

**Untersuchungen zur Polyaminbiosynthese bei Diatomeen:
Charakterisierung einer Thermosperminsynthese 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. Sterner |
| 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	Ethylendiamintetraacetat
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-</i> Massenspektrometer
min	Minute

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

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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

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

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.

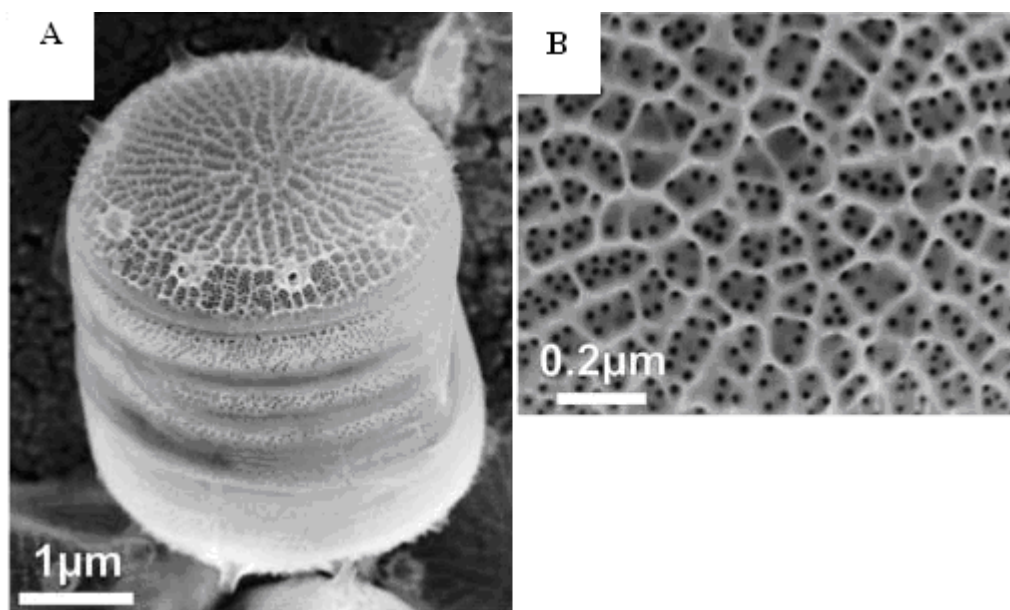


Abb. 1-1: A) Abbildung der Diatomee *Thalassiosira pseudonana* (Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Schale).

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 ineinandergestülpten Schalenhälften, gleichsam einer Petrischale, wobei die größere Hälfte (Epitheka) die kleinere Hälfte (Hypotheka) 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 Hypotheka, durch Biomineralisierung gebildet. Die Bildung der neuen Hypotheka geschieht in einem Zellkompartiment, dem SDV (*Silica deposition vesicle*), das 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 Exocytose 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.

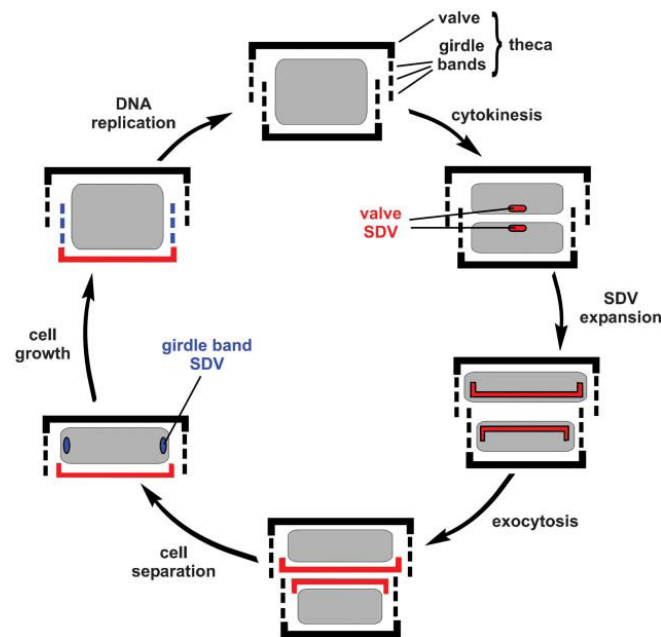


Abb. 1-2: Schematische Darstellung eines Zellzyklus einer Diatomee. Die silifizierte Zellwand wurde schwarz dargestellt, der Protoplast grau, die neugebildete Hypotheka rot hervorgehoben. (Bildquelle: SUMPER und KRÖGER, 2004)

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_2 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_2 , 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_2 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 CaCO_3 bei *Bacillus cereus*), Pflanzen (Bildung von Phytolithen bei monokotylen Pflanzen) und Tieren (Bildung von silikathaltigen Skleriten bei Kiesel Schwämmen, 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 μm 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 *Cylindrotheka fusiformis*

Seit den 1990er Jahre wurden von KRÖGER und SUMPER die Zusammensetzung von Diatomeenzellwänden, speziell von *Cylindrotheka 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 BIDDLE 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 apparente molekulare Masse zwischen 4 bis 17 kDa und hatten die Fähigkeit *in vitro* in einer phosphatgepufferten $\text{Si}(\text{OH})_4$ -Lösung das Silikat zu präzipitieren, wobei Silikat/Silaffin-haltige Nanokügelchen entstanden, die einen Durchmesser von 500–700 nm aufwiesen (KRÖGER et al., 1999). Die Strukturen zweier Silaffine, Sil1-A₁ und Sil1-A₂ von *C. fusiformis*, wurden von KRÖGER et al. (1999 und 2001) genauer untersucht. Dabei wurde herausgefunden, dass die Silaffine Sil1-A₁ bzw. Sil1-A₂ 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-A₁, ϵ -N,N-Dimethyllysin bei Sil1-A₁ und Sil1-A₂, 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).

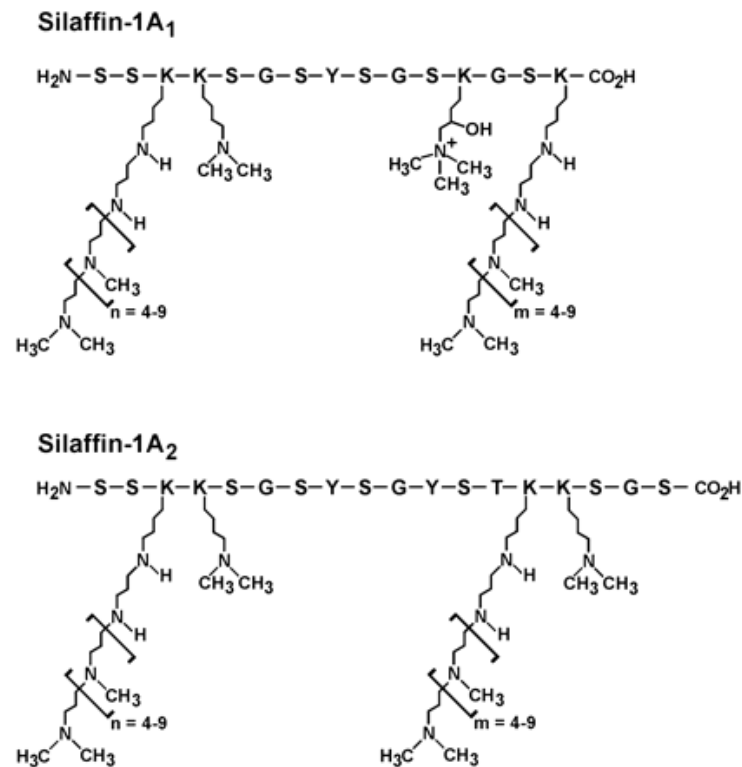


Abb. 1-3:

Aufbau der Silaffine – 1A₁ und 1A₂ 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-1A₁ 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-1A₁ und natSil-1A₂ hatte natSil-2 von *C. fusiformis* keine Befähigung zur Silikatpräzipitationen. Wurden natSil-1A₂ 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-1A₁/ Sil-1A₂ 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 Si(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 *Nitzschia 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 wailessii*) entstehen. Dabei wird vermutet, dass innerhalb des SDV eine enggepackten Anordnung von Polyamintröpfchen besteht, die innerhalb einer wässrigen Si(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 Tröpfchen kommt, wodurch noch feinere Silikatstrukturen aufgrund der Polymerisierung der Monokieselsäure zu Silikat an den Grenzflächen der Tröpfchen entstehen.

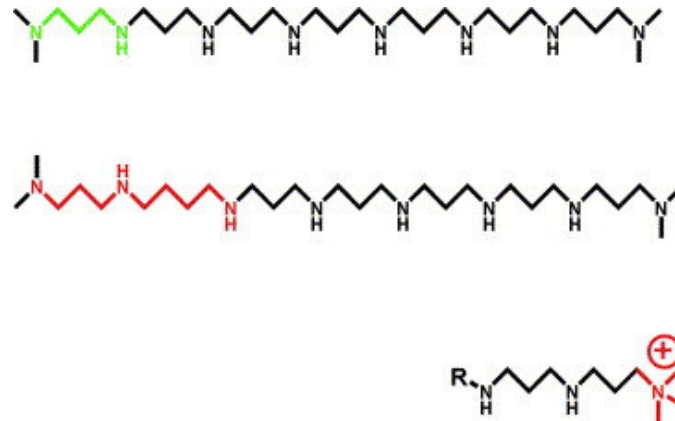


Abb. 1-4: Strukturen von freien langkettigen Polyaminen, die aus der Schale von *T. pseudonana* isoliert und analysiert wurden (SUMPER et al., 2005).

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-Fractionen 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 oxidativen 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 (Hydroxyputrescinylin) ist, das eine ungewöhnliche Aminosäuremodifikation bei dem eukaryontischen Translations-initiationsfaktor eIF5A ist. In der Tat konnte bei spermidinsynthesedefizienten 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-Adenosylmethionindecaboxylasegen 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 Ornithindecaboxylaseaktivität führt, während geringe Polyaminkonzentrationen zu einer erhöhten Ornithindecaboxylaseaktivität führen. Zudem fördern erhöhte Polyaminkonzentrationen die Translation eines Antizyms (AZ), das an Ornithindecaboxylase (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-Adenosylmethionindecaboxylase 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 Ornithindecaboxylase zu Putrescin decarboxyliert wird. In einigen Bakterien und bei *Arabidopsis thaliana*, bei denen es keine Ornithindecaboxylase gibt, wird Arginin durch eine Arginindecaboxylase 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).

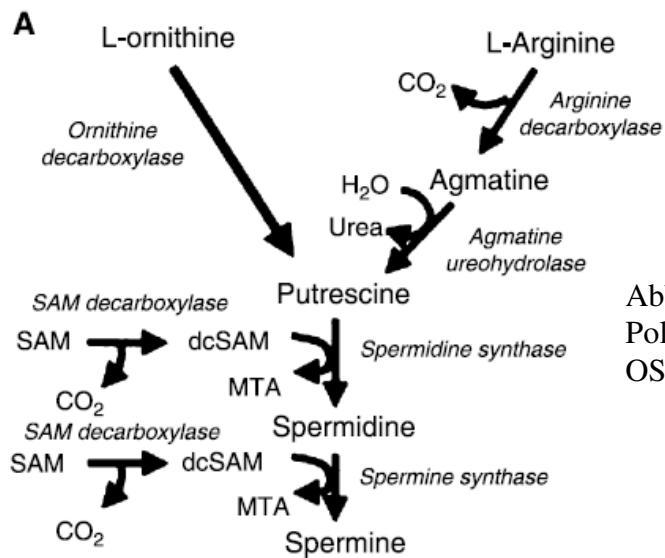


Abb. 1-5/A: Pflanzlicher bzw. bakterieller Polyaminsyntheseweg (Abbildung von OSHIMA, 2007).

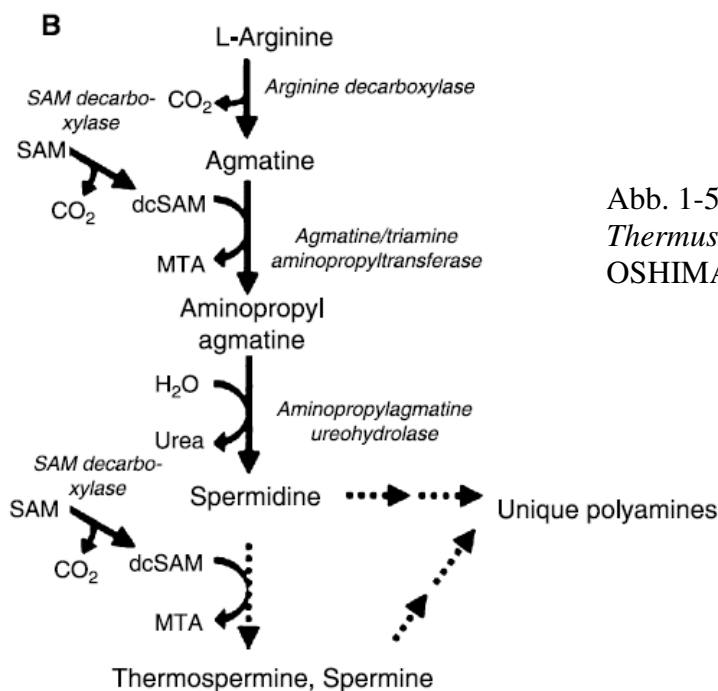


Abb. 1-5/B: Polyaminsyntheseweg bei *Thermus thermophilus* (Abbildung von OSHIMA, 2007).

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 Caldohexamin 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.

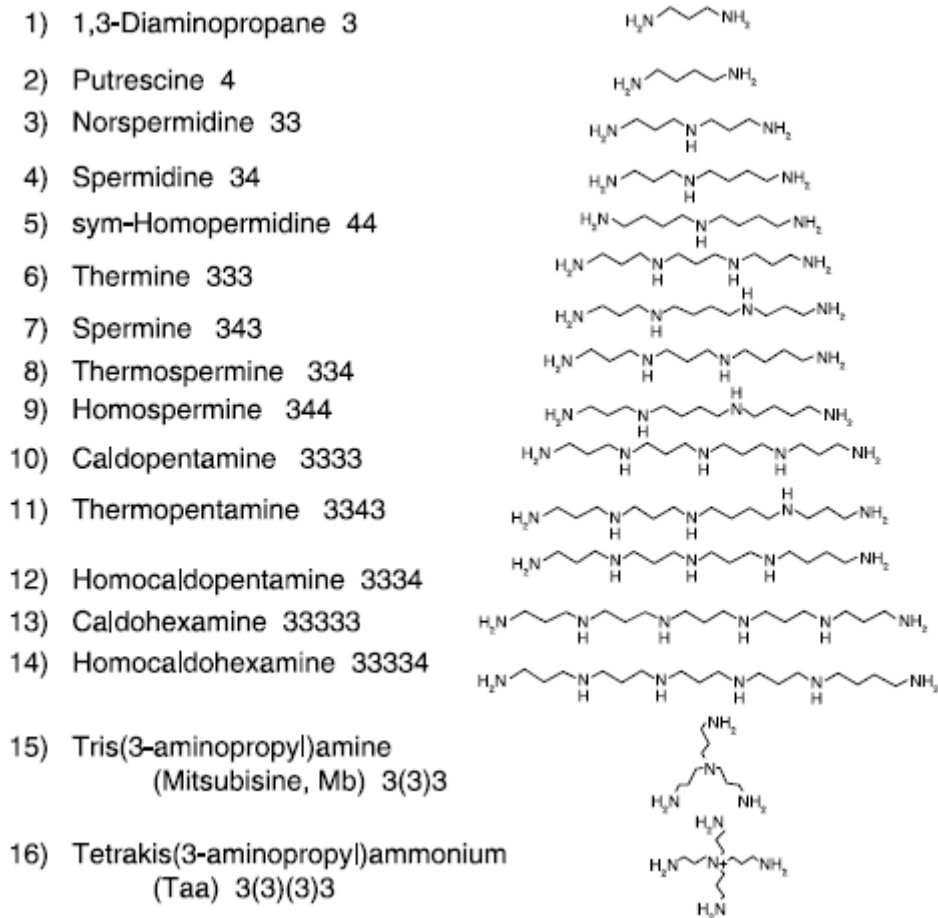


Abb. 1-6: Überblick über die 16 nachgewiesenen Polyamine von *T. thermophilus* (Abbildung von OSHIMA, 2007).

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, Sperminsynthase 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 Sperminsynthase 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 sperminsynthesedefizienten 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 (Nukleotidbindemotiv) 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.

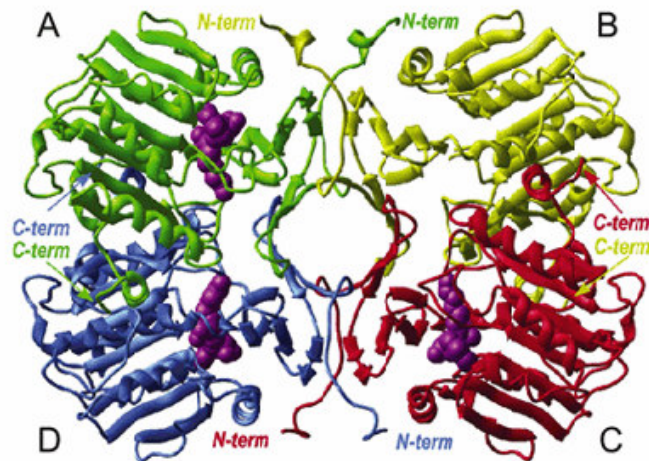


Abb. 1-7: Aufbau der Spermidinsynthase von *T. maritima* in einer Schleifenstruktur: Die Untereinheiten A, B, C, D wurden in grün, gelb, rot und blau dargestellt, der Multisubstratinhibitor AdoDATO magentafarben angegeben (Abbildung von KOROLEV et al., 2002).

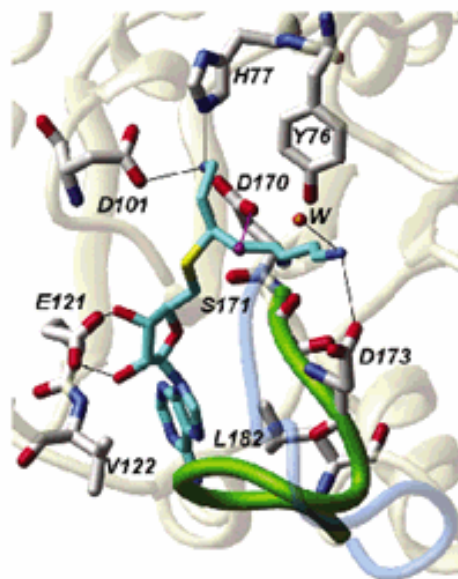


Abb. 1-8: Struktur des aktiven Zentrums von der Spermidinsynthase aus *T. maritima*: Die katalytisch bedeutsamen Aminosäurereste, sowie AdoDATO wurden in „ball and stick“-Darstellung hervorgehoben, W ist ein Wassermolekül, das deprotonierende Asp170 in Interaktion mit der Position, die die anzugreifende 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 ₂ 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 H₂O

LB-Medium für Blue/White-Screening

Zusammensetzung wie LB-Festmedium mit 0,5 mM IPTG (Stammlösung: 1 M in H₂O, 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 ₂ O

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

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

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

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

Süßwassermedium (*Navicula pellicullosa*)

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

0,27 mg	$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
0,24 mg	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
0,42 mg	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
0,97 mg	$\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$
2,45 mg	Dinatriumtartrat-dihydrat
0,36 mg	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$
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 SinglesTM von Novagen

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

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

E. coli B121 (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*, *Cylindrotheka 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.

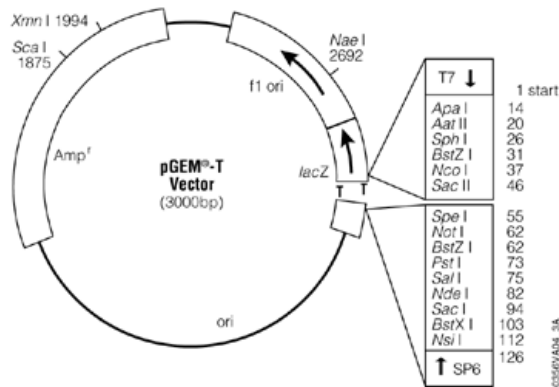


Abb.2-1: Plasmidkarte des pGEM-T-Vektors für TA-Klonierungen.
(Quelle: Promega-Homepage)

Für heterologe Genexpression in *E. coli* B121 (DE3) unter Kontrolle eines T7-Promoters wurde der pET-20b Vektor von Novagen verwendet.

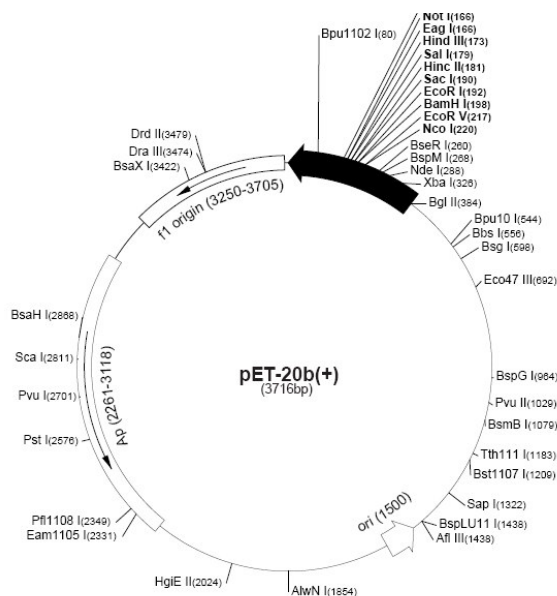


Abb.2-2: Plasmidkarte vom pET20-b Vektor.
(Quelle: Technical Bulletin 037 12/98 von Novagen.)

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

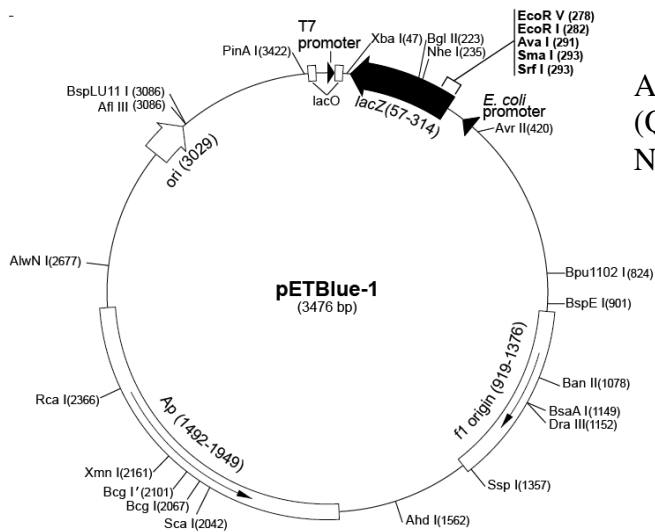


Abb.2-3: Plasmidkarte vom pETBlue-1.
(Quelle: Technical Bulletin 258 12/99 von Novagen.)

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

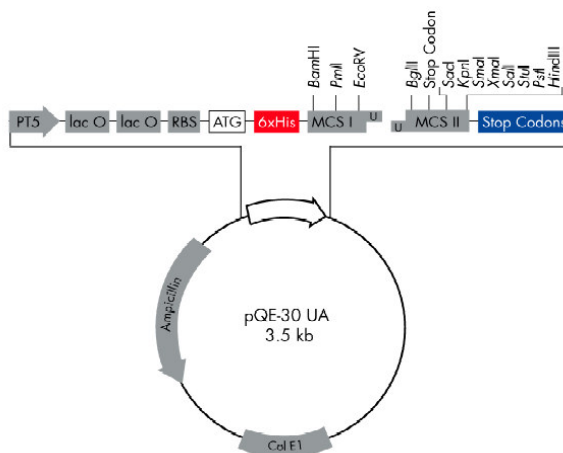


Abb.2-4: Plasmidkarte mit
Klonierungsregion vom pQE-30 UA-
Vektor.
(Quelle: Homepage von Qiagen)

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-Promoters von *T. pseudonana* und wird durch Anwesenheit von NO_3^- im Medium aktiviert bzw. durch Anwesenheit von NH_4^+ im Medium supprimiert.

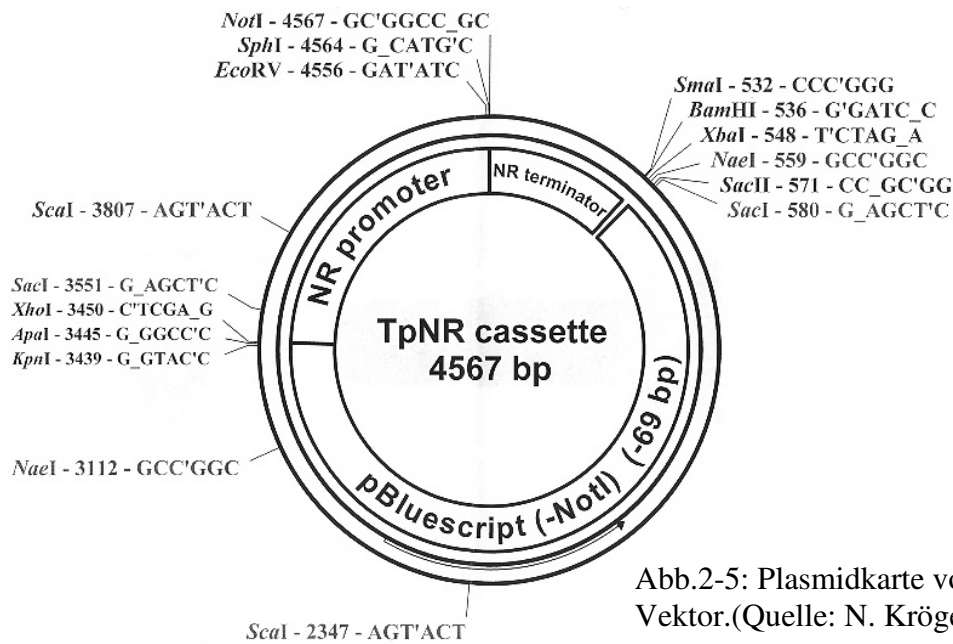


Abb.2-5: Plasmidkarte vom TpNR.-Vektor.(Quelle: N. Kröger)

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

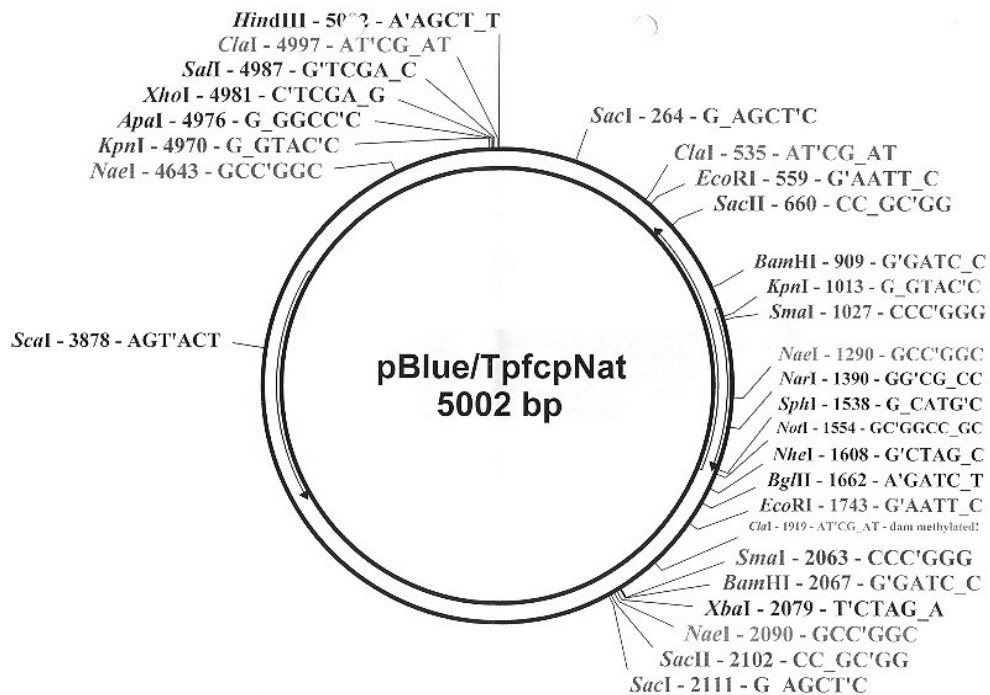


Abb.2-6: Plasmidkarte des pBlue/TpfcNat-Vektors.
(Quelle: N. Kröger)

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 ₂
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 ₂
10 mM	KCl
15%	Glycerin

Sterilfiltrieren.

20x SSC (Southern-Blot):

3 M	NaCl
0,3 M	Na ₃ 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-Acetat, pH 6

Southern-Blot-Waschpuffer 1: 1x SSC, 0.1% SDS

Southern-Blot-Waschpuffer 2: 0,1x SSC, 0.1% SDS

Prä- 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 ₂ O	5,4	5,2
Gesamtvolumen	10	10

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

2 M	Tris
50 mM	EDTA
1 M	Essigsäure
H ₂ O ad 1 l	

10x DNA-Ladepuffer (für Agarosegelelektrophorese):

5 %	Glycerin
10 mM	EDTA
0,25%	Bromphenolblau

2x Bindepuffer für mRNA-Isolierung mit Oligo-dT₂₅-Beads:

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

Waschpuffer für mRNA-Isolierung mit Oligo-dT₂₅-Beads:

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

DEPC-behandeltes H₂O (für den Gebrauch mit RNA):

0,1% (v/v) DEPC in Millipore-H₂O 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
30% Acrylamid (ml)	1,5	2	2,6	3	3,75
H ₂ 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 ₂ 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_3BO_3

10 % Methanol

Mit NaOH auf pH 9 einstellen

2.1.6. Verwendete Enzyme, Kits und Hilfsmittel für die Molekularbiologie

Verwendete Größenbestimmungsstandards für Agarosegelelektrophorese und PAGE

a) Für Agarosegelelektrophorese

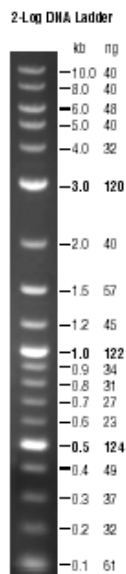


Abb. 2-7: 1 µg aufgetragene 2-Log DNA Leiter von NEB in einem 1%igen Agarosegel (Quelle: NEB).

b) Für SDS-PAGE

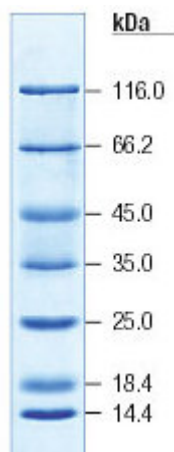


Abb. 2-8: Für die SDS-PAGE verwendeter Proteinstandard von Fermentas (Quelle: Fermentas).

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
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	NEB
Phusion TM -DNA-Polymerase	Finnzymes/NEB
Superscript III TM (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
[³⁵ S]-dATP	GE-Healthcare
[¹⁴ C]-Spermidin	GE-Healthcare
[¹⁴ C]-Putrescin	GE-Healthcare
[¹⁴ 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

Gerätebezeichnung	Modell	Hersteller
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

50×10^7 *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-H₂O 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)₂₅ eingesetzt. Es wurden 30 µl Dynal-dT₂₅-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-dT₂₅ 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-dT₂₅-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. H₂O 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 Agarosegelelektrophorese das gewünschte DNA-Fragment 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. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese 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 eingeformten 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 H₂O verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Es wird davon ausgegangen, dass eine reine DNA-Lösung ein OD_{260nm}/OD_{280nm}-Verhältnis von 1,8-2,0 aufweist.

Die Konzentration wird durch folgende Formel berechnet:

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

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. B121 (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_{600nm} 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-Aliquote verteilt und in flüssigen N₂ 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 hitzestabiler 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. Desweiteren 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-dT₂₅ 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-dT₂₅ 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 dass 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 *SphI* und *SacI* verdaut. Parallel dazu wurde ein pET-20b/41289-Vektor mit *SphI* und *SacI* verdaut und aufgereinigt. Durch eine Ligationsreaktion wurde das mutagenisierte Insert über die *SacI*- und *SphI*-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/TpfcNat, verwendet. Das pBlue/TpfcNat-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 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 μl EtOH resuspendiert und danach 1 min zentrifugiert. Das Wolfram-Pellet wurde in 250 μl EtOH aufgenommen und für 1-2 min gevortext. Die Suspension wurde danach für 1 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann jeweils 3x mit 250 μl sterilem Wasser gewaschen, 1 min zentrifugiert, und nach diesem Waschvorgang in 150 μl Wasser resuspendiert und in 50 μl -Aliquoten aufgeteilt.

b) Beschichtung der Wolfram-Partikel:

Zu je 50 μl wurden unter kontinuierlichem vortexen zugegeben: 5 μl (5 μg + 5 μg Expressions- und Selektionsplasmid), 50 μl 2,5 M CaCl_2 , 20 μl 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 μl EtOH aufgenommen und nochmals für 1 min gevortext. Die Wolfram-Partikel wurden mittels 10 sec Zentrifugation pelletiert und in 50 μl EtOH aufgenommen und bis zur Transformation auf Eis aufbewahrt. Pro Macrocarrier wurden 10 μl (~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 Stoppingscreen nachfolgend dem Macrocarrier angebracht.

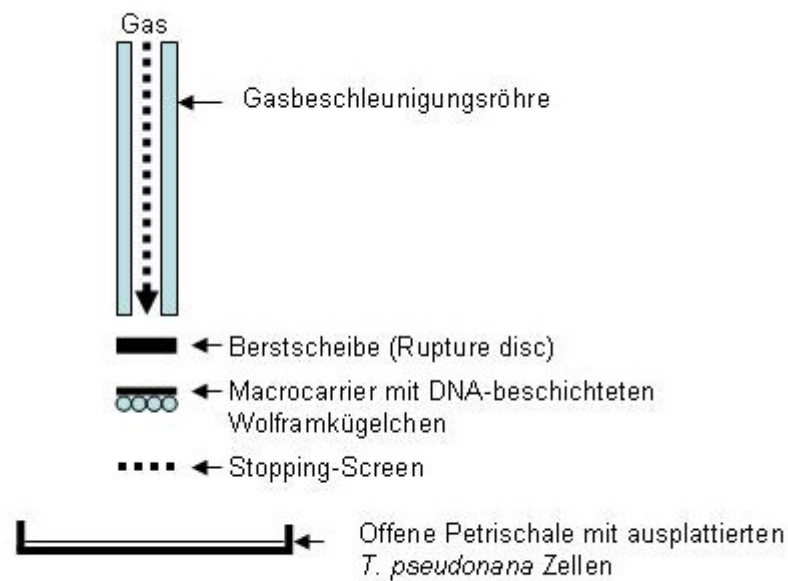


Abb.2-9: Schematischer Aufbau einer PDS-1000/He Particle Delivery System von Biorad.

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 1×10^6 Zellen/ml kultiviert. 1×10^8 Zellen wurden abzentrifugiert und diese auf eine MW1-Agarplatte kreisförmig zu einem Rasen ($d=5\text{cm}$) 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/ NH_4^+ -Medium aufgenommen (Zelldichte: 1×10^6 Zellen/ml). Nach 24h Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und auf eine MW1/ NH_4^+ /ClonNat-Agarplatte (Selektion: $100 \mu\text{g}$ 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/ NH_4^+ -Medium angeimpft und zu einer Zelldichte von 500.000 bis 1000.000 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 Schnelldachweis 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 10⁵ Zellen) in stickstofffreiem MW1 Medium umgesetzt. Nach 24 h wurde der Kultur NO₃⁻ 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 Schnelldachweis 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 *Xho*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 mJxcm²), 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 Methylenblaufärbelösung 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 ³⁵S-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_{260nm}= 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-(³⁵S)-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 ³⁵S-markierten Sonde erfolgte im β-Counter mit dem ³⁵S-Programm.

2.3.10. DNA-DNA-Hybridisierung mit ³⁵S-markierter DNA-Sonde

Die geblottete Nylonmembran wurde in einem 50 ml-Falconröhrchen überführt und mit 3 ml Prähybridisierungslösung bei 65°C für 6 h in einem Hybridisierungssofen 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 6×10^6 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 Hybridisierungssofen ein zweites Mal gewaschen wurde. Nach diesen Waschschritten 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 MgCl₂ (pH 7,5) und 500 µl zellfreien Rohextrakt von überexprimierter S-Adenosylmethionindecarboxylase 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 Hydrolyseungsreaktion 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 H₂O gelöst und mit NaOH auf pH 7 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.4.2. SDS- und Native Polyacrylamidgelelektrophorese (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 Probenaschen 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 Probenasche 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 cm² Gelfläche für 1 h betrieben.

Danach wurde der Blot abgebaut und die Membran mit Coomassie-Färbelösung (0,1% Coomassie Brilliant 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 Äquilibration 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_{224nm} 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 $d = 1$ 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 ($d = 0,3$ mm) gevortext bzw. geschüttelt, mit dem Ziel die Zellen zu öffnen. Das Zellysate 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 präzipitieren 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) [1,4-¹⁴C]-Putrescin, [¹⁴C]Spermidin bzw. [¹⁴C]-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 ¹⁴C-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 ¹⁴C-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 H₂O 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 Zellysatz abzentrifugiert und der Überstand in einem Rundkolben überführt und die HCl mittels Rotationsverdampfer entfernt. Der im Rundkolben zurückgebliebene Rückstand wurde in 10 ml H₂O aufgenommen und mit NaOH neutralisiert und durch einen Papierfilter filtriert. Der neutralisierte und filtrierte Extrakt wurde mit 1 l H₂O 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 H₂O, 3 Bettvolumen 50 mM Ammoniumacetat gewaschen, die Eluierung der Polyamine erfolgte mit 3 Säulenvolumen 2 M NH₃-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 H₂O, 10 µl 500 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7), 10 µl 1 M NaCNBH₃ und 10 µl 1 M Acetaldehyd versetzt und die Perethylierungsreaktion über Nacht bei 25°C durchgeführt. Die Probe wurde danach zweimal mit 1 Vol CHCl₃ extrahiert, wobei die untere Phase gesammelt wurde. Mit offenem Deckel wurde das Reaktionsgefäß mit der Probe zugluftsicher stehengelassen, bis das CHCl₃ 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-Aminopropyltransferasesequenzen 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 hypothesisiert, 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).

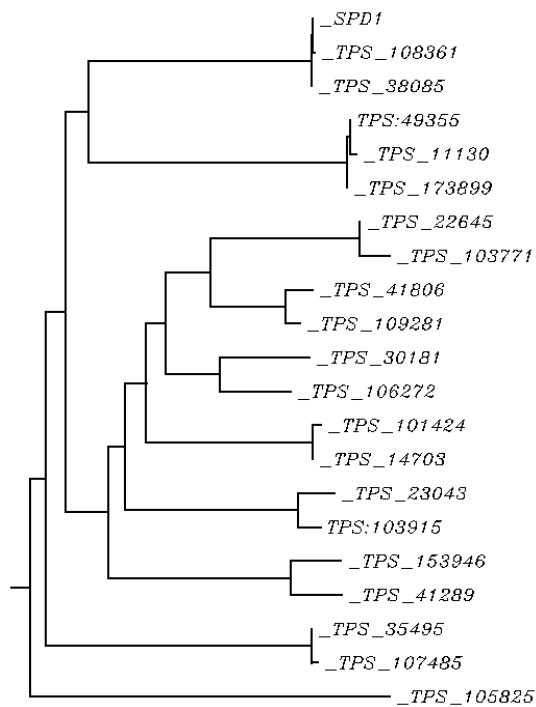


Abb. 3-1: Ergebnis des gegenseitigen Alignments der 21 Genmodelle putativer N-Aminopropyltransferasesequenzen zum Nachweis von Homologien.

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_35489* unter Kulturbedingungen transkribiert werden, jedoch nicht die Sequenzen *TPS_23043* bzw. *TPS_105825* (siehe Abb. 3-2).

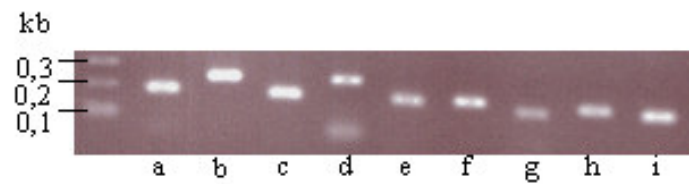


Abb. 3-2: Erhaltene PCR-Amplifikate nach durchgeführter RT-PCR zum Nachweis der Transkription. (a) *TPS_108361*, (b) *TPS_41289*, (c) *TPS_101424*, (d) *TPS_106272*, (e) *TPS_41806*, (f) *TPS_11130*, (g) *TPS_22645*, (h) *TPS_35489*, (i) β -Tubulingen (Positivkontrolle).

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 Dendrogramm 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 [^{14}C]-Spermidin, [^{14}C]-Putrescin, [^{14}C]-1,3-Diaminopropan und dcSAM keinerlei Aktivität gemessen werden konnte (diese Daten sind hier nicht weiter aufgeführt).

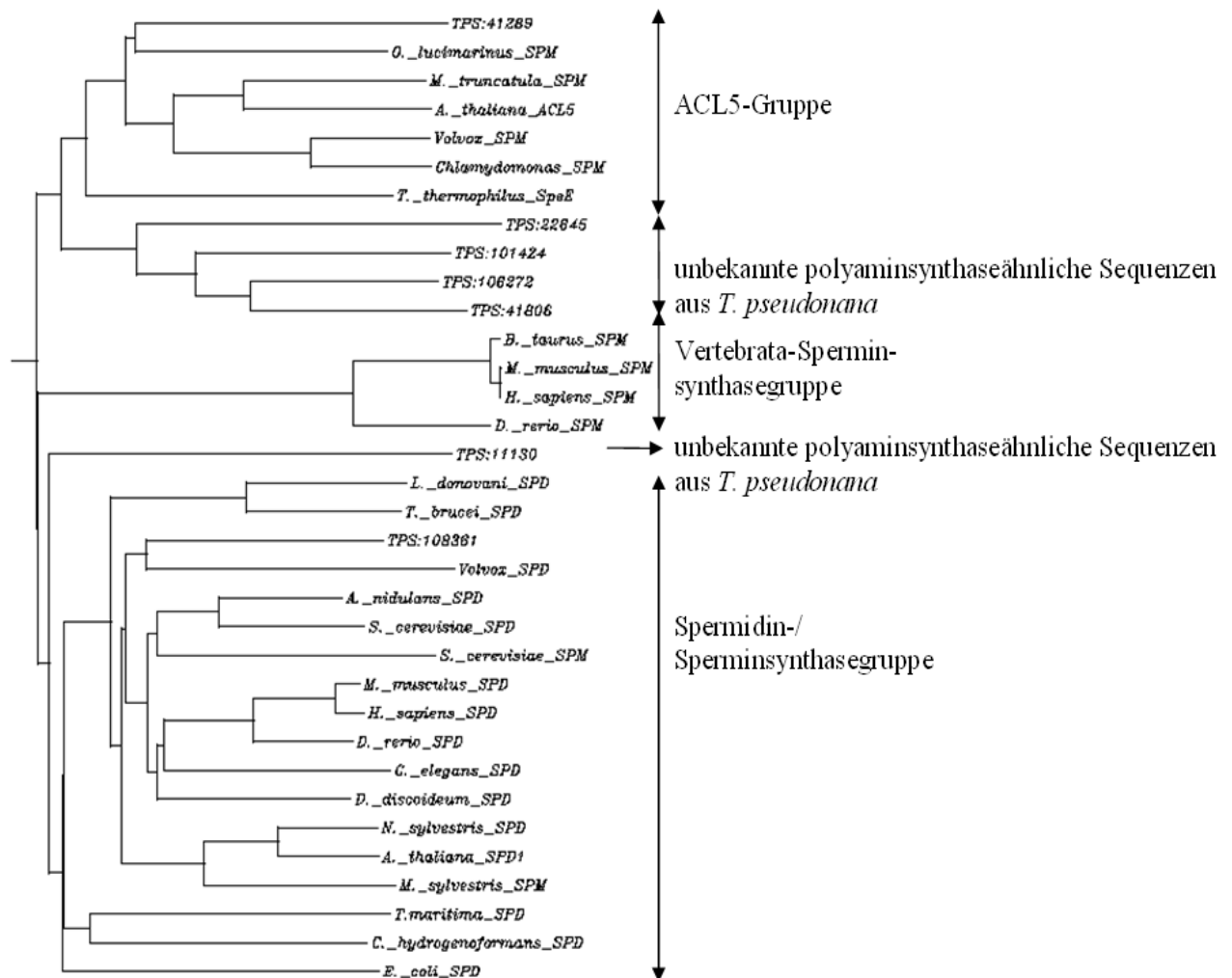


Abb. 3-3: Mit Clustalw erstelltes Dendrogramm zum Homologienachweis verschiedener N-Aminopropyltransferase-Aminosäuresequenzen (*Ostreococcus lucimarinus_SPM* (Akzession: XP_001418368), *Medicago truncatula_SPM* (Akzession: ABE91714), *Arabidopsis thaliana_ACL5* (Akzession: BAB83652), *Volvox carteri_SPM* (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 cerevisia_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), *Carboxydotherrhus hydrogenofomans*_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 vorhandenen 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) 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 Spermidinsynthese 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 ($VL^V/IGGGDGG-X-LRE$) 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 Aspartat auch bei den Sequenzen TPS_108361 und TPS_41289 identifiziert werden, die bei allen N-Aminopropyltransferasen konserviert vorkommen (Kennzeichnung in Abb. 3-4: „■“).

<i>A. thaliana</i> _SPD1	-----MDAKETSATDLKRPREEDDNGGAATMETENGDKKEPACFSTVIP
TPS_108361	MAAFAPQHSIVALTTLVSICLACTVTASSSSTPTAPPTPLTHNMSDFPPPQDYSHLIID
<i>C. elegans</i> _SPD	-----MNKLHKGWTFEFSPDDLEKMNGASDEEP---TKVLK
<i>S. cerevisiae</i> _SPM	-----MVNNSQHP----YIKD
<i>T. maritima</i> _SPD	-----MRTLKELERELQPRQH
<i>A. thaliana</i> _ACL5	-----MGEAVEVMFGNGFPEIHKATSPTQTLHSNQDC
<i>T. thermophilus</i> _SpeE	-----MDYG
TPS_41289	MHIHNL LPSLSLAFTSRQSPYRLHHQRKPFSSSSTRMQNNTSMADQTDDEEII TEQRA

	+
<i>A. thaliana</i> _SPD1	GWFSMSMP-MWPGEAHSLKVEKVLFGKSDYQDVIVFQSATYKVLVLGGVIGVITETEDFC
TPS_108361	NWHERGP-LWPGQSFSIQIEKILYHQKSLFDVLVFDSTNHKVLVLGGVIGVITCTEDH
<i>C. elegans</i> _SPD	SDGQEMGG-AWPGQAFSLQVKKVLFHEKSKYQDVLVFESTTYENVLVLGGVIGVQATERDEF
<i>S. cerevisiae</i> _SPM	GWFREINDKSFPGQAFMTIVDSILYEARSEFCILIFRNKVYCTVLVLGGVIGVQCTEFDEF
<i>T. maritima</i> _SPD	LWYFEYYTGNNVG--LFMKMNRVIYSGSDIRIDIFENPDLEVVFALGIGITMTETEDF
<i>A. thaliana</i> _ACL5	HWYETID---DDLKWSFALNSVLHQGTSEYQDIALLDTKRFKVLVLGGKMQSAERDEF
<i>T. thermophilus</i> _SpeE	MYFFEHVIT---PYETLVRRMERVIASGKTPFDYFLFESKGFKVLIIKDKVQSTERDEF
TPS_41289	KSSFRYVEAVAPGLNLDMLHTILHTAVSDFGEVQVIES-YFERTLVTGSKTQSAHDEF

	■ +	+	+
<i>A. thaliana</i> _SPD1	AQEMITLPLCS-----IPNPKKVLVLGGDGGVLRVARHASTEQIDMCEIK		
TPS_108361	SQEMMALIPLYS-----HPNPKKVLVLGGDGGVLRRIARHPGVEICTCELK		
<i>C. elegans</i> _SPD	SQEMLALPMAFA-----HPDKKRVLLI GGCGGGLREVILKHESVEKVTMCEIE		
<i>S. cerevisiae</i> _SPM	AQEMITLIAMFA-----HSNPKKRVLLI GGCGGGLREVAKHSCVEDITMVEIS		

<i>T.maritima_SPD</i>	MHEMLAIVPMFL-----HPNPKKVLII GGGDGGTLREVLKHDSVEKAILCEVIG
<i>A.thaliana_ACL5</i>	IHECLIPALLF-----HPNPKTVFIMGGGEGSAAREILKHTTIEKVVMCDIHQ
<i>T.thermophilus_SpeE</i>	IHEITLVHPAMLT-----HPEPKRVLIVGGGEGATLREVLKHPTVEKAVMVDIIG
TPS_41289	VHESLVHPALFWSAILSGESGQGGAPKSVFIGGGELATAREVLRHSTIERCVMVDIIP
<i>A.thaliana_SPD1</i>	MVVDVSKQFFPDVAIG--YEDPRVNLVIGDGVAFLKN---AAEGSYDAVIVDSDDP---
TPS_108361	DVIDVSKKYLFPMAKG--FDDPRVKVHIMDGAKFME-----ENQSADFVIVTDSDDP---
<i>C.elegans_SPD</i>	MVIDVAKKFLPGMSCG--FSDPKLDLFCGDGFELK-----NHKNEFVVIITDSDDP---
<i>S.cerevisiae_SPM</i>	SVIELSRKFLPTLSNGA-FDDERLDLKLCDGFKFLQDIGASDVHKKFVVIITDSDDP---
<i>T.maritima_SPD</i>	LVIEARKYLKQTS CG--FDDPRAEIVIANGAEYVR---KFKNEFVVIITDSDDP---
<i>A.thaliana_ACL5</i>	EVVDFCRFLTVNSD-AFCNKKLELVIKDAKAELE-----KREEKFVVIITDSDDP---
<i>T.thermophilus_SpeE</i>	ELVEVAKRHMPWEHQGA-FDDPRAVLVIDDARAYLE-----RTEERYVVIITDSDDP---
TPS_41289	AVVNCKKYLPEWGGQAVIDHPKMEYIVGDHAKYLMETN---EKFVVIITDSDDP-IE
<i>A.thaliana_SPD1</i>	IGPAKELEKPFQ-SVARALRPGGVVCTQA--ESLWLHMDIIEDIVS-----
TPS_108361	VGPASVLEETPFYK-ALHGSRLREGSIICIQG--ECVWLHVDLIQPLIK-----
<i>C.elegans_SPD</i>	VGPAESLFQGSYYE-LLRDALKEDGILSSQG--ESVWLHLPLIAHLVA-----
<i>S.cerevisiae_SPM</i>	EGPAEAFFQERYFE-LLKDALNPNGVIMQSS-ENFWLNLEYLHDLKN-----
<i>T.maritima_SPD</i>	AGQGGHLETEFYQ-ACYDALKEDGVFSAET--EDPFYDIGWFKLAYR-----
<i>A.thaliana_ACL5</i>	GGFCYQLYTKSFYQNILKPKLSPNGIFVTQAGPAGIFTHKEVFTSIYN-----
<i>T.thermophilus_SpeE</i>	DNPARLLYTFEYFR-LVKAHLNPGGVMGQAG-MILLTHHRVHPVVHR-----
TPS_41289	AGFGVALYTQEFYQRAAEVLNKPNGVFTVQAGSADFVPHPHAFPEDENDANKETCCFS
<i>A.thaliana_SPD1</i>	NCREIFKGSVN YAWTSVPTYPGSGVIGFMLCSTEGPDVDFKHPLNPID-----
TPS_108361	AIQPLET-TVEYAYCTIPSYPSGQIGFIIATKGG-----KGCNRPVR-----
<i>C.elegans_SPD</i>	FNRKIFP-AVTYQSIVSYPSGSMGYLICAKNANRDVTTPARTLTA-----
<i>S.cerevisiae_SPM</i>	TAKKVP-NTEYCYTMVPTYSQGLLIVCSNNAN---IPLNIPQR-----
<i>T.maritima_SPD</i>	RISKVP-ITRVYLGFMPTYPGSMWSYTFASKGID----PIKDFDP-----
<i>A.thaliana_ACL5</i>	TMKQVFK---YVKAYTAHVPSFADTWGVWMA SDHEFDVEVDEMRR-----
<i>T.thermophilus_SpeE</i>	TVREAFR---YVRSYKNHIGFGLNFGFLASDAFDPAAFSEGVI-----
TPS_41289	PIKNTLGTVFDHAIPYSCPIASFGEWGYVMAFNGDPSQGRKLADLSRESVDEIEERIR
<i>A.thaliana_SPD1</i>	-----ESSSKSNGPDKFYNAEIHSAAFCKPSFAKKVLESKAN----
TPS_108361	-----APEESVQKEIKYYTPDIHSAAFVCPAFAQRAIFGGLSK----
<i>C.elegans_SPD</i>	-----EQIKALN--IRFYNSEVHKAAFVCPQFVKNALE-----
<i>S.cerevisiae_SPM</i>	-----KISEQEKGKIKYYNPQIHSSAFVCP TWADKVLIN-----
<i>T.maritima_SPD</i>	-----EKVRKFNKEIKYYNEVHVASFAPNPFVKELGLM-----
<i>A.thaliana_ACL5</i>	-----IEER-VNGEIMYLNAPSFVSATINKTISLALKEKETEYSE
<i>T.thermophilus_SpeE</i>	-----ARIRERNLARHLTAPYLEAMFVCPKDLLEALEKETMVSTD
TPS_41289	LVPGVPHRYRSKGVKRAIKGNEVGAEVCKHYDGVSHRRLFAKSKPLREAMKSDERIMTE

<i>A.thaliana_SPD1</i>	-----
TPS_108361	-----
<i>C.elegans_SPD</i>	-----
<i>S.cerevisiae_SPM</i>	-----
<i>T.maritima_SPD</i>	-----
<i>A.thaliana_ACL5</i>	ENARFIHGHSVAYRHI---
<i>T.thermophilus_SpeE</i>	QNPFFYVTPEGEARQAPYKG
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*, Sperminsynthase 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 Restriktionsenzymen *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* B121 (DE3) transformiert. Der neuentstandene Vektor codierte für ein Fusionsprotein mit C-terminalem Hexahistidintag, der unter Kontrolle eines T7-Promoters stand (siehe Abb. 3-5).

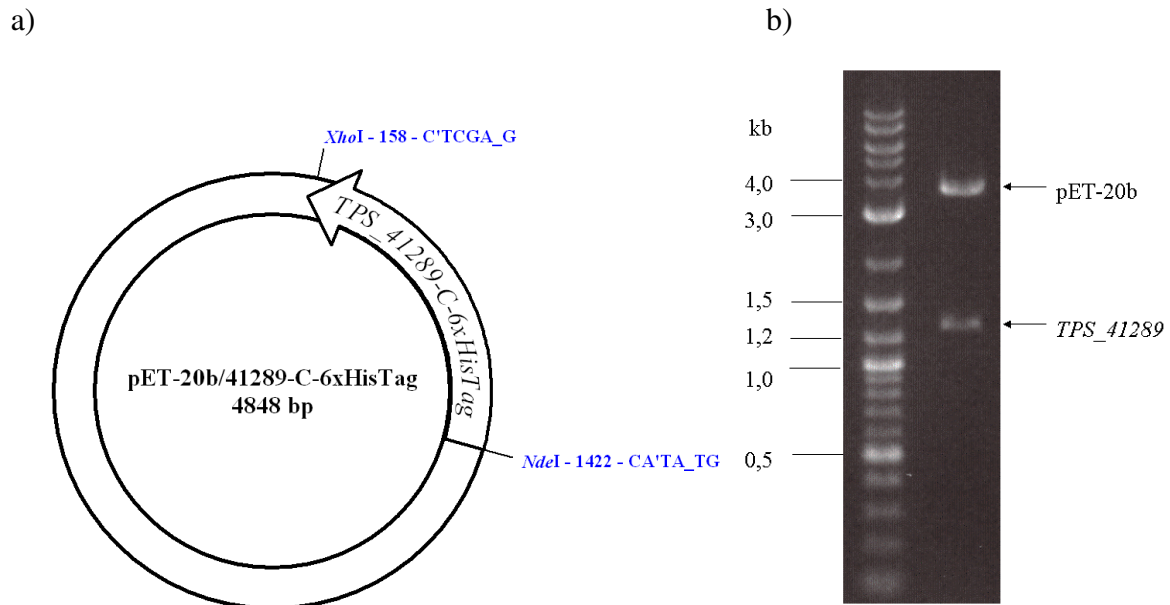


Abb. 3-5: a) Schematische Darstellung des konstruierten pET-20b/41289-C-6xHisTag-Vektors, mit eingezeichneter Klonierungsstelle *NdeI* und *XhoI*. b) Mit *NdeI* und *XhoI* restringierte pET-20b/41289-C-6xHisTag-DNA im 1 %igen Agarosegel (pET-20b-Fragment = 3584 bp/TPS_41289-Fragment = 1264 bp). Die Leserichtung 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.

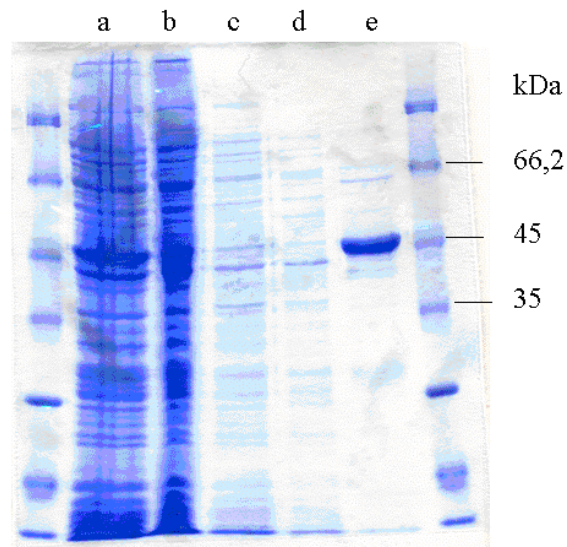


Abb. 3-6: Analytische 12%ige SDS-PAGE zum Nachweis der Ni-NTA-Aufreinigung des rekombinanten 6xHis-Tag Proteins (TPS_41289) . a) Rohextrakt, b) Säulendurchfluss, c) 10 Säulenvolumen 10 mM Imidazol (Waschpuffer), d) 10 Säulenvolumen 20 mM Imidazol (Waschpuffer), e) 3 Säulenvolumen 250 mM Imidazol (Elutionspuffer).

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:

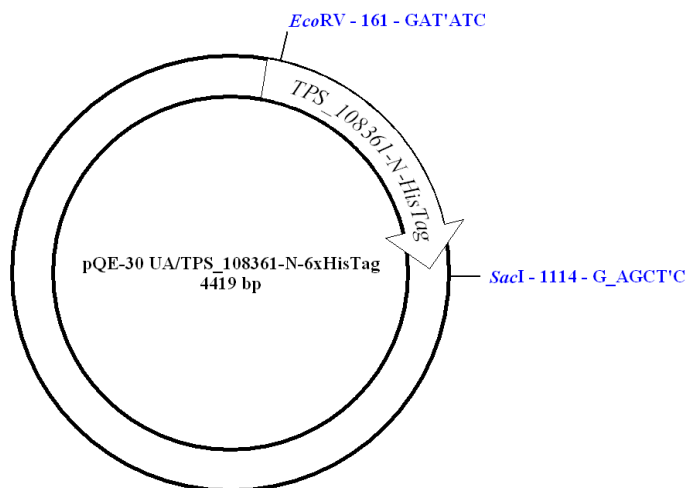
```
Original      MAAFAPQHSIVVALTLVSICLACTVTASSSSTPTAPPTPLTHNMSDFPPPQDYSHLIID
1.Sequenz      XXTVTASS
               *****
2.Sequenz      XXXFAPQX-I
               **** *
```

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)

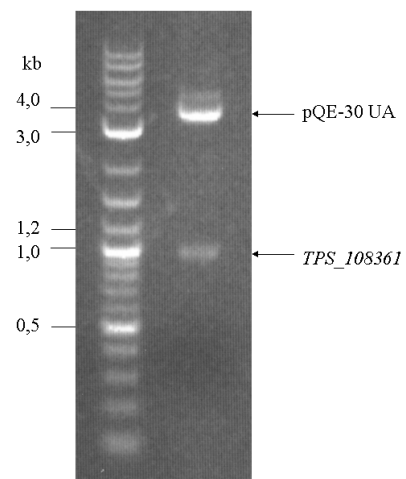


Abb. 3-8: a) Schematische Darstellung des pQE-30 UA/N-6xHisTag-108361-Vektors.

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 $OD_{600nm} = 0,6$ 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.

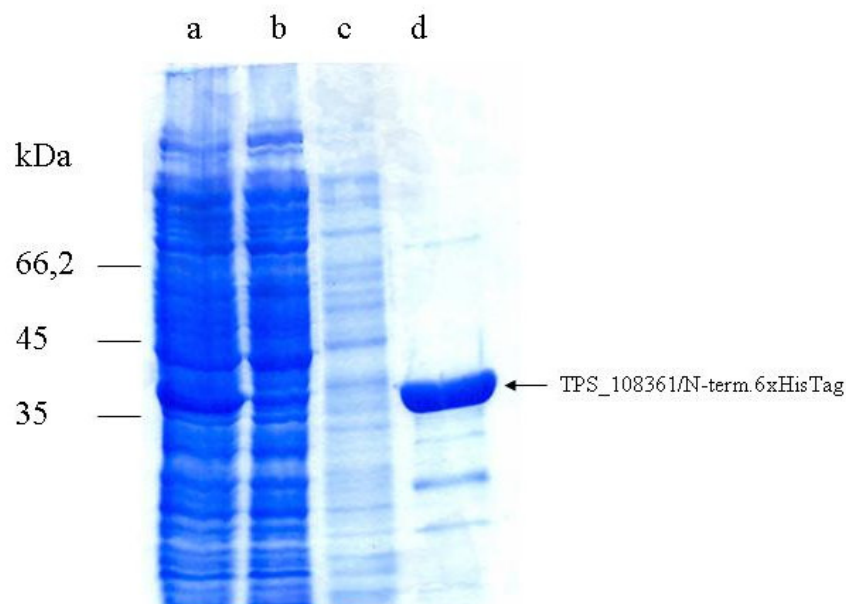


Abb. 3-9: Analytische 12%iges SDS-Gel zum Nachweis der Aufreinigung des rekombinanten TPS_108361 mit N-terminalem Hexahistintag. a) Rohextrakt, b) Durchfluss, c) 20 mM Imidazol (Waschpuffer), d) 250 mM (Elutionspuffer).

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 Spermidinsynthese 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 [¹⁴C]-Polyamine als Substrat angeboten, wobei jeweils der zweite Reaktionspartner, dcSAM, als Aminopropyl donor zur Verfügung stand. Mit den Substraten [¹⁴C]-1,3-Diaminopropan und dcSAM war keinerlei Aktivität messbar. [¹⁴C]-Putrescin und dcSAM konnte hingegen vollständig zu Spermidin umgesetzt werden, worauf geschlossen werden konnte, dass es sich bei TPS_108361 wahrscheinlich um eine Spermidinsynthese handelt (siehe Abb. 3-10). Wurde hingegen [¹⁴C]-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 R_f-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, [^{14}C]-1,3-Diaminopropan, [^{14}C]-Putrescin, [^{14}C]-Spermidin getestet. Hierbei stellte sich heraus, dass TPS_41289 nur Spermidin zu Thermospermin, eine isomere Form von Spermin, umsetzen konnte, wobei die anderen genannten Polyamine nicht aminopropyliert werden konnten. Die Identifikation von Thermospermin beruhte auf der von SHIRAHATA (1983) publizierten DC-Methode, wobei das DC-Laufmittel BAPF für die Isomere Spermin und Thermospermin unterschiedliche R_f -Werte ergibt, während im BAPW-Laufmittel die R_f -Werte von Spermin und Thermospermin praktisch nicht unterscheidbar waren. Die genauere Produktidentifikation von TPS_41289 erfolgte durch Dr. KNOTT (KNOTT et al., 2007).

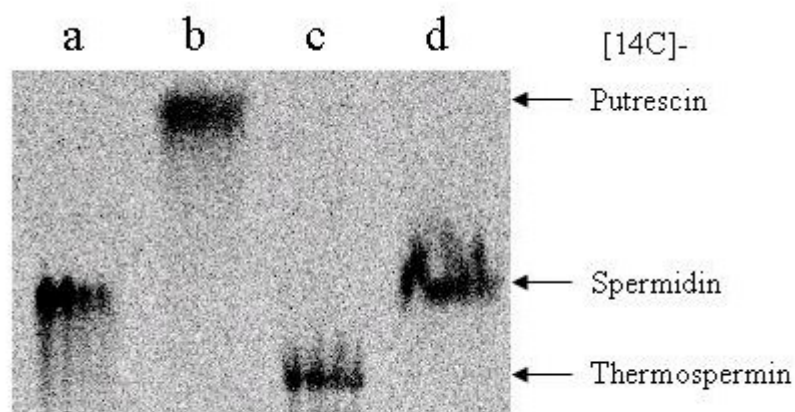


Abb. 3-10: Nachweis [^{14}C]-markierter Polyamine, die durch BAPW-Laufmittel aufgetrennt und mit Autoradiographie (Phosphoimager) visualisiert worden. a) Kommerzielles [^{14}C]-Spermidin als Standard, b) Kommerzielles [^{14}C]-Putrescin als Standard, c) [^{14}C]-Thermospermin (durch TPS_41289 katalysierte Reaktion: dcSAM + Spermidin \rightarrow MTA + Thermospermin), d) [^{14}C]-Spermidin (durch TPS_108361 synthetisierte Reaktion: dcSAM + Putrescin \rightarrow 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. Weiterhin 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 Aminosäure.

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).

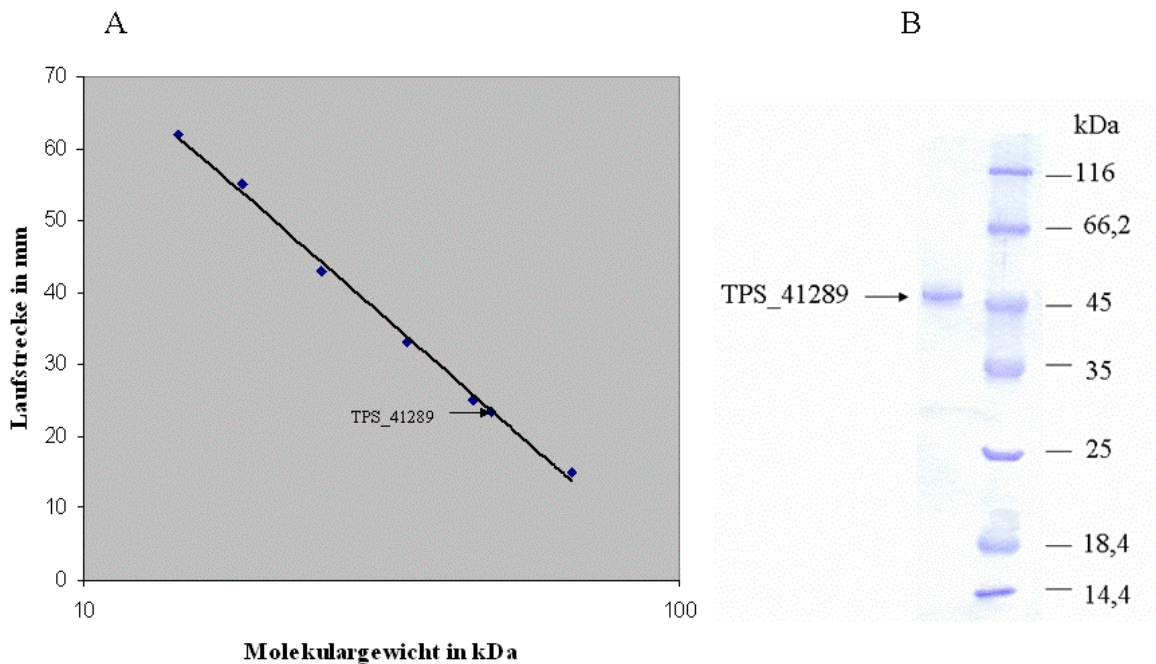


Abb. 3-12: Denaturierende Auftrennung von TPS_41289 in einem 12 %igen SDS-Gel mit Abschätzung des Molekulargewichts. Die Eichgerade hat die Funktion $y = -31,408 \ln(x) + 145,37$. A) Erstellte Eichgerade von dem SDS-Gel aus Teilabbildung B. B) 12%iges denaturierendes Gel zur Größenabschätzung von TPS_41289.

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.

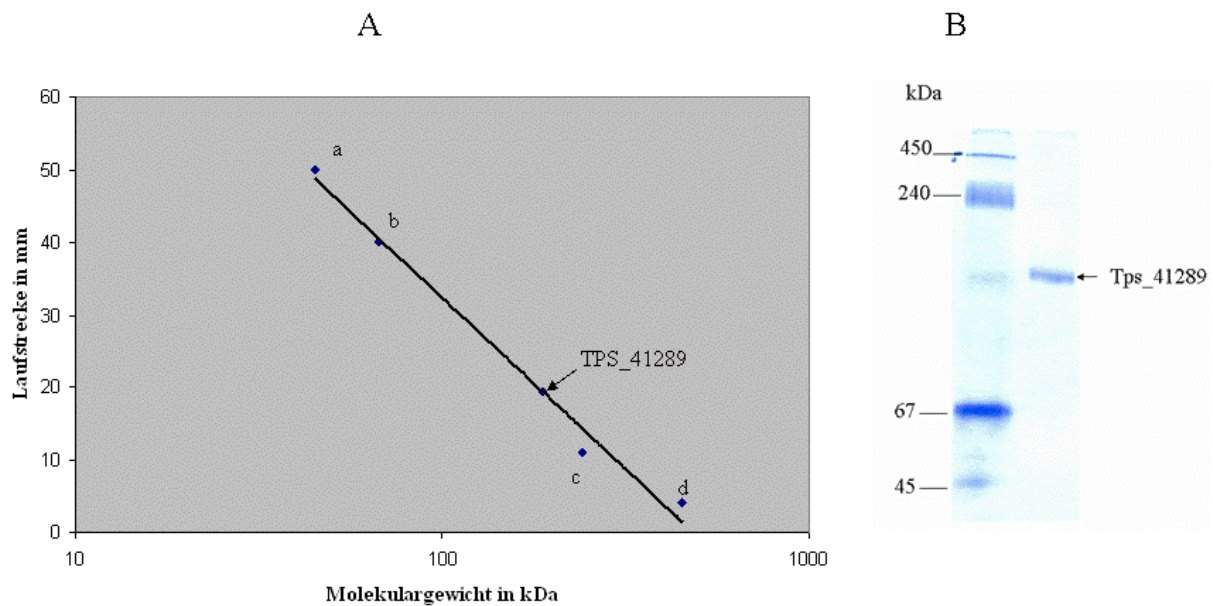


Abb. 3-13: Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von TPS_41289 durch Native PAGE (10% Trenngel) mit dazugehöriger Eichgeraden.

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).

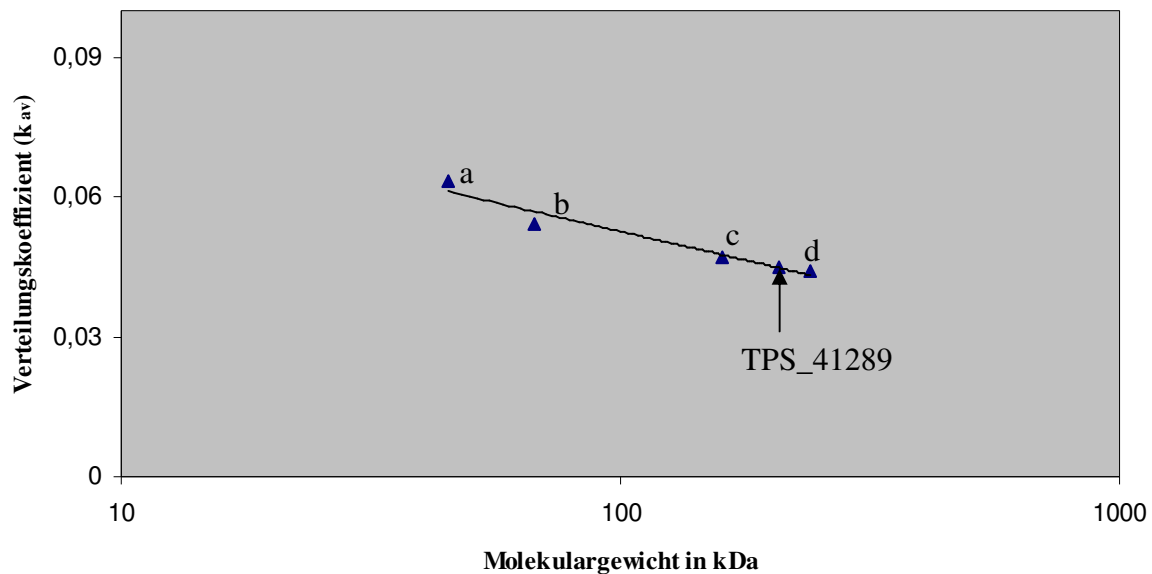


Abb. 3-14: Gelfiltration an einer Superose 6-Säule. Als Eichproteine wurden verwendet: (a) Eialbumin, 45 kDa; (b) BSA, 67 kDa; (c) Aldolase, 160 kDa; (d) Katalase, 240 kDa.

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).

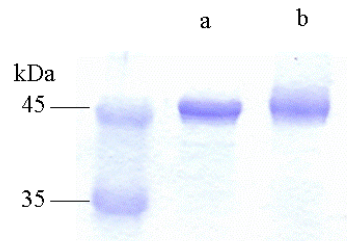


Abb. 3-15: Nachweis von intramolekularen Disulfidbrücken bei TPS_41289 mit einer 12%igen SDS-PAGE: (a) ohne Reduktionsmittel, (b) mit Reduktionsmittel.

3.4.4. Optimierung der Enzymaktivität bezüglich Temperatur und pH

Die Temperatur- und pH-Bedingungen wurden für TPS_41289 dahingehend optimiert, dass die Thermosperminsynthesereaktion 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).

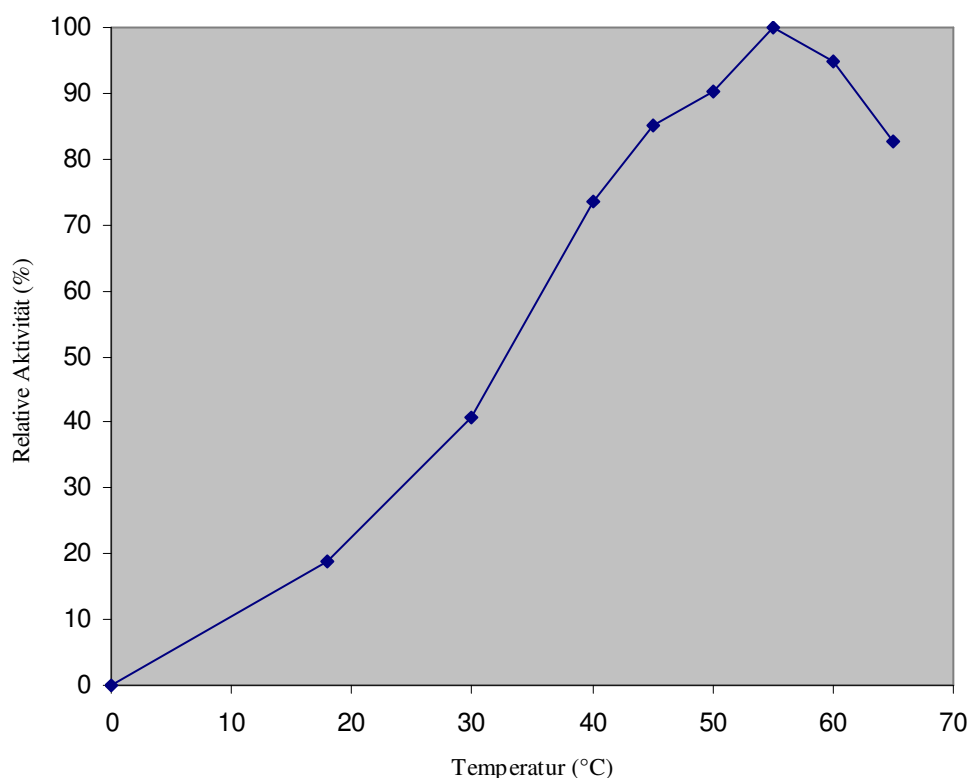


Abb. 3-16: Messung der Temperaturabhängigkeit der Thermosperminsynthesereaktion im Bereich von 0°C bis 65°C: Messbedingungen: 5 µg TPS_41289, 100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 2 nmol dcSAM und 23 pmol [¹⁴C]-Spermidin (5500 dpm), Reaktionszeit: 15 min.

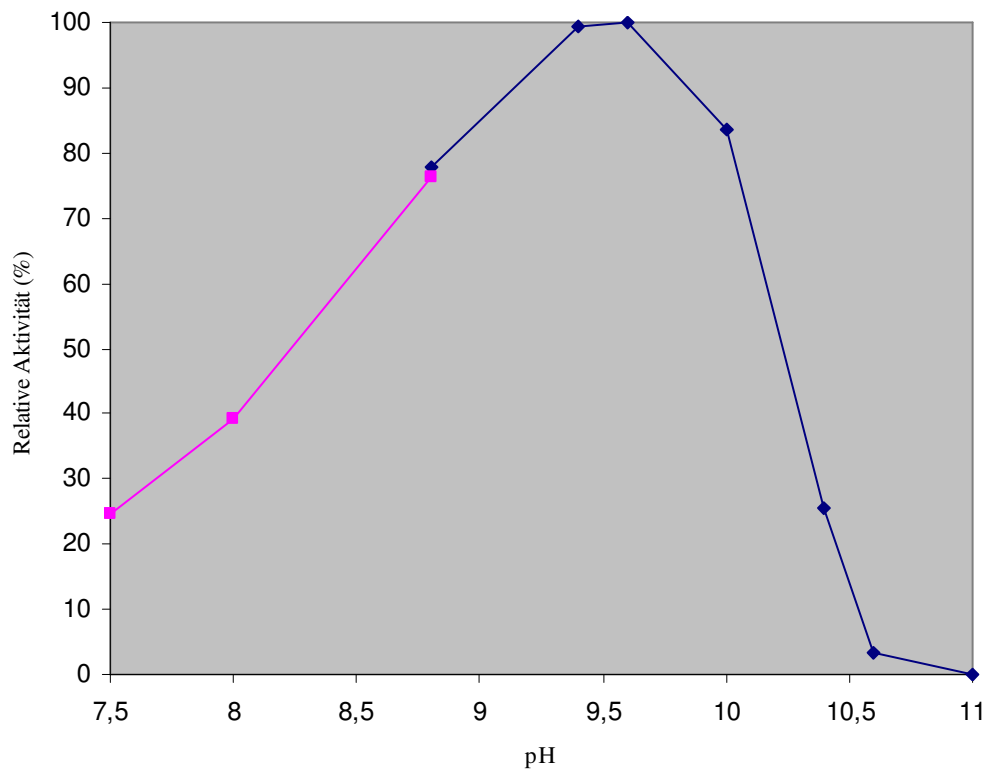


Abb. 3-17: Messung der pH-Abhängigkeit der Thermosperminsynthasereaktion im Bereich von pH 6,8 bis pH 10,6 (blaue Linie: Messung mit 100 mM Tris/HCl-Puffer zwischen pH 7,5 und pH 8,8/ magentafarbene Linie: Messung mit 100 mM Glycin/NaOH zwischen pH 8,8 und 11). Messbedingungen: 5 μ g TPS_41289, 55°C, 2 nmol dcSAM mit 23 pmol [14 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 μ M gemessen und für dcSAM ein K_M von 91 μ M 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.

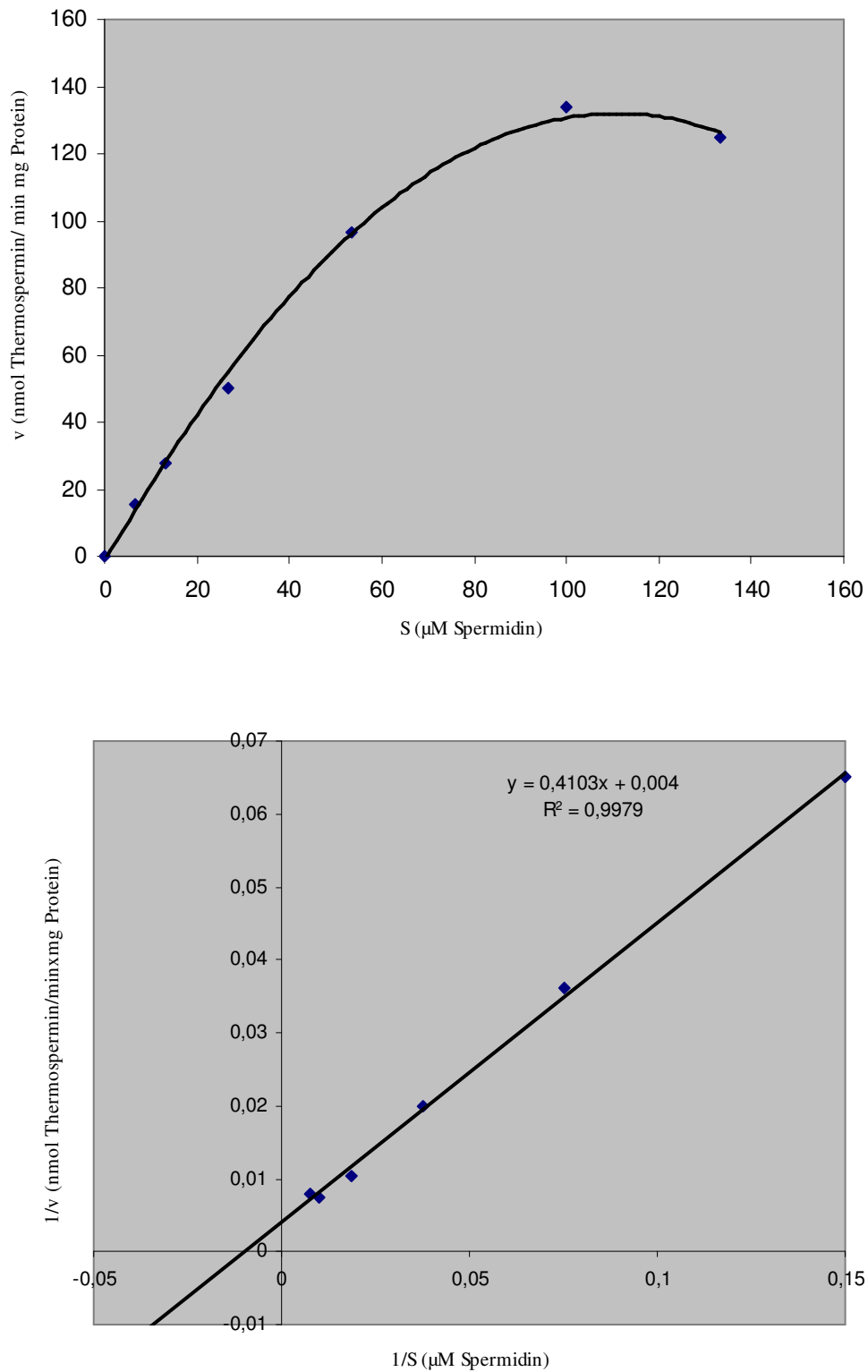


Abb. 3-18: Abhängigkeit der von TPS_41289 katalysierten Thermosperminbildung von Spermidin (3 Messungen): A) Michaelis-Menten-Kinetik, B) Lineweaver-Burk-Diagramm (Messbedingungen: 100 mM Glycin/NaOH, pH 9,6, 240 μM dcSAM, 0-133 μM Spermidin, 55°C, 10 min).

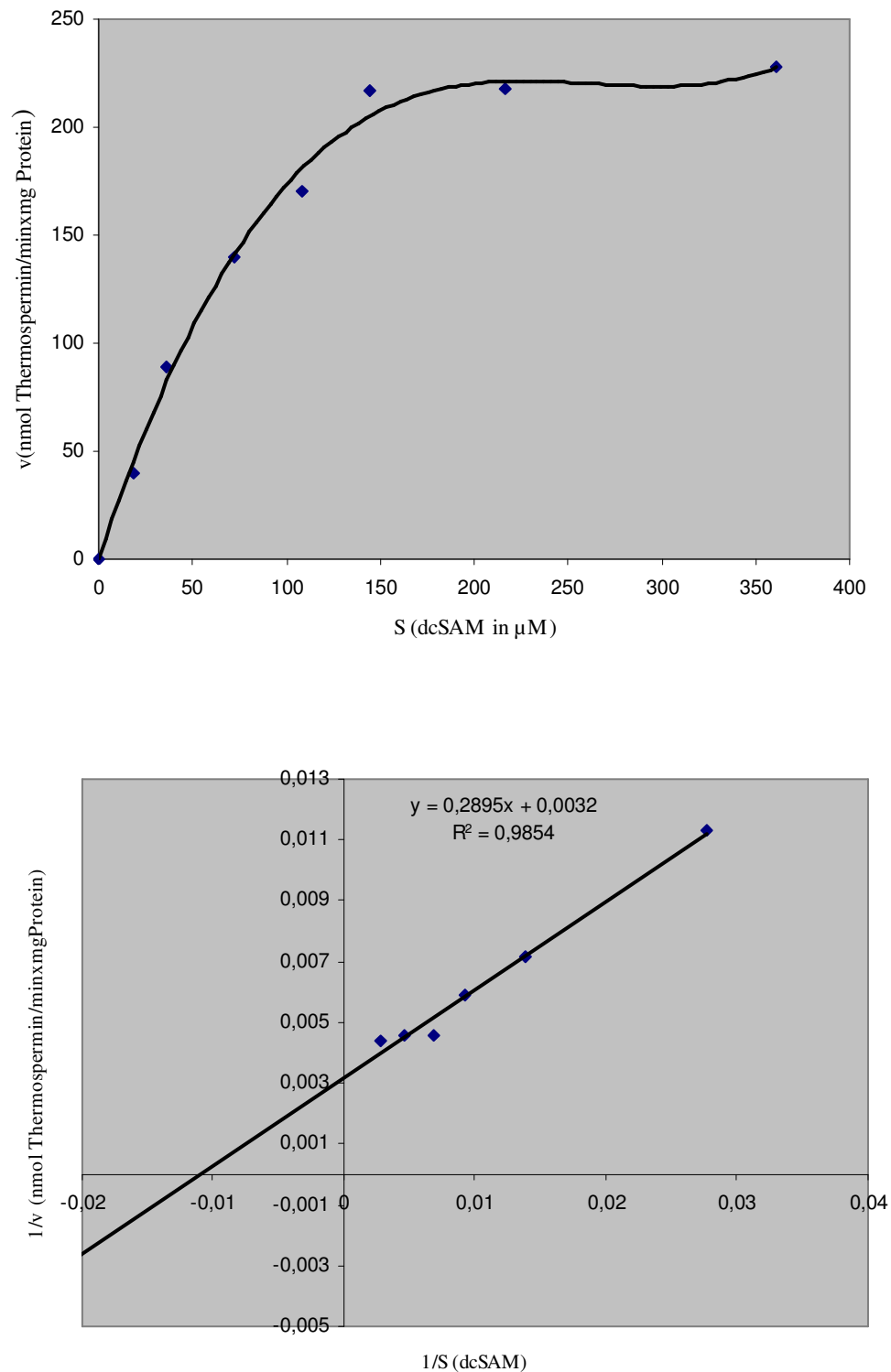


Abb. 3-19: Abhängigkeit der von TPS_41289 katalysierten Thermosperminbildung von dcSAM (3 Messungen): A) Michaelis-Menten-Kinetik, B) Lineweaver-Burk-Diagramm (Messbedingungen: 100 mM Glycin/NaOH, pH 9,6, 0-360 μM dcSAM, 333 μM Spermidin, 55°C, 10 min).

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 [¹⁴C]-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	YHESLVHPALFWSAILSSESQGGAPKSVFIGGGGELATAREVLRHSTIERCVMVDIDPA
Basenaustausch	YHESLVHPALFWSAILSSESQGGAPKSVFIGGGDLATAREVLRHSTIERCVMVDIDPA
	*****:*****

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.

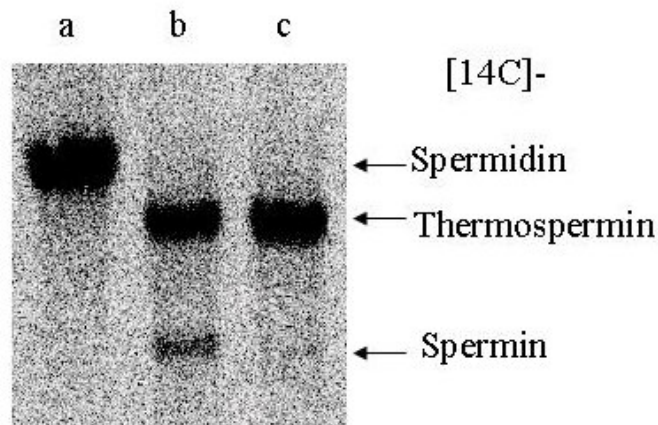


Abb. 3-21: Nachweis der Reaktionsprodukte mit DC und BAPF-Laufmittel bei (a) TPS_41289 (E156), 95°/10 min (Negativprobe) und (b) TPS_41289 (D156) und (c) TPS_41289 (E156) (Reaktionsbedingungen: 5500 dpm [^{14}C]-Spermidin, 2 nmol dcSAM, jeweils 3 μg TPS_41289, 55°C und 100 mM Glycin/NaOH, pH 9,6, Reaktionszeit: 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 Dendogramm 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 verstärkt 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 gehalten (100 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 23 pmol Spermidin (5500 dpm), 2 nmol dcSAM bei 30°C für 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 erwähnt, können Spermin und Thermospermin im DC-Laufmittel BAPF aufgrund ihres unterschiedlichen R_f -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.

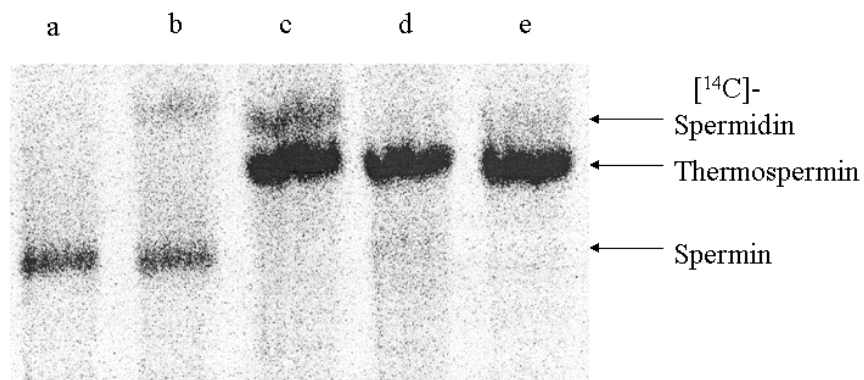


Abb. 3-22: Vergleich der Polyaminprodukte nach Reaktion verschiedener Spermidin-N-Aminopropyltransferasen mit Spermidin und dcSAM (autoradiographische Auswertung einer DC-Platte nach BAPF-Lauf): (a) *SPE4* (*S. cerevisiae*), (b) *SPMS* (*A. thaliana*), (c) *ACL5* (*A. thaliana*), (d) *SpeE* (*T. thermophilus*), (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 Expressierung 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/TpfcNat, verwendet. Das pBlue/TpfcNat-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 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/TpfcNat 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) Schnellausschuss 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 Schnellausschuss mit der beschriebenen PCR ergab, dass von den zehn untersuchten Transformanten sieben Transformanten das TpNR/41289-Plasmid tatsächlich aufgenommen haben (siehe Abb. 3-23).

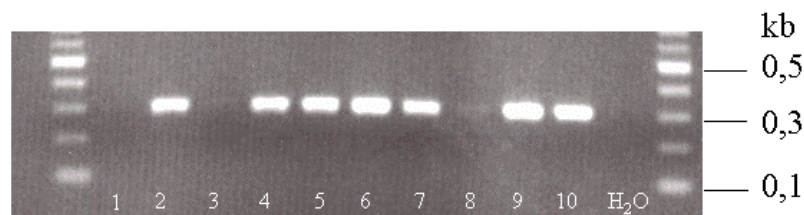


Abb. 3-23: Auswertung des Schnellausschusses mittels PCR mit genomischer DNA: Von zehn Transformanten wurde die genomische DNA isoliert und mittels einer PCR der Transformationserfolg geprüft. Wasser diente als Negativkontrolle, um DNA-Kontaminationen nachzuweisen.

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 Schnellausschuss mittels PCR mit genomischer DNA nochmals abzusichern, da der alleinige Schnellausschuss 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/NH_4^+ bzw. in MW1/NO_3^- angewachsen sind. Aufgrund des Nitratreduktase-Promoters der die *TPS_41289*-Expression steuert, war zu erwarten, dass nur Transformanten, die in MW1/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 β -Tubulin mit gleicher Menge cDNA amplifiziert und sehr deutlich in der gleichen cDNA-Präparation nachgewiesen (Spur b). Im Vergleich zur cDNA aus MW1/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.

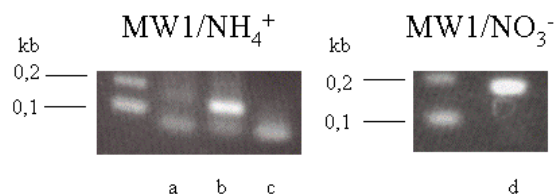


Abb. 3-24: RT-PCR zum Nachweis der NO_3^- -induzierten Bildung von *TpNR/41289*-Transkript: a) PCR zum Nachweis von *TpNR/41289*-Transkript (cDNA von Zellen gewachsen mit NH_4^+), b) β -Tubulinen (Positivkontrolle/ gleiche cDNA wie bei a), c) H_2O , d) *TpNR/41289*-Transkript (cDNA von Zellen gewachsen mit 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 [³⁵S]-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 [³⁵S]-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 *Xho*I-verdauten genomischen DNA des Wildtyps nur eine Kopie nachgewiesen werden, die bei der Fragmentlänge von 7 kb identifizierbar ist (Abb. 3-25 (c)).

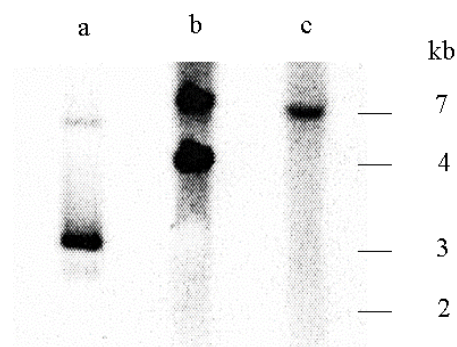


Abb. 3-25: Nachweis der zusätzlichen Genkopie von *TPS_41289* im Genom von *T. pseudonana* durch DNA/DNA-Hybridisierung mit einer [³⁵S]-DNA-Sonde: a) Positivkontrolle mit dem unverdauten Plasmid TpNR/41289 (50 attomol), b) *Xho*I verdaute genomische DNA von der transformierten *T. pseudonana*, c) *Xho*I 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 Nitratreduktaspromoter 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/NO₃⁻ 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 gleichgehalten wurde. Wie in Abb. 3-26 zu sehen ist, wurde mit dem Rohextrakt von in MW1/NO₃⁻ 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.

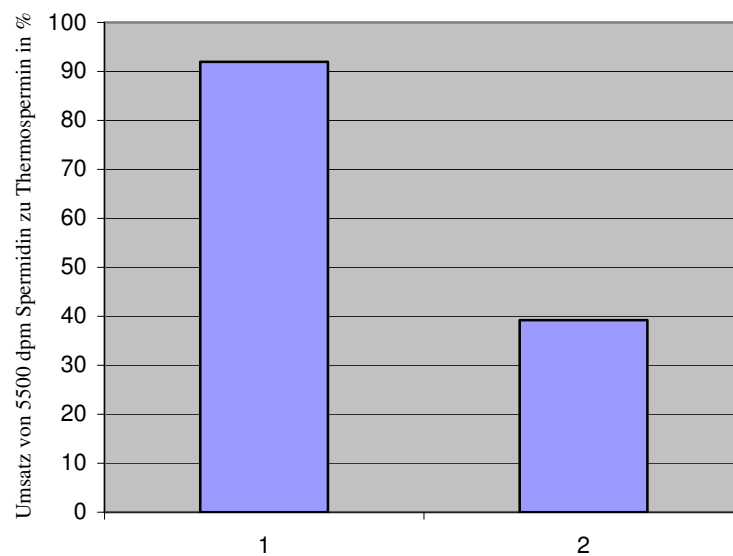


Abb. 3-26: Vergleichende Umsatzmessung von [¹⁴C]-Spermidin zu [¹⁴C]-Thermospermin zwischen Transformante (1) und Wildtypzellen (2) von *T. pseudonana* (Reaktionsbedingungen: 5500 dpm [¹⁴C]-Spermidin, 2 nmol dcSAM, 55°C, 100 mM Tris, pH 8,8, 1 h, 0,75 mg/ ml Protein, Volumen: 400 µl).

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), einfach methyliertes Norspermidin (m/z: 258,3), zweifach methyliertes Norspermidin (m/z: 244,3), dreifach methyliertes 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 länger-kettige Polyamine (Oktamine) sein könnte.

Nachgewiesene Polyamine (Transformante und Wildtyp)

Polyamine	Struktur (ohne Perethylierung)	(m/z) mit Perethylierung
Spermidin	C_4C_3	286,3
Norspermidin	C_3C_3	272,3
Einfach methyliertes Norspermidin	$C_3C_3-(CH_3)$	258,3
Zweifach methyliertes Norspermidin	$C_3C_3-(CH_3)_2$	244,3
Dreifach methyliertes Norspermidin	$C_3C_3-(CH_3)_3$	230,2
Norspermin	$C_3C_3C_3$	357,4

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

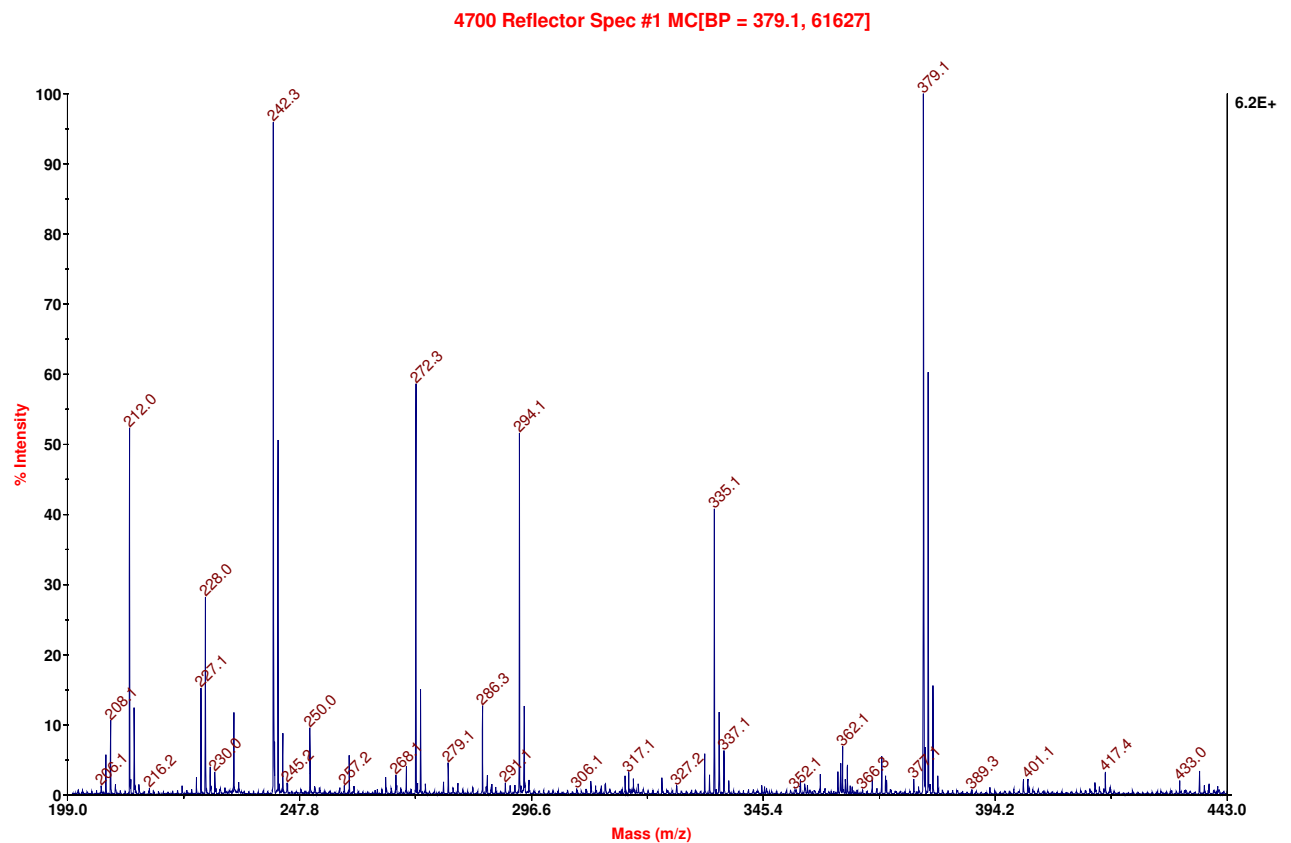


Abb. 3-27: Massenspektrum einer perethylierten Polyaminprobe aus untransformierten *T. pseudonana*.

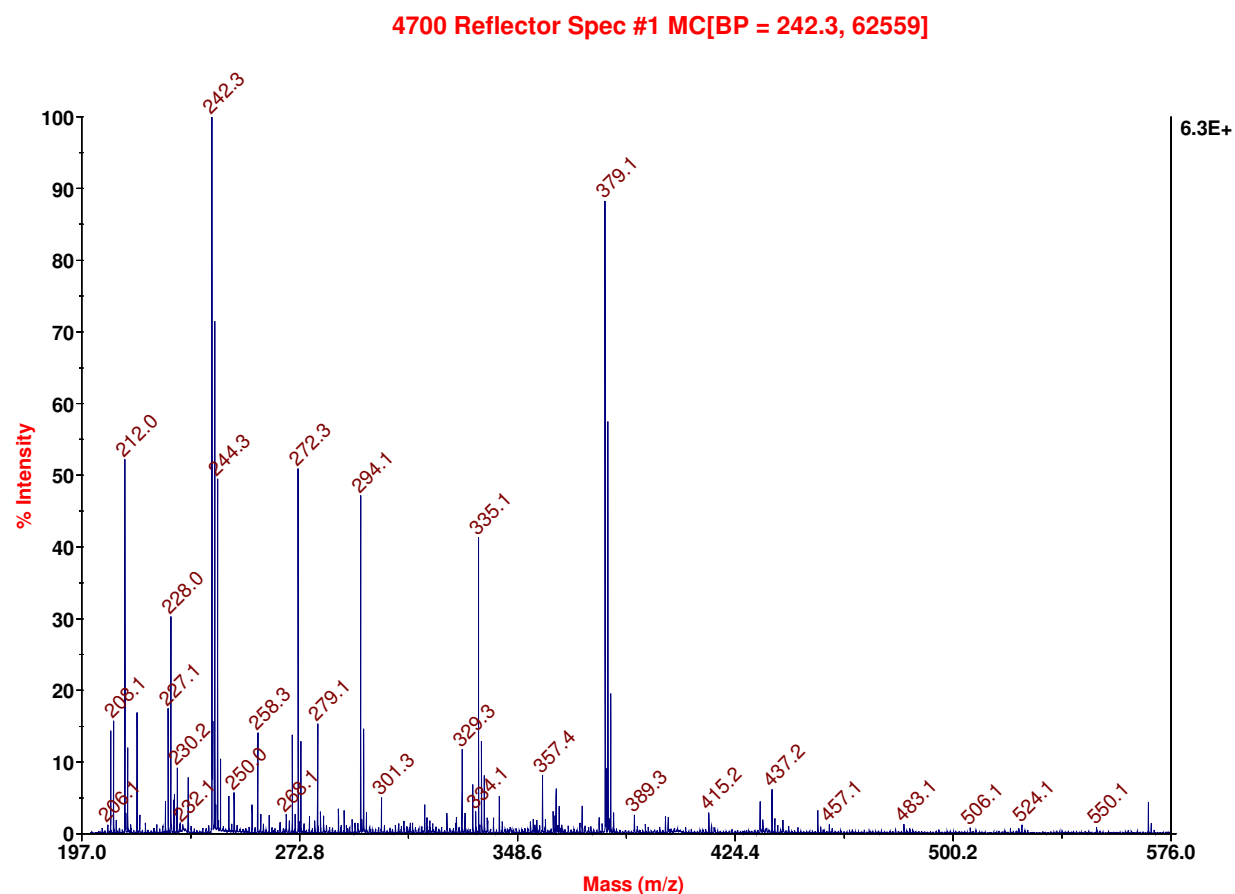


Abb. 3-28: Massenspektrum einer perethylierten Polyaminprobe aus *T. pseudonana*, mit Überexpression von *TPS_41289*.

3.7. Nachweis einer Thermosperminsynthaseaktivität bei verschiedenen Diatomeenarten

Es wurden zellfreie Rohextrakte von verschiedenen Diatomeenarten mit [^{14}C]-Putrescin und [^{14}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 meneghiniana* 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 *Cylindrotheka 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>Cylindrotheka 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.

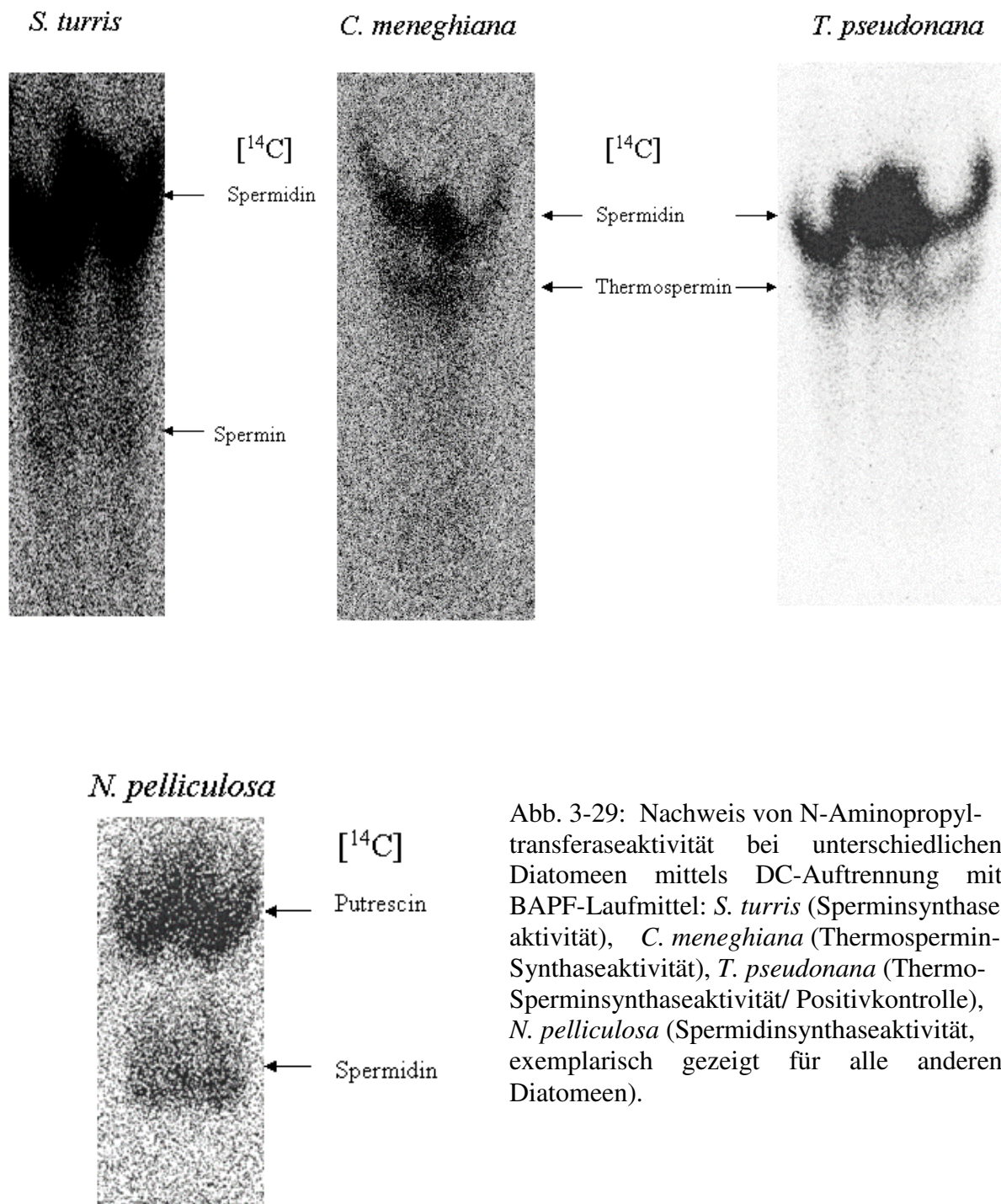


Abb. 3-29: Nachweis von N-Aminopropyltransferaseaktivität bei unterschiedlichen Diatomeen mittels DC-Auftrennung mit BAPF-Laufmittel: *S. turris* (Sperminsynthaseaktivität), *C. meneghiana* (Thermospermin-Synthaseaktivität), *T. pseudonana* (Thermosperminsynthaseaktivität/ Positivkontrolle), *N. pelliculosa* (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-Aminopropyltransferasesequenzen 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 Spermidinsynthese 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 Thermosperminsynthase (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 Thermosperminsynthaseaktivität 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 Spermidinsynthese 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 Ornithindecaboxylase oder Spermidinsynthase (oder anderen Proteinen) etc. vorliegt, wobei dies einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit der N-Aminopropyltransferasereaktion nehmen könnte. Eine solche Form der Multiproteinkomplexbildung bzw. N-Aminopropyltransferasekomplexbildung 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 Thermosperminsynthaseaktivität

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 Thermosperminsynthase 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*- Doppelnulldmutante 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 Hitzeschockpromoters 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 Ca^{2+} -abhängige Ionenkanal modulierende Wirkung in der Stomatazelle hat, wobei Spermin den Ca^{2+} -Fluß in die Stomatazelle fördert. Dies führt zu einer Depolarisierung der Stomatazelle, wodurch K^+ -Ionen (Osmotika) aus der Schließzelle ausströmen und daraufhin der Tugor 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 Aminosäurenaustausch 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 Methylgruppendonator bzw. dcSAM als Aminopropyl-donor 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 kleinster Mengen von Spermin bei TPS_41289(D156) ist möglicherweise dadurch zustande gekommen, 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 Carboxyspermidinsynthase (Putrescin-Aspartat- β -Semialdehyd Schiffbase-Reduktase) gefunden, das die Schiffbase aus Putrescin und Aspartat- β -Semialdehyd mittels NADPH₂ reduziert, wobei Carboxyspermidin entsteht, welches wiederum durch eine Carboxyspermidindecarboxylase zu Spermidin decarboxyliert wird. Der Sinn eines solchen Parallellweges 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 abundanter 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 kompetetive Wirkung auf andere physiologische Prozesse (z.B. Bildung von Hypusin, Methylgruppendonor) haben könnte. Allerdings konnte bisher kein passendes Genmodell für Carboxyspermidinsynthase bzw. Carboxyspermidindecaboxylase 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 NO₃⁻-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, Thamtrakoln 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 archaeobacteria, *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 Biogenese 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

Biom mineralization 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

CACAACCTGAAACCTCCTCTCAAACATTGATGGCTGCCTTCGCCCCACAACACAGTATCGTGGTAGCATT
AACTTTGGTCTCCATCTGTTTGGCTTGCACCGTCACTGCATCGTCGTCATCAACAACGCCACCGCCCCG
CCAACGCCGCTGACCCACAACATGAGCGACTTTCCTCCGCCGAAGATTACTCGCACCTC**ATCATAGACA**
ATTGGTTCCACGAACGTGGTCTCTCTGGCCAGGCCAATCCTTCTCTCTCCAAATCGAAAAGATACTCTA
CCATCAAAGTCTCTCTTCCAAGACGTGCTCGTGTGTTGACTCGACCAACCATGGCAAAGTGCTGGTATTG
GATGGAGTCATTCAATGCACCGAACATGATGAACACAGTTACCAAGAGATGATGGCGCACATTCTCTCT
ACTCTCATCCAAATCCCAAGAAGGTACTGGTCATCGGAGGCGGAGACGGAGGTGTCTACGCGAGATAGC
ACGTCATCCTGGAGTTGAGGAGATTTGCATCTGTGAGTTGGACAAGGATGTCATTGACGTATCCAAAAAG
TACTTGCCGTTTATGGCAAAGGGATTTCGACGATCCACGTGTCAAAGTACACATTATGGACGGTGCCAAAT
TCATGGAGGAGAACCAATCTGCATTTGATGTCATCGTTACGGACTCGTCGGATCCTGTAGGACCAGCGAG
TGTCTTGTGTTGAGACTCCATTCTACAAGGCTTTGCATGGAAGTTTACGTGAGGGAGGAATCATTTCGACA
CAGGGGGAATGTGTTTGGCTTCACGTTGACTTGATCCAACCGTTGATCAAGGCGATTACAGCTCTATTTA
CGACTGTGGATACGCTTACTGCACGATTCCGAGCTATCCGAGTGGGCAGATTGGGTTTATTATTGCAAC
CAAGGTTGGAAGGGGTGTAGGAATCCAGTACGTGCACAGAGGAGAGTGTGCAGAAGGAGTTAAAGTAT
TATACTCCCGATATTCATAGTGCAGCGTTTGTGCTGCCTGCGTTTGCACAGCGAGCTATTTTCGGTGGTT
TGTCGAAGTAGAGATTGTGTGGACGAGACTGCAAAACTTGGAGGTTGTTGGTTTGGTTTCTTGGATGTCT
ATTTTTTCGGCATGAATTATCTTTTGAAGGATGTAATGGATTGGGAAGTAAAGCATTGGGGCGGGGAAGA
GTGGCGGAAAGAACGTATCAATGCACGATATGAGTTGGATTAGATGTTTT

IIDNWFHERGPLWPGQSFSLSQIEKILYHQSLFQDVLVFDSTNHGKVLVLDGVIQCTEHDEHSYQEMMAH
IPLYSHPNPKVLVI**GGGD**GVLREIARHPGVEEICICELDKDVIDVSKKYLPMAGKGFDDPRVKVHIMD
GAKFMEENQSAFDVIVTDSSDPVGPASVLFETPFYKALHGSRLREGGIICTQGEVWLHVLDLIQPLIKAIQ
PLFTTVEYAYCTIPSYPSGQIGFIATKGGKGCNRPVRAPEESVQKELKYTPDIHSAFVLPFAFAQRAI

TPS_108361

CTTCTCCGTCTTCTTTGATTTGGGATTGTGACGGAAGGCATACGAGTTCTGGTGTGCGGGTGCTCGTCCC
TTCTTCTTTTTGCTGCCTCCGCCGGGTGCGCTGCTTCGTTGGGGCATCTTGGGTGTTGTGGCTTGTGTT
TGGCTGGCTGCCTTTCCGTCTGTCCGTTGACCACAACCTGAAACCTCCTCTCAAACATTG**ATGGCTGCCT**
TCGCCCCACAACAGTATCGTGGTAGCATTAACTTTGGTCTCCATCTGTTTGGCTTGACCGTCACTGC
ATCGTCGTATCAACAACGCCACCGCCCCCAACGCGCTGACCCACAACATGACGACTTCCCTCCG
CCGCAAGATTACTCGCACCTCATCATAGACAATTGGTTCCACGAACGTGGTCCTCTCTGGCCAGGCCAAT
CCTTCTCTCTCCAAATCGAAAAGATACTCTACCATCAAAAGTCTCTCTTCCAAGACGTGCTCGTGTGTTGA
CTCGACCAACCATGGCAAAGTGCTGGTATTGGATGGAGTCATTCAATGCACCGAACATGATGAACACAGT
TACCAAGAGATGATGGCGCACATTCTCTCTACTCTCATCCAAATCCCAAGAAGGTACTGGTCATCGGAG
GCGGAGACGGAGGTGTCTACGCGAGATAGCACGTATCTGGAGTTGAGGAGATTGTCATCTGTGAGTT
GGACAAGGATGTCATTGACGTATCCAAAAAGTACTTGCCGTTTATGGCAAAGGGATTTCGACGATCCACGT
GTCAAAGTACACATTATGGACGGTGCCAAATTCATGGAGGAGAACCAATCTGCATTTGATGTCATCGTTA
CGGACTCGTCGGATCCTGTAGGACCAGCGAGTGTCTTGTGTTGAGACTCCATTCTACAAGGCTTTGCATGG
AAGTTTACGTGAGGGAGGAATCATTTCACACAGGGGGAATGTGTTTGGCTTCACGTTGACTTGATCCAA
CCGTTGATCAAGGCGATTTCAGCCTCTATTTACGACTGTGGAGTACGCTTACTGCACGATTCCGAGCTATC
CGAGTGGGCAGATTGGGTTTATTATTGCAACCAAGGGTGGAAAGGGGTGTAGGAATCCAGTACGTGCACC
AGAGGAGAGTGTGCAGAAGGAGTTAAAGTATTATACTCCCGATATTCATAGTGCAGCGTTTGTGCTGCCT
GCGTTTGCACAGCGAGCTATTTTCGGTGGTTTGTGCAAGTAGAGATTGTGTGGACGAGACTGCAAACTT
GGAGGTTGTTGGTTTGGTTTCTTGGATGTCTATTTTTTCGGCATGAATTATCTTTTGAAGGATGTAATGG
ATTGGGAAGTAAAGCATTGGGGCGGGGAAGAGTGGCGGAAAGAACGTATCAATGCACGATATGAGTTGGA
TTAGATGTTTTAAGTGGCTAATCCTATATCCTGACCTTCGTCCCTGCCATTTTCTTCTCGTTATGGATT

GTTGCTTGAACAGTAGATTGTAAGCCTGTTCTGCCTTCTCCGGAAGATCCAACGAAGCCTCGGGCTTACG
CTTACACAAACATTCCCATTCTAGACGTTGTGTGTCAGCGTCGCTTTTGGAGACAACGCCGGGCTTCAAGTAT
CTCGGACGAATGTGCCCAACGACGTTGAAGAAGCCGGCTT

MAAFAPQHSIVVALTLVSICLACTVTASSSSTTPTAPPTPLTHNMDSFPPPDYSHLIIDNWFHERGPLW
PGQSFSLQIEKILYHQKSLFQDVLVFDSTNHGKVLVLDGVIQCTEHDEHSYQEMMAHIPLYSHPNPKKVL
VI^{GGGDG}GVLREIARHPGVEEICICELDKDVIDVSKKYLPMFAKGFDDPRVKVHIMDGAKFMEENQSAFD
VIVTDSSDPVGPASVLFETPFYKALHGSLREGGIICTQGECVWLHVDLIQPLIKAIQPLFTTVEYAYCTI
PSYPSGQIGFIIATKGGKGCNRPVRAPEESVQKELKYYTPDIHSAAFVLPFAFAQRAIFGGLSK*

TPS_38085

CACAACCTGAAACCTCCTCTCAAACATTGATGGCTGCCTTCGCCCCACAACACAGTATCGTGGTAGCATT
AACTTTGGTCTCCATCTGTTTGGCTTGCACCGTCACTGCATCGTCGTCATCAACAACGCCACC GCCCCG
CCAACGCCGCTGACCCACAACATGAGCGACTTTCCTCCGCCGCAAGATTACTCGCACCTCATCATAGACA
ATTGGTTCCACGAACGTGGTCTCTCTGGCCAGGCCAATCCTTCTCTCTCCAAATCGAAAAGATACTCTA
CCATCAAAGTCTCTCTTCCAAGACGTGCTCGTGTGTTGACTCGACCAACCATGGCAAAGTGCTGGTATTG
GATGGAGTCATTCAATGCACCGAACATGATGAACACAGTTACCAAGAGATGATGGCGCACATTCCTCTCT
ACTCTCATCCAAATCCCAAGAAGGTACTGGTCATCGGAGGCGGAGACGGAGGTGTCCTACGCGAGATAGC
ACGTCATCCTGGAGTTGAGGAGATTTGCATCTGTGAGTTGGACAAGGATGTCATTGACGTATCCAAAAAG
TACTTGCCGTTTCATGGCAAAGGGATTTCGACGATCCACGTGTCAAAGTACACATTATGGACGGTGCCAAAT
TCATGGAGGAGAACCAATCTGCATTTGATGTATCGTTACGGACTCGTCGGATCCTGTAGGACCAGCGAG
TGTCTTGTGTTGAGACTCCATTCTACAAGGCTTTGCATGGAAGTTTACGTGAGGGAGGAATCATTTGCACA
CAGGGGGAATGTGTTTGGCTTCACGTTGACTTGATCCAACCGTTGATCAAGGCGATTACAGCTCTATTTA
CGACTGTGGAGTACGCTTACTGCACGATTCCGAGCTATCCGAGTGGGCAGATTGGGTTCATTATTGCAAC
CAAGGGTGGAAAGGGGTGTAGGAATCCAGTACGTGCACAGAGGAGAGTGTGCAGAAGGAGTTAAAGTAT
TATACTCCCATATTTCATAGTGCAGCGTTTGTGCTGCCTGCGTTTGCACAGCGAGCTATTTTCGGTGGTT
TGTCGAAGTAGAGATTGTGTGGACGAGACTGCAAAAGTTGGAGGTTGTTGGTTTGGTTTCCTTGGATGTCT
ATTTTTCGGCATGAATTATCTTTTGAAAGGATGTAATGGATTGGGAAGTAAAGCATTGGGGCGGGGAAGA
GTGGCGGAAAGAACGTATCAATGCACGATATGAGTTGGATTAGATGTTTT

IIDNWFHERGPLWPGQSFSLQIEKILYHQKSLFQDVLVFDSTNHGKVLVLDGVIQCTEHDEHSYQEMMAH
IPLYSHPNPKKVLVI^{GGGDG}GVLREIARHPGVEEICICELDKDVIDVSKKYLPMFAKGFDDPRVKVHIMD
GAKFMEENQSAFDVIVTDSSDPVGPASVLFETPFYKALHGSLREGGIICTQGECVWLHVDLIQPLIKAIQ
PLFTTVEYAYCTIPSYPGQIGFIIATKGGKGCNRPVRAPEESVQKELKYYTPDIHSAAFVLPFAFAQRAI

TPS_22645

CGTTTGCTTTTTGGTTTTGTATCGGCTGTATGACAAGGATCATCTTGATGCACAATTTTACAAGGGCAAT
ATATCAAGGCTCCGTTTCAGAAAATGGATGATATAACAAACAGCTCCAGCGACGTCAAGCTTGATACCACT
ACCGGCACTTTGGTCTCCATTCAATACCAGTGGCAGAGAAAGATGCACAGAGATGCGTCA^{TATCACGAGT}
CCATCGTTTCATCTGTCTGATTACTCACCCCAACCTAAGCGAGTTGCAATTGTGCGAGGAGATAAGGG
GGCAACTCTGCGTGAAGTACTGAAACACAAACTGTGGAGAGTACAGCAATGTTTGGTACCACAAGTGAC
TTCGTCGAGTTGGCGAGAGAGTATCTGCTCGAGTGGAGCGATTGCTCTGATATCACTGATAGTTCCAAGT
GTTGCTTTGACGATGAACGAGCTGAAGCAAAAGTTGATGACGTCGTGGAATACTTCGTCGAAACGTTCTA
CAATGACAACCTCTACAAGATATCAACGCGAAGATGAGTATGATATCATCATCATGACACACTTGATCCA
AACGATGGAAGTGTTTCGTCCAATCTATATACAATGGTCTATCACACTCCGGTATCTTGGTTATACAAGTAA
ACGCAGTACCTCTCATCAATGTTACGGAGAAGTTAGAAGAGGTTGGATTTCGAGTCTATTTCATGTGTACGA
AGAACGCCACTACATCACTCCTTCGTCTTTCTTGGTTGCCTTCAAGGACTACGAAACAAGAGCAGACTG

YHESIVHPVMITHPNPKRVAIVGGDKGATLREVLKHKTVESTAMFGTTSDFVELAREYILLEWSDCSDITD
SSKCCFDDERAEAKYQREDEYDIIIMDTLDPNDG

TPS_35495

CCGGCGGTGTCTCTCCAAACGCCGAAGGCGTCTGCCCGAACCCCGACATGCTCAATGACGACGACGAAGA
AAGCTCCAGCGACGACGACGAACCAAGTTCGTCGCTCCAGCAACCCCAACGCTCACCGCCTGGAAGAAGGG
GAAGAAAAGCCCCCACCACATGCGAATCGTACCTCAAACCTCCCGGCTTTAAAGACGCC^{GTATACGAAA}
CTCGCTCCTTCTACCAAGAAGTGGCGTGGAGCGGAGAACGCCAACAACCGGACGTGTGCATGAGTCTCGA
TGACATTCTACAGATTTGTCAATTCGTACCGTCCCATTTATCATGAACCATATGTTTCATTTCCCCGCTGCG
TATATGAAGGATTACAAGCGAATTGTGTTTATCGGAGGTGGAGACGCCATGCTTTTGCATGAATCGCTCA
AGTATCCCAACGTTGAGTTGGTGTGGTTTGGAGCTCGATCAAAAGGTTGTGCGTGAGAGTTTGAAGCA
TTTCATACGCAGCCTCATTTCAAGATCCTCGTGTTCAGTGGTGGTTTGGAGATGCTGCCAAGTCACTG
GCATTGTTGCCACGTGAGTGGTTTGGTACATTTGATTTGGTCATGGTGGATTTGAGTGAGACGGCCATGT

CCATCAGTGTGACGGACGATCTTGATATCTTCGGGGCACTCTCCTTATTGATGAAGCCTGAGGGAGTTT
CGTCAAGAATGAGTTGTACTACGGTCAAATGTCCAAGCTCTTCGACCACAGTGTCTTTGTGTACATGACT
GATTATCCCATCTCTGTGATCAAGATTGGGCCATGGGATCGAACAAGGTGGACTTTCTCCATCCTCAGA
TTGAAGGAGGGTTGGTGGAGCAGAACAAAATTCGTACCTTTGAATACAACCTCTTGA

VYETRSFYQEVAWSENANKPDVCM SLDDILQICHSYRPHYHEPYVHFPAAYMKDYKRIVFIGGGDAMLLH
ESLKYPNVELVLGLELDQKVVRESLKHFHTQPHFEDPRVQWWFGDAAKSLALLPREWFGTFDLVMVDLSE
TAMSISVTDDLDIFGALSLLMKPEGV

TPS_101424

AGCTCGACATGTCGGCTGATACTTTACAGAGGCGAGCTTTTGACTTGAAAAAGAACGTAGCCTCTGAAGA
AACAGACTATCAGCACGTAGACATCTACGAGGTGATCAACCTCGCTATCGATCTATCGCACAGTACGAG
AAATCCCTCTCTCGTGACGGTTCTTACGAGTCACTTCATCCAGAGTTCTACAAACCAGATCGACTTTTAT
ATTTGGAAGGTATTCTGCAGAGTTCGTTGTATGGCGAGACTTCTTACCATGAGGCACTCGTTCATCCAGC
GATGCTTTCTCATCTTAATCCAAAACGAGTTGCCATCGTTGGAGGAGGTGAGGGTGCAACGCTTCGTGAG
GTAAGTTAATCCATCAATTCAAAGCATTGTGTTAAATATCACCATCTCATAATAATGATTCGCTCCTCAC
CTTAAGGTATTGAAGCATAAACCGTGGATACAGTCGTATGCTTGAGGTAAGTTGCAACAATTCTCATT
TGTCGTCGTTTAAGAGAGAGACGCTCATTCTTTTTCTTGACAGATCGATGAAAACAATGTAAACATTTTGA
GACAACATCTTCTGAATGGTCGGACTGCGATGAGTTACCCTCTTCAATGAAATCTTGCTTTGACGATCC
TCGAGCTGATGTGCGATTTGTGACGCAATTTAAATGGTTTACCAATAACTTTGATATCAACAGTGCTGAC
AAATTGTCAAAGGAAGATCGGTTTGACGTAGTGTGAGTGGCTTTGATTACTTTCTCTGTCGAGTTGTTG
CACCTTTACTAATCCAAACCAATGACGCCTGACTGCGGTAGTATCATGGACGGTGAGTACCATATGTTTA
GACTGAATCCATCTTGATCAATAGTTTCTTTTTCAGAACATCAATCTAATTCTTCTCACCGTCGTTTATCAA
ATCAAGCGCTTGATCCTAACGACAAT

RLLYLEGILQSSLYGETSYHEALVHPAMLSHLNPKRVAIVGGGEGATLREVLKHKTVDTVVMLEIDENNV
NILRQHLPEWSDCDELPSSMKSCFDDPRADVRFVDAFKWFTNNFDINSADKLSKEDRFDVV*

TPS_103771

CAATTTTACAAGGGCAATATATCAAGGCTCCGTTTCAGAAAATGGATGATATAACAAACAGCTCCAGCGAC
GTCAAGCTTGATAACCACTACCGGCACTTTGGTCTCCATTCAATACCAGTGGCAGAGAAAAGATGACACAGAG
ATGCGTCATATCAGGAGTCCATCGTTCATCCTGTGATGATTACTCACCCCAACCCTAAGCGAGTTGCAAT
TGTCGGAGGAGATAAGGGGGCAACTCTGCGTGAAGTACTGAAACACAAAACGTGGAGAGTACAGCAATG
TTTGGTACCACAAGTGACTTCGTGAGTTGGCGAGAGAGTATCTGCTCGAGTGGAGCGATTGCTCTGATA
TCACTGATAGTTCCAAGTGTTGCTTTGACGATGAACGAGCTGAAGCAAAAGTTTGATGACGTCGTGGAATA
CTTCGTCGAAACGTTCTACAATGACAACCTCTACAAGATATCAACGCGAAGATGAGTATGATATCATCATC
ATGGACACACTTGATCCAAACGATGGAGTGTTGCTCCAATCTATATACAATGGTCTATCACACTCCGGTA
TCTTGTTTATACAAGTAAACGCAGTACCTCTCATCAATGTTACGGAGAAGTTAGAAGAGGTTGGATTGCA
GTCTATTATGTTGTACGAAGAACGCCACTACATCACTCCTTCGTCTTTCTTGTTGCTTCAAGGACTAC
GAAACAAGAGCAGACTGGTATCGCAACGAGGCCGAAGTGGAGATACACATCCAAAACGTGTCAAGCGAT
CCAAGTCTGGCAATCCTCTGTTGAGATACTTTGACGGACCTACAATGATGGGCTACCAGACTCCACCCAA
AGCATTTGAACACATCTATTGTTTGCATCAGAATATACCGGACGATTGCAGTTTGCAGAATGAGTTGTAC
GCCAAACATCGACGTATAATCCCTGTACAGATTGGAAGTGCGAAATAGTACCGTAGGAGAGACGCTG
GAAGAGGCATATTTGCATTGAATGCCGTTGAAGCTGGTTCACTCTTTGACCCAAGCGAAAAATATGAAGAG
TTTTCATGTCTGTCATCAACATGGGCTGTGATTGAGGCGATGTCTGAGGTATCCGAAGAACTCGGTGGT
GTTGAAACATTTCATTGACGGATACGGTTACGACTCAGTGTTGTTGGTGAGATCTTTGCAGAGTGGCTTCT
TTGGCTGGTTGCATTGCGATTGTTTGACTTCTCTATTCTCACTTAATCTTCTTCTTTCAAGGGTAAAC
TTCATATGCAGTGGATTCTGGCATCATGCTCTTCGCAACACCGGTTGCGATGGAAGCTAAAACCTTTGG
AGACATCAACGAAGACAGTGTGCTTACTGAAACGAATGTTGGCATTGATCAAGTTCAGACAAAATTCGAT

MHRDASYHESIVHPVMITHPNPKRVAIVGGDKGATLREVLKHKTVESTAMFGTTSDFVELAREYLLEWSD
CSDITDSSKCCFDDERAEAKYQREDEYDIIIMDTLDPNDGVFVQSIYNGLSHSGILVIVQNAVPLINVTE
KLEEVGFESIHVYEERHYITPSSFLVAFKDYETRADWYRNEAEVEIHIQKRVKRSKSGNPLLRFYDGP
TM MGYQTPPKAFEHIYCLHQNIPDDCSLQNELYAKHRRIPVTDLEVRNSTVGEHAGRGIFALNAVEAGSLF
DPSENMKSFHVLPTWAVIEAMSEVSEELGGVETFDIDGYDVSLLVRSLSQSGFFGWLHSHCLTSLFSLN
LLLFQG*

TPS_107485

CGCTTCTCGCACATCCAACCTCCACGAACACAACGCACCATGAGATTGGCAGACGCTACCTCTCTCCTAAT
CGCCGCCACGGCAGGCCTACTAACCTATCAAGCACCATCCCATCAGCCACCCTATTTCGCCACCGCCGAA

ACAGCTTCATGCCCCGGCGGTGTCTCTCCAAACGCCGAAGGCGTCTGCCCCGAACCCCGACATGCTCAATG
 ACGACGACGAAGAAAGCTCCAGCGACGACGACGAACCAGTCGTCCGCTCCAGCAACCCCAACGCTCACC
 CCTGGAAGAAGGGGAAGAAAAGCCCCCACCACATGCGAATCGTACCTCAAACCTCCCCGGCTTTAAAGAC
 GCCGTATACGAAACTCGCTCCTTCTACCAAGAAGTGGCGTGGAGCGAGAACGCCAACAAACCGGACGTGT
 GCATGAGTCTCGATGACATTCTACAGATTTGTCAATTCGTACCGTCCCCATTATCATGAACCATATGTTCA
 TTTCCCCGCTGCGTATATGAAGGATTACAAGCGAATTGTGTTTATCGGAGGTGGAGACGCCATGCTTTTG
 CATGAATCGCTCAAGTATCCCAACGTGGAGTTGGTGTCTGGGTTTGGAGCTCGATCAAAAGGTTGTGCGTG
 AGAGTTTGAAGCATTTCATACGCAGCCTCATTTCGAAGATCCTCGTGTTCAGTGGTGGTTTGGAGATGC
 TGCCAAGTCACTGGCATTGTTGCCACGTGAGTGGTTTGGTACATTTGATTTGGTCATGGTGGATTGAGT
 GAGACGGCCATGTCATCAGTGTGACGGACGATCTTGATATCTTCGGGGCACTCTCCTTATTGATGAAGC
 CTGAGGGAGTTTTTCGTCAAGAATGAGTTGTACTACGGTCAAATGTCCAAGCTCTTCGACCACAGTGTCTT
 TGTGTACATGACTGATTATCCCATTCTCTGTGATCAAGATTGGGCCATGGGATCGAACAAGGTGGACTTT
 CTCCATCCTCAGATTGAAGGAGGGTTGGTGGAGCAGAACAATAATTCGTACCTTTGAATACAACCTCTTG
 AGGATGAGGAGGAGCATTACAAGCTTATTAAGGATTATTCTCGCAATGATGCTAGGAAGCAGGGCAAGTG
 CGGAGATTACGATGCTGAGGTTGAGGCTGCGAAGAAGGGAGGGGGGAGGAGAAGAAGGAGGTTGTCAAA
 CCGAAGAGTTCGGCGGGTGTGCTCATGGTTGTGGAGGTGAGAGTGTTCGGAGGGTGTGGCTGCTGAGT
 TGGAGGCGTCTCTCAACACAATCTTGGAGAAGGAGGGTATGCATCCTCTTGCCCCGGCCATGTCTCACA
 TGCAGCGAGGGAGATGCGTCTTTGGCACTCTTTATTGGAATGGAGGAGGGATACGTCGATGCCACTTT
 TACCCTTCAAATCACACGTTGGTCTTGAGATTGTGCTCTGGTCTAAGATTGCAAAGCAGGATGATCTCC
 GTACGGCCATTCTTGGTGCCATGGGAGTGGATAAGACTTTCTCTCAGTACCGTGTGATTACGGCGGTAT
 GCTCGGTGCGAAGAACTGGAAGGAGGATGTTGAGGCTGTGGGACCAGTTAAGAAGAACTTGCGTAACCTGT
 GACCCTGCTGCTAAGGCTGCTGAACCCCAAGATTGGAAAGGGACCCATTCTTCAGCTACGTTCAGTGCGG
 CTGTGTGCGCCGCTTTGTCACTCCTTCCCAAAAAGATGGATAAGGTCGTTGCTGTGCTTTGTGGATCCAA
 GGATAAGCCTTGTGAGACTTTGAATGCTCTTGAGAAGAATAGCAAGGTTGACAAAATCGTTGCTATTTAC
 TCTTGTCTGAGGGAGGTGCTGAGGGTGAGAAGAGTGGCAAGGATGATTGGTGTCCAATGTGTACCACT
 GCTCTGCTAAGGATTTGAAGCGTGTGCAAAAGGCTGAGGAAGGTTTCAGTGCCGTAATTATGGATCCTGC
 TGCCGAGGCGGACTTCGTGGGCAACATGCAGGATGAGTTCTGCAAGAAGAAGGATGCTGGACAGACGTT
 CTTCTTCGTGATCAGGTACCTTCATGACTCAACTTTCTAACGATGATGAGGAGATCTTCTTCAAGGAT
 GCACTCGTCAACTAATGAAGAAGATGGTTCTGACTAGTCGCATCATTATTGACGGTTCATCTGAGTTGGG
 AGTCATTTCTTCCGGCAACCTGGATTTGTCAAGCGTATTGTCAATTTGGCCGAGGCTGTTGAGAAGAAG
 ACTGGAGTTCTGACAGTTATTGATAAGATGGTGGGCGGGCCTGTGCAACAGCAAAAAGAACTACGATCCTG
 AACACTACCCTGCCAATGCATACGACGAGAGAGATGCCTTGAAACAGTACACCTATCAAGTGCTCTGGC
 TTCGAGAGTCTCTACCAGATTCAAGTGGGCGATGAGAATGAAATCAAGTCCGTTTCGGCTAGCATGATT
 AAGGATGCCCTCGATGCCGTTGTTGCCGGAAGCCCTAAGTTCGCTGGTGCCAAACGATTGATTTCAAGT
 GTGAGATTGGAGACGGAGCTGTGAGCGCTGCAATCCTCGCTGCTGGACACATCATTGTTACGTGGGATGG
 AGCTGGACGTGTCAATCAACACCATGACTTTGGGCGAGACTTACGAACCTATTCTCCACCTCTGAT
 GTGCCTGATATGTTTCTCTCGGAGCACAAGGACAACATTGTTGATGTGTTTATGCGCAAGCTTCCATCGT
 CAACGCTCTGTGTCGGTTCTGTGAGCAGATGCCAAGGGGATCAAACCGTGTGCTCAACTTCAAGAAGGATAT
 CAATGCCATCCCTGGATGTACCAACCACTTTGACCTTTGTATGGACTTTGCTAAGGATGGTGACTGTGAT
 GATGAAGAGGAGCAGCCTTGATGCAAAAGTACTGTTCTCTTTCTGTGGAACCTGTGATCAAATGGTAC
 CCAAGTTTTAAGTTGCTTGGATTGAGTTAGGGTGTGTTAAGCAGTTTCGTTGTGTAAATGTTAAGGAACAGT
 CCATGCACTCTTAAGTTAATTAAAGGACATGTATTGAGTTGATAACTCGTTGAAAAGACATCTCTTCTCTT
 TTCTTCTACTCTTTCTTACGCAGATTATCACGTGACGAGTGACTGAATTTTTTACGTGATATGAAGTT

MLNDDDEESSDDDEPVRSSNPNAHRLEEGERPPTTCESYLKLPFGKDAVYETRSFYQEVAVSENANK
 PDVCM SLDDILQICHSYRPHYHEPYVHFPAAYMKDYKRIVFIGGGDAMLLHESLKPYNVELVLGLELDQK
 VVRESLKHFTQPHFEDPRVQWWFGDAAKSLALLPREWFGTFDLVMVDLSETAMISVTDLDIFGALS
 LMKPEGVFVKNELYYGQMSKLFDSVVFVYMTDYPILCDQDWAMGSNKVDFLHPQIEGGLVEQNKIRTFEY
 NPLEDEEEHYKLIKDYSRNDARKQKCGDYDAEVEAAKKGGGEEKKEVVVKPKSSAGVLMVVEVESVAEGV
 AAELEASLNTILEKEGMHPLAPAMSHNASEGDASLALFIGMEEGYVDAHYPYKSHVGLIEIVLWSKIAKQ
 DDLRTAILGAMGVDKTFQYRVIHGGMLGAKNWKEDVEAVGPVKKNLNRNCDPAKAAEPQIGKGP
 IPSATFSAVSAALSLLPKMKDKVVAVVCGSKDKPCETLNALEKNSKVDKIVAIYSCPEGGAEGEKSGKDDLVS
 NYHCSAKDLKRAAKAEEGFSAVIMDPAAEADVFVGNMQDEFCKKKDAGQHVLLRDQVTFMTQLSNDDEE
 IFKGGCTRLMKMVRTRSRIIDGSSELGVISSGNPFGVKRIVNLAEAVEKKTGVRTVIDKMSLYQIQV
 GDENEIKSVSASMIKDALDAVVAGSPKFAGAKRIDFSGEIGDGAVSAAILAAGHIIVTWDGAGRVTINTMTL
 GETYEPIPTSDVPDMVLSEHKDNIVDVFMRLPSSTSVSVREQMPRGSNRVVNFKKDINAIPGCTNHFDL
 CMDFAKDGDCDDEEEQPWMQKYCSLSCGTCDQMVPKF*

TPS_105825

TGTCTTTTACTAGGAGCGGCCCCCTGACCTTTTCTTACCGCTTTTGGACACGACGGCTGTGCGGCCGAT
 CATCAGCCAACGCGGGCACCACGAGCGAACGCCACATACATTCTCATAACATCAATTGGACGATACGCAT
 AAGCCTATCATCACCAACAACAATACAACCAACCAATAGTCTCAATACATACCAACCATGGTCAGCA

AGAAAGCCCTCAAGCTCGGAGCCGTCGGCCTCGCCGTCGTCGCCATCACCCCTCGGTCTCGGTCTCGGCCT
CGGATTGAAGAAGAATAACACTAACGATAAGTCTCTCGCCGCTCCAGCGCCGAGGAGACCTACGATGTC
TACTCTGACGGATGCCGTCGTGAGTTGGACGCCACTGGCCGTTTGTGTGTCGGCTCCTTCTAATGATGCCT
TCCAAGGAGATAGGAGGGCTCTTCGTAAGTATGATGCTATCAGGCAGCTGTGCAAGGGAAGCAAGAGCAAGGG
ATCATCTGGTGCCTCTTACAACGTGAGTTCTCATCGTGTGTGTGTTAATCTGGTGACTTAATATCCCGTG
ACGCTCGTCTATACCGTGATTATATCTTTTATTGGCTGTGCTAGTATCCTAACCTTCGCAATTGCTACTT
CTCACCATCATCTGCTTCTGCTCATGTCTCGTTCACTTACAGTGTAGCAAGGGTTCCAAAGGAAAGTCTA
GCCAAGGAGGTGTAAAGTGCTTACAACATAAAGTAACTCATTGATTGAAGAGATGTCTCTCACCCATCACT
TCACATTGCACAACCAATAGGACTTGTGTGCCCCATTGGCCCCCTGGTGGAGGAAAGGGCAATCATCCAA
GGGATCTTTCAACTTCGGTTCTGACTTCCAAAGGAAAGTCTAGCAAGGGCAGCAACGTTGGTGTGAGAG
TGTACATGTATGGCTCCCGTCAACCCTGGTAAGAGCAACAAGTCGTCCAAGGGATCTAATGTTGCTGGAT
CTGGATCCAAGGGAAGCAACAAGTCTTCCAAGTCGGGAGGTGGTCTTGAAAACCGTAACCTTGGAAGGTGA
GACATGGAACAGCGATGGTTACGCTCCAGTCGGTGGAGTGGATCCAACAAGTCAAGCAAGGGAACCAAC
GTTGCTGGATCTGGAAGCAAGGGATCTAACAAGTCATCCAAGGGTGTCTCTCCCGTCAATGGTTCCAAGG
GAAAGTCATCCAAGGGCTCATCTCCCGCTAATGGTTCCAAGGGATCGAAAGGAAAGGGATCCAAGAGTTC
TCCTGCTGATGGTTCCAAGGGATCGAAAGGAAAGGGATCCAAGGGTCTCCCGCTAATGGTTCCAAGGGA
TCCAAGGAAAGGGATCCAAGGGTCTCCCGCTAATGGTTCCAAGGGATCCAAGGAAAGGGATCCAAGG
GTCCTCCCGCTAATGGTTCCAAGGGATCCAAGGAAAGTTCGAGCAAGGGAAGTCCACCCCCCTTGCACC
AGTTCCTTGTAAGTTGAAAAGAGGAAATATCTTTTCATGTGCTTACGGCATCATTCCGGGTGATACTTTAC
TAACTCATTGTCTTTCTCCAACGTTTCAAACAGGCCCATGCGTTTCTCTCTCTGCATCTCTCGAACCTT
CGATCTGCGTCTATACCCCTTCTCCCACTGATTTTCCACCCCTTCTCCCACTGTCTTCTCTCGCATTAC
CACCGACGTCCCTACTCCATTCCCCACTGCTATGGTCGTTACGATCGTACCTACCATGGGATC

MVSKKALKLGAVGLAVVAITLGLGLGLGLKKNNTNDKSLAASSAEETYDVYSDGCRRELDATGRLLSAPS
NDAFQGDRLRLRTDAIRQLSKGSKSGSSGASYNCSKSGSKGSSQGGDLCAPLAPGGGKKGSSKGSFNFG
SDSKGKSSKGSNVGAGECTCMAPVNPGRKSNKSSKGSNVAGSGSKGSNKSSKSGGGLENRNLEGETWNSDG
YAPVGGSGSNKSSKGTNVAGSGSKGSNKSSKGVSPVNGSKGKSSKGSPPANGSKGSKGKSSKSPADGSK
GSKGKSGKGPANGSKGSKGKSGKGPANGSKGSKGKSGKGPANGSKGSKGKSSKGSPPPLAPVPCKLK
RGNIFHVLTASFRVILY*

TPS_14703

AGCTCGACATGTGCGCTGATACTTTACAGAGGCGAGCTTTTGACTTGAAAAAGAACGTAGCCTCTGAAGA
AACAGACTATCAGCACGTAGACATCTACGAGGTGATCAACCCCTCGCTATCGATCTATCGCACAGTACGAG
AAATCCCTCTCTCGTGACGGTTCTTACGAGTCACTTCATCCAGAGTTCTACAAACCAGATCGACTTTTAT
ATTTGGAAGGTATTCTGCAGAGTTCGTTGTATGGCGAGACTTCTTACCATGAGGCACCTCGTTTCATCCAGC
GATGCTTTCTCATCTTAATCCAAAACGAGTTGCCATCGTTGGAGGAGGTGAGGGTGCAACGCTTCGTGAG
GTAAGTTAATCCATCAATTCAAAGCATTGTGTTAAATATCACCATCTCATAATAATGATTCTGCTCCTCAC
CTTAAGGTATTGAAGCATAAACCGTGGATACAGTCGTCATGCTTGAGGTAAGTTGCAACAATTCTCATT
TGTCGTCGTTTAAAGAGAGAGACGCTCATTCTTTTCTTGCAGATCGATGAAAACAATGTAAACATTTTGA
GACAACATCTTCTGAATGGTCGGACTGCGATGAGTTACCCTCTTCAATGAAATCTTGCTTTGACGATCC
TCGAGCTGATGTGCGATTTGTGACGCGATTTAAATGGTTTACCAATAAATTTGATATCAACAGTGCTGAC
AAATTGTCAAAGGAAGATCGGTTTGACGCTAGTGTGAGTGGCTTTGATTACTTTCTCTGTCGAGTTGTTG
CACCTTTACTAATCAAACCAATGACGCTGACTGCGGTAGTATCATGGACGGTGAGTACCATATGTTTA
GACTGAATCCATCTTGATCAATAGTTT

RLLYLEGILQSSLYGETSYHEALVHPAMLSHLNPKRVAIVGGGEGATLREVLKHKTVDTVVMLEIDENNV
NILRQHLPEWSDCDELPSMKSCFDDPRADRVRFVDAFKW

TPS_49355

ATGAACCTTCTGGGCTTCCGACGAGGCAACAGTAATAGTTTCGCATGCAATCCTACTCATTCTTGCCCTTACT
TGTGCTACCATCAGCTATTGCACTGCCCAACAATCCACATCCGAGTCCAAACGAGTCGACGAAGAGGAA
GAAGAAATCGGGTACATTCAAACCTTCTGCTAAACACTCCGGCCGTCACCACGCTAAACCTTACCTATC
AAAAGATAGAAGTATATGAAAGTGATCACTTTGGTAAAGTCTTTCTATTGGATGATTGTTTGCAATTGAC
TGAGAGGGATGCTCCGCATTATAATGAGATGTTGGCGCATGTTCCGGTTATGGAGTATCTAGCTTCCAAT
GCAGGAATTGATGAACAGTTGGATATACTAGTAGTGGGCGGTGGTATGGGTATGTAGTATCTGAACTCT
TGAAATATCCACATGTTGGATCGATAGATCATGTAGATTTGGATGGTATGTGATTTCTGTTTCCAAAGA
TCATTTTCCCTGGGCCAAGTCTGTTTGGGACAATGCGAAAGTGAATCTAGTTGTAGGTGATGGTTTACAG
TTTGTAAGGAGCAAGTTGAAAAGAACAAAACTATCATGTATCATACAAGATGCAAGTGATCCCTTCT
GGATACGATATGATGGCTCTGTGTTTATATTACCAAGTCATGTGTTATATGAAGAAGAGCATTTTCAACG
TATACACAGGTTGTTAGAGGCCAAGAATGGAGTGTGATGTATCAAGCCGAGACTTACAATATACCCAGC
AATCTGAAGGAGATTGCCAATGGAGAAAGGTATTGAAAAGTATTGGATTGGTAGAGTTTCGCTATGGAA

CGATCGCTATATCAACGTATCCTACTGGTCAGATTGGTTTCTTTGCTTCGCATGCTGGATACTATGATGA
TCATGCATGTATTAATTCTGATGAGGCAACAGCTGACGCATTGTGTAGTGAAATTGACAATCCTGAGATT
ACGCTGAATTGGATGGACTGGAAAAAGTGTCTGAAGACTTTTCATGATCTGGAAAGTACCAAGTACTACC
ATCCTCGTATTACAGAAGGTAAGTTACTATTAT

STYQKIEVYESDHF GKVFLLDDCLQLTERDAPHYNEMLAHVPVMEYLASNAGIDEQLDILVVGGGDGYV
SELLKYPHVGSIDHVDLDGDVISVSKDHFPAKSVWDNAKVNLVVGDGSQFVKEQVEKNKNYHVIIQDAS
DPFWIRYDGSVVILPSHVLYEEHFQRIHRLLEAKNGVLMYQAETYNIPSNLKEIAKWRKVLKSIGFGRV
RYGTIAISTYPTGQIGFF

TPS_11130

TATATCTCCTTCGAATGTGATGACCTTTCAAGTGAGGGTCCTTCTCAACGCATCAGCACACATGTGAATT
TGAACGGCTATATTGGACGAAAATCATGAACCTTGTTGAACCACAGCGAAACGGAGAAGCAACGACTGCG
GACGCGCAGAGAAAATCGATTGGCTGCAAAACACAACCCAAAGAACCGAGTTGACAATGACTGACG
TTCCCATTAATGAACCTTCTGGGCTTCCGACGAGGCAACAGTAATAGTTTCGCATGCAATCCTACTCATTCT
TGCCTTACTTGTGCTACCATCAGCTATTGCACTGCCCAACAATCCACATCCGAGTCCAAACGAGTCGAC
GAAGAGGAAGAAGAAATCGGGTACATTCAAACCTTCTGCTAAACACTCCGGCCGTACCACGCTAAACT
CTACCTATCAAAGATAGAAGTATATGAAAGTGATCACTTTGGTAAAGTCTTTCTATTGGATGATTGTTT
GCAATTGACTGAGAGGGATGCTCCGCATTATAATGAGATGTTGGCGCATGTTCCGGTTATGGAGTATCTA
GCTTCCAATGCAGGAATTGATGAACAGTTGGATATACTAGTAGTGGGCGGTGGTGATGGGTATGTAGTAT
CTGAACCTCTTGAAATATCCACATGTTGGATCGATAGATCATGTAGATTTGGATGGTGATGTGATTTCTGT
TTCCAAAGATCATTTTCCCTGGGCCAAGTCTGTTTGGGACAATGCGAAAGTGAATCTAGTTGTAGGTGAT
GGTTCACAGTTTGTAAAGGAGCAAGTTGAAAAGAACAAAACATCATGTGCATCATACAAGATGCAAGTG
ATCCCTTCTGGATACGATATGATGGCTCTGTGGTTATATTACCAAGTCATGTGTTATATGAAGAAGAGCA
TTTTCAACGTATACACAGTTGTTAGAGGCCAAGAATGGAGTGTGATGTATCAAGCCGAGACTTACAAT
ATACCCAGCAATCTGAAGGAGATTGCCAAATGGAGAAAGGTATTGAAAAGTATTGGATTGTTGGTAGAGTTC
GCTATGAACGATCGCTATATCAACGTATCCTACTGGTCAAGTATTGGTTTCTTTGCTTCGCATGCTGGATA
CTATGATGATCATGCATGTATTAATTCTGATGAGGCAACAGCTGACGCATTGTGTAGTGAAATTGACAAT
CCTGAGATTACGCTGAATTGGATGGACTGGAAAAAGTGTCTGAAGACTTTTCATGATCTGGAAAGTACCA
AGTACTACCATCCTCGTATTACAGAAGGTAAGTTACTATTATGTAACCTTGTCGCTTTCTGTATACGGTG
TTGCTTATTTGTCAATTTTGTGGCGTCATTTTGTGGCAATAGCTCGTTTGATCTTCCGTTGTGGGTTGA
GAAGACCGTCTACAATGATGCAAAAGAAATCTCAGATGAATAAAGTAACGATTTAAGTATGCATGATCTC
ATGCTCAATGATATGCTCCAGT

MTDVPINELLGFRRGNSNSSHAILLILALLVLP SAIALPNNPTSESKRVDEEEEEIGYIQTLNLTNPAVT
TLNSTYQKIEVYESDHF GKVFLLDDCLQLTERDAPHYNEMLAHVPVMEYLASNAGIDEQLDILVVGGGDG
YVVSSELLKYPHVGSIDHVDLDGDVISVSKDHFPAKSVWDNAKVNLVVGDGSQFVKEQVEKNKNYHVIIQ
DASDPFWIRYDGSVVILPSHVLYEEHFQRIHRLLEAKNGVLMYQAETYNIPSNLKEIAKWRKVLKSIGF
GRVRYGTIAISTYPTGQIGFFASHAGYYDDHACINSDEATADALCSEIDNPEITLNWMDWKKVSKTFHDL
ESTKYYHPRIHR*

TPS_23043

GAAGGGAGGATGGAAGAAGGGAGATCCTAGGTGGTTGATGAATGAGATGGCTAGTCCGGCGAGGCTCTTG
TTCTTGAATGGTACCTTGATGGTGGGTTTTGTCTTTGTATGATGTATCACAGTGCACATCATGCATCATT
TGCTCACCTCGTATTCCCTTCACCTCTTCTTCACAGAGTATTTCTGATTCTTTCCGCGAAATCCATGAGT
CTCTCGTCCAACCTGCCATGTTGCTCATCCATTTCCCAAGAATGTCGCCATTTTGGAGGAGGAGAAGG
AGCCACTCTTCTTGAGGTTCTCAAGCATCGTTGCGTTGAAAAGGCTACAATGATTGAAATTGATGCAACA
ATGGTGGAGTTATGCAAGGAACACTTGCCTGAAATGTCCAACCTGTTCTGATATTGTGGGGAGTGCACCTA
GTTGTTATGATGATAGGAGGACTGAGTTGGTGATTGCCGATGCCTTTCAGTACATCTTGGATAAGAAGGC
TGCATACGACGCTTTGATTGTAGACACCAAAGTGCCAGAAGATCACACTGAATTTACCGACGCAACGGTT
GTCAATGCCATGGTAGACTCTTTGACTTCCAATGGAGTCATGGCAGTTCACATTGGCACTGCTCCTTCCA
TACACGACCCCAAGGCTGATAAGGGAGTTTACCCCAAGCGAGAGCTCCTCACCAATCTTCTCGAAGTTAA
CCCCAACATTGCATCCATATTCAATTTACGAGGAGGCACACGTTGGCTTTTGGGAACCCACTTCTTCTC
GTCGCATGTGCGGACGTTTCTTGTGCGCAAGAAGTGGTA

FHESLVQPAMFAHPFPKNVAIFGGGEGATLLEVLKHSVEKATMIEIDATMVELCKEHLPEMSNCSDIVG
SAPSCYDDRRTELVIADAFQYILDKKAAYDVLIVDTKVPEDHTEFTDATVVNAMVDSLTSNGVMAV

TPS_173899

ATGAACCTCTGGGCTTCCGACGAGGCAACAGTAATAGTTTCGCATGCAATCCTACTCATTCTTGCCTTACT
TGTGCTACCATCAGCTATTGCACTGCCCAACAATCCACATCCGAGTCCAAACGAGTCGACGAAGAGGAA

GAAGAAATCGGGTACATTCAAACCCCTTCTGCTAAACACTCCGGCCGTCACCACGCTAAACCTACCTATC
 AAAAGATAGAAGTATATGAAAGTGATCACTTTGGTAAAGTCTTTCTATTGGATGATTGTTTGCAATTGAC
 TGAGAGGGATGCTCCGCATTATAATGAGATGTTGGCGCATGTTCCGGTTATGGAGTATCTAGCTTCCAAT
 GCAGGAATTGATGAACAGTTGGATATACTAGTAGTGGGCGGTGGTGATGGGTATGTAGTATCTGAACTCT
 TGAAATATCCACATGTTGGATCGATAGATCATGTAGATTTGGATGGTGATGTGATTTCTGTTTCCAAAGA
 TCATTTTCCCTGGGCCAAGTCTGTTTGGGACAATGCGAAAGTGAATCTAGTTGTAGGTGATGGTTCACAG
 TTTGTAAAGGAGCAAGTTGAAAAGAACAAAACTATCATGTATCATACAAGATGCAAGTGATCCCTTCT
 GGATACGATATGATGGCTCTGTGGTTATATTACCAAGTCATGTGTTATATGAAGAAGAGCATTTCACAG
 TATACACAGGTTGTTAGAGGCCAAGAATGGAGTGTGTGATGTATCAAGCCGAGACTTACAATATACCCAGC
 AATCTGAAGGAGATTGCCAATGGAGAAAGGTATTGAAAAGTATTGGATTGGTAGAGTTCGCTATGGAA
 CGATCGCTATATCAACGTATCCTACTGGTCAGATTGGTTTCTTTGCTTCGCATGCTGGATACTATGATGA
 TCATGCATGTATTAATTCTGATGAGGCAACAGCTGACGCATTGTGTAGTGAAATTGACAATCCTGAGATT
 ACGCTGAATTGGATGGACTGGAAAAAGTGTGCAAGACTTTTCATGATCTGGAAAGTACCAAGTACTACC
 ATCCTCGTATTACAGAAGGTAAGTTACTAT

STYQKIEVYESDHFVKVFLDDCLQLTERDAPHYNEMLAHVPVMEYLASNAGIDEQLDILVVGGGDGYVV
 SELLKYPHVGSIDHVDLDGDVISVSKDHFPWAKSVWDNAKVNLLVVGDSQFVKEQVEKNKNYHVIIQDAS
 DPFWIRYDGSVILP SHVLYEEEHFQRIHRLLEAKNGVLMYQAETYNIPSNLKEIAKWRKVLKSI GFGRV
 RYGTIAISTYPTGQIGF

TPS_153946

TCCATCACCAAAGAAAACCCCTTTTCTTCATCTAGTACCAGACGAATGCAGAACAAACACCAGCATGGCAGA
 CCAAACAGACGACGAAGAAATAATCACGGAGCAAAGAGCCAAGAGCTCCTTCCGCTACGTCGAAGCCGTA
 GCTCCCGGATTAAACCTCGATATGGACCTGCACACAATCCTCCACACTGCCGTCTCTGATTTCCAAGAGG
 TACAAGTGATTGAAAGCTACTTTGGACGAACGCTAGTCACTGATGGCAAGACGAGAGTGCCGAACACGA
 TGAGTTTGTATATCAGAGAGTTTAGTCCACCCTGCCCTATTCTGCTGCTGCCATCCTCTCCGCCGAAAGC
 GGACAAGGAGGTGCACCCAAATCTGTCTTCATCGGAGGAGGCGGAGAGTTGGCCACTGCTCGTGAAGTCC
 TCCGCCATTCCACCATCGAACGATGCGTCATGGTTGACATCGACCCTGCCGTAGTCAACGTATGCAAAAA
 GTACCTCCCCGAATGGGGCGGACAGGCTGTATCGACCACCCCAAAATGGAATACATTGTGGGAGACGCT
 CACAAATACCTCATGGAGACAAACGAGAAGTTCGACGTCATCATCATGGACATTTCCGATCCGATTGAGG
 CAGGACCGGGAGTGGCACTGTACACACAAGAGTTCTACCAACGTGCCGAGAGGTGTTGAACAAACCGCA
 TGGAGTATTTGTAACCTCAAGCTGGGAGTGCGGATTTCTGACCTCATCCGCATGCGTTTCTGAGGATGAG
 AATGACGACGATGCCAATAAGGAGACTTGTGTTTTAGTCCTATCAAGAATACTTTGGGTACGGTGTTTG
 ATCATGCCATTCCGTATTCTTGTCCGATTGCTAGTTTTGGAGAGGATTGGGGATATGTCATGGCTTTTAA
 TGGGGATCCTTCTCAGGGGAGGAAGTTGGCAGATTTGTCTCGGGAGAGTGTGGATGAGTTGATTGAGGAG
 CGTATTAGGTTGGTGCTGGCGTTCTGTGCATAGGTATCGGAGTAAGGGAGTCAAGAGGGCTATTAAAG
 GAAATGAGGTGGGCGCGGAGGTATTGAAGCATTATGATGGGGTCAGTCATCGGAGGTGTTTTGCTTTGAG
 TAAACCGTTGAGGGAGGCGATGAAGAGTGATGAGAGGATTATGACAGAGGCCAATCCAATCTTCATGTAT
 TAGAGGAGTTTTACTAAAAAGGAAGAGGTGATGAATTGGAGACGATATTGGACTGAATTGAGGGTTAACT
 TAGGAAATGCTAGCAACGCAAATCTTCTTCTCAGAGTGTAGTATGCTGTTCTTCGAGTACATTTACACCT
 TCACAAAGGATCAATTCAACGTAGCACTTGAGTGGATTACTATTTCGAATAA

FQEVQVIESYFGRITLVTGDKTQSAEHDEFVYHESLVHPALFCGQGGAPKSVFIGGGGELATAREVLRHST
 IERCVMVDIDPAVVNVCKKYLPEWGGQAVIDHPKMEYIVGDAHXYLMETNEKFDVIIMDISDPIEAGPGV
 ALYTQEFYQRAAEVLNKP HGVFVTQAGSADFETCCFSP IKNTLGTVFDHAIPYSCP IASFGEWDGYVMAF
 NGDPSQGRKLADLSRESVDELIEERIRLVKLHYDGVSHRRLFALSKPLREAMKSDERIMTEANPI

TPS_41806

ACAATGATCTTGATAGATACGTGCTTACCAAATTGAACCACGATATCAAGACGCCATTGGTATCAACATC
 AACTGAATATCAAACCTGTTGATGTGTATGAGTTGTTGCATCCCAAGGAACGAGACATGCAATCTTACAAG
 AAGTCACTTTAGAGAGACAACCTCTACGAAGCACAAACATCCGGAACCTATTGGTCCAAACCGATTGCTGA
 TGCTTGACGGTGTTATTCAAAGCACTTTGTTCCGGTGATGCTTCGTATCACGAGTCCATCGTTACCCCTGC
 CATGTTTACTCATTTCAAACCTAAACGAGTTGCAATTGTAGGAGGAGGAGAAGGAGCAACGCTTCGTGAA
 GTACTAAAACACGAAACTGTTGAGCGAGCAGTAATGATCGAAATAGACGAAAGTGTTGTTGAGTTGGCAA
 GAGAATATCTGCCTGAGTGGAGCGATTGTTCTGATATCGATGCTAGTTCCGAGTGGTGCTTTGACGATGA
 ACGAGCGGAGGCAAAGTTTGAAGATGCCATGACATACTTCGTCGATACGTTCTACAATGACAACTCTGCA
 AGATATCAACGCGAAGATGAGTATGATATCATCATTATGGACGCACTTGATCCCAATGACGGCGTTGACT
 TCGCCACATATTTGTACACAAGTGATAGCTATATCCAATCTCTGTACAAAGGATTAAACACAATCAGGAAT
 CTTGGTTGTACAGGTAGGAGAGATCCCCGAAATCGAGCTCCTCCAGATGAACCTGGGACCTTCGCCAAT
 CGTGCACTGATGATCAAGAACTGGAAGAGGTTGGATTCAAGTCAATTACATTTATGCTGAAGCACACT
 CTGGCTTCCTTGCTCCATGGAGTACATTAGTTACTTTCAAGGACTACGAAACGAGAGCAGACTGGTATCG

TAACGAGGC

RLLMLDGV IQSTLFGDASYHESIVHPAMFTHSNPKRVAIVGGGEGATLREVLKHETVERAVMIEIDESV
ELAREYLP EWSDYAMTYFVDTFYNDNSARYQREDEYDIIIMDALDPNDGVDFATYLYTSDSYIQSLYKGL
TQSGILVVQVG

TPS_109281

GTCATTCTTACAATGATCTTGATAGATACGTGCTTACCAAATTGAACCACGATATCAAGACGCCATTGGT
ATCAACATCAACTGAATATCAAACCTGTTGATGTGTATGAGTTGTTGCATCCCAAGGAACGAGACATGCAA
TCTTACAAGAAGTCACTTTTACGAGAGACAACCTCTACGAAGCACAAACATCCGGAACCTATTTGGTCCAAACC
GATTGCTGATGCTTGACGGTGTTATTCAAAGCACTTTGTTCCGGTGATGCTTCGTATCACGAGTCCATCGT
TCACCCTGCCATGTTTACTCATTCCAACCCTAAACGAGTTGCAATTGTAGGAGGAGGAGAAGGAGCAACG
CTTCGTGAAGTACTAAACACGAACTGTTGAGCGAGCAGTAATGATCGAAATAGACGAAAGTGTGTTG
AGTTGGCAAGAGAATATCTGCCTGAGTGGAGCGATTGTTCTGATATCGATGCTAGTTCCGAGTGGTGCTT
TGACGATGAACGAGCGGAGGCAAAGTTTGAAGATGCCATGACATACTTCGTCGATACGTTCTACAATGAC
AACTCTGCAAGATATCAACGCGAAGATGAGTATGATATCATCATTATGGACGCACTTGATCCCAATGACG
GCGTTGACTTCGCCACATATTTGTACACAAGTGATAGCTATATCCAATCTCTGTACAAAGGATTAACACA
ATCAGGAATCTTGGTTGTACAGGTAGGAGAGATCCCCGAAATCGAGCTCCTCCAGATGAACCTGGGACC
TTCGCCAATCGTGCATGATGATCAAGAACTGGAAGAGGTTGGATTCAAGTCAATTCACATTTATGCTG
AAGCACACTCTGGCTTCCTTGCTCCATGGAGTACATTAGTTACTTTCAAGGACTACGAAACGAGAGCAGA
CTGGTATCGTAACGAGGCCGAAAT

GPNRLLMLDGV IQSTLFGDASYHESIVHPAMFTHSNPKRVAIVGGGEGATLREVLKHETVERAVMIEIDE
SVVELAREYLP EWSDCSDIDASSEWCFFDERAEAKFEDAMTYFVDTYQREDEYDIIIMDALDPNDGVDF
TYLYTSDSYIQSLYKGLTQSGILVVQVGEI

TPS_30181

CACACAACTACGTGGGTTTAGAGAGGGATTGCTCCGGGGTATGTTTCGCACCAGCAATCCTCTGGATGG
TGACTTGGGACGGTATGTCCTTGAAAGTTGGATTTTCGATCTCAAAACACCCTTGATTTCTACAAAGACG
GAATTCCAGAGTGTGGATGTCTATGAACCTTTGTATCCGAGGTTGCGAAATGCTGAATCCATCAAAAGT
CGTTGGAAGATAGGGATTCTTACGAATACGAGAATCCTGAGCTGTTTGCTCCCGATCGTGTGCTCTTTT
GGATGGAGTTATTACAGTACTCATTATGGCGATGCCCCATACCATGAATCTATCGTACATCCAGCGATG
ATTACTCATTCAAACCCAAAACGCGTTGCCATTGTTGGAGGAGGTGAGGGTGCTACGTTGCGTGAAGTGC
TAAAGCATGGTTTCAGTGGAGAAAGCTACAATGATTGAAATTGACGAGGATGTTGTGGACATTTCCAAAGA
GTTCTTGCCAGAGTGGTCAAATTGTTTCGGATATTGTGGGCAGTGACAGTGGTGCTTTGATGACGAAAGG
GTGGATTCTAGGTTTGAGGATGCCATGGAATACTTCAAGAGTCGATTTGCAACAAAAACGTTAGCCGCGG
CTTCTTCTGATGAACGATTTGACGTCATTATCATGGATGCCCTGGATCCAAATGATGAGATTGAGTTTGC
AGTGGAGTT

YQKSLEDRDSYEYENPELFAPDRVFLDGV IQSTHYGDAPYHESIVHPAMITHSNPKRVAIVGGGEGATL
REVLKHGSVEKATMIEIDEDVVDISKEFLPEWS

TPS_106272

ATGGTGACTTGGGACGGTATGTCCTTGAAAGTTGGATTTTCGATCTCAAAACACCCTTGATTTCTACAAA
GACGGAATTCCAGAGTGTGGATGTCTATGAACCTTTGTATCCGAGGTTGCGAAATGCTGAATCCTATCAA
AAGTCGTTGGAAGATAGGGATTCTTACGAATACGAGAATCCTGAGCTGTTTGCTCCCGATCGTGTGCTCT
TTTTGGATGGAGTTATTACAGTACTCATTATGGCGATGCCCCATACCATGAATCTATCGTACATCCAGC
GATGATTACTCATTCAAACCCAAAACGCGTTGCCATTGTTGGAGGAGGTGAGGGTGCTACGTTGCGTGAA
GTGCTAAAGCATGGTTTCAGTGGAGAAAGCTACAATGATTGAAATTGACGAGGATGTTGTGGACATTTCCA
AAGAGTTCTTGCCAGAGTGGTCAAATTGTTTCGGATATTGTGGGCAGTGACAGTGGTGCTTTGATGACGA
AAGGGTGGATTCTAGGTTTGAGGATGCCATGGAATACTTCAAGAGTCGATTTGCAACAAAAACGTTAGCC
GCGGCTTCTTCTGATGAACGATTTGACGTCATTATCATGGATGCCCTGGATCCAAATGATGAGATTGAGT
TTGCAGTGGAGTTGTACCAGAGTGAGTCTTTTATTGGATCACTGTACAAGGGATTGACTGACTCGGGTAT
TTTGGCAGTGCAGGTTGGAGAAACACCAGATCACTGTGATCCTCCGACGAAGCAGATCAGTTTGCCAAT
AGGCAGGTTATGCTGCAAAAGTTGCAAGATGTTGGATTTAAGAGCATTACATCTATACAGAATCGCACT
CTGGATTCCATTGGGGCTTGAGGTACACTGGTGGCATTCAAGGACTACGAAACAAGGGCGAACTGGTACCG
TAGTACTCC

RVFLDGV IQSTHYGDAPYHESIVHPAMITHSNPKRVAIVGGGEGATLREVLKHGSVEKATMIEIDEDVV

DISKEFLPECAEWCFDDERVDSEFEDAMEYFKTAASSDERFDVIIMDALDPNDEIEFAVELYQSESFIGS
LYKGLTDSGILAVQVG

TPS_103915

TATGCCAACTTATGCGGATGGTTTGAAGGGAGGATGGAAGAAGGGAGATCCTAGGTGGTTGATGAATGAG
ATGGCTAGTCCGGCGAGGCTCTTGTCTTGAATGGTACCTTGATGGTGGGTTTTGTCTTTGTATGATGTA
TCACAGTGCACATCATGCATCATTGCTCACCTCGTATTCCCTTCACCTCTTCTTCACAGAGTATTTCTG
ATTCTTTCCGCGAATTCATGAGTCTCTCGTCCAACCTGCCATGTTTCGCTCATCCATTTCCCAAGAATGT
CGCCATTTTTGGAGGAGGAGAAGGAGCCACTCTTCTTGAGTTCTCAAGCATCGTTTCGGTTGAAAAGGCT
ACAATGATTGAAATTGATGCAACAATGGTGGAGTTATGCAAGGAACACTTGCCTGAAATGTCCAACGTGT
CTGATATTGTGGGGAGTGACCTAGTTGTTATGATGATAGGAGGACTGAGTTGGTGATTGCCGATGCCCTT
TCAGTACATCTTGGATAAGAAGGCTGCATACGACGTCTTGATTGTAGACACCAAAGTGCCAGAAGATCAC
ACTGAATTTACCGACGCAACGGTTGTCAATGCCATGGTAGACTCTTTGACTTCCAATGGAGTCATGGCAG
TTCACATTGGCACTGCTCCTTCCATACACGACCCCAAGGCTGATAAGGGAGTTTACCCCAAGCGAGAGCT
CCTCACCAATCTTCTCGAAGTTAACCCCAACATTGCATCCATATTCATTTA

SISDSFREFHESLVQPAMFAHPFPKNVAIFGGGEGATLLEVLKHSVEKATMIEIDATMVLECKEHLPEI
APSCYDDRTELVIADAFQYILDKKAAYDVLIVDTKVP

TPS_41289

ACTCGATGCACATCCACAACCTCCTTTTGCCATCACTTTCACTGGCTTTTACTTCCCGTCAATCTCCGTA
CCGCCTCCATCACCAAAGAAAACCTTTTCTTCATCTAGTACCAGACGAATGCAGAACACACCAGCATG
GCAGACCAAACAGACGACGAAGAAATAATCACGGAGCAAAGAGCCAAGAGCTCCTTCCGCACGTGCAAG
CCGTAGCTCCCGGATTAAACCTCGATATGGACTGCACACAATCCTCCACACTGCCGTCTCTGATTTCGA
AGAGGTACAAGTGATTGAAAGCTACTTTGGACGAACGCTAGTCACTGATGGCAAGACGAGTGGCCGGA
CACGATGAGTTTGTATATCACGAGAGTTTAGTCCACCCTGCCTTATTCTGGTCTGCCATCCTCTCCGGCG
AAAGCGGACAAGGAGGTGCACCCAAATCTGTCTTCATCGGAGGAGGCGGAGAGTTGGCCACTGCTCGTGA
AGTCCTCCGCCATTCCACCATCGAACGATGCGTCATGGTTGACATCGACCCTGCCGTAGTCAACGTATGC
AAAAAGTACCTCCCCGAATGGGGCGGACAGGCTGTCATCGACCACCCCAAAATGGAATACATTGTGGGAG
ACGCTCACAAATACCTCATGGAGACAAACGAGAAGTTTCGACGTCATCATGACATTTCCGGATCCGAT
TGAGGCAGGACCGGGAGTGGCACTGTACACACAAGAGTTCTACCAACGTGCCGAGAGGTGTTGAACAAA
CCGCATGGAGTATTTGTAACCTCAAGCTGGGAGTGGGATTTTCGTACCTCATCCGATGCGTTTCTGAGG
ATGAGAATGACGACGATGCCAATAAGGAGACTTGTGTTTTAGTCCATCAAGAATACTTTGGGTACGGT
GTTTGATCATGCCATTCCGTATTCTTGTCCGATTGCTAGTTTTGGAGAGGATTGGGGATATGTCATGGCT
TTTAATGGGGATCCTTCTCAGGGGAGGAAGTTGGCAGATTTGTCTCGGGAGAGTGTGGATGAGTTGATTG
AGGAGCGTATTAGGTTGGTGCCTGGCGTTTCTGTGCATAGGTATCGGAGTAAGGGAGTCAAGAGGGCTAT
TAAAGGAAATGAGGTGGGCGCGGAGGTATTGAAGCATTATGATGGGGTCAGTCATCGGAGGTTGTTTGCT
TTGAGTAAACCGTTGAGGGAGGCGATGAAGAGTGATGAGAGGATTATGACAGAGGCCAATCCAATCTTCA

YVEAVAPGLNLDMDLHTILHTAVSDFQEVQVIESYFGRITLVDGKTQSAEHDEFVYHESLVHPALFWSAI
LSGESGQGGAPKSVFIGGGELATAREVLRHSTIERCVMVDIDPAVVNVCKKYLPEWGGQAVIDHPKMEY
IVGDAHXYLMETNEKFVDVIMDISDPIEAGPGVALYTQEFYQRAAEVLNKPFGVFTVQAGSADFPVPHFA
FPEDENDDDANKETCCFSPIKNTLGTVFDDHAIPYSCPIASFGEWDWGYVMAFNGDPSQGRKLADLSRESVD
ELIEERI

b) Vollständige cDNA-Sequenzen von *TPS 108361* und *TPS 41289*

TPS_108361

ATGGCTGCCTTCGCCCCACAACACAGTATCGTGGTAGCATTAACCTTTGGTCTCCATCTGTTTGGCTTGCACCGTC
ACTGCATCGTCGTCATCAACAACGCCCACCGCCCCGCCAACGCCGTGACCCACAACATGAGCGACTTTCTCTCCG
CCGCAAGATTACTCGCACCTCATCATAGACAATTGGTTCCACGAACGTGGTCCTCTCTGGCCAGGCCAATCCTTC
TCTCTCCAAATCGAAAAGATACTCTACCATCAAAAGTCTCTCTTCCAAGACGTGCTCGTGTGTTGACTCGACCAAC
CATGGCAAAGTGCTGGTATTGGATGGAGTCATTCAATGCACCGAACATGATGAACACAGTTACCAAGAGATGATG
GCGCACATTCTCTCTACTCTCATCCAAATCCCAAGAAGGTACTGGTCATCGGAGGCGGAGACGGAGGTGTCCTA
CGCGAGATAGCACGTATCCTGGAGTTGAGGAGATTTGCATCTGTGAGTTGGACAAGGATGTCATTGACGTATCC
AAAAAGTACTTGCCGTTTCATGGCAAAGGGATTGACGATCCACGTGTCAAAGTACACATTATGGACGGTGCCAAA
TTCATGGAGGAGAACCAATCTGCATTTGATGTCATCGTTACGGACTCGTCGGATCCTGTAGGACCAGCGAGTGTC

TTGTTTGAGACTCCATTCTACAAGGCTTTGCATGGAAGTTTACGTGAGGGAGGAATCATTTCACACAGGGGGAA
TGTGTTTGGCTTCACGTTGACTTGATCCAACCGTTGATCAAGGCGATTTCAGCCTCTATTTACGACTGTGGAGTAC
GCTTACTGCACGATTCCGAGCTATCCGAGTGGGCAGATTGGGTTTATTATTGCAACCAAGGGTGGAAAAGGGTGT
AGGAATCCAGTACGTGCACCAGAGGAGAGTGTGCAGAAGGAGTTAAAGTATTATACTCCCCGATATTCATAGTGCA
GCGTTTGTGCTGCCTGCGTTTGCACAGCGAGCTATTTTCGGTGGTTTGTGCAAGTAG

MAAFAPQHSIVVALTLVSICLACTVTASSSSTTPTAPPTPLTHNMSDFPPPQDYSHLIIDNWFHERGPLWPGQSF
SLQIEKILYHQKSLFQDVLVFDSTNHGKVLVLDGVIQCTEHDEHSYQEMMAHIPLYSHPNPKVLVIGGGDGGVL
REIARHPGVEEICICELDKDVIDVSKKYLPMAGKFDDPRVKVHIMDGAKFMEENQSAFDVIVTDSSDPVGPASV
LFETPFYKALHGSRLREGGIICTQGECVWLHVLDLIQPLIKAIQPLFTTVEYAYCTIPSYPSGQIGFIATKGGKGC
RNPVRAPEESVQKELKYYTPDIHSAAFVLPFAQRAIFGGLSK

TPS_41289

ATGCACATCCACAACCTCCTTTTGCCATCACTTTTACTGGCTTTTACTTCCCGTCAATCTCCGTACCGCTCCAT
CACCAAAGAAAACCTTTTCTTCATCTAGTACCAGACGAATGCAGAACAACACCAGCATGGCAGACCAAACAGAC
GACGAAGAAATAATCACGGAGCAAAGAGCCAAGAGCTCCTTCCGCTACGTGCAAGCCGTAGCTCCCGGATTAAAC
CTCGATATGGACCTGCACACAATCCTCCACACTGCCGTCTCTGATTTCCAAGAGGTACAAGTGATTGAAAGCTAC
TTTGGACGAACGCTAGTCACTGATGGCAAGACGCAGAGTGCCGAACACGATGAGTTTGTATATCACGAGAGTTTA
GTCCACCCTGCCTTATTCTGGTCTGCCATCCTCTCCGGCGAAAGCGGACAAGGAGGTGCACCCAAATCTGTCTTC
ATCGGAGGAGGCGGAGAGTTGGCCACTGCTCGTGAAGTCTCCGCCATTCCACCATCGAACGATGCGTCATGGTT
GACATCGACCCTGCCGTAGTCAACGTATGCAAAAAGTACCTCCCCGAATGGGGCGGACAGGCTGTCATCGACCAC
CCCAAATGGAATACATTGTGGGAGACGCTCACAATACTCATGGAGACAAACGAGAAGTTCGACGTCATCATC
ATGGACATTTTCGGATCCGATTGAGGCAGGACCGGGAGTGGCACTGTACACACAAGAGTTCTACCAACGTGCCGCA
GAGGTGTTGAACAACCGCATGGAGTATTTGTAACCTCAAGCTGGGAGTGCGGATTTCGTACCTCATCCGCATGCG
TTTCCTGAGGATGAGAATGACGACGATGCCAATAAGGAGACTTGTGTTTTAGTCCTATCAAGAATACTTTGGGT
ACGGTGTGTTGATCATGCCATTCCGTATTCTTGTCCGATTGCTAGTTTTGGAGAGGATTGGGGATATGTCATGGCT
TTTAATGGGGATCCTTCTCAGGGGAGGAAGTTGGCAGATTTGTCTCGGGAGAGTGTGGATGAGTTGATTGAGGAG
CGTATTAGGTTGGTGCCTGGCGTTCCTGTGCATAGGTATCGGAGTAAGGGAGTCAAGAGGGCTATTAAAGGAAAT
GAGGTGGGCGCGGAGGTATTGAAGCATTATGATGGGGTCAGTCATCGGAGGTTGTTTGCTTTGAGTAAACCGTTG
AGGGAGGCGATGAAGAGTGATGAGAGGATTATGACAGAGGCCAATCCAATCTTCATGTATTAG

MHIHNNLLPSLSLAFTSRQSPYRLHHQRKPFSSSSTRMQNNTSMADQTDDEEIIITEQRAKSSFRIVEAVAPGLN
LMDMLHTILHTAVSDFQEVQVIESYFGRITLVDGKTQSAEHDEFVYHESLVHPALFWSAILSGESGQGGAPKSVF
IGGGGELATAREVLRHSTIERCVMVDIDPAVVNVCKKYLPEWGGQAVIDHPKMEYIVGDAHKYLMETNEKFDV
MDISDPIEAGPGVALYTQEFYQRAAEVLNKPVGVTQAGSADFVPHPHAFPEDENDDDANKETCCFSP
IKNTLGTVFDHAIPYSCPIASFGEWDGYVMAFNQDPSQGRKLADLSRESVDELIEERIRLVPGVPVHRYRSKGVKRAIKGN
EVGAEVLKHYDGVSHRRLFALSKPLREAMKSDERIMTEANP
IFMY

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'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGGIIIG-3'
5Race-2	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'
5R(412)-1	5'-CAATCACTTGTACCTCTTGG-3'
5R(412)-2	5'-CATCGTCGTCATTCTCAC-3'

Für die 3'-RACE-PCR von *TPS_41289*

3R412-1	5'-AACCCCTTTTCTTCATCTAGT-3'
3R412-2	5'-ACTTTGGGTACGGTGTGTTGA-3'

ONDT25	5'-GCCGCCGAATTCCCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
ON644	5'-GCCGCCGAATTCCCAGTT-3'
Für die Amplifikation von <i>TPS_108361</i>	
108361-1	5'-CATATGGCTGCCTTCGCCCCAC-3'
10861-2	5'-CTACTTCGACAAACCACCG-3'
108-Alternativ	5'-CTGACCCACAACATGAGC-3'
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'-ATGGACTIONCGGATGTACTTCT-3'
TTH-SPD2	5'-CTACCCCTTGTAAGGGGC-3'
Für die Amplifikation von <i>SPMS1</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	
SPMS-1	5'-ATGGAGGGAGACGTCGGAATAG-3'
SPMS-2	5'-TCAAGAAGCCAGAAGTGAAGCTAC-3'
Für die Amplifikation von <i>Spe4</i> aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
SC-1	5'-ATGGTTAATAATTCACAGCATCCT-3'
SC-2	5'-TCATTCATTAATGACCTTGTCTG-3'
Für die Amplifikation von <i>TPS_41289</i> für die TpNR-Expressionskassette	
412I-Trafo	5'-ATCATAATCATGCACATCCACAACCTCCT-3'
412II-Trafo	5'-CTAATACATGAAGATTGGATTGGC-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'-GTGAGCGGATAACAATTTTCAC-3'
PQE-Ende	5'-GAGGTCATACTGGATCTAC-3'
Für die Amplifikation von β -Tubulin (<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'-GGTGCACCCAAATCTGTCTT-3'
412-B	5'-TGATGACGTGGAACCTTCTCG-3'
Für die Amplifikation von <i>TPS_108361</i> (RT-PCR)	
108-A	5'-GCCAAATTCATGGAGGAGAA-3'
108-B	5'-TCAACGGTTGGATCAAGTCA-3'
Für die Amplifikation von <i>TPS_41806</i>	
418-A	5'-GGTCCAGAATCCGAAGATGA-3'
418-B	5'-ATGTCTCGTTCTTGGGATG-3'
Für die Amplifikation von <i>TPS_106272</i>	
106-A	5'-GCAGAGTGGTGCTTTGATGA-3'

106-B	5'-ACCTGCACTGCCAAAATACC-3'
Für die Amplifikation von TPS_22645	
226-A	5'-TTGCTTTGACGATGAACGAG-3'
226-B	5'-GGACGAACACTCCATCGTTT-3'
Für die Amplifikation von TPS_101424	
101-A	5'-CGGCAAGTCTGTACCCAAAT-3'
101-B	5'-GGTCCATTGCGTAGGTAGGA-3'
Für die Amplifikation von TPS_11130	
111-A	5'-TCCAATGCAGGAATTGATGA-3'
111-B	5'-ACTTTCGCATTGTCCCAAAC-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'-GCCAAATTCATGGAGGAGAA-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