

# **Untersuchungen zur Struktur und Spezifität der Phycobiliproteinlyase CPES aus *Guillardia theta***

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität  
Kaiserslautern zur Erlangung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“ (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Dissertation

angefertigt im

Fachbereich Biologie  
Abteilung Mikrobiologie

vorgelegt von

**Natascha Tomazic**

geb. Riedel

Wissenschaftliche Aussprache: Kaiserslautern, 21.11.2019

Referent: Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel  
Korreferent: Prof. Dr. Michael Schroda

Kaiserslautern, 2019 – D 386



# Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei meiner Doktormutter Nicole Frankenberg-Dinkel bedanken. Sie gab mir nicht nur nach einer gefühlt unendlichen Suche die Chance, bei ihr in der Abteilung Mikrobiologie zu promovieren, sondern auch dieses spannende und herausfordernde Thema, in dem ich mich die letzten Jahre sehr wohl gefühlt habe. Mit gutem Rat und aufmunternden Worten stand und steht sie mir und unserer gesamten Gruppe zur Seite. Das erleichterte es mir auch dann weiterzumachen, wenn einmal gar nichts funktionieren wollte. Vielen Dank für so viel positive Energie!

Für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Schroda bedanken.

Prof. Dr. Sandro Keller möchte ich zunächst für die bereitwillige und freundliche Funktionsübernahme als Vorsitz danken. Zudem ermöglichte er mir, in seinem Labor die ITC-Messungen für diese Arbeit durchzuführen – unter Anleitung durch Florian Mahler (Danke, Flo!) – und unterstützte mich außerdem bei der Findung von Problemlösungen.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Antonio Pierik für seine maßgebliche Unterstützung bei der Erstellung, der für die Bestimmung der Bindungsaffinitäten verwendeten Gleichung, sowie für jeden Rat und Diskussionsansatz seinerseits.

Bei Wendy Schluchter (University of New Orleans) bedanke ich mich für die freundliche Bereitstellung von benötigten Konstrukten.

Mein Dank gilt des Weiteren meinen Studenten, die ich mit großer Freude in den letzten Jahren betreut habe: Jana Hartmann, Christina Huber und Tatjana Wirz. Insbesondere Jana Hartmann verdanke ich einige Proteinvarianten, die sie während ihrer Bachelorarbeit unter meiner Betreuung erzeugte.

Auch unserem tollen Mibi-Team, das wir die letzten Jahre waren und hoffentlich immer sein werden, möchte ich danken: Katrin, Kerstin, Lorian, Bin, Marco, Anne, Martina und Benni. Es war nicht immer einfach, aber Freundschaft und ausgiebige Mittagspausen mit euch versüßten den Laboralltag. Ihr gabt mir ein neues Zuhause in Kaiserslautern. An dieser Stelle danke ich auch Ireen, Kathrin P., Eric, Sylvia, Julia, Susanne und Ute dafür.

Abschließend gilt mein Dank natürlich meiner Familie und meinen Freunden, die sich die letzten Jahre meine stetigen Labornörgeleien anhören mussten und dennoch stets ein offenes Ohr für mich haben. Mein Mann und meine Zwillingsschwester ganz vorne mit dabei.

Ich bin froh, dass ich euch habe!

Eure Tascha

Für meine Mama

Diese Arbeit entstand zwischen dem 01.05.2015 und 31.12.2018 unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel. Sie wurde von Frau M. Sc. Natascha Tomazic (geb. Riedel) im Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern in der Abteilung Mikrobiologie angefertigt.

Die hier vorgestellten Ergebnisse stammen vom Autor.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
ACN	Acetonitril
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxosulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser; hier: MilliQ® Reinstwasser
B	Betain
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BLAST	engl. <i>basic local alignment search tool</i>
BR	Bilirubin
BV	Biliverdin IX $\alpha$
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Chl	Chlorophyll
Cmp	Chloramphenicol
DHBV	15,16-Dihydrobiliverdin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
$\epsilon$	Molarer Extinktionskoeffizient
E	Emission
EC	engl. <i>enzyme commission (numbers)</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation (engl. <i>electrospray ionization</i> )
EST	engl. <i>expressed sequence tag</i>
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alii</i> (Maskulinum), <i>et aliae</i> (Femininum), <i>et alia</i> (Neutrum))
EtOH	Ethanol
FDBR	Ferredoxin-abhängige Bilinreduktase (engl. <i>ferredoxin dependent bilin reductase</i> )
<i>F. diplosiphon</i>	<i>Fremyella diplosiphon</i>
fwd	engl. <i>forward</i>
<i>G. theta</i>	<i>Guillardia theta</i>
HCl	Salzsäure (Chlorwasserstoff)
HO	Hämoxxygenase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
Kan	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
LAP	Lyaseassaypuffer
LB	Luria Bertani (-Medium)
LC	Flüssigkeitschromatographie (engl. <i>liquid chromatography</i> )
LTD	engl. <i>luminal targeting domain</i>
max	Maximum
MeOH	Methanol

## ..... Abkürzungsverzeichnis .....

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MS	Massenspektrometrie (engl. <i>mass spectrometry</i> )
mSA	mit Sequenzanhang
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
OD	Optische Dichte
oSA	ohne Sequenzanhang
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBP	Phycobiliprotein
PBP Lyasen	Phycobiliproteinlyasen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PC	Phycocyanin
PCB	Phycocyanobilin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
PEB	Phycoerythrobilin
PEC	Phycoerythrocyanin
pH	Potentia Hydrogenii
<i>P. marinus</i>	<i>Prochlorococcus marinus</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	engl. <i>reverse</i>
RR	engl. <i>twin arginine motif</i>
RT	Raumtemperatur
S	Sorbitol
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecylsulfate</i> )
Spc	Spectinomycin
STAGE	engl. <i>stop and go extraction</i>
SV	Säulenvolumen
<i>T. elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure (engl. <i>trifluoroacetic acid</i> )
T	Temperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
ü.N.	über Nacht
UniProt	engl. <i>universal protein database</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (engl. <i>volume per volume</i> )
vis	Sichtbar ( <i>visible</i> )
w/v	Masse pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i> )
<b>Aminosäuren</b>	
Ala, A	Alanin
Arg, R	Arginin
Asc, N	Asparagin
Asp, D	Asparaginsäure
Cys, C	Cystein
Glu, E	Glutaminsäure
His, H	Histidin
Ile, I	Isoleucin
Leu, L	Leucin
Met, M	Methionin
Phe, F	Phenylalanin
Pro, P	Prolin
Ser, S	Serin
Trp, W	Tryptophan
Val, V	Valin

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1	Die oxygene Photosynthese.....	5
1.2	Cryptophyten - Entstehung und Aufbau.....	6
1.3	Phycobiliproteine – Chromoproteine für die Lichtsammlung.....	9
1.3.1	Phycobiline als Chromophore der Phycobiliproteine.....	9
1.3.2	Phycobiliproteine von Cryptophyten, Cyanobakterien und Rotalgen im Vergleich.....	13
1.3.3	Phycoerythrin PE545 aus <i>G. theta</i> .....	17
1.4	Phycobiliproteinlyasen.....	18
1.4.1	Putative Phycobiliproteinlyasen in <i>G. theta</i> .....	21
1.4.2	Die eukaryotische Phycobiliproteinlyase <i>GtCPES</i> .....	22
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	23
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1	Materialien.....	24
2.1.1	Geräte.....	24
2.1.2	Labormaterial, Chemikalien, Enzyme, Antikörper und Kits.....	26
2.1.3	Bakterienstämme.....	27
2.1.4	Plasmide.....	27
2.1.5	Oligonukleotide.....	31
2.1.6	Medien und Zusätze.....	32
2.2	Mikrobiologische Methoden.....	33
2.2.1	Lagerung und Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	33
	Kultivierung in Flüssigmedium.....	33
	Bestimmung der Zelldichte.....	34
	Kultivierung auf Agar-Platten und Lagerung als Glycerin-Gefrierkulturen..	34
2.2.2	Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	34
2.2.3	Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	35
2.3	Molekularbiologische Techniken.....	35
2.3.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	35
	Nukleinsäuren-Konzentrationsbestimmung.....	36

2.3.2	Konstruktion von Expressionsvektoren.....	37
	DNA Amplifikation mittels PCR.....	38
	Reinigung des PCR-Produkts.....	39
	DNA Restriktion.....	39
	Ligation von DNA-Fragmenten.....	39
	Zielgerichtete Mutagenese .....	40
	Sequenzierungsanalyse.....	41
2.3.3	Agarosegelelektrophorese.....	41
2.4	Proteinbiochemische und biophysikalische Methoden.....	42
2.4.1	(Ko-)Produktion rekombinanter Proteine in <i>Escherichia coli</i> .....	42
	<i>GtCPES</i> und Phycobiliprotein- $\beta$ -Untereinheiten .....	42
	Phycobiliproteinlyasen <i>GtCPCX</i> und <i>GtCPEZ</i> .....	43
	Koproduktion von Phycobiliproteinlyasen und Phycobilinen mit Duet- Vektoren.....	44
2.4.2	Reinigung und Detektion rekombinanter Proteine .....	45
	Zellaufschluss.....	45
	Testaufschluss zur Bestimmung der Löslichkeit.....	46
	Affinitätschromatographie.....	46
	Dialyse (Umpufferung).....	48
	Proteinkonzentrierung und -konzentrationsbestimmung .....	48
	Extinktionskoeffizienten-Bestimmung von Phycobiliproteinlyase: Bilin- Komplexen .....	50
	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	50
	Proteindetektion mittels Western-Blot.....	52
2.4.3	Schmelztemperaturbestimmung (ThermoFluor Assay) .....	53
2.4.4	Produktion und Präparation von Phycobilinen.....	54
	Isolierung von Phycobilinen (PCB, PEB) aus <i>E. coli</i> .....	54
	Isolierung von PCB aus <i>Spirulina platensis</i> .....	55
	Präparation der isolierten Phycobiline .....	56
	Phycobilinanalyse mittels HPLC.....	57
2.4.5	Charakterisierung der Phycobiliproteinlyase-Aktivität.....	58
	Bindestudien zur Phycobiliproteinlyase-Phycobilin-Interaktion (UV/vis- Spektroskopie).....	59
	Bestimmung der Bindungsaffinität.....	59

Phycobilin-Transfer auf Phycobiliprotein- $\beta$ -Untereinheiten (Fluoreszenzspektroskopie).....	61
Zink-induzierte Fluoreszenz .....	62
Identifikation von Chromopeptiden mittels Massenspektrometrie .....	63
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>66</b>
3.1 Produktion und Reinigung putativer Phycobiliproteinlyasen aus <i>G. theta</i> ...	66
3.2 Untersuchungen zum <i>GtCPES</i> vermittelten PEB-Transfer.....	72
3.2.1 Produktion und Reinigung von <i>CpeB</i> aus <i>Prochlorococcus marinus</i> MED4 ...	72
3.2.2 Präparation von 3(Z)-PEB mittels Gefriertrocknung.....	74
3.2.3 Produktion und Reinigung von <i>GtCPES</i> .....	75
3.2.4 <i>GtCPES</i> unterstützt den PEB-Transfer auf Cys <sup>82</sup> der Phycobiliprotein $\beta$ - Untereinheit ( <i>PmCpeB</i> ) .....	76
3.2.5 Disulfidbrücke zwischen den <i>GtCPES</i> -Monomeren besitzt keinen Einfluss auf die Transferaktivität.....	79
3.3 Charakterisierung der <i>GtCPES</i> -Struktur: Identifizierung bindungs- und transferrelevanter Aminosäurereste .....	80
3.3.1 Produktion und Reinigung der <i>GtCPES</i> Varianten .....	82
3.3.2 Identifizierung relevanter Aminosäuren für die PEB-Bindung .....	82
3.3.3 Trp <sup>75</sup> und Ser <sup>150</sup> sind relevant für den PEB-Transfer .....	89
3.3.4 Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen <i>GtCPES</i> (Varianten) und 3(Z)-PEB.....	92
3.4 Analyse der Substratspezifität von <i>GtCPES</i> .....	94
3.4.1 Produktion und Reinigung von <i>GtCPES</i> Varianten mit vergrößerter Binde- tasche .....	95
3.4.2 Einzel-Aminosäureaustausch erweitert Substratspektrum von <i>GtCPES</i> .....	96
3.4.3 <i>GtCPES_M67A</i> bildet stabilen Komplex mit PCB und PEB <i>in vivo</i> in <i>E. coli</i> ..	102
3.5 Untersuchungen zum PCB-Transfer durch <i>GtCPES_M67A</i> .....	106
3.5.1 Kontrolltransfer von 3(E)-PCB auf SCpcB durch NCpcS.....	107
3.5.2 Phycobilin-Übertragung auf SCpcB durch <i>GtCPES</i> .....	109
3.5.3 <i>GtCPES_M67A</i> transferiert 3(E)-PCB auf Cys <sup>82</sup> von <i>PmCpeB</i> .....	111
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>115</b>
4.1 Funktion von <i>GtCPES</i> in <i>G. theta</i> .....	115
4.1.1 <i>GtCPES</i> transferiert 3(Z)-PEB auf $\beta$ -Cys <sup>82</sup> .....	116

.....	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>4</b>
4.1.2	Zur Substratspezifität von <i>GtCPES</i> .....	119
	Met <sup>67</sup> verantwortet die hohe Substratspezifität von <i>GtCPES</i> .....	121
	Fluoreszenz der <i>GtCPES_M67A</i> :Phycobilin-Komplexe.....	123
	Phycobiliproteinlyase-Substratspezifität beeinflusst Chromophor- zusammensetzung des Holo-Phycobiliproteins.....	125
4.1.3	Charakterisierung der Ligandenbindetasche: Bindungs- und transfer- relevante Aminosäurereste in <i>GtCPES</i> .....	132
4.2	Struktur und Funktion der putativen Phycobiliproteinlyasen <i>GtCPCX</i> und <i>GtCPEZ</i> .....	138
4.3	Optimierung der 3(Z)-PEB-Gewinnung aus <i>E. coli</i> .....	142
	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>144</b>
	<b>Summary</b> .....	<b>145</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>146</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>156</b>
6.1	Sequenzen .....	156
6.1.1	Nukleotidsequenzen.....	156
6.1.2	Aminosäuresequenzen.....	157
6.1.3	Protein- und Genidentifikationsnummern.....	159
6.2	Abbildungen .....	160
6.2.1	Charakterisierung der <i>GtCPES</i> -Struktur.....	160
6.2.2	Analyse der Substratspezifität von <i>GtCPES</i> .....	167
6.2.3	Untersuchungen zum PCB-Transfer durch <i>GtCPES_M67A</i> .....	169
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>170</b>
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>171</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die oxygene Photosynthese

Die Grundlage für die Entwicklung des Lebens in seiner heute bekannten Form und Vielfalt bildet die Photosynthese, bei der Sauerstoff produziert wird - die oxygene Photosynthese. Dabei wird unter Verwendung von Lichtenergie Wasser oxidiert und neben molekularem Sauerstoff chemische Energie erzeugt (Lichtreaktion). Bei der anschließenden Fixierung des Kohlenstoffdioxids werden zusätzlich energiereiche Kohlenhydrate synthetisiert (Dunkelreaktion), die von heterotroph lebenden Organismen als Energiequelle verwendet werden können. Wasser agiert demnach als Elektronendonator, wird oxidiert und liefert damit die benötigten Elektronen für diese Synthese (Blankenship, 2014). Über die Fähigkeit der oxygenen Photosynthese verfügen neben grünen Pflanzen auch Algen und Cyanobakterien. Diese Organismen verwenden für die Lichtsammlung – gemeint ist die Absorption von Licht – Chlorophyll-haltige Antennenkomplexe, mit denen sie die Energie von Licht in den Wellenlängenbereichen von etwa 400 nm bis 500 nm (blau) und 600 nm bis 700 nm (rot) nutzen können. Cyanobakterien gelten als die ersten Organismen, die vor über 2,5 Milliarden Jahren die oxygene Photosynthese ausführten (Summons *et al.*, 1999; Dismukes *et al.*, 2001). Die Entwicklung mariner phototropher Organismen ging damit der Entwicklung der terrestrischen Pflanzen voraus. Viele Gattungen der Cyanobakterien kommen daher noch heute in unterschiedlichen marinen Habitaten vor, sie sind aber auch in Süßwasser bis hin zu Gesteinsoberflächen zu finden (Whitton und Potts, 2012). In Abhängigkeit von Wassertiefe und Habitat war es für Cyanobakterien somit lebensnotwendig, sich an die wechselnden, zum Teil geringen Lichtverhältnisse anzupassen (Kehoe und Grossmann, 1994). Cyanobakterien entwickelten in Folge dessen Lichtsammelproteine, die Phycobiliproteine (PBP). Diese Proteine erweiterten den für sie mit Hilfe von Chlorophyll nutzbaren Spektralbereich des Lichts und ermöglichten ihnen, Licht der „Grünlucke“ (490-620 nm) als Energiequelle zu verwenden (Glazer, 1985). Rotalgen, Glaucophyten und Cryptophyten verwenden PBP ebenfalls als zusätzliche Lichtsammelproteine (Gantt *et al.*, 1971; Grossman *et al.*, 1993; Sidler, 1994; Apt *et al.*, 1995). Da Cryptophyten auch verschiedene marine Lebensräume besiedeln, bilden sie gemeinsam mit den planktonischen Cyanobakterien einen Großteil des Phytoplanktons in den Meeren (Klaveness, 1989; Ducklow *et al.*, 2007; Moline *et al.*, 2008; Metfies *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2018). Damit bilden sie die Basis der Nahrungskette mariner Habitate und nehmen zudem eine

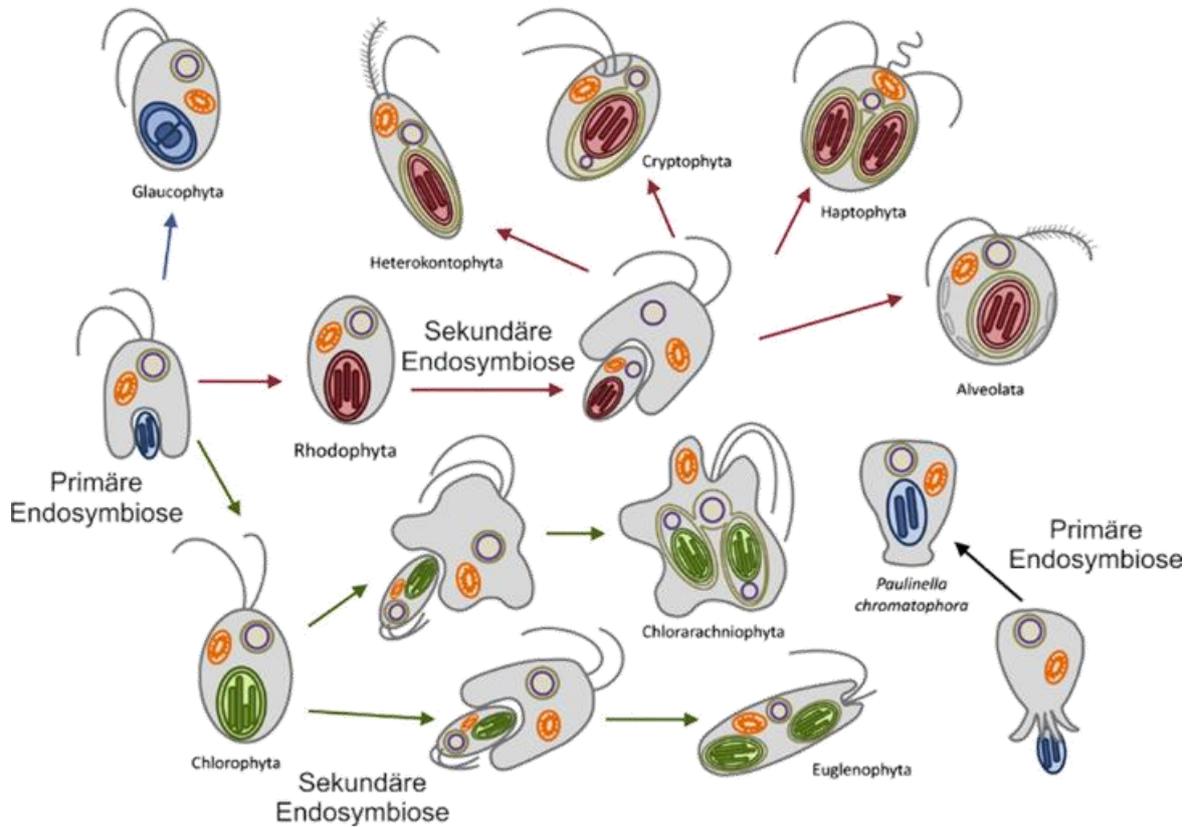
entscheidende Rolle in der Kohlenstoff-Fixierung sowie Sauerstofferzeugung der Erde ein.

## 1.2 Cryptophyten - Entstehung und Aufbau

Cryptophyten sind phototrophe, einzellige Algen, die insbesondere in Süßwasser, aber auch in Meer- oder Brackwasservorkommen (Klaveness, 1988). Sie gehören zu den Cryptomonaden, die - mit wenigen Ausnahmen - einen farbigen Plastiden und eine phototrophe Lebensweise besitzen. Innerhalb der Gattung *Cryptomonas* haben einige Spezies ihre Photosynthese-Fähigkeit unabhängig voneinander verloren, sie tragen lediglich farblose Leukoplasten (Hoef-Emden und Melkonian, 2003; Hoef-Emden, 2005). Die heterotroph lebende Gattung *Goniomonas* verfügt dagegen über keinen Plastiden. Den Plastiden und die damit verbundene Fähigkeit der oxygenen Photosynthese verdanken die Cryptophyten der sekundären Endosymbiose.

Die Endosymbionten-Theorie besagt (Margulis, 1970), dass bei dem Prozess der evolutionären Endosymbiose zunächst ein ancestrales, zur oxygenen Photosynthese befähigtes Cyanobakterium durch eine heterotrophe Wirtszelle aufgenommen und als hilfreicher Endosymbiont integriert wurde (primäre Endosymbiose) (Abbildung 1.1). Die Etablierung eines ancestralen Cyanobakteriums als intrazellulären Endosymbionten bot Eukaryoten damit erstmals die Möglichkeit einer autotrophen Lebensweise. Hierbei entstanden die photosynthetischen Eukaryoten Chlorophyta (Grünalgen), Glaucophyta und Rhodophyta (Rotalgen) (Palmer *et al.*, 2004; Howe *et al.*, 2008). Die daran anschließende sekundäre Endosymbiose beschreibt den Prozess, bei dem eine ancestrale Rotalge oder Grünalge durch verschiedene eukaryotische, heterotrophe Wirtszellen umschlossen und schließlich durch sukzessive Reduktion als intrazelluläre Endosymbionten etabliert wurden (Stoebe und Maier, 2002; Cavalier-Smith, 2003). Dies führte zu der unabhängigen Entwicklung von Euglenophyta, Chlorarachniophyta sowie der Chromalveolata. Zu den Chromalveolata gehören die Alveolata, Haptophyta, Heterokontophyta (zugehörig zu den Stramenopila) und auch Cryptophyta (Archibald und Keeling, 2002; Gould *et al.*, 2008; Keeling, 2010; Burki *et al.*, 2012). Diese Organismen integrierten im Laufe der Evolution die endosymbiotische Algenzelle als komplexen Plastiden mit drei bis vier Hüllmembranen. Für die Cryptophyten tritt zudem eine Besonderheit auf, dass der Zellkern des Endosymbionten erhalten blieb, wenn auch in reduzierter Form und Kodierungskapazität (Gilson und McFadden, 2002; Archibald, 2007). Er wird als Nucleomorph bezeichnet und

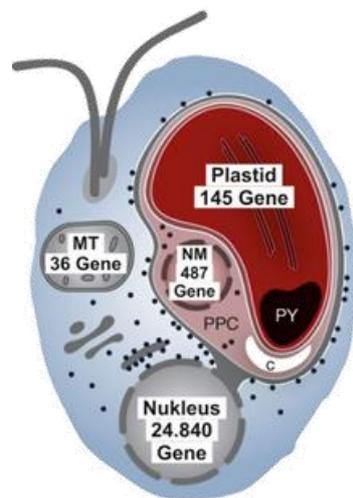
wurde bereits in den 1970ern beschrieben (Greenwood, 1977). Aus der sekundären Endosymbiose resultierten damit sowohl aus genetischer als auch zellbiologischer Sicht sehr außergewöhnliche Organismen.



**Abbildung 1.1: Plastidevolution in photosynthetischen Eukaryoten.** Die Aufnahme eines cyanobakteriellen Vorgängers im Prozess der primären Endosymbiose brachte drei Abstammungslinien hervor: neben Glaucophyta (blau) entstanden Rhodophyta (rot) sowie Chlorophyta (grün). Zu den Chlorophyten zählen auch die Landpflanzen. Durch die sekundäre Endosymbiose entwickelten sich schließlich Euglenophyta und Chlorarachniophyta (grün) sowie Chromalveolata (rot). *Paulinella chromatophora* repräsentiert einen unabhängigen Endosymbioseprozess. (verändert nach Facchinelli und Weber, 2011)

Bei genauerer Betrachtung der Zellmorphologie von Cryptophyten am Beispiel des Modellorganismus *Guillardia theta* fällt auf, dass dieser Organismus eine asymmetrische Zellform mit zwei Flagellen in einer Zelleinstülpung aufweist (Abbildung 1.2). In dieser Furche befinden sich auch Ejektosomen, explosive Organellen, die der Zelle bei chemischen oder mechanischen Reizen eine schnelle Flucht ermöglichen (Morrall und Greenwood, 1980). Weitere Ejektosomen befinden sich unterhalb des Periplasten. Dieser umschließt als Zellhülle die Zelle und begrenzt somit das Zytoplasma (Kugrens und Lee, 1991). Der mit Chlorophyll und PBP angereicherte komplexe Plastid ist aufgrund seiner

intensiven Pigmentierung unter dem Lichtmikroskop deutlich zu erkennen. Neben dem von vier Membranen umschlossenen Plastiden besitzen Cryptophyten drei weitere DNA-enhaltende zelluläre Kompartimente: Mitochondrium, Zellkern und Nucleomorph. Der Zellkern und die äußere Plastidhülle bilden über das durchgängige raue endoplasmatische Retikulum (rER) ein Kontinuum (Cavalier-Smith, 2003). Während die Mitochondrien, der Nukleus und ein Pyrenoid im Zytoplasma vorliegen, befindet sich der ehemalige Zellkern des Endosymbionten, der Nucleomorph, im reduzierten Restzytosol des Endosymbionten. Zusammen mit 80S-Ribosomen liegt der Nucleomorph hier zwischen den zwei mittleren Membranen, die den Plastiden umschließen. Dieser Zwischenraum wird als periplastidäres Kompartiment (*periplastidial compartment*, PPC) bezeichnet, weshalb die äußere der beiden Membranen auch periplastidäre Membran genannt wird (Gould *et al.*, 2008). Das innenliegende Membranenpaar grenzt das Stroma ab, in dem sich das Plastidengenom befindet. Im Plastidenstroma liegen auch die in Lamellen angeordneten Thylakoide, in denen die Photosynthese stattfindet.



**Abbildung 1.2: Zellmorphologie und Geneanzahl der cryptophytischen Alge *Guillardia theta*.** Der Plastid ist von vier Membranen umgeben, hierbei ist die äußere Membran durchgehend mit der Kernhülle verbunden. Die Oberfläche ist mit 80S-Ribosomen besetzt. Zwischen dem äußeren und inneren Membranenpaar befindet sich der periplastidäre Raum (PPC), der den Nucleomorph (NM) enthält. Die jeweils geschätzte Anzahl Protein-kodierender Gene der verschiedenen Genome von Plastid, Mitochondrium (MT), Nucleomorph und Nukleus von *G. theta* wird gezeigt. C: Kohlenhydrat; PY: Pyrenoid. (verändert nach Curtis, 2012)

Die evolutionäre Entwicklung und die daraus hervorgegangene Zellmorphologie der Cryptophyten machen deutlich, dass die vier Genome der Cryptophyten unterschiedlichen Ursprungs sind. Prokaryotischen Ursprungs sind die Genome des Mitochondriums

(Hauth *et al.*, 2005) und des Plastiden (Douglas und Penny, 1999; Rogers *et al.*, 2007). Nukleus und Nukleomorphgenom besitzen dagegen einen eukaryotischen Ursprung (Zauner *et al.*, 2000; Douglas *et al.*, 2001; Gilson *et al.*, 2006; Lane *et al.*, 2007). Da die Gene für einen großen Anteil essentieller, plastidärer Proteine im Laufe der Zeit in den Wirtszellkern überführt wurden, ist ein aufwändiger Reimport dieser Proteine über die verschiedenen Membranen in den Plastiden notwendig (Douglas *et al.*, 2001; Bolte *et al.*, 2009). Signal- und Transitsequenzen sind hierbei behilflich (Gould *et al.*, 2006a).

Hinzukommend zu ihrem ökologischen Nutzen bieten Cryptophyten somit die Möglichkeit, das Verständnis der eukaryotischen Endosymbiose, Plastidevolution und des intrazellulären Transports zu erweitern. Anhand des Modellorganismus *G. theta* werden sowohl diese Bereiche als auch die Cryptophyten selbst eingehend erforscht. Die verschiedenen Genome von *G. theta* wurden bereits vollständig sequenziert und publiziert (Douglas und Penny, 1999; Douglas *et al.*, 2001; Curtis *et al.*, 2012). Die Anzahl möglicher Protein-kodierender Gene konnte ebenfalls abgeschätzt werden (Abbildung 1.2). Mit Hilfe dieser Daten lassen sich in Zukunft diverse cryptophytische molekulare Prozesse genauer untersuchen.

## **1.3 Phycobiliproteine – Chromoproteine für die Lichtsammlung**

### **1.3.1 Phycobiline als Chromophore der Phycobiliproteine**

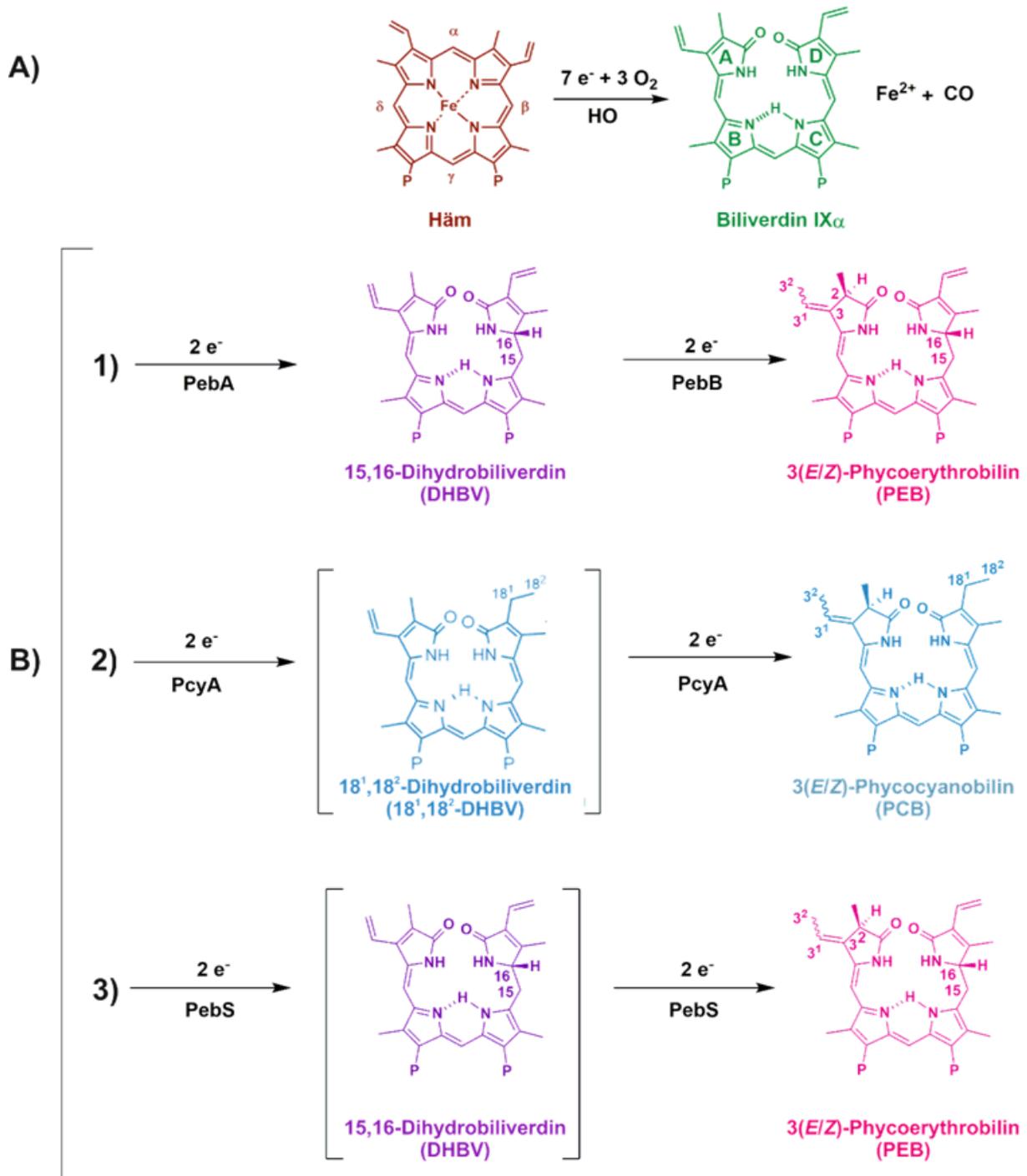
Phycobiline bilden neben Chlorophyll eine wesentliche Gruppe an Lichtsammelpigmenten für die Photosynthese. Diese Chromophore erhielten ihren Namen 1920 durch Rudolf Lemberg. Der Name entstammt dem griechischen Wort für Seetang (*phykos*), da sie in Rotalgen und blaugrünen Algen – heute als Cyanobakterien bekannt – gefunden wurden, und der strukturellen Ähnlichkeit zu den Gallenfarbstoffen, den Bilinen (lat. *bilis*) (Nobel, 2005). Die häufigsten Vertreter der Phycobiline sind Phycocyanobilin (PCB) und Phycoerythrobilin (PEB). Da Phycobiline zumeist in höheren Konzentrationen als Chlorophyll vorkommen, sind sie häufig für die Farbgebung des entsprechenden Organismus verantwortlich. Wie auch Chlorophyll sind Phycobiline Tetrapyrrole, sie liegen jedoch anders als Chlorophyll in offenkettiger Form vor. Sie werden deswegen auch als offenkettige Tetrapyrrole bezeichnet. Die vier Pyrrolringe sind spezifisch mit A bis D benannt und über Methinbrücken miteinander verbunden. In ungebundener, freier Form nehmen Phycobiline eine zyklisch, helikale bis eher lineare Konformation ein (Scheer, 1981). Dabei

werden die Absorptionseigenschaften der deutlich gefärbten Phycobiline durch das konjugierte  $\pi$ -Elektronensystem und dessen Länge bestimmt (Falk, 1989). Ihre maximale Absorption liegt zwischen 520 und 620 nm mit einer gering absorbierenden Soret-Bande im UV-Bereich. Anders als bei Carotinoiden und Chlorophyllen liegen die Phycobiline als Chromophor kovalent über Thioether an ein Protein gebunden vor (Crespi und Smith, 1970; Lagarias *et al.*, 1979; Scheer und Zhao, 2008). Die kovalente Bindung an ein PBP führt zu einer starren, linearen Konformation der Phycobiline, die nach Anregung keinen strahlungsfreien Rückgang der Elektronen in den Grundzustand erlaubt. Eine deutlich detektierbare Fluoreszenz der chromophorylierten PBP ist die Folge (Kronick und Grossmann, 1983; Beutler *et al.*, 2002). Das gilt jedoch nicht für PBP, die elektronisch mit Photosystemen gekoppelt sind.

Das zyklische Tetrapyrrol Häm liefert das Ausgangssubstrat für die Synthese der Phycobiline. Das offenkettige Tetrapyrrol Biliverdin IX $\alpha$  (BV) wird sowohl in Pro- als auch Eukaryoten unter regiospezifischer Spaltung der  $\alpha$ -Methinbindung von Häm erzeugt. Dieser Schritt wird durch Hämoxxygenasen (HO; EC 1.14.99.3) katalysiert, wobei bevorzugt Ferredoxin in Bakterien, Algen und pflanzlichen HO die benötigten Elektronen (7 e<sup>-</sup>) für diese Reduktion liefert (Rhie und Beale, 1992; Cornejo *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 1999; Muramoto *et al.*, 1999; Willows *et al.*, 2000; Frankenberg *et al.*, 2001; Wilks, 2002; Frankenberg-Dinkel, 2004). Drei Moleküle molekularen Sauerstoffs werden bei dieser Reaktion verbraucht, Fe(II) und CO freigesetzt (Abbildung 1.3, A).

Das erzeugte BV dient anschließend als Substrat für die Ferredoxin-abhängigen Bilinreduktasen (FDBR). Diese katalysieren unter Anwendung eines Substratradikalmechanismus die Reduktion von BV zu verschiedenen Phycobilinen (Abbildung 1.3, B) (Frankenberg *et al.*, 2001; Kohchi *et al.*, 2001; Frankenberg und Lagarias, 2003a; Dammeyer *et al.*, 2008a; Tu und Lagarias, 2004; Busch *et al.*, 2011a; Busch *et al.*, 2011b). Es existieren diverse Vertreter dieser Enzymfamilie in Eukaryoten und Prokaryoten. Die Phytochromobilin:Ferredoxin-Oxidoreduktasen (HY2; EC 1.3.7.4) synthetisieren Phytochromobilin (P $\Phi$ B), den Hauptchromophor pflanzlicher Phytochrome (Terry *et al.*, 1995; Kohchi *et al.*, 2001). Die Phycocyanobilin:Ferredoxin-Oxidoreduktasen (PcyA; EC 1.3.7.5) katalysieren dagegen die Reduktion von BV zu Phycocyanobilin (PCB). Bei dieser werden formal vier Elektronen benötigt und das Intermediat 18<sup>1</sup>,18<sup>2</sup>-Dihydrobiliverdin (18<sup>1</sup>,18<sup>2</sup>-DHBV) gebildet (Frankenberg *et al.*, 2001; Frankenberg und Lagarias, 2003a). Diese FDBR wurden

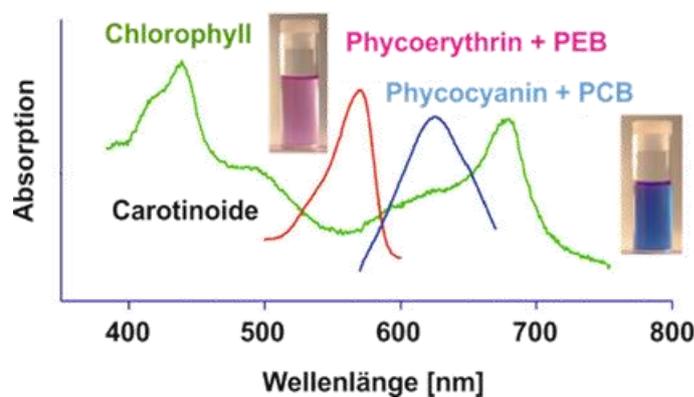
vorrangig in Cyanobakterien, aber auch in anderen Organismen gefunden. Wie auch einige andere FDBR-Gene, konnte auch das Gen für PcyA zudem im Genom von Cyanobakterien infizierenden Phagen (Cyanophagen) identifiziert werden (Dammeyer *et al.*, 2008a; Ledermann *et al.*, 2016). Dies gilt auch für das Gen der PEB-Synthase PebS (EC 1.3.7.6) aus dem Cyanophagen P-SSM2, der das Cyanobakterium *Prochlorococcus marinus* infiziert. Wie auch PcyA katalysiert PebS eine Vier-Elektronen-Reduktion, in diesem Fall von BV zu 3(Z)-PEB unter Bildung des Intermediats 15,16-Dihydrobiliverdin (DHBV) (Dammeyer *et al.*, 2008a; Dammeyer *et al.*, 2008b). In Cyanobakterien werden für die Reduktion von BV zu PEB hingegen zwei Enzyme benötigt, PebA und PebB. Die DHBV:Ferredoxin-Oxidoreduktase PebA (EC 1.3.7.2) ist dabei für den ersten Reduktionsschritt verantwortlich, bei dem die Doppelbindung zwischen C15 und C16 reduziert wird. Als Produkt dieser Reaktion geht DHBV hervor, das im Anschluss der PEB:Ferredoxin-Oxidoreduktase PebB (EC 1.3.7.3) als Substrat für eine Reduktion unter Verbrauch von zwei Elektronen dient. Bei dieser wird das Dien-System am Pyrrolring A reduziert und damit PEB gebildet (Frankenberg *et al.*, 2001; Dammeyer *et al.*, 2006; Busch *et al.*, 2011). Für die Cryptophyte *G. theta* wird eine vergleichbare Phycobilinsynthese angenommen. Für PEBB (*GtPEBB*) konnte die Reduktion von DHBV zu PEB gezeigt werden, womit *GtPEBB* ebenfalls zu den Vertretern der FDBR zählt. Ein Gen für PEBA (*GtPEBA*) wurde im Nukleusgenom von *G. theta* ebenfalls identifiziert, das Protein konnte bisher jedoch nicht in löslicher und aktiver Form produziert und somit keine Reduktion von BV zu DHBV gezeigt werden (Overkamp *et al.*, 2014b).



**Abbildung 1.3: Phycobilinbiosynthese durch Hämoxygenase und ausgewählte Ferredoxin-abhängige Bilinreduktasen.** **A.** Häm dient als Substrat für Hämoxygenasen, durch die das offenkettige Tetrapyrrol Biliverdin IX $_{\alpha}$  (BV) gebildet wird. Die Benennung der Pyrrol-Ringe ist an diesem exemplarisch dargestellt. **B.** Die Umsetzung von BV wird durch Enzyme der FDBR-Familie katalysiert. 1) Die cyanobakteriellen Enzyme PebA und PebB katalysieren jeweils eine Zwei-Elektronen-Reduktion. 2) und 3) Durch PcyA und PebS werden formale Vier-Elektronen-Reduktionen katalysiert. PcyA wurde sowohl in Cyanobakterien als auch Homologe hierzu in Cyanophagen (P-SSM4) gefunden. PebS wurde im Cyanophagen P-SSM2 identifiziert. Die folgenden Abkürzungen werden verwendet: Propionsäure-Seitenkette (P), Hämoxygenase (HO), PCB:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PcyA), 15,16-DHBV:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PebA), PEB:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PebB), und PEB Synthase (PebS). Proteingebundene Intermediate sind in Klammern dargestellt.

### 1.3.2 Phycobiliproteine von Cryptophyten, Cyanobakterien und Rotalgen im Vergleich

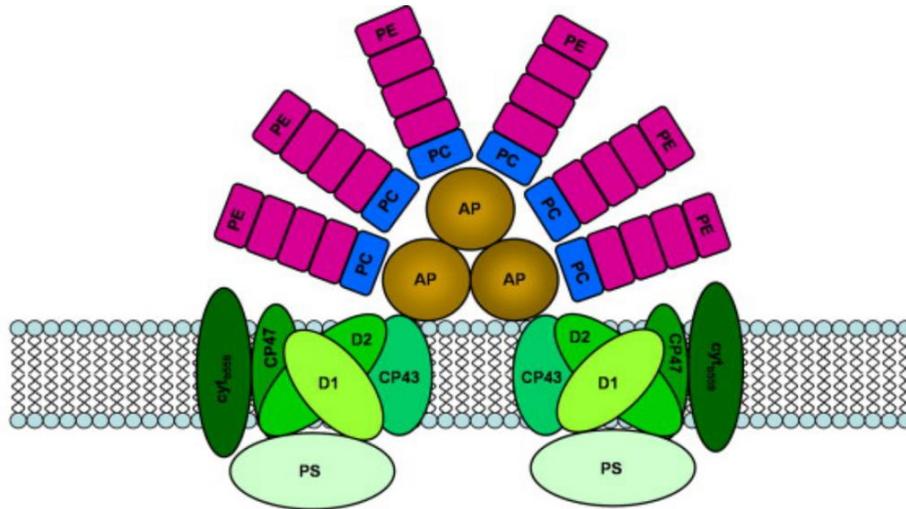
Die evolutionäre Adaption von Cyanobakterien an ihre Umgebung resultierte in der Entwicklung akzessorischer Lichtsammelproteine, den Phycobiliproteinen (PBP), die neben Chlorophyll *a* der Photosynthese dienen. Diese membranassoziierten und hydrophilen Chromoproteine absorbieren Licht in einem Wellenlängenbereich von grün bis hellrot (450-650 nm), das von Chlorophyll nur geringfügig genutzt werden kann, und leiten diese Energie zu den Photosystemen (PS) weiter (Abbildung 1.4) (Porter *et al.*, 1978; Searle *et al.*, 1978; MacColl und Guard-Friar, 1987; Kehoe, 2010). Bei den PBP werden insbesondere das rote Phycoerythrin (PE;  $A_{\max} = 560 \text{ nm}$ ), das blaue Phycocyanin (PC;  $A_{\max} = 620 \text{ nm}$ ) und das blaue Allophycocyanin (APC;  $A_{\max} = 650 \text{ nm}$ ) unterschieden (Apt *et al.*, 1995).



**Abbildung 1.4: Absorptionsspektren der beiden PBP Phycoerythrin (PE) und Phycocyanin (PC) und von Chlorophyll.** Insbesondere die gebundenen Chromophore Phycoerythrobilin (PEB) und -cyanobilin (PCB) verleihen PE und PC ihre intensive Färbung. (verändert nach Kehoe, 2010)

PBP setzen sich aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proteinuntereinheiten zusammen. Diese tragen Chromophore, die den Proteinen die Lichtabsorption ermöglichen. Als chromophore Gruppen dienen die Phycobiline, die über Thioether kovalent an spezifischen, konservierten Cysteinresten gebunden am PBP vorliegen (MacColl und Guard-Friar, 1987; Arciero *et al.*, 1988a; Sidler, 1994). Die Anzahl der gebundenen Phycobiline variiert dabei unter den verschiedenen PBP und ihren Untereinheiten. Die  $\alpha$ -Untereinheit kann mit ein bis drei, die  $\beta$ -Untereinheit mit bis zu drei Phycobilinen assoziiert sein (Scheer und Zhao, 2008). In Cyanobakterien und Rotalgen finden die Phycobiline Phycocyanobilin (PCB), Phycoerythrobilin (PEB), Phycoviolobilin (PVB) und Phycourobilin (PUB) Verwendung

(Glazer, 1995). Sie unterscheiden sich in ihrer Anzahl an konjugierten Doppelbindungen und somit in ihren Absorptionseigenschaften.

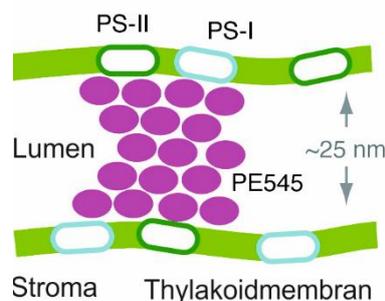


**Abbildung 1.5: Phycobilisomenaufbau von Cyanobakterien.** Phycobilisomen befinden sich auf der Thylakoidmembran in der Nähe zu den PS, auf welche sie die Lichtenergie übertragen. AP bildet den Phycobilisomenkern. In der Mitte befindet sich PC, gefolgt von PE. In Abhängigkeit von der Lichtintensität kann der Aufbau der Phycobilisomen variieren. AP: Allophycocyanin; PC: Phycocyanin; PE: Phycoerythrin; CP43, CP47: PS-II-Chlorophyll-bindende Proteine; D1, D2: PS-II-Reaktionszentrumsproteine; Cyt: Cytochrom; PS: Photosysteme. (verändert nach Wiethaus *et al.*, 2010b)

Die chromophorylierten Untereinheiten der PBP lagern sich in den Zellen von Rotalgen und Cyanobakterien zu  $(\alpha\beta)_3$ -Homotrimeren oder -hexameren zusammen (Schirmer *et al.*, 1987; Ficner *et al.*, 1992; Grossman *et al.*, 1993). Diese sind in supramolekularen Antennenkomplexen organisiert, die sich in regelmäßigen Abständen angeordnet auf der Thylakoidmembran in Nähe zu den Photosystemen (PS-I, PS-II) befinden und einen Durchmesser von bis zu 40 nm erreichen (Abbildung 1.5) (Mörschel und Wehrmeyer, 1979). In diesen Phycobilisomen befinden sich zwischen etwa 300 und 800 Phycobiline (Glazer, 1985). Etwa 80% des Phycobilisoms setzen sich aus PBP zusammen, den Rest machen Linkerproteine aus, die unter anderem das PBS-Gerüst stabilisieren (Tandeau de Marsac und Cohen-Bazire, 1977; McColl, 1998). Der Phycobilisomenkern ist aus APC aufgebaut, auf dieses folgt räumlich PC (Abbildung 1.5) (Bryant, 1982; Wiethaus *et al.*, 2010b). Im äußeren Bereich der Phycobilisomen befinden sich in einigen Spezies zudem Phycoerythrocyanin (PEC; 570-590 nm) oder PE auf dem PC angeordnet (Bryant, 1982; MacColl, 1998). Dieser Antennenaufbau gewährleistet die effiziente, emissionsfreie Wei-

terleitung der Anregungsenergie (Resonanztransfer) von Phycoerythrin bis zum Chlorophyll *a* der PS (Glazer *et al.*, 1985; Zhao *et al.*, 1992). Das Verhältnis der verschiedenen PBP in den Phycobilisomen sowie auch deren Phycobilinbesetzung werden in einigen Organismen durch die vorherrschenden Lichtverhältnisse gesteuert. Dieser Vorgang wird chromatische Adaptation oder auch Akklimation genannt und wird von vielen, jedoch nicht allen, Cyanobakterien durchgeführt (Bogorad, 1975; Tandeau de Marsac, 1977). Es existieren verschiedene Formen der Photoakklimation (Montgomery, 2017). Bei der komplementären chromatischen Akklimation fördert rotes Licht beispielsweise eine vermehrte Phycocyanin-, grünes Licht hingegen eine Phycoerythrinbildung.

Anders als in Cyanobakterien oder Rotalgen besitzen Cryptophyten hinzukommend zu Chlorophyll *a/c*<sub>2</sub>-haltigen Antennenkomplexen PBP, die in löslicher Form im Thylakoidlumen vorliegen (Gantt *et al.*, 1971; Spear-Bernstein und Miller, 1989; Glazer und Wedemeyer, 1995; Broughton *et al.*, 2006). Um einen effizienten Resonanztransfer zu ermöglichen, befinden sich die PBP hier dicht gepackt in hohen Konzentrationen (Abbildung 1.6) (Lichtlé *et al.*, 1980; Doust *et al.*, 2006; Scholes, 2010).



**Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der PBP-Lokalisation in Cryptophyten.** Im Thylakoidlumen befinden sich die löslichen Phycobiliproteine (in Magenta), welche die Energie des absorbierten Lichts auf die in der Thylakoidmembran befindlichen Photosysteme (PS-I und PS-II) weiterleiten. PE: Phycoerythrin. (verändert nach Scholes, 2010)

Bereits bei den ersten spektrophotometrischen Analysen von Cryptophyten in den 1950ern wurde erkannt, dass jede cryptophytische Spezies lediglich eine Sorte an PBP verwendet (Glazer und Wedemeyer, 1995; Wedemeyer *et al.*, 1996). Bisher wurden insgesamt acht verschiedene cryptophytische PBP gefunden und charakterisiert: drei Phycoerythrine (PE545, PE555, PE566) und fünf Phycocyanine (PC569, PC577, PC612, PC630, PC645) (Ficner *et al.*, 1992; Wedemeyer *et al.*, 1992; Wemmer *et al.*, 1993;

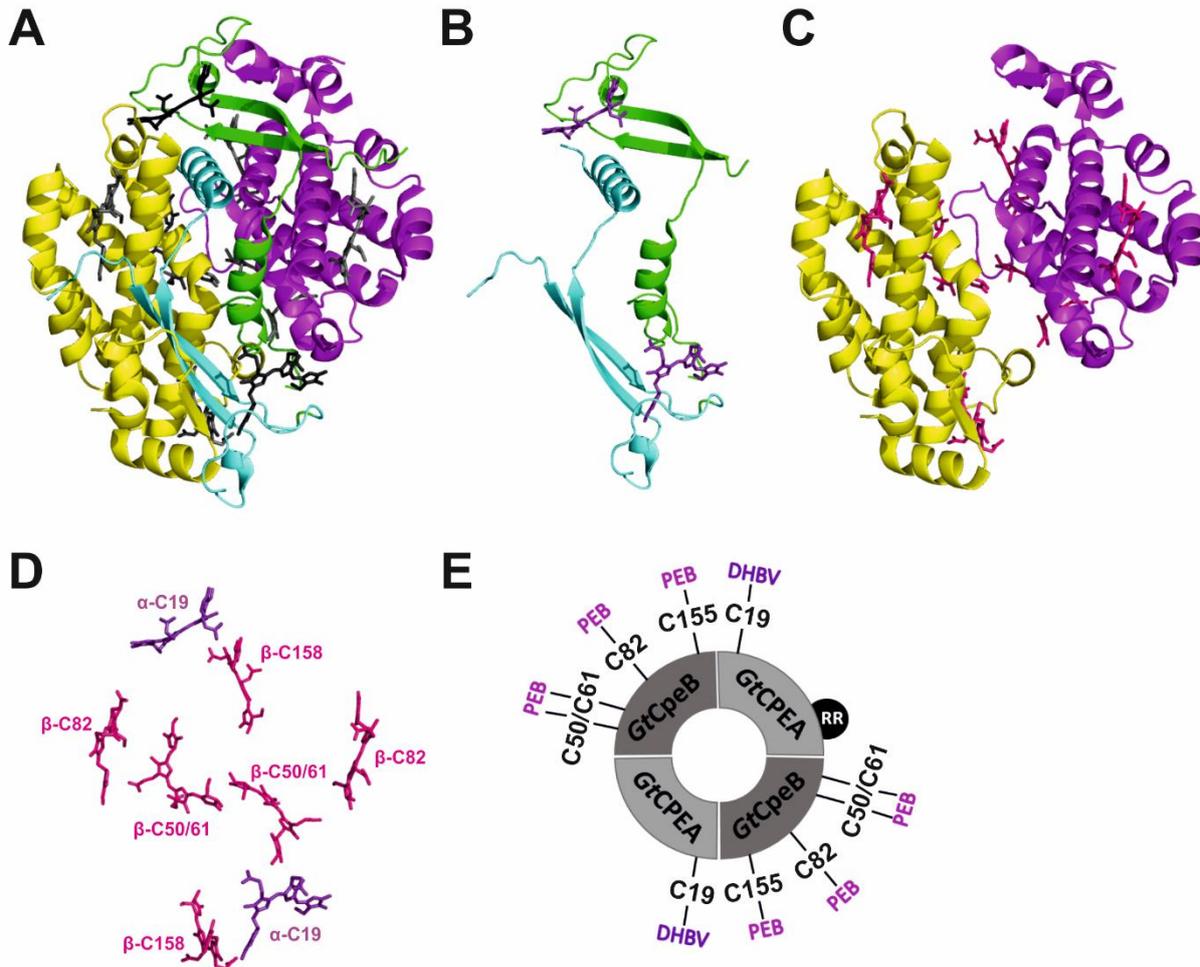
Wedemeyer *et al.*, 1996; Ritter *et al.*, 1999; Contreras-Martel *et al.*, 2001; Contreras-Martel *et al.*, 2007; Hoef-Emden, 2008; Overkamp *et al.*, 2014a; Greenwold *et al.*, 2019). Bei der Namensgebung wurde das jeweilige Absorptionsmaximum berücksichtigt. Cryptophytische PBP setzen sich aus zwei  $\alpha$ -Untereinheiten (8-10 kDa) eukaryotischen und zwei  $\beta$ -Untereinheiten (18-20 kDa) prokaryotischen Ursprungs zusammen. Gemeinsam bilden sie kompakte  $(\alpha_1\beta)(\alpha_2\beta)$ -Heterodimere, d.h.  $(\alpha_1\beta)(\alpha_2\beta)$ -Tetramere (Mörschel und Wehrmeyer, 1975; Glazer und Wedemeyer, 1995). Die Heterogenität der beiden Nukleuskodierten  $\alpha$ -Untereinheiten basiert auf wenigen Sequenzunterschieden der Aminosäuresequenz und ihre Struktur weist eine hohe Spezifität für die diversen cryptophytischen Spezies auf (Jenkins *et al.*, 1990; Broughton *et al.*, 2006; Gould *et al.*, 2007). Die  $\alpha$ -Untereinheiten der Cryptophyten sind dabei nicht mit den  $\alpha$ -Untereinheiten der PBP zu vergleichen, die in Phycobilisomen vorkommen (Wilk *et al.*, 1999; Doust *et al.*, 2004). Homologe Proteine prokaryotischen Ursprungs wurden bisher nicht gefunden (Apt *et al.*, 1995; Curtis *et al.*, 2012). Alle  $\alpha$ -Untereinheiten besitzen jedoch ein gemeinsames Bilinbindemotiv (FDxRGC), in dem das konservierte Cys<sup>19</sup> enthalten ist (Gould *et al.*, 2007). Die Gene der beiden identischen  $\beta$ -Untereinheiten sind im Plastidgenom kodiert und zeigen deutliche Homologien zu den Phycoerythrin- $\beta$ -Untereinheiten der Rotalgen und Cyanobakterien (Glazer und Wedemeyer, 1995; Apt *et al.*, 1995). Die vier konservierten Cysteinreste Cys<sup>50</sup>, Cys<sup>61</sup>, Cys<sup>82</sup> und Cys<sup>158</sup> sind bei der Chromophorylierung der jeweiligen  $\beta$ -Untereinheit involviert, es werden jedoch lediglich drei Phycobiline gebunden, da eines der Phycobilinmoleküle sowohl an Cys<sup>50</sup> als auch an Cys<sup>61</sup> kovalent gebunden ist (Glazer und Wedemeyer, 1995). Einige Phycobiline, die in PBP der Cryptophyten identifiziert wurden, sind weder in Cyanobakterien noch in Rotalgen zu finden. Zusätzlich zu PCB und PEB wurden die Intermediate der Phycobilinsynthese 18<sup>1,18</sup>-DHBV und 15,16-DHBV in chromophorylierten PBP gefunden. Des Weiteren konnten die bisher nur in cryptophytischen PBP nachgewiesenen Phycobiline Bilin 584 und Bilin 618 identifiziert werden (Wedemeyer *et al.*, 1992; Wemmer *et al.*, 1993; Wedemeyer *et al.*, 1996).

### 1.3.3 Phycoerythrin PE545 aus *G. theta*

In der cryptophytischen Alge *G. theta* unterstützt Phycoerythrin 545 (PE545) die photosynthetische Lichtsammlung. Das Absorptionsmaximum dieses PBP liegt bei 545 nm und verleiht der Alge aufgrund der Absorption von grünem Licht eine rötliche Färbung. PE545 wurde zuvor bereits in der Cryptophyte *Rhodomonas* sp. CS24 (RCS-PE545) identifiziert und untersucht (Wilk *et al.*, 1999; Doust *et al.*, 2004) (Abbildung 1.7). Sequenzvergleiche und Strukturmodelle lassen jedoch eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zum PE545 aus *G. theta* annehmen. Fünf der insgesamt zwanzig in *G. theta* exprimierten  $\alpha$ -Untereinheiten (*GtCPEA4*, *GtCPEA5*, *GtCPEA11*, *GtCPEA16* und *GtCPEA20*) zeigen eine Sequenzidentität zwischen 84% und 99% zu den  $\alpha$ -Untereinheiten aus *Rhodomonas* sp. CS24, wobei *GtCPEA4* und *GtCPEA20* der  $\alpha_2$ - bzw.  $\alpha_1$ -Untereinheit am ähnlichsten sind (99%). Die  $\beta$ -Untereinheiten (*GtCpeB*) sind identisch zu denen von RCS-PE545 (100%) (Kieselbach *et al.*, 2017). Röntgenstrukturanalysen zeigen, dass die leicht unterschiedlichen  $\alpha$ -Untereinheiten aus zwei antiparallelen, durch einen Loop miteinander verbundenen  $\beta$ -Faltblatt-Strängen aufgebaut sind, auf welche eine C-terminale  $\alpha$ -Helix folgt (Abbildung 1.7, B). Jede der beiden  $\alpha$ -Untereinheiten trägt im Holo-Protein innerhalb des konservierten Bilinbindemotivs FDxRGC am Cys<sup>19</sup> (oder an einem homologen Cystein) ein DHBV-Molekül als Chromophor (Wilk *et al.*, 1999; Gould *et al.*, 2007). Die  $\beta$ -Untereinheiten setzen sich hingegen aus acht  $\alpha$ -Helices zusammen, die ebenfalls durch Loops miteinander verbunden sind (Abbildung 1.7, C). Beide Untereinheiten binden jeweils drei PEB-Moleküle über Thioetherbindungen: ein doppelt gebundenes PEB an  $\beta$ -Cys<sup>50</sup> und  $\beta$ -Cys<sup>61</sup>, sowie je ein einfach gebundenes PEB-Molekül an  $\beta$ -Cys<sup>82</sup> und  $\beta$ -Cys<sup>158</sup> (Glazer und Wedemeyer, 1995). Die homologen Cysteine von PE545 aus *G. theta* weichen hinsichtlich ihrer Position leicht von denen in RC-PE545 ab. Bei der  $\alpha$ -Untereinheit wird DHBV am Cys<sup>18</sup> gebunden und ein PEB-Molekül liegt an  $\beta$ -Cys<sup>155</sup> assoziiert vor.

Bei genauerer Betrachtung der Proteinvorstufensequenzen der beiden  $\alpha$ -Untereinheiten von PE545 aus *G. theta* wurde bei einer Untereinheit eine dreiteilige Zielsequenz mit einem doppelten Arginin-Motiv (*twin arginine motif*, RR) und einer integrierten luminalen TAT-Zielsequenz (*luminal targeting domain*, LTD) gefunden ( $\alpha_1$ ). Die andere ( $\alpha_2$ ) weist hingegen lediglich ein Endoplasmatisches Retikulum(ER)-Signalpeptid und ein Transitpeptid auf (Broughton *et al.*, 2006; Gould *et al.*, 2007). Da die PE- $\beta$ -Untereinheiten

ebenfalls keine LTD besitzen, wird davon ausgegangen, dass sich das Tetramer im Plastidstroma zusammensetzt und schließlich mit Hilfe der  $\alpha_1$ -Proteinvorstufe über die Thylakoidmembran transportiert wird (Overkamp *et al.*, 2014b; Kieselbach *et al.*, 2017).



**Abbildung 1.7: Kristallstruktur von RCS-PE545 aus *Rhodomonas sp.* CS24 und schematische Darstellung von PE545 aus *Guillardia theta*. A.** Kristallstruktur von RCS-PE545 einschließlich aller Chromophore (PDB: 1XG0). **B.** Separierte Darstellung der  $\alpha_1$ - (grün) und  $\alpha_2$ -Untereinheiten (türkis). **C.** Kristallstruktur der identischen  $\beta$ -Untereinheiten (gelb, magenta). **D.** Chromophoranordnung von DHBV (violett) und PEB (magenta) im Kristall. Die Phycobiline zeigen eine leicht gestreckte Konformation (verändert nach Doust *et al.*, 2004). **E.** Schematische Darstellung des zu RCS-PE545 strukturell ähnlichen PE545 aus *G. theta*. RR: twin arginine motif.

## 1.4 Phycobiliproteinlyasen

Die korrekte Assemblierung der Phycobiline und Apo-PBP-Untereinheiten wird häufig durch Phycobiliproteinlyasen (PBP Lyasen) vermittelt. Auch eine autokatalytische oder spontane Bindung der Phycobiline an konservierte Cysteine in PBP und Phytochromen ist möglich, die stereo- und regioselektive korrekte Ligation an die spezifischen Cysteinreste

wird jedoch in der Regel durch PBP Lyasen gewährleistet (Scheer *et al.*, 2008; Kupka *et al.*, 2009; Wiethaus *et al.*, 2010a; Zhou *et al.*, 2014). Die PBP Lyase bindet zunächst reversibel den Chromophor. Dieser Prozess findet deutlich schneller statt (Reaktionszeit im Millisekunden- bis Sekundenbereich) als die spontane Bindung oder die langsame vermittelte Übertragung des Phycobilins auf das Apo-PBP (Minuten- bis Zehn-Minutenbereich). Diese kinetische Kontrolle erinnert an die Wirkungsweise von Chaperonen, benötigt jedoch kein ATP (Kupka *et al.*, 2009). Die Ligation des Phycobilins über den A-Pyrrolring wird somit durch die PBP Lyase unterstützt und zwischen der C3<sup>1</sup>-Position des A-Rings und dem Schwefelatom des Cysteins wird eine Thioetherbindung gebildet (Beuhler *et al.* 1976). Dabei wird ein neues chirales C-Atom mit einer *R*- oder *S*-Stereoisomerie erzeugt. Doppelt gebundene Phycobiline bilden über den zweiten Cysteinrest eine weitere kovalente Bindung zur C18<sup>1</sup>-Position des D-Rings aus. Es wird vermutet, dass bei der Chromophorylierung eine Beladungsreihenfolge der zu chromophorylierenden Cysteinbindestellen eingehalten wird (Zhao *et al.*, 2007b; Kronfel *et al.*, 2019a).

In Anbetracht der großen Anzahl an PBP-verwendenden Spezies wurden bisher vergleichsweise wenige PBP Lyasen charakterisiert. Sie werden in drei Gruppen eingeteilt, die entsprechend ihres Typs für die Chromophorylierung der verschiedenen spezifischen, konservierten Cysteinbindestellen verantwortlich sind. Ihre Apo-PBP- und Phycobilinspezifitäten sowie ihr Oligomerisierungsgrad können sich jedoch deutlich voneinander unterscheiden (Scheer *et al.*, 2008). PBP Lyasen vom E/F-Typ vermitteln die spezifische Ligation von Phycobilinen an  $\alpha$ -Cys<sup>84</sup> sowie entsprechende homologe Cysteinbindestellen. Hierbei besitzen sie eine hohe Spezifität hinsichtlich des zu chromophorylierenden Apo-Proteins als auch der Bindestelle (Fairchild *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 2000; Blot *et al.*, 2009; Biswas *et al.*, 2011; Shukla *et al.*, 2012). CpeZ aus *Fremyella diplosiphon* zählt ebenfalls zu den PBP Lyasen dieses Typs, stellt aber einen Sonderfall dar. Sie verfügt über keine eigene Phycobilin-Transferaktivität und wirkt lediglich unterstützend für die Aktivität der E/F-Typ-PBP Lyase CpeY (Biswas *et al.*, 2011; Kronfel *et al.*, 2019b). Für einige Vertreter vom E/F-Typ wurde außerdem eine zusätzliche Isomeraseaktivität beschrieben (Zhao *et al.*, 2000; Blot *et al.*, 2009; Shukla *et al.*, 2012). Kristallstrukturen des E/F-Typs zeigen eine charakteristische Armadillo-Typ-Faltung mit einem HEAT (*Huntingtin*, *elongation factor 3 (EF3)*, *PR65/A subunit of protein phosphatase 2A (PP2A)*, *yeast PI3-kinase TOR1*)-Wiederholungsmotiv (Hemmings, 1990; Andrade *et al.*, 1995;

Groves *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2017). Bei diesem Motiv wiederholen sich zwei antiparallele  $\alpha$ -Helices, die über flexible Schleifen miteinander verbunden sind und eine Vertiefung für den zu bindenden Chromophor bilden (Zhao *et al.*, 2017). Protein-Protein-Interaktionen werden durch diese Struktur häufig gefördert.

Bisher ist nur wenig über die Übertragung des an zwei Cysteinresten assoziierten Phycobilins bekannt. Vor Kurzem wurde allerdings die PBP Lyase CpeF identifiziert und charakterisiert, die in *F. diplosiphon* für die Chromophorylierung von  $\beta$ -Cys<sup>48/59</sup> der PE- $\beta$ -Untereinheit (CpeB) mit PEB verantwortlich ist. Mit Unterstützung durch CpeZ vermittelt sie zunächst die Ligation des PEB-A-Rings an Cys<sup>48</sup> und anschließend des D-Rings an Cys<sup>59</sup> (Kronfel *et al.*, 2019a; Kronfel *et al.*, 2019b). Diese PBP Lyase vom E/F-Typ ist somit bisher der einzige bekannte Vertreter seines Typs, der die Chromophorligation an eine  $\beta$ -Untereinheit unterstützt.

Die Gruppe der S/U-Typ-PBP Lyasen zeigt wiederum eine hohe Bindestellenspezifität für die Phycobilinbindung an den konservierten Aminosäurerest Cys<sup>84</sup> (und homologen Cysteinen) in PBP- $\alpha$ - oder auch  $\beta$ -Untereinheiten. Ihre Spezifität für das Apo-Protein ist hingegen gering (Zhao *et al.*, 2007a; Zhao *et al.*, 2007b; Saunée *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008; Biswas *et al.*, 2010; Kronfel *et al.*, 2013). So vermitteln beispielsweise CpcS aus *Nostoc* sp. PCC7120 (NCpcS) sowie CpeS aus *Anabaena* sp. PCC7120 sowohl die Anbindung von PCB an  $\alpha$ -APC als auch an  $\beta$ -PC und  $\beta$ -PEC (Zhao *et al.*, 2006a; Zhao *et al.*, 2007a). Auch CpcS aus *Thermosynechococcus elongatus* (TeCpcS) überträgt Phycobiline auf das  $\alpha/\beta$ -Cys<sup>82</sup> verschiedener Apo-PBP. Als nahezu universale PBP Lyase bindet und transferiert sie außerdem unterschiedliche Phycobiline (PCB, PEB und P $\Phi$ B) (Kronfel *et al.*, 2013). Die Auflösung der Kristallstruktur von TeCpcS (PDB: 3BDR) und anschließende Strukturvorhersagen konnten zur Aufklärung der Struktur des S/U-PBP Lyasen-Typs beitragen (Kronfel *et al.*, 2013). Diese setzt sich aus einem  $\beta$ -Faltblatt mit zehn Strängen und zwei  $\alpha$ -Helices zusammen, die gemeinsam eine „Fass“-ähnliche Struktur mit hydrophober Bindetasche im Innern bilden. Mit dieser Calyx-Faltung lassen sie sich in die Familie der Calycine einordnen, zu der Proteine mit unterschiedlichen Funktionen gehören (Flower *et al.*, 2000). Enzymatische Funktionen bilden hierbei die Ausnahme, denn insbesondere der Ligandentransport wird durch diese Struktur begünstigt. Alle bisher bekannten S-Typ-Lyasen besitzen ebenfalls ausschließlich eine Transferfunktion (Zhao *et al.*, 2007a; Zhao *et al.*, 2007b; Saunée *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008; Biswas *et al.*, 2010; Wiethaus *et al.*, 2010; Kronfel *et al.*, 2013).

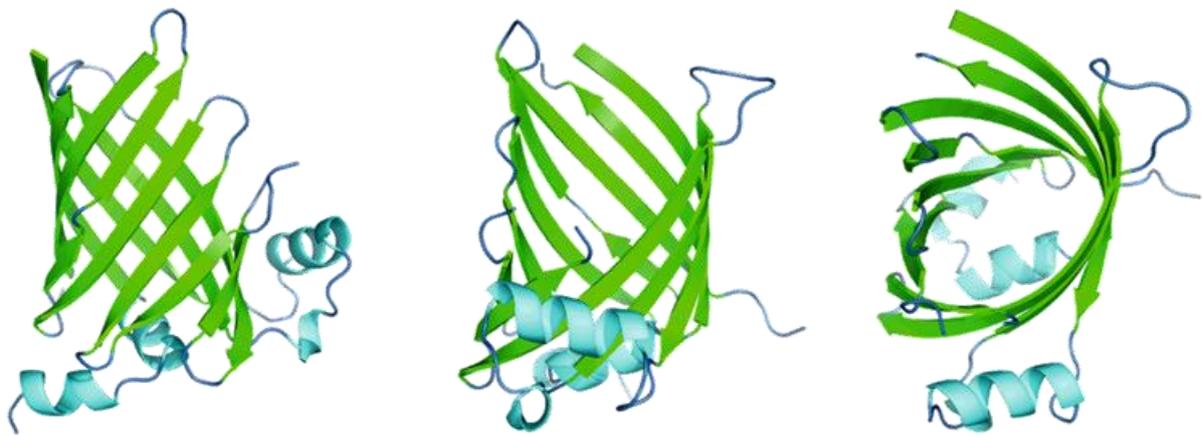
Zum T-Typ gehörige PBP Lyasen unterstützen die Ligation von Phycobilinen an das konservierte  $\beta$ -Cys<sup>155</sup> und entsprechende homologe Cysteine (Shen *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007b). Sie weisen damit eine hohe Bindestellenspezifität auf, zeigen aber hinsichtlich des Apo-Proteins unterschiedliche Spezifitäten. Ihre Struktur ähnelt der des S/U-Typs, denn auch sie bilden eine aus  $\beta$ -Faltblättern bestehende „Fass“-ähnliche Struktur mit hydrophobem Innenraum aus (Zhou *et al.*, 2014; Gasper *et al.*, 2017). Im Fall von  $\Phi$ CpeT aus dem Cyanophagen P-HM1 ist diese jedoch deutlich kleiner und kompakter (Gasper *et al.*, 2017). Obwohl nur PCB-übertragende Vertreter dieses Typs bekannt sind, bindet  $\Phi$ CpeT PEB.  $\Phi$ CpeT wird allerdings eine assistierende Rolle bei der PBP Assemblierung im Wirtorganismus *Prochlorococcus* zugesprochen (Gasper *et al.*, 2017). Eine Übertragung von PEB auf das PBP des Wirtes konnte bisher nicht gezeigt werden.

#### 1.4.1 Putative Phycobiliproteinlyasen in *G. theta*

Die Chromophorylierung von PE545 in *G. theta* erfordert die Unterstützung durch PBP Lyasen. Bereits vor Veröffentlichung der Nukleusgenomdaten wurden drei putative PBP Lyasen in der Literatur erwähnt, die an der PBP Assemblierung in *G. theta* beteiligt sind: *GtCPET* vom T-Typ (Bolte *et al.*, 2008), sowie *GtCPCX* (Gould *et al.*, 2006b) und *GtCPEZ* vom E/F-Typ (Gould *et al.*, 2007; Curtis *et al.*, 2012). Für *GtCPET* wird angenommen, dass diese im Nukleomorph kodierte Lyase für die Chromophorassemblierung an  $\beta$ -Cys<sup>155</sup> verantwortlich ist (Bolte *et al.*, 2008). Die Gene der putativen PBP Lyasen *GtCPCX* und *GtCPEZ* sind im Nukleus lokalisiert und wurden zuvor anhand kodierender EST (*expressed sequence tag*)-Sequenzen gefunden (Gould *et al.*, 2006a; Gould *et al.*, 2006b; Gould *et al.*, 2007). Die EST-Sequenz von *gtCPCX* kodiert für ein Protein ähnlich einer PCB: $\alpha$ -PC-Lyase (Gould *et al.*, 2006b) mit einer für PBP Lyasen vom E/F-Typ häufig auftretenden HEAT-Wiederholungsdomäne. Zudem weisen Strukturmodelle beider Proteine, die anhand der Sequenzen mit Phyre<sup>2</sup> (Kelley *et al.*, 2009) erzeugt wurden, auf eine Armadillo-Typ-ähnliche Faltung hin (Overkamp *et al.*, 2014b). *GtCPCX* zeigt jedoch nur eine geringe Ähnlichkeit zu bereits charakterisierten PBP Lyasen, wohingegen sich *GtCPEZ* in die CpeZ-Familie einordnen ließ (Overkamp *et al.*, 2014b). Diese Familie zählt ebenfalls zu den PBP Lyasen des E/F-Typs (Bretaudeau *et al.*, 2013). Die genaue Funktion beider putativer PBP Lyasen konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

### 1.4.2 Die eukaryotische Phycobiliproteinlyase GtCPES

Nach Veröffentlichung der Nukleusgenomdaten von *G. theta* wurde zudem die PBP Lyase CPES (GtCPES) identifiziert, deren gelöste Kristallstruktur (PDB: 4TQ2) die erste war, die für eine eukaryotische PBP Lyase veröffentlicht wurde (Overkamp *et al.*, 2014b). Zehn, durch Loop-Regionen miteinander verbundene antiparallele  $\beta$ -Faltblätter formen eine Fass- oder Kelch-ähnliche Struktur, die Calyx (Abbildung 1.8). Die unterschiedliche Länge der  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen bedingt hierbei die einseitig leicht geöffnete Form, wobei diese auf der anderen Seite durch zwei  $\alpha$ -Helices begrenzt wird. Eine weitere Helix der Kristallstruktur resultiert aus dem StrepII-Affinitäts-tag des rekombinant produzierten und kristallisierten StrepII-GtCPES. Bei der Struktur von GtCPES handelt es sich zusammengefasst um eine modifizierte Lipocalin-Struktur. Die Familie der Lipocaline transportiert kleine hydrophobe Moleküle wie Biline, Steroide oder Fette in ihrer hydrophoben Ligandenbindetasche (Flower *et al.*, 2000). GtCPES liegt als Homodimer vor, bei dem beide Monomere durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Je Monomer wird ein Phycobilinmolekül gebunden.



**Abbildung 1.8: Kristallstruktur von GtCPES aus *G. theta*.** Zehn antiparallel angeordnete  $\beta$ -Faltblätter (grün) bilden eine Fass-ähnliche Struktur. Die  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen sind durch flexible Loops (blau) miteinander und mit drei  $\alpha$ -Helices (türkis) verbunden. Die N-terminale  $\alpha$ -Helix wird durch den StrepII-Affinitäts-tag gebildet.

Mit Hilfe der Kristallstruktur und BLAST (*basic local alignment search tool*)-Recherchen wurde GtCPES dem S/U-PBP Lyasen-Typ zugeordnet (Altschul *et al.*, 1990; Overkamp *et al.*, 2014b). Deshalb wird vermutet, dass GtCPES für die Ligation von PEB an  $\beta$ -Cys<sup>82</sup> von

*GtCPEB* verantwortlich ist. *GtCPES* bindet ausschließlich Phycobiline mit C15,C16-reduzierter Doppelbindung (DHBV, PEB) *in vitro*, d.h. *GtCPES* besitzt eine hohe Substratspezifität. Eine beengte Bindetasche wurde hierfür verantwortlich gemacht. Die *in vivo* Komplexbildung von *GtCPES* und PEB in *Escherichia coli* ist ebenfalls möglich (Overkamp *et al.*, 2014b). Als nativer Ligand von *GtCPES* gilt 3(Z)-PEB, welches durch die PBP Lyase unter anderem vor spontanen und unphysiologischen Bindungsreaktionen geschützt wird. Eine durch *GtCPES* vermittelte Übertragung des gebundenen PEB auf die PE- $\beta$ -Untereinheit konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Endosymbiose ermöglichte Eukaryoten eine phototrophe Lebensweise, führte jedoch im evolutionären Verlauf zu einem Gentransfer zwischen den vorhandenen Genomen sowie zu Modifikationen verschiedener Endosymbiontengene und -proteine. Dies galt auch für die photosynthetisch relevanten Proteine. Denn obwohl Cyanobakterien, Rotalgen und Cryptophyten sowohl Chlorophyll-haltige Antennenkomplexe als auch PBP für die Lichtsammlung verwenden, unterscheiden sich die PBP der Cryptophyten deutlich hinsichtlich der Lokalisation, Organisation, Struktur und Chromophorbesetzung. Der cryptophytische Modellorganismus *G. theta* verwendet lediglich PE545 als PBP, dessen Assemblierung im Vergleich zu cyanobakteriellen PBP bisher nur wenig untersucht ist. Über spezifische Cysteininbindestellen liegt PE545 mit den Phycobilinen PEB und DHBV assoziiert vor. Verschiedene putative PBP Lyasen, die möglicherweise für die Chromophorylierung der Apo-PBP-Untereinheiten verantwortlich sind, wurden mit Hilfe der Nukleusgenomdaten von *G. theta* bereits identifiziert und *GtCPES* als erste cryptophytische PBP Lyase kristallisiert. *GtCPES* zeigt eine hohe Substratspezifität und bindet unter anderem das Phycobilin PEB. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten unter Zuhilfenahme der Struktur und Anwendung biochemischer und biophysikalischer Untersuchungen, die Bindung von PEB sowie der vermittelte Transfer von PEB auf eine Apo-PBP- $\beta$ -Untereinheit durch *GtCPES* untersucht werden. Ein besonderer Fokus galt hierbei der Identifizierung von Aminosäuren in der Bindetasche, welche die Substratspezifität und die Transferaktivität von *GtCPES* bedingen. Ein weiteres Ziel lag darin, zwei weitere, putative PBP Lyasen aus *G. theta* (*GtCPCX*, *GtCPEZ*) rekombinant zu produzieren, die womöglich die Chromophorbindung weiterer PE545-Cysteininbindestellen vermitteln oder unterstützen können.

## 2 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die für diese Arbeit benötigten Materialien sowie die angewendeten Methoden und Techniken aufgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien und Reagenzien mindestens im Reinheitsgrad *pro analysis* von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Fluka (Seelze), GE Healthcare (München), J.T. Baker (Griesheim), Merck (Darmstadt), Riedel-deHaën (Seelze) und Sigma Aldrich (München) bezogen.

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 2.1: Verwendete Geräte und Zubehör.**

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	VX-150	Systemec
Blotapparatur	Semidry-Blot	Bio-Rad
Fluoreszenzspektrometer	Aminco Bowman Series 2	Thermo Fisher
Geldokumentationsanlage	GeliX20 Imager	Intas
Gelelektrophoresekammer	ComPhor L Mini/Midi	Bioplastics BV
Gelfiltrationssäulen	PD MiniTrap G-25	GE Healthcare
HPLC-Anlage	1100 Series	Agilent
Chromatographiesäulen	Luna 5µ C18 (2) 100 A, 250 x 4,6 mm	Phenomenex
	Ultracarb 5µ ODS C20, 250 x 10 mm	Phenomenex
Horizontalschüttler	Innova 44R	New Brunswick Scientific
	SM 30 CONTROL	Edmund Bühler
	IKA™ Rocker 3D basic	IKA™
Inkubator	Polymax 1040	Heidolph
Kalorimeter	MicroCal iTC200	Malvern
Lyophylle	Alpha 2-4 CSC plus	Christ
Magnetrührer	MR Hei-Standard	Heidolph
	MR Hei-Mix L	Heidolph
Massenspektrometer	Triple-TOF 6600 mit ekspert™ nanoLC 425	ABSciex
Chromatographiesäulen	Triart C18, 5 µm Partikel, 0,5 mm x 5 mm	YMC
	Triart C18, 3 µM Partikel, 300 µm x 150 mm	
pH-Meter	PB-11	Sartorius

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Photometer	8453 UV-Visible System	Agilent
	Novaspec III	Amersham Bioscience
	NanoDrop™ Lite	Thermo Fisher Scientific
Pipetten	Eppendorf Research®	Eppendorf
	Pipetman	Gilson
qPCR-Gerät	CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad
Reinstwasseranlage	F3MA89742B	Milli-Q
SDS-PAGE-Apparatur	Mini-Protean Tetra System	Bio-Rad
Spannungsgeber	PowerPac™ HC	Bio-Rad
	PowerPac™ Basic	Bio-Rad
Thermoblock	ThermoStat plus	Eppendorf
Thermocycler	TGradient	Biometra
	T1	Biometra
	T3 Personal	Biometra
Ultraschallbad	Sonorex	Bandelin
Ultraschallgerät	Sonopuls HD2200, Spitze KE 76	Bandelin
Vakuumpumpe	Laboport®	Knf
Vortexer	ReaxTop	Heidolph
Waagen	Research	Sartorius
	AccuLab	Sartorius
Zentrifugen und Rotoren	Centrifuge 5810R	Eppendorf
	Rotor A-4-62	
	Centrifuge 5415D	Eppendorf
	Rotor F45-24-11	
	Z32HK	HERMLE
	Rotor 12/002	
	SORVALL LYNX 6000	Thermo Fisher Scientific
	Rotor T29	
	Rotor F14	
	Rotor F9	
Zellaufschlussgerät	Mikrofluidizer™ LM-10	Microfluidics

## 2.1.2 Labormaterial, Chemikalien, Enzyme, Antikörper und Kits

**Tabelle 2.2: Labormaterial und Chemikalien.**

<b>Material / Chemikalien</b>	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Dialyseschlauch	Cellulose MWCO 10.000	Roth
DNA Standard	GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Thermo Fisher
DNA Farbstoff	GelRed™	Biotium
Filter/ Filtriereinheiten	Minisart® Syringe Filter	Sartorius
	VWR® Vacuum Filtration, 0,2 µm, PES	VWR
Konzentratoren	Amicon® Ultra-4 Ultracel®-10K, Regenerierte Cellulose, 10.000 NMWL	Merck
Mikrotiterplatten	PCR 96-well TW-MT-Platte, semi-skirted thin wall	Biozym Scientific
Protein Farbstoff	Sypro® Orange Protein Gel Stain	Sigma Aldrich
Protein Standard	PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher
	Unstained Protein Standard Broad Range	NEB
PVDF-Membran	Roti®-PVDF-Membran	Carl Roth
Säulenmaterial	Strep-Tactin® Sepharose®	IBA
	TALON® Metal affinity Resin	Clontech
SepPak®-Säulen	SepPak® Plus C18	Waters
Spritzen	Injekt® (5, 10, 20 ml)	Braun
	Omnifix®-F 1 ml LuerSolo	Braun
Spritzenfilter	Phenex, PTFE Membran, 0,2 µm	Phenomenex
	BGB®, PVDF, 0,45 µm, Ø 25 mm	Diagonal
	Rotilabo®, PVDF, steril, 0,22 µm, Ø 33 mm	Roth
Whatman-Papier	0,92 mm	Roth

**Tabelle 2.3: Enzyme und kommerziell erhältliche Kits.**

<b>Enzyme / Kit</b>	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
DNA Ligase	T4 DNA Ligase	NEB
DNA Polymerase	Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	NEB
	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	AG Frankenberg-Dinkel
dNTPs	Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix (10 mM)	NEB
PCR Aufreinigung	NucleoSpin® Gel and PCR clean-up	Macherey & Nagel
Plasmidpräparation	NucleoSpin® Plasmid EasyPure	Macherey & Nagel
Restriktionsendonukleasen	DpnI, EcoRI-HF®, NotI-HF®, HindIII-HF®, XhoI	NEB

**Tabelle 2.4: Verwendete Antikörper für den Fusions-tag Nachweis mittels Western-Blot.**

<b>Antikörper</b>	<b>Nachweis von:</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Strep-Tactin-AP-Konjugat	StrepII-tag	1:4000	IBA
Anti-Penta-His-Antikörper	His <sub>6</sub> -tag (Erstantikörper)	1:2000	GE Healthcare
Anti-Mouse IgG AP-Konjugat	His <sub>6</sub> -tag (Zweitantikörper)	1:5000	Sigma Aldrich

### 2.1.3 Bakterienstämme

In diesem Abschnitt sind die für diese Arbeit relevanten Bakterienstämme mit dem dazugehörigen Genotyp tabellarisch aufgeführt (Tabelle 2.5).

**Tabelle 2.5: Verwendete *E. coli* - Bakterienstämme.**

<b><i>E. coli</i> Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
BL21 (λDE3)	F-ompZ r- m- λlysPlacUV5-T7- GenIPlacq-lacI	Studier <i>et al.</i> , 1986
BL21 (λDE3)-CodonPlus RIL	F- ompT hsdS (rB-mB-) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr]	Stratagene
DH5α	F-1-supE44D(argF-lac) U169 j80dlacZΔM15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Grant <i>et al.</i> , 1990
JM83	Ara, Δlac-pro, strA, thi, [Φ80lacZΔM15]	Vieira <i>et al.</i> , 1982

### 2.1.4 Plasmide

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Vielzahl an Plasmiden verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die auf den synthetisch hergestellten Konstrukten (MWG Eurofins Operon; BioCat GmbH, Heidelberg) befindlichen Gene ohne den für Signalpeptide kodierenden Bereich an den Codongebrauch von *E. coli* K12 angepasst.

**Tabelle 2.6: Verwendete Expressionsplasmide.** Unter „Plasmidsammlung“ ist die archivierte Sammlung der AG Frankenberg-Dinkel zu verstehen. Die Person, die das entsprechende Plasmid konstruiert hat, ist in Klammern angegeben.

Plasmid	Eigenschaften	Fusions- tag	Referenz
<b>Konstrukte mit PBP Lyase-Genen</b>			
1) pASK-s <sub>gtCPES</sub>	pASK-IBA7+-Derivat; synthetisches <i>gtCPES</i> -Gen aus <i>G. theta</i> ; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	K. Overkamp <i>et al.</i> , 2014b
2) pASK-s <sub>gtCPES_R18A</sub>	pASK-s <sub>gtCPES</sub> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese R18A; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Plasmid-sammlung (K. Overkamp)
3) pASK-s <sub>gtCPES_H21A</sub>	pASK-s <sub>gtCPES</sub> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese H21A; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Plasmid-sammlung (K. Overkamp)
4) pASK-s <sub>gtCPES_N22A</sub>	pASK-s <sub>gtCPES</sub> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese N22A; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Plasmid-sammlung (K. Overkamp)
5) pASK-s <sub>gtCPES_I65A</sub>	pASK-s <sub>gtCPES</sub> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese I65A; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Hartmann, 2016
6) pASK-s <sub>gtCPES_M67A</sub>	pASK-s <sub>gtCPES</sub> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese M67A; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Hartmann, 2016
7) pASK-s <sub>gtCPES_M67V</sub>	pASK-s <sub>gtCPES</sub> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese M67V; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Diese Arbeit
8) pASK-s <sub>gtCPES_W69A</sub>	pASK-s <sub>gtCPES</sub> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese W69A; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Plasmid-sammlung (K. Overkamp)
9) pASK-s <sub>gtCPES_W75A</sub>	pASK-s <sub>gtCPES</sub> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese W75A; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Plasmid-sammlung (K. Overkamp)
10) pASK-s <sub>gtCPES_E136A</sub>	pASK-s <sub>gtCPES</sub> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese E136A; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Overkamp <i>et al.</i> , 2014b
11) pASK-s <sub>gtCPES_E136D</sub>	pASK-s <sub>gtCPES</sub> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese E136D; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Diese Arbeit
12) pASK-s <sub>gtCPES_R146A</sub>	pASK-s <sub>gtCPES</sub> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese R146A; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Overkamp <i>et al.</i> , 2014b
13) pASK-s <sub>gtCPES_R148A</sub>	pASK-s <sub>gtCPES</sub> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese R148A; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Overkamp <i>et al.</i> , 2014b

14) pASK-s_ <i>gtCPES</i> _C149A	pASK-s_ <i>gtCPES</i> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese C149A; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Overkamp <i>et al.</i> , 2014b
15) pASK-s_ <i>gtCPES</i> _S150A	pASK-s_ <i>gtCPES</i> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese S150A; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Plasmid-sammlung (K. Overkamp)
16) pASK-s_ <i>gtCPES</i> _E168A	pASK-s_ <i>gtCPES</i> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese E168A; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Plasmid-sammlung (K. Overkamp)
17) pASK-s_ <i>gtCPES</i> _E168D	pASK-s_ <i>gtCPES</i> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese E168D; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Diese Arbeit
18) pASK-s_ <i>gtCPES</i> _I65A_M67A	pASK-s_ <i>gtCPES</i> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese I65A_M67A; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Diese Arbeit
19) pASK-s_ <i>gtCPES</i> _I65A_M67V	pASK-s_ <i>gtCPES</i> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese I65A_M67V; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Diese Arbeit
20) pASK-s_ <i>gtCPES</i> _I65A_M67V_L89P	pASK-s_ <i>gtCPES</i> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese I65A_M67V_L89P; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Diese Arbeit
21) pASK-s_ <i>gtCPES</i> _I65A_M67V_L89P_F123L	pASK-s_ <i>gtCPES</i> -Derivat; Quik-Change-Mutagenese I65A_M67V_L89P_F123L; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Diese Arbeit
22) pETDuet-s_ <i>gtCPES</i>	pETDuet-Derivat; synthetisches <i>gtCPES</i> -Gen aus <i>G. theta</i> ; Amp <sup>R</sup>	N-term. His <sub>6</sub>	Overkamp <i>et al.</i> , 2014b
23) pETDuet-s_ <i>gtCPES</i> _M67A	pETDuet-s_ <i>gtCPES</i> -Derivat; QuikChange-Mutagenese M67A; Amp <sup>R</sup>	N-term. His <sub>6</sub>	Diese Arbeit
24) pET30_ <i>cpcS1</i>	pET30-Derivat; Originalsequenz <i>cpcS</i> -Gen aus <i>Nostoc</i> sp. PCC7120; Kan <sup>R</sup>	C-term. His <sub>6</sub>	Zhao <i>et al.</i> , 2007a/b
25) pASK_ <i>gtCPCX</i> _mSA	pASK-IBA45 <sup>+</sup> -Derivat; Originalsequenz: Synthetisches <i>gtCPCX</i> -Gen mit Sequenzanhang aus <i>G. theta</i> ; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Diese Arbeit
26) pASK_ <i>gtCPCX</i> _oSA	pASK-IBA45 <sup>+</sup> -Derivat; Originalsequenz: Synthetisches <i>gtCPCX</i> -Gen ohne Sequenzanhang aus <i>G. theta</i> ; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Diese Arbeit
27) pASK_ <i>gtCPEZ</i>	pASK-IBA45 <sup>+</sup> -Derivat; Originalsequenz: Synthetisches <i>gtCPEZ</i> -Gen aus <i>G. theta</i> mit Signalpeptid; Amp <sup>R</sup>	N-term. StrepII	Diese Arbeit
28) pETDuet_ <i>gtCPCX</i> _mSA	pETDuet-Derivat; Originalsequenz: Synthetisches <i>gtCPCX</i> -	N-term. His <sub>6</sub>	Diese Arbeit

	Gen mit Sequenzanhang aus <i>G. theta</i> ; Amp <sup>R</sup>		
29) pETDuet_ <i>gtCPCX_oSA</i>	pETDuet-Derivat; Originalsequenz: Synthetisches <i>gtCPCX</i> -Gen ohne Sequenzanhang aus <i>G. theta</i> ; Amp <sup>R</sup>	N-term. His <sub>6</sub>	Diese Arbeit
30) pETDuet_ <i>gtCPEZ</i>	pETDuet-Derivat; Originalsequenz: Synthetisches <i>gtCPEZ</i> -Gen aus <i>G. theta</i> mit Signalpeptid; Amp <sup>R</sup>	N-term. His <sub>6</sub>	Diese Arbeit

---

**Konstrukte mit PBP-Untereinheit-Genen**

31) pCOLADuet_ <i>cpeB</i>	pCOLADuet1-Derivat; Originalsequenz: Synthetisches <i>cpeB</i> -Gen aus <i>P. marinus</i> MED4; Kan <sup>R</sup>	N-term. His <sub>6</sub>	Pauls, 2014
32) pCOLADuet_ <i>cpeB_C82A</i>	pCOLADuet_ <i>cpeB</i> -Derivat; QuikChange-Mutagenese C82A; Kan <sup>R</sup>	N-term. His <sub>6</sub>	Plasmidsammlung (J. Schwach)
33) pBS_ <i>cpcB</i>	pBS150v-Derivat; Originalsequenz: <i>cpcB</i> -Gen aus <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002; Spc <sup>R</sup>	N-term. His <sub>6</sub>	AG Schluchter: Shen <i>et al.</i> , 2006
34) pCOLADuet_ <i>cpcB</i>	pCOLADuet-Derivat; <i>cpcB</i> -Gen aus <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002; Kan <sup>R</sup>	N-term. His <sub>6</sub>	Diese Arbeit

---

**Konstrukte für Koexpression**

35) pTD <i>ho1pcyA</i>	pACYCDuet1-Derivat; <i>ho1</i> - und <i>pcyA</i> -Gen aus Cyanophagen P-SSM2 und P-SSM4; Cmp <sup>R</sup>	C-term. S N-term. His <sub>6</sub>	Dammeyer <i>et al.</i> , 2008a
36) pTD <i>ho1pebS</i>	pACYCDuet1-Derivat; <i>ho1</i> - und <i>pebS</i> -Gen aus Cyanophagen P-SSM2; Cmp <sup>R</sup>	C-term. S N-term. His <sub>6</sub>	Dammeyer <i>et al.</i> , 2008a
37) pGro7 (CP2)	pACYC-Derivat; enthält <i>groES</i> - und <i>groEL</i> -Gene; <i>araB</i> -Promotor; Cmp <sup>R</sup>	-	TaKaRa Bio Inc

---

### 2.1.5 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit für die Klonierung (Tabelle 2.7) und Zielgerichtete Mutagenese (Tabelle 2.8) von Expressionsplasmiden verwendeten Oligonukleotide (Primer) sind in diesem Kapitel aufgelistet.

**Tabelle 2.7: Oligonukleotide zur Konstruktion der Expressionsplasmide dieser Arbeit.**

Name	Schnittstellen	Sequenz 5'- 3'	Konstrukt
1) <i>gtCPCX_mSA_pASK_EcoRI_f</i>	EcoRI	GCGAATTCAACTCTGCTT GTGTGAGAGAAG	pASK_ <i>gtCPCX_mSA</i>
2) <i>gtCPCX_HindIII_rev</i>	HindIII	GCAAGCTTTCAGCAGTCC CACGCTAG	pASK_ <i>gtCPCX_mSA</i> pASK_ <i>gtCPCX_oSA</i> pETDuet_ <i>gtCPCX_mSA</i> pETDuet_ <i>gtCPCX_oSA</i>
3) <i>gtCPCX_oSA_pASK_EcoRI_f</i>	EcoRI	GCGAATTCATGATATCG GAGAAGGGAAACC	pASK_ <i>gtCPCX_oSA</i>
4) <i>gtCPEZ_EcoRI_pASK_fwd</i>	EcoRI	GCGAATTCAATGATCTC AAGGGTTTTTCATCC	pASK_ <i>gtCPEZ</i>
5) <i>gtCPEZ_XhoI_pASK_rev</i>	XhoI	TATACTCGAGCTAGGAG GACGAGAGAGG	pASK_ <i>gtCPEZ</i>
6) <i>gtCPCX_mSA_pET_EcoRI_f</i>	EcoRI	GCGAATTCCTCAACTCTGCT TGTGTGAGAGAAG	pETDuet_ <i>gtCPCX_mSA</i>
7) <i>gtCPCX_oSA_pET_EcoRI_f</i>	EcoRI	GCGAATTCATGATATC GGAGAAGGGAAACC	pETDuet_ <i>gtCPCX_oSA</i>
8) <i>gtCPEZ_EcoRI_pET_fw</i>	EcoRI	GCGAATTCATGATCTCA AGGGTTTTTCATCC	pETDuet_ <i>gtCPEZ</i>
9) <i>gtCPEZ_NotI_rev</i>	NotI	TATAGCGGCCGCTAGGA GGACGAG	pETDuet_ <i>gtCPEZ</i>
10) <i>cpb7002_EcoRI_fwd</i>	EcoRI	CGGAATTCTATGTTTGA TATTTTTACC	pCOLADuet_ <i>cpb</i>
11) <i>cpb7002_HindIII_re</i>	HindIII	GCAAGCTTTTATTCAAC AGCTTTTG	pCOLADuet_ <i>cpb</i>

**Tabelle 2.8: Verwendete Oligonukleotide für die Zielgerichtete Mutagenese (Quik-Change®).** Gezeigt sind jeweils die *forward* (fwd)-Primer. Der *reverse* (rev)-Primer bildet das jeweilige reverse Komplement hierzu.

<b>Name</b>	<b>Sequenz 5' - 3'</b>	<b>Konstrukt</b>
12) <i>gtCPES_M67V</i>	CTGTTCAAGCATTCGCGTAAG TTGGGAAGGTAGCTC	pASK-s_ <i>gtCPES_M67V</i>
13) <i>gtCPES_E136D</i>	CTGCAGCCGAAGACCGCATTT GGTTTG	pASK-s_ <i>gtCPES_E136D</i>
14) <i>gtCPES_E168D</i>	GTCTTTCGACCGACGTACGCG ACAAAAG	pASK-s_ <i>gtCPES_E168D</i>
15) <i>gtCPES_M67A</i>	GTTCAAGCATTCGCGCGAGTT GGGAAGGTAG	pETDuet-s_ <i>gtCPES_M67A</i>
16) <i>gtCPES_I65AM67A</i>	GGCCTGTTCAAGCGCTCGCGC GAGTTGGGAAGGTAGC	pASK- s_ <i>gtCPES_I65A_M67A</i>
17) <i>gtCPES_I65A_M67V</i>	GGCCTGTTCAAGCGCTCGCGT GAGTTGGGAAGGTAGC	pASK- s_ <i>gtCPES_I65A_M67V</i>
18) <i>gtCPES_I65A_M67V_L89P</i>	GGCTCCACTGTCCTGGTTCCG TACAAAGATGAGG	pASK-s_ <i>gtCPES_I65A_M67V_L89P</i>
19) <i>gtCPES_I65A_M67V_L89P_F123L</i>	GCAGGAAGATGGGACCCCTTGT GCTGCATACC	pASK-s_ <i>gtCPES_I65A_M67V_L89P_F123L</i>

### 2.1.6 Medien und Zusätze

Die verwendeten Medien und Zusätze wurden in MilliQ® Reinstwasser (Aqua dest.) angesetzt, falls nicht anders angegeben. Für die Kultivierung von Bakterien wurden die Medien und Zusätze vor Verwendung autoklaviert (20 min, 2 bar, 121 °C) oder, bei Hitzeempfindlichkeit, steril filtriert (Porengröße 0,2 µm, Rotilabo®, PVDF, Roth).

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde Luria Bertani (LB)-Medium verwendet, welches bei Bedarf mit entsprechenden Zusätzen versetzt wurde (Tabelle 2.9). Für die Erzeugung des Festmediums (LB-Agar) wurden 1,5% (w/v) Agar-Agar (Roth) vor dem Autoklavierungsprozess zum Medium hinzugegeben.

<b>LB-Medium</b>		<b>LB-Agar</b>		<b>LB-BS-Medium</b>	
LB-Medium	20 g/l	LB-Medium		LB-Medium	
(Lennox), Braun		Agar-Agar	15 g/l	Betain	2,5 mM
In Aqua dest.				D-Sorbitol	100 mM

**Tabelle 2.9: Medienzusätze.** Vor der Verwendung wurden die Medienzusätze (AppliChem, Roth, Sigma-Aldrich) steril filtriert.

<b>Zusatz</b>	<b>gelöst in</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Endkonzentration</b>
Ampicillin (Amp)	Aqua dest.	100 mg/ml	100 µg/ml
Anhydrotetracyclin (AHT)	70% EtOH	2 mg/ml	200 ng/ml
L-Arabinose	Aqua dest.	100 mg/ml	0,5 mg/ml
Chloramphenicol (Cmp)	70% EtOH	34 mg/ml	34 µg/ml
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Aqua dest.	1 M	0,1-0,5 mM
Kanamycin	Aqua dest.	50 mg/ml	50 µg/ml
Spectinomycin (Spc)	Aqua dest.	50 mg/ml	50 µg/ml

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Lagerung und Kultivierung von *Escherichia coli*

Die im Kultivierungsprozess verwendeten Medien, Plastik-Messzylinder und Schottflaschen wurden vor der Verwendung durch Autoklavieren (121 °C, 2 bar, 20 min), Glaswaren mittels trockener Hitze (180 °C, 3 h) sterilisiert. Handelte es sich um hitzeempfindliche Substanzen, so wurden diese gelöst und anschließend steril filtriert.

#### Kultivierung in Flüssigmedium

Für die Kultivierung von *E. coli* in Hinblick auf die Proteinproduktion sowie die Isolierung von Plasmiden wurde zunächst eine Vorkultur mit LB-Medium angesetzt. Diese wurde mit einer Einzelkolonie beimpft und zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks mit entsprechenden Antibiotika versetzt, wenn nicht anders angegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 170 rpm (SM 30 CONTROL, Edmund Bühler) wurde die Bakterienvorkultur (1:100) einer Hauptkultur hinzugegeben, die bereits das Medium, die benötigten Antibiotika und Additive enthielt. Die Hauptkultur wurde dann bei 37 °C und 90 rpm bis 120 rpm bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD) bei 578 nm von etwa 0,6 inkubiert (Innova®44, New Brunswick Scientific). Anschließend wurden die Kulturen auf ihre Produktionstemperatur gebracht (30 °C; 17 °C). Sobald die Produktionstemperatur erreicht war, wurde die Genexpression induziert.

### **Bestimmung der Zelldichte**

Die Optische Dichte, d.h. die Zelldichte der Bakterienkultur, wurde bei einer Wellenlänge von 578 nm mit Hilfe eines Photometers (NovaspecII, Amersham Biosciences) bestimmt. Eine  $OD_{578}$  von 1 entspricht einer Zellzahl von  $1 \times 10^9$  Zellen pro Milliliter. Als Referenz wurde frisches LB-Medium verwendet.

### **Kultivierung auf Agar-Platten und Lagerung als Glycerin-Gefrierkulturen**

Die in Kapitel 2.1.3 genannten Bakterienstämme wurden aus Flüssigkulturen oder Glycerin-Gefrierkulturen auf LB-Agar-Platten vereinzelt und diese bei 37 °C über Nacht inkubiert. Bei Bedarf wurde zuvor das LB-Agar-Medium mit Antibiotika versetzt (Selektionsplatten). Anschließend wurde eine 5 ml Flüssigkultur LB-Medium mit einer Einzelkolonie der Vereinzlung beimpft und ebenfalls über Nacht inkubiert (37 °C, 170 rpm). Aus dieser Vorkultur wurden 500 µl Bakteriensuspension entnommen und mit autoklaviertem Glycerin als Frostschutz im Verhältnis 1:1 gemischt. Diese Glycerin-Kultur wurde unter Verwendung von Flüssigstickstoff direkt eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die *E. coli*-Zellen wurden später für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen verwendet (Kapitel 2.2.2). LB-Agar-Platten, die älter als sieben Tage waren, wurden zum Beimpfen von Flüssigkulturen nicht mehr verwendet und im S1-Abfall entsorgt.

### **2.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen**

Um *E. coli*-Zellen zur Aufnahme von Fremd-DNA zu befähigen, wurden diese zunächst chemisch kompetent gemacht. Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde eine Vorkultur (5 ml) mit einer Kolonie des gewünschten Bakterienstammes beimpft und über Nacht inkubiert (37 °C, 170 rpm). Mit Hilfe dieser Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium angeimpft (1:100) und es folgte eine Inkubation dieser Hauptkultur bei 37 °C und 170 rpm bis zu einer  $OD_{578}$  von etwa 0,5. Darauffolgend wurden die Zellen mittels Zentrifugation (4000 rpm, 10 min, 4 °C, 5810R, A-4-62, Eppendorf) geerntet. Der Überstand wurde entfernt und die Zellpellets in jeweils 50 ml steriler  $CaCl_2$ -Lösung (50 mM) resuspendiert. Die Suspension wurde für eine Stunde auf Eis inkubiert. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation (4000 rpm, 10 min, 4 °C), der Überstand wurde verworfen. Die Zellpellets wurden schließlich in insgesamt 5 ml einer 50 mM  $CaCl_2$ -Lösung, versetzt mit 15% (v/v)

Glycerin, aufgenommen. Nach der Aliquotierung wurden die Aliquots (200 µl) bei -80 °C gelagert.

### **2.2.3 Transformation chemisch kompetenter Zellen**

Damit freie DNA (Transformation) aufgenommen werden kann, in diesem Fall in Form von Plasmiden, wurde einem Aliquot (200 µl) chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen 1 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA hinzugefügt. Lag eine geringe Konzentration an Plasmid vor – nachgewiesen über Photometer (NanoDrop™ Lite, Thermo Fisher) und/oder Agarosegelelektrophorese – so wurden 2-3 µl Plasmid verwendet. Handelte es sich um einen Ligationsansatz, so wurden 10 µl eingesetzt. Es folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis, gefolgt von einem Hitzeschock bei 42 °C für 1 min im Thermoblock (ThermoStat plus, Eppendorf). Anschließend wurden 700 µl frisches, steriles LB-Medium hinzugefügt und die Zellen daraufhin eine Stunde im Horizontalschüttler inkubiert (170 rpm, 37 °C, SM 30 CONTROL, Edmund Bühler). Von dieser Bakteriensuspension wurden 100 µl auf Selektionsplatten, die Antibiotika enthielten, ausgestrichen und diese bei 37 °C über Nacht inkubiert. Bei Transformationen, die sich als schwieriger erwiesen haben, wurden die Zellen vor Ausplattierung pelletiert (5 min, 4000 rpm, Centrifuge 5415D, Eppendorf), der Überstand entfernt und das Zellpellet in 100 µl LB-Medium aufgenommen.

War es notwendig, ein weiteres Plasmid in die *E. coli*-Zellen einzubringen, so wurden aus einer bereits Plasmid-enthaltenen Bakterienkolonie kompetente Zellen hergestellt (Kapitel 2.2.2, Herstellung chemisch kompetenter Zellen) und in diese das zweite Plasmid eingebracht. Eine Selektionsplatte versetzt mit beiden Antibiotika gewährleistete an dieser Stelle den benötigten Selektionsdruck zum Erhalt beider Plasmide in den Zellen.

## **2.3 Molekularbiologische Techniken**

### **2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA**

Zur Isolierung und Präparation von Plasmid-DNA wurden 5 ml LB-Medium mit einer Bakterien-Einzelkolonie beimpft und inkubiert (37 °C, 170 rpm, über Nacht). Am nächsten Tag wurden 2 ml hiervon für 2 min zentrifugiert (13.000 rpm, 5415D, F45-24-11, Eppendorf). Das Zellpellet wurde in 300 µl Lösung P1 resuspendiert und inkubiert (5 min, RT).

Dann wurden 300 µl frisch hergestellter Lösung P2 zur alkalischen Lyse der Zellen und Denaturierung der DNA hinzugefügt und durch Invertieren gemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf Eis für 5 min. Dieser Schritt wurde nach Zugabe von 300 µl Lösung P3 zur Äquilibrierung des pH-Wertes und Renaturierung der Plasmid-DNA wiederholt. Nach Zentrifugation (13.000 rpm, 15 min, RT) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß (Volumen 2 ml) überführt und 800 µl 100%iges Ethanol zur Fällung der Plasmid-DNA hinzugegeben. Es folgte ein Inkubationsschritt (2 min, RT) und eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 min. Der Überstand wurde entfernt und das erhaltene Pellet mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Im Anschluss an eine Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min) wurde das Pellet bei 37 °C getrocknet und schließlich zum Lösen der Plasmid-DNA in 30 µl Aqua dest. resuspendiert.

Die Präparation von Plasmid-DNA, die für die Langzeitlagerung bei -20 °C in der Stammsammlung (AG Frankenberg-Dinkel) oder zur Sequenzierung geplant war, wurde mittels des kommerziell erhältlichen NucleoSpin Plasmid EasyPure Kits (Macherey&Nagel) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieses Kit basiert ebenfalls auf der alkalischen Lyse und Renaturierung der Plasmid-DNA.

<b>P1</b>		<b>P2</b>		<b>P3</b>	
Glucose Monohydrat	50 mM	NaOH	200 mM	Natriumacetat	3 M
Tris HCL pH 8	25 mM	SDS	1% (w/v)	Essigsäure	
EDTA	10 mM			pH 5,5	
RNase	100 µg/ml				
(frisch hinzugeben).					

### **Nukleinsäuren-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA in wässriger Lösung wurde mittels Messung der Absorption bei 260 nm durch ein Photometer (NanoDrop™ Lite, Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Eine Absorption von 1 entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50 µg ml<sup>-1</sup> (Sambrook *et al.*, 2001). Alternativ wurden die DNA-Konzentration sowie die Reinheit der Probe abgeschätzt, indem ein bekanntes Volumen der DNA-Probe in einer Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.3.3) eingesetzt und mittels interkalierenden DNA Farbstoff (GelRed™, Biotium) unter UV-Licht im Agarosegel detektiert wurde. Hierbei diente ein DNA-Standard als Vergleich.

### **2.3.2 Konstruktion von Expressionsvektoren**

Zur Konstruktion der in der vorliegenden Arbeit erzeugten Plasmide (Tabelle 2.6) wurden synthetische Gene (*gtCPCX*, *gtCPEZ*) von der Firma BioCat (Heidelberg) bezogen. Diese wurden nach Erhalt in geeignete Expressionsvektoren zur Überexpression in *E. coli* kloniert. Die Gene wurden durch die Firma in Plasmiden (pUC57) zur Verfügung gestellt, die dann als DNA-Ausgangsmatrize für die DNA-Amplifikation dienten. Für die synthetischen Gene von *gtCPCX* und *gtCPEZ* wurden die Originalsequenzen aus *G. theta* ohne die darin enthaltenen Introns verwendet. Für die Klonierung von *cpcB* (aus *Synechococcus* sp. PCC7002) in pCOLADuet1 bildete das Plasmid pBS\_ *cpcB* das Ausgangsplasmid für die Amplifikation des Gens. Dieses war ein Geschenk der AG Schluchter (AG Schluchter, University of New Orleans; Shen *et al.*, 2006; Saunée *et al.*, 2008). Die zur Klonierung benötigten Schnittstellen wurden mittels PCR unter Verwendung entsprechender Oligonukleotide (Tabelle 2.7) eingebracht und die erhaltenen PCR-Produkte nach Reinigung schließlich mittels Restriktionsendonukleasen verdaut. Daraufhin folgten die Ligation in den gewünschten geschnittenen Vektor und die Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Von fünf Kolonien der Selektionsplatte wurden 5 ml Vorkulturen unter Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks durch Antibiotika angesetzt und nach Inkubation deren Plasmide isoliert (Kapitel 2.3.1). Eine Testrestriktion dieser Plasmide diente zur Kontrolle der Integration des Gens. Hierfür wurde das Gen entweder mit Hilfe von Restriktionsenzymen herausgeschnitten oder eine beliebige Restriktionsschnittstelle innerhalb des Plasmids gewählt, das Plasmid damit linearisiert und anhand der Größe analysiert. Bei positiven Plasmiden mit Gen (Insert) wurden diese für die Verifikation zur Sequenzierungsanalyse versendet. Die Zielgerichtete Mutagenese wurde mit bereits in der Stammsammlung der AG Franckenberg-Dinkel enthaltenen, veröffentlichten Expressionsvektoren (pASK-s\_ *gtCPES*, pET-Duet-s\_ *gtCPES*; Overkamp *et al.*, 2014b) unter Anwendung der QuikChange®-Methode durchgeführt. Die dazu verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.8 aufgelistet. Die geschilderte Vorgehensweise zur Konstruktion von Expressionsvektoren wird in den folgenden Abschnitten dieses Kapitels im Detail aufgeführt.

### DNA Amplifikation mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) diente der Amplifizierung von DNA-Fragmenten und Einbringung von Restriktionsschnittstellen, um benötigte Expressionsplasmide herzustellen. Dabei wurden die laboreigene *Pfu* DNA-Polymerase (Mullis *et al.*, 1992) oder die *Phusion* HF-DNA-Polymerase (NEB) verwendet. Die Dauer der Elongation wurde der Geschwindigkeit der Polymerase und der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments angepasst. Für die *Phusion* HF-DNA-Polymerase wurden die vom Hersteller zur Verfügung gestellten Puffer verwendet. Der *Pfu*-Reaktionspuffer (mit MgCl<sub>2</sub>) wurde von der Firma Fermentas bezogen. Die Hybridisierungstemperatur für die Anlagerung der Primer wurde dabei individuell angepasst. Bei Durchführung einer zielgerichteten Mutagenese wurde das Standard PCR-Temperaturprogramm in Tabelle 2.14 angewendet.

**Tabelle 2.10: PCR-Reaktionsansatz (50 µl).**

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration oder Volumen</b>
5x <i>Phusion</i> -Reaktionspuffer	1x
<b>oder</b> 10x <i>Pfu</i> -Reaktionspuffer mit MgSO <sub>4</sub>	1x
dNTPs	200 µM
Primer fwd	100 pmol
Primer rev	100 pmol
DNA (Plasmid)	10-50 ng
<i>Phusion</i> HF-DNA-Polymerase	0,5 µl
<b>oder</b> <i>Pfu</i> DNA-Polymerase	1 µl
Aqua dest.	auf 50 µl

**Tabelle 2.11: PCR-Temperaturprogramm.** *Pfu* DNA-Polymerase: 2 min/kbp; *Phusion* HF-DNA-Polymerase: 30 s/kbp.

<b>Reaktionsschritt</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit</b>
Erste Denaturierung	98	2 min
Denaturierung	98	30 s
Hybridisierung (30 Zyklen)	55-70 (primerspezifisch)	30 s
Elongation	72	2 min/kbp oder 30 s/kbp
Finale Elongation	72	10 min

### **Reinigung des PCR-Produkts**

Im Anschluss an die PCR wurde das erhaltene PCR-Fragment (Insert) mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.3.3) auf Reinheit und Größe überprüft sowie anschließend mittels Kit (NucleoSpin® Gel and PCR clean-up, Macherey&Nagel) nach Herstellerangaben gereinigt.

### **DNA Restriktion**

Die Restriktion von Vektor und PCR-Produkt zur Klonierung wurde mittels Restriktionsendonukleasen (NEB) nach den Herstellerangaben mit den von der Firma NEB zur Verfügung gestellten Puffern für 1 h bei 37 °C durchgeführt (Tabelle 2.12). Anschließend wurden die Restriktionsenzyme, wenn möglich, hitzeinaktiviert (EcoRI-HF®: 65 °C; HindIII-HF®: 80 °C; NotI-HF®: 65 °C; XhoI: 65 °C; 10 min). Wurden zwei Restriktionsenzyme zum Restriktionsverdau benötigt, so wurde der Verdau nacheinander angesetzt und durchgeführt.

**Tabelle 2.12: Restriktionsverdau-Reaktionsansatz.**

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration oder Volumen</b>
Plasmid-DNA / DNA-Fragment	50 ng
10x Reaktionspuffer (CutSmart)	1x
Restriktionsenzym	1 µl
Aqua dest.	Auf 20 µl

### **Ligation von DNA-Fragmenten**

Zur Ligation von Vektor und Insert wurden diese gemeinsam in einem Verhältnis 3:1 eingesetzt und mit einer T4 DNA-Ligase (NEB) bei RT für 30 min oder alternativ bei 17 °C über Nacht inkubiert (Tabelle 2.13). Danach wurde diese inaktiviert (65 °C; 10 min). Dieser Ligationsansatz wurde schließlich in chemisch kompetente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert und auf Selektionsmedium ausplattiert.

**Tabelle 2.13: Ligationsansatz.**

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration oder Volumen</b>
Vektor-DNA (geschnitten)	3 µl
Insert (geschnitten)	9 µl
T4 DNA-Ligase	1U 1 µl
T4 DNA-Ligase Puffer 10x	1x
Aqua dest.	Auf 20 µl

### Zielgerichtete Mutagenese

Um die Funktion der Aminosäuren eines Proteins zu ermitteln, werden diese gegen andere Aminosäuren ausgetauscht und der daraus resultierende Effekt auf die Struktur oder Aktivität überprüft. Zur Erzeugung dieser Proteinvarianten werden Nucleobasen des Gens ersetzt, um das Codon der gewünschten Aminosäure zu generieren. Bei dieser zielgerichteten Mutagenese wurden die Mutationen des Gens mittels PCR und entsprechend geplanter Oligonukleotide (Tabelle 2.8), die den Nucleobasen-Austausch enthalten, eingebracht. Dazu wurde für die PCR eine Hybridisierungstemperatur der Primer von 55 °C verwendet und die Elongationsdauer entsprechend der Konstruktgröße angepasst (Tabelle 2.14). Es wurde die *Phusion* HF-DNA-Polymerase (NEB) eingesetzt. Die Methylierung des parentalen Ausgangskonstrukts erlaubte es anschließend, dieses mit dem Restriktionsenzym DpnI (NEB) zu verdauen (1 h, 37 °C) und – nach Inaktivierung von DpnI (10 min, 80 °C) – vorrangig das verbliebene, mutierte Konstrukt in *E. coli* DH5α zu transformieren und auf Selektionsplatten zu bringen. Aus drei der erhaltenen Kolonien wurden die Plasmide isoliert und durch Sequenzierungsanalyse auf die eingeführte Mutation hin überprüft.

**Tabelle 2.14: Standard PCR-Temperaturprogramm für Zielgerichtete Mutagenese.**

*Pfu* DNA-Polymerase: 2 min/kbp; *Phusion* HF-DNA-Polymerase: 30 s/kbp.

<b>Reaktionsschritt</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit</b>
Erste Denaturierung	96	30 min
Denaturierung	96	30 s
Hybridisierung (16 Zyklen)	55	60 s
Elongation	68	2 min/kbp oder 30 s/kbp
Finale Elongation	68	10 min

**Tabelle 2.15: PCR-Reaktionsansatz und Restriktionsansatz (DpnI-Verdau) für Zielgerichtete Mutagenese.**

<b>PCR-Reaktionsansatz</b>		<b>DpnI-Verdau</b>	
<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration oder Volumen</b>	<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration oder Volumen</b>
5x <i>Phusion</i> Reaktionspuffer	1x	Reaktionspuffer (CutSmart) 10x	1x
dNTPs	200 µM	PCR-Ansatz	25
Primer fwd	100 pmol	DpnI	2 µl
Primer rev	100 pmol	Aqua dest.	auf 30 µl
DNA (Plasmid) <i>Phusion</i>	~100 ng 0,5 µl		
Aqua dest.	auf 50 µl		

### Sequenzierungsanalyse

Die DNA-Sequenzierung zur Überprüfung erstellter Konstrukte wurde mittels Sanger-Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech (Eurofins Genomics) vorgenommen. Der dazu benötigte Ansatz aus Oligonukleotid, Plasmid-DNA und Aqua dest. wurde nach Angaben der Firma pipettiert. Die Analyse der erhaltenen Sequenzierungsdaten erfolgte unter Anwendung der Software *SnapGene*® sowie der frei zugänglichen Online-Software *Clustal Omega*.

### 2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese lassen sich DNA-Moleküle verschiedener Größe und Erscheinungsform elektrophoretisch voneinander trennen. Verwendet wurden Agarosegele mit 1% (w/v) Agarose (Axon) gelöst in TAE-Puffer. Als DNA interkalierender Farbstoff wurde GelRed™ (Biotium) im Gel eingesetzt (1:20.000). Ein definiertes Volumen der DNA enthaltenen Proben wurde mit DNA-Probenpuffer gemischt und die Probekammern des Gels darauf mit der gemischten Probe befüllt. Das verwendete Volumen hing hierbei davon ab, ob die Elektrophorese der Analyse oder der weiteren Probenaufarbeitung galt. Die Elektrophorese wurde anschließend bei 100 V in 1x TAE-Puffer in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Bioplastics BV) bis zur vollständigen Trennung möglicher Fragmente (~1 h) durchgeführt. Mittels Geldokumentationsanlage (Intas) ließen sich die vorhandenen DNA-Fragmente schließlich unter UV-Licht (312 nm) im Agarosegel detektieren. Als Längenstandard wurde der GeneRuler™ DNA-Ladder Mix

(Thermo Fisher Scientific) verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Agarosegelelektrophorese für die Detektion und Überprüfung von Testrestriktionen und PCR-Produkten sowie zur Qualitätsabschätzung von Plasmid-Isolierungen verwendet.

<b>TAE-Puffer (50x)</b>		<b>DNA-Probenpuffer (4x)</b>	
Tris-Acetat pH 8,5	2 M	EDTA	250 mM
EDTA	50 mM	Glycerin (87%)	50% (v/v)
		Bromphenolblau	4% (w/v)

## 2.4 Proteinbiochemische und biophysikalische Methoden

### 2.4.1 (Ko-)Produktion rekombinanter Proteine in *Escherichia coli*

#### ***GtCPES* und Phycobiliprotein- $\beta$ -Untereinheiten**

Alle innerhalb der vorliegenden Arbeit hergestellten Proteine wurden heterolog in *E. coli* produziert. Für die Produktion wurden ausschließlich *E. coli* BL21(DE3) und -RIL verwendet und diese bei 37 °C und 100 rpm ( $\geq 1$  l Kultur) bzw. 170 rpm (100 ml Kultur) in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika und bei Bedarf auch Zusätzen (Betain (B), Sorbitol (S)) angezogen. Bei einer OD<sub>578</sub> von 0,5 bis 0,8 wurden die Kulturen auf 17 °C heruntergekühlt und nach Induktion der Genexpression (0,5 mM IPTG, 200 ng/ml, AHT) die gewünschten Proteine bei 17 °C und 100/170 rpm über Nacht produziert. Die Produktionsbedingungen für *GtCPES* (Varianten), *NCpcS*, *PmCpeB* und *SCpcB* sind in der Tabelle 2.16 zusammengefasst aufgeführt. Mittels Zentrifugation (10 min, 4 °C, 9000 rpm für  $\geq 1$  l, 4000 rpm für 100 ml Kultur, 5810R, A-4-62, Eppendorf) wurden die Zellen anschließend geerntet und direkt aufgeschlossen oder bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

Für *PmCpeB* und *SCpcB* wurden weitere Produktionsbedingungen getestet, auf die in den Kapiteln 3.2.1 und 3.5.1 innerhalb der präsentierten Forschungsergebnisse näher eingegangen wird. Die in Tabelle 2.16 dargestellten Bedingungen für diese Proteine waren jedoch die Produktionsbedingungen, die letztendlich für diese Proteine verwendet wurden. *StrepII-GtCPES* wurde gemeinsam mit dem Chaperonkomplex GroES-GroEL (pGro7, Takara) produziert, der die *in vivo* Faltung und damit die Löslichkeit des Proteins unterstützt. Die Koproduktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Für das pET-Konstrukt von *gtCPES* wurde keine Koexpression mit Chaperongenen, sondern lediglich mit den Synthesegenen für die spätere Erzeugung von PEB (*ho1*, *pebS*) oder PCB (*ho1*, *pcyA*)

(pACYC-Konstrukt) durchgeführt (s. Koproduktion von Phycobiliproteinlyasen und Phycobilinen mit Duet-Vektoren).

**Tabelle 2.16: Standardproduktion von *GtCPES*, *NCpcS*, *PmCpeB*, *SCpcB*.**

<b>Protein</b>	<b><i>GtCPES</i></b>	<b><i>NCpcS</i></b>	<b><i>PmCpeB</i></b>	<b><i>SCpcB</i></b>
<b>Plasmid</b>	pASK- <i>s_gtCPES</i>	pET30_ <i>cpcS</i>	pCOLA- Duet_ <i>cpeB</i>	pCOLA- Duet_ <i>cpcB</i>
<b>Fusions-tag</b>	StrepII	His <sub>6</sub>	His <sub>6</sub>	His <sub>6</sub>
<b><i>E. coli</i> Stamm</b>	BL21(DE3)	BL21(DE3)	BL21-RIL	BL21(DE3)
<b>Koexpression mit:</b>	pGro7(CP2)	-	-	-
<b>Medium</b>	LB-BS	LB	LB-BS	LB
<b>Antibiotikum</b>	Amp	Kan	Kan	Kan
<b>Antibiotikum</b>	Cmp	-	-	-
<b>Koexpressionsplasmid</b>				
<b>Induktion</b>	0,5 mg/ml	-	-	-
<b>Koexpressionsplasmid</b>	L-Arabinose			
<b>Kultivierungstemperatur [°C]</b>	37	37	37	37
<b>Expressionstemperatur [°C]</b>	17	17	17	17
<b>Induktion mit:</b>	200 ng/ml AHT	1 mM IPTG	0,5 mM IPTG	0,5 mM IPTG
<b>Expressionsdauer</b>	ü.N.	ü.N.	ü.N.	ü.N.

### **Phycobiliproteinlyasen *GtCPCX* und *GtCPEZ***

Hinzukommend zu *GtCPES* sollten weitere putative PBP Lyasen aus *G. theta* untersucht werden: *GtCPCX* und *GtCPEZ*. Für beide Proteine wurden verschiedene Produktionsbedingungen im Rahmen von Testexpressionsansätzen getestet. Diese sind in Tabelle 2.17 zusammengefasst. Beide Proteine wurden mit Hilfe von *E. coli* BL21(DE3) in LB-basierendem Medium unter Antibiotika-Selektionsdruck produziert. Zu diesem Zweck wuchsen die Zellen in 100 ml Kulturen bei 37 °C auf eine OD<sub>578</sub> von 0,5 bis 0,8. Bei einer Temperatur von 17 °C wurde die Genexpression induziert (AHT, IPTG) und über Nacht die PBP Lyasen produziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und für einen Testaufschluss verwendet (Kapitel 2.4.2, Testaufschluss zur Bestimmung der Löslichkeit).

**Tabelle 2.17: Getestete Produktionsbedingungen für die Testexpressionen von *GtCPCX* und *GtCPEZ*.** In Klammern befindliche Angaben beziehen sich auf die Bedingungen bei Koexpression mit dem Chaperonplasmid pGro7. Nicht jede Kombination der aufgeführten Bedingungen wurde getestet. Die untersuchten Kombinationen sind in Kapitel 3.1 aufgeführt.

	<i>GtCPEZ</i>		<i>GtCPCX</i> (oSA, mSA)	
<b>Plasmid</b>	pASK-IBA45+	pETDuet1	pASK-IBA45+	pETDuet1
<b>Fusions-tag</b>	StrepII	His <sub>6</sub>	StrepII	His <sub>6</sub>
<b><i>E. coli</i> Stamm</b>	BL21(DE3)	BL21(DE3)	BL21(DE3)	BL21(DE3)
<b>Medium</b>	LB, LB-BS	LB-BS	LB	LB, LB-BS
<b>Antibiotikum</b>	Amp	Amp	Amp	Amp
<b>Koexpressionsplasmid</b>	(pGro7)	(pGro7)	(pGro7)	(pGro7)
<b>Antibiotikum</b>	(Cmp)	(Cmp)	(Cmp)	(Cmp)
<b>Koexpressionsplasmid</b>	(Cmp)	(Cmp)	(Cmp)	(Cmp)
<b>Induktion</b>	(0,5 mg/ml	(0,5 mg/ml	(0,5 mg/ml	(0,5 mg/ml
<b>Koexpressionsplasmid</b>	L-Arabinose)	L-Arabinose)	L-Arabinose)	L-Arabinose)
<b>Kultivierungstemperatur</b>	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
<b>Expressionstemperatur</b>	17 °C	17 °C	17 °C	17 °C
<b>Induktion mit:</b>	200 ng/ml AHT	0,5 mM IPTG	200 ng/ml AHT	0,5 mM IPTG
<b>Expressionsdauer</b>	ü.N.	ü.N.	ü.N.	ü.N.

## Koproduktion von Phycobiliproteinlyasen und Phycobilinen mit Duet-Vektoren

### Koproduktion mit *GtCPES*

Für die *in vivo* Bindung von *GtCPES* mit den Phycobilinen PEB oder PCB wurde die PBP Lyase mit den PEB- und PCB-Biosyntheseenzymen (Ho1, PebS bzw. PcyA), die in den Cyanophagen P-SSM2 und P-SSM4 identifiziert wurden, gemeinsam koproduziert. Hierzu wurden Duet-Vektoren (pETDuet, pACYCDuet) von Novagen verwendet. Die entsprechenden Plasmide (pET-s<sub>gtCPES</sub>, pTDho1pebS, pTDho1pcyA; Tabelle 2.6) wurden zunächst nacheinander in kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert und diese anschließend unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika (Amp, Cmp) zum LB-BS-Medium bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 bis 0,8 bei 37 °C und 100 rpm kultiviert. Nachdem die Kulturen auf 17 °C abgekühlt waren, wurde die Genexpression durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert und die Kulturen bei 17 °C und 100 rpm über Nacht unter Lichtausschluss inkubiert. Unter reduzierten Lichtverhältnissen wurden die gefärbten Zellen geerntet

(4 °C, 9000 rpm, 10 min, SORVALL LYNX 6000, F9, Thermo Fisher) und entweder gelagert oder direkt für Zellaufschluss und Reinigung weiterverwendet.

### **Koproduktion mit *GtCPCX* oder *GtCPEZ***

Die Koproduktion von *GtCPCX* oder *GtCPEZ* mit den Syntheseezymen von PEB (*Ho1*, *PebS*) wurde bei Anwendung einer Testexpression in 100 ml LB-Medium überprüft. Die vorangegangene Transformationsvorgehensweise wurde analog zu der durchgeführt, die für die Koproduktion von *GtCPES* mit PEB verwendet wurde. Die Zellen wurden bei 37 °C und 150 rpm kultiviert und bei einer  $OD_{578}$  von etwa 0,5 wurde eine Produktionstemperatur von 17 °C eingestellt. Die Induktion der Genexpression erfolgte bei 17 °C. Für das pASK-IBA45<sup>+</sup>-Konstrukt von *GtCPCX* (*oSA*, *mSA*) wurden 200 ng/ml AHT zusätzlich zu 0,5 mM IPTG verwendet. Bei Verwendung der pETDuet1-Konstrukte der Lyasengene war lediglich die Zugabe von IPTG zur Induktion der Genexpression aller benötigten Gene (*his-gtCPCX/his-gtCPEZ*, *ho1*, *pebS*) notwendig. Nach einer Expressionsdauer von etwa 18 h (ü.N.) wurden die Zellkulturen zentrifugiert (4 °C, 4000 rpm, 10 min, 5810R, A-4-62, Eppendorf) und daraufhin die Zellpellets auf eine mögliche Färbung hin untersucht.

### **2.4.2 Reinigung und Detektion rekombinanter Proteine**

Die Untersuchung von rekombinant in *E. coli* produzierten Proteinen *in vitro* erfordert deren Isolation aus den Zellen sowie die anschließende Reinigung und Ankonzentrierung der Proteine. Die Detektion der gewünschten produzierten Proteine wurde in der vorliegenden Arbeit mittels SDS-PAGE und Western-Blot Analyse durchgeführt. Die verwendeten Methoden zur Reinigung und Detektion werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

### **Zellaufschluss**

Zu Beginn wurde das *E. coli* Zellpellet (aus 1-2 l Zellkultur) in Lysepuffer resuspendiert, mit einer Spatelspitze Lysozym und DNaseI versetzt und gründlich gemischt. Nach einer Inkubation der Zellen für 30 min auf Eis wurden diese aufgeschlossen. Für die PBP- $\beta$ -Untereinheiten (*PmCpeB*, *SCpcB*) wurde ein Druck basierter Aufschluss mit Hilfe eines Mikrofluidizer<sup>TM</sup> LM-10 (Microfluidics) durchgeführt. Hierbei wurde ein Druck von

15.000 psi verwendet und der Vorgang insgesamt dreimal wiederholt. Als Alternative für PBP Lyasen (*GtCPES*, *NCpcS*) ließen sich die Zellen auch mittels Ultraschall (3 x 3 min; 50% Zyklus für Beschallung/Pause, KE 76, Sonopuls HD2200, Bandelin) auf Eiswasser aufschließen. Dennoch wurde auch für die PBP Lyasen der Aufschluss mittels Mikrofluidizer™ präferiert. Anschließend wurde die lösliche Fraktion durch Zentrifugation bei 4 °C für 1 h (19.000 rpm, SORVALL LYNX 6000, T29, Thermo Fisher) von unlöslichen Bestandteilen getrennt.

<b>Lysepuffer (für PBP-Untereinheit)</b>		<b>Lysepuffer (für PBP Lyasen)</b>	
Tris-HCl pH 7,5	50 mM	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
Glycerin	10% (v/v)		

### **Testaufschluss zur Bestimmung der Löslichkeit**

Das Zellpellet einer Testexpression (100 ml Zellkultur) wurde in 10 ml des gewünschten Lysepuffers resuspendiert und 1 ml dieser Zellsuspension mit Lysozym versetzt. Mit einem Ultraschallbad wurden die Zellen zweimal für 15 min aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (15 min, 13.000 rpm, 5415D, F45-24-11, Eppendorf) und 5 µl des Überstandes für die SDS-Probenvorbereitung verwendet (s. Kapitel 2.4.2, SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)). Die SDS-PAGE diente zur Abschätzung der Proteinlöslichkeit.

### **Affinitätschromatographie**

Die Affinitäts-tag-Fusionsproteine ließen sich mittels Affinitätschromatographie aus dem Zelllysate isolieren. Das hierfür verwendete Säulenmaterial (Strep-Tactin®-Sepharose®, TALON®) wurde in Chromatographiesäulen überführt und nach Herstellerangaben äquilibriert. Anschließend wurde das Lysat auf die Säule gegeben. Nachdem die Säule mit Waschpuffer (Puffer  $W_{His}$ , Puffer  $W_{Strep}$ , Lyaseassaypuffer) gereinigt wurde, wurden die Fusionsproteine mit einem entsprechenden Elutionspuffer (Puffer  $E_{His}$ , Puffer  $E_{Strep}$ ) vom Säulenmaterial in mehreren Fraktionen eluiert und bis zur Weiterverwendung auf Eis gelagert. Für die *in vivo* in *E. coli* erzeugten PBP Lyase-Bilin-Komplexe wurde der Lyaseas-

saypuffer (LAP) zum Waschen verwendet, welcher dem Puffer  $W_{His}$  ohne Imidazol entsprach. Durch die Entnahme einer Probe während der verschiedenen Reinigungsschritte (Lysat, Durchlauf, Waschfraktion, Elutionsfraktionen) sowie deren Aufbereitung, wurde die Bindung und Reinigung der Fusionsproteine mittels SDS-PAGE nachvollzogen. Abschließend wurden die Säulen nach Herstellerangaben regeneriert und auf 20% EtOH bzw. Regenerierungspuffer (Puffer R) bei 4 °C gelagert. Bei Bedarf wurde zudem die Strep-Tactin®-Sephарose® mit 0,5 M NaOH von Proteinerückständen befreit. In Tabelle 2.18 befinden sich die verwendeten Reinigungsparameter für die verschiedenen Affinitäts-tags aufgelistet.

**Tabelle 2.18: Reinigungsprotokoll von StrepII- und His<sub>6</sub>-tag-Fusionsproteinen.**

<b>Fusionsprotein(e)</b>	<b>PBP Lyasen</b>	<b>PBP-β-Untereinheiten</b>	<b>PBP Lyase-Phycobilin Komplex</b>
<b>Affinitäts-tag</b>	<b>StrepII</b>	<b>His<sub>6</sub></b>	<b>His<sub>6</sub></b>
<b>Säulenmaterial</b>	Strep-Tactin®-Sephарose®	TALON® (Co-NTA)	TALON® (Co-NTA)
<b>1 SV (ml)</b>	5	5	5
<b>1) Äquilibrierung</b>	10 SV Puffer $W_{strep}$	10 SV Aqua dest. 10 SV Puffer $W_{His}$	10 SV Aqua dest. 10 SV Puffer $W_{His}$
<b>2) Säule beladen</b>	-----Lysat auftragen-----		
<b>3) Waschschrift</b>	10 SV Puffer $W_{strep}$	10 SV Puffer $W_{His}$	10 SV Lyaseassay-Puffer
<b>4) Elution</b>	3 SV Puffer $E_{strep}$	3 SV Puffer $E_{His}$	3 SV Puffer $E_{His}$
<b>5) Säule waschen</b>	10 SV Puffer $W_{strep}$ 2 SV 0,5 M NaOH	10 SV Puffer $W_{His}$	10 SV Puffer $W_{His}$
<b>6) Regenerierung</b>	3 SV Puffer R	10 SV Aqua dest. 5 SV 20% EtOH	10 SV Aqua dest. 5 SV 20% EtOH

<b>Puffer W<sub>Strep</sub></b>		<b>Puffer E<sub>Strep</sub></b>		<b>Regenerierungspuffer (Puffer R)</b>	
Tris-HCl pH 8	100 mM	Puffer W <sub>Strep</sub>		Puffer W <sub>Strep</sub>	
NaCl	150 mM	Desthiobiotin	2,5 mM	HABA	1 mM
EDTA	1 mM			pH 8	
<b>Puffer W<sub>His</sub></b>		<b>Puffer E<sub>His</sub></b>		<b>Lyaseassaypuffer (LAP)</b>	
Natriumphosphat	60 mM	Puffer E <sub>His</sub>		Natriumphosphat	60 mM
NaCl	300 mM	Imidazol	150 mM	(NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O = 1,56 g/l)	
Imidazol	50 mM			(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> = 6,92 g/l)	
pH 7,5				NaCl	300 mM
				pH 7,5	

### Dialyse (Umpufferung)

Die Umpufferung der Protein-enthaltenden Elutionsfraktionen erfolgte mittels einer Dialyse. Im Rahmen dieser wurde die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch (Ausschlussgrenze 12-14 kDa, Roth) überführt und gegen mindestens das 100-fache Volumen eines Natriumphosphat-basierten Puffers (Lyaseassay-Puffer) bei 4 °C über Nacht unter Rühren (120 rpm) dialysiert.

<b>Lyaseassay-Puffer (LAP)</b>	
Natriumphosphat	60 mM
(NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O = 1,558 g/l)	
(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> = 6,915 g/l)	
NaCl	300 mM
pH 7,5	

### Proteinkonzentrierung und -konzentrationsbestimmung

Die im gewünschten Puffer befindliche Proteinlösung wurde mittels Zentrifugation (4 °C, 4000 rpm, 5810R, A-4-62, Eppendorf) innerhalb von Amicon® Zentrifugen-Filtriereinheiten (Ausschlussgrenze 10 kDa, Merck) auf ein gewünschtes Volumen eingengt, wodurch das Protein ankonzentriert wurde.

Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration photometrisch indem die Absorption des verdünnten Proteins bei 280 nm in einer Quarzküvette (SUPRASIL®,

10 mm, Hellma Analytics) gemessen wurde (8453 UV-Visible system, Agilent Technologies). Unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes und Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm ( $\epsilon_{280}$ ) konnte die Proteinkonzentration schließlich berechnet werden (Gleichung 1). Unter Verwendung der frei verfügbaren Software *PROTEIN CALCULATOR v3.4* ergab sich  $\epsilon_{280}$  bei bekannter Aminosäuresequenz nach der Methode von Gill und von Hippel (Gill *et al.*, 1989). Die Konzentrationen der Phycobiline PCB und PEB wurden mit Hilfe bereits in der Literatur beschriebener Extinktionskoeffizienten bestimmt. Für *in vivo* erzeugte PBP Lyase:Bilin-Komplexe wurde die Konzentration mittels selbst ermittelter Extinktionskoeffizienten der gebundenen Phycobiline berechnet (Kapitel 2.4.2, Extinktionskoeffizienten-Bestimmung von Phycobiliproteinlyase:Bilin-Komplexen).

$$c = \frac{A_{280} \cdot VF}{d \cdot \epsilon_{280}} \quad (1)$$

c: Proteinkonzentration [mol/l];  $A_{280}$ : Absorption bei 280 nm;  $\epsilon_{280}$ : Molarer Extinktionskoeffizient [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]; d: Schichtdicke der Küvette [cm]; VF: Verdünnungsfaktor.

**Tabelle 2.19: Molare Extinktionskoeffizienten für die Bestimmung der Proteinkonzentration.** Angegeben sind die molaren Extinktionskoeffizienten der löslichen Proteine inklusive Fusions-tag und möglicher Disulfidbrücken.

Protein	Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280}$ [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]
His <sub>6</sub> -PmCpeB	2680
His <sub>6</sub> -SCpcB	6520
His <sub>6</sub> -NCpcS	33690
StrepII-GtCPES	39380

**Tabelle 2.20: Extinktionskoeffizienten für die Bestimmung von Phycobilinkonzentrationen.**

Phycobilin	Extinktionskoeffizient	Lösungsmittel	Referenz
3(E)-PEB	$\epsilon_{594nm} = 46,9 \text{ mM}^{-1}cm^{-1}$	5% HCl in MeOH	Gossauer <i>et al.</i> , 1979
3(Z)-PEB	----- wie 3(E)-PEB, Messung bei 571 nm -----		
3(E)-PCB	$\epsilon_{685nm} = 37,15 \text{ mM}^{-1}cm^{-1}$	2% HCl in MeOH	Weller <i>et al.</i> , 1980
3(Z)-PCB	----- wie 3(E)-PCB -----		

### **Extinktionskoeffizienten-Bestimmung von Phycobiliproteinlyase:Bilin-Komplexen**

Die Bestimmung eines Extinktionskoeffizienten für PBP Lyase:Bilin-Komplexe erlaubt unter Annahme, dass alle *GtCPES*-Moleküle im Komplex vorliegen, die anschließende Berechnung der Konzentration der *in vivo* produzierten Komplexe (*wtGtCPES*:PEB; *GtCPES\_M67A*:PEB; *GtCPES\_M67A*:PCB) mittels UV/vis-Spektroskopie. Für die Bestimmung wurden 20  $\mu\text{M}$  freier PBP Lyase in Natriumphosphatpuffer (LAP) mit einem Phycobilin-Überschuss (30  $\mu\text{M}$ ) versetzt. Das Gesamtvolumen betrug 550  $\mu\text{l}$ . Die Protein-Endkonzentration wurde zu Beginn und nach Zugabe des Phycobilins überprüft. Das überschüssige PEB bzw. PCB wurde anschließend mittels Gelfiltration (PD Minitrapp G25 Sephadex Säule, GE Healthcare) abgetrennt, um ausschließlich im Komplex gebundene Biline vorliegen zu haben. Das auf Zentrifugation basierte Protokoll (*Spin protocol*) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurde nach der Säulenäquilibrierung die Gelfiltrations-Säule mit 500  $\mu\text{l}$  Komplex enthaltender Lösung beladen und durch Zentrifugation (3300 rpm; 2 min, 5415D, F45-24-11, Eppendorf) freies Bilin entfernt. Für das Eluat wurde anschließend die Absorption bestimmt. Bei Umstellung des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Gleichung 1) ließen sich schließlich die Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  der PBP Lyase:Bilin-Komplexe bei den maximalen Absorptionswellenlängen (PEB: 600 nm; PCB: 640 nm) berechnen.

**Tabelle 2.21: Extinktionskoeffizienten für die Konzentrationsbestimmung von PBP Lyase:Phycobilin-Komplexen.**

<b>Komplex</b>	<b>Extinktionskoeffizient [<math>\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}</math>]</b>	<b>Lösungsmittel</b>
<i>GtCPES</i> :PEB	$\epsilon_{600\text{nm}} = 27,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	in LAP
<i>GtCPES_M67A</i> :PEB	$\epsilon_{600\text{nm}} = 29,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	
<i>GtCPES_M67A</i> :PCB	$\epsilon_{640\text{nm}} = 15,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	

### **SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Überprüfung der Genüberexpression in *E. coli* sowie die Überwachung von Proteinreinigungsschritten wurden durch Auftrennung der Proteine in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Bio-Rad) vorgenommen. Die Auftrennung der Proteine wurde hierbei unter denaturierenden Bedingungen mittels einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-

gelelektrophorese (SDS-PAGE) umgesetzt. Handelte es sich um eine Probe (1 ml) aus einer *E. coli*-Zellkultur, so wurde diese zunächst zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min, 5415D, F45-24-11, Eppendorf) und der Überstand verworfen, während das verbleibende Zellpellet weiterverwendet wurde. Aus Zellysat und Fraktionen der Reinigungsschritte wurden Proben entnommen, die direkt eingesetzt wurden. Die zu analysierenden Proben (Lösung oder Zellpellet) wurden mit SDS-Probenpuffer (1x) gemischt (Tabelle 2.23), für 10 min gekocht (95 °C) und zentrifugiert (13.000 rpm, 10 min). Anschließend wurden 12,5%ige SDS-Gele (Tabelle 2.22) mit 10 µl Probe je Tasche (15 Taschen) beladen. Als Proteinstandard dienten PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) oder Unstained Protein Standard Broad Range (NEB). Die Auftrennung erfolgte für etwa 50 min bei 200 V in SDS-Laufpuffer (Rotiphorese® 10x SDS-PAGE, Roth). Im Anschluss wurde das SDS-Gel in Coomassie enthaltende Färbelösung gelegt, 10 min unter Schütteln gefärbt und schließlich wieder entfärbt, wobei die Proteine ihre blaue Färbung beibehielten.

<b>Sammelgelpuffer (4x)</b>		<b>Trenngelpuffer (4x)</b>	
Tris-HCl pH 6,8	1,5 M	Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
SDS	4% (w/v)	SDS	0,4% (w/v)

<b>SDS-Probenpuffer (5x)</b>		<b>Gel-Färbelösung</b>	
SDS	7,5% (w/v)	Essigsäure	10% (v/v)
Glycerin (87%)	30% (v/v)	Ethanol (vergällt)	30% (v/v)
β-Mercaptoethanol	12,5% (v/v)	Coomassie Brilliant Blue G250	0,25% (w/v)
Bromphenolblau in 4x Sammelgelpuffer	1% (w/v)		

<b>Gel-Entfärbelösung</b>	
Essigsäure	10% (v/v)
Ethanol (vergällt)	30% (v/v)

**Tabelle 2.22: Protokoll zur Herstellung von SDS-Gelen.**

<b>Sammelgel (5,25%; 4 Stück)</b>		<b>Trenngel (12,5%; 4 Stück)</b>	
Rotiphorese Gel-30 (30% Acrylamid, 0,3% bis-Acrylamid)	1,4 ml	Rotiphorese Gel-30	6,7 ml
Aqua dest.	4,6 ml	Aqua dest.	5,3 ml
4x Sammelgelpuffer	2 ml	4x Trenngelpuffer	4 ml
10% (w/v) APS	30 µl	10% (w/v) APS	80 µl
TEMED	20 µl	TEMED	8 µl

**Tabelle 2.23: Probenzusammensetzung für die SDS-PAGE.**

	<b>Zellproben</b>	<b>Lysat, Durchlauf, Waschfraktion</b>	<b>Elution</b>	<b>Zn-Blot</b>
<b>Probe</b>	Pellet (OD <sub>578</sub> ~0,5)	5 µl	16 µl	40 µl
<b>SDS-Probenpuffer (5x)</b>	10 µl	10 µl	4 µl	10 µl
<b>Aqua dest.</b>	40 µl	35 µl	---	---
<b>Verdünnung</b>	---	1:10	4:5	4:5

### **Proteindetektion mittels Western-Blot**

Eine Western-Blot Analyse wurde zur immunologischen Detektion von rekombinant produzierten Proteinen angewendet. Dabei wurde es sich zu Nutze gemacht, dass alle innerhalb der vorliegenden Arbeit produzierten Proteine mit einem Affinitäts-*tag* fusioniert waren (His<sub>6</sub>, StrepII), der die Bindung eines spezifischen monoklonalen Antikörpers ermöglichte. Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen dieser sind in Tabelle 2.4 (Kapitel 2.1.2) aufgeführt. Nachdem die zu analysierenden, Protein-enthaltenden Proben mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden, erfolgte ein Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (20 min; 15 V; Semidry-Blot, Bio-Rad). Zuvor wurde die Membran in Methanol aktiviert und anschließend gemeinsam mit dem zugeschnittenen Whatman-Papier sowie dem Protein tragenden SDS-Gel in Towbin-Puffer äquilibriert. Auf den Proteintransfer folgte eine Inkubation der Membran bei RT für 1 h oder alternativ bei 4 °C über Nacht in 10 ml Blockierlösung. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min mit PBS-T-Puffer gewaschen. Für den Nachweis eines StrepII-*tags* wurde die Membran zunächst mit 2 µg/ml Avidin in PBS-T-Puffer für 10 min, dann mit dem Erstantikörper in PBS-T-Puffer für 1 h unter Schütteln inkubiert. Der Erstantikörper lag in diesem Fall bereits mit der Alkalische Phosphatase (AP) konjugiert vor. Für den His<sub>6</sub>-*tag*-Nachweis folgte dem Erstantikörper jedoch ein AP-konjugierter Zweitantikörper. Bevor der Zweitantikörper der Membran hinzugegeben wurde, wurde die Membran nach der Inkubation mit dem Erstantikörper (1 h) erneut dreimal für 5 min mit PBS-T-Puffer gewaschen. Auf die einstündige Inkubation der Membran mit dem AP-konjugierten Antikörper folgten drei Waschschrte mit PBS-T-Puffer sowie drei weitere mit PBS-Puffer für jeweils 5 min. Für die Detektion mit Hilfe der AP wurde die Membran zunächst in 10 ml AP-Puffer äquilibriert. Dieser Puffer lieferte den entsprechenden pH-Wert und die benötigten Magnesium-Ionen für die Aktivität der Alkalischen Phosphatase. Schließlich wurde die chromogene Reaktion durch Zugabe von 33 µl Nitroblau-Tetrazolium (NBT; 100 mg/ml) und

33 µl (50 mg/ml) 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) gestartet. Die gekoppelte Alkalische Phosphatase setzt NBT und BCIP zu einem bläulichen Farbstoff um, wodurch sich die *tag*-fusionierten Proteine auf der Membran detektieren lassen. Durch Zugabe von Wasser wurde die Farbreaktion abschließend gestoppt.

<b>PBS-Puffer (10x)</b>		<b>Towbin-Puffer</b>	
NaCl	1,4 M	Tris-HCl pH 8,3	25 mM
KCl	27 mM	Glycin	192 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 mM		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18 mM		
pH 7,4			
<b>Blockierlösung</b>		<b>PBS-T-Puffer</b>	
Albumin Fraktion V	5% (w/v)	Tween20	0,1% (v/v)
Tween20	0,5% (v/v)	in 1x PBS	
in 1x PBS			
		<b>AP-Puffer</b>	
		Tris-HCl pH 9,5	100 mM
		NaCl	100 mM
		MgCl <sub>2</sub>	5 mM

### 2.4.3 Schmelztemperaturbestimmung (ThermoFluor Assay)

Der *ThermoFluor* Assay – auch bekannt als *Thermal Shift Assay* oder *Differential Scanning Fluorimetry (DSF)* – ist ein schneller, Temperatur basierter Test, der als Alternative zur CD-Spektroskopie (*circular dichroism*) für die Abschätzung der Konformations-Protein-stabilität verwendet wird (Niesen *et al.*, 2007; Boivin *et al.*, 2013). Mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes wird er dazu genutzt, die Schmelztemperaturen und -kurven von Proteinen in verschiedenen Puffern zu bestimmen. Der Farbstoff besitzt dabei die Eigenschaft, in hydrophoben Bereichen zu binden und durch diese Interaktion zu fluoreszieren. Mit Anstieg der Temperatur entfaltet sich das Protein zunehmend, hydrophober Proteinbereiche werden zugänglich und das Resultat ist ein Anstieg der Fluoreszenz. Mit dem *ThermoFluor Assay* lässt sich folglich eine Aussage darüber treffen, ob ein Protein womöglich denaturiert vorliegt. Ein Vorteil dieser Methode ist insbesondere die niedrige Menge an Protein, die benötigt wird. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde eine Proteinmenge (*GtCPES*) von etwa 2 mg ml<sup>-1</sup> verwendet. Um mögliche Schwebeteilchen und aggregiertes Protein aus der Lösung zu entfernen, wurde die ankonzentrierte Proteinlösung zuvor für 10 min bei 4 °C zentrifugiert (13.000 rpm, Z32HK, 12/002, HERMLE). In einem dreifachen Ansatz wurden anschließend 5 µl des Proteins auf ein Gesamtvolumen

von 50 µl mit einer 10-fachen Verdünnung an 100x *SYPRO Orange* (Sigma-Aldrich) direkt in Mikrotiterplatten (Biozym) gemischt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Natriumphosphatpuffer (60 mM, 300 mM NaCl, pH 7,5) verwendet, in dem auch die Aktivitätstests der relevanten Proteine durchgeführt wurden. Die Hinzugabe des Farbstoffes erfolgte zum Schluss unter Ausschluss von Licht und die entsprechenden Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden mit Klebefolie abgedeckt. Die Detektion der temperaturabhängigen Fluoreszenz wurde anschließend mit einem qPCR-Gerät der Firma Bio-Rad (CFX Connect™ Real-Time System) im FRET Messmodus durchgeführt. Die Bestimmung der Schmelztemperatur erfolgte automatisch nach dem Messvorgang mittels der firmeneigenen Software *CFX Maestro*.

**Tabelle 2.24: Schmelzkurven-Temperaturprogramm.**

<b>Reaktionsschritt</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit bis zur Messung</b>
Starttemperatur	10	15 min
Denaturierung	10-95, in 0,5 Schritten	10 s
Abkühlen	12	30 s
Finale Temperatur	12	---

#### **2.4.4 Produktion und Präparation von Phycobilinen**

Um Veränderungen der lichtempfindlichen Phycobiline vorzubeugen, wurden deren Produktion sowie Präparation unter reduzierten Lichtbedingungen durchgeführt. Eine vorausschauende Planung und Vorbereitung aller Schritte sowie zügige Vorgehensweise waren dazu unabdingbar.

##### **Isolierung von Phycobilinen (PCB, PEB) aus *E. coli***

Das in der vorliegenden Arbeit für alle *in vitro* durchgeführten Untersuchungen verwendete PEB wurde in *E. coli* produziert und anschließend gereinigt und isoliert (Overkamp *et al.*, 2014b). Die effiziente Produktion in *E. coli* BL21(DE3) erforderte hinzukommend zu der Koproduktion der Synthesenzyme Ho1 und PebS aus dem Cyanophagen P-SSM2, die zeitgleiche Produktion von His<sub>6</sub>-GtCPES (im pETDuet-Konstrukt) aus *G. theta* (Kapitel 2.4.1, Koproduktion von Phycobiliproteinlyasen und Phycobilinen mit Duet-Vektoren). Die blau gefärbten Zellen wurden anschließend geerntet und aufgeschlossen, der PBP

Lyase:PEB-Komplex mittels Affinitätschromatographie gereinigt und ankonzentriert (Kapitel 2.4.2). Die Sättigung der Säule sowie der gesamte Reinigungsvorgang waren hier deutlich anhand der Färbung zu beobachten und nachzuvollziehen. Bei einer deutlichen Blaufärbung der Durchlauf- oder Waschfraktion wurden diese nochmals auf die Säule gegeben, um die Ausbeute des Komplexes zu optimieren. Das stark blaue Eluat wurde schließlich mit dem 10-fachen Volumen an 0,1% TFA verdünnt. Durch diese Ansäuerung fielen alle verbliebenen Proteine aus und die überstehende Lösung wurde auf C18 Sep-Pak Säulen (Waters) aufgetragen. Die anschließende Probenaufbereitung sowie Qualitätsüberprüfung der Phycobiline mittels HPLC erfolgte wie in Kapitel 2.4.4 (Phycobillinanalyse mittels HPLC) beschrieben. Für die Isolierung von PEB und PCB aus Komplexen mit *GtCPES* Varianten wurde analog vorgegangen. Diese wurden jedoch nur zur Analyse der Komplexe und Identifizierung der darin enthaltenen Isomere verwendet. Das durch Koproduktion mit *wtGtCPES* erhaltene PEB wies bei zügiger Aufarbeitung nahezu ausschließlich das gewünschte *Z*-Isomer auf und konnte daher in dieser Form ohne zusätzliche Aufarbeitung weiterverwendet werden. Eine Lagerung der Proben verschlossen mit Parafilm bei -20 °C auf Silicagel war möglich, jedoch nur für einen geringen Zeitraum (~1 Monat). Existierten aufgrund der Lagerungsdauer Unklarheiten hinsichtlich der Isomierzusammensetzung, wurden die Proben erneut mittels HPLC-Analyse überprüft.

### **Isolierung von PCB aus *Spirulina platensis***

Für die Extraktion von PCB aus *Spirulina platensis* wurden 8 g der getrockneten Zellen (Nahrungsergänzungsmittel *Spirulina California*, Spirulife) in flüssigem Stickstoff gefroren und mittels Mörser sorgfältig zerstoßen. Das erhaltene Pulver wurde in 200 ml Aqua dest. resuspendiert und anschließend für 5 min bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert (SORVALL LYNX 6000, F14, Thermo Fisher). Der blau gefärbte Überstand wurde entnommen und auf Eis gelagert, während das Zellpellet wiederholt in Aqua dest. resuspendiert und zentrifugiert wurde bis der Überstand farblos war. Die Überstände wurden miteinander vereinigt und durch mehrlagige Mullbinden filtriert. Unter Rühren wurde dem auf Eis befindlichen Filtrat schrittweise TCA bis zu einer Endkonzentration von 1% (w/v) zugesetzt. Die Suspension wurde für 1 h bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert und dann zentrifugiert (9000 rpm, 20 min, 4 °C, SORVALL LYNX 6000, F9, Thermo Fisher). Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene blaue Zellpellet in 50 ml MeOH, versetzt mit HgCl<sub>2</sub>

(1 mg/ml), aufgenommen. Unter Verwendung von Glaskugeln wurde das Zellpellet mittels Vortexen fragmentiert und über Nacht in einem Wasserbad bei 45 °C unter dem Abzug inkubiert. Die erhaltene Suspension wurde zentrifugiert (9000 rpm, 10 min, 4 °C) und dem Überstand anschließend  $\beta$ -Mercaptoethanol (1  $\mu$ l/1 ml MeOH) hinzugefügt. Es folgte eine Zentrifugation bei 18.000 rpm für 10 min bei 4 °C (SORVALL LYNX 6000, T29, Thermo Fisher). Der Überstand wurde schließlich mit 0,1% TFA verdünnt (1:10) und auf Sep-Pak Säulen geladen. Die weitere Präparation und Analyse von PCB wird in den folgenden Kapiteln fortgesetzt. Das durch diese Methode erzeugte 3(*E*)-PCB konnte aufgrund seiner Isomerenreinheit ohne weitere Aufreinigung direkt weiterverwendet und in Binde- und Transferassays genutzt werden.

### **Präparation der isolierten Phycobiline**

Die zu einem späteren Zeitpunkt folgende HPLC-Analyse sowie die Verwendung der Phycobiline in Studien setzte zunächst deren Reinigung, Entsalzung und Ankonzentrierung voraus. Dazu wurden Sep-Pak C18 Plus-Säulen (Waters) verwendet, die vor Verwendung zweimal mit den aufgeführten Lösungen aus Tabelle 2.25 gewaschen und damit äquilibriert wurden. Die Phycobilin enthaltenden Lösungen, die es mittels HPLC zu analysieren galt, wurden zunächst mit 0,1% TFA verdünnt (1:10) und im Anschluss auf die vorbereiteten Sep-Pak Säulen geladen. Die beladenen Säulen wurden mit 0,1% TFA gewaschen und die Phycobiline mit Acetonitril von der Säule eluiert bis das Eluat keine Farbe mehr aufwies.

**Tabelle 2.25: Vorbereitung der Sep-Pak C18 Plus-Säulen (Waters).**

	Volumen [ml]
1) Acetonitril	5
2) Aqua dest.	5
3) 0,1% TFA	5
4) 10% MeOH in 0,1% TFA	5
1) bis 4) wiederholen	
-----mit Probe beladen-----	
Waschen mit 0,1% TFA	5

Die Reaktionsgefäße (1,5 oder 2 ml), in denen sich das Eluat befand, wurden in der geräte-eigenen Reaktionsgefäß-Halterung einer Lyophylle (Advance Alpha 2-4 LSCplus freeze dryer, Christ) bei -80 °C eingefroren (>3 h). Danach wurden mit Hilfe einer Kanüle Löcher in die Deckel der Reaktionsgefäße gestochen, bevor diese mitsamt der Halterung in die Lyophylle überführt wurden, in welcher das Acetonitril bei -40 °C und 0,04 mbar verdampfte. Die Reaktionsgefäße mit dem darin enthaltenen Phycobilin-Feststoff wurden mit Parafilm luftdicht verschlossen und bei -20 °C auf Trockenmittel (Silicagel orange) gelagert oder direkt verwendet.

### **Phycobilinanalyse mittels HPLC**

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high liquid performance chromatography*, HPLC) stellt eine analytische Methode zur Auftrennung von Substanzgemischen dar. Diese werden in einem Laufmittel (mobile Phase) über eine Trennsäule geleitet. Dabei resultiert die unterschiedliche Wechselwirkungsstärke der verschiedenen Substanzen mit dem Säulenmaterial (stationäre Phase) in deren Auftrennung.

### **Probenvorbereitung**

Für die HPLC-Analyse wurden die eingetrockneten Phycobiline in einem geringen Volumen (< 10 µl) DMSO resuspendiert. Das gewählte Volumen hing dabei von der erhaltenen Farbintensität der Phycobilin-DMSO-Lösung ab. Von dieser Lösung wurde 1 µl mit 200 µl HPLC-Laufmittel verdünnt. Zur Entfernung von Schwebeteilchen und Verunreinigungen wurde die Probe zudem mit einem PTFE-Filter (Polytetrafluorethylen; 0,2 µm, Phenomenex) filtriert. Anschließend wurde die gesamte Probe in die HPLC injiziert.

<b>HPLC-Laufmittel</b>	
Aceton	50% (v/v)
20 mM Ameisensäure (in Aqua dest.)	50% (v/v)

## **HPLC-Analyse**

Für die HPLC-Analyse der isolierten Phycobiline (PCB, PEB) hinsichtlich ihrer Isomere wurde die HPLC-Anlage 1100 Series von Agilent Technologies in Kombination mit der C<sub>18</sub>-*reversed-phase* Luna 5 $\mu$  C18 Säule (Phenomenex) verwendet. Alle für die HPLC verwendeten Lösungen wurden zuvor filtriert (0,2  $\mu$ m) und für 30 min im Ultraschallbad bei einem locker aufgeschraubten Deckel entgast. Befand sich die Säule nicht im Einsatz, so wurde sie auf Acetonitril gelagert. Vor Verwendung wurde die Säule zunächst mit Aqua dest. gewaschen und daraufhin mit dem Laufmittel äquilibriert. Für die Analyse der Phycobiline wurde die Methode *Biline.M* verwendet, die Flussrate für die Auftrennung der Isomere betrug 0,6 ml/min. Die Laufmittelkonzentration blieb hierbei über die gesamte Messdauer konstant. Die Absorption der Phycobiline wurde bei 380, 560 und 650 nm detektiert. Die verbliebene Probe wurde mit Parafilm luftdicht verschlossen und wiederum unter Lichtausschluss bei -20 °C auf Trockenmittel bis zur Verwendung gelagert.

### **2.4.5 Charakterisierung der Phycobiliproteinlyase-Aktivität**

Für die Charakterisierung der Aktivität von *GtCPES* und ihrer Varianten standen spektroskopische Methoden im Fokus. Eine mögliche Bindung der Phycobiline PEB bzw. PCB durch PBP Lyasen wurde mittels UV/vis-Spektroskopie untersucht. Weiterhin wurde für *wtGtCPES* die Bindungsaffinität zu PEB mit isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) sowie, für einige ausgewählte Varianten von *GtCPES* (Wildtyp, M67A, W75A) zusätzlich Bindungsaffinitäten zu PEB oder auch PCB in einem UV/vis-Spektroskopie-basierten Titrationsexperiment bestimmt.

Die Aktivität von *GtCPES* hinsichtlich der Übertragung von PEB und PCB auf rekombinant produzierte  $\beta$ -Untereinheiten von PBP (*PmCpeB*, *SCpcB*) war mit Hilfe von Fluoreszenzspektroskopie zu beobachten. Die hier aufgeführten spektroskopischen Messungen wurden in Natriumphosphatpuffer (60 mM, 300 mM NaCl, pH 7,5) durchgeführt. Die genannten Methoden werden in den folgenden Abschnitten eingehend beschrieben.

**Bindestudien zur Phycobiliproteinlyase-Phycobilin-Interaktion (UV/vis-Spektroskopie)**

Um die Bindung von Phycobilinen an PBP Lyasen zu untersuchen, wurden mit Hilfe eines Photometers (8453 UV-Visible system, Agilent Technologies) und einer Quarzküvette (SUPRASIL®, 10 mm, Hellma Analytics) Absorptionsspektren in einem Bereich von 250 bis 800 nm detektiert. Da es sich aufgrund der hohen Anzahl an konjugierten Doppelbindungen bei den Phycobilinen um Chromophore handelt, verleihen sie den gebundenen Proteinen (Chromoproteine) spezifische spektroskopische Eigenschaften. Bei der Bindung von Phycobilinen durch PBP Lyasen kommt es in der Regel zu Konformationsänderungen, die wiederum zu einer Veränderung der Absorptionseigenschaften der Phycobiline führen (Kapitel 1.3). Die Bildung eines PBP Lyase:Phycobilin-Komplexes lässt sich somit anhand der Absorption nachvollziehen.

Zunächst wurde ein Absorptionsspektrum des freien Phycobilins (5  $\mu\text{M}$ ) in Puffer aufgenommen und das Phycobilin anschließend mit 20  $\mu\text{M}$  PBP Lyase gemischt. Nach einer Inkubationszeit der Probe von 2 min wurde erneut ein Spektrum aufgenommen und dieses hinsichtlich seiner Absorptionsmaxima und -intensitäten mit dem Ausgangsspektrum verglichen. Für den Vergleich der Intensitäten wurde eine manuelle Hintergrundkorrektur vorgenommen, indem von beiden Spektren der jeweilige Absorptionswert bei 1000 nm subtrahiert wurde.

**Bestimmung der Bindungsaffinität**

Die Interaktion von zwei Bindungspartnern lässt sich durch die Bindungsaffinität beschreiben. Die Bindungsaffinität wird üblicherweise mit der Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_D$ ) angegeben, die zur Beurteilung der Bindungsstärke herangezogen wird. Diese Konstante lässt sich sowohl mit Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) als auch mittels UV/vis-Spektroskopie bestimmen. Da die Bindung von Phycobilinen durch PBP Lyasen aufgrund der chromophoren Eigenschaften der Phycobiline unter Verwendung von UV/vis-Spektroskopie zu verfolgen ist, ließ sich die Bindungsaffinität auch mittels dieser aus einem Titrations-basierten Versuch ermitteln.

### **Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)**

Mit Hilfe der ITC ist es möglich, die Interaktion von Proteinen untereinander oder mit Liganden zu untersuchen (Ladbury und Chowdhry, 1996). Dabei wird es sich zu Nutze gemacht, dass Wechselwirkungen zwischen Bindungspartnern mit Änderungen der Reaktionsenthalpie ( $\Delta H$ ) einhergehen, d.h. Wärme entsteht (exotherme Reaktion) oder entzogen wird (endotherme Reaktion). Die Wärmemenge, die bei der Komplexbildung zwischen Bindungspartnern entsteht, wird bei der ITC durch Änderung der Heizleistung ausgeglichen und detektiert. Mit Hilfe der Heizleistung lässt sich unter anderem die Bindungsaffinität ermitteln, die durch die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  beschrieben wird.

Für die Bestimmung der Bindungsaffinität wurde das Titrationskalorimeter iTC200 (Malvern Instruments) verwendet. Die Messapparatur umfasste eine Referenzzelle und eine Probenzelle, welche beide konstant temperiert wurden. Die Messungen wurden bei 20 °C in LAP durchgeführt. In der Probenzelle wurden 30  $\mu\text{M}$  des Phycobilins (Ligand) 3(Z)-PEB bzw. 3(E)-PCB vorgelegt, zu diesen wurden 300  $\mu\text{M}$  wtGtCPES in 1,7  $\mu\text{l}$ -Schritten hinzutitriert. Da die Phycobiline in DMSO gelöst wurden, bevor diese in LAP verdünnt werden konnten, wurde der PBP Lyase-Verdünnung die gleiche Menge an DMSO (0,94%) hinzugegeben, um Wärmeunterschiede aufgrund unterschiedlicher Pufferzusammensetzungen zu vermeiden. Der Einfluss von Verdünnungseffekten wurde bereits in der Doktorarbeit von Overkamp (2014) durch Kontrollmessungen, bei denen entweder GtCPES oder PEB in LAP titriert wurden, ausgeschlossen. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  wurde mit Hilfe der frei verfügbaren Software-Pakete *NITPIC* und *SEDPHAT* (Keller *et al.*, 2012; Scheuermann und Brautigam, 2015; Brautigam *et al.*, 2016) automatisch berechnet und über zwei Messungen gemittelt.

### **UV/vis-Spektroskopie-basierte Titration**

Zu Beginn des Versuches wurde ein Gesamtansatz jeweils an 3(Z)-PEB und 3(E)-PCB erzeugt, um eine hohe Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen. Dieser wurde mittels HPLC-Messung auf seine Qualität hinsichtlich der Isomierzusammensetzung überprüft. Die untersuchten PBP Lyasen wurden vor Beginn des Versuches frisch gereinigt und ankonzentriert. Daraufhin wurde eine variable Endkonzentration an PBP Lyase (2-15  $\mu\text{M}$ )

zu einer konstanten Konzentration an 10  $\mu\text{M}$  Phycobilin (PEB, PCB) in insgesamt 10 Ansätzen titriert. Das Gesamtvolumen betrug 200  $\mu\text{l}$ . Anschließend wurde nach 2 min Inkubationszeit jeweils ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Als Referenz wurde LAP verwendet. Vor der Messung war es der Spektrenqualität dienlich, die Küvette gründlich von außen mit Kimtech-Papier zu reinigen. Die Messungen wurden jeweils in einem technischen Replikat durchgeführt mit Ausnahme bei einer fehlenden erkennbaren Bindung. In diesem Fall wurde auf die Wiederholung der Messung verzichtet, um die Biline nicht unnötig zu verbrauchen.

Um abschließend den  $K_D$ -Wert berechnen zu können, wurden die Absorptionsdifferenzen ( $\Delta A$ ) der Absorptionsmaxima in Abhängigkeit von der *GtCPES* Konzentration unter Verwendung der Software *Microsoft Excel* aufgetragen. Da bei der Bindung von PEB ein typischer Doppelpeak auftritt, wurde eine Mittelung der Messpunkte für beide Absorptionsmaxima unternommen. Für die Bindung von 3(*E*)-PCB wurde lediglich ein Absorptionsmaximum berücksichtigt. Bei Anwendung der Gleichung (2) sowie der numerischen *Solver*-Funktion von *Excel* konnte der  $K_D$  schließlich ermittelt werden.

$$K_D = \frac{([P_{total}] - [PL]) ([L_{total}] - [PL])}{[PL]} \quad (2)$$

Hier beschreiben  $[P_{total}]$  die Gesamtkonzentration an Protein (*GtCPES*) im Ansatz,  $[L_{total}]$  die des Phycobilins (PEB oder PCB) und  $[PL]$  die Konzentration des gebildeten Komplexes.

### **Phycobilin-Transfer auf Phycobiliprotein- $\beta$ -Untereinheiten (Fluoreszenzspektroskopie)**

Da Holo-PBP fluoreszente Eigenschaften besitzen, lässt sich deren Assemblierung mittels Fluoreszenzspektroskopie verfolgen. Zur Untersuchung der Übertragung von Phycobilinen auf Apo-PBP durch PBP Lyasen wurden Transferreaktionen mit Hilfe eines Aminco Bowman Series 2 Luminescence Spektrometers (Thermo Fisher) bei 975 V und 60% Sensitivität durchgeführt. Für die Fluoreszenzmessungen wurde eine Quartz SUPRASIL®-Küvette (3x3 mm, Hellma Analytics) verwendet. Dabei wurden 5  $\mu\text{M}$  Phycobilin in Lyase-assay-Puffer mit der PBP Lyase im Überschuss (20  $\mu\text{M}$ ) versetzt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 20  $\mu\text{M}$  der Apo-PBP-Untereinheit (*PmCpeB*,

SCpcB) hinzugegeben. Von dem freien Phycobilin, dem PBP Lyase:Phycobilin-Komplex sowie direkt nach Zugabe des Apo-PBPs zu dem Komplex wurden UV/vis- und Fluoreszenz-Emissionsspektren aufgenommen. Die gewählte Anregungswellenlänge hing hierbei von der zu detektierenden Holo-PBP-Untereinheit ab. In Abhängigkeit von der Zeit wurden weitere Emissionsspektren aufgenommen (nach 5, 10, 15, 20, 30, 45 min). Die Gesamtmessdauer betrug regulär 45 min, das Gesamtvolumen 100 µl. Dabei war es wichtig, unnötiges Pipettieren zu vermeiden, um das Probenvolumen nicht deutlich zu dezimieren. Im Anschluss an die Transfermessungen wurde eine Probe für eine SDS-PAGE mit anschließendem Zink-Blot (s. Zink-induzierte Fluoreszenz) entnommen. Die SDS-Proben wurden bei der Probenvorbereitung nicht erhitzt, eine Inkubationszeit von mindestens 10 min jedoch eingehalten. In Tabelle 2.26 sind die Messparameter für die beschriebene Transferreaktion im Überblick dargestellt. Um die Ergebnisse der verschiedenen *GtCPES* Varianten mit dem Wildtyp vergleichen zu können, wurde am Tag der Messung jeweils eine Referenzmessung mit *wtGtCPES* sowie den gleichen Reaktionskomponenten vorgenommen. Da *PmCpeB* nicht für jede Messung frisch gereinigt wurde, ließ sich anhand der Ergebnisse für den Wildtyp zudem abschätzen, ob die Apo-PBP-Untereinheit noch zu verwenden war.

**Tabelle 2.26: Transferreaktion-Messparameter.**

<b>Spannung</b>	975 V	
<b>Sensitivität</b>	60%	
<b>Scanrate</b>	10.00 nm	
<b>Transfer mit</b>	<b>3(Z)-PEB</b>	<b>3(E)-PCB</b>
<b>Anregung</b>	550 nm	600/620 nm
<b>Messbereich</b>	560-750 nm	610/630-800 nm

### **Zink-induzierte Fluoreszenz**

Eine kovalente Bindung zwischen Chromophor und PBP  $\beta$ -Untereinheit lässt sich mit Hilfe eines Zink-Blots nach Berkelman und Lagarias detektieren (Berkelmann und Lagarias, 1986). Bei kovalenter Bindung verbleibt der Chromophor trotz denaturierender SDS-PAGE am Protein und komplexiert die Zink-Ionen, wodurch ein (Zink-induziertes) Fluoreszenzsignal entsteht. Nach erfolgter SDS-PAGE und Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran (Semidry-Blot, Bio-Rad; 15 V, 20 min), wurde die Membran für 1 h

bei 4 °C in einer 1,3 M Zinkacetat-Lösung inkubiert und danach unter UV-Licht (312 nm, Geldokumentationsanlage, Intas) mögliche Fluoreszenzsignale detektiert.

### **Identifikation von Chromopeptiden mittels Massenspektrometrie**

Hinzukommend zum Nachweis der gebildeten, kovalenten Bindung durch Zink-induzierte Fluoreszenz, galt es für einige Proben im Anschluss an die Transferuntersuchungen, die Cysteinposition der kovalenten Bindung mit Hilfe der Massenspektrometrie zu identifizieren. Bei der Massenspektrometrie handelt es sich um eine Methode, die eine hohe Sensitivität und Selektivität aufweist. Deshalb lassen sich bereits geringe Mengen einer Substanz nachweisen. Die Methode benötigt eine Ionenquelle, einen Massenanalysator und einen Detektor. Weiterhin ist die Kopplung mit einer HPLC-Anlage hilfreich, um komplex zusammengesetzte Proben zunächst in ihre Verbindungen aufzutrennen. In diesem Fall wird von einer LC-MS (Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie, *liquid chromatography mass spectrometry*) gesprochen. Die in der Ionenquelle (z.B. Elektrospray-Ionisation, ESI) erzeugten Ionen werden im Massenanalysator durch Anlegen elektromagnetischer Felder nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ) aufgetrennt und mittels eines Detektors erfasst (Gross, 2011). Ist das gewünschte Peptid in der Probe vorhanden, so lässt sich dieses bei Kenntnis der molaren Masse mittels der erhaltenen Spektren identifizieren.

Nach erfolgter Transferreaktion wurden die Reaktionsansätze bis zur Verwendung unter Lichtausschluss auf Eis gelagert und anschließend aus diesen Proben für die SDS-PAGE vorbereitet. Hierfür wurden 40 µl Reaktionslösung mit SDS-Probenpuffer (5x) gemischt. Wie zuvor bei der Probenvorbereitung für die Messung der Zink-induzierten Fluoreszenz, wurden diese Proben ebenfalls nicht gekocht. Für die SDS-PAGE wurden 10 µl der Proben verwendet. Anschließend wurden die Proteine im Gel fixiert, indem das Gel zweimal für 10 min in Fixierlösung inkubiert wurde. Das Gel wurde wiederholt mit Wasser für je 5 min gewaschen und anschließend die Proteine mit kolloidalem Coomassie für mehr als 3 h gefärbt. Das Gel wurde daraufhin für etwa 5 min mit 1% (v/v) Essigsäure entfärbt, da lediglich eine geringe Hintergrundfärbung vorlag. Nach dem Waschen mit Wasser wurden die relevanten Banden auf Höhe der PBP- $\beta$ -Untereinheit ausgeschnitten und für die darauffolgende Massenspektrometrie verwendet. Sowohl der In-Gel-Verdau mit Trypsin als auch die weitere Probenvorbereitung sowie Messung wurden durch Dr. Frederik Sommer

(AG Schroda, Molekulare Biotechnologie und Systembiologie, TU Kaiserslautern) durchgeführt. Die Gelfragmente wurden zerkleinert und jeweils dreimal mit einer 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung gewaschen, dann in 100  $\mu\text{l}$  50% Acetonitril (ACN) inkubiert (15 min). Die Reduktion der Cysteine wurde durch die Inkubation bei 50 °C in 10 mM Dithiothreitol (DTT) und 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  erreicht (30 min). Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Gelfragmente durch die Zugabe von ACN dehydratisiert. Das ACN wurde durch eine 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung mit 55 mM Iodoacetamid ausgetauscht und die Cysteine unter Lichtausschluss alkyliert (25 °C, 30 min). Im dreifachen Wechsel wurden Waschschritte mit 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  und Inkubationen mit ACN (15 min) wie bereits zuvor beschrieben durchgeführt. Für den In-Gel-Verdau der Proteine wurden die Gelstücke schließlich unter Vakuum getrocknet und nach Zugabe von 30  $\mu\text{l}$  25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  und 12,5 ng/ $\mu\text{l}$  Trypsin (Promega, Mannheim) für 30 min auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde anschließend gesammelt, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und später mit zwei Überständen vereint, die bei jeweils einstündiger Inkubation der Gelstücke mit 100  $\mu\text{l}$  50% ACN und 1% Essigsäure erhalten wurden. Im Anschluss an eine Vakuumtrocknung wurden die Peptide nach Rappsilber *et al.* (2003) entsalzen. Hierfür wurden STAGE(*stop and go extraction*)-Tips verwendet, die mit 50  $\mu\text{l}$  Puffer B (80% ACN, 0,5% Essigsäure) äquilibriert wurden. Die Peptide wurden in 50  $\mu\text{l}$  Puffer A (2,5% ACN, 0,5% Essigsäure) gelöst und auf die STAGE-Tips geladen, welche anschließend dreimal mit 50  $\mu\text{l}$  Puffer A gewaschen wurden. In einem letzten Schritt wurden die Peptide zweimal mit 50  $\mu\text{l}$  Puffer B eluiert und wiederum unter Vakuum getrocknet.

Für die anschließenden LC-MS-Messungen wurden die Peptide in 10  $\mu\text{l}$  Puffer A gelöst und 2  $\mu\text{l}$  davon verwendet. Es wurde das ESI-LC-MS-System Triple-TOF 6600 (ABSciex) gekoppelt mit ekspert<sup>TM</sup> nanoLC 425 (eksigent, ABSciex) verwendet. Die Peptide wurden hierbei mittels einer *reversed phase* Säule (Triart C18, 5  $\mu\text{m}$  Partikel, 0,5 mm x 5 mm als Trap-Säule; Triart C18, 3  $\mu\text{m}$  Partikel, 300  $\mu\text{m}$  x 150 mm als Analytik-Säule, YMC) bei einer Flussrate von 0,4  $\mu\text{l}/\text{min}$  und einen HPLC-Gradienten von 2 bis 35% voneinander trennt.

---

<b>Fixierlösung</b>	
EtOH	40% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

---

---

<b>HPLC-Puffer (LC-MS)</b>	
Acetonitril	90% (v/v)
Ameisensäure	0,1% (v/v)

---

---

<b>Kolloidales Coomassie</b>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	80 g
Phosphorsäure	3% (w/v)
Coomassie Brilliant Blue G-250	1 g
MeOH	20% (v/v)

---

### 3 Ergebnisse

Cryptophyten verfügen neben Chlorophyll-enthaltenden Antennenkomplexen zusätzlich über PBP, die für eine effiziente Lichtsammlung eingesetzt werden. Im Gegensatz zu cryptophytischen PBP, sind die PBP der Cyanobakterien deutlich intensiver untersucht. Die Assemblierung der PBP in Cryptophyten war dagegen zu Beginn dieser Arbeit in vielen Bereichen weiterhin unklar. Durch vollständige Sequenzierung der vier Genome der Cryptophyte *G. theta* (Douglas *et al.*, 1999; Archibald, 2007; Gould *et al.*, 2007; Lane *et al.*, 2007; Curtis *et al.*, 2012) ergab sich die Möglichkeit, diese zukünftig genauer zu analysieren. *G. theta* verwendet lediglich das PBP PE545, das mit den Phycobilinen PEB und DHBV chromophoryliert vorliegt. Wie diese Chromophorylierung in Cryptophyten funktioniert, war bisher nicht geklärt, doch unterstützende PBP Lyasen werden für die Chromophorylierung verantwortlich gemacht. Einige putative Vertreter wurden unter anderem bereits im Nukleusgenom identifiziert (Gould *et al.*, 2006b; Gould *et al.*, 2007; Overkamp *et al.*, 2014b). Bei Beginn der vorliegenden Arbeit existierten für die cryptophytische PBP Lyase *GtCPES* bereits eine gelöste Kristallstruktur sowie Voruntersuchungen hinsichtlich der Substratspezifität und einer möglichen Transferaktivität (Overkamp *et al.*, 2014b; Overkamp, 2014). Eingehendere Untersuchungen der *GtCPES*-Bindetasche und der Phycobilinbindung sowie der Substratspezifität standen zu diesem Zeitpunkt noch aus. Des Weiteren war es zuvor nicht möglich, eine Transferaktivität von *GtCPES* experimentell nachzuweisen (Overkamp, 2014). Zwei weitere putative PBP Lyasen (*GtCPCX*, *GtCPEZ*) aus *G. theta* konnten vorab ebenfalls identifiziert, jedoch nicht produziert (*GtCPCX*) oder in löslicher Form gereinigt (*GtCPEZ*) werden, womit weitere Studien nicht durchzuführen waren (Overkamp, 2014; Overkamp *et al.*, 2014b).

#### 3.1 Produktion und Reinigung putativer Phycobiliproteinlyasen aus *G. theta*

Die genaue Funktion der beiden putativen PBP Lyasen *GtCPEZ* und *GtCPCX* aus *G. theta* ist bisher ungeklärt. Es wird jedoch vermutet, dass sie in *G. theta* an der gezielten Chromophorylierung von PE545- $\alpha$ -Cys<sup>18</sup> und PE545- $\beta$ -Cys<sup>50/61</sup> beteiligt sein könnten (Overkamp, 2014). Die biochemische und biophysikalische Untersuchung und Charakterisierung der beiden PBP Lyasen erforderte jedoch zunächst deren erfolgreiche Produktion und Reinigung. Zuvor konnten weder *GtCPCX* noch *GtCPEZ* in löslicher Form durch rekombinante

Genexpression produziert und gereinigt werden (Overkamp, 2014). Dieses Ziel wurde in der vorliegenden Arbeit weiter verfolgt, indem die Original-Gensequenzen aus *G. theta* statt der *E. coli* K12-adaptierten Sequenzen beider Proteine in verschiedene Expressionsvektoren (pASK-IBA45+, pETDuet1) eingebracht wurden. Die Gene beider Proteine befinden sich in *G. theta* im Nukleus lokalisiert. Die Entfernung von Introns der Nukleuskodierten Gene wurde bei der Konstruktion der Expressionsvektoren beachtet. Da PBP Lyasen in *G. theta* ihre Funktion im Plastidstroma ausüben (Gould *et al.*, 2007), macht die Lokalisation beider Gene im Nukleus es notwendig, hinzuzüglich zur Proteinsequenz auch Signal- und Transitpeptidsequenzen für den intrazellulären Transport zu kodieren (Gould *et al.*, 2006a; Gould *et al.*, 2006b). Es wurde sich an den durch Overkamp (Dissertation, 2014) verwendeten Proteinamino-säuresequenzen orientiert. In dieser Arbeit sollten jedoch zusätzlich veröffentlichte native Signalpeptide und Aminosäuresequenzanhänge der PBP Lyasen berücksichtigt werden. Für die rekombinante Produktion in *E. coli* wird keines der beiden Sequenzen regulär benötigt, aber eine mögliche Stabilisierung des Proteins wurde sich hiervon erhofft. Mit Hilfe des *TargetP 1.1 Servers* wurden die in der UniProt (*universal protein database*)-Datenbank veröffentlichten Aminosäuresequenzen beider Proteine (Tabelle 6.1) auf mögliche N-terminale Signal- und Transitpeptide hin überprüft (Bairoch *et al.*, 2004; Emanuelsson *et al.*, 2007) (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1: N-terminale Signal- und Transitpeptide für GtCPCX und GtCPEZ.** Dargestellt sind die veröffentlichten N-terminalen Aminosäuresequenzen. Mit Hilfe des *TargetP 1.1 Servers* wurden mögliche Signalpeptide (SP) und Transitpeptide (TP) vorhergesagt (Emanuelsson *et al.*, 2007). Blau: Signalpeptid; Grün: Sequenzanhang (SA); Unterstrichen: Transitpeptid; Fett: Erkennungssequenz der Schnittstelle (AXAF-Motiv); Pfeil: Relevante Aminosäure für den Plastidimport.

Im Fall von *GtCPEZ* wurde sowohl ein Signalpeptid als auch eine Transitpeptidsequenz für den Transport in den Plastiden vorhergesagt. Das identifizierte Signalpeptid wird be-

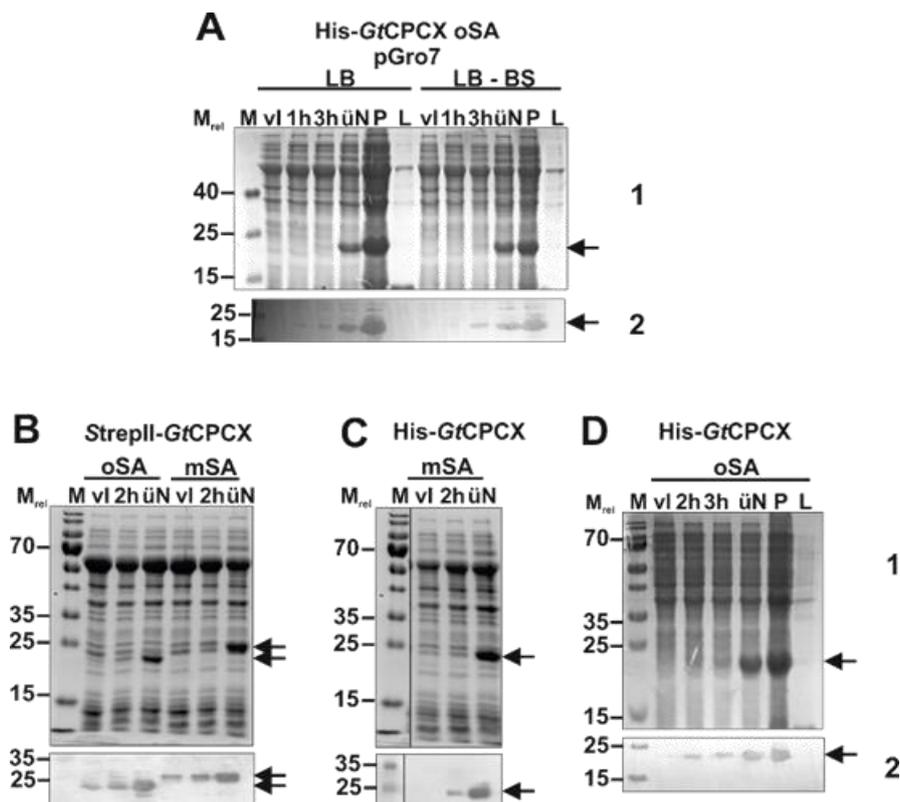
reits in der UniProt-Datenbank aufgeführt. Das AXAF-Motiv bildet die Erkennungssequenz für die Schnittstelle, wobei Phenylalanin an dieser Stelle durch ein Tyrosin ersetzt wurde (Gould *et al.*, 2006a). Dieser Aminosäurerest spielt allerdings eine wichtige Rolle im Organismus, da lediglich aromatische Aminosäuren sowie das sterisch anspruchsvolle Leucin in dieser Position (+1) den Plastidimport erlauben (Gould *et al.*, 2006a; Gruber *et al.*, 2007). Für *GtCPCX* wurde ein N-terminaler Sequenzanhang (SA) veröffentlicht, der womöglich einen Teil eines Transitpeptids beinhaltet.

Aufgrund der Unklarheiten über das mögliche Transitpeptid für *GtCPCX*, wurden mit *gtCPCX* schließlich Konstrukte gefertigt, die sowohl die Produktion des N-terminalen Sequenzanhangs von *GtCPCX* berücksichtigen als auch welche, die es nicht tun. Das Signalpeptid von *GtCPEZ* wurde in jedem Konstrukt berücksichtigt. Die Produktion beider putativer PBP Lyasen wurde unter verschiedenen Bedingungen in *E. coli* BL21(DE3) getestet und die Löslichkeit der Proteine bereits zum Teil überprüft (Tabelle 3.1; Tabelle 3.2). Da es sich für die erfolgreiche Produktion von *GtCPES* als hilfreich herausgestellt hatte (Overkamp *et al.*, 2014b), wurden auch an dieser Stelle zusätzlich Koproduktionen mit dem Chaperonplasmid *pGro7* durchgeführt. Der Chaperonkomplex war auch hier dafür gedacht, die korrekte Faltung der Proteine zu unterstützen.

**Tabelle 3.1: Getestete Produktionsbedingungen für die putative PBP Lyase *GtCPCX*.** Einige Kombinationen wurden nicht untersucht, daher war keine Aussage über die Produktion oder die Löslichkeit des Proteins zu treffen (---). mSA: mit Sequenzanhang; oSA: ohne Sequenzanhang.

Protein	pGro7	Medium	Produziert?	Löslich?
His- <i>GtCPCX</i> _oSA	-	LB	ja	nein
	+	LB	ja	nein
	-	LB-BS	---	---
	+	LB-BS	ja	nein
His- <i>GtCPCX</i> _mSA	-	LB	ja	nicht getestet
	+	LB	---	---
	-	LB-BS	---	---
	+	LB-BS	---	---
StrepII- <i>GtCPCX</i> _oSA	-	LB	---	---
	+	LB	ja	nicht getestet
	-	LB-BS	---	---
	+	LB-BS	---	---
StrepII- <i>GtCPCX</i> _mSA	-	LB	---	---
	+	LB	ja	nicht getestet
	-	LB-BS	---	---
	+	LB-BS	---	---

Mit Hilfe von SDS-PAGE-Gelen der Testproduktionen und der dazugehörigen Western-Blot Analyse ließ sich die Produktion von *GtCPCX* deutlich nachvollziehen (Abbildung 3.2). *GtCPCX* erwies sich unter den durchgeführten Bedingungen unabhängig vom Affinitäts-*tag* und dem vorhandenen Sequenzanhang als produzierbar. Bei Überprüfung der Löslichkeit stellte sich jedoch für His-*GtCPCX* ohne Sequenzanhang heraus, dass dieses bei Testaufschluss in der Pellet-Probe aufzufinden war und damit nicht in löslicher Form vorlag (Abbildung 3.2, A, D). Für die übrigen Konstrukte, Bedingungen und Kombinationen dieser bedarf es weiterer Untersuchungen und Löslichkeitstests.

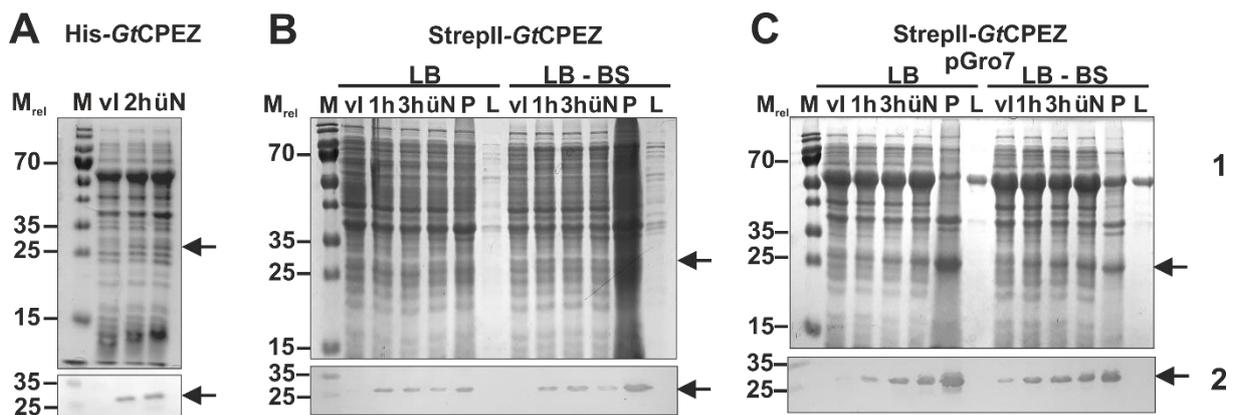


**Abbildung 3.2: SDS-PAGE-Gele und Western-Blots der Testproduktion von *GtCPCX* bei unterschiedlichen Produktionsbedingungen.** Die Testexpression der Gene wurde in *E. coli* BL21(DE3) bei 17 °C über Nacht durchgeführt. Durch Probennahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Induktion (2 h, 3 h, üN) wurde die Produktion nachvollzogen. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt und dann mit Coomassie gefärbt (1) oder auf eine PVDF-Membran für den anschließenden Nachweis mittels Western-Blot (2) transferiert. Für die Detektion des His-*tags* wurden Anti-Penta-His-Antikörper und Anti-Mouse IgG AP-Konjugat, für den StrepII-*tag* Anti-Strep-Tactin-AP-Konjugat verwendet. **A-D.** Für die Produktion wurde LB- (A-D) oder LB-BS-Medium (A) verwendet. **A-C.** Der Chaperonkomplex GroEL-GroES wurde ebenfalls koproduziert. **A, D.** Zusätzlich wurden Proben des Zellpellets und des Lysats nach Testaufschluss genommen. Der Pfeil markiert His- bzw. StrepII-*GtCPCX*. StrepII-*GtCPCX*\_mSA: ~24,5 kDa; StrepII-*GtCPCX*\_oSA: ~23,2 kDa; His-*GtCPCX*\_mSA: ~24,2 kDa; His-*GtCPCX*\_oSA: ~22,8 kDa. M<sub>rel</sub>: Relative Molekülmasse (x1000); M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher); vl: Zellprobe vor der Induktion; nl: Zellprobe nach der Induktion; P: Pellet; L: Lysat; üN: über Nacht; oSA: ohne Sequenzanhang; mSA: mit Sequenzanhang.

**Tabelle 3.2: Getestete Produktionsbedingungen für die putative PBP Lyase *GtCPEZ*.** Einige Kombinationen wurden nicht untersucht, daher war keine Aussage über die Produktion oder die Löslichkeit des Proteins zu treffen (---).

Protein	pGro7	Medium	Produziert?	Löslich?
<i>His-GtCPEZ</i>	-	LB	---	---
	+	LB	ja	nicht getestet
	-	LB-BS	---	---
	+	LB-BS	---	---
<i>StrepII-GtCPEZ</i>	-	LB	ja	nein
	+	LB	ja	nein
	-	LB-BS	ja	nein
	+	LB-BS	ja	nein

Für *GtCPEZ* ergab sich ein ähnliches Bild. Auch diese putative PBP Lyase konnte nachweislich produziert werden, wobei die Produktion für *His-GtCPEZ* bei Koproduktion und *StrepII-GtCPEZ* ohne Koproduktion von pGro7 lediglich anhand der Western-Blots zu erkennen war (Abbildung 3.3, A, B). Damit war sie schwächer als für *StrepII-GtCPEZ* in Kombination mit dem Chaperonkomplex (Abbildung 3.3, C). Es konnte kein Protein in der löslichen Fraktion (Lysat) nach Testaufschluss detektiert werden (Abbildung 3.3, B, C). Auch an dieser Stelle werden weitere Optimierungen der Produktionsbedingungen benötigt.



**Abbildung 3.3: SDS-PAGE-Gele und Western-Blots der Testproduktion von *GtCPEZ* bei unterschiedlichen Produktionsbedingungen.** Die Testexpression der Gene wurde in *E. coli* BL21(DE3) bei 17 °C über Nacht durchgeführt. Durch Probenahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Induktion (2 h, 3 h, ün) wurde die Produktion nachvollzogen. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt und dann mit Coomassie gefärbt (1) oder auf eine PVDF-Membran für den anschließenden Nachweis mittels Western-Blot (2) transferiert. Für die Detektion des *His-tags* wurden Anti-Penta-His-Antikörper und Anti-Mouse IgG AP-Konjugat, für den *StrepII-tag* Anti-Strep-Tactin-AP-Konjugat verwendet. **A-D.** Für die Produktion wurde LB- (A-D) oder LB-BS-Medium (A) verwendet. **A, C.** Der Chaperonkomplex GroEL-GroES wurde ebenfalls koproduziert. Der Pfeil markiert His- bzw. StrepII-*GtCPEZ*. StrepII-*GtCPEZ*: ~28,1 kDa; His-*GtCPEZ*: ~27,8 kDa. M<sub>rel</sub>: Relative Molekülmasse (x1000); M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher); vl: Zellprobe vor der Induktion; nl: Zellprobe nach der Induktion; P: Pellet; L: Lysat; ün: über Nacht.

Um eine Stabilisierung der Proteine durch eine mögliche Komplexbildung mit PEB zu untersuchen, wurden weiterhin erste Testproduktionen zur Koproduktion von StrepII-*GtCPCX* (oSA, mSA), His-*GtCPCX* (oSA) und His-*GtCPEZ* mit PEB durchgeführt. Es ist jedoch anzumerken, dass eine Bindung von PEB durch diese PBP Lyasen bisher nicht gezeigt wurde. Die PBP Lyasen wurden dennoch gemeinsam mit den PEB-Syntheseenzymen Ho1 und PebS in LB bei 17 °C über Nacht koproduziert. Die Zellkulturen und -pellets waren jedoch nicht gefärbt (Daten nicht gezeigt). Eine Wiederholung dieser Koproduktion sowie deren Optimierung stehen noch aus. Eine Testproduktion mit DHBV, durch Koproduktion mit Ho1 und PebA, könnte möglicherweise einen PBP Lyase:DHBV-Komplex hervorbringen und zur Proteinstabilisierung beitragen.

Obwohl sich beide PBP Lyasen produzieren ließen, konnten die Proteine wiederum nicht in löslicher Form erhalten werden. Zukünftig werden damit weitere Optimierungen oder Versuchsstrategien benötigt, damit eine Charakterisierung von *GtCPCX* und *GtCPEZ* letztendlich ermöglicht werden kann.

### 3.2 Untersuchungen zum *GtCPES* vermittelten PEB-Transfer

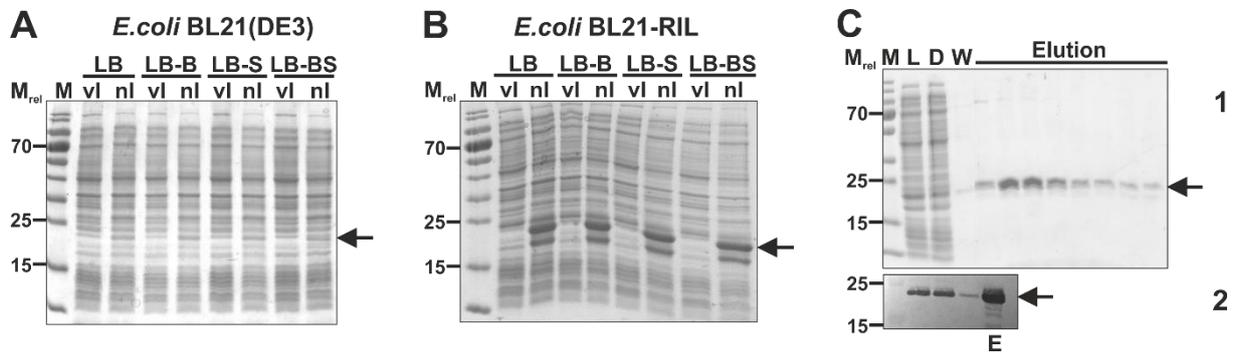
Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde sich eingehender mit der bereits durch Overkamp *et al.* (2014b) charakterisierten S-Typ PBP Lyase *GtCPES* befasst. Genauere Untersuchungen zum PBP Lyase vermittelten 3(Z)-PEB-Transfer auf ein Apo-PBP sowie zu der Substratspezifität von *GtCPES* fehlten bisher gänzlich oder wurden lediglich ansatzweise vorgenommen.

Bei dem für die Übertragung von PEB benötigten Apo-Akzeptorprotein handelt es sich um die  $\beta$ -Untereinheit des PBP, in diesem Fall *GtCpeB* von PE545. Durch die Zuordnung von *GtCPES* zum S-Typ der PBP Lyasen wurde angenommen, dass *GtCPES* für die Anbindung von 3(Z)-PEB an die konservierte Aminosäure Cys<sup>82</sup> verantwortlich ist (Overkamp *et al.*, 2014b). Da es zuvor nicht gelang, *GtCpeB* von PE545 aus *Guillardia theta* in löslicher Form zu produzieren und zu reinigen, konnte kein *GtCPES* vermittelter Transfer von PEB auf diese Untereinheit gezeigt werden (Overkamp, 2014). Die evolutionär bedingte hohe Konservierung der  $\beta$ -Untereinheiten von PBP aus Cyanobakterien und Cryptophyten lieferte jedoch die Möglichkeit, cyanobakterielle Alternativen an PBP-Untereinheiten zu verwenden (Glazer *et al.*, 1985). In der vorliegenden Arbeit wurde *PmCpeB* aus *P. marinus* MED4 verwendet, das eine Sequenzidentität von 37% zum erwähnten *GtCpeB* aus *G. theta* aufweist. *cpeB* kodiert in *P. marinus* MED4 für das einzige strukturelle PBP und verfügt lediglich über das konservierte Cystein an der Position 82 (Steglich *et al.*, 2005). Eine Übertragung von 3(Z)-PEB vermittelt durch *PmCpeS*, ebenfalls aus *P. marinus* MED4, konnte für diese PBP-Untereinheit bereits gezeigt werden (Wiethaus *et al.*, 2010a).

#### 3.2.1 Produktion und Reinigung von *CpeB* aus *Prochlorococcus marinus* MED4

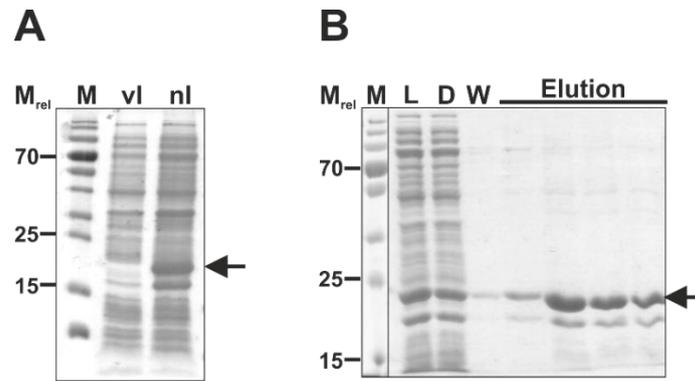
Um die Funktionalität von *GtCPES* hinsichtlich des Transfers von Phycobilinen zu untersuchen, wurde die entsprechende Apo-PBP- $\beta$ -Untereinheit benötigt. Als Alternative für *GtCpeB* wurde *PmCpeB* aus *P. marinus* MED4 verwendet. Zunächst wurde die Produktion von His-*PmCpeB* sowohl mit Hilfe des *E. coli* BL21(DE3)- als auch des *E. coli* BL21-RIL-Stammes bei verschiedenen Medienzusammensetzungen getestet und die Proteinproduktion vor und nach Induktion der Genexpression mit Hilfe einer SDS-PAGE miteinander verglichen (Abbildung 3.4, A, B). Es wurde deutlich, dass His-*PmCpeB* (21,4 kDa) sich in *E. coli* BL21-RIL mit höherer Effizienz produzieren ließ (Abbildung 3.4, B). In *E. coli*

BL21(DE3) war eine Produktion mittels SDS-PAGE kaum nachweisbar. Ein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Medien (LB, LB-BS) konnte nicht beobachtet werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde sich anlässlich der Produktion von CpeB für ein Produktionsmedium mit Sorbitol und Betain in Kombination mit der Produktion in *E. coli* BL21-RIL entschieden, da diese Zusätze einen positiven Effekt auf die Proteinstabilität ausüben können (Back *et al.*, 1979; Arakawa *et al.*, 1985). Die Medienzusammensetzung wich damit von der zuvor von Pauls verwendeten ab (Pauls, Masterarbeit, 2014). Des Weiteren ließ sich *PmCpeB* mittels Affinitätschromatographie erfolgreich reinigen und durch eine Western-Blot Analyse nachweisen (Abbildung 3.4, C). Zur Überprüfung der Proteinstabilität wurde das gereinigte *PmCpeB* mittels Schmelzpunktanalyse untersucht. Bei Auswertung der Schmelzkurven einer Dreifachbestimmung wurde ein stabiler Schmelzpunkt von 50 °C ( $\pm 0,5$ ) erhalten (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.4: SDS-PAGE der Produktionen von His-*PmCpeB* in *E. coli* BL21(DE3) und BL21-RIL bei verschiedenen Medienzusammensetzungen und der Reinigung von His-*PmCpeB*.** A, B. Die Produktion in *E. coli* BL21(DE3) und BL21-RIL fand bei 17 °C über Nacht statt. Bei Bedarf wurden Betain und Sorbitol als Medienzusätze zum LB-Medium verwendet (B, S, BS). C. Nach der Reinigung mit Affinitätschromatographie (1) erfolgte der Nachweis von *PmCpeB* mittels Western-Blot (2). Für die Detektion wurden Anti-Penta-His-Antikörper und Anti-Mouse IgG AP-Konjugat verwendet. Der Pfeil markiert His-*PmCpeB* mit einer Größe von etwa 21,4 kDa. M<sub>rel</sub>: Relative Molekülmasse (x1000); M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher); vI: Zellprobe vor der Induktion; nI: Zellprobe nach der Induktion; L: Lysat; D: Durchlauf; W: Waschfraktion; E: Elutionsfraktion.

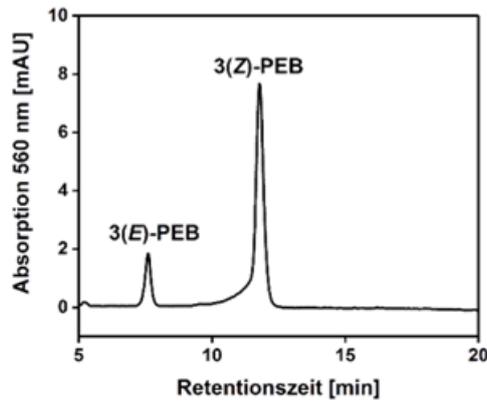
Für weitergehende Untersuchungen zum PEB-Transfer fand zudem eine *PmCpeB* Variante Anwendung, in welcher das konservierte Cystein an Position 82 gegen ein Alanin ausgetauscht wurde (*PmCpeB\_C82A*). Auch die Variante ließ sich analog zum *PmCpeB* Wildtyp erfolgreich in *E. coli* BL21-RIL produzieren und anschließend reinigen (Abbildung 3.5). Auf eine Western-Blot Analyse wurde an dieser Stelle verzichtet.



**Abbildung 3.5: SDS-PAGEs der Produktion und Reinigung von His-*PmCpeB\_C82A*.** **A.** Die Produktion in *E. coli* BL21-RIL fand bei 17 °C über Nacht statt. Als Medienzusätze zum LB-Medium wurden Betain (B) und Sorbitol (S) verwendet. **B.** Die Reinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie gefärbt. Der Pfeil markiert His-*PmCpeB\_C82A* mit einer Größe von etwa 21,4 kDa.  $M_{rel}$ : Relative Molekülmasse (x1000); M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher); vl: Zellprobe vor der Induktion; nl: Zellprobe nach der Induktion; L: Lysat; D: Durchlauf; W: Waschfraktion; E: Elutionsfraktion.

### 3.2.2 Präparation von 3(Z)-PEB mittels Gefriertrocknung

Um die Phycobilinbindung und Aktivität von *GtCPES* und deren Varianten untersuchen zu können, wurde das Phycobilin PEB als Substrat für die spektroskopischen Messungen benötigt. Durch Overkamp *et al.* (2014b) konnte anhand der Koproduktion von PEB-Synthesenzymen (Ho1, PebS) mit *GtCPES* in *E. coli* gezeigt werden, dass die PBP Lyase *in vivo* das Z-Isomer von PEB bindet. Somit sollte dieses Isomer für nachfolgende Binde- und Transferstudien verwendet werden. Bei dem Z-Isomer handelt es sich jedoch um das thermodynamisch instabilere der beiden Isomere (Weller und Gossauer, 1980; Frankenberg und Lagarias, 2003b), was die Herstellung erschwerte. Kommerziell ist das Z-Isomer nicht erhältlich. Bei Reinigung des gesamten durch Koproduktion erzeugten His-*GtCPES*:PEB-Komplexes und anschließender Isolierung von PEB, ließen sich bisher beide Isomere, jedoch mit einem Überschuss an 3(E)-PEB, erzeugen (Overkamp *et al.*, 2014b). Bei Eintrocknung der Phycobiline mittels eines Vakuum-Konzentrators unterlagen diese einem Temperaturanstieg, der die Produktion des thermodynamisch stabileren Produkts und damit des E-Isomers begünstigte. Dadurch wurde es notwendig, beide erhaltenen Isomere in einem weiteren Schritt mittels einer präparativen HPLC voneinander zu trennen, um auch das Z-Isomer verwenden zu können. Da dieser Schritt zu deutlichen Verlusten an PEB führte, war es wünschenswert, diesen zukünftig zu vermeiden.



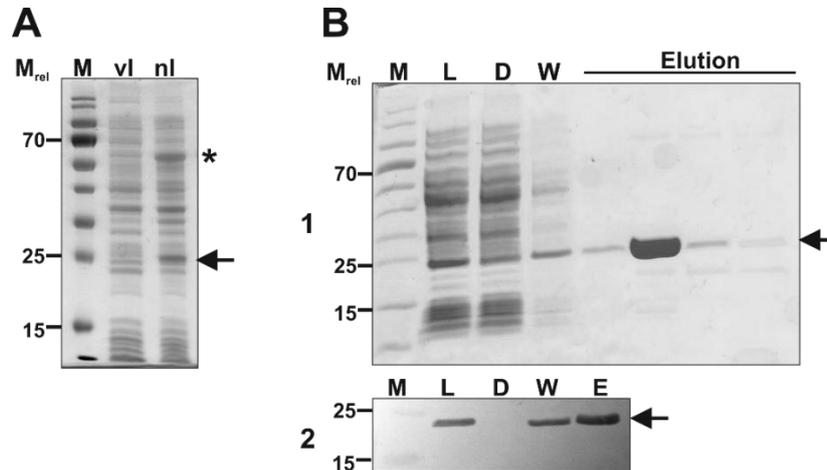
**Abbildung 3.6: HPLC-Profil von PEB gereinigt aus *E. coli* bei 560 nm.** PEB wurde durch Ko-produktion von Ho1 und PebS in *E. coli* BL21(DE3) bei gleichzeitiger Produktion von His-GtCPES produziert. Für die Produktion wurde LB-BS-Medium verwendet. Nach Reinigung des His-GtCPES:PEB-Komplexes mittels Affinitäts-tag wurde dieser Komplex durch Ansäuerung denaturiert (0,1% TFA, 1:10) und PEB mit Hilfe von Sep-Pak Säulen (Waters) isoliert. PEB wurde mittels Gefriertrocknung (Lyophylle) bei -40 °C und 0,04 mbar getrocknet. Für die HPLC-Analyse wurde eine HPLC-Anlage 1100 Series von Agilent Technologies in Kombination mit der C<sub>18</sub>-reversed-phase Luna 5µ C18 Säule (Phenomenex) verwendet. Die Isomere von PEB wurden bei einer Absorption von 560 nm detektiert. Laufmittel: 50% Aceton/ 50% Ameisensäure (20 mM); Flussrate: 0,6 ml/min.

Während der alternativen Gefriertrocknung mittels Lyophylle wurden die Proben des isolierten PEB über die gesamte Trocknung temperiert und unterlagen damit lediglich einer geringen Isomerisierung zu 3(*E*)-PEB. Es wurde ein deutlicher Überschuss an 3(*Z*)-PEB in der Probe detektiert (Abbildung 3.6) und die Probe war damit direkt für die anschließenden Messungen verwendbar. Mögliche Nebeneffekte aufgrund der Verunreinigungen mit 3(*E*)-PEB wurden vernachlässigt. In Abhängigkeit von der Lagerungsdauer wurden die Proben regelmäßig hinsichtlich ihrer Isomerzusammensetzung analysiert, bei Bedarf auch frisches PEB produziert. Lediglich Proben mit deutlichem Überschuss an *Z*-Isomer wurden für Folgemessungen verwendet.

### 3.2.3 Produktion und Reinigung von GtCPES

Zunächst wurde StrepII-GtCPES der Literatur entsprechend in *E. coli* BL21(DE3) bei gleichzeitiger Produktion des Chaperonprotein-Komplexes GroEL-GroES bei 17 °C über Nacht produziert (Abbildung 3.7, A) (Overkamp *et al.*, 2014b). Der genannte Komplex unterstützt die korrekte Faltung und damit Löslichkeit und Aktivität des gewünschten Proteins (Thomas und Baneyx, 1996). Dem Medium wurden außerdem Sorbitol und Betain

hinzugefügt, welche die Produktion der nativen Form des Proteins unterstützen sollten (Back *et al.*, 1979; Arakawa und Timasheff, 1985). StrepII-*GtCPES* (21,6 kDa) ließ sich unter diesen Bedingungen erfolgreich produzieren (Abbildung 3.7, A) und anschließend mittels Affinitätschromatographie in löslicher Form reinigen (Abbildung 3.7, B1). Zudem konnte StrepII-*GtCPES* mittels Durchführung einer Western-Blot Analyse deutlich in den relevanten Proben (Lysat, Elution) während der Reinigung nachgewiesen werden (Abbildung 3.7, B2). Anteilig wurde es auch in der Waschfraktion detektiert.

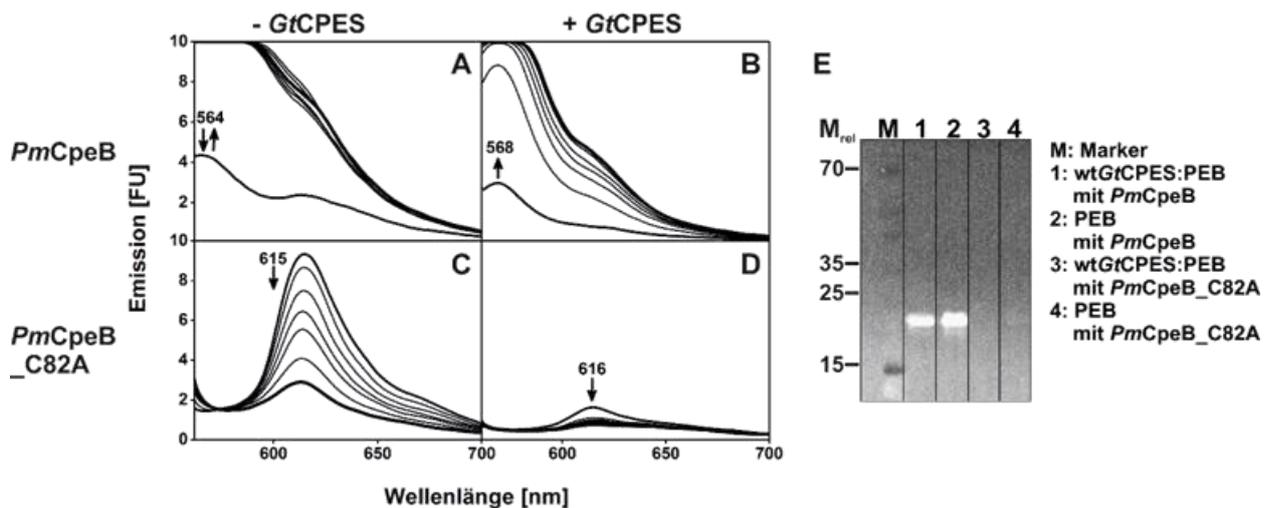


**Abbildung 3.7: SDS-PAGE der Produktion und Reinigung von StrepII-*GtCPES* und Nachweis mittels Western-Blot.** Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie gefärbt oder auf eine PVDF-Membran für die anschließende Western-Blot Analyse transferiert. **A.** Die Produktion von StrepII-*GtCPES* wurde in *E. coli* BL21(DE3) unter Koexpression mit dem Chaperonplasmid pGro7 bei 17 °C über Nacht durchgeführt. Es wurde LB-BS-Medium verwendet. **B.** Nach der Reinigung mittels Affinitätschromatographie (1) erfolgte der Nachweis von *GtCPES* mittels Western-Blot (2). Für die Detektion wurde Anti-Strep-Tactin-AP-Konjugat verwendet. Der Pfeil markiert StrepII-*GtCPES* mit einer berechneten Größe von etwa 21,6 kDa. Der Stern markiert die Position des Chaperonproteins GroEL (~60 kDa). *M<sub>rel</sub>*: Relative Molekülmasse (x1000); M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher); vl: Zellprobe vor der Induktion; nl: Zellprobe nach der Induktion; L: Lysat; D: Durchlauf; W: Waschfraktion; E: Elutionsfraktion.

### 3.2.4 *GtCPES* unterstützt den PEB-Transfer auf Cys<sup>82</sup> der Phycobiliprotein $\beta$ -Untereinheit (*PmCpeB*)

Nach der *in vitro* Bindung von 3(*Z*)-PEB durch *GtCPES*, die bereits durch Overkamp *et al.* (2014b) gezeigt werden konnte, wurde die anschließende Übertragung von PEB auf das Cys<sup>82</sup> von *PmCpeB* untersucht. Da chromophorylierte PBP und deren Untereinheiten fluoreszieren, ließ sich die Phycobilinübertragung mittels Fluoreszenzspektroskopie verfolgen. Direkt zum freien 3(*Z*)-PEB oder nach einer Inkubation des *GtCPES*:PEB-Komplexes für 5 min wurde die PBP-Untereinheit hinzugefügt. Fluoreszenzspektren wurden nach 1,

5, 10, 15, 20, 30 und 45 min detektiert (Abbildung 3.8). Zum Vergleich wurde die Messung sowohl für *PmCpeB* als auch für *PmCpeB\_C82A* durchgeführt, bei der das relevante Cys<sup>82</sup> in Alanin ausgetauscht wurde. Die Kovalenz der gebildeten Phycobilin-PBP-Thioetherbindungen wurde anschließend anhand Zink-induzierter Fluoreszenz nachvollzogen (Kapitel 2.4.5). Die Komplexierung von Zink-Ionen durch Tetrapyrrole ist auf einem Zink-Blot als fluoreszente Bande unter UV-Licht sichtbar. Einen weiteren Nachweis für die gebildete kovalente Bindung sollte die Identifikation von Chromopeptiden mit Hilfe der Massenspektrometrie liefern (Kapitel 2.4.5).

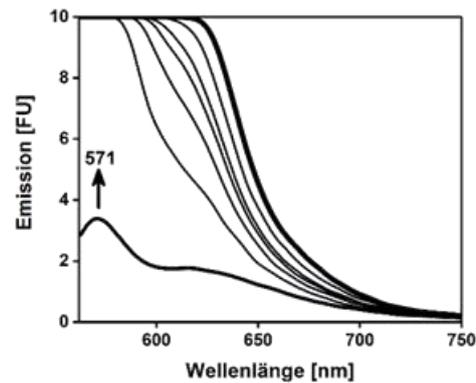


**Abbildung 3.8: Fluoreszenzspektren der zeitabhängigen Übertragung von 3(Z)-PEB auf *PmCpeB* und *PmCpeB\_C82A* bei An- und Abwesenheit von *GtCPES* und Zink-Blot als Nachweis der geformten, kovalenten Bindung.** A-D. Für die Messung wurden 5  $\mu$ M freies 3(Z)-PEB bei Bedarf zunächst mit 20  $\mu$ M *GtCPES* versetzt, ansonsten wurden direkt 20  $\mu$ M *PmCpeB* oder *PmCpeB\_C82A* hinzugegeben. Nach 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 min wurden Fluoreszenzspektren detektiert. Das Spektrum nach 45 min ist in Fett hervorgehoben. Die Anregungswellenlänge war 550 nm. A. 3(Z)-PEB mit *PmCpeB*. B. 3(Z)-PEB mit *GtCPES* und *PmCpeB*. C. 3(Z)-PEB mit *PmCpeB\_C82A*. D. 3(Z)-PEB mit *GtCPES* und *PmCpeB\_C82A*. E. Der Nachweis der kovalenten Bindung erfolgte mittels Zink-induzierter Fluoreszenz anhand eines Zink-Blots. Dieser wurde unter UV-Licht (312 nm) analysiert.  $M_{rel}$ : Relative Molekülmasse (x1000).

Sowohl in Gegenwart als auch Abwesenheit der PBP Lyase wurde eine deutliche Fluoreszenzemission beobachtet (Abbildung 3.8, A, B). Die Emissionsintensität stieg jedoch im Beisein von *GtCPES* kontinuierlich über die Messdauer an (Abbildung 3.8, B), wohingegen sie ohne PBP Lyase direkt nach 5 min eine starke, aber über die Messdauer schwankende Intensität aufwies (Abbildung 3.8, A). Auch die Emissionsmaxima unterschieden sich. Für das Produkt der unvermittelten Reaktion wurde ein Emissionsmaximum von 564 nm, für die *GtCPES*-vermittelte Übertragung eines von 568 nm detektiert. In beiden Fällen wurde

ein Fluoreszenzsignal auf dem Zink-Blot in Höhe der entsprechenden Größe von *PmCpeB* (21,4 kDa) detektiert (Abbildung 3.8, E). Dieses Signal deutete auf eine gebildete kovalente Bindung zwischen Chromophor und PBP hin. Es war also davon auszugehen, dass eine PEB-Chromophorilierung von *PmCpeB* auch unvermittelt ohne *GtCPES* in Form einer spontanen Anbindung stattfindet. Da das hierbei erhaltene Emissionsmaximum mit 565 nm jedoch von dem der Holo-PBP- $\beta$ -Untereinheit abwich (569 nm; Wiethaus *et al.*, 2010a), wurde vermutet, dass bei der spontanen Chromophorilierung eine heterogene Produktbildung hinsichtlich der Isomerie auftrat (Arciero *et al.*, 1988a; Fairchild und Glazer, 1994a). Das Maximum des Produkts der durch *GtCPES* unterstützten Übertragung entsprach hingegen nahezu dem Literaturwert für Cys<sup>82</sup>-PEB-chromophoriliertes Holo-*PmCpeB* (569 nm; Steglich *et al.*, 2005; Wiethaus *et al.*, 2010a), wodurch auf eine erfolgreiche Übertragung von PEB vermittelt durch *GtCPES* geschlossen werden konnte. Für den innerhalb einer Koproduktion von *GtCPES*, Ho1 und *PebS* *in vivo* erzeugten *GtCPES*:PEB-Komplex (Overkamp, 2014) konnte ebenfalls eine PBP Lyase vermittelte PEB-Übertragung auf *PmCpeB* gezeigt werden (Abbildung 3.9). Das Emissionsmaximum lag hier bei 571 nm. Dennoch konnten mit Hilfe der Massenspektrometrie im Anschluss an die Übertragungsreaktionen keine entsprechenden Chromopetide des Übertragungsproduktes (Holo-*PmCpeB*) identifiziert werden. Dies galt sowohl für das Übertragungsprodukt, das bei Verwendung des *in vivo* erzeugten *GtCPES*:PEB-Komplexes gebildet wurde, als auch für das mit Hilfe des *in vitro* Komplexes gebildete Holo-*PmCpeB*.

Bei Verwendung von *PmCpeB\_C82A* innerhalb der Transferreaktion wurde eine sinkende Fluoreszenzemission mit einem Maximum bei 615 nm für die Reaktion ohne *GtCPES* (Abbildung 3.8, C), bei voriger *GtCPES*:PEB-Komplexbildung lediglich eine geringe, ebenfalls sinkende Emission mit ähnlichem Emissionsmaximum (616 nm) gemessen (Abbildung 3.8, D). Eine Übertragung von 3(*Z*)-PEB auf diese Untereinheit wurde anhand der sinkenden Emissionen und der fehlenden Fluoreszenzsignale im Zink-Blot ausgeschlossen (Abbildung 3.8, E). Diese Beobachtung gab einen weiteren Hinweis darauf, dass *GtCPES* den gezielten Transfer von 3(*Z*)-PEB auf das konservierte Cys<sup>82</sup> von *PmCpeB* vermittelt.

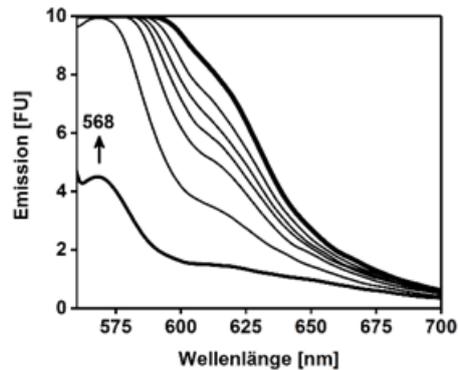


**Abbildung 3.9: Fluoreszenzspektrum der durch *GtCPES*:PEB vermittelten PEB-Übertragung auf *PmCpeB*.** Für die Messung wurden  $34,8 \mu\text{M}$  des *in vivo* in *E. coli* produzierten und gereinigten *GtCPES*:PEB-Komplexes mit  $20 \mu\text{M}$  *PmCpeB* verwendet. Die Fluoreszenzspektren wurden nach 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 min Reaktionsdauer aufgenommen. Die Spektren nach 1 min und 45 min sind in Fett hervorgehoben. Der zeitabhängige Emissionsverlauf und das Emissionsmaximum (in nm) sind angegeben. Die Anregungswellenlänge betrug 550 nm.

### 3.2.5 Disulfidbrücke zwischen den *GtCPES*-Monomeren besitzt keinen Einfluss auf die Transferaktivität

Bei *GtCPES* handelt es sich um ein Homodimer. Anhand der Kristallstruktur ist zu erkennen, dass die beiden Monomere über eine Disulfidbrücke miteinander assoziiert sind (Overkamp *et al.*, 2014b). Um herauszufinden, ob die Disulfidbrücke einen Einfluss auf die Transferaktivität hinsichtlich der Übertragung von PEB ausübt, wurde das an der Ausbildung der Disulfidbrücke beteiligte Cys<sup>149</sup> innerhalb einer Proteinvariante durch Alanin ersetzt. Anhand von Gelfiltrationsversuchen unter reduzierenden Bedingungen sowie mit Hilfe der Proteinvariante *GtCPES\_C149A* konnte zuvor bereits gezeigt werden, dass die Disulfidbrücke keinen Einfluss auf die Dimerisierung und das PEB-Bindevverhalten von *GtCPES* besitzt (Overkamp *et al.*, 2014b). Der Einfluss der Disulfidbrücke auf die Transferaktivität von *GtCPES* wurde analysiert, indem der durch *GtCPES\_C149A* vermittelte Transfer von 3(*Z*)-PEB auf *PmCpeB* überprüft wurde (Abbildung 3.10). Das Absorptionsspektrum der Bindung von PEB war vergleichbar zu dem des *GtCPES* Wildtyps, die Absorptionsmaximalagen bei 555 nm und 597 nm (Daten nicht gezeigt). Auch die Fluoreszenzspektren zeigten einen kontinuierlichen Emissionsanstieg in Abhängigkeit von der Messdauer mit einem Absorptionsmaximum von 568 nm, und damit die Bildung des gewünschten Produktes (Abbildung 3.10). Somit fand trotz des Aminosäureaustausches ein

vermittelter Transfer von 3(*Z*)-PEB auf *PmCpeB* statt. Der Aminosäureaustausch übte damit weder auf die PEB-Bindung noch den Transfer einen nachweisbaren Einfluss aus. *GtCPES\_C149A* wies jedoch lediglich einen Schmelzpunkt von 47 °C auf. Mit einer Abweichung des Schmelzpunktes um 9 °C von dem Schmelzpunkt des Wildtyps war die Proteinvariante deutlich temperaturinstabiler. Somit wird davon ausgegangen, dass die Disulfidbrücke für die Stabilität der *GtCPES*-Struktur von Bedeutung ist.



**Abbildung 3.10: Fluoreszenzspektrum der durch *GtCPES\_C149A* vermittelten PEB-Übertragung auf *PmCpeB*.** Für die Messung wurden 5 µM freies 3(*Z*)-PEB zunächst mit 20 µM *GtCPES\_C149A* versetzt, dann wurden 20 µM *PmCpeB* hinzugegeben. Fluoreszenzspektren wurden nach 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 min Reaktionsdauer aufgenommen. Die Spektren nach 1 min und 45 min sind in Fett hervorgehoben. Das angegebene Emissionsmaximum (in nm) wurde nach 45 min Reaktionsdauer und im Anschluss an eine Verdünnung der Reaktionsprobe erhalten. Die Anregungswellenlänge betrug 550 nm.

### 3.3 Charakterisierung der *GtCPES*-Struktur: Identifizierung bindungs- und transferrelevanter Aminosäurereste

*GtCPES* besitzt eine hohe Substratspezifität und ist in der Lage, sowohl PEB als auch DHBV zu binden. Es wird jedoch lediglich PEB durch *GtCPES* übertragen. Erste Untersuchungen zur Identifizierung möglicher, an der Bindung von PEB beteiligter Aminosäuren wurden bereits durchgeführt (Overkamp, 2014; Overkamp *et al.*, 2014b). Hierfür wurde unter anderem die Kristallstruktur von StrepII-*GtCPES* herangezogen, die eine innenliegende Ligandenbindetasche mit einem Molekül 1,6-Hexandiol darin offenbart, das wahrscheinlich aus der Kristallisationslösung stammt.



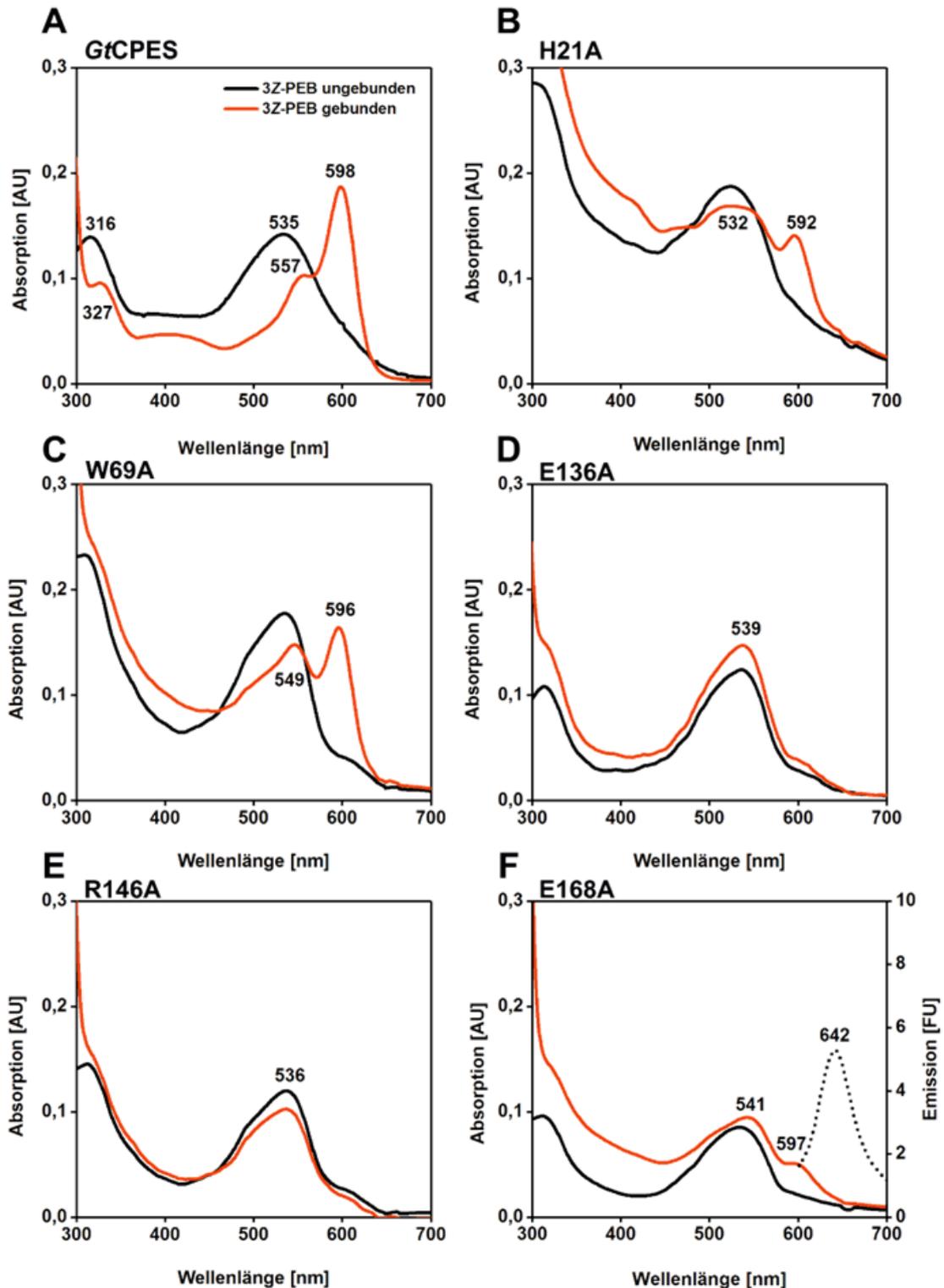
In der Publikation von Overkamp *et al.* (2014b) wurde zudem ein ausführlicher Sequenzvergleich mit verschiedenen S-Typ-PBP Lyasen aus Cyanobakterien (*P. marinus* MED4; *Fremyella diplosiphon*, *Nostoc* sp. PCC7120, *T. elongatus*) vorgenommen (Abbildung 3.11). Der Vergleich diente auch dazu, mögliche transferrelevante Aminosäuren zu identifizieren. Unter den konservierten Aminosäuren der verschiedenen S-Typ PBP Lyasen befinden sich insbesondere Histidin-, Arginin- und Tryptophanreste, für die partiell bereits Funktionen hinsichtlich der Tetrapyrrolbindung und des Transfers postuliert wurden (Kupka *et al.*, 2009; Kronfel *et al.*, 2013). Mit Hilfe der Struktur und des Sequenzvergleiches wurden schließlich mehrere Aminosäuren in *GtCPES* ausgewählt (Arg<sup>18</sup>, His<sup>21</sup>, Asn<sup>22</sup>, Trp<sup>69</sup>, Trp<sup>75</sup>, Glu<sup>136</sup>, Arg<sup>146</sup>, Arg<sup>148</sup>, Ser<sup>150</sup>, Glu<sup>168</sup>), die womöglich eine Rolle bei der PEB-Bindung oder auch den Transfer einnehmen. Mittels Zielgerichteter Mutagenese wurden diese in Alanin getauscht und die erzeugten *GtCPES* Varianten hinsichtlich ihrer PEB-Binde- und Übertragungsfähigkeit untersucht.

### 3.3.1 Produktion und Reinigung der *GtCPES* Varianten

Die mittels Zielgerichteter Mutagenese erzeugten Varianten von *GtCPES* (R18A, H21A, N22A, W69A, W75A, E136A, R146A, R148A, S150A, E168A) ließen sich analog zu *wtGtCPES* produzieren und reinigen (Kapitel 3.2.3; Abbildung 6.1; Abbildung 6.2). Die jeweils produzierte Variante war jedoch anhand der SDS-PAGE der Produktion nicht in jedem Fall deutlich erkennbar. An dieser Stelle lieferte die SDS-PAGE des Reinigungsprozesses eine Aussage über den Erfolg der Produktion (Abbildung 6.2; Kapitel 6.2.1).

### 3.3.2 Identifizierung relevanter Aminosäuren für die PEB-Bindung

Die Varianten von *GtCPES* wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit 3(*Z*)-PEB zu binden innerhalb von Bindestudien mittels UV/vis-Spektroskopie untersucht (Kapitel 2.4.5). Hierbei wurde das freie Phycobilin (5 µM) vorgelegt und das Absorptionsspektrum von diesem mit dem Spektrum nach Zugabe von *GtCPES* oder dessen Varianten (20 µM) verglichen (Abbildung 3.12).



**Abbildung 3.12: Absorptionsspektren der 3(Z)-PEB-Bindung durch StrepII-GtCPES Wildtyp und Varianten. A-F.** Absorptionsspektren von ungebundenem 3(Z)-PEB (5  $\mu$ M; schwarz) im Vergleich zum Absorptionsspektrum nach Zugabe von StrepII-GtCPES oder der jeweiligen GtCPES Variante im Überschuss (20  $\mu$ M; rot). Gezeigt werden jeweils die hinsichtlich ihres Hintergrundes korrigierten Absorptionsspektren. Die Absorptionsmaxima sind angegeben (in nm). **F.** Neben dem Absorptionsspektrum ist beispielhaft das Emissionsspektrum des GtCPES\_E168A:PEB-Komplexes dargestellt (gepunktete Linie). Das Emissionsmaximum ist gezeigt (in nm).

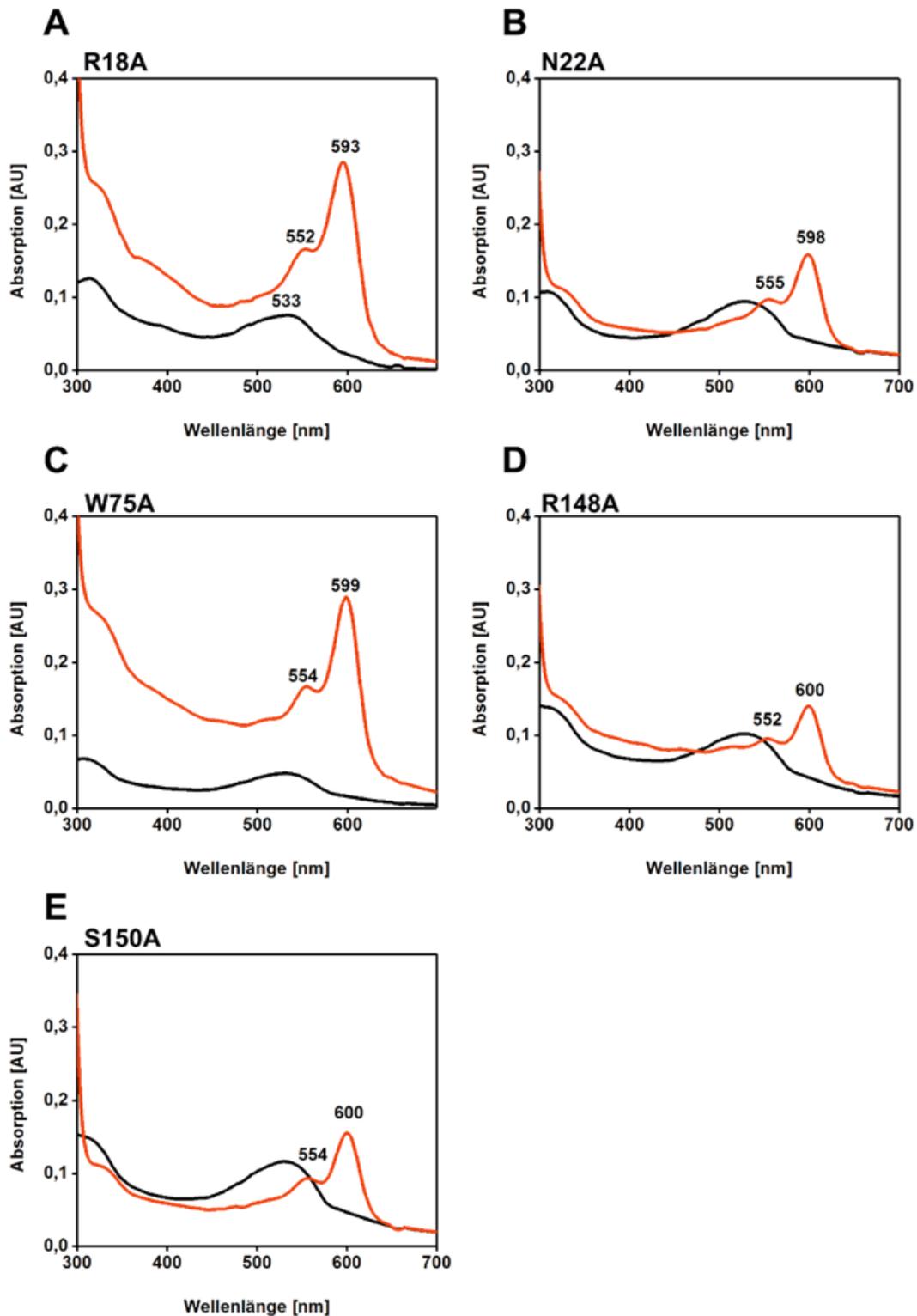
Das Absorptionsspektrum des selbst produzierten und gereinigten, freien 3(Z)-PEB wies zwei Absorptionsmaxima auf (316 nm, 535 nm), die auf die bewegliche, helikale Form von PEB in Lösung hindeuten (Abbildung 3.12, A) (Krois und Lehner, 1993). Abweichungen im Erscheinungsbild der Absorptionsspektren von freiem 3(Z)-PEB können unter anderem auf Verunreinigungen der PEB-Probe zurückzuführen sein. Mittels HPLC-Analyse wurden die Proben vor Verwendung auf ihren Gehalt an 3(Z)-PEB hin überprüft, geringe Konzentrationen des *E*-Isomers in der Probe wurden jedoch toleriert. Des Weiteren erwies es sich als problematisch, das in DMSO gelöste, hydrophobe Phycobilin zu pipettieren. Hierdurch kam es trotz einer Dreifachbestimmung der Bilinkonzentration unter Anwendung von Verdünnungsreihen zu deutlichen Abweichungen. Eine genaue Konzentrationsbestimmung der Phycobiline erwies sich damit insgesamt als schwierig.

Die Bindung von 3(Z)-PEB durch den *GtCPES* Wildtyp führte zu einer Verschiebung der Absorptionsmaxima zu höheren, energieärmeren Wellenlängen (Abbildung 3.12, A) und somit zu einer Rotverschiebung (bathochromer Effekt). Es bildeten sich zwei bathochrome Maxima (557 nm, 598 nm), wobei das längerwellige Absorptionsmaximum von beiden einen Extinktionsanstieg im Vergleich zum Spektrum von freiem PEB zeigte. Diese Beobachtungen resultierten aus der Änderung der Absorptionseigenschaften basierend auf der Konformationsänderung von PEB, die mit der Bindung in der hydrophoben Bindetasche einherging. Hierbei nimmt PEB bei Betrachtung der Struktur und Bindetasche (Abbildung 3.11, B) vermutlich eine eher gestreckte Konformation ein, wobei auch das ausgeprägte  $\pi$ -Elektronensystem von PEB der Streckung unterliegt (Overkamp *et al.*, 2014b).

Die Absorptionsspektren von fünf der insgesamt zehn *GtCPES* Varianten wichen nach Zugabe zu 3(Z)-PEB deutlich von dem Bindungsspektrum des Wildtyps ab (Abbildung 3.12). Während die Varianten *GtCPES\_H21A*, *GtCPES\_W69A* und *GtCPES\_E168A* noch Doppelmaxima zeigten (Abbildung 3.12, B, C, F), wiesen die Absorptionsspektren von *GtCPES\_E136A* und *GtCPES\_R146A* hingegen keine Veränderungen im relevanten Absorptionsbereich bei einem Vergleich mit dem Spektrum von freiem PEB auf. Sie zeigten damit keine Bindung von PEB (Abbildung 3.12, D, E). Bei der Bindung von PEB durch *GtCPES\_E168A* war weiterhin deutlich das Spektrum von freiem PEB hintergründig im Bindungsspektrum zu erkennen, wodurch der Absorptionspeak eine Schulter zeigte (Abbildung 3.12, F). Eine verringerte Rotverschiebung des Maximums ging hiermit einher. Dies ließ vermuten, dass trotz PBP Lyase-Überschuss und erfolgter Bindung weiterhin

freies PEB in der Lösung vorlag. Zur Verifizierung der Beobachtungen für *GtCPES\_E136A* und *GtCPES\_E168A* wurden zusätzliche Proteinvarianten erzeugt, bei denen die entsprechende Aminosäure mit einer Aminosäure ähnlicher Eigenschaft ausgetauscht wurde. Hierbei wurde Glutamat gegen Aspartat ausgetauscht, da diese Aminosäure ebenfalls saure Eigenschaften aufweist. *GtCPES\_E136D* und *GtCPES\_E168D* zeigten ein vergleichbares Bindungsverhalten *in vitro* wie die Alaninvarianten (Daten nicht gezeigt). Das veränderte Bindungsverhalten der beiden Varianten *GtCPES\_E136A* und *GtCPES\_E168A* basierte damit nicht auf der vergrößerten Bindetasche durch den Aminosäureaustausch zu der kleinen Aminosäure Alanin, sondern aus dem Fehlen der entsprechenden Aminosäure. Im Fall der Varianten *GtCPES\_H21A* und *GtCPES\_W69A* wurde ebenfalls die Vermutung angestellt, dass weiterhin frei vorliegendes PEB vorhanden war. Der erwartete bathochrome Effekt fiel hier schwächer aus (Abbildung 3.12, B, C). Die im längerwelligen Bereich befindlichen Absorptionsmaxima zeigten außerdem bei diesen beiden Bindungsspektren sowie für *GtCPES\_E168A* keinen deutlichen bindungsbedingten Extinktionsanstieg im Vergleich mit der PEB-Bindung durch den Wildtyp. Mit Ausnahme für *GtCPES\_W69A* stellte das längerwellige Maximum auch das Maximum mit geringerer Extinktion dar. Bei der Bindung durch *GtCPES\_W69A* zeigte das Absorptionsmaximum eine geringfügig höhere Extinktion bei direktem Vergleich mit dem kürzerwelligen Maximum des Doppelpeaks (Abbildung 3.12, C).

Nach Zugabe der PBP Lyase zu 3(*Z*)-PEB konnte für die hinsichtlich der PEB-Bindung auffällig gewordenen Varianten zudem eine Fluoreszenzemission detektiert werden (Tabelle 3.3). Die jeweiligen Emissionsmaxima lagen zwischen 637 nm und 642 nm. Aufgrund der Vergleichbarkeit der Spektren und Maxima wird lediglich das Emissionsspektrum für *GtCPES\_E168A* exemplarisch dargestellt (Abbildung 3.12, F). Der *GtCPES* Wildtyp wies hingegen keine Fluoreszenz im Komplex mit 3(*Z*)-PEB auf. Bereits fluoreszente Komplexe zwischen PBP Lyase und Phycobilin könnten die anschließenden Transferuntersuchungen mittels Fluoreszenzspektroskopie aufgrund von Überlagerungen behindern und die Interpretation der Ergebnisse erschweren.



**Abbildung 3.13: Absorptionsspektren der 3(Z)-PEB-Bindung durch StrepII-GtCPES Varianten.** A-E. Absorptionsspektren von ungebundenem 3(Z)-PEB (5 µM; schwarz) im Vergleich zum Absorptionsspektrum nach Zugabe der jeweiligen GtCPES Variante im Überschuss (20 µM; rot). Dargestellt werden jeweils die hinsichtlich ihres Hintergrundes korrigierten Absorptionsspektren. Die Absorptionsmaxima sind angegeben (in nm).

Für die übrigen Varianten wurden Bindespektren ähnlich zu dem Bindungsspektrum des Wildtyps detektiert, sowohl hinsichtlich der Lage der Absorptionsmaxima als auch der Ausbildung der Doppelmaxima (Abbildung 3.13). Im Komplex mit 3(Z)-PEB wurde, vergleichbar zu wt*GtCPES*, ebenfalls keine Fluoreszenz beobachtet. Auffällig ist dennoch, dass für *GtCPES\_R18A* und *GtCPES\_W75A* deutliche Lichtstreuungseffekte auftraten (Abbildung 3.13, A, C). Bei Betrachtung der Intensitäten von beiden gebildeten Absorptionspeaks in Relation zueinander, lagen diese dennoch im gleichen Größenbereich wie die relativen Intensitäten für die 3(Z)-PEB-Bindung durch wt*GtCPES*. Das längerwellige Maximum von *GtCPES\_R18A* wich mit 593 nm jedoch von den Bindungsspektren des Wildtyps und der anderen Varianten ab.

Die hier getroffenen Aussagen bezüglich der Bindung von 3(Z)-PEB durch *GtCPES* und deren Varianten sind gemeinsam mit den dazugehörigen Absorptions- und Emissionsmaxima in Tabelle 3.3 aufgeführt.

**Tabelle 3.3: Bindung von 3(Z)-PEB durch *GtCPES* (Varianten).**  $A_{max}$ : Absorptionsmaxima;  $E_{max}$ : Emissionsmaximum nach Zugabe von *GtCPES* (Variante) zu 3(Z)-PEB.

<b><i>GtCPES</i> (Varianten)</b>	<b>Bindung PEB</b>	<b><math>A_{max}</math> [nm]</b>	<b><math>E_{max}</math> [nm]</b>
WT	+	554, 600	---
R18A	(+) <sup>a</sup>	552, 593	---
H21A	(+) <sup>a</sup>	532, 592	638
N22A	+	555, 598	---
W69A	(+) <sup>a</sup>	549, 596	637
W75A	+	554, 599	---
E136A	-	539	638
R146A	-	536	638
R148A	+	552, 600	---
S150A	+	554, 600	---
E168A	(+) <sup>a</sup>	541, 597	642

a: Absorptionsspektrum weicht deutlich vom wt*GtCPES*:PEB-Bindungsspektrum ab.

Damit die beobachteten abweichenden PEB-Bindeaktivitäten der *GtCPES* Varianten auch auf den Aminosäureaustausch zurückgeführt werden konnten, wurden die Proteinvarianten nach ihrer Reinigung zeitnah einer Schmelztemperaturbestimmung unterzogen (Kapitel 2.4.3). Bei Erhalt einer auswertbaren Fluoreszenzschmelzkurve, anhand deren Ableitung nach der Temperatur eine Schmelztemperatur abgelesen werden konnte, wurde davon ausgegangen, dass das Protein nicht aggregiert oder denaturiert und damit

in einer effizient gefalteten und energetisch günstigen Form vorlag. Mit Ausnahme der Varianten *GtCPES\_H21A* und *GtCPES\_R146A* ließen sich für den Wildtyp und alle Varianten Schmelztemperaturen in Dreifachbestimmung ermitteln (Tabelle 3.4). Die Ableitungen der verschiedenen Schmelzkurven nach der Temperatur, die zur Ermittlung der Schmelztemperaturen dienten, sind im Anhang dargestellt (Abbildung 6.4; Abbildung 6.5; Kapitel 6.2.1). Zusammengefasst lagen die erhaltenen Schmelztemperaturen in einem Bereich zwischen 47,5 °C und 58 °C. Für den Wildtyp von *StrepII-GtCPES* wurde eine Schmelztemperatur von 56 °C gemessen. Die Schmelztemperaturen der Varianten *GtCPES\_W75A* (58 °C) und *GtCPES\_R148A* (56 °C) lagen nah bei diesem Wert und unterstützten die Beobachtung einer zum Wildtyp ähnlichen Bindung von 3(Z)-PEB (Abbildung 3.13). Die Qualität der Schmelzkurven unterschied sich jedoch für die unterschiedlichen Varianten und somit auch deren Ableitung. Für die Proteinvarianten *GtCPES\_N22A* und *GtCPES\_S150A* wurden Schmelztemperaturen ähnlich der Temperatur des Wildtyps gemessen (55 °C bzw. 57,5 °C), aber jeweils eine zweite Schmelztemperatur erhalten. Für *GtCPES\_N22A* lag diese bei 67,5 °C. Für einige andere Varianten konnten in den Ableitungen ähnliche Minima bei dieser Temperatur beobachtet werden (R18A, H21A, W69A, W75A), die jedoch nicht unter Null lagen und damit nicht als Schmelztemperatur erkannt wurden (Abbildung 6.4; Abbildung 6.5). Mögliche Verunreinigungen der Proben wurden für diese Minima verantwortlich gemacht. *GtCPES\_S150A* wies außerdem eine Schmelztemperatur von 47,5 °C auf, womit vermutlich eine weitere, temperaturinstabilere Form dieser Proteinvariante in der Probe vorlag.

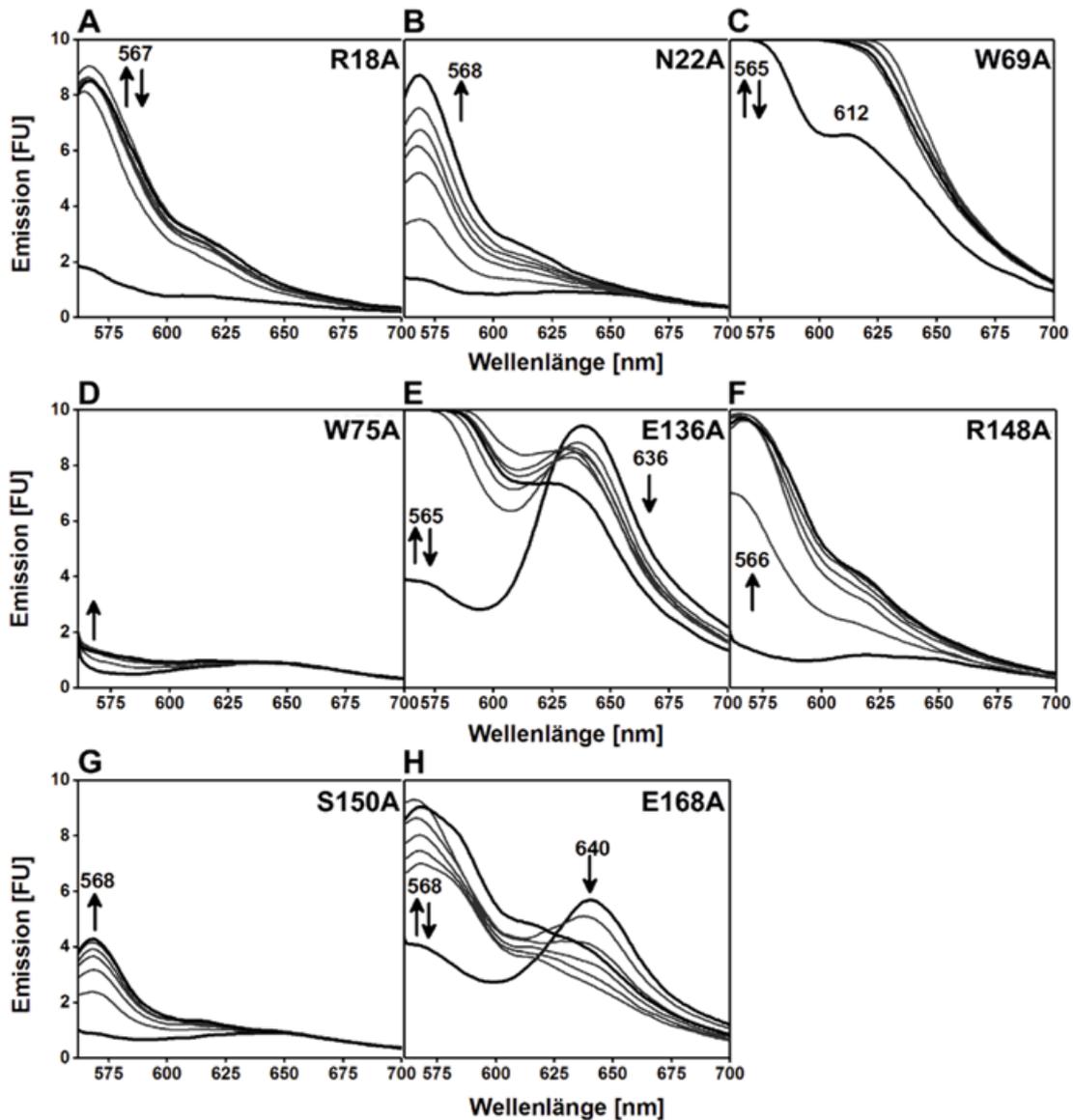
**Tabelle 3.4: Schmelzpunkte von *GtCPES* (Varianten).** Die Schmelzpunkte der Proteine wurden in Dreifachbestimmung ermittelt. n.d.: nicht detektierbar.

<b><i>GtCPES</i> (Varianten)</b>	<b>T<sub>m</sub> [°C]</b>
WT	56,0 ± 0,0
R18A	48,0 ± 0,0
H21A	n.d.
N22A	55,0 ± 0,0 und 67,5 ± 0,0
W69A	48,0 ± 0,0
W75A	58,0 ± 0,0
E136A	47,5 ± 0,0
R146A	n.d.
R148A	56,0 ± 0,0
S150A	48,2 ± 0,3 und 57,5 ± 0,0
E168A	49,0 ± 0,0

Eine deutlichere Abweichung der Schmelztemperatur im Vergleich zum Wildtyp wurde für die übrigen, bereits bei Auswertung der Bindungsspektren auffällig gewordenen Varianten (R18A, W69A, E136A, E168A) erhalten. Bei diesen Varianten wurde eine Schmelztemperatur von unter 50 °C gemessen, womit der Aminosäureaustausch sie nicht nur hinsichtlich ihrer Bindeaktivität, sondern auch in ihrer Temperaturstabilität beeinträchtigte. Da weder für *GtCPES\_H21A* noch für *GtCPES\_R146A* eine Schmelzkurve gemessen und damit keine Schmelztemperatur bestimmt werden konnte, wurde davon ausgegangen, dass diese beiden Varianten fehlgefaltet vorlagen. Das könnte der Grund für die veränderten Bindeaktivitäten von 3(Z)-PEB sein. Die Aminosäuren His<sup>21</sup> und Arg<sup>146</sup> zeigten sich damit als relevant für die Strukturstabilität von *GtCPES*. Es lässt sich also zusammenfassen, dass die Aminosäuren Trp<sup>69</sup>, Glu<sup>136</sup> und Glu<sup>168</sup> in *GtCPES* für die PEB-Bindung von Bedeutung sind. Zu Arg<sup>18</sup> konnte bisher keine eindeutige Aussage getroffen werden.

### 3.3.3 Trp<sup>75</sup> und Ser<sup>150</sup> sind relevant für den PEB-Transfer

Anschließend sollte die Transferaktivität von *GtCPES* untersucht und für den PEB-Transfer relevante Aminosäuren identifiziert werden. Die zuvor erzeugten Alaninvarianten von *GtCPES*, die keine Fehlfaltung aufwiesen (R18A, N22A, W69A, W75A, E136A, R148A, S150A, E168A), wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie hinsichtlich ihrer Fähigkeit überprüft, 3(Z)-PEB auf *PmCpeB* zu übertragen (Abbildung 3.14). Am jeweiligen Tag der Messung wurde hinzukommend eine Referenzmessung mit dem Wildtyp von *GtCPES* durchgeführt und diese mit den zeitabhängigen Fluoreszenzspektren für die verschiedenen Varianten verglichen. So konnte für *GtCPES\_N22A* und *GtCPES\_R148A* angenommen werden, dass sich diese in Bezug auf den PEB-Transfer wie der Wildtyp verhielten, obwohl diese von dem gezeigten *GtCPES*-vermittelten PEB-Transfer in Abbildung 3.8 abweichen (Abbildung 3.14, B, F). Diese Annahme ließ sich durch die zum Wildtyp ähnlichen Bindungseigenschaften von 3(Z)-PEB stützen (Abbildung 3.13, B, D; Kapitel 3.3.2). Für *GtCPES\_S150A* wurde, trotz zum Wildtyp vergleichbarer Bindungseigenschaften, ein reduzierter Emissionsanstieg detektiert und damit eine eingeschränkte Transferaktivität beobachtet (Abbildung 3.14, G). Das Fluoreszenzspektrum für die PEB-Übertragung durch *GtCPES\_W75A* wies nahezu gar keinen detektierbaren Transfer mehr auf (Abbildung 3.14, D). Hierfür möglicherweise zugrunde liegende Fehlfaltungen konnten zuvor bereits ausgeschlossen werden (Kapitel 3.3.2).



**Abbildung 3.14: Fluoreszenzspektren zur Untersuchung der Übertragung von 3(Z)-PEB auf *PmCpeB* durch *GtCPES* Varianten. A-H.** Für die Messung wurden 5  $\mu\text{M}$  freies 3(Z)-PEB mit 20  $\mu\text{M}$  der jeweiligen *GtCPES* Variante und 20  $\mu\text{M}$  *PmCpeB* verwendet. Fluoreszenzspektren wurden nach 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 min Reaktionsdauer mit einem Fluoreszenzspektrometer Aminco Bowman Series 2 (Thermo Fisher) detektiert. Die angegebenen Emissionsmaxima (in nm) wurden nach 45 min erhalten, für C und E wurden die Maxima nach Verdünnung der Reaktionsprobe bestimmt. Die Spektren nach 1 min und nach 45 min sind in Fett hervorgehoben. Die Anregungswellenlänge betrug 550 nm.

Aufgrund der fehlenden Bindung zwischen 3(Z)-PEB und *GtCPES*\_E136A ließ sich im Fluoreszenzspektrum deutlich erkennen, wie sich das weiterhin frei vorliegende PEB spontan unter einem deutlichen Emissionsanstieg (565 nm) an *PmCpeB* anlagerte (Abbildung 3.14, E). Des Weiteren trat hier bereits zu Beginn ein Emissionsmaximum bei 636 nm auf,

dessen Intensität über die Messdauer sank. Hierbei handelt es sich um die Fluoreszenzemission des *GtCPES\_E136A*:PEB-Komplexes, die bereits zuvor beobachtet wurde (Kapitel 3.3.2). *GtCPES\_E168A*, das eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich abweichende Bindung von 3(*Z*)-PEB zeigte (Abbildung 3.12, F; Kapitel 3.3.2), wies ebenfalls aufgrund des fluoreszenten Komplexes mit PEB ein längerwelliges Maximum bei 640 nm auf. Mit zunehmender Messdauer sank die Intensität von diesem (Abbildung 3.14, H). Da das produktrelevante Emissionsmaximum hier kontinuierlich mit der Zeit anstieg und bei einer Wellenlänge von 568 nm vorlag, wurde angenommen, dass die Variante dazu fähig war, 3(*Z*)-PEB zu übertragen. Jedoch lag aufgrund der schwachen Bindung weiterhin freies PEB in Lösung vor, dessen spontane Bindung an *PmCpeB* das Fluoreszenzspektrum des vermittelten Transfers überlagerte (Abbildung 3.14, H). Das Fluoreszenzspektrum von *GtCPES\_W69A* zeigte eine deutliche Emission bei 565 nm, die bereits zu Beginn der Reaktion eine hohe Intensität aufwies (Abbildung 3.14, C). Das Spektrum glich somit dem der spontanen Bindung von 3(*Z*)-PEB an *PmCpeB* (Abbildung 3.8, A). Die Emission des fluoreszenten *GtCPES\_W69A*:PEB-Komplexes wurde durch die starke Fluoreszenzemission des spontan erzeugten Produktes überlagert.

Anhand des Fluoreszenzspektrums für *GtCPES\_R18A* war eine Interpretation der Transferaktivität schwierig. Es blieb unklar, ob es sich um eine *GtCPES*-vermittelte Übertragung handelte (Abbildung 3.14, A). Es lag keine Kontinuität des zeitlichen Emissionsanstiegs vor, das Emissionsmaximum bei 567 nm wies jedoch auf die gewünschte Produktbildung von *PmCpeB*-Cys<sup>82</sup>-PEB hin. Auf dem, zu der Transferreaktion zugehörigen Zink-Blot konnte zudem ein Fluoreszenzsignal detektiert werden, das auf eine gebildete kovalente Bindung zwischen *PmCpeB* und PEB hinwies (Abbildung 6.3; Kapitel 6.2.1). Für den fehlenden oder auch beeinträchtigten PEB-Transfer durch *GtCPES\_W75A* und *GtCPES\_S150A* (Abbildung 3.14, D, G) konnte hingegen keine kovalente Bindung hiermit nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Unter Zuhilfenahme des Referenz-Fluoreszenzspektrums des durch *wtGtCPES* vermittelten Transfers, welches dem aus Abbildung 3.8 glich, wurde aufgrund der deutlichen Abweichung von diesem schließlich angenommen, dass es sich hier nicht um eine mit gleicher Effizienz vermittelte Übertragung von PEB handelte. Da jedoch ein deutliches Bindungsspektrum von *GtCPES\_R18A* mit PEB erzeugt wurde (Abbildung 3.13, A), wenn auch mit abweichenden Absorptionsmaxima, war ein vermittelter PEB-Transfer durch *GtCPES\_R18A* dennoch in Betracht zu ziehen.

### 3.3.4 Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen *GtCPES* (Varianten) und 3(Z)-PEB

In einem weiteren Schritt wurden die zuvor gezeigten, hinsichtlich der Bindung und des Transfers von PEB, vom *GtCPES* Wildtyp abweichenden Varianten in verschiedene Gruppen unterteilt (Tabelle 3.5). Gruppe 2 enthielt auch die Variante *GtCPES\_R18A*, da diese im PEB-Bindungsspektrum eine deutliche blauverschobene Abweichung des längerwelligen Absorptionsmaximums aufwies. Für lediglich einen Vertreter jeder Gruppe wurde die Bindungsaffinität in Form der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten mittels UV/vis-basierter Titration ermittelt (Kapitel 2.4.5). Hierfür wurde die Gleichung 2 als Näherung verwendet. Die reduzierte Anzahl an zu messenden Varianten diente dazu, PEB zu sparen, welches hierfür in erhöhten Mengen benötigt wurde. Zuvor als fehlgefaltet herausgestellte *GtCPES* Varianten wurden nicht berücksichtigt. Anstelle einer Proteinvariante der Gruppe 1, in welcher die Varianten eine zum *GtCPES* Wildtyp ähnliche Bindung von 3(Z)-PEB zeigten, wurde die Bindungsaffinität des Wildtyps stellvertretend gemessen. Da die Variante *GtCPES\_E136A* keine Bindung von PEB bei bereits im Überschuss vorliegender PBP Lyase zeigte (Abbildung 3.12, D), wurde auf die Titrationsmessung verzichtet.

**Tabelle 3.5: Differenzierung der verschiedenen *StrepII-GtCPES* Varianten in Gruppen hinsichtlich der Bindung und des Transfers von 3(Z)-PEB.**

Bindungs- bzw. Transferverhalten der <i>GtCPES</i> Varianten				
1)	Bindung und Transfer ähnlich zu wt <i>GtCPES</i>	N22A	R148A	
2)	abweichende Absorptionsmaxima bei Bindung	R18A	W69A	E168A
3)	keine Bindung von PEB	E136A		
4)	eingeschränkter PEB-Transfer	W75A	S150A	

Innerhalb von zehn 200 µl-Ansätzen wurden einer konstanten Konzentration an 3(Z)-PEB (10 µM) eine variable Konzentration an *StrepII-GtCPES* (Variante) (2-15 µM) hinzutitriert und ein Absorptionsspektrum gemessen (Abbildung 6.7). Hinzukommend wurde für den *StrepII-GtCPES* Wildtyp der  $K_D$ -Wert mittels ITC ermittelt (Abbildung 6.6; Kapitel 6.2.1). Da es sich jedoch als schwierig herausstellte, die PBP Lyase in ausreichenden Konzentrationen für diese Anwendung zu erzeugen und auch an dieser Stelle viel PEB benötigt wurde, wurde von der Messung der Proteinvarianten abgesehen. In Tabelle 3.6

sind die errechneten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten gemittelt über jeweils zwei Messungen dargestellt.

**Tabelle 3.6: Bindungsaffinitäten für die Komplexbildung zwischen StrepII-GtCPES (Varianten) und 3(Z)-PEB.** Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_D$  der ITC wurden mit den Software-Paketen *NITPIC* und *SEDPHAT* automatisch berechnet. Die Werte der UV/vis-basierten Titration wurden mit der Gleichung 2 bei Verwendung der *Solver*-Funktion von *Microsoft Excel* berechnet. Die Ergebnisse wurden über zwei Messungen gemittelt.

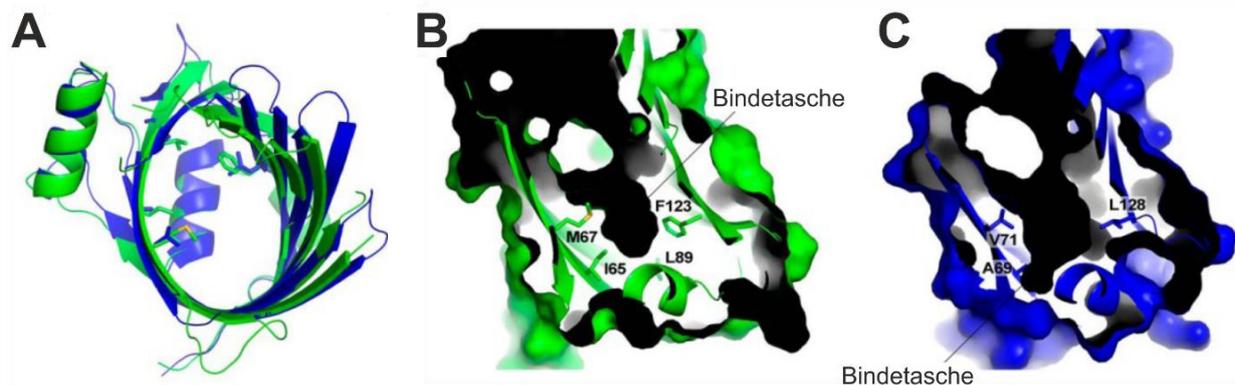
<b>GtCPES (Variante)</b>	<b>ITC</b>	<b>UV/vis</b>
	<b><math>K_D</math> [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	
WT	9,13 ± 1,46	14,25 ± 2,62
W75A	---	0,86 ± 0,06
E168A	---	Nicht auswertbar

Die  $K_D$ -Werte, die für den GtCPES Wildtyp aus den beiden Bestimmungsmethoden erhalten wurden, lagen bei 9,13  $\mu\text{M}$  (ITC) und 14,25  $\mu\text{M}$  (UV/vis). Sie wichen damit voneinander ab, befanden sich aber in einem ähnlichen Größenbereich. Anhand dieser Werte ließ sich vermuten, dass beide Methoden die Berechnung des  $K_D$ -Wertes und anschließende Abschätzung der Bindungsaffinität erlaubten. Im Vergleich zum Wildtyp wurde für GtCPES\_W75A eine deutlich stärkere Bindung mit einem  $K_D$  von 0,86  $\mu\text{M}$  ermittelt. Das sterisch anspruchsvolle Tryptophan oberhalb der Bindetasche (Abbildung 3.11) schränkt damit die Bindungsaffinität von GtCPES mit PEB deutlich ein. Für GtCPES\_E168A war aufgrund der geringen Absorptionsänderung mit steigender Konzentration an PBP Lyase bei Verwendung der Gleichung 2 kein  $K_D$ -Wert zu bestimmen (Abbildung 6.7; Kapitel 6.2.1). Das von Gleichung 2 beschriebene Kurvenmodell war an dieser Stelle nicht auf die experimentellen Daten anwendbar und damit nicht geeignet, um die Bindungsaffinität schwacher Bindungen zu charakterisieren.

### 3.4 Analyse der Substratspezifität von *GtCPES*

Bedingt durch sterisch ausladende Aminosäurereste (Ile<sup>65</sup>, Met<sup>67</sup>, Leu<sup>89</sup>, Phe<sup>123</sup>) besitzt die PBP Lyase *GtCPES* eine kleine Bindetasche (Abbildung 3.15, B). Die genannten Aminosäurereste gewährleisten eine hohe Substratspezifität von *GtCPES*, welche lediglich die Bindung von Phycobilinen mit einer reduzierten C15,C16-Doppelbindung wie DHBV und PEB erlaubt. Phycobiline wie PCB, mit einer rigiden Doppelbindung an dieser Position, können aufgrund der fehlenden D-Ring-Flexibilität nicht durch *GtCPES* gebunden werden (Overkamp *et al.*, 2014b) (Abbildung 3.20, D; Kapitel 3.4.2).

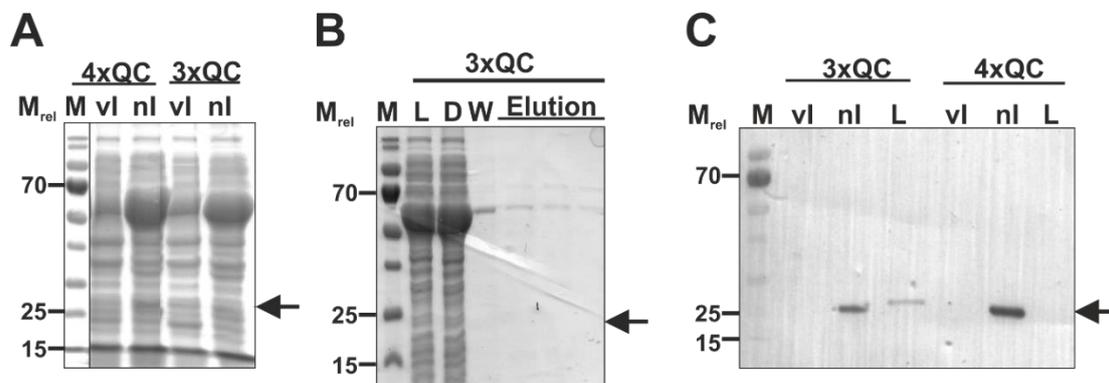
Bei einem Vergleich mit der Bindetasche der PΦB- und PCB-bindenden PBP Lyase *TeCpcS* aus *Thermosynechococcus elongatus* wurde festgestellt, dass die Bindetasche eine zu *GtCPES* ähnliche Struktur aufweist. Sie besitzt jedoch weniger räumlich ausgedehnte, äquivalente Aminosäurereste (Ala<sup>69</sup>, Val<sup>71</sup>, Pro<sup>92</sup>, Leu<sup>128</sup>) und damit eine größere Bindetasche (Kronfel *et al.*, 2013; Overkamp *et al.*, 2014b) (Abbildung 3.15). Die Aminosäuren von *TeCpcS* dienen als Ausgangsmodell für die Erzeugung von *GtCPES* Proteinvarianten mit vergrößerter Bindetasche. Durch Austausch der genannten Aminosäuren sollten die Reste identifiziert werden, die für die hohe Substratspezifität von *GtCPES* maßgebend sind. Hierbei wurden die *GtCPES* Proteinvarianten auf die Fähigkeit untersucht, zusätzlich zu der Bindung und dem Transfer von 3(*Z*)-PEB, auch 3(*E*)-PCB zu binden.



**Abbildung 3.15: Vergleich der S-Typ-PBP Lyasen *GtCPES* und *TeCpcS*.** A. Strukturelle Anpassung von *GtCPES* (grün) und *TeCpcS* (blau) in der Draufsicht. B. Darstellung der zentralen Bindetaschen (schwarz) von *GtCPES*, C, und *TeCpcS*. (verändert nach Overkamp *et al.*, 2014b)

### 3.4.1 Produktion und Reinigung von GtCPES Varianten mit vergrößerter Bindetasche

Zunächst wurden die durch Zielgerichtete Mutagenese erzeugten GtCPES Varianten mit vergrößerter Bindetasche (I65A, M67A, M67V, I65A\_M67A, I65A\_M67V, I65A\_M67V\_L89P, I65A\_M67V\_L89P\_F123L) produziert (Abbildung 3.16; Abbildung 6.8; Kapitel 6.2.2). Bei Durchführung von *in vitro* Bindestudien mit 3(Z)-PEB und 3(E)-PCB wurden die Proteinvarianten anschließend mittels UV/vis-Spektroskopie auf ihr Substratspektrum hin analysiert.



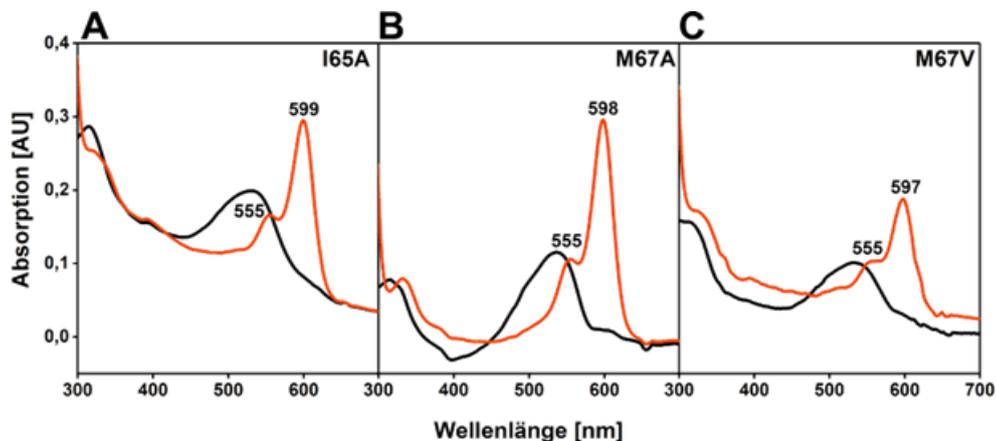
**Abbildung 3.16: Produktion und Reinigung von GtCPES<sub>I65A\_M67V\_L89P</sub> (3xQC) und GtCPES<sub>I65A\_M67V\_L89P\_F123L</sub> (4xQC).** Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt oder auf eine PVDF-Membran für die anschließende Western-Blot Analyse transferiert. **A.** Die Produktionen von GtCPES<sub>I65A\_M67V\_L89P</sub> (3xQC) und GtCPES<sub>I65A\_M67V\_L89P\_F123L</sub> (4xQC) wurden in *E. coli* BL21(DE3) unter Koexpression mit dem Chaperonplasmid pGro7 bei 17 °C über Nacht durchgeführt. Es wurde LB-BS-Medium verwendet. **B.** Die Variante 3xQC wurde mittels Affinitätschromatographie gereinigt. **C.** Die Produktion und Löslichkeit beider Proteinvarianten wurde mit Hilfe eines Western-Blots nachgewiesen. Für die Detektion wurde Anti-Strep-Tactin-AP-Konjugat verwendet. Der Pfeil markiert die erwartete Größe der Varianten von etwa 21,6 kDa. M<sub>rel</sub>: Relative Molekülmasse (x1000); M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher); vl: Zellprobe vor der Induktion; nl: Zellprobe nach der Induktion; L: Lysat; D: Durchlauf; W: Waschfraktion; 3xQC: 3-fache QuikChange Mutagenese; 4xQC: 4-fache QuikChange Mutagenese.

Mit Ausnahme der Varianten GtCPES<sub>I65A\_M67V\_L89P</sub> (3xQC) und GtCPES<sub>I65A\_M67V\_L89P\_F123L</sub> (4xQC) ließen sich die übrigen Proteinvarianten sowohl erfolgreich produzieren als auch reinigen (Abbildung 6.8; Abbildung 6.9; Kapitel 6.2.2). Anhand der SDS-PAGE der Produktion und des Western-Blots lässt sich erkennen, dass die beiden genannten Ausnahmen in der Zellprobe nach Induktion und Inkubation über Nacht bei 17 °C zwar detektiert und damit produziert werden konnten, die SDS-PAGE der

Reinigung von *GtCPES\_I65A\_M67V\_L89P* (Abbildung 3.16, B) zeigte jedoch kein erkennbares Protein der entsprechenden Größe (~21,6 kDa) (Abbildung 3.16, A, C). Der Western-Blot der löslichen Fraktion (Lysat) beider Varianten machte schließlich deutlich, dass *GtCPES\_I65A\_M67V\_L89P* nur in geringen Mengen und die Variante *GtCPES\_I65A\_M67V\_L89P\_F123L* gar nicht in löslicher Form vorlagen. Fehlfaltungen und daraus resultierende Aggregation aufgrund der zahlreichen Aminosäureaustausche wurden diesen Beobachtungen zugrunde gelegt. Insbesondere ein Austausch in die Aminosäure Prolin ist als kritisch zu betrachten, da diese durch ihre chemische Struktur einen Strukturbruch und damit eine deutliche Konformationsänderung des Proteins nach sich ziehen kann. Demnach konnten mit diesen Proteinvarianten keine weitergehenden Untersuchungen durchgeführt werden.

### 3.4.2 Einzel-Aminosäureaustausch erweitert Substratspektrum von *GtCPES*

Die erfolgreich produzierten und gereinigten *GtCPES* Varianten (I65A, M67A, M67V, I65A\_M67A, I65A\_M67V) wurden innerhalb von Bindestudien zunächst mit 3(*Z*)-PEB und anschließend mit 3(*E*)-PCB hinsichtlich ihrer Substratspezifität überprüft.



**Abbildung 3.17: Absorptionsspektren der 3(*Z*)-PEB-Bindung durch *GtCPES* Varianten mit vergrößerter Bindetasche.** A-C. Absorptionsspektren von ungebundenem 3(*Z*)-PEB (5 µM; schwarz) im Vergleich zum Absorptionsspektrum nach Zugabe der jeweiligen *GtCPES* Variante im Überschuss (20 µM; rot). Dargestellt werden jeweils die hinsichtlich ihres Hintergrundes korrigierten Absorptionsspektren. Die Absorptionsmaxima sind angegeben (in nm).

Die Absorptionsspektren der getesteten Varianten zeigten ein deutliches Bindungsspektrum nach Zugabe der jeweiligen PBP Lyase (20  $\mu\text{M}$ ) zu 3(Z)-PEB (5  $\mu\text{M}$ ) und waren damit alle weiterhin dazu in der Lage, dieses zu binden (Abbildung 3.17). Die Bindungsspektren wiesen eine Rotverschiebung des Absorptionsmaximums in Kombination mit einem gebildeten Doppelpeak auf. In Tabelle 3.7 sind die Absorptionsmaxima der Bindespektren aufgeführt.

**Tabelle 3.7: Schmelztemperaturen der *GtCPES* mit vergrößerter Bindetasche und *in vitro* Bindung und Transfer auf *PmCpeB* von 3(Z)-PEB.** Die Schmelztemperatur  $T_m$  der Proteine wurde im Triplikат bestimmt.  $A_{\text{max}}$ : Absorptionsmaxima der Varianten des *GtCPES*:PEB-Komplexes;  $E_{\text{max}}$ : Emissionsmaximum des Übertragungsproduktes (ÜP). ND: nicht durchgeführt.

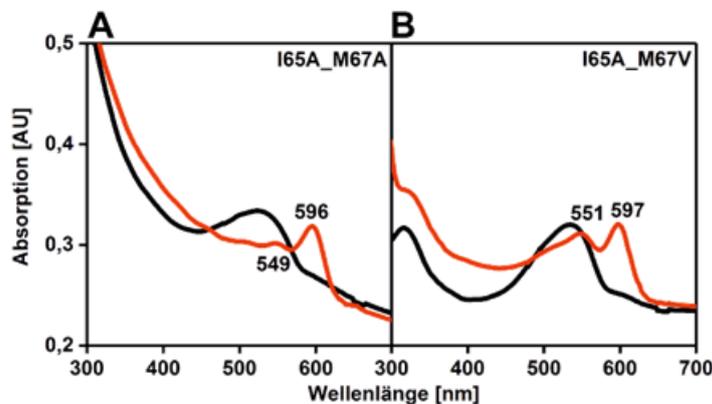
<i>GtCPES</i> (Variante)	$T_m$ [°C]	3(Z)-PEB			
		Bindung	$A_{\text{max}}$ [nm]	Transfer	$E_{\text{max}}$ [nm]
			<i>GtCPES</i> :PEB		ÜP
WT	56,0 $\pm$ 0,0	+	554, 600	+	568
I65A	47,5 $\pm$ 0,5	+	555, 599	+	568
M67A	53,3 $\pm$ 0,3	+	555, 598	+	569
M67V	52,3 $\pm$ 0,4	+	555, 597	+	567
I65A_M67A	46,2 $\pm$ 1,0 58,0 $\pm$ 0,0	(+) <sup>a</sup>	549, 596	-	567
I65A_M67V	52,2 $\pm$ 1,5	(+) <sup>a</sup>	551, 597	+	568
I65A_M67V_L89P	ND	ND	---	ND	---
I65A_M67V_L89P_F123L	ND	ND	---	ND	---

a: Absorptionsspektrum weicht vom wt*GtCPES*-Bindungsspektrum mit PEB ab.

Die Varianten mit Doppelaustausch an Aminosäuren (I65A\_M67A, I65A\_M67V) wichen in Bezug auf ihr Bindungsspektrum (Abbildung 3.18) jedoch deutlich von dem für wt*GtCPES* ab (Abbildung 3.12, A; Kapitel 3.3.2). Beide Absorptionsmaxima waren im Vergleich zum Wildtyp weniger rotverschoben und das kürzerwellige Maximum weniger deutlich ausgeprägt. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass sich weiterhin freies PEB in Lösung befand und damit keine vollständige Bindung von diesem stattfand.

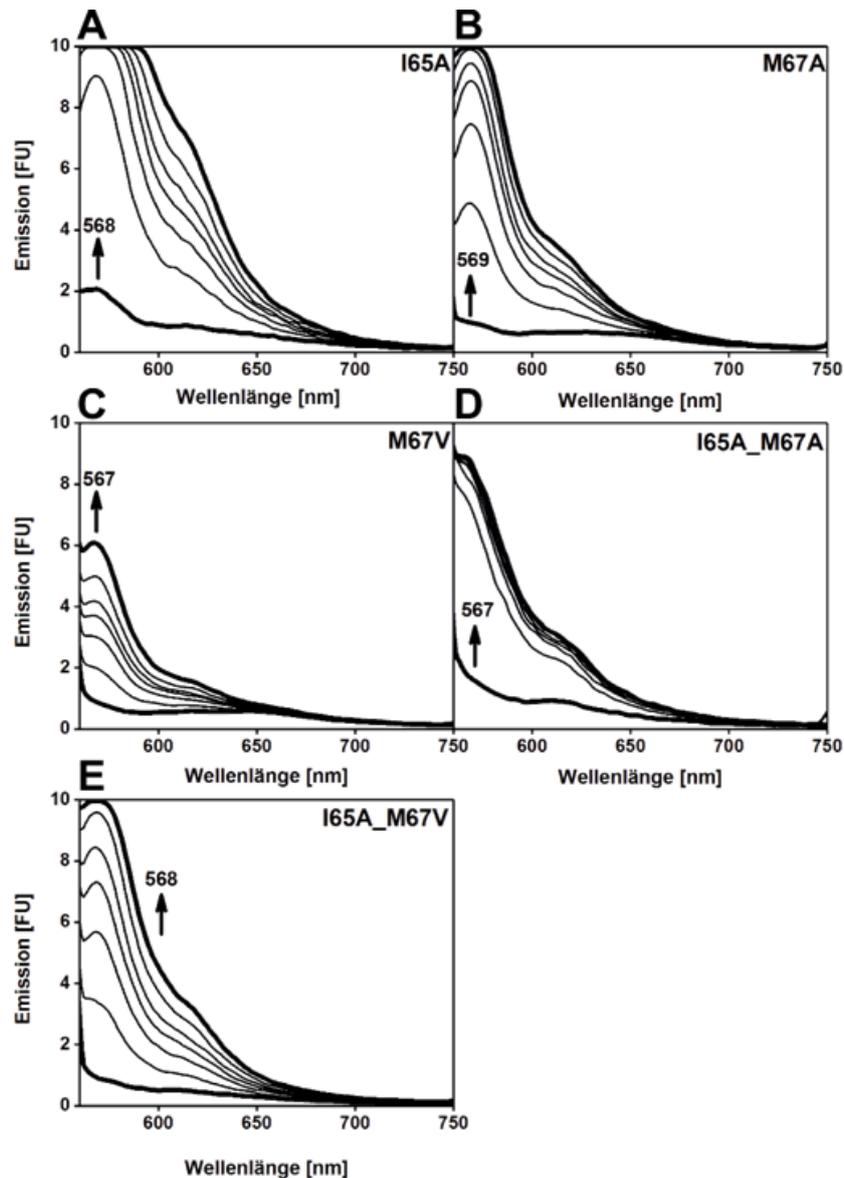
Mit Hilfe der Schmelztemperaturbestimmung, die für die verschiedenen *GtCPES* Varianten mit Bindetaschenmodifikation durchgeführt wurde, ließ sich abschätzen, ob diese

möglichen Fehlfaltungen unterlagen (Tabelle 3.7; Abbildung 6.4; Kapitel 6.2.1). Die Schmelztemperatur beider Proteinvarianten konnte detektiert werden, die Qualität beider Fluoreszenzspektren und der entsprechenden Ableitungen zur Bestimmung der Schmelztemperatur war aber gering, erkennbar auch an den Standardabweichungen (1 °C; 1,5 °C). Für *GtCPES\_I65A\_M67A* wurden außerdem zwei  $T_m$ -Werte erhalten (46,2 °C und 58 °C). Es lagen daher womöglich zwei, hinsichtlich ihrer Temperaturstabilität unterschiedliche Spezies dieser Proteinvariante vor. Fehlerbehaftete Schmelztemperaturen waren aufgrund der niedrigen Qualität der Spektren aber nicht auszuschließen. Insbesondere im Fall von *GtCPES\_I65A\_M67A* wies die Ableitung der Schmelzkurve nach der Temperatur deutliche Schwankungen auf. Dies kann auf eine inkorrekte Faltung der Variante zurückzuführen sein und die abweichende Bindung von 3(*Z*)-PEB möglicherweise erklären (Abbildung 6.4; Kapitel 6.2.1).



**Abbildung 3.18: Absorptionsspektren der 3(*Z*)-PEB-Bindung durch die *GtCPES\_I65A\_M67A* und *GtCPES\_I65A\_M67V*.** A, B. Absorptionsspektren von ungebundenem 3(*Z*)-PEB (5 µM; schwarz) im Vergleich zum Absorptionsspektrum nach Zugabe der jeweiligen *GtCPES* Variante (20 µM; rot). Dargestellt werden jeweils die hinsichtlich ihres Hintergrundes korrigierten Absorptionsspektren. Die Absorptionsmaxima sind angegeben (in nm).

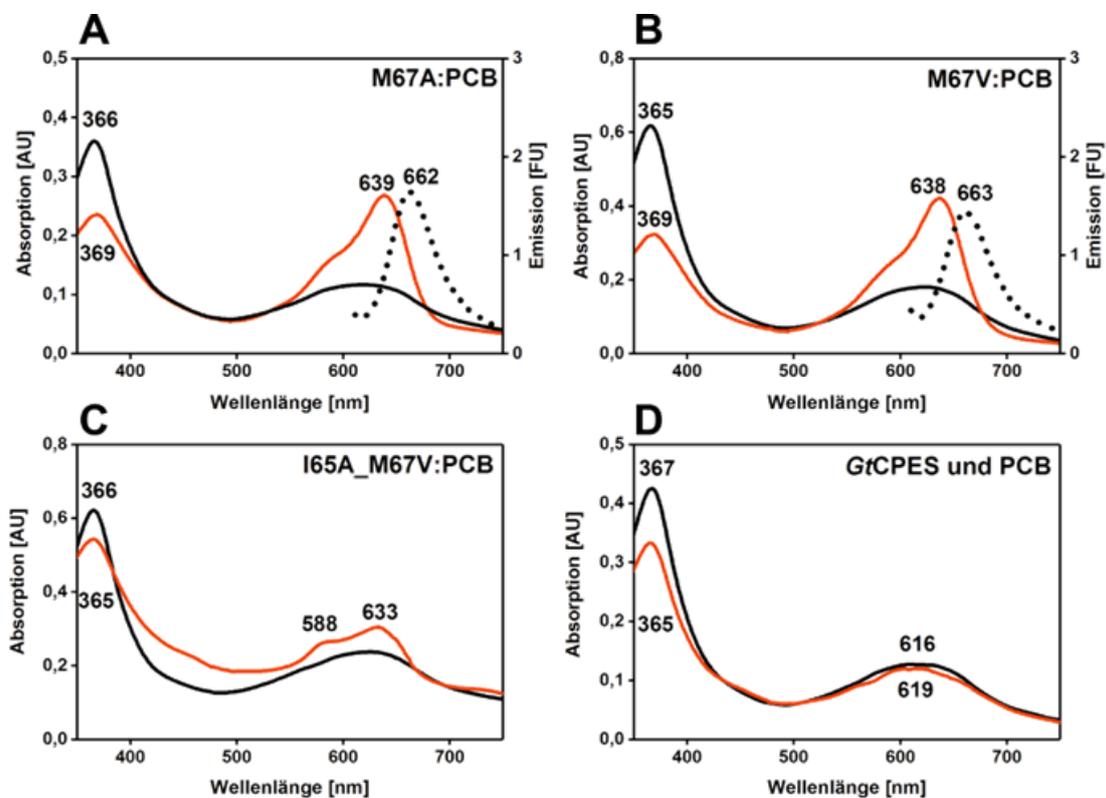
Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die Proteinvarianten weiterhin dazu in der Lage waren, nicht nur 3(*Z*)-PEB zu binden, sondern dieses auch auf *PmCpeB* zu übertragen. Mit Ausnahme der zuvor als vermutlich fehlgefaltet herausgestellten Variante *GtCPES\_I65A\_M67A*, war es den hier aufgeführten *GtCPES* Varianten (*I65A*, *M67A*, *M67V*, *I65A\_M67V*) möglich, den Transfer von 3(*Z*)-PEB auf *PmCpeB* zu vermitteln (Abbildung 3.19). Die Kontinuität des Emissionsanstiegs sowie die Emissionsmaxima des Übertragungsproduktes waren mit der Referenzmessung der vermittelten Übertragung durch den Wildtyp vergleichbar (Tabelle 3.7).



**Abbildung 3.19: Fluoreszenzspektren zur Untersuchung der Übertragung von 3(Z)-PEB auf *PmCpeB* durch *GtCPES* Varianten mit vergrößerter Bindetasche. A-E.** Für die Messung wurden 5  $\mu\text{M}$  freies 3(Z)-PEB mit 20  $\mu\text{M}$  der jeweiligen *GtCPES* Variante und 20  $\mu\text{M}$  *PmCpeB* verwendet. Fluoreszenzspektren wurden nach 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 min Reaktionsdauer mit einem Fluoreszenzspektrometer Aminco Bowman Series 2 (Thermo Fisher) detektiert. Die angegebenen Emissionsmaxima (in nm) wurden nach 45 min erhalten. Die Spektren nach 1 min und nach 45 min sind in Fett hervorgehoben. Der Pfeil gibt den Emissionsverlauf an. Die Anregungswellenlänge betrug 550 nm.

Anschließend wurde die Überprüfung des Substratspektrums in Bezug auf die *in vitro* Bindung von 3(E)-PCB durchgeführt. Nach der jeweiligen Zugabe der Varianten *GtCPES*\_I65A, *GtCPES*\_M67A, *GtCPES*\_M67V, *GtCPES*\_I65A\_M67A und *GtCPES*\_I65A\_M67V zu 3(E)-PCB konnten anhand der Absorptionsbindespektren drei PCB-bindende *GtCPES* Varianten identifiziert werden (Tabelle 3.8). Der Einzelaminosäureaustausch von Met<sup>67</sup> lieferte

*GtCPES* Varianten mit der Fähigkeit, 3(*E*)-PCB im Komplex zu binden (M67A, M67V). Für alle wurde eine Rotverschiebung der längerwelligen Absorptionsmaxima beobachtet, wobei diese Varianten ein Maximum von 638 nm und 639 nm erreichten. Zudem wurde ein für die Phycobilinbindung erwarteter Extinktionsanstieg dieser Maxima im Vergleich mit dem Spektrum für freies PCB detektiert. Ein deutliches Doppelmaximum wurde bei der Bindung von PCB nicht erzeugt. Ein zweites Absorptionsmaximum lag jedoch andeutungsweise als Absorptionsschulter vor. Interessanterweise wiesen die *GtCPES* Varianten des Einzelaminosäureaustausches zudem im Komplex mit PCB ein Emissionsmaximum bei 662 nm und 663 nm auf (Abbildung 3.20, A, B). Des Weiteren wurden ähnliche Schmelztemperaturen für beide Varianten erhalten (53,3 °C und 52,3 °C), wobei die Ableitungen der Fluoreszenz nach der Temperatur für *GtCPES*\_M67A innerhalb der Dreifachbestimmung sich ähnlicher und damit reproduzierbarer waren (Abbildung 6.4; Kapitel 6.2.1).



**Abbildung 3.20: Absorptionsspektren zur Untersuchung der Bindung von 3(*E*)-PCB durch verschiedene *GtCPES* Varianten.** A-D. Absorptionsspektren von freiem 3(*E*)-PCB (5 µM; schwarz) im Vergleich zum Absorptionsspektrum nach Zugabe der jeweiligen *GtCPES* Variante (A-C) oder des Wildtyps (D) (20 µM; rot). Dargestellt werden jeweils die hinsichtlich ihres Hintergrundes korrigierten Absorptionsspektren. Die Absorptionsmaxima sind angegeben (in nm). Für A und B sind außerdem die Fluoreszenzspektren der gebildeten PBP Lyase:PCB-Komplexe mit den dazugehörigen Emissionsmaxima (in nm) gezeigt (gepunktete Linie). Die Anregungswellenlänge betrug 600 nm.

Nach Zugabe von *GtCPES\_I65A\_M67V* zu 3(*E*)-PCB bildete sich ein doppeltes Absorptionsmaximum (588 nm, 633 nm) (Abbildung 3.20, C). Der Extinktionsanstieg von diesem blieb im Verhältnis zu dem Spektrum für freies PCB jedoch gering. Eine vollständige PCB-Bindung durch diese Doppelaustauschvariante mit vergrößerter Bindetasche wurde daher ausgeschlossen. Zudem konnte keine Fluoreszenz des Komplexes detektiert werden. *GtCPES\_I65A* zeigte keine Bindung mit PCB, wie auch der Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Für *GtCPES\_I65A\_M67A* wurde ebenfalls keine Bindung mit 3(*E*)-PCB beobachtet (Tabelle 3.8). Sowohl eine unspezifische Bindetasche und hierdurch fehlende, benötigte Interaktionen sowie die zuvor diskutierte Fehlfaltung könnten Gründe hierfür sein.

**Tabelle 3.8: *In vitro* Bindung von 3(*E*)-PCB nach Inkubation mit *GtCPES* Varianten mit vergrößerter Bindetasche.**  $A_{\max}$ : Absorptionsmaximum.  $E_{\max}$ : Emissionsmaximum des Variante:PCB-Komplexes (Anregung bei 600 nm).

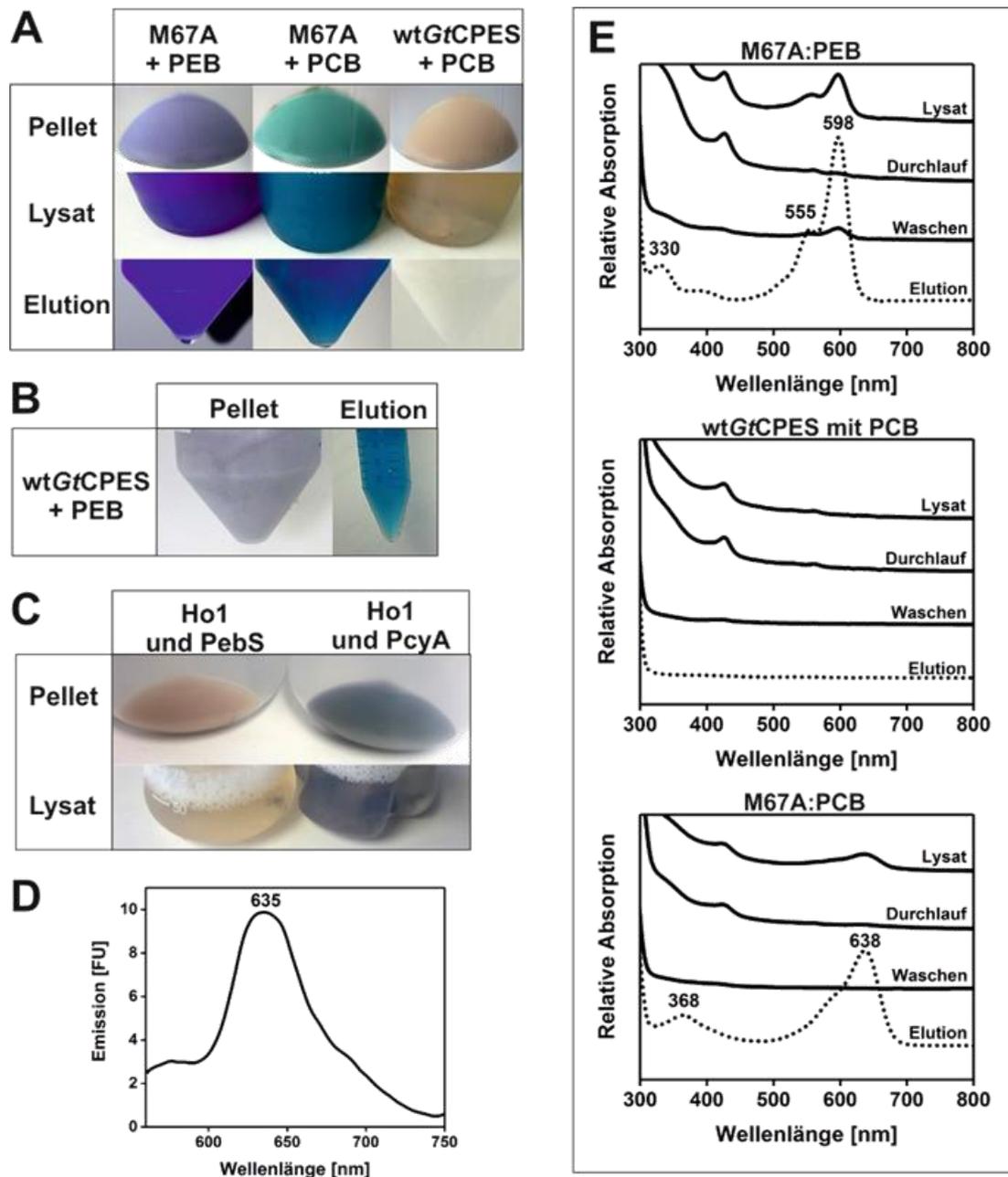
<i>GtCPES</i> Variante	3( <i>E</i> )-PCB		
	Bindung	$A_{\max}$ [nm]	$E_{\max}$ [nm]
I65A	-	616	---
M67A	+	639	662
M67V	+	638	663
I65A_M67A	-	617	---
I65A_M67V	(+)	588, 633	---

Für die gebildeten Komplexe zwischen *GtCPES\_M67A* und 3(*Z*)-PEB sowie 3(*E*)-PCB wurden Bindungsaffinitäten mittels UV/vis-Spektroskopie basierter Titration bestimmt (Kapitel 2.4.5; Abbildung 6.10; Kapitel 6.2.2). Für beide Komplexe konnte die Bindungsaffinität mit dieser Methode bestimmt werden. Der  $K_D$ -Wert für PEB lag bei 0,044  $\mu\text{M}$  ( $\pm 0,003$ ), für PCB bei 7  $\mu\text{M}$  ( $\pm 0,41$ ). Beide  $K_D$ -Werte lagen unterhalb des Wertes für den Wildtyp (Tabelle 3.6). Die Bindungen dieser Komplexe waren damit stärker als die Bindung zwischen *GtCPES* und 3(*Z*)-PEB.

### 3.4.3 *GtCPES\_M67A* bildet stabilen Komplex mit PCB und PEB *in vivo* in *E. coli*

Die erfolgreiche Koproduktion des *GtCPES* Wildtyps und der Syntheseezyme für PEB (Ho1, His-PebS) und eine hieraus resultierende *in vivo* Komplexbildung von *GtCPES*:PEB konnte bereits gezeigt werden (Overkamp *et al.*, 2014b). An dieser Stelle war es interessant, ob eine *in vivo* Bindung und die anschließende Reinigung des Komplexes sich auch auf eine *GtCPES* Variante mit vergrößerter Bindetasche und ein hierdurch bedingtes erweitertes Substratspektrum übertragen lassen. Da *GtCPES\_M67A* sowohl eine Bindung zu PEB sowie PCB als auch einen Transfer von PEB auf *PmCpeB* zeigte, wurde sich für diese Untersuchungen für *GtCPES\_M67A* entschieden. Für die Koproduktion war es wichtig, das Gen *gtCPES\_M67A* in einen anderen Vektor einzubringen, da diese in Kombination mit dem eigentlichen pASK-IBA7+-Vektor bereits für den *GtCPES* Wildtyp nicht effizient funktionierte (Daten nicht gezeigt). Die Koproduktion für *GtCPES\_M67A* mit Hilfe des geeigneten Vektors (pETDuet1) wurde sowohl in Kombination mit den Syntheseezymen für PEB (Ho1, PebS) als auch mit denen für PCB (Ho1, His-PcyA) durchgeführt. Die zusätzliche Koproduktion von wt*GtCPES* und PCB galt als Negativkontrolle, da *GtCPES* PCB nicht bindet. Als eine weitere Kontrolle wurden lediglich die Gene *ho1* und *pebS* bzw. *pcyA* koexpressiert (Abbildung 3.21, C). Auf die Koexpression des PBP Lyase-Gens wurde an dieser Stelle verzichtet. Die Phycobilinproduktion und die Komplexbildung wurden anschließend während des Zellaufschlusses und der Reinigung mittels UV/vis-Spektroskopie für die genannten Koproduktionen detektiert und nachvollzogen (Abbildung 3.21, E).

Wie für den Wildtyp (Abbildung 3.21, B), so wurden ebenso für *GtCPES\_M67A* intensiv gefärbte Zellpellets nach der Produktion über Nacht erhalten, welche bereits auf die erfolgreiche Synthese der Pigmente hinwiesen (Abbildung 3.21, A). Das Zellpellet der Koproduktion mit PEB wies eine violette Färbung und das der Koproduktion mit PCB eine türkise Färbung auf. Für die Koproduktion von wt*GtCPES* mit PcyA sowie Ho1 konnten hingegen keine Färbungen der Zellen bzw. Zellpellets beobachtet werden.



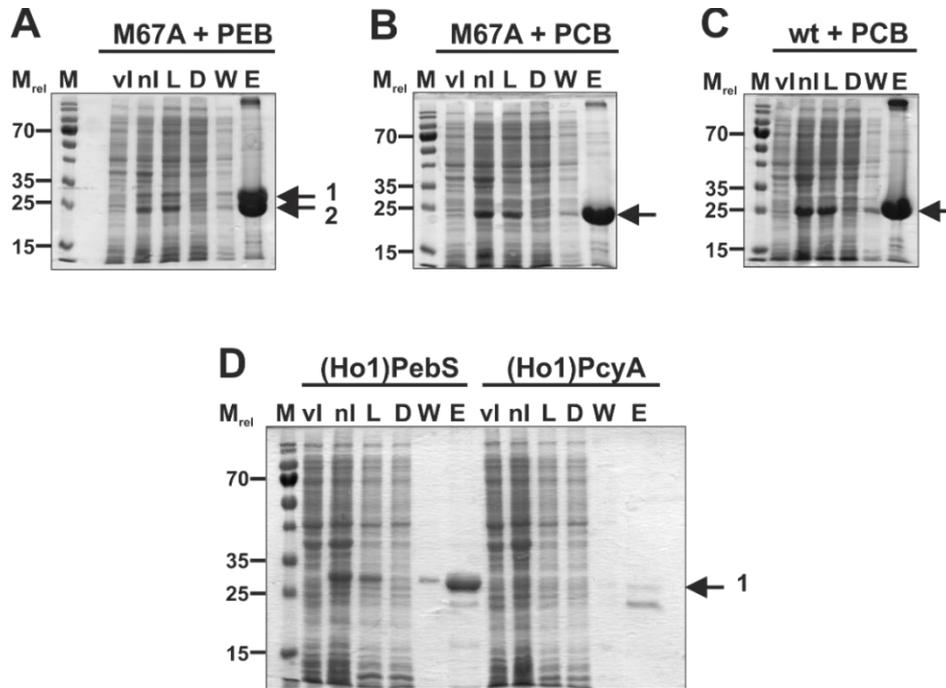
**Abbildung 3.21: Koproduktion des *GtCPES* Wildtyps und *GtCPES*\_M67A mit den Synthesenzymen für PCB und PEB und entsprechenden Kontrollen. A-C. Darstellung der *E. coli* BL21(DE3)-Zellpellets nach der Koproduktion (17 °C, über Nacht, LB-BS), der Lysate nach Zellaufschluss und der affinitätsgereinigten Elutionsprobe für die verschiedenen Koproduktionen. **A.** *GtCPES*\_M67A mit PEB (Ho1, PebS), mit PCB (Ho1, PcyA) und wt*GtCPES* mit PCB. **B.** Kontrolle mit *GtCPES* Wildtyp und PEB. **C.** Kontrolle der Koproduktion von Ho1 mit PebS bzw. PcyA ohne die Koproduktion einer PBP Lyase. **D.** Fluoreszenzemission des *in vivo* in *E. coli* erzeugten *GtCPES*\_M67A:PEB-Komplexes. Das Emissionsmaximum ist angegeben (in nm). Die Anregungswellenlänge betrug 550 nm. **E.** Absorptionsspektren der Reinigungsschritte für die Koproduktionen aus A zur Detektion möglicher gebildeter *GtCPES*:Phycobilin-Komplexe. Die Absorptionsmaxima der Elutionsproben sind angegeben (in nm).**

Nach Zellaufschluss zeigten die Absorptionsspektren der intensiv gefärbten Lysate für *GtCPES\_M67A* bereits detektierbare Phycobilinbindungen mit Absorptionsmaxima, vergleichbar zu denen der *in vitro* Bindung (Abbildung 3.21, E). Es konnte daher bereits an dieser Stelle von einer *in vivo* Komplexbildung ausgegangen werden. Innerhalb des Affinitäts-Reinigungsprozesses banden die gebildeten Komplexe effizient an die Affinitätssäule, im Durchlauf wurde kein Komplex detektiert. Im Fall von *GtCPES\_M67A*:PCB wurde auch beim Waschen kein Komplex oder PCB in lichtabsorbierenden Mengen von der Säule gelöst, wohingegen *GtCPES\_M67A*:PEB bereits in der Waschfraktion detektiert werden konnte. Eine Übersättigung der Affinitätssäule wurde hierfür verantwortlich gemacht. Nach Elution beider Komplexe von der Säule wurden deutliche Bindungsspektren mit dem jeweiligen Phycobilin erhalten. Die Absorptionsmaxima entsprachen weiterhin denen, der zuvor gemessenen *in vitro* Bindungen. Im Gegensatz zu der *in vitro* Bindung konnte für den *in vivo* erzeugten Komplex zwischen *GtCPES\_M67A* und PEB jedoch bei einer Anregungswellenlänge von 550 nm eine deutliche Fluoreszenzemission mit einem Maximum von 635 nm detektiert werden (Abbildung 3.21, D). Der Komplex war damit fluoreszent.

Weiterhin wurde ein vermittelter Transfer des gebundenen PEB auf *PmCpeB* für diesen Komplex mittels Fluoreszenzspektroskopie überprüft und bestätigt (Daten nicht gezeigt). Für die Kontrollkoproduktion mit *wtGtCPES* und PCB wurden weder das freie, noch das gebundene PCB detektiert. Das Gleiche galt für die Kontrollen ohne die koproduzierte PBP Lyase als Abnehmerprotein für die Phycobiline. Die Zellpellets und -lysatlösungen waren leicht gefärbt (Abbildung 3.21, C), zeigten aber keine detektierbaren Mengen an PEB und PCB (Daten nicht gezeigt).

Anhand von SDS-PAGEs wurde sichergestellt, ob die relevanten Proteine (FDBRs, PBP Lyase) produziert und gereinigt werden konnten (Abbildung 3.22). Hiermit konnte ausgeschlossen werden, dass eine fehlende Phycobilindetektion auf einer unzureichenden Produktion von *PebS* oder *PcyA* basierte. Aufgrund des ähnlichen Laufverhaltens der Proteine innerhalb der SDS-PAGE ließ sich jedoch schwer abschätzen, ob im Fall des *GtCPES* Wildtyps die Synthesenzyme für PCB unzureichend produziert wurden (Abbildung 3.22, C). Die Intensität der dargestellten Banden nach erfolgter Induktion und Reinigung war jedoch vergleichbar zu denen der übrigen Koproduktionen (Abbildung 3.22, A, B). Das ließ vermuten, dass die Produktion der gewünschten Proteine auch hier erfolgreich war. Bei Betrachtung der Produktion und

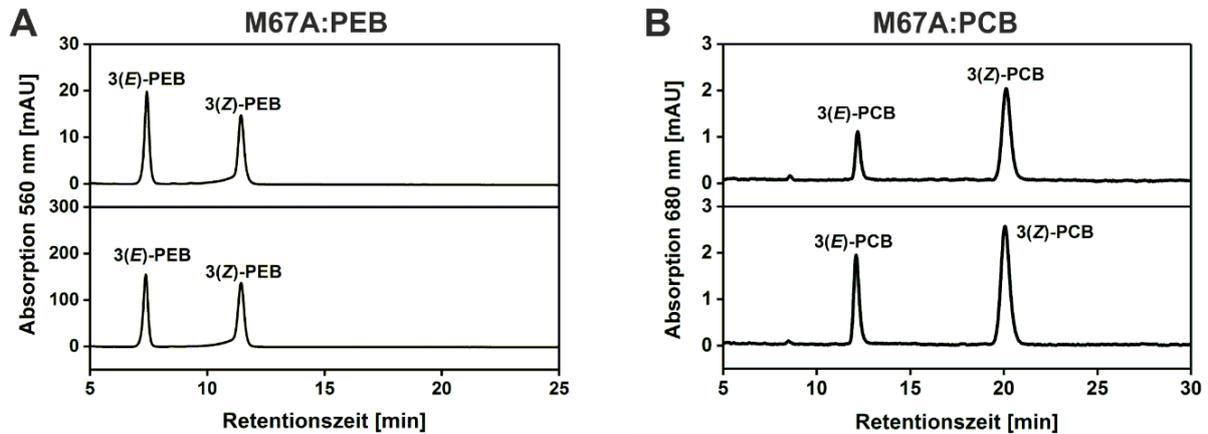
Reinigung von His-PebS und His-PcyA wurde außerdem deutlich, dass PebS in höheren Mengen als PcyA produziert wurde (Abbildung 3.22, D), wodurch dieses bei Koexpression innerhalb einer SDS-PAGE besser von der PBP Lyase zu unterscheiden war (Abbildung 3.22, A).



**Abbildung 3.22: SDS-PAGE der Produktion und Reinigung der verschiedenen Koproduktionsansätze.** A-C. Die Produktion von *GtCPES* (M67A) in *E. coli* BL21(DE3) fand bei 17 °C über Nacht in Koexpression mit pTDho1pebS (PEB) oder pTDho1pcyA (PCB) statt (A-C). Es wurde LB-BS-Medium verwendet. D. Kontrolle ohne PBP Lyase. Die Proteine wurden mit Affinitätschromatographie (TALON®) gereinigt. Die Pfeile markieren His-PebS bzw. His-PcyA (1; ~28,9 kDa bzw. ~29,2 kDa), und die His-*GtCPES*\_M67A und den Wildtyp (2; ~21,8 kDa). Aufgrund ähnlichen Laufverhaltens im Gel sind diese nicht immer deutlich voneinander zu unterscheiden (B, C). M<sub>rel</sub>: Relative Molekülmasse (x1000); M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher); vI: Zellprobe vor der Induktion; nI: Zellprobe nach der Induktion; L: Lysat; D: Durchlauf; W: Waschfraktion; E: Elution.

Bei Isolierung und Überprüfung der in der *GtCPES*\_M67A-Bindetasche befindlichen Phycobiline konnten anhand der HPLC-Spektren keine eindeutigen Aussagen getroffen werden, welches Isomer bevorzugt durch die Variante gebunden wurde und sich in der Bindetasche befand (Abbildung 3.23). Es wurden für beide Phycobiline sowohl das *E*- als auch das *Z*-Isomer mit vergleichbaren Absorptionsintensitäten detektiert, wobei Tendenzen für *GtCPES*\_M67A:PEB Richtung 3(*E*)-PEB und für *GtCPES*\_M67A:PCB zu 3(*Z*)-PCB vorlagen. Es gilt jedoch zu erwähnen, dass die *E. coli*-Zellpellets an dieser Stelle, im Gegensatz zur Koproduktion des Wildtyps *GtCPES* im

Komplex mit PEB (Kapitel 3.2.2), mittels Ultraschall aufgeschlossen wurden. Da die Zellsuspension sich innerhalb dieser Prozedur erwärmte, war eine Begünstigung des thermodynamisch stabileren Isomers durch diese Aufschlussmethode anzunehmen. Um in Bezug auf das gebundene Isomer genauere Aussagen treffen zu können, wäre eine Wiederholung der Analyse mit einer vorangegangenen druckbasierten Aufschlussmethode ratsam.



**Abbildung 3.23: HPLC-Profile der in *GtCPES\_M67A* gebundenen und isolierten Isomere von PCB und PEB.** PCB und PEB wurden durch Koproduktion von Ho1 und PebS bzw. PcyA in *E. coli* BL21(DE3) bei gleichzeitiger Produktion von His-*GtCPES\_M67A* produziert. Es wurde LB-BS-Medium verwendet. Nach Reinigung des Komplexes mittels Affinitäts-*tag* wurde dieser Komplex durch Ansäuerung denaturiert (0,1% TFA, 1:10) und PEB oder PCB mit Hilfe von Sep-Pak Säulen (Waters) isoliert. Die Phycobiline wurden mittels Gefriertrocknung (Lyophylle) bei -40 °C und 0,04 mbar getrocknet. Für die HPLC-Analyse wurde die 1100 Series HPLC-Anlage von Agilent Technologies in Kombination mit der C<sub>18</sub>-reversed-phase Luna 5µ C18 Säule (Phenomenex) verwendet. Die Isomere wurden bei 560 nm (PEB) bzw. 680 nm (PCB) detektiert. Laufmittel: 50% Aceton/ 50% Ameisensäure (20 mM); Flussrate: 0,6 ml/min.

### 3.5 Untersuchungen zum PCB-Transfer durch *GtCPES\_M67A*

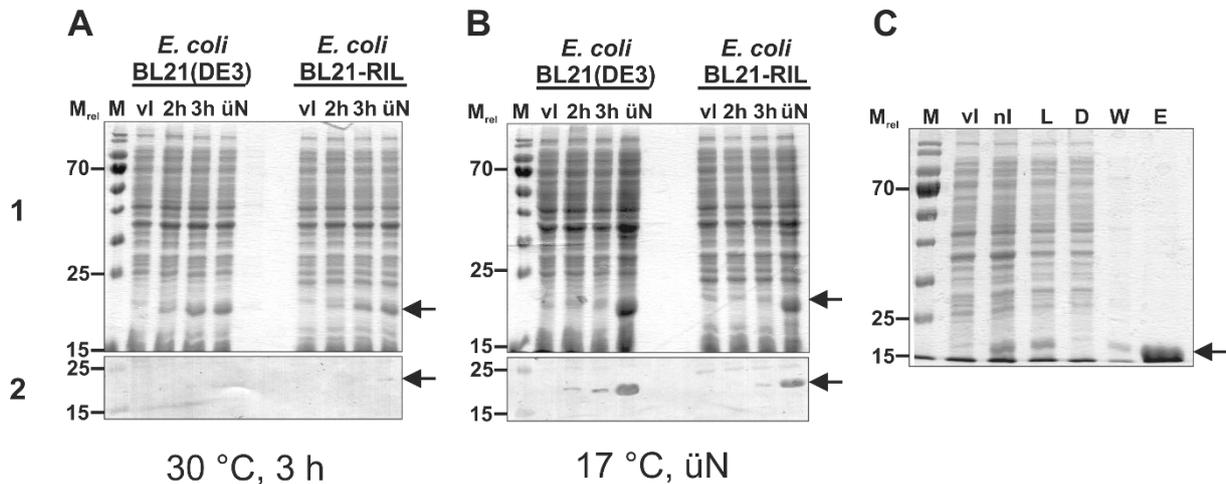
Nachdem gezeigt wurde, dass *GtCPES\_M67A* dazu in der Lage war, 3(*E*)-PCB sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in *E. coli* zu binden, und diese PBP Lyase damit ein erweitertes Substratspektrum aufwies, sollte anschließend überprüft werden, ob sie auch die Übertragung von PCB auf die PBP-β-Untereinheit *PmCpeB* vermitteln kann. Im nativen Zustand trägt die β-Untereinheit lediglich ein kovalent gebundenes PEB-Molekül am Cys<sup>82</sup> als Pigment (Steglich *et al.*, 2005). Daher wurden hinzukommende Kontrollexperimente mit einer PBP Lyase und einer PBP-Untereinheit durchgeführt, die in der Natur mit PCB assoziiert vorliegen. Hierfür wurden die PBP Lyase *NCpcS* aus *Nostoc* sp. PCC7120 und die

PBP- $\beta$ -Untereinheit SCpcB aus *Synechococcus* sp. PCC7002 verwendet. NCpcS ist dafür bekannt, sowohl die regiospezifische, kovalente Anbindung von PCB an Cys<sup>84</sup> von  $\alpha$ -APC sowie den  $\beta$ -Untereinheiten von PEC (PecB) und PC (CpcB) als auch die von PEB an beide Untereinheiten von C-PE zu unterstützen (Zhao *et al.*, 2007a). Die konservierten Cysteine Cys<sup>82</sup> und Cys<sup>153</sup> von SCpcB sind im nativen Zustand mit PCB-Molekülen beladen, womit sich diese Untereinheit als PCB-Akzeptorprotein zur Kontrolle eignete.

### 3.5.1 Kontrolltransfer von 3(E)-PCB auf SCpcB durch NCpcS

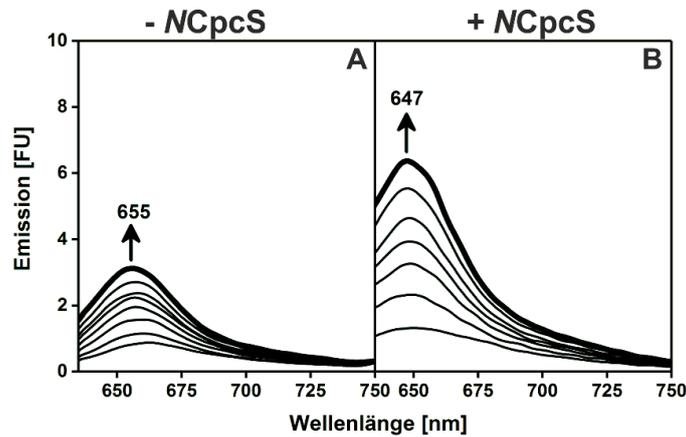
Nach der Klonierung von *cpcB* in den pCOLADuet-Vektor wurde das Gen zunächst in *E. coli* BL21(DE3) und in *E. coli* BL21-RIL testweise bei verschiedenen Temperaturen (17 °C, 30 °C) überexprimiert (Abbildung 3.24, A, B). Bei Vergleich beider SDS-PAGE-Gele und der Western-Blots zur Detektion ließ sich erkennen, dass His-SCpcB sich unabhängig vom verwendeten *E. coli*-Stamm bei 17 °C und einer Expression über Nacht produzieren ließ (Abbildung 3.24, B). Bei einer Expression bei 30 °C für 3 h konnte die PBP-Untereinheit nicht mittels Western-Blot Analyse detektiert werden (Abbildung 3.24, A2). Für weitere Produktionsansätze von SCpcB wurde *E. coli* BL21(DE3) verwendet. His-SCpcB ließ sich anschließend erfolgreich bei Anwendung einer Affinitätschromatographie reinigen (Abbildung 3.24, C).

Nach anschließender Dialyse, die der weiteren Reinigung und einem Pufferwechsel diente, und Konzentrierung des Proteins für die Kontrollmessungen, wurde das Protein direkt verwendet. Einfrieren und Wiederverwendung dieses Proteins war nicht möglich, da dieses in dem Fall stark aggregierte. Zur Überprüfung der Proteinstabilität wurde das gereinigte SCpcB mittels Schmelzpunktanalyse untersucht. Bei Auswertung der Schmelzkurven einer Dreifachbestimmung wurde ein stabiler Schmelzpunkt von 49,8 °C ( $\pm 0,3$ ) erhalten (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.24: SDS-PAGE-Gele der Produktion von His-SCpcB in *E. coli* BL21(DE3) und BL21-RIL bei unterschiedlichen Produktionsbedingungen und der Reinigung von His-SCpcB.** A, B. Die Produktion in *E. coli* BL21(DE3) und BL21-RIL wurden jeweils bei 30 °C für 3 h und bei 17 °C über Nacht in LB-Medium durchgeführt. Durch Probennahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Induktion (2 h, 3 h, ün) wurde die Produktion nachvollzogen. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt und dann mit Coomassie gefärbt (1) oder auf eine PVDF-Membran für den anschließenden Nachweis mittels Western-Blot (2) transferiert. Für die Detektion wurden Anti-Penta-His-Antikörper und Anti-Mouse IgG AP-Konjugat verwendet. C. His-SCpcB wurde schließlich bei 17 °C über Nacht in *E. coli* BL21(DE3) produziert und mittels Affinitätschromatographie (TALON®) gereinigt. Der Pfeil markiert His-SCpcB mit einer Größe ~20,1 kDa. M<sub>rel</sub>: Relative Molekülmasse (x1000); M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher); vl: Zellprobe vor der Induktion; nl: Zellprobe nach der Induktion; L: Lysat; D: Durchlauf; W: Waschfraktion; E: Elutionsfraktion; ün: über Nacht.

Auch die Produktion und Reinigung von His-NCpcS lieferten lösliches Protein, die Proteinproduktion war auch hier mittels Western-Blot nachweisbar (Abbildung 6.11). Im Anschluss an die Bindung von 3(*E*)-PCB durch NCpcS (Abbildung 6.12; Kapitel 6.2.3) wurde die Übertragung von PCB auf SCpcB untersucht. Die anhand von zeitabhängigen Fluoreszenzspektren detektierte spontane Assemblierung von PCB an SCpcB wurde im Vergleich zu der betrachtet, die bei Zugabe der PBP Lyase NCpcS erhalten wurde (Abbildung 3.25). Für beide Messungen wurde ein kontinuierlicher Anstieg der Emission mit der Zeit beobachtet. Bei Anwesenheit von NCpcS wurde jedoch eine höhere Emission mit einem Emissionsmaximum bei 647 nm detektiert (Abbildung 3.25, B). Da dieses Maximum in dem Bereich lag, der in der Literatur für PCB-beladenes  $\beta$ -Cys<sup>82</sup> von Phycocyanin beschrieben wird (644-648 nm) (Sauer und Scheer, 1988; Debreczeny *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 2006), wurde angenommen, dass das erwartete Produkt (SCpcB-Cys<sup>82</sup>-PCB) vorlag. Damit konnte der durch NCpcS vermittelte PCB-Transfer auf Cys<sup>82</sup> von SCpcB hier mittels Fluoreszenzspektroskopie gezeigt werden.

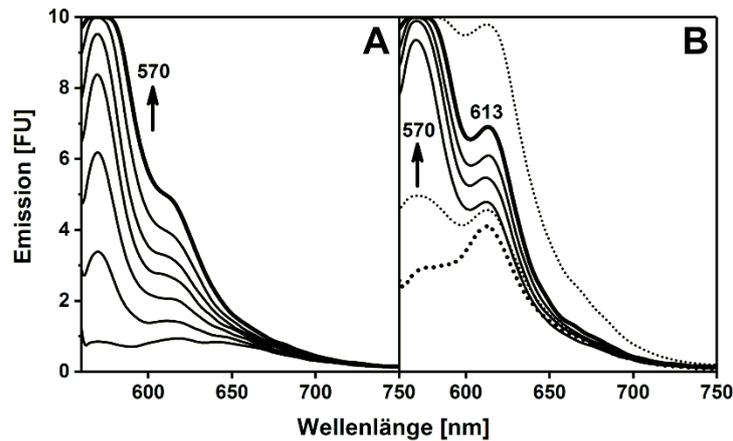


**Abbildung 3.25: Fluoreszenzspektren der zeitabhängigen Übertragung von 3(E)-PCB auf SCpcB bei An- und Abwesenheit der PBP Lyase NCpcS.** Für die Messung wurden 5  $\mu\text{M}$  freies 3(E)-PCB zunächst bei Bedarf mit 20  $\mu\text{M}$  NCpcS versetzt. Anschließend wurden 20  $\mu\text{M}$  SCpcB hinzugegeben. Nach 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 min wurden Fluoreszenzspektren detektiert. Das Spektrum nach 45 min ist in Fett hervorgehoben. Der zeitabhängige Emissionsverlauf und das Emissionsmaximum (in nm) sind angegeben. Die Anregungswellenlänge war 620 nm. **A.** 3(E)-PCB mit SCpcB. **B.** 3(E)-PCB mit NCpcS und SCpcB.

### 3.5.2 Phycobilin-Übertragung auf SCpcB durch GtCPES

Anschließend galt es zu überprüfen, ob zunächst ein Transfer von PEB auf SCpcB durch den Wildtyp von GtCPES möglich war. Hiermit sollte eine mögliche Interaktion zwischen GtCPES sowie der Proteinvariante GtCPES\_M67A mit SCpcB gezeigt werden. Aufgrund des ähnlichen Verhaltens des Wildtyps und GtCPES\_M67A in Bezug auf die Bindung und den Transfer von 3(Z)-PEB, wurde von einer PEB-Übertragung auf SCpcB durch GtCPES\_M67A abgesehen und davon ausgegangen, dass sich die Variante diesbezüglich wie die Wildtyp PBP Lyase verhält.

Der Phycobilintransfer auf SCpcB wurde sowohl für den *in vitro* als auch den *in vivo* gebildeten GtCPES:PEB-Komplex mittels Fluoreszenzspektroskopie betrachtet (Abbildung 3.26). Für beide Ansätze wurde ein kontinuierlicher Emissionsanstieg gezeigt. Dieser fiel für den *in vitro* gebildeten Komplex aber stärker aus und wurde nach 10 min Messdauer im Verhältnis 1:1 verdünnt, um eine weitere Detektion zu ermöglichen (Abbildung 3.26, B). Das Maximum mit der höchsten Emission lag für beide Messungen bei 570 nm und wich damit lediglich geringfügig von dem Wert für die Übertragung von PEB auf PmCpeB ab (568 nm) (Kapitel 3.2.4).

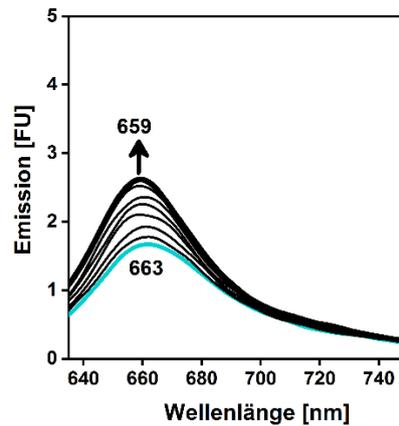


**Abbildung 3.26: Fluoreszenzspektren der zeitabhängigen Übertragung von PEB auf SCpcB durch GtCPES.** Nach jeweils 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 min Messdauer wurden Fluoreszenzspektren aufgenommen. Das Spektrum nach 45 min ist in Fett hervorgehoben. Der zeitabhängige Emissionsverlauf und die Emissionsmaxima (in nm) sind angegeben. Die Anregungswellenlänge war 620 nm. **A**, 20 µM GtCPES:PEB und 20 µM SCpcB, **B**, 5 µM 3(Z)-PEB, 20 µM GtCPES und 20 µM SCpcB wurden verwendet (gepunktete Linie) und ab 15 min im Verhältnis 1:1 verdünnt (durchgezogene Linie).

Aufgrund der Ähnlichkeit der Transferreaktionen zu der Übertragung auf PmCpeB wurde angenommen, dass die PBP Lyase GtCPES mit SCpcB interagieren konnte und ein vermittelter Transfer von PEB auf SCpcB möglich war. Ein weiteres Emissionsmaximum bei 613 nm wurde für den *in vitro* gebildeten Komplex beobachtet, dieses war für die *in vivo* Bindung von GtCPES und 3(Z)-PEB nur angedeutet (Abbildung 3.26, A). Eine unkontrollierte Bindung von freien, in der Reaktionslösung verbliebenen PEB an das andere konservierte Cystein (Cys<sup>153</sup>) von SCpcB sowie unerwünschte Interaktionen mit hydrophoben Bereichen des Apo-Proteins stellten mögliche Ursachen hierfür dar. Gestützt wurde diese Annahme dadurch, dass die *in vivo* Erzeugung von GtCPES:PEB freies PEB in der Reaktionslösung zu vermeiden vermag, und das erwähnte Maximum somit hier nicht deutlich auftrat (Abbildung 3.26, A).

Des Weiteren wurde untersucht, ob ein möglicher Transfer von PCB unterstützt durch GtCPES\_M67A stattfindet (Abbildung 3.27). Für diese Reaktion wurde 3(E)-PCB mit GtCPES\_M67A versetzt, um einen GtCPES\_M67A:PCB-Komplex zu erhalten und diesem anschließend SCpcB hinzugefügt. In Abhängigkeit von der Zeit wurde ein Anstieg der Emission beobachtet, der mit einer Verschiebung des Maximums von 663 nm zu 659 nm einherging, wobei die Anfangsemission die intrinsische Fluoreszenz des GtCPES\_M67A:PCB-Komplexes darstellt. Im Vergleich zu der NCpcS vermittelten

Übertragung fiel diese schwächer hinsichtlich der Emissionsintensitäten aus und erreichte mit etwa 3 FU lediglich die Hälfte der zuvor gemessenen Intensitäten (Abbildung 3.25, B).



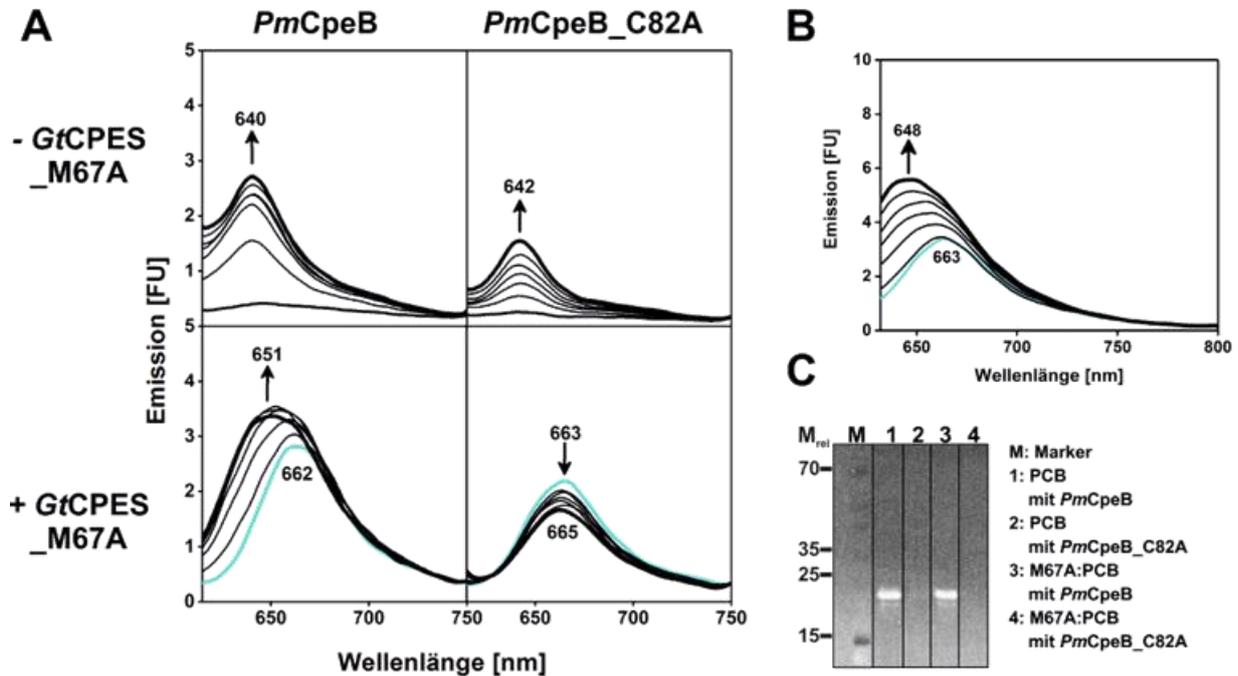
**Abbildung 3.27: Fluoreszenzspektrum der zeitabhängigen Übertragung von 3(E)-PCB auf SCpcB bei Anwesenheit von GtCPES\_M67A.** Für die Messung wurden 5  $\mu\text{M}$  freies 3(E)-PCB, 20  $\mu\text{M}$  GtCPES\_M67A und 20  $\mu\text{M}$  SCpcB verwendet. Nach 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 min wurden Fluoreszenzspektren aufgenommen. Das Spektrum nach 45 min ist in Fett hervorgehoben. Der fluoreszente GtCPES\_M67A:PCB-Komplex ist durch das türkise Spektrum nach 1 min Reaktionsdauer hervorgehoben. Der zeitabhängige Emissionsverlauf und das Emissionsmaximum (in nm) sind angegeben. Die Anregungswellenlänge betrug 620 nm.

Ein durch GtCPES\_M67A vermittelter PCB-Transfer konnte hiermit weder anhand des Emissionsmaximums noch anhand einer starken Fluoreszenzsteigerung eindeutig gezeigt werden. Da es sich hier jedoch nicht um die PBP Lyase handelte, die nativ PCB bindet und an dieses Apo-Protein vermittelt, resultiert eine geringere Emission womöglich aus einer ineffizienten Interaktion zwischen der PBP Lyase und der Apo-PBP-Untereinheit. Die Chromophorübertragung wäre hierdurch ebenfalls beeinträchtigt.

### 3.5.3 GtCPES\_M67A transferiert 3(E)-PCB auf Cys<sup>82</sup> von PmCpeB

Im nächsten Schritt wurde die vermittelte Übertragung von 3(E)-PCB durch GtCPES\_M67A auf PmCpeB untersucht, welches im nativen Zustand allerdings ein PEB-Molekül am konservierten Cys<sup>82</sup> bindet. Im Anschluss an die mittels Fluoreszenzspektroskopie verfolgten Übertragungsreaktionen wurde zusätzlich die Zink-induzierte Fluoreszenz möglicher, gebildeter kovalenter Bindungen überprüft (Abbildung 3.28). Durch die Komplexbildung der Zink-Ionen durch das kovalent gebundene Tetrapyrrol

sollte hiermit ein Nachweis für die Bildung von *PmCpeB*-PCB geliefert werden. Über 45 min wurden Fluoreszenzspektren für die Übertragung von 3(*E*)-PCB auf *PmCpeB* und die Variante *PmCpeB\_C82A*, bei welcher das relevante Cys<sup>82</sup> in Alanin ausgetauscht wurde, sowohl in An- als auch Abwesenheit von *GtCPES\_M67A* detektiert (Abbildung 3.28, A).



**Abbildung 3.28: Fluoreszenzspektren der zeitabhängigen Übertragung von 3(*E*)-PCB auf *PmCpeB* (C82A) bei An- und Abwesenheit von *GtCPES\_M67A* und Zink-Blot. A.** Für die Messung wurden 5  $\mu\text{M}$  freies 3(*E*)-PCB bei Bedarf zunächst mit 20  $\mu\text{M}$  *GtCPES\_M67A* versetzt, ansonsten wurden direkt 20  $\mu\text{M}$  *PmCpeB* oder *PmCpeB\_C82A* hinzugegeben. Nach 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 min wurden Fluoreszenzspektren detektiert. Das Spektrum nach 45 min ist in Fett hervorgehoben; der fluoreszente Komplex *GtCPES\_M67A:PCB* ist in Türkis dargestellt (1 min Messung). Die Anregungswellenlänge war 600 nm. Der zeitabhängige Emissionsverlauf und die Emissionsmaxima (in nm) sind angegeben. **B.** Wiederholung der PCB-Übertragung durch *GtCPES\_M67A* bei einer Anregungswellenlänge von 620 nm. **C.** Der Nachweis der kovalenten Bindung erfolgte mittels Zink-induzierter Fluoreszenz anhand eines Zink-Blots. Dieser wurde unter UV-Licht (312 nm) analysiert.  $M_{\text{rel}}$ : Relative Molekülmasse ( $\times 1000$ ).

Für die Reaktionsansätze ohne die Zugabe der PBP Lyase wurden kontinuierliche Emissionssteigerungen in Abhängigkeit von der Messdauer erhalten. Die Emission wies jedoch für beide eine geringe Intensität nach 45 min auf. Für die Reaktion mit *PmCpeB\_C82A* fiel diese noch geringer aus ( $\sim 2$  FU). Das Emissionsmaximum für *PmCpeB* lag bei 640 nm, für die Variante bei 642 nm. Obwohl diese Maxima nah beieinander lagen, wurde für den Reaktionsansatz, der 3(*E*)-PCB und *PmCpeB* enthielt, ein Fluoreszenzsignal

auf dem Zink-Blot detektiert, der auf eine kovalente Bindung zwischen Tetrapyrrol und PBP hinwies. Diese Beobachtung wurde für PCB und *PmCpeB* bereits durch Steglich *et al.* (2005) angestellt. Für die gleiche Reaktion mit *PmCpeB\_C82A* wurde kein Signal detektiert (Abbildung 3.28, C). Damit war zu erwarten, dass PCB spontan an das Cys<sup>82</sup> von *PmCpeB* bindet. Da es sich hierbei jedoch nicht um den nativ gebundenen Chromophor handelte, lassen sich die geringen Fluoreszenzintensitäten womöglich mit einer ineffizienten spontanen Ligation erklären. Aufgrund unkontrollierter Bindung in Abwesenheit der PBP Lyase kam es zudem vermutlich zu einer heterogenen Produktverteilung hinsichtlich der Konfiguration von PCB an Cys<sup>82</sup>-*PmCpeB*. Das könnte eine Abweichung des Absorptionsmaximums von denen der Literatur für das strukturell ähnliche PCB-Cys<sup>82</sup>-CpcB erklären (644-648 nm) (Sauer und Scheer, 1988; Debreczeny *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 2006). Die wider Erwarten detektierten Fluoreszenzsignale geringer Intensität für die Reaktion von *PmCpeB\_C82A* mit PCB könnten ihren Ursprung in Interaktionen von PCB mit hydrophoben Bereichen der Untereinheit besitzen.

Bei Anwesenheit der PBP Lyase *GtCPES\_M67A* zeigte die Emission einen kontinuierlichen Anstieg in Abhängigkeit von der Messdauer und eine Verschiebung des Emissionsmaximums (Abbildung 3.28, A). Das Maximum zu Beginn (662 nm) beschrieb die Fluoreszenz des *GtCPES\_M67A*:PCB-Komplexes. Nach einer Messdauer von 45 min lag das Emissionsmaximum bei 651 nm und damit geringfügig über den Werten, die in der Literatur für PCB-Cys<sup>82</sup>-CpcB beschrieben sind. Diese liegen zwischen 644 nm und 648 nm (Sauer und Scheer, 1988; Debreczeny *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 2006). Die Emissionsintensität war jedoch auch hier mit etwa 3,5 FU niedriger als für die PCB-Übertragung durch *NCpcS* (Abbildung 3.25; Kapitel 3.5.1). Ein detektierbares Fluoreszenzsignal auf dem Zink-Blot unterstützte dennoch die Aussage, dass eine kovalente Bindung gebildet wurde und es sich damit um einen vermittelten Transfer von PCB handelte (Abbildung 3.28, C). Da für das PCB chromophorylierte PC-β-Cys<sup>82</sup> (PCB-Cys<sup>82</sup>-CpcB) ein Absorptionsmaximum zwischen 617 nm und 628 nm beschrieben wurde, wurde die Anregungswellenlänge auf 620 nm angehoben (Sauer und Scheer, 1988; Debreczeny *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 2006). Bei Wiederholung der Messung mit einer Anregungswellenlänge von 620 nm statt 600 nm wurde eine Intensität von etwa 6 FU mit einem Emissionsmaximum um 648 nm erreicht (Abbildung 3.28, B). Diese Werte ähnelten denen der *NCpcS*-vermittelten Übertragung und bekräftigten damit die Aussage einer hier vorliegenden PCB-Übertragung. Für den Reaktionsansatz bei Verwendung von *PmCpeB\_C82A* als PCB-Akzeptorprotein

wurde lediglich eine Abnahme der Emission bei einem nahezu gleichbleibenden Maximum (665 nm) beobachtet (Abbildung 3.28, A), vermutlich verursacht durch Ausbleichen des fluoreszenten *GtCPES\_M67A*:PCB-Komplexes. Mittels Zink-induzierter Fluoreszenz konnte weiterhin keine kovalente Bindung detektiert und eine Übertragung auf *PmCpeB* damit an dieser Stelle ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich lag damit ein durch *GtCPES\_M67A* vermittelter Transfer von PCB auf das konservierte Cys<sup>82</sup> von *PmCpeB* vor. Durch den tryptischen Verdau des erhaltenen Transferproduktes sollten mögliche chromophorylierte Peptide (Chromopeptide) mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Hierbei wurden ausschließlich Peptide mit dem relevanten Cys<sup>82</sup> betrachtet. Es konnten allerdings keine Chromopeptide von *PmCpeB* gefunden und damit die Annahme einer *GtCPES\_M67A* vermittelten PCB-Übertragung auf *PmCpeB*-Cys<sup>82</sup> nicht eindeutig bestätigt werden. Experimentelle Fehler sind an dieser Stelle nicht auszuschließen und eine Wiederholung dieses Nachweises sollte zukünftig durchgeführt werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Funktion von GtCPES in *G. theta*

Cryptophyten verwenden sowohl Chlorophyll-haltige Antennenkomplexe als auch PBP für die Lichtsammlung. Obwohl Cryptophyten im Laufe der Evolution aus Cyanobakterien bzw. Rotalgen hervorgingen, unterscheiden sich cryptophytische PBP dennoch deutlich hinsichtlich der Lokalisation, Organisation, Struktur und Chromophorbesetzung von den PBP der anderen Organismen. Der cryptophytische Modellorganismus *G. theta* verwendet lediglich das PBP PE545. Über spezifische Cysteininbindestellen liegt es mit den Phycobilinen PEB und DHBV assoziiert vor. Im Vergleich mit der Assemblierung cyanobakterieller PBP ist die PBP Assemblierung in Cryptophyten bisher nur wenig untersucht.

Die kovalente Bindung von Phycobilinen an ihre entsprechenden Apo-PBP erfolgt in Cyanobakterien regulär mit Hilfe von PBP Lyasen (Scheer *et al.*, 2008). Es existieren nur wenige Ausnahmen, bei denen eine autokatalytische Chromophorylierung stattfindet (Zhao *et al.*, 2005a; Hu *et al.*, 2006). Eine Ausnahme stellt das Linkerprotein ApcE (L<sub>CM</sub><sup>99</sup>) aus *Nostoc* sp. PCC7120 dar, für das eine autokatalytische Fähigkeit nachgewiesen wurde (Zhao *et al.*, 2005a). ApcE ist das Apo-Protein des Linkers, der den Phycobilisomenkern mit der Thylakoidmembran verbindet. Der gebildete Komplex zwischen ApcE und PCB, welches am Cys<sup>159</sup> gebunden ist, lässt sich spektroskopisch nicht vom nativen Holo-Protein unterscheiden. ApcE ist folglich dazu fähig, die stereochemisch korrekte Bindung von PCB zu kontrollieren.

Wie die Assemblierung von PBP und insbesondere die Ligation des Chromophors in Cryptophyten erfolgt, blieb bisher jedoch wenig erforscht. Für die Cryptophyte *G. theta* wurden vier Gene identifiziert, die für putative PBP Lyasen kodieren. Zwei dieser wurden bereits eingehender untersucht und als PBP Lyasen annotiert: *GtCPET* und *GtCPES* (Bolte *et al.*, 2008; Overkamp *et al.*, 2014b) (Tabelle 4.1). Während für *GtCPET* die Fähigkeit nachgewiesen wurde, das Fehlen einer T-Typ-Lyase in *Synechocystis* sp. PCC6803 zu komplementieren, und damit den Transfer von PCB an Cys<sup>155</sup> der PBP  $\beta$ -Untereinheit zu vermitteln (Bolte *et al.*, 2008), konnte für *GtCPES* zuvor lediglich die Phycobilinbindung untersucht werden (Overkamp *et al.*, 2014b).

#### 4.1.1 GtCPES transferiert 3(Z)-PEB auf $\beta$ -Cys<sup>82</sup>

Mit Hilfe von vorangegangenen BLAST-Recherchen sowie der Strukturaufklärung von GtCPES wurde diese PBP Lyase dem S/U-Typ zugeordnet. Da PBP Lyasen des S/U-Typs insbesondere die korrekte PEB-Anbindung an dem konservierten  $\beta$ -Cys<sup>82</sup> von PE545 vermitteln, wurde neben der bereits gezeigten Bindung von PEB auch diese Aktivität für GtCPES postuliert (Overkamp *et al.*, 2014b). Spektroskopische Untersuchungen des in *E. coli* produzierten PBP Lyase:Phycobilin-Komplexes zwischen GtCPES und PEB weisen darauf hin, dass GtCPES mit hoher Wahrscheinlichkeit unter natürlichen Bedingungen das Z-Isomer bindet (Overkamp *et al.*, 2014b). Daher wurde 3(Z)-PEB als der unter natürlichen Bedingungen gebundene Ligand für die Transferuntersuchungen verwendet. Mit Hilfe von UV/vis- und Fluoreszenzspektroskopie wurde in dieser Arbeit der Transfer von 3(Z)-PEB auf das Cys<sup>82</sup> der  $\beta$ -Untereinheit von *P. marinus* MED4 (*PmCpeB*) sowohl mit dem *in vitro* als auch dem *in vivo* produzierten GtCPES:PEB-Komplex gezeigt und die Transferaktivität damit nachgewiesen (Kapitel 3.2.4). Das Fluoreszenzmaximum für das gebildete Holo-Protein PEB-Cys<sup>82</sup>-*PmCpeB* war vergleichbar zu dem Wert, der bereits für die Übertragung von 3(Z)-PEB durch *PmCpeS* aus *P. marinus* MED4 erhalten wurde (Steglich *et al.*, 2005; Wiethaus *et al.*, 2010a). Zudem konnte eine gebildete kovalente Bindung bestätigt werden. Die spontane Ligation von 3(Z)-PEB oder 3(E)-PCB an Cys<sup>82</sup>-*PmCpeB* führte ebenfalls zu der Bildung einer kovalenten Bindung, lieferte jedoch nicht das gewünschte native Holo-PBP, sondern vermutlich ein heterogenes Produktgemisch (Arciero *et al.*, 1988a; Fairchild und Glazer, 1994a; Steglich *et al.*, 2005; Wiethaus *et al.*, 2010a). Ein Grund hierfür sind neben der geringen Spezifität spontaner Chromophorbindungen auch Nebenreaktionen, welche die Eigenschaften der Chromophore und damit des PBP beeinflussen können. Mittels Massenspektrometrie konnte die kovalente Bindung von PEB an Cys<sup>82</sup> jedoch nicht nachgewiesen werden. Da sich die massenspektroskopische Analyse bereits für die Untersuchung anderer PBP Lyasen und deren Transferaktivität als aufschlussreich erwiesen hat, sollte sie zukünftig wiederholt werden (Zhao *et al.*, 2007b; Saunée *et al.*, 2008; Wiethaus *et al.*, 2010a; Kronfel *et al.*, 2019a). Für die Übertragung durch *PmCpeS* aus *P. marinus* MED4 konnte beispielsweise anhand der Massenspektrometrie gezeigt werden, dass PEB kovalent gebunden am Cys<sup>82</sup>-*PmCpeB* vorlag. Außerdem wurde die Bildung von DHBV-Cys<sup>82</sup>-*PmCpeB* bei spontaner PEB-Assemblierung und damit eine Reoxidation von PEB bei unvermittelter Ligation nachge-

wiesen (Wiethaus *et al.*, 2010a). Da der massenspektroskopische Nachweis mit der dazugehörigen Probenaufarbeitung in dieser Forschungsarbeit nur einmalig durchgeführt wurde und Handhabungsfehler nicht auszuschließen sind, gilt es, die Methode zu wiederholen und den Nachweis in Zukunft zu erbringen.

Zusammenfassend weist *GtCPES* mit der hohen Substratspezifität (PEB, DHBV; Overkamp *et al.*, 2014b) und der spezifischen Übertragung auf Cys<sup>82</sup>, die für den S-Typ PBP Lyasen typischen Eigenschaften auf. Dabei war die Disulfidbrücke, welche die beiden *GtCPES*-Monomere im Homodimer miteinander verbindet, nachweislich weder für die Bindung von 3(*Z*)-PEB noch für dessen Übertragung von Bedeutung (Kapitel 3.2.5). Mit Hilfe von Gelfiltrationsversuchen unter reduzierten Bedingungen konnten bereits Overkamp *et al.* (2014b) zeigen, dass die Disulfidbrücke für die Dimerisierung von *GtCPES* nicht essenziell ist. Es wird angenommen, dass bereits die Interaktionsfläche der beiden Monomere zur Ausbildung eines Dimers ausreicht. An der Interaktionsfläche befinden sich insbesondere Isoleucin- und Leucinreste, aber auch geladene Aminosäurereste (Arg, His, Glu, Ser). Durch die Disulfidbindung könnte diese Struktur zusätzlich stabilisiert werden. Eine im Vergleich zum Wildtyp gemessene geringere Schmelztemperatur einer *GtCPES* Variante mit fehlender Disulfidbrücke (*GtCPES\_C149A*) bekräftigt diese Annahme. Möglicherweise ist die Ausbildung des Dimers trotzdem nicht von Bedeutung für die PBP Lyase-Aktivität von *GtCPES*. Für S-Typ-PBP Lyasen sind sowohl funktionelle Vertreter in Form von Homodimeren, Heterodimeren als auch Monomeren bekannt (Zhao *et al.*, 2007a; Saunée *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008; Wiethaus *et al.*, 2010a; Zhou *et al.*, 2014). Die Struktur der Dimerisierungsgrenzfläche zwischen den Monomeren von *NCpcT* aus *Nostoc* sp. PCC7120 ist beispielsweise relevant für deren Chaperonfunktion und schirmt zusätzlich das reaktive und labile PCB-Molekül vor unerwünschten Reaktionen ab (Zhou *et al.*, 2014). Weder anhand der Kristallstruktur des *GtCPES*-Dimers noch mittels des in Overkamp *et al.* (2014b) präsentierten Interaktionsmodells für das Homodimer von *GtCPES* mit dem Apo-Protein RCS-CpeB aus *Rhodomonas* sp. CS24 lässt sich eine strukturelle Funktion des Dimers zum Schutz des Chromophors ableiten. Die Dimerstruktur sowie deren Oberflächenladung stabilisieren in *GtCPES* womöglich lediglich die Interaktion mit dem Apo-Protein und kommen keiner schützenden Funktion nach.

Die Verwendung des nativen Apo-Proteins *GtCpeB* aus *G. theta* für die *in vitro* Untersuchung der PEB-Übertragung war in dieser Arbeit nicht möglich, da dieses nicht in löslicher

Form vorhanden war (Overkamp, 2014). Als geeignete Alternative bot sich die cyanobakterielle  $\beta$ -Untereinheit *PmCpeB* an, mit der bereits der vermittelte PEB-Transfer durch die S-Typ-PBP Lyase *PmCpeS* aus *P. marinus* MED4 nachvollzogen wurde (Wiethaus *et al.*, 2010a). Die Verwendung anderer cyanobakterieller  $\beta$ -Untereinheiten ist aufgrund der hohen Konservierung durchaus üblich und häufig möglich (Zhao *et al.*, 2006a; Zhao *et al.*, 2007a; Zhao *et al.*, 2007b; Kupka *et al.*, 2009; Biswas *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2014). *PmCpeB* stammt aus dem Starklicht (*high-light*, HL)-adaptierten Cyanobakterium *P. marinus* MED4, welches ein degeneriertes PE in Form dieser  $\beta$ -Untereinheit besitzt. Neben einem weiteren, für die Phycobilinbindung irrelevanten Cystein (Cys<sup>61</sup>), weist die Aminosäuresequenz lediglich das konservierte Cys<sup>82</sup> auf (Steglich *et al.*, 2005). Da eine notwendige sequenzielle Beladung der vier konservierten Cysteine (Cys<sup>50/61</sup>, Cys<sup>82</sup>, Cys<sup>158</sup>) von *GtCpeB* nicht auszuschließen ist, lieferte diese strukturelle Gegebenheit den Vorteil, dass die gewünschte Cystein-Position durch die PBP Lyase direkt anzusteuern war. In Bindestudien mit den PBP Lyasen CpcT1 und CpcS1 aus *Nostoc* sp. PCC7120 wurde durch Zhao *et al.* (2007b) erkannt, dass eine korrekte Chromophorbindung sowohl an Cys<sup>82</sup> als auch an Cys<sup>155</sup> der PBP-Untereinheiten von PC und PEC (CpcB, PecB) nur dann möglich war, wenn zunächst Cys<sup>155</sup> durch CpcT1 mit PCB beladen wurde. Im umgekehrten Fall wird die Chromophorylierung des Cys<sup>155</sup> durch das von CpcS1 chromophorylierte Cys<sup>82</sup>-PCB gehemmt (Zhao *et al.*, 2007b). Ebenso konnte für die Chromophorylierung von *FdCpeB* aus *F. diplosiphon* gezeigt werden, dass die Aktivität von CpeF, die bei der Ligation des doppelt gebundenen PEB an Cys<sup>48</sup>/Cys<sup>59</sup> involviert ist, mit zunehmender partieller Chromophorylierung steigt (Kronfel *et al.*, 2019a). Bisher ist die Beladungsreihenfolge allerdings nur geringfügig untersucht und sollte zukünftig auch für die Untereinheiten von PE545 eingehender betrachtet werden. Außerdem wäre es von Vorteil, *GtCpeB* in löslicher Form zu gewinnen. Hiermit ließe sich sowohl die Beladungsreihenfolge untersuchen als auch die in dieser Arbeit gezeigten Transferstudien wiederholen, und damit schließlich die *GtCPES*-vermittelte Übertragung von 3(*Z*)-PEB auf diese verifizieren.

### 4.1.2 Zur Substratspezifität von GtCPES

Unter den PBP Lyasen existieren diverse charakterisierte Vertreter (Tabelle 4.1), so auch in der Gruppe der S-Typ PBP Lyasen. Ihnen gemein ist ihre häufig ausgeprägte Spezifität für die Cystein-Chromophorylierungsstelle (Cys<sup>82</sup>), an welche sie den Phycobilintransfer vermitteln. Gleichzeitig besitzen sie allgemein eine eher geringe Spezifität für die Apo-PBP-Untereinheit, zu dem diese Bindestelle gehört (Zhao *et al.*, 2007a; Zhao *et al.*, 2007b; Saunée *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008; Biswas *et al.*, 2010). Ihre Substrat- oder auch Ligandenspezifität hingegen kann sehr unterschiedlich sein, wobei nicht jedes gebundene Phycobilin auch durch die PBP Lyase übertragen werden kann. Für NCpcS1 aus *Nostoc* sp. PCC7120 und SCpcS/CpcU aus *Synechococcus* sp. PCC7002 konnten lediglich die vermittelten Übertragungen von PCB nachgewiesen werden (Zhao *et al.*, 2006a; Zhao *et al.*, 2007a; Zhao *et al.*, 2007b; Saunée *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008). PmCpeS aus *P. marinus* MED4 und FdCpeS aus *F. diplosiphon* sind hingegen an dem Transfer von PEB beteiligt (Wiethaus *et al.*, 2010a; Biswas *et al.*, 2011). TeCpcS aus *T. elongatus* stellt einen besonderen Vertreter dar, denn diese PBP Lyase unterstützt neben der Übertragung von PEB und PCB auch die von PΦB, womit sie als universelle PBP Lyase gilt (Kronfel *et al.*, 2013). Um diese Varianz bei der Substratspezifität aufbringen zu können, besitzt sie eine angepasste Bindetasche, in welcher sie die genannten Phycobiline binden kann. Da es sich bei den zyklisch-helikalen PCB und PΦB im Vergleich zu PEB um eher rigide Molekülstrukturen handelt, ist die Bindetasche damit entsprechend groß (Abbildung 3.15).

Die cryptophytische PBP Lyase GtCPES besitzt hingegen aufgrund sterisch anspruchsvoller Aminosäuren eine räumlich beengte Ligandenbindetasche und eine hieraus resultierende eingeschränkte Substratspezifität. In ihrer hydrophoben Bindetasche bindet sie lediglich Phycobiline mit einer reduzierten C15, C16-Doppelbindung (PEB, DHBV), wobei ausschließlich PEB durch GtCPES auf das β-Cys<sup>82</sup> des Apo-Proteins transferiert wird.

**Tabelle 4.1: Übersicht der bisher charakterisierten PBP Lyasen aus Cyanobakterien und Cryptophyten.**

Typ	Bsp.	Organismus	Aktivität	Referenz
E/F	CpcE/F	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	PCB:α-Cys <sup>84</sup> -PC-Lyase	Fairchild <i>et al.</i> , 1992
	PecE/F	<i>Mastigocladus laminosus</i>	PCB:α-Cys <sup>84</sup> -PC-Lyase/ Isomerase (PVB)	Zhao <i>et al.</i> , 2000
	RpcG	<i>Synechococcus</i> sp. WH8102	PEB:α-Cys <sup>84</sup> -PC-Lyase/ Isomerase (PUB)	Blot <i>et al.</i> , 2009
	CpeY/Z	<i>Fremyella diplosiphon</i>	PEB:α-Cys <sup>82</sup> -PE-Lyase	Biswas <i>et al.</i> , 2011 Kronfel <i>et al.</i> , 2019b
	MpeZ	<i>Synechococcus</i> sp. RS9916	PEB:α-Cys <sup>83</sup> -PEII-Lyase/ Isomerase (PUB)	Shukla <i>et al.</i> , 2012
	CpcE/F	<i>Nostoc</i> sp. PCC7120	PCB:α-Cys <sup>84</sup> -PC-Lyase <sup>a</sup>	Zhao <i>et al.</i> , 2017
	CpeF/Z	<i>Fremyella diplosiphon</i>	PEB:β-Cys <sup>48</sup> /Cys <sup>59</sup> -PE-Lyase	Kronfel <i>et al.</i> , 2019a
S/U	CpcS-III	<i>Nostoc</i> sp. PCC7120	PCB:β-Cys <sup>84</sup> -PC-Lyase PCB:β-Cys <sup>84</sup> -PEC-Lyase PCB:α-Cys <sup>82</sup> -APC-Lyase	Zhao <i>et al.</i> , 2006a; Zhao <i>et al.</i> , 2007a
	CpcS-I/ CpcU	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	PCB:α/β-Cys <sup>81</sup> -APC-Lyase PCB: β-Cys <sup>82</sup> -PC-Lyase	Saunée <i>et al.</i> , 2008 Shen <i>et al.</i> , 2008
	CpcS-III	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	PCB/PEB/PΦB:β-Cys <sup>82</sup> -PC-Lyase PCB/PEB/PΦB:α/β/ApcD/ApcF- Cys <sup>82</sup> -APC-Lyase	Kronfel <i>et al.</i> , 2013
	CpeS	<i>Prochlorococcus marinus</i> MED4	PEB:β-Cys <sup>82</sup> -PE-Lyase	Wiethaus <i>et al.</i> , 2010a
	CpeS	<i>Fremyella diplosiphon</i>	PEB:β-Cys <sup>80</sup> -PE-Lyase	Biswas <i>et al.</i> , 2011
	CPES	<i>Guillardia theta</i>	PEB: β-Cys <sup>82</sup> -PE-Lyase	Overkamp <i>et al.</i> , 2014b Diese Arbeit
	T	CpcT	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	PCB:β-Cys <sup>153</sup> -PC-Lyase
	CpcT	<i>Nostoc</i> sp. PCC7120	PCB:β-Cys <sup>155</sup> -PEC-Lyase	Zhao <i>et al.</i> , 2007b
	CPET	<i>Guillardia theta</i>	PEB:β-Cys <sup>155</sup> -PC-Lyase <sup>b</sup>	Bolte <i>et al.</i> , 2008
	ΦCpeT	Cyanophage P-HM1	PEB:β-Cys <sup>153</sup> -PE-Lyase <sup>a,c</sup>	Gasper <i>et al.</i> , 2017

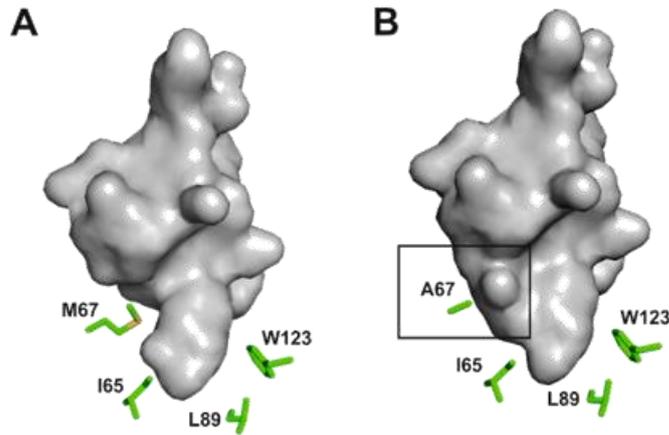
a: Postuliert, nicht nachgewiesen.

b: Funktion heterolog gezeigt als PCB:β-Cys<sup>155</sup>-PC-Lyase in *Synechocystis* sp. PCC6803.

c: Unterstützt Transferaktivität von *PmCpeS* auf β-Cys<sup>82</sup> aus *P. marinus* MED4.

**Met<sup>67</sup> verantwortet die hohe Substratspezifität von GtCPES**

Um die Substratspezifität von GtCPES genauer zu untersuchen, wurden basierend auf der Kristallstruktur von TeCpeS als Modell, Proteinvarianten mit vergrößerter Bindetasche geplant. Anhand von diesen konnte gezeigt werden, dass bereits der Austausch einer Aminosäure (Met<sup>67</sup>) die Substratspezifität von GtCPES sowohl *in vivo* als auch *in vitro* auf PCB erweiterte (Kapitel 3.4). Der erzeugte Komplex zwischen GtCPES\_M67A und PCB wies hierbei eine zum Wildtyp mit PEB ähnliche Bindungsaffinität auf. GtCPES\_M67V zeigte ebenfalls eine PCB-Bindeaktivität. Der Austausch von mehreren Aminosäuren führte hingegen zu einer reduzierten PEB-Bindekapazität sowie zu Fehlfaltungen und Proteinaggregation. Für die Substratspezifität von GtCPES kommt dem Methionin an Position 67 damit eine wichtige Bedeutung zu. Dieses liegt so zentriert in der Bindetasche, dass es den mittleren Bereich dieser deutlich einengt und den inneren Bindungsbereich damit abgrenzt (Abbildung 4.1, A). Durch diesen Umstand lässt sich das rigide PCB-Molekül mit einer Doppelbindung zwischen C15 und C16 nicht binden. Die zielgerichtete Mutagenese in Alanin erzeugte jedoch eine vergrößerte Tasche in diesem Bereich (Abbildung 4.1, B), welche die Bindung von PCB ermöglichte. Ein Austausch von Ile<sup>65</sup>, das sich im unteren Bereich der Bindetasche befindet, zum räumlich weniger anspruchsvollen Alanin genügte hingegen nicht aus, um zusätzlich zu PEB auch PCB zu binden. In anderen lediglich PEB-bindenden sowie -übertragenden S-Typ-PBP Lyasen (*FdCpeS*, *PmCpeS*) befindet sich an der homologen Position zu Met<sup>67</sup> ebenfalls ein Methionin oder ein Isoleucin (Abbildung 3.11; Kapitel 3.3). Zusätzlich oder ausschließlich PCB-transportierende PBP Lyasen dieses Typs (*TeCpcS*, *NCpcS*) weisen hingegen ein Valin auf (Wiethaus *et al.*, 2010a; Biswas *et al.*, 2011; Kronfel *et al.*, 2013). Die genannten Aminosäuren sind unpolar und sich in ihren Eigenschaften ähnlich, können aber je nach Ausrichtung sterisch unterschiedlich anspruchsvoll sein. Methionin ist durch das zusätzliche Schwefelatom jedoch nochmals räumlich ausladender als die übrigen genannten Reste.



**Abbildung 4.1: Volumenstruktur der Bindetasche von *GtCPES* und *GtCPES\_M67A*.** A. *GtCPES* mit sterisch anspruchsvollen Aminosäuren vor dem Aminosäureaustausch (in Grün). B. *GtCPES\_M67A* Proteinvariante mit vergrößerter Bindetasche.

Obwohl T- und S-Typ PBP Lyasen in ihrer Struktur ähnlich zueinander sind, weichen die Absorptionsspektren von CpcT-gebundenem und *GtCPES\_M67A*-gebundenem PCB deutlich voneinander ab. In der Ligandenbindetasche von NCpcT aus *Nostoc* sp. PCC7120 wird PCB in einer zyklisch-helikalen Konformation, ähnlich der frei vorliegenden Struktur von PCB gebunden, was anhand vergleichbarer Absorptionsspektren nachzuvollziehen ist ( $A_{\max} = 370 \text{ nm}/618 \text{ nm}$ ) (Zhou *et al.*, 2014). Weder eine deutliche Verschiebung der Maxima (Rotverschiebung) noch eine Erhöhung der Extinktion traten ein. Trotz ähnlicher Struktur zu CpcT, weist  $\Phi\text{CpeT}$  aus dem Cyanophagen P-HM1 für die Bindung mit PEB jedoch ein typisches Bindungsspektrum mit den genannten Merkmalen auf, das auf eine gestreckte Konformation des gebundenen PEB in der kompakten Lyasenstruktur hindeutet (Gasper *et al.*, 2017). Die Kompaktheit von  $\Phi\text{CpeT}$  bedingt womöglich auch die Fluoreszenz des  $\Phi\text{CpeT}$ :PEB-Komplexes, da PEB bei Bindung durch die PBP Lyase deutlich in Bezug auf konformelle Änderungen eingeschränkt ist. In wt*GtCPES* wird PEB ebenfalls in einer gestreckten Konformation gebunden (Overkamp *et al.*, 2014b). Für die Bindung von 3(*E*)-PCB durch *GtCPES\_M67A* wurden sowohl eine deutliche Rotverschiebung des Absorptionsmaximums ( $A_{\max} = 639 \text{ nm}$ ) als auch eine Extinktionssteigerung gezeigt. Ein Doppelpeak wurde nicht gebildet, durch eine Schulter erschien der Absorptionsspek jedoch breiter. Das Erscheinungsbild sowie die Extinktionssteigerung des Maximums sind dahingehend konsistent mit dem für *TeCpcS*:PCB aus *T. elongatus*. Für diesen Komplex wird eine eher gestreckte Konformation von PCB postuliert (Kronfel *et al.*, 2013). Obwohl

das Maximum von dem für *GtCPES\_M67A*:PCB detektierten Absorptionsmaximum abweicht ( $A_{\max} = 605 \text{ nm}$ ), wird für *GtCPES\_M67A*:PCB damit ebenfalls von einer gestreckten Konformation des PCB-Moleküls in der Bindetasche ausgegangen. Die deutliche Rotverschiebung des Maximums könnte zudem einen Hinweis auf eine Protonierung von PCB in der Bindetasche darstellen. Protonierungen von Phycobilinen gehen regulär mit einem bathochromen Effekt einher (Kikuchi *et al.*, 1997; Kupka *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2014).

### Fluoreszenz der *GtCPES\_M67A*:Phycobilin-Komplexe

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit für *GtCPES\_M67A*:PCB ( $E_{\max} = 662 \text{ nm}$ ) – wie zuvor auch für die erwähnten Komplexe *NCpCT*:PCB ( $E_{\max} = 642 \text{ nm}$ ) und *TeCpcS*:PCB ( $E_{\max} = 633 \text{ nm}$ ) – eine detektierbare Fluoreszenz nach Bindung des Chromophors beobachtet werden (Kronfel *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014). Die Fluoreszenz resultiert vermutlich aus der Zunahme der Chromophorrigidität durch die Bindung. Dabei ist die Fluoreszenz des PBP Lyase:Phycobilin-Komplexes in der Regel von geringerer Intensität als die des chromophorylierten PBP (Kronfel *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014). Interessanterweise erzeugt der Komplex zwischen *GtCPES\_M67A* und PEB ebenfalls eine deutliche Fluoreszenz mit hoher Emissionsintensität ( $E_{\max} = 635 \text{ nm}$ ), aber nur, wenn der Komplex *in vivo* in *E. coli* erzeugt wurde. Der Wildtyp von *GtCPES* zeigte keine detektierbare Fluoreszenzintensität mit PEB.

Bei der *in vivo* Koproduktion von Phycobilinen in *E. coli* kann es zur Anhäufung fluoreszenter Porphyrine kommen, die ebenfalls durch PBP Lyasen gebunden werden könnten. Eine kovalente Bindung dieser Zwischenstufen der Hämbiosynthese durch cyanobakterielle bzw. pflanzliche Phytochrome wurde bereits beobachtet (Fischer *et al.*, 2005). Da die Absorptionsbindungsspektren zwischen den *in vivo* und *in vitro* erzeugten *GtCPES\_M67A*:Phycobilin-Komplexen vergleichbar waren, wurde eine Porphyrinbindung nicht für die Fluoreszenz verantwortlich gemacht. Um jedoch vollständig auszuschließen, dass es sich um ein gebundenes Porphyrin handelt, ließe sich eine Denaturierung des Komplexes mit anschließender UV/vis-Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie durchführen. Denn spektroskopisch sind die zyklischen Porphyrine deutlich von Phycobilinen zu unterscheiden (Falk, 1989; Fischer *et al.*, 2005).

Des Weiteren lässt sich vermuten, dass PEB *in vivo* womöglich bereits vor Beendigung der Proteinfaltung in der Bindetasche gebunden wurde. Eine hierbei gebildete, kovalente Bindung von *GtCPES\_M67A* mit PEB wurde bisher nicht ausgeschlossen. Für den *in vivo*

produzierten Komplex zwischen *TeCpcS* und PCB geht die Fluoreszenz nachweislich auf eine kovalente Verknüpfung mit dem Chromophor zurück (Kronfel *et al.*, 2013). Es wird jedoch angenommen, dass die kovalente Bindung nicht die natürliche Chromophorbindung durch diese PBP Lyase widerspiegelt (Kronfel *et al.*, 2013). Im Fall der S-Typ PBP Lyase (der Gruppe III) *NCpcS1* aus *Nostoc PCC7120* wurde ebenfalls eine schwache Fluoreszenz aufgrund von anteilig kovalent gebundenen PCB beobachtet (Tu *et al.*, 2008).

Eine bestehende Kovalenz ist allerdings nicht maßgeblich für die Fluoreszenz des PBP Lyase:Phycobilin-Komplexes. In der kleinen T-Typ PBP Lyase  $\Phi$ CpeT befindet sich der Chromophor PEB nicht kovalent gebunden. Eine deutliche Emission bei 617 nm wurde dennoch detektiert (Gasper *et al.*, 2017). Diese Beobachtung wurde auf weitere, im Komplex mit PEB befindliche CpeTs aus Cyanophagen ausgeweitet und ist vermutlich auf die feste PEB-Bindung in der kompakten Struktur von  $\Phi$ CpeT zurückzuführen (Gasper *et al.*, 2017; Ledermann und Frankenberg-Dinkel, 2018).

Sollte sich PEB kovalent gebunden in der Ligandenbindetasche von *GtCPES\_M67A* befinden, so wird eine deutlich eingeschränkte Beweglichkeit des Chromophors und eine hieraus resultierende Präferenz für *GtCPES\_M67A* hinsichtlich des gebundenen Isomers von PEB erwartet. Ein vorrangig gebundenes Isomer konnte mit Hilfe der HPLC-Analyse jedoch weder für PCB noch für PEB beobachtet werden (Abbildung 3.23). Eine mögliche Erklärung hierfür stellt der verwendete Zellaufschluss mittels Ultraschall dar. Die hierdurch bedingte Erwärmung der *E. coli*-Zellen kann die Bildung des thermodynamisch stabileren *E*-Isomers begünstigen (Weller und Gossauer, 1980; Frankenberg und Lagarias, 2003b). Die Ergebnisse der Untersuchungen können aber auch dahingehend gedeutet werden, dass aufgrund der vergrößerten Bindetasche keine präferierte Isomerbindung besteht. Eine Wiederholung der Isomerbestimmung mit einer auf Druck basierten Aufschlussmethode bei gleichzeitiger Temperierung der Proben könnte zukünftig klären, ob die Konfiguration eines PEB- oder PCB-Isomers durch die Struktur *GtCPES\_M67A* begünstigt wird. Die Massenspektrometrie sowie die Zink-induzierte Fluoreszenz könnten außerdem aufzeigen, um welche Chromophorbindung es sich im *in vivo* gebildeten Komplex mit *GtCPES\_M67A* schließlich handelt.

### **Phycobiliproteinlyase-Substratspezifität beeinflusst Chromophorzusammensetzung des Holo-Phycobiliproteins**

Die sterische sowie die elektrostatische Umgebung der jeweiligen Cysteinbindestelle des Apo-Proteins beeinflussen unter anderem die Beladung der PBP mit Chromophoren (Kronfel *et al.*, 2013; Overkamp *et al.*, 2014b; Zhou *et al.*, 2014). Eine sequenzielle Beladung der verschiedenen konservierten Cysteine der PBP-Untereinheiten unterstützt diese Annahme, da die Chromophorylierung Konformationsänderungen des Proteins initiiert, welche die darauffolgende Chromophorylierung weiterer Bindestellen erst ermöglicht (Zhao *et al.*, 2007b; Kronfel *et al.*, 2019a). Des Weiteren ist anzunehmen, dass die am Holo-PBP gebundenen Chromophore zudem durch die Substratspezifität der entsprechenden PBP Lyasen bestimmt werden. Um den Einfluss der *GtCPES*-Substratspezifität auf die Chromophorylierung des Apo-PBP eingehender zu untersuchen, wurde die Proteinvariante *GtCPES\_M67A* über die Bindung von PCB hinaus auch auf dessen vermittelten Transfer auf das Apo-Protein überprüft. Hierfür wurden für den Transfer eine im nativen Zustand PCB-assoziierte PBP-Untereinheit (*SCpcB*) sowie *PmCpeB* als Apo-Proteine verwendet. Zudem wurden Kontrollreaktionen hinsichtlich der spontanen Assemblierung von PCB an den erwähnten Apo-Proteinen sowie mit der PCB-transportierenden PBP Lyase *NCpcS* aus *Nostoc* sp. PCC7120 durchgeführt.

### **Spontane Assemblierung von PCB an Apo-Proteine (*SCpcB*, *PmCpeB*) und Kontrolltransfer durch *NCpcS***

*PmCpeB* ist im natürlichen Zustand lediglich mit einem PCB-Molekül am Cys<sup>82</sup> chromophoryliert, wohingegen *SCpcB* als  $\beta$ -Untereinheit von PC aus *Synechococcus* sp. PCC7002 mit zwei PCB-Molekülen assoziiert vorliegt. Diese befinden sich an den konservierten Cysteinen in den Positionen 82 und 153. Der Transfer auf Cys<sup>82</sup> wird regulär durch das Heterodimer aus den PBP Lyasen *CpcS* und *CpcU*, der Transfer auf Cys<sup>153</sup> durch *CpcT* vermittelt (Shen *et al.*, 2006; Saunée *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008). Ein drittes Cystein in *SCpcB* (Cys<sup>109</sup>) sowie ein zweites in *PmCpeB* (Cys<sup>61</sup>) sind zwar vorhanden, sie sind jedoch nicht mit einem Phycobilin versehen (Steglich *et al.*, 2005). Bei eingehender Betrachtung der Kristallstruktur von PE545 der Cryptophyte *Rhodomonas* sp. CS24 (PDB: 1XG0) wird der Grund hierfür deutlich: zusätzliche, nicht chromophorylierte Cysteine liegen in PBP regulär nicht auf der Oberfläche der Proteinstruktur exponiert vor. Sie stehen demnach für eine kovalente Bindung nicht zur Verfügung. Dennoch ist bei Abwesenheit einer

Transfer-vermittelnden PBP Lyase eine spontane Bindung auch an diese Cysteinreste bei einer entsprechenden Faltung des Apo-Proteins nicht ausgeschlossen. Des Weiteren sind Interaktionen der stark hydrophoben Phycobiline mit hydrophoben Bereichen der Apo-Proteinstrukturen ebenfalls nicht auszuschließen. Sie könnten detektierbare Fluoreszenzmissionen bedingen. Für umgebungssensitive Fluoreszenzfarbstoffe, wie das in dieser Arbeit verwendete hydrophobe SYPRO Orange, ist die Interaktion mit hydrophoben Proteinbereichen maßgeblich für die starke Fluoreszenz. Daher wird es für die Bestimmung von Proteinschmelztemperaturen sowie zur Proteinfärbung innerhalb einer SDS-PAGE verwendet (Steinberg *et al.*, 1996; Boivin *et al.*, 2013). Strukturinstabilitäten der zu testenden PBP-Untereinheiten wurden jedoch zuvor untersucht, da sie zu freiliegenden Cysteinresten und vermehrt hydrophoben Proteinbereichen führen können.

Weder die spontane Bindung von PCB an SCpcB noch die an PmCpeB waren von der gemessenen Emissionsintensität her mit der spontanen Bindung von PEB zu vergleichen. Beide zeigten wesentlich geringere Intensitäten, eine kovalente Bindung an PmCpeB wurde dennoch gebildet. Da PmCpeB normalerweise kein PCB bindet, entsprach diese Beobachtung den Erwartungen. Die strukturellen Gegebenheiten der Umgebung der Cys<sup>82</sup>-Bindestelle sind für die Beladung mit dem rigideren PCB-Molekül wahrscheinlich nicht optimal, womit auch keine effiziente spontane PCB-Assemblierung zu erwarten war. Für die Bindung an SCpcB ergab sich zudem die Schwierigkeit, dass zwei Cysteinbindestellen zur Verfügung standen. Die spektralen Eigenschaften beider sind jedoch für chromophoryliertes CpcB beschrieben und erlauben damit die Abschätzung, an welchem Cystein die Chromophorylierung stattfindet (Tabelle 4.2). Kristallstrukturanalysen von PC haben gezeigt, dass das gebildete chirale C3<sup>1</sup> von PCB am Cys<sup>82</sup> in der *R*- und am Cys<sup>153</sup> in der *S*-Konfiguration gebunden vorliegt (Schirmer *et al.*, 1987). Bei abweichenden Fluoreszenzmaxima wurde von der Bildung eines heterogenen Produktgemisches ausgegangen, bei welchem nicht die gewünschte Konfiguration des Chromophors am PBP vorherrschte.

Vergleichbar geringe Emissionsintensitäten sowohl für die spontane als auch die mit NCpcS durchgeführte Transferreaktion auf CpcB können sich an dieser Stelle womöglich mit der Notwendigkeit einer sequenziellen Beladung erklären lassen. Da SCpcB nicht mit Hilfe einer entsprechenden PBP Lyase mit PCB versehen wurde, war die Chromophorylierung von Cys<sup>82</sup> möglicherweise gehemmt. Denn zuvor wurde postuliert, dass Cys<sup>155</sup> (und hierzu Homologe) zuerst chromophoryliert werden müssen, um eine effiziente

Übertragung von PCB auf Cys<sup>82</sup>-CpcB zu ermöglichen (Zhao *et al.*, 2007b). In *Synechococcus* sp. PCC7002 ist CpcT für die Phycobilinübertragung auf Cys<sup>155</sup> verantwortlich (Shen *et al.*, 2006). Bei falscher Beladungsreihenfolge wurde hierfür ebenfalls eine beeinträchtigte Chromophorylierung beobachtet. Die gleiche Beobachtung konnte zudem auf die Chromophorylierung der Bindestellen von  $\beta$ -PEC (PecB) übertragen werden (Zhao *et al.*, 2007b). Des Weiteren wurde gezeigt, dass in *Synechococcus* sp. PCC7002 zwei PBP Lyasen benötigt werden, um den Transfer von PCB auf  $\beta$ -Cys<sup>82</sup>-SCpcB zu vermitteln. CpcS und CpcU bilden in dieser Funktion gemeinsam ein Heterodimer (Shen *et al.*, 2008). Aufgrund der Konserviertheit der verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten liegt die Vermutung nahe, dass die jeweilige PBP Lyase-Aktivität der verschiedenen PBP Lyasen darüber entscheidet, ob die Hilfe einer anderen Lyase zur Chromophorylierung benötigt wird. NCpcS aus *Nostoc* sp. PCC7120 wurde bereits charakterisiert und ist im Gegensatz zu CpcS/U dazu in der Lage, unabhängig von anderen PBP Lyasen den Transfer von PCB auf das entsprechende Cys<sup>82</sup> zu vermitteln (Zhao *et al.*, 2006a; Zhao *et al.*, 2007b). Das Gleiche gilt für die Übertragungen von PEB auf Cys<sup>82</sup>-CpeB durch PmCpeS aus *P. marinus* MED4 (Wiethaus *et al.*, 2010a) sowie durch GtCPES. Letzteres wurde in dieser Arbeit gezeigt. Da das erhaltene Fluoreszenzmaximum für die Produktbildung durch NCpcS zudem der Literatur entsprach (Tabelle 4.2), wurde von einem erfolgreichen PCB-Transfer auf Cys<sup>82</sup>-SCpcB ausgegangen. Eine vorangehende Chromophorylierung von Cys<sup>153</sup> durch CpcT und anschließende Wiederholung der gezeigten PCB-Übertragung auf Cys<sup>82</sup> wäre dennoch eine Möglichkeit, die Emissionsintensität zu steigern. Eine sequenzielle Beladung ließe sich dadurch ausschließen.

**Tabelle 4.2: Absorptions- und Fluoreszenzmaxima für die Cysteinbindestellen von nativem CpcB.**

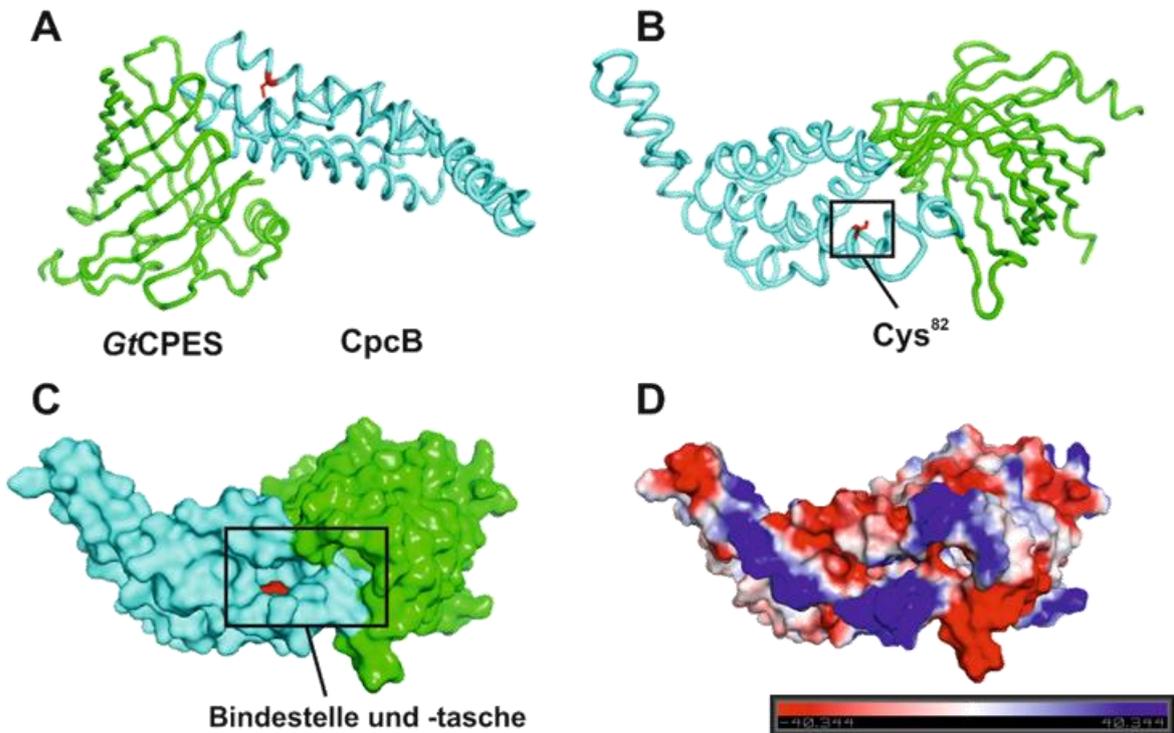
Chromophorylierte Bindestelle	A <sub>max</sub> [nm]	E <sub>max</sub> [nm]	Referenz
PCB- $\beta$ -Cys <sup>82</sup>	617-628	644-648	Sauer und Scheer, 1988 Debreczeny <i>et al.</i> , 1993 Shen <i>et al.</i> , 2006 Biswas <i>et al.</i> , 2010 Kronfel <i>et al.</i> , 2013
PCB- $\beta$ -Cys <sup>153</sup>	592	624-625	Zhao <i>et al.</i> , 2007b Saunée <i>et al.</i> , 2008 Biswas <i>et al.</i> , 2010

### ***GtCPES\_M67A* unterstützt PCB-Übertragung auf Apo-Phycobiliprotein-Untereinheiten**

Für einen potenziellen Transfer von PCB durch *GtCPES\_M67A* auf die beiden Apo-PBP (*SCpcB*, *PmCpeB*) wurden deutlich unterschiedliche Fluoreszenzmaxima und -intensitäten bei einer Anregungswellenlänge von 620 nm erhalten (Kapitel 3.5.2). Dabei lagen die Intensitäten für *PmCpeB* in etwa doppelt so hoch. Eine Interaktion von *GtCPES* (M67A) mit *SCpcB* wurde dennoch postuliert, da zunächst die Übertragung von PEB durch *GtCPES* in einem Holo-PBP mit der gewünschten Emission für PEB- $\beta$ -Cys<sup>82</sup> ( $E_{\max} = 570$  nm) resultierte (Wiethaus *et al.*, 2010a). Trotz einer detektierten Fluoreszenzsteigerung über die Messdauer wich das finale Emissionsmaximum von 659 nm für die mögliche PCB-Übertragung auf *SCpcB* deutlich von den Literaturwerten für beide Cysteinbindestellen ab (vgl. Tabelle 4.2). Das Emissionsmaximum für das Transferprodukt nach der Reaktion mit *GtCPES\_M67A*:PCB und *PmCpeB* entsprach hingegen den Literaturwerten einer nativ Cys<sup>82</sup>-PCB-bindenden  $\beta$ -Untereinheit ( $E_{\max} = 648$  nm). Das detektierte Fluoreszenzsignal auf dem Zink-Blot wies zudem auf eine gebildete kovalente Bindung hin. Beides zusammen stützt die Annahme eines *GtCPES\_M67A*-vermittelten PCB-Transfers auf *PmCpeB*. Das bedeutet, dass die Substrat- oder auch Ligandenspezifität von *GtCPES* ebenfalls über den gebundenen Chromophor am Apo-Protein entscheidet. Denn, obwohl *P. marinus* MED4 ein *PcyA* besitzt, binden in nativer Form vermutlich weder *PmCpeB* noch *GtCpeB* ein PCB-Molekül.

Die  $\beta$ -Untereinheiten der PBP verschiedener Cyanobakterien sind hoch konserviert. In BLAST-Recherchen wurde für die beiden verwendeten Apo-Proteine eine Sequenzidentität von 32% ermittelt, womit sie eine deutliche Sequenzhomologie aufweisen und sich strukturell ähneln. Evolutionär bedingt weisen die  $\beta$ -Untereinheiten cryptophytischer PBP ebenfalls eine hohe Homologie zu denen von Cyanobakterien und Rotalgen auf (Glazer *et al.*, 1985). Es wird vermutet, dass die Spezifität der PBP Lyase-Typen für die entsprechenden PBP-Bindestellen mit der Struktur und Oberflächenladung zu begründen ist. Für *CpeB* von PE545 aus der Cryptophyte *Rhodomonas* sp. CS24 wurde gemeinsam mit *GtCPES* bereits ein Protein-Protein-Interaktionsmodell präsentiert, welches auf der Oberflächenladung beider Proteine basiert (Overkamp *et al.*, 2014b). Dieses zeigt, dass beide strukturell und elektrostatisch zueinander passen und eine Chromophorylierung

von Cys<sup>82</sup> somit nicht behindern. Diese Annahme wurde auch auf *GtCpeB* aus *G. theta* übertragen. Da für andere PBP Lyasen vom S-Typ eine geringe Apo-Protein-Spezifität nachgewiesen wurde, lässt sich annehmen, dass *GtCPES* diese ebenso aufweist (Zhao *et al.*, 2007a; Zhao *et al.*, 2007b; Saunée *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008; Biswas *et al.*, 2010; Kronfel *et al.*, 2013). Eine Übertragung von 3(*Z*)-PEB sowie 3(*E*)-PCB auf Cys<sup>82</sup>-SCpcB ist demnach vermutlich möglich.



**Abbildung 4.2: Protein-Protein-Interaktionsmodell von *GtCPES* und *CpcB*.** Interaktionsmodell der Kristallstrukturen von *GtCPES* und *CpcB* aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (PDB: 4F0T), das mit Hilfe des *GRAMM-X Protein-Protein Docking Web Servers* vorhergesagt wurde (Tovchigrechko und Vakser, 2006). **A, B.** Generiertes Interaktionsmodell aus unterschiedlichen Perspektiven. *GtCPES* in Grün, *CpcB* in Cyan und Cys<sup>82</sup>-Bindestelle in Rot. **C.** Oberflächendarstellung des Interaktionsmodells bei Blick in die Bindestasche von *GtCPES* sowie in den Bindebereich von *CpcB*. **D.** Elektrostatische Oberfläche und Interaktionsfläche (generiert durch *PyMOL*). Negativ geladene Bereiche sind in Rot, positiv geladene Bereiche in Blau und neutrale/hydrophobe Bereiche in Weiß dargestellt.

In einem mittels des *GRAMM-X Protein-Protein Docking Web Servers* erstellten Protein-Protein-Interaktionsmodell zwischen *GtCPES* und *CpcB* aus *Synechocystis* sp. PCC6803 lässt sich neben der elektrostatischen Interaktionsfläche auch die strukturelle Nähe der relevanten Cysteinbindestelle zu der Bindestasche von *GtCPES* analysieren (Abbildung 4.2) (Tovchigrechko und Vakser, 2006). In Ermangelung einer veröffentlichten Kristall-

struktur für SCpcB aus *Synechococcus* sp. PCC7002 wurde als Alternative die Kristallstruktur von CpcB aus *Synechocystis* sp. PCC6803 verwendet. Diese Untereinheit besitzt BLAST-Recherchen zufolge die höchste bekannte Sequenzhomologie zu SCpcB (Sequenzidentität von 75%). Deutlich zu erkennen ist, dass das relevante Cystein in unmittelbarer Nähe zur Ligandenbindetasche von GtCPES liegt (Abbildung 4.2, A, B, C). Bindestelle und -tasche liegen jedoch nicht direkt aufeinander und bilden stattdessen einen seitlich geöffneten Kanal (Abbildung 4.2, C). Bei Betrachtung der elektrostatischen Interaktionsfläche wird deutlich, dass sich auf der einen Seite der Cysteinbindestelle insbesondere positiv- und neutral geladene und auf der anderen Seite hingegen negativ- und neutral geladene Bereiche befinden. Die angrenzenden Bereiche von GtCPES besitzen jeweils die umgekehrte Ladung und sollten somit eine Interaktion und womöglich auch einen Transfer auf Cys<sup>82</sup> erlauben.

Die Bereitstellung von PCB durch GtCPES\_M67A kann trotzdem zu einem anderen Transferprodukt mit abweichendem Emissionsmaximum führen. Es ist schließlich nicht geklärt, in welcher Konfiguration GtCPES\_M67A PCB bindet und schließlich für den Transfer bereitstellt. Der nach oben geöffnete Kanal zwischen Bindetasche und Cysteinbindestelle lässt womöglich mehr Bewegungsfreiheit des PCB-Moleküls zu. Das kann in einer zum nativen Holo- $\beta$ -PBP unterschiedlichen PCB-Stereoisomerie sowie zu einer Heterogenität der gebildeten Transferprodukte führen. Für Proteinvarianten von ApcE aus *Synechococcus* sp. PCC7002, bei dem das Cystein ausgetauscht wurde, konnte ein nicht kovalent gebundener Chromophor im Bindebereich von Cys<sup>187</sup> identifiziert werden (Gindt *et al.*, 1992; Shen *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde die Oxidation des Chromophors in Betracht gezogen. Da in dieser Arbeit die Kovalenz der vermutlich gebildeten Bindung für ein mögliches PCB-SCpcB nicht überprüft wurde, wäre auch eine nicht kovalente Bindung von PCB im Bindestellenbereich denkbar. Eine nicht kovalente Bindung hätte ebenfalls – wie auch eine Oxidation des Chromophors – eine Rotverschiebung der spektroskopischen Eigenschaften zur Folge (Arciero *et al.*, 1988a; Gindt *et al.*, 1992). Bei Vorhandensein des relevanten Cysteins in unmittelbarer Nähe erscheint eine nicht kovalente Chromophorbindung jedoch eher unwahrscheinlich. Bei einer nicht kovalenten Bindung würde zudem eine reduzierte Fluoreszenzemission erwartet, da der gebundene Chromophor flexibler ist und Energie anderweitig abgeben kann (Gindt *et al.*, 1992). Des Weiteren kann eine PBP Lyase vermittelte Bindung von PCB an Cys<sup>155</sup> anhand der Struktur und der detektierten Emissionsmaxima ausgeschlossen werden. Es wäre dennoch denkbar, dass

der im Interaktionsmodell beobachtete Transportkanal durch Konformationsänderungen des Proteins, die mit einer vorangehenden Chromophorylierung des Cys<sup>155</sup> einhergehen, geschlossen wird und insgesamt eine kontrolliertere Übertragung ermöglicht.

Für die PCB-Übertragung auf *PmCpeB* ist die Stereoisomerie des PCB-Moleküls ebenfalls nicht geklärt. Obwohl die Proteinumgebung einen sehr großen Einfluss auf die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften eines Chromophors ausüben kann, konnte trotz Verwendung einer PE- $\beta$ -Untereinheit womöglich ein korrekt chromophoryliertes Holo-Protein erzeugt werden (Krois und Lehner, 1991; Krois und Lehner, 1993). Die hohe Sequenzhomologie cyanobakterieller  $\beta$ -Untereinheiten bedingt hierbei vermutlich die ähnliche Proteinumgebung in der Nähe zur Bindestelle.

Um zu verifizieren, dass PCB tatsächlich am Cys<sup>82</sup> von *PmCpeB* assoziiert vorliegt, sollten mittels Massenspektrometrie die PCB-tragenden Chromopeptide identifiziert werden. Dieser Nachweis konnte bisher weder für die spontane noch für die vermittelte Übertragung von PCB erbracht werden. Hiermit ließe sich außerdem die Bildung von Oxidationsprodukten nachweisen oder ausschließen. Die Kristallisation des *GtCPES\_M67A:PCB*-Komplexes sowie die des erzeugten *PCB-PmCpeB* könnte zudem ein besseres Verständnis für die Konfiguration des jeweils gebundenen PCB-Moleküls vermitteln. Die korrekte PCB-Assemblierung an Cys<sup>82</sup> wäre hiermit ebenfalls zu verifizieren.

Aber worin liegen die Vorteile und worin die Nachteile einer begrenzten Substratspezifität der PBP Lyasen? Eine geringere Spezifität bietet vielfältige Einsatzmöglichkeiten hinsichtlich der Chromophorylierung verschiedener Apo-Proteine. Das gilt jedoch nur für die Apo-PBP, die sowohl strukturell als auch elektrostatisch die Ligation durch verschiedene PBP Lyasen an die konservierten Cysteinbindestellen ermöglichen. *TeCpcS* besitzt eine weite Substratspezifität, da es sowohl PEB, PCB als auch P $\Phi$ B übertragen kann (Kronfel *et al.*, 2013). Es bildet damit aber eine Ausnahme. Da weder PEB noch P $\Phi$ B in diesem Cyanobakterium synthetisiert werden und der Organismus hauptsächlich PC und APC als PBP verwendet, werden die gebotenen Möglichkeiten durch die breite Substratspezifität *in vivo* nicht ausgeschöpft. Sie bieten womöglich dennoch die Möglichkeit, sich bei Änderung von Umwelteinflüssen noch flexibler an diese Änderungen anzupassen. Viele Cyanobakterien besitzen bereits die Fähigkeit, innerhalb des Prozesses der komplementären chromatischen Adaptation in Abhängigkeit von den herrschenden Lichtverhältnissen sowohl ihre Chromophor- als auch PBP-Zusammensetzung im PBS zu

variieren (Bogorad, 1975; Tandeau de Marsac, 1977; Kehoe und Gutu, 2006). Cryptophyten sind aufgrund fehlender PBS und lediglich der Verwendung einer Sorte an PBP da wesentlich unflexibler. Um trotzdem auf Umwelteinflüsse reagieren zu können, wird an dieser Stelle die Möglichkeit diskutiert, alternative Gene, die für PBP-Untereinheiten kodieren, zu exprimieren (Overkamp, 2014). Da das Nukleusgenom von *G. theta* zwanzig Gene für PE545  $\alpha$ -Untereinheiten besitzt, erscheint die Expression alternativer Gene möglich (Curtis *et al.*, 2011). Kieselbach *et al.* (2017) konnten zeigen, dass alle *gtcpeA*-Gene bei weißem Licht exprimiert werden. Weiterhin wurde eine spezifische Regulation der *gtcpeA*-Gene in Abhängigkeit von der Lichtintensität postuliert.

Bei lediglich einem vorhandenen PBP im Organismus sowie der entsprechenden Anzahl an (putativen) PBP Lyasen für die Chromophorylierung der PBP, scheint es jedoch nicht vorteilhaft, eine ausgeweitete Substratspezifität zu besitzen. *G. theta* verfügt nicht über die Enzyme, um PCB zu synthetisieren, womit eine Übertragung von diesem unnötig wäre. Eine hohe Substratspezifität aufgrund der Struktur wie *GtCPES* sie besitzt, bedeutet hingegen eine Stabilisierung des Chromophors in der Ligandenbindetasche, welche die gewünschte Stereoisomerie des Phycobilins am PBP gewährleistet. Durch zu hohe Chromophorbeweglichkeit verursachte Konfigurationsänderungen, die in ineffizienten Holo-PBP resultieren, lassen sich hierdurch vermeiden. Es herrscht somit eine doppelte Kontrolle der jeweiligen Chromophorbindung: zum einen durch die sterische und elektrostatische Umgebung der Cysteinbindestelle, zum anderen durch die hohe Substratspezifität und dadurch Stabilisierung der Chromophorstruktur. Bei lediglich einer zur Verfügung stehenden Sorte an PBP hat sich diese kontrollierte Chromophorylierung bewährt, da sie notwendig für die Erzeugung effizienter Holo-PBP ist. Nur diese können schließlich die erwartete Leistung in der Lichtsammlung erreichen.

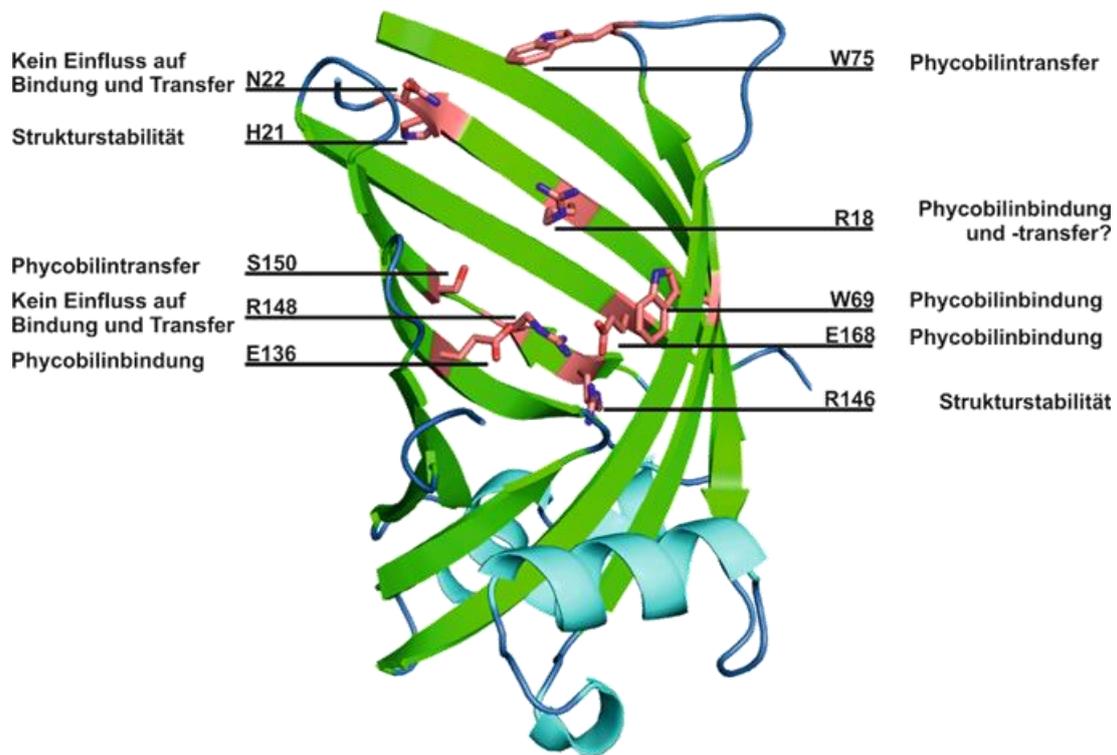
#### **4.1.3 Charakterisierung der Ligandenbindetasche: Bindungs- und transferrelevante Aminosäurereste in *GtCPES***

Die Ligandenbindetasche von *GtCPES* befindet sich zentral in deren Fass- oder auch Calyx-Struktur. Spektroskopische Daten weisen darauf hin, dass der Ligand PEB in der Bindetasche womöglich leicht gestreckt gebunden wird (Overkamp *et al.*, 2014b). Bei gestreckter Konformation und Koordination des D-Rings im unteren Bereich der Bindetasche wäre gewährleistet, dass sich der PEB-A-Ring für die anschließende Ligation an  $\beta$ -Cys<sup>82</sup> des Apo-PBP an der Öffnung befindet. Aus der Kristallstruktur von PE545 ist

bekannt, dass PEB schließlich in einer *R*-Stereoisomerie des C3<sup>1</sup>-Atoms an  $\beta$ -Cys<sup>82</sup> gebunden wird (Wilk *et al.*, 1999; Doust *et al.*, 2004). Bisher konnte als einzige PBP Lyase mit gebundenem Chromophor CpcT aus *Nostoc* sp. PCC7120 kristallisiert werden. PCB liegt hier jedoch weiterhin in seiner zyklisch-helikalen Struktur in der Ligandenbindetasche vor (Zhou *et al.*, 2014). Der Komplex zwischen der S-Typ Lyase *TeCpcS* aus *T. elongatus* und PCB ließ sich mit Hilfe des kristallisierten *UnaG:BR*-Komplexes modellieren (Kumagai *et al.*, 2013; Kronfel *et al.*, 2013). An dieser Stelle wurde ein gestrecktes PCB-Molekül in der Ligandenbindetasche postuliert, obwohl die Bindetasche im Vergleich zu der von *GtCPES* größer ist und demnach mehr Raum zur Verfügung steht (Abbildung 3.15) (Kronfel *et al.*, 2013; Overkamp *et al.*, 2014b). Bei *UnaG* handelt es sich um ein fluoreszentes Protein aus dem Aal *Anguilla japonica*, welches das Pigment Bilirubin (BR) bindet (Kumagai *et al.*, 2013). Trotz einer geringen Sequenzidentität zu *TeCpcS* (11%) war eine *in silico* Bindung von BR in der Bindetasche von *TeCpcS* möglich, womit sich *UnaG* als Strukturmodell für die Ligandenmodellierung eignete (Kronfel *et al.*, 2013). Es ist jedoch anzumerken, dass BR eine deutlich flexiblere Struktur, aufgrund einer reduzierten Doppelbindung zwischen Ring B und C, besitzt.

Der strukturelle Vergleich verschiedener S-Typ-PBP Lyasen sowie die Koordinierung von 1,6-Hexandiol in der Kristall-Ligandenbindetasche von *GtCPES*, lieferten vorab bereits Hinweise, welche Aminosäuren womöglich bei der PEB-Bindung und der Vermittlung des PEB-Transfers involviert sein könnten (Overkamp *et al.*, 2014b). Zur Charakterisierung der Ligandenbindetasche wurden für den Vergleich konservierter Aminosäurereste durch Overkamp *et al.* (2014b) *PmCpeS*, *FdCpeS*, *NCpcS* und *TeCpcS* aus *P. marinus* MED4, *F. diplosiphon*, *Nostoc* sp. PCC7120 und *T. elongatus* herangezogen (Abbildung 3.11; Kapitel 3.3). Die potenziell relevanten Aminosäurereste (Arg<sup>18</sup>, His<sup>21</sup>, Asn<sup>22</sup>, Trp<sup>69</sup>, Trp<sup>75</sup>, Glu<sup>136</sup>, Arg<sup>146</sup>, Arg<sup>148</sup>, Ser<sup>150</sup>, Glu<sup>168</sup>) wurden schließlich durch die ungeladene Aminosäure Alanin ersetzt. Die Proteinvarianten wurden anschließend sowohl hinsichtlich ihrer PEB-Bindekapazität als auch ihrer PEB-Transferaktivität untersucht. Da sowohl für *TeCpcS* aus *T. elongatus* als auch für *NCpcS* aus *Nostoc* sp. PCC7120 detaillierte Strukturuntersuchungen veröffentlicht wurden, werden im Folgenden die Ergebnisse insbesondere im Vergleich mit diesen beiden PBP Lyasen diskutiert (Kupka *et al.*, 2009; Kronfel *et al.*, 2013). Es ist jedoch anzumerken, dass die beiden genannten PBP Lyasen trotz ihrer Ähnlichkeit zu *GtCPES* über ein breiteres Substratspektrum verfügen.

In Abbildung 4.3 sind die konservierten Aminosäurereste mit ihrer Positionierung in der Kristallstruktur und ihrer Relevanz insbesondere für die Bindung und den Transfer von PEB dargestellt. Vor allem in der Mitte und im unteren Bereich der Ligandenbindetasche befinden sich die untersuchten Aminosäurereste, die für die Bindung und Koordination von PEB von Bedeutung sind. Hierbei handelt es sich insbesondere um geladene sowie aromatische Aminosäurereste (Glu, Arg, Trp). Die transferinvolvierten Aminosäuren liegen hingegen im mittleren bis oberen Bereich der Kristallstruktur, um räumlich an der Übertragung von PEB teilhaben und möglicherweise mit dem Apo-Protein interagieren zu können. Für His<sup>21</sup> und Arg<sup>146</sup> konnten keine Aussagen in Bezug auf die Bindung und den Transfer von PEB getroffen werden, da der Einzelaustausch dieser Aminosäuren die Strukturstabilität der PBP Lyase beeinträchtigte.



**Abbildung 4.3: Position der untersuchten Aminosäurereste in der Kristallstruktur von *GtCPES* und ihre Relevanz.** Die konservierten Aminosäurereste sind in Hellrot dargestellt. Für die Bindung und Koordination von PEB wichtige Aminosäuren (Glu, Arg, Trp) befinden sich sowohl im unteren sowie mittleren Bereich der Ligandenbindetasche. Im Transfer involvierte Aminosäuren sind im mittleren bis oberen Bereich der Kristallstruktur zu finden (Trp, Ser). Die Alanin-Proteinvarianten für His<sup>21</sup> und Arg<sup>146</sup> waren fehlgefaltet, hinsichtlich ihrer Relevanz für die Bindung und den Transfer von PEB konnten keine Aussagen getroffen werden.

Als essenziell für die PBP Lyase-Bindeaktivität von *GtCPES* konnte in der vorliegenden Arbeit zunächst Glu<sup>136</sup> bestätigt werden. Bei Austausch von Glu<sup>136</sup> war keine Bindung von

3(Z)-PEB mehr möglich. Die Relevanz dieses Restes wurde bereits durch Overkamp *et al.* (2014b) herausgestellt, die strukturelle Verifizierung stand jedoch zu Beginn der Arbeit noch aus. Glu<sup>136</sup> liegt im Inneren der Ligandenbindetasche (Abbildung 4.3) und könnte durch Interaktion mit den Pyrrol-Stickstoffen von PEB an der Koordination des C- bzw. D-Rings beteiligt sein. Ein weiterer Glutamatrest (Glu<sup>168</sup>) ist ebenfalls von Bedeutung für die Bindung von PEB: *GtCPES\_E168A* zeigte eine stark beeinträchtigte Bindefähigkeit, aber im Vergleich zu *GtCPES\_E136A* wurde die Bindung nicht vollständig unterbunden. Die Bindungsaffinität der Variante zu PEB konnte allerdings aufgrund einer zu schwachen Bindung nicht ermittelt werden (Kapitel 3.3.4). Es lag jedoch weiterhin eine durch *GtCPES\_E168A* vermittelte PEB-Übertragung auf *PmCpeB* vor. Die PBP Lyase-Transferaktivität blieb somit trotz des Aminosäureaustausches intakt. Die tief in der Bindetasche liegende Position des Aminosäurerestes Glu<sup>168</sup> lässt auch hier eine Koordinierung von PEB durch das Glutamat als wahrscheinlich annehmen (Abbildung 4.3). Für homologe Glutamatreste anderer S-Typ PBP Lyasen konnten bisher keine genaue Funktionen nachgewiesen werden (Kupka *et al.*, 2009; Kronfel *et al.*, 2013).

Arg<sup>146</sup> wurde zuvor als essenziell für die Bindung von PEB identifiziert (Overkamp *et al.*, 2014b). Die fehlende Komplexbildung zwischen *GtCPES\_R146A* und 3(Z)-PEB konnte an dieser Stelle bei genauer Überprüfung jedoch auf eine fehlgefaltete Struktur der Proteinvariante zurückgeführt werden. Als relevant für die Strukturstabilität von *GtCPES* wurde außerdem His<sup>21</sup> identifiziert. Auch diese Proteinvariante war fehlgefaltet. Sowohl His<sup>21</sup> als auch Arg<sup>147</sup>, als homologe Aminosäuren der S-Typ PBP Lyase *NCpcS*, bilden in dieser PBP Lyase jedoch für die Chromophorbindung wichtige Aminosäurereste (Kupka *et al.*, 2009; Abbildung 3.11, A). Eine Proteinvariante von *NCpcS*, mit einem Einzelaminosäureaustausch an der zu His<sup>21</sup> homologen Position 21, erwies sich jedoch ebenso als anfällig für Fehlfaltungen (Kupka *et al.*, 2009). Erst die gemachten Beobachtungen für die Proteinvariante von His<sup>22</sup> sowie für die Doppelaustausch-Variante von His<sup>21</sup>/His<sup>22</sup> lieferten schließlich die Aussage, dass beide Varianten in der PCB-Bindung durch *NCpcS* involviert sind. His<sup>22</sup> (homolog zu Asn<sup>22</sup> in *GtCPES*) ist zusätzlich für die *NCpcS*-Transferaktivität von Bedeutung (Kupka *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu der *NCpcS* Variante für His<sup>22</sup>, unterschied sich das untersuchte *GtCPES\_N22A* hinsichtlich der PBP Lyase-Aktivität jedoch lediglich geringfügig vom verwendeten Wildtyp. Der in *GtCPES* homologen Aminosäure Asn<sup>22</sup> konnte damit keine Funktion in Hinblick auf die Bindung oder den Transfer von PEB zugeordnet werden.

In *GtCPES* besitzt die Aminosäure Arg<sup>148</sup> weder Einfluss auf die Binde- noch die Transferaktivität, obwohl diese sich räumlich nah zu Glu<sup>136</sup> und damit tief in der Bindetasche befindet (Abbildung 4.3). In *NCpcS* hingegen hat sich das homologe Arg<sup>149</sup> sogar als kritisch für den PCB-Transfer auf CpcB herausgestellt. Denn in dieser PBP Lyase schränkt der Aminosäureaustausch zu Leucin die Fähigkeit ein, PCB zu binden und inaktiviert *in vivo* in *E. coli* sowie *in vitro* nahezu die Phycobilin-Transferaktivität (Kupka *et al.*, 2009). Insgesamt wird für die tief in der Bindetasche gelegenen Argininreste, die an der Chromophorbindung beteiligt sind, eine Interaktion in Form von polaren Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen) mit den Propionat-Seitenketten des C- und D-Rings von PEB vermutet (Kupka *et al.*, 2009; Kronfel *et al.*, 2013; Overkamp, 2014).

Am oberen Rand der Ligandenbindetasche und nach innen gerichtet in der Calyx-Struktur von *GtCPES* befindet sich ein weiteres Arginin (Arg<sup>18</sup>) (Abbildung 4.3). Auch dieses wurde hinsichtlich seiner Chromophor-Binde- sowie Transferfunktion überprüft. Eine Interpretation der Ergebnisse erwies sich jedoch als schwierig und damit auch die Abschätzung der Funktion. Ein Einfluss von Arg<sup>18</sup> auf den Phycobilintransfer – und womöglich auch auf die Bindung – wird dennoch angenommen. In *NCpcS* ist das homologe Arg<sup>18</sup> notwendig für die Chromophorbindung sowie die PBP Lyase-Aktivität (Kupka *et al.*, 2009). Als mögliche Funktion kommt ebenso eine Beteiligung dieser Aminosäure an der Koordinierung des C- und D-Rings von PEB über die Propionat-Seitenketten in Frage. Die beobachteten Unterschiede zwischen den Fluoreszenzspektren für die 3(Z)-PEB-Transferreaktionen, die in Anwesenheit von *GtCPES\_R18A* und dem Wildtyp durchgeführt wurden, schlossen die Bildung eines heterogenen Produktgemisches nicht aus. Daher ist es möglich, dass die Koordinierung für die Isomerie des gebildeten PEB-Cys<sup>82</sup>-*PmCpeB* von Relevanz ist.

Trp<sup>69</sup> stellt eine weitere bindungsrelevante Aminosäure in *GtCPES* dar. Die Alanin-Proteinvariante dieser Aminosäure wies eine reduzierte PEB-Bindeaktivität auf. Die Untersuchungen zum Transfer unterstützten die Annahme, dass eine Selbstassemblierung statt einer vermittelten Übertragung von PEB an das Apo-Protein vorlag. Es wird angenommen, dass das hydrophobe Tryptophan, welches mittig lokalisiert und der Bindetasche zugewandt vorliegt, durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit den Pyrrolringen von PEB interagiert (Abbildung 4.3). Hierdurch stabilisiert es die Bindung zu PEB und koordiniert und kontrolliert zudem möglicherweise die Einhaltung der PEB-Konformation während des Ligationsprozesses. In *NCpcS* wurde diese Funktion für das homologe Trp<sup>69</sup> bereits

beschrieben (Kupka *et al.*, 2009). Bei Austausch dieser Aminosäure wurde neben einer reduzierten PCB-Bindeaktivität hinzukommend ein stereochemisch fehlerhaftes Holo-PBP als Produkt erhalten, da PCB inkorrekt an CpcB assembliert vorlag (Kupka *et al.*, 2009).

Dem Tryptophanrest an Position 75 in *GtCPES* kommt hingegen eine andere Bedeutung zu. Trp<sup>75</sup> befindet sich oberhalb der Bindetasche in einer Loop-Region (Abbildung 4.3). Bei Verwendung der Proteinvariante konnte weiterhin PEB gebunden werden, die Bindungsaffinität von *GtCPES\_W75A* mit PEB war mehr als ein zehnfaches stärker als für den Wildtyp. Ein Transfer von PEB war mit dieser Proteinvariante jedoch nicht mehr nachweisbar (Kapitel 3.3.3). Trp<sup>75</sup> ist somit essenziell für die PBP Lyase-Aktivität von *GtCPES*. In *NCpcS* ist das homologe Trp<sup>75</sup> ebenfalls wichtig für die Chromophorübertragung, jedoch nicht essenziell (Kupka *et al.*, 2009). Die Lage von Trp<sup>75</sup> am Rand der Interaktionsfläche in einem Protein-Loop von *GtCPES* bietet die Möglichkeit, mit dem Apo-Protein zu interagieren. Eine eingeschränkte Interaktion mit der Apo-PBP-Untereinheit bei Fehlen der entsprechenden Aminosäure könnte damit der Grund für eine fehlende Übertragung sein. Eine Stabilisierung der Interaktion durch Trp<sup>75</sup> wäre möglich. Die Positionierung des Protein-Loops über der Bindetasche erzeugt zudem die Notwendigkeit einer Konformationsänderung von *GtCPES* bei Interaktion mit dem Apo-Protein, da die Bindetasche durch den Loop verschlossen scheint. Kronfel *et al.* (2013) deuteten aufgrund vergleichbarer Positionierung für das homologe Trp<sup>79</sup> in *TeCpcS* eine mögliche Funktion als molekularer Verschluss der Bindetasche an, wodurch der A-Ring von PCB nicht dauerhaft ungeschützt freiläge. Eine unkontrollierte, spontane Bindung von PEB aufgrund einer fehlenden Schutzvorrichtung konnte für *GtCPES\_W75A* jedoch nicht beobachtet werden.

Als transferrelevante Aminosäure für *GtCPES* stellte sich außerdem Ser<sup>150</sup> heraus. Bei Wildtyp-ähnlicher Bindung von PEB wurde eine eingeschränkte Transferaktivität für die Alaninvariante festgestellt. Für das homologe Ser<sup>155</sup> in *TeCpcS* wurde hingegen insbesondere eine Relevanz für die Chromophorbindung erkannt (Kronfel *et al.*, 2013). Wie für die bindungsrelevanten Argininreste, so wird auch für Ser<sup>155</sup> eine Interaktion mit dem C- und D-Ring des Phycobilins angenommen (Kronfel *et al.*, 2013).

## 4.2 Struktur und Funktion der putativen Phycobiliproteinlyasen GtCPCX und GtCPEZ

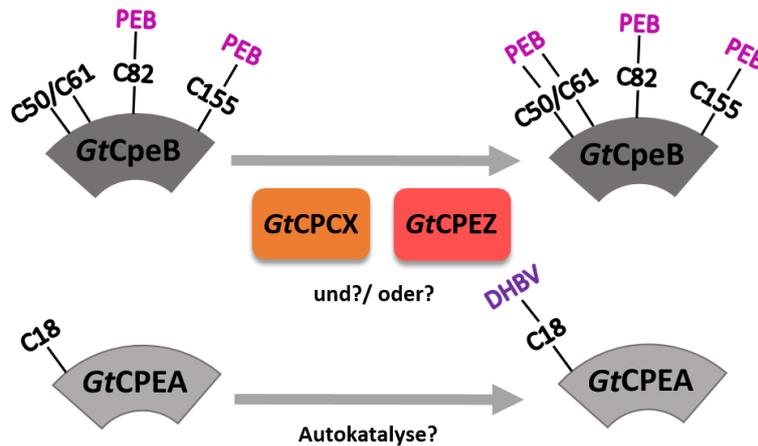
In *G. theta* konnten neben GtCPES und GtCPET zwei weitere, bisher nicht charakterisierte putative PBP Lyasen identifiziert werden: GtCPCX und GtCPEZ (Gould *et al.*, 2006b; Gould *et al.*, 2007; Curtis *et al.*, 2012; Overkamp *et al.*, 2014b). Die Anzahl der identifizierten Gene für PBP Lyasen in *G. theta* korreliert damit mit der Anzahl der zu chromophorylierenden konservierten Cysteine in PE545 ( $\alpha$ -Untereinheit: Cys<sup>18</sup>;  $\beta$ -Untereinheit: Cys<sup>50/61</sup>, Cys<sup>82</sup>, Cys<sup>155</sup>). PE545 baut sich als Heterodimer mit zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Untereinheiten auf. Jede  $\beta$ -Untereinheit (GtCpeB) liegt hierbei mit drei PEB-Molekülen assoziiert vor, wobei ein PEB-Molekül über eine doppelte Thioetherbindung sowohl an das Cys<sup>50</sup> als auch an Cys<sup>61</sup> bindet. An das konservierte Cys<sup>18</sup> der  $\alpha$ -Untereinheit ist lediglich ein DHBV-Molekül gebunden (Wilk *et al.*, 1999). Die gezielte Chromophorylierung dieser Cysteinreste durch PBP Lyasen in *G. theta* war zu Beginn dieser Arbeit wenig untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass GtCPES die Chromophorylierung von  $\beta$ -Cys<sup>82</sup> mit PEB vermittelt. Als verantwortliche PBP Lyase für die Chromophorassemblierung von  $\beta$ -Cys<sup>155</sup> wurde GtCPET identifiziert (Bolte *et al.*, 2008). Die Chromophorylierung der Cysteinbindestellen  $\alpha$ -Cys<sup>18</sup> und  $\beta$ -Cys<sup>50/61</sup> verblieb bisher ungeklärt. Für den Transfer der Chromophore DHBV und PEB auf diese Cysteine kommen die PBP Lyasen GtCPCX und GtCPEZ in Frage. Beide Proteine sollten in der vorliegenden Arbeit für eine spätere eingehende Charakterisierung produziert werden (Kapitel 3.1). Die Gene für beide Proteine sind im Nukleus lokalisiert und wurden zuvor anhand kodierender EST-Sequenzen identifiziert (Gould *et al.*, 2006b; Gould *et al.*, 2007), wobei die EST-Sequenz von *gtCPCX* ein Protein ähnlich einer PCB: $\alpha$ -PC-Lyase kodiert (Gould *et al.*, 2006b). Beide putative PBP Lyasen wurden dem E/F-Typ zugeordnet (Overkamp *et al.*, 2014b). Bisher wurde angenommen, dass die PBP Lyasen wie auch Rotalgen ihre Funktion im Plastidstroma von *G. theta* ausüben (MacColl und Guard-Friar, 1987; Gould *et al.*, 2007). Wenn das der Fall ist, ist zudem davon auszugehen, dass diese ein N-terminales Signalpeptid sowie ein Transitpeptid besitzen, um sie in das Stroma zu transportieren. Beide Strukturen konnten für diverse Nukleus-kodierte Proteine aus *G. theta* bereits identifiziert werden (Gould *et al.*, 2006a; Gould *et al.*, 2006b; Gould *et al.*, 2007). Für die veröffentlichten Sequenzen von GtCPEZ sowie GtCPCX konnten Peptidstrukturen vorhergesagt werden, die womöglich für den intrazellulären Transport wichtig sind und in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt wurden. Trotz der Verwendung der *G. theta*-Originalsequenzen konnte keine der beiden PBP

Lyasen in dieser Arbeit als lösliches Protein erzeugt werden. Für die rekombinante Produktion der PEB-Syntheseenzyme (HO: HemO; FDBR: PcyX) aus Bakteriophagen konnte gezeigt werden, dass die Verwendung der Originalsequenz deutliche Steigerungen der Proteinlöslichkeit und -ausbeute erzielte (Ledermann *et al.*, 2016). Obwohl bei der rekombinanten Produktion eine für *E. coli* kodonoptimierte Nukleotidsequenz häufig zielführend ist, kann eine Anpassung zu Proteinaggregation führen. Eine zu hohe Synthesegeschwindigkeit, bedingt durch die optimierte Sequenz, und dadurch auftretende Strukturfehler werden hierfür verantwortlich gemacht. Translationelle Pausen haben hingegen einen positiven Effekt auf die Proteinfaltung (Rosano und Ceccarelli, 2014).

<b>GtCPEZ</b>	1) N-Terminus-IGGGDVAHGYPG <b>CERV</b> RSDLSVLLPSPLSSS*
	2) N-Terminus-IGGGDVAHGYPG <b>MREGSG</b> CSH*
<b>GtCPCX</b>	1) N-Terminus-LSDLLAEEDDMLEWYATWLWLV <b>P</b> LAWDC*
	2) N-Terminus-LSDLLAEEDDMLEWYATWLWLV <b>S</b> LAWDC*

**Abbildung 4.4: Veröffentlichte C-terminale Aminosäuresequenzen für GtCPCX und GtCPEZ.** Die Sequenzen unter 1) basieren auf den veröffentlichten Genomsequenzen und wurden in dieser Arbeit verwendet (Identifikationsnummer: NW\_005434531.1 und NW\_005434644.1). 2) Sequenzen, die unter anderem in der UniProt-Datenbank veröffentlicht wurden (Identifikationsnummer: A2AX35\_GUITH und Q5K270\_GUITH).

Es sei weiterhin zu erwähnen, dass zu den C-Termini der beiden PBP Lyasen unterschiedliche Aminosäuresequenzen veröffentlicht wurden (Abbildung 4.4). Die Wahl der jeweiligen Sequenz kann die Produktion der Proteine beeinflussen. Die in dieser Arbeit verwendeten Sequenzen entsprechen denen, die für das hypothetische Protein vorhergesagt wurden und auf der veröffentlichten Nukleusgenomsequenz basieren (Curtis *et al.*, 2012). Im Fall von *GtCPEZ* unterscheidet sich der alternative C-Terminus (Abbildung 4.4, *GtCPEZ* 2) deutlich in Länge und Sequenz zu der in dieser Arbeit verwendeten Sequenz. Bei der Alternativ-Sequenz für *GtCPCX* ist hingegen nur eine Aminosäure ausgetauscht (Abbildung 4.4, *GtCPCX* 2). Diese Alternativen präsentieren womöglich die nativen Sequenzen beider PBP Lyasen.



**Abbildung 4.5: Postulierte Chromophorassemblierung für  $\alpha$ -Cys<sup>18</sup> und  $\beta$ -Cys<sup>50/61</sup> in *G. theta*.** Die Chromophorylierung der konservierten Cysteinbindestellen  $\alpha$ -Cys<sup>18</sup> und  $\beta$ -Cys<sup>50/61</sup> der  $\alpha$ - (*GtCPEA*) und  $\beta$ -Untereinheit (*GtCpeB*) von PE545 wird womöglich durch eine PBP Lyase (*GtCPCX*, *GtCPEZ*) unterstützt. Die Zusammenarbeit beider Lyasen sowie eine autokatalytische Chromophorylierungsreaktion stellen weitere Optionen der Chromophorylierung dar.

Da sich keine der beiden PBP Lyasen in löslicher Form reinigen ließ, lässt sich hinsichtlich ihrer Proteinfunktion weiterhin nur spekulieren. Sowohl *GtCPCX* als auch *GtCPEZ* könnten eine DHBV: $\alpha$ -Cys<sup>18</sup>-PE-Lyase- oder eine PEB: $\beta$ -Cys<sup>50/61</sup>-PE-Lyase-Aktivität besitzen (Abbildung 4.5). Im Allgemeinen sind PBP Lyasen des E/F-Typs für ihre hohe Apo-Protein-Spezifität für die PBP- $\alpha$ -Untereinheit bekannt. Das stützt die Annahme einer Chromophorylierungsfunktion von  $\alpha$ -Cys<sup>18</sup>. Bisher konnte jedoch in der Regel eine hohe Bindestellenspezifität für Cys<sup>84</sup> der  $\alpha$ -Untereinheit gezeigt werden (Fairchild *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 2000; Blot *et al.*, 2009; Biswas *et al.*, 2011; Shukla *et al.*, 2012). Eine Ausnahme in der Gruppe der E/F-Typ-PBP Lyasen stellt die kürzlich charakterisierte PBP Lyase CpeF aus *F. diplosiphon* dar. Diese ist der bisher einzige bekannte Vertreter seines Typs, der die Chromophorligation an eine  $\beta$ -Untereinheit unterstützt (Kronfel *et al.*, 2019a). Außerdem transferiert sie PEB auf  $\beta$ -Cys<sup>48/59</sup> der PE- $\beta$ -Untereinheit (CpeB) und weicht damit ebenso in Bezug auf die Bindestellenspezifität von den anderen E/F-Typ Lyasen ab. Unterstützt wird sie hierbei durch CpeZ, das keine eigene Phycobilin-Transferaktivität besitzt, aber bereits als Helferprotein der PBP Lyase CpeY bekannt ist (Biswas *et al.*, 2011; Kronfel *et al.*, 2019b). *GtCPCX* oder *GtCPEZ* könnten ebenso Ausnahmen darstellen, die hinsichtlich ihrer Bindestellen- oder auch Apo-Protein-Spezifität von den meisten Vertretern dieser Gruppe abweichen. Neben der Vermittlung des doppelt gebundenen PEB an  $\beta$ -Cys<sup>50/61</sup> oder von DHBV an  $\alpha$ -Cys<sup>18</sup> durch jeweils eine der beiden PBP Lyasen, wäre anhand der

gezeigten unterstützenden Funktion von CpeZ auch eine Zusammenarbeit beider PBP Lyasen eine mögliche Option. Aufgrund der Zuordnung von GtCPEZ zur CpeZ-Familie lässt sich annehmen, dass diese PBP Lyase womöglich eine helfende Funktion ausübt. CpeZ aus *F. diplosiphon* und GtCPEZ teilen allerdings lediglich eine Sequenzidentität von 18%.

Eine native autokatalytische Chromophorylierung, insbesondere von  $\alpha$ -Cys<sup>18</sup>, ohne die Hilfe von PBP Lyasen wäre ebenso denkbar (Overkamp *et al.*, 2014b). Basierend auf der Oxidation von PEB zu DHBV, die für die spontane Bindung an  $\alpha$ -Cys<sup>84</sup> und  $\beta$ -Cys<sup>82</sup> von Apo-PC aus *Synechococcus* sp. PCC7002 beobachtet wurde (Arciero *et al.*, 1988b), diskutierte Overkamp (Dissertation, 2014) die Möglichkeit der Erzeugung von GtCPEA-gebundenem DHBV in *G. theta*. Verschiedene Phycobiliproteine aus Cyanobakterien wurden identifiziert, die eine stereochemisch korrekte Assemblierung kontrollieren können (Zhao *et al.*, 2005a; Hu *et al.*, 2006). Die PBP- $\alpha$ -Untereinheit ApcA aus *Synechocystis* sp. PCC6803 bildet einen Komplex mit PCB, der sich spektroskopisch nicht vom nativen Holo-Protein unterscheidet (Hu *et al.*, 2006). Für die spontane Chromophorylierung des Linkerproteins ApcE aus *Nostoc* sp. PCC7120 gilt das Gleiche (Zhao *et al.*, 2005a). In beiden Organismen konnten keine APC-spezifischen PBP Lyasen identifiziert werden.

Um die Proteinfunktion näher charakterisieren zu können, ist die Produktion von GtCPEZ und GtCPCX in Bezug auf die Proteinlöslichkeit zukünftig zu optimieren. Da in *E. coli* weder das Signal- noch das Transitpeptid für die Produktion benötigt werden, sollte auf die Signal-/Transitpeptide zukünftig verzichtet und die Proteinproduktion ohne diese ausprobiert werden. Für die weitere Optimierung bietet sich unter anderem ein anderer Expressionsstamm an. Da der Kodongebrauch von *G. theta* von dem von *E. coli* abweicht, ließe sich *E. coli* BL21(DE3)-RIL verwenden. Dieser kodiert zusätzliche tRNAs, die einen zu *E. coli* fremden Kodongebrauch anteilig ausgleichen können (Carstens *et al.*, 1999). Weiterhin könnte die Erzeugung eines möglichen PBP Lyase:Phycobilin-Komplexes durch Koproduktion der Proteininstabilität dienlich sein und eine Aggregation der Proteine verhindern. In einem weiteren Schritt ließe sich anschließend die Chromophorassemblierung *in vivo* in *E. coli* durchführen. Dies benötigt die Koexpression sowohl von GtCPEZ als auch GtCPCX gemeinsam mit den Phycobilin-Synthesenzymen und jeweils einer der beiden oder auch beider PBP-Untereinheiten. In verschiedenen Versuchsansätzen, bei denen auf die Expression entsprechender Gene verzichtet wird, ließe sich damit zudem der Annahme auf den Grund gehen, ob GtCPEZ lediglich eine Helferfunktion ausübt oder

womöglich gar nicht an der Chromophorylierung beteiligt ist. Des Weiteren sollte in Betracht gezogen werden, dass eine oder auch beide in dieser Arbeit verwendeten Nukleotidsequenzen in ihrer Gesamtheit nicht für die nativen PBP Lyasen kodieren. Die veröffentlichten Alternativen der C-Termini sollten, bei zukünftig weiterhin bestehender Unlöslichkeit der rekombinant produzierten Proteine, berücksichtigt werden.

### 4.3 Optimierung der 3(Z)-PEB-Gewinnung aus *E. coli*

Für die spektroskopischen Untersuchungen der PBP Lyase *GtCPES* wurden die entsprechenden Phycobiline in Isomeren-reiner Form benötigt. Die verschiedenen spektroskopischen Untersuchungen des in *E. coli* produzierten PBP Lyase:Phycobilin-Komplexes zwischen *GtCPES* und PEB weisen darauf hin, dass *GtCPES* unter natürlichen Bedingungen das Z-Isomer bindet (Overkamp et al., 2014b). Dieses ist kommerziell jedoch nicht erhältlich.

In einem zeit- und kostenaufwendigen Verfahren unter Verwendung gesundheitsgefährdender Chemikalien (Aceton, Methanol, Quecksilberchlorid) wurde PEB früher aus der Rotalge *Porphyridium cruentum* isoliert (Glazer und Hixson, 1977; Terry, 2002). Diese Methode bringt diverse Nachteile mit sich und liefert zudem überwiegend 3(E)-PEB. Eine Alternative dazu bildet die Koproduktion der Gene *ho1* und *pebS* in *E. coli*. Dabei werden lediglich geringe Mengen PEB erzeugt, da die Produktion instabil ist. An dieser Stelle kann die Phycobilinproduktion in Koproduktion mit einem Empfängerprotein (z.B. Phytochrome, PBP Lyasen) häufig verbessert werden (Dammeyer et al., 2008a; Overkamp et al., 2014b; Gasper et al., 2017; Lu et al., 2017), obwohl sich einige Phycobiline auch ohne dieses problemlos in hohen Konzentrationen produzieren lassen (BV: Chen et al., 2012; PCB: Ge et al., 2013). Eine Optimierung hinsichtlich verschiedener Produktionsbedingungen (Induktorkonzentration, Medienzusätze, Produktionstemperatur) der PEB-Produktion, bei Koproduktion von *Ho1* und *PebS* in *E. coli*, und die anschließende Vergrößerung des Ansatzes erzielten auch ohne Empfängerprotein eine Steigerung der PEB-Produktion (Stiefelmaier et al., 2018). Interessanterweise befanden sich hier größere Mengen an PEB in dem liquiden Überstand und dem gebildeten Schaum als in den Zellen. Das PEB wurde somit durch *E. coli* ausgeschieden. Abgesehen davon, dass das im Schaum befindliche PEB vor Verwendung weitere aufwendige Reinigungsschritte durchlaufen muss, wird bei dieser Produktionsmethode wiederum vorwiegend das E-Isomer gebildet.

Bei Koproduktion mit *GtCPES* als Empfängerprotein lässt sich der *GtCPES*:PEB-Komplex hingegen direkt in *E. coli* produzieren und verbleibt in den Zellen. Nach Reinigung und anschließender Ansäuerung des Komplexes wird das Lösungsmittel in einer Vakuumzentrifuge abschließend eingedampft und PEB erhalten (Overkamp *et al.*, 2014b). Aber es entsteht 3(*E*)-PEB im Überschuss, da Temperaturschwankungen während des Isolationsprozesses zu einer Konformationsänderung der Phycobiline führen können (Weller und Gossauer, 1980; Frankenberg und Lagarias, 2003b). Um beide Isomere verwenden zu können, müssen die Isomere daher im Anschluss durch eine präparative HPLC-Reinigung getrennt werden. Diese führt jedoch häufig zu reduzierten Mengen an PEB und damit zu Verlusten.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung einer Gefriertrocknungsanlage (Lyophylle, Christ) für die Verdampfung des Lösungsmittels, sich die HPLC-Reinigung vermeiden lässt. Es kam lediglich zu einer geringen Isomerisierung und das *Z*-Isomer lag in einem deutlichen Überschuss vor (Kapitel 3.2.2). Nach einer HPLC-Analyse der PEB-Probe zur Überprüfung der Zusammensetzung konnte die Probe ohne weitere Verluste direkt im Anschluss für spektroskopische Messungen verwendet werden. Die zeitaufwendige HPLC-Reinigung und -Trennung der Isomere war somit nicht mehr notwendig. Bei Bedarf an 3(*Z*)-PEB für weitere Studien von PBP Lyasen ist diese Produktions- und Isolationsmethode letztendlich zu empfehlen.

## Zusammenfassung

Cryptophyten verwenden neben Chlorophyll zusätzliche Lichtsammelproteine für die Photosynthese – die Phycobiliproteine (PBP). In Cyanobakterien, Rotalgen und Glaukophyten sind PBP ebenfalls ubiquitär verbreitet. Für den Zweck der Lichtsammlung tragen die PBP-Untereinheiten kovalent gebundene offenkettige Tetrapyrrol-Chromophore an konservierten Cysteinresten. Diese Phycobiline sind in der Lage, grünes Licht zu absorbieren und es für die Photosynthese zur Verfügung zu stellen. Die Fähigkeit zur Photosynthese erlangten Cryptophyten bei der sekundären Endosymbiose durch Aufnahme einer früheren Rotalge. Die evolutionäre Entwicklung brachte schließlich modifizierte PBP hervor. In Gegensatz zu anderen Organismen liegen die PBP in Cryptophyten in löslicher Form im Thylakoidlumen des Plastiden vor. Cryptophyten besitzen lediglich einen Typ an PBP, *Guillardia theta* verwendet Phycoerythrin PE545. Die  $\alpha$ -Untereinheiten sind jeweils mit einem Molekül 15,16-Dihydrobiliverdin (DHBV) und die  $\beta$ -Untereinheiten mit drei Molekülen Phycoerythrobilin (PEB) chromophoryliert. Die Chromophorylierung cryptophytischer Apo-PBP ist bisher wenig untersucht und verstanden. Aus Cyanobakterien ist jedoch bekannt, dass die Chromophorylierung häufig mit Hilfe von Phycobiliproteinlyasen (PBP Lyasen) stattfindet, welche die Phycobilinübertragung unterstützen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die funktionelle Charakterisierung der eukaryotischen S-Typ-PBP Lyase *GtCPES* aus *G. theta*. Mittels Fluoreszenzspektroskopie und Zink-induzierter Fluoreszenz konnte gezeigt werden, dass *GtCPES* den Transfer von 3(Z)-PEB auf Cys<sup>82</sup> der PBP- $\beta$ -Untereinheit aus *Prochlorococcus marinus* MED4 (*PmCpeB*) vermittelt. An der PEB-Bindung sowie am -Transfer beteiligte Aminosäuren wurden mit Hilfe Zielgerichteter Mutagenese identifiziert. Anhand spektroskopischer Binde- und Transferstudien mit den Proteinvarianten wurden drei Aminosäuren in der Ligandenbindetasche ermittelt, die relevant für die Bindung sind (Trp<sup>69</sup>, Glu<sup>136</sup>, Glu<sup>168</sup>). Diese koordinieren vermutlich PEB in der Bindetasche und stabilisieren somit die Konformation. Zusätzlich konnten zwei im PEB-Transfer involvierte Aminosäuren eindeutig identifiziert werden (Trp<sup>75</sup>, Ser<sup>150</sup>). Trp<sup>75</sup> kommt dabei eine essenzielle Bedeutung für den Transfer zu. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Met<sup>67</sup> für die auf PEB und DHBV beschränkte Substratspezifität von *GtCPES* verantwortlich ist. Die Variante *GtCPES\_M67A* bindet sowohl PEB als auch das rigide Phycocyanobilin (PCB) stabil unter Bildung eines farbigen Komplexes *in vitro* und *in vivo* in *Escherichia coli*. *GtCPES\_M67A* scheint zudem in der Lage zu sein, PCB auf geeignete Apo-Proteine zu transferieren. Neben der sterischen und elektrostatischen Umgebung entscheidet damit zusätzlich die Substratspezifität der PBP Lyase über die gebundenen Chromophore am PBP.

## Summary

In addition to chlorophylls cryptophytes employ phycobiliproteins (PBP) for light harvesting during oxygenic photosynthesis. PBPs are also ubiquitously distributed in cyanobacteria, red algae and glaucophytes. For light harvesting, PBP subunits carry covalently attached open-chain tetrapyrrole chromophores called phycobilins. Phycobilins absorb green light and make it available for photosynthesis. Cryptophytes gained the ability for photosynthesis during secondary endosymbiosis by uptake of a former red algae. Eventually, evolutionary development resulted in modified PBPs. In contrast to the majority of organisms in which the individual PBPs are organized in larger aggregates, known as phycobilisomes, cryptophytes employ a single type of PBP which is localized in the thylakoid lumen of the chloroplast. *Guillardia theta* utilizes the PBP phycoerythrin PE545 which binds one molecule 15,16-dihydrobiliverdin (DHBV) at both  $\alpha$  subunits and three molecules of phycoerythrobilin (PEB) at  $\beta$  subunits. Thus far, the attachment of bilins to cryptophycean apo-PBPs is not yet completely understood. However, it is known from cyanobacteria that chromophorylation is often mediated by phycobiliprotein lyases (PBP lyases) which support phycobilin transfer.

In this thesis, the functional characterization of eukaryotic S-type PBP lyase *GtCPES* from *G. theta* was presented. Fluorescence spectroscopy and zinc-induced fluorescence showed that *GtCPES* mediates transfer and covalent attachment of 3(*Z*)-PEB to the conserved Cys<sup>82</sup> of PBP- $\beta$  subunit of *Prochlorococcus marinus* MED4 (*PmCpeB*). With aid of site-directed mutagenesis amino acid residues involved in phycobilin binding and transfer were identified. By spectroscopic binding and transfer studies with variants, three amino acids in the binding pocket were identified that are relevant for binding PEB (Trp<sup>69</sup>, Glu<sup>136</sup>, Glu<sup>168</sup>). They probably coordinate PEB in the binding pocket and stabilize its conformation. In addition, two amino acid residues involved in PEB transfer were identified (Trp<sup>75</sup>, Ser<sup>150</sup>). Here, Trp<sup>75</sup> is essential for the transfer. Moreover, one single amino acid residue (Met<sup>67</sup>) was identified that exchange resulted in 3(*E*)-phycocyanobilin (PCB) binding variants by reason of larger binding site. Thus, Met<sup>67</sup> is responsible for restricted substrate specificity of *GtCPES* which is usually limited to PEB and DHBV. *GtCPES\_M67A* binds both PEB and PCB in a stable, colorful complex *in vitro* and *in vivo* produced in *Escherichia coli*. Furthermore, *GtCPES\_M67A* seems to be able to mediate PCB transfer to suitable apo-PBP subunits. Therefore, it was shown that PBP lyase substrate specificity in addition to steric and electrostatic protein environment determines PBP attached phycobilins.

## 5 Literaturverzeichnis

- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. 1990. Basic local alignment search tool. *J Biol Chem* 215: 403-410.
- Andrade MA, Bork P. 1995. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* 11: 115-116.
- Apt K, Collier J, Grossman A. 1995. Evolution of the phycobiliproteins. *J Mol Biol* 248: 79-96.
- Arakawa T, Timasheff S. 1985. The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J* 47: 411-414.
- Archibald J, Keeling P. 2002. Recycled plastids: a 'green movement' in eukaryotic evolution. *Trends Genet* 18: 577-584.
- Archibald J. 2007. Nucleomorph genomes: structure, function, origin and evolution. *BioEssays* 29: 392-402.
- Arciero DM, Bryant DA, Glazer AN. 1988a. *In vitro* attachment of bilins to apophycocyanin. I. Specific covalent adduct formation at cysteinyl residues involved in phycocyanobilin binding in C-phycocyanin. *J Biol Chem* 263: 18343-18349.
- Arciero DM, Dallas JL, Glazer AN. 1988b. *In vitro* attachment of bilins to apophycocyanin. III. Properties of the phycoerythrobilin adduct. *J Biol Chem* 263: 18358-18363.
- Back J, Oakenfull D, Smith M. 1979. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry* 18: 5191-5196.
- Bairoch A, Apweiler R, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, Gasteiger E, Huang H, Lopez R, Magrane M, Martin MJ, Natale DA, O'Donovan C, Redaschi N, Yeh LL. 2004. The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 33: D154-D159.
- Berkelman TR, Lagarias JC. 1986. Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 156: 194-201.
- Beuhler RJ, Pierce RC, Friedman L, Siegelman HW. 1976. Cleavage of phycocyanobilin from C-phycocyanin. Separation and mass spectral identification of the products. *J Biol Chem* 251: 2405-2411.
- Beutler M, Wiltshire KH, Meyer B, Moldaenke C, Luring C, Meyerhofer M, Hansen UP, Dau H. 2002. A fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ*. *Photosynth Res* 72: 39-53.
- Biswas A, Vasquez YM, Dragomani TM, Kronfel ML, Williams SR, Alvey RM, Bryant DA, Schluchter, WM. 2010. Biosynthesis of cyanobacterial phycobiliproteins in *Escherichia coli*: chromophorylation efficiency and specificity of all bilin lyases from *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Appl Environ Microbiol* 76: 2729-2739.
- Biswas A, Boutaghou MN, Alvey RM, Kronfel CM, Cole RB, Bryant DA, Schluchter WM. 2011. Characterization of the activities of the CpeY, CpeZ, and CpeS bilin lyases in phycoerythrin biosynthesis in *Fremyella diplosiphon* strain UTEX 481. *J Biol Chem* 286: 35509-35521.
- Blankenship R. 2014. Molecular mechanisms of photosynthesis. Chichester: *Wiley Blackwell*.
- Bogorad L. 1975. Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. *Ann Rev Plant Phys* 26: 369-401.
- Boivin S, Kozak S, Meijers R. 2013. Optimization of protein purification and characterization using ThermoFluor screens. *Protein Express Purif* 91: 192-206.
- Bolte K, Kawach O, Prechtel J, Gruenheit N, Nyalwidhe J, Maier U. 2008. Complementation of a phycocyanin-bilin lyase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 with a nucleomorph-encoded open reading frame from the cryptophyte *Guillardia theta*. *BMC Plant Biol* 8: 56.

- Bolte K, Bullmann L, Hempel F, Bozarth A, Zauner S, Maier U. 2009. Protein Targeting into secondary plastids. *J Eukaryot Microbiol* 56: 9-15.
- Brautigam C, Zhao H, Vargas C, Keller S, Schuck P. 2016. Integration and global analysis of isothermal titration calorimetry data for studying macromolecular interactions. *Nat Protoc* 11: 882-894.
- Breitaudeau A, Coste F, Humily F, Garczarek L, Le Corguille G, Six C, Ratin M, Collin O, Schluchter WM, Partensky F. 2013. CyanoLyase: a database of phycobilin lyase sequences, motifs and functions. *Nucleic Acids Res* 41: D396-D401.
- Broughton M, Howe C, Hiller R. 2006. Distinctive organization of genes for light-harvesting proteins in the cryptophyte alga *Rhodomonas*. *Gene* 369: 72-79.
- Bryant DA. 1982. Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: Properties and occurrence in cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 128: 835-844.
- Burki F, Okamoto N, Pombert JF and Keeling PJ. 2012. The evolutionary history of haptophytes and cryptophytes: phylogenomic evidence for separate origins. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 279: 2246-2254.
- Busch A, Reijerse E, Lubitz W, Frankenberg-Dinkel N, Hofmann E. 2011a. Structural and mechanistic insight into the ferredoxin-mediated two-electron reduction of bilins. *Biochem J* 439: 257-264.
- Busch A, Reijerse E, Lubitz W, Hofmann E, Frankenberg-Dinkel N. 2011b. Radical mechanism of cyanophage phycoerythrobilin synthase (PebS). *Biochem J* 433: 469-476.
- Carstens CP, Waesche A. 1999. Codon bias-adjusted BL21 derivatives for protein expression. *Strategies* 12: 49-51.
- Cavalier-Smith T. 2003. Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 109-133.
- Chen D, Brown J, Kawasaki Y, Bommer J, Takemoto J. 2012. Scalable production of biliverdin IX $\alpha$  by *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol* 12: 89.
- Crespi HL, Smith UH. 1970. The chromophore-protein bonds in phycocyanin. *Phytochemistry* 9: 205.
- Curtis B, Tanifuji G, Burki F, Gruber A, Irimia M, Maruyama S, Arias M, Ball S, Gile G, Hirakawa Y, Hopkins J, Kuo A, Rensing S, Schmutz J, Symeonidi A, Elias M, Eveleigh R, Herman E, Klute M, Nakayama T, Oborník M, Reyes-Prieto A, Armbrust E, Aves S, Beiko R, Coutinho P, Dacks J, Durnford D, Fast N, Green B, Grisdale C, Hempel F, Henrissat B, Höppner M, Ishida K, Kim E, Kořený L, Kroth P, Liu Y, Malik S, Maier U, McRose D, Mock T, Neilson J, Onodera N, Poole A, Pritham E, Richards T, Rocap G, Roy S, Sarai C, Schaack S, Shirato S, Slamovits C, Spencer D, Suzuki S, Worden A, Zauner S, Barry K, Bell C, Bharti A, Crow J, Grimwood J, Kramer R, Lindquist E, Lucas S, Salamov A, McFadden G, Lane C, Keeling P, Gray M, Grigoriev I, Archibald J. 2012. Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature* 492: 59-65.
- Dammeyer T, Frankenberg-Dinkel N. 2006. Insights into phycoerythrobilin biosynthesis point toward metabolic channeling. *J Biol Chem* 281: 27081-27089.
- Dammeyer T, Bagby S, Sullivan M, Chisholm S, Frankenberg-Dinkel N. 2008a. Efficient phage-mediated pigment biosynthesis in oceanic cyanobacteria. *Curr Biol* 18: 442-448.
- Dammeyer T, Hofmann E, Frankenberg-Dinkel N. 2008b. Phycoerythrobilin synthase (PebS) of a marine virus. *J Biol Chem* 283: 27547-27554.

- Davis S, Kurepa J, Vierstra R. 1999. The *Arabidopsis thaliana* HY1 locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6541-6546.
- Debreczeny M, Sauer K, Zhou J, Bryant D. 1993. Monomeric C-phycoerythrin at room temperature and 77 K: resolution of the absorption and fluorescence spectra of the individual chromophores and the energy-transfer rate constants. *J Phys Chem* 97: 9852-9862.
- Derks A, Vasiliev S, Bruce D. 2008. Under light limiting growth, CpcB lyase null mutants of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 are capable of producing pigmented  $\beta$ -phycoerythrin but with altered chromophore function. *Biochemistry* 47: 11877-11884.
- Dismukes G, Klimov V, Baranov S, Kozlov Y, DasGupta J, Tyrishkin A. 2001. The origin of atmospheric oxygen on Earth: The innovation of oxygenic photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* 98: 2170-2175.
- Douglas SE und Penny SL. 1999. The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta*: complete sequence and conserved synteny groups confirm its common ancestry with red algae. *J Mol Evol* 48: 236-244.
- Douglas S, Zauner S, Fraunholz M, Beaton M, Penny S, Deng L, Wu X, Reith M, Cavalier-Smith T, Maier U. 2001. The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. *Nature* 410: 1091-1096.
- Doust AB, Marai CN, Harrop SJ, Wilk KE, Curmi PM, Scholes GD. 2004. Developing a structure-function model for the cryptophyte phycoerythrin 545 using ultrahigh resolution crystallography and ultrafast laser spectroscopy. *J Mol Biol* 344: 135-153.
- Doust AB, Wilk KE, Curmi PM, Scholes GD. 2006. The photophysics of cryptophyte light-harvesting. *J Photochem Photobiol A* 184: 1-17.
- Ducklow H, Baker K, Martinson D, Quetin L, Ross R, Smith R, Stammerjohn S, Vernet M, Fraser W. 2007. Marine pelagic ecosystems: the West Antarctic Peninsula. *Philos T R Soc B* 362: 67-94.
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* 2: 953-971.
- Facchinelli F, Weber A. 2011. The metabolite transporters of the plastid envelope: an update. *Front Plant Sci* 2.
- Fairchild CD, Zhao J, Zhou J, Colson SE, Bryant DA, Glazer AN. 1992. Phycocyanin alpha-subunit phycocyanobilin lyase. *Proc Natl Acad Sci* 89: 7017-7021.
- Fairchild CD, Glazer AN. 1994a. Nonenzymatic bilin addition to the alpha subunit of an apophycoerythrin. *J Biol Chem* 269: 28988-28996.
- Fairchild, CD, Glazer, AN. 1994b. Oligomeric structure, enzyme kinetics, and substrate specificity of the phycocyanin alpha subunit phycocyanobilin lyase. *J Biol Chem* 269: 8686-8694.
- Falk H. 1989. The chemistry of linear oligopyrroles and bile pigments. Wien: *Springer Verlag*.
- Ficner R, Lobeck K, Schmidt G, Huber R. 1992. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of B-phycoerythrin from the red alga *Porphyridium sordidum* at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol* 228: 935-950.
- Fischer A, Rockwell N, Jang A, Ernst L, Waggoner A, Duan Y, Lei H, Lagarias J. 2005. Multiple roles of a conserved GAF domain tyrosine residue in cyanobacterial and plant phytochromes. *Biochemistry* 44: 15203-15215.
- Flower D, North A, Sansom C. 2000. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *BBA - Protein Struct M* 1482: 9-24.

- Frankenberg N, Mukougawa K, Kohchi T, Lagarias JC. 2001. Functional genomic analysis of the HY2 family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms. *Plant Cell Online* 13: 965-978.
- Frankenberg N, Lagarias JC. 2003a. Phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase of *Anabaena* sp. PCC 7120. Biochemical and spectroscopic characterization. *J Biol Chem* 278: 9219-9226.
- Frankenberg N, Lagarias JC. 2003b. Biosynthesis and biological functions of bilins. In: Kadish KM, Smith, KM, Guillard R (eds.). *The Porphyrin Handbook* .Vol. 13. Boston: *Academic Press*: 211-235.
- Frankenberg-Dinkel N. 2004. Bacterial heme oxygenases. *Antioxid Redox Sign* 6: 825-834.
- Gantt E, Edwards MR, Provasoli L. 1971. Chloroplast structure of the cryptophyceae. Evidence for phycobiliproteins within intrathylakoidal spaces. *J Cell Biol* 48: 280-290.
- Gaspar R, Schwach J, Hartmann J, Holtkamp A, Wiethaus J, Riedel N, Hofmann E, Frankenberg-Dinkel N. 2017. Distinct features of cyanophage-encoded T-type phycobiliprotein lyase  $\Phi$ CpET. *J Biol Chem* 292: 3089-3098.
- Ge B, Li Y, Sun H, Zhang S, Hu P, Qin S, Huang F. 2013. Combinational biosynthesis of phycocyanobilin using genetically-engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 35: 689-693.
- Gill S, von Hippel P. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182: 319-326.
- Gilson PR, McFadden GI. 2002. Jam packed genomes – a preliminary, comparative analysis of nucleomorphs. *Genetica* 115: 13-28.
- Gilson PR, Su V, Slamovits CH, Reith ME, Keeling PJ, McFadden GI. 2006. Complete nucleotide sequence of the chlorarachniophyte nucleomorph: nature's smallest nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9566-9571.
- Gindt Y, Zhou J, Bryant D, Sauer K. 1992. Core mutations of *Synechococcus* sp. PCC 7002 phycobilisomes: a spectroscopic study. *J Photochem Photobiol B: Biology* 15: 75-89.
- Glazer AN, Hixson CS. 1977. Subunit structure and chromophore composition of rhodophytan phycoerythrins. *Porphyridium cruentum* B-phycoerythrin and b-phycoerythrin. *J Biol Chem* 252: 32-42.
- Glazer AN. 1985. Light harvesting by phycobilisomes. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 14: 47-77.
- Glazer AN. 1994. Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. *J Appl Phycol* 6: 105-112.
- Glazer AN, Wedemayer GJ. 1995. Cryptomonad biliproteins - an evolutionary perspective. *Photosynth Res* 46: 93-105.
- Gossauer A, Klahr E. 1979. Synthesen von Gallenfarbstoffen, VIII. Totalsynthese des racem. Phycoerythrobilin-dimethylesters. *Chem Ber* 112: 2243-2255.
- Gould SB, Sommer MS, Hadfi K, Zauner S, Kroth PG, Maier UG. 2006a. Protein targeting into the complex plastid of cryptophytes. *J Mol Evol* 62: 674-681.
- Gould SB, Sommer MS, Kroth PG, Gile GH, Keeling PJ, Maier UG. 2006b. Nucleus-to-nucleus gene transfer and protein retargeting into a remnant cytoplasm of cryptophytes and diatoms. *Mol Biol Evol* 23: 2413-2422.
- Gould SB, Fan E, Hempel F, Maier UG, Klosgen RB. 2007. Translocation of a phycoerythrin alpha subunit across five biological membranes. *J Biol Chem* 282: 30295-30302.
- Gould SB, Waller RF, McFadden GI. 2008. Plastid evolution. *Annu Rev Plant Biol* 59: 491-517.

- Greenwold MJ, Cunningham BR, Lachenmyer EM, Pullman JM, Richardson TL, Dudycha JL. 2019. Diversification of light capture ability was accompanied by the evolution of phycobiliproteins in cryptophyte algae. *Proc R Soc B* 286: 20190655.
- Greenwood AD, Griffiths HB, Santore UJ. 1977. Chloroplasts and cell compartments in cryptophyceae. *Brit Phycol J* 12: 119.
- Gross JH. 2011. Mass Spectrometry. 2. Auflage. Berlin Heidelberg: *Springer Verlag*: 7-8, 366-368.
- Groves M, Hanlon N, Turowski P, Hemmings B, Barford D. 1999. The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell* 96: 99-110.
- Gruber A, Vugrinec S, Hempel F, Gould S, Maier U, Kroth P. 2007. Protein targeting into complex diatom plastids: functional characterisation of a specific targeting motif. *Plant Mol Biol* 64: 519-530.
- Hartmann J. 2016. Charakterisierung von Phycobiliproteinlyasen aus *Guillardia theta* und marinen Cyanophagen. Bachelor-Abschlussarbeit. Technische Universität Kaiserslautern.
- Hauth AM, Maier UG, Lang BF, Burger G. 2005. The *Rhodomonas salina* mitochondrial genome: bacteria-like operons, compact gene arrangement and complex repeat region. *Nucleic Acids Res* 33: 4433-4442.
- Hemmings BA, Adams-Pearson C, Maurer F, Müller P, Goris J, Merlevede W, Hofsteenge J, Stone SR. 1990. Alpha- and beta-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure. *Biochemistry* 29: 3166-3173.
- Hoef-Emden K, Melkonian M. 2003. Revision of the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae): a combination of molecular phylogeny and morphology provides insights into a long-hidden dimorphism. *Protist* 154: 371-409.
- Hoef-Emden K. 2005. Multiple independent losses of photosynthesis in the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae) – combined phylogenetic analyses of DNA sequences of the nuclear and the nucleomorph ribosomal operons. *J Mol Evol* 60: 183-195.
- Hoef-Emden K. 2008. Molecular phylogeny of phycocyanin-containing cryptophytes: evolution of biliproteins and geographical distribution. *J Phycol* 44: 985-993.
- Howe C, Barbrook A, Nisbet R, Lockhart P, Larkum A. 2008. The origin of plastids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363: 2675-2685.
- Hu IC, Lee TR, Lin HF, Chiueh CC, Lyu PC. 2006. Biosynthesis of fluorescent allophycocyanin R-subunits by autocatalytic bilin attachment. *Biochemistry* 45: 7092-7099.
- Jenkins J, Hiller RG, Speirs J, Godovac-Zimmermann J. 1990. A genomic clone encoding a cryptophyte phycoerythrin alpha-subunit. Evidence for three alpha-subunits and an N-terminal membrane transit sequence. *FEBS Lett* 273: 191-194.
- Johnson M, Beaudoin D, Frada M, Brownlee E, Stoecker D. 2018. High grazing rates on cryptophyte algae in Chesapeake Bay. *Front Mar Sci* 5.
- Klaveness D. 1988. Ecology of the cryptomonadida: a first review. In: Sandgren CD (ed.). Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton. Cambridge: *Cambridge University Press*: 105-133.
- Klaveness D. 1989. Biology and ecology of the cryptophyceae: status and challenges. *Biol Oceanogr* 6: 257-270.
- Keeling P. 2010. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365: 729-748.
- Kehoe D, Grossman A. 1994. Complementary chromatic adaptation: photoperception to gene regulation. *Semin Cell Biol* 5: 303-313.

- Kehoe DM, Gutu A. 2006. Responding to color: the regulation of complementary chromatic adaptation. *Annu Rev Plant Biol* 57: 127-150.
- Kehoe D. 2010. Chromatic adaptation and the evolution of light color sensing in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci* 107: 9029-9030.
- Keller S, Vargas C, Zhao H, Piszczek G, Brautigam C, Schuck P. 2012. High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis. *Anal Chem* 84: 5066-5073.
- Kieselbach T, Cheregi O, Green B, Funk C. 2017. Proteomic analysis of the phycobiliprotein antenna of the cryptophyte alga *Guillardia theta* cultured under different light intensities. *Photosynth Res* 135: 149-163.
- Kikuchi H, Sugimoto T, Mimuro M. 1997. An electronic state of the chromophore, phycocyanobilin, and its interaction with the protein moiety in C-phycocyanin: protonation of the chromophore. *Chem Phys Lett* 274: 460-465.
- Kohchi T, Mukougawa K, Frankenberg N, Masuda M, Yokota A, Lagarias JC. 2001. The *Arabidopsis* HY2 gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin dependent biliverdin reductase. *Plant Cell* 13: 425-436.
- Krois D, Lehner H. 1991. Conformation control of bilatrienes by peptides: a survey. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly* 122: 89-100.
- Krois D, Lehner H. 1993. Helically fixed chiral bilirubins and biliverdins: a new insight into the conformational, associative and dynamic features of linear tetrapyrroles. *J Chem Soc* 7: 1351-1360.
- Kronfel CM, Kuzin AP, Forouhar F, Biswas A, Su M, Lew S, Seetharaman J, Xiao R, Everett JK, Ma LC, Acton TB, Montelione GT, Hunt JF, Paul CE, Dragomani TM, Boutaghou MN, Cole RB, Riml C, Alvey RM, Bryant DA, Schluchter WM. 2013. Structural and biochemical characterization of the bilin lyase CpcS from *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochemistry* 52: 8663-8676.
- Kronfel C, Hernandez C, Frick J, Hernandez L, Gutu A, Karty J, Boutaghou M, Kehoe D, Cole R, Schluchter W. 2019a. CpeF is the bilin lyase that ligates the doubly linked phycoerythrobilin on  $\beta$ -phycoerythrin in the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*. *J Biol Chem* 294: 3987-3999.
- Kronfel C, Biswas A, Frick J, Gutu A, Blensdorf T, Karty J, Kehoe D, Schluchter W. 2019b. The roles of the chaperone-like protein CpeZ and the phycoerythrobilin lyase CpeY in phycoerythrin biogenesis. *BBA - Bioenergetics* 1860: 549-561.
- Kronick M, Grossman PD. 1983. Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates. *Clin Chem* 29: 1582-1586.
- Kugrens P, Lee RE. 1991. Organization of cryptomonads. In: Patterson DJ, Larsen J (eds). *Biology of free-living heterotrophic flagellates*. Oxford: Clarendon Press: 219-233.
- Kumagai A, Ando R, Miyatake H, Greimel P, Kobayashi T, Hirabayashi Y, Shimogori T, Miyawaki A. 2013. A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle. *Cell* 153: 1602-1611.
- Kupka M, Zhang J, Fu WL, Tu JM, Böhm S, Su P, Chen Y, Zhou M, Scheer H, Zhao KH. 2009. Catalytic mechanism of S-type phycobiliprotein lyase chaperone like action and functional amino acid residues. *J Biol Chem* 284: 36405-36414.
- Ladbury J, Chowdhry B. 1996. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. *Chem Biol* 3: 791-801.
- Lagarias JC, Glazer AN, Rapoport H. 1979. Chromopeptides from C-phycocyanin. Structure and linkage of a phycocyanobilin bound to the beta-subunit. *J Am Chem Soc* 101: 5030.
- Lane CE, van den Heuvel K, Kozera C, Curtis BA, Parsons BJ, Bowman S, Archibald JM. 2007. Nucleomorph genome of *Hemiselmis andersenii* reveals complete intron loss and compaction as a driver of protein structure and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19908-19913.

- Ledermann B, Béjà O, Frankenberg-Dinkel N. 2016. New biosynthetic pathway for pink pigments from uncultured oceanic viruses. *Environ Microbiol* 18: 4337-4347.
- Ledermann B, Frankenberg-Dinkel N. 2018. Phagen-codierte metabolische Hilfgene krepeln den Wertsstoffwechfel um. *BIOspektrum* 24: 372-374.
- Lichtlé C, Jupin H, Duval JC. 1980. Energy transfers from photosystem II to photosystem I in *Cryptomonas rufescens* (Cryptophyceae). *BBA-Bioenergetics* 591: 104-112.
- Margulis L. 1970. Origin of eukaryotic cells. New Haven: *Yale University Press*.
- MacColl R, Guard-Friar D. 1987. Phycobiliproteins. *CRC Press Boca Raton*.
- MacColl R. 1998. Cyanobacterial phycobilisomes. *J Struct Biol* 124: 311-334.
- Metfies K, Gescher C, Frickenhaus S, Niestroy R, Wichels A, Gerdts G, Knefelkamp B, Wiltshire K, Medlin L. 2010. Contribution of the class cryptophyceae to phytoplankton structure in the german bight1. *J Phycol* 46: 1152-1160.
- Moline M, Karnovsky N, Brown Z, Divoky G, Frazer T, Jacoby C, Torres J, Fraser W. 2008. High latitude changes in ice dynamics and their impact on polar marine ecosystems. *Ann NY Acad Sci* 1134: 267-319.
- Montgomery B. 2017. Seeing new light: recent insights into the occurrence and regulation of chromatic acclimation in cyanobacteria. *Curr Opin Plant Biol* 37: 18-23.
- Morrall S, Greenwood A. 1980. A comparison of the periodic substructure of the trichocysts of the cryptophyceae and prasinophyceae. *Biosystems* 12: 71-83.
- Mörschel E, Wehrmeyer W. 1975. Cryptomonad biliprotein: Phycocyanin-645 from a *Chroomonas* species. *Arch Microbiol* 105: 153-158.
- Mörschel E, Wehrmeyer W. 1979. Elektronenmikroskopische Feinstrukturanalyse von nativen Biliproteidaggregaten und deren räumliche Ordnung. *Ber Deutsch Bot Ges* 92: 393-402.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Sym* 51: 263-273.
- Muramoto T, Kohchi T, Yokota A, Hwang I, Goodman H. 1999. The *Arabidopsis* photomorphogenic mutant *hy1* is deficient in phytochrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid heme oxygenase. *Plant Cell* 11: 335.
- Niesen F, Berglund H, Vedadi M. 2007. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc* 2: 2212-2221.
- Nobel PS. 2005. Physicochemical and environmental plant physiology. 3. Auflage. London: *Academic Press*: 232.
- Overkamp K, Langklotz S, Aras M, Helling S, Marcus K, Bandow J, Hoef-Emden K, Frankenberg-Dinkel N. 2014a. Chromophore composition of the phycobiliprotein Cr-PC577 from the cryptophyte *Hemiselmis pacifica*. *Photosynth Res* 122: 293-304.
- Overkamp K, Gasper R, Kock K, Herrmann C, Hofmann E, Frankenberg-Dinkel N. 2014b. Insights into the biosynthesis and assembly of cryptophycean phycobiliproteins. *J Biol Chem* 289: 26691-26707.
- Overkamp K. 2014. Biosynthese offenkettiger Tetrapyrrole und Assemblierung von Phycobiliproteinen in der Cryptophyte *Guillardia theta*. Dissertation. Ruhr-Universität Bochum.
- Palmer JD, Soltis DE, Chase MW. 2004. The plant tree of life: an overview and some points of view. *Am J Bot* 91: 1437-1445.
- Pauls J. 2014. Charakterisierung von Phycobiliproteinlyasen aus marinen Cyanophagen. Master-Abschlussarbeit. Ruhr-Universität Bochum.

- Porter G, Tredwell CJ, Searle GFW, Barber J. 1978. Picosecond time-resolved energy transfer in *Porphyridium cruentum*. Part I. In the intact alga. *Biochim Biophys Acta* 501: 232-245.
- Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M. 2003. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem* 75: 663-670.
- Rhie G, Beale SI. 1992. Biosynthesis of phycobilins: Ferredoxin-supported NADPH-independent heme oxygenase and phycobilin-forming activities from *Cyanidium caldarium*. *J Biol Chem* 267: 16088-16093.
- Rogers MB, Gilson PR, Su V, McFadden GI, Keeling PJ. 2007. The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte *Bigeloviella natans*: evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts. *Mol Biol Evol* 24: 54-62.
- Rosano G, Ceccarelli E. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 2001. Molecular cloning. Cold Spring Harbor, NY: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sauer K, Scheer H. 1988. Excitation transfer in C-phycocyanin. Förster transfer rate and exciton calculations based on new crystal structure data for C-phycocyanins from *Agmenellum quadruplicatum* and *Mastigocladus laminosus*. *BBA - Bioenergetics* 936: 157-170.
- Scheer H. 1981. Biliproteine. *Angew Chem* 93: 230-250.
- Scheer H, Zhao KH. 2008. Biliprotein maturation: the chromophore attachment. *Mol Microbiol* 68: 263-276.
- Scheuermann T, Brautigam C. 2015. High-precision, automated integration of multiple isothermal titration calorimetric thermograms: New features of NITPIC. *Methods* 76: 87-98.
- Schirmer T, Bode W, Huber R. 1987. Refined three-dimensional structures of two cyanobacterial C-phycocyanins at 2.1 and 2.5 Å resolution. *J Mol Biol* 196: 677-695.
- Scholes G. 2010. Quantum-coherent electronic energy transfer: did nature think of it first? *J Phys Chem Lett* 1: 2-8.
- Searle GFW, Barber J, Porter G, Tredwell, CJ. 1978. Picosecond time-resolved energy transfer in *Porphyridium cruentum*. Part II. In the isolated light-harvesting complex (phycobilisomes). *Biochim Biophys Acta* 501: 246-256.
- Shen G, Saunee NA, Williams SR, Gallo EF, Schluchter WM, Bryant DA. 2006. Identification and characterization of a new class of bilin lyase: the cpcT gene encodes a bilin lyase responsible for attachment of phycocyanobilin to Cys-153 on the beta-subunit of phycocyanin in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *J Biol Chem* 281: 17768-17778.
- Shen G, Schluchter WM, Bryant DA. 2008. Biogenesis of phycobiliproteins: I. cpcSI and cpcU mutants of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 define a heterodimeric phycocyanobilin lyase specific for beta-phycocyanin and allophycocyanin subunits. *J Biol Chem* 283: 7503-7512.
- Sidler WA. 1994. Phycobilisome and phycobiliprotein structure. In: Bryant, DA (ed.). The molecular biology of cyanobacteria. Dordrecht: *Kluwer*: 139-216.
- Spear-bernstein L, Miller K. 1989. Unique location of the phycobiliprotein light-harvesting pigment in the cryptophyceae. *J Phycol* 25: 412-419.
- Steinberg T, Jones L, Haugland R, Singer V. 1996. SYPRO Orange and SYPRO Red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. *Anal Biochem* 239: 223-237.

- Stiefelmaier J, Ledermann B, Sorg M, Banek A, Geib D, Ulber R, Frankenberg-Dinkel N. 2018. Pink bacteria – Production of the pink chromophore phycoerythrobilin with *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 274: 47-53.
- Stoebe B, Maier UG. 2002. One, two, three: nature's tool box for building plastids. *Protoplasma* 219: 123-130.
- Summons RE, Jahnke LL, Hope JM, Logan GA. 1999. 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. *Nature* 400: 554-557.
- Tandeau de Marsac N. 1977. Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *J Bacteriol* 130: 82-91.
- Tandeau de Marsac N, Cohen-bazire G. 1977. Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. *Proc Natl Acad Sci* 74: 1635-1639.
- Terry M, McDowell M, Lagarias J. 1995. (3Z)- and (3E)-phytochromobilin are intermediates in the biosynthesis of the phytochrome chromophore. *J Biol Chem* 270: 11111-11118.
- Terry M. 2002. Biosynthesis and analysis of bilins. In: Smith AG, Witty M (eds.). Heme, chlorophyll, and bilins. Totowa, N.J.: Humana Press: 273-291.
- Thomas J, Baneyx F. 1996. Protein folding in the cytoplasm of *Escherichia coli*: requirements for the DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES molecular chaperone machines. *Mol Microbiol* 21:1185-1196.
- Tovchigrechko A, Vakser I. 2006. GRAMM-X public web server for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res* 34: W310-W314.
- Tu SL, Gunn A, Toney MD, Britt RD, Lagarias JC. 2004. Biliverdin reduction by cyanobacterial phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase (PcyA) proceeds via linear tetrapyrrole radical intermediates. *J Am Chem Soc* 126: 8682-8693.
- Tu J, Kupka M, Böhm S, Plöscher M, Eichacker L, Zhao K, Scheer H. 2008. Intermediate binding of phycocyanobilin to the lyase, CpeS1, and transfer to apoprotein. *Photosynth Res* 95: 163-168.
- Wedemayer GJ, Kidd DG, Wemmer DE, Glazer AN. 1992. Phycobilins of cryptophycean algae. Occurrence of dihydrobiliverdin and mesobiliverdin in cryptomonad biliproteins. *J Biol Chem* 267: 7315-7331.
- Wedemayer G, Kidd D, Glazer A. 1996. Cryptomonad biliproteins: bilin types and locations. *Photosynth Res* 48: 163-170.
- Weller J, Gossauer A. 1980. Synthesen von Gallenfarbstoffen, X. Synthese und Photoisomerisierung des racem. Phytochromobilin-dimethylesters. *Chem Ber* 113: 1603-1611.
- Wemmer DE, Wedemayer GJ, Glazer AN. 1993. Phycobilins of cryptophycean algae. Novel linkage of dihydrobiliverdin in a phycoerythrin 555 and a phycocyanin 645. *J Biol Chem* 268: 1658-1669.
- Whitton BA, Potts M. 2012. The Ecology of cyanobacteria. Dordrecht: Kluwer: 1-13.
- Wiethaus J, Busch AW, Kock K, Leichert LI, Herrmann C, Frankenberg-Dinkel N. 2010a. CpeS is a lyase specific for attachment of 3Z-PEB to Cys<sup>82</sup> of betaphycoerythrin from *Prochlorococcus marinus* MED4. *J Biol Chem* 285: 37561-37569.
- Wiethaus J, Busch A, Dammeyer T, Frankenberg-Dinkel N. 2010b. Phycobiliproteins in *Prochlorococcus marinus*: Biosynthesis of pigments and their assembly into proteins. *Eur J Cell Biol* 89: 1005-1010.

- Wilk KE, Harrop SJ, Jankova L, Edler D, Keenan G, Sharples F, Hiller RG, Curmi PM. 1999. Evolution of a light-harvesting protein by addition of new subunits and rearrangement of conserved elements: crystal structure of a cryptophyte phycoerythrin at 1.63-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8901-8906.
- Wilks, A. 2002. Heme oxygenase: evolution, structure, and mechanism. *Antioxid Redox Sign* 4: 603-614.
- Willows R, Mayer S, Foulk M, DeLong A, Hanson K, Chory J, Beale S. 2000. Phytobilin biosynthesis: the *Synechocystis* sp. PCC6803 heme oxygenase-encoding *ho1* gene complements a phytochrome-deficient *Arabidopsis thaliana* *hy1* mutant. *Plant Mol Biol* 43: 113-120.
- Zauner S, Fraunholz M, Wastl J, Penny S, Beaton M, Cavalier-Smith T, Maier UG, Douglas S. 2000. Chloroplast protein and centrosomal genes, a tRNA intron, and odd telomeres in an unusually compact eukaryotic genome, the cryptomonad nucleomorph. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 200-205.
- Zhao J, Zhou J, Bryant D. 1992. Energy transfer processes in phycobilisomes as deduced from analyses of mutants of *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Res Photosynth* 1: 25-32.
- Zhao KH, Deng MG, Zheng M, Zhou M, Parbel A, Storf M, Meyer M, Strohmam B, Scheer H. 2000. Novel activity of a phycobiliprotein lyase: both the attachment of phycocyanobilin and the isomerization to phycoviolobilin are catalyzed by the proteins PecE and PecF encoded by the phycoerythrocyanin operon. *FEBS Lett* 469: 9-13.
- Zhao KH, Su P, Böhm S, Song B, Zhou M, Bubenzer C, Scheer H. 2005a. Reconstitution of phycobilisome core-membrane linker, L<sub>CM</sub>, by autocatalytic chromophore binding to ApcE. *Biochim Biophys Acta* 1706: 81-87.
- Zhao KH, Wu D, Zhou M, Zhang L, Böhm S, Bubenzer C, Scheer H. 2005b. Amino acid residues associated with enzymatic activities of the isomerizing phycoviolobilin-lyase PecE/F. *Biochemistry* 44: 8126-8137.
- Zhao KH, Su P, Li J, Tu JM, Zhou M, Bubenzer C, Scheer H. 2006a. Chromophore attachment to phycobiliprotein β-subunits: phycocyanobilin:cysteine β84 phycobiliprotein lyase activity of CpeS-like protein from *Anabaena* sp. PCC7120. *J Biol Chem* 281: 8573-8581.
- Zhao KH, Wu D, Zhang L, Zhou M, Böhm S, Bubenzer C, Scheer H. 2006b. Chromophore attachment in phycocyanin: Functional amino acids of phycocyanobilin –α-phycocyanin lyase and evidence for chromophore binding. *FEBS J* 273: 1262-1274.
- Zhao KH, Su P, Tu JM, Wang X, Liu H, Plösch M, Eichacker L, Yang B, Zhou M, Scheer H. 2007a. Phycobilin: cysteine-84 biliprotein lyase, a near-universal lyase for cysteine-84-binding sites in cyanobacterial phycobiliproteins. *Proc Natl Acad Sci* 104: 14300-14305.
- Zhao KH, Zhang J, Tu JM, Böhm S, Ploscher M, Eichacker L, Bubenzer C, Scheer H, Wang X, Zhou M. 2007b. Lyase activities of CpcS- and CpcT-like proteins from *Nostoc* PCC7120 and sequential reconstitution of binding sites of phycoerythrocyanin and phycocyanin beta-subunits. *J Biol Chem* 282: 34093-34103.
- Zhao C, Höppner A, Xu Q, Gärtner W, Scheer H, Zhou M, Zhao KH. 2017. Structures and enzymatic mechanisms of phycobiliprotein lyases CpcE/F and PecE/F. *Proc Natl Acad Sci* 114: 13170-13175.
- Zhou W, Ding W, Zeng X, Dong L, Zhao B, Zhou M, Scheer H, Zhao K, Yang X. 2014. Structure and mechanism of the phycobiliprotein lyase CpcT. *J Biol Chem* 289: 26677-26689.

## 6 Anhang

### 6.1 Sequenzen

#### 6.1.1 Nukleotidsequenzen

Die Nukleotidsequenzen sind jeweils vom 5'- zum 3'-Ende aufgeführt.

***cpcB* aus *Synechococcus* sp. PCC7002 (519 bp):**

ATGTTTGATATTTTTACCCGGGTTGTTTCTCAGGCTGATGCCCCGAGGTGAGTTCATTTCTAGCGACAA  
 GCTCGAAGCTCTCAAAAAAGTTGTTGCCGAAGGTACCAAGCGTTCTGATGCCGTAAGCCGCATGACCA  
 ACAATGCGTCTTCCATCGTTACTAACGCTGCTCGTCAACTCTTCGCTGACCAGCCCCAACTCATCGCTC  
 CCGGTGAAAATGCTTACACCAACCGTCGCATGGCTGCTTGTCTTCGCGACATGGAAATCATCCTCCGTT  
 ATGTAACCTACGCAACCTTCACTGGTGATGCGTCTGTACTCAACGACCGCTGCCTCAATGGCCTCCGTG  
 AAACCTACGTTGCGCTTGGTGTTCGCGTGCTTCCGTTGCTGCTGGTGTACGTGCAATGGGTAAAGCTG  
 CTGTAGCGATTGTTATGGATCCCGCTGGTGTAACCTCCGCTGACTGCAGCTCTCTCCAACAGGAAATCG  
 AACTCTACTTCGAAACTGCTGCAAAGCTGTTGAATAA

***gtCPCX* aus *Guillardia theta* CCMP2712 (Signalsequenz ist rot markiert)(615 bp mit Sig-  
 nalsequenz; 573 bp ohne Signalsequenz):**

**AACTCTGCTTGTGTGAGAGAAGCGGCGTGAAGGGCTTGGCG**ATGATATCGGAGAAGGGAAACCGCAA  
 CGTTGTGCTCGCCATGGCCGAAGTGGTCGAGGAGGAGAGAGCCATCACTGTGAGGAGTGCAGCGCTGC  
 AAGCTCTGACAAGGGTGGCTGAGAGGGGGGACGAGGTAGCTGTGCGCCTGTGCTGAAGCTGCTGCGG  
 CGGGTTGAGGGCACAGAGAGAGGAGATTTCTTCTCCCCTCACCTCTCCCCATCATCAGCAAGAATGCT  
 GCCAAGGCCCTAGGTAGCCTAGCAGAGTACGGAGACCTCAAGGCCCTCAAGGCCTTCACTGCGCGTA  
 TTGGACGATCCGAACCCTGTGGTGAGGGAAGCAGCTGCGCGAGCACTTGGGAGCATTGCGAACATGGG  
 TGACCGGCAAGTGATCTTCGCCCTCACGATCTGCCTGGAGGACGAGGACGAGGGAGTTCGACGGTCAGC  
 GATGAGGAGCCTCAAGTCGTTGAAGAAGAAGGAGAAGGACGACGGAAGCCTGAGCGACTTACTTTCGG  
 AGGAGGACGACATGCTCGAGTGGTACGCGACGTGGTTGTGGCTGGTTCCTCTAGCGTGGGACTGCTGA

***gtCPEZ* aus *Guillardia theta* CCMP2712 (723 bp):**

ATGATCTCAAGGGTTTTATCCTGTCAACTCTTCTATCCTCTGCCTCAGCATATTCCTTGGCCCCAGTG  
 CTTCAAGGCTTGAAGGCTCCCTCCTCTGCTCCCTTGTGCCACAAGTTCTCTGCTCGGCCAGGAGTGCGG  
 AGAGGCCTTACGCCGGTCAGGGCTGGTGACCAACCCATCCCGGAGGGTTTCCGAGAGTTCCAGGCGAGG

GAGAAAAGCCTGGATGAATGGTTTGC AAAGCTTGCTGATAGCCGCTCCTCCATCCGTCAGATGGCCAGC  
 ATCAAGATCGCTGAGATGCACGACAAGGAAGGGGAGGAGCAGGAGAAGGCTGTGATTCAACGGCTGTT  
 CAGTTACCTCACCTTGGAGGACGTCCATGAGAGGAGAGCAGCGGTGCAGGCGCTGGGAATGATCGGAC  
 AGAAGGTCCTGCCGCCGCTGGTTGACATGCTCCTTGCGACTGAGGACCGCGTTGTGCGGGCGTCTGCT  
 CCAAGGCCATCGGAGCAGTTGCTCTGAAGAACCCCGAGCTCCTCCCGGAGTTTCCGCAGCTCGCGCTTG  
 ATGGGATGAAGAAGGCGATTCTTGACATCCCTGACCTGTGACCAAGATCGCCACCATCAGCTCCCTCG  
 GACAGATCGGAGGAGGGGATGTTGCTCATGGCTACCCGGGATGCGAGAGGGTGAGAGATTCCGATCTT  
 TCAGTCCTACTTCCCTCTCCTCTCTCGTCCTCCTAG

### 6.1.2 Aminosäuresequenzen

Die Aminosäuresequenzen sind jeweils vom N- zum C-Terminus aufgeführt.

#### **StrepII-GtCPES aus *Guillardia theta* CCMP2712**

MASWSHPQFEKIEGRMSVEEFFERSVGSWRSLRSSHNI AFAQLEEVNSDIDITQVAADDSEFLDICKTYN  
 FEPEKACSSIRMSWEGSSDWDENEVIKSTVLVLYKDEERKGKLLRSVGYTETIPAVGEWTMQEDGTFV  
 LHTFYDRAAAEERIWFATPDLRMRC SIIKTQHGKGVLTASLSTEVRDKSK\*

#### **His-PmCpeB aus *Prochlorococcus marinus* MED4**

MGSSHHHHHSQDPNSMTVSKSNQILSNDRDLENISNKNIEDIKEFINTANSRLDAIDSITNNSHAI AAD  
 AVTAMICENQDSVNTKISLDTTNKMSVCLRDGEIILRIVSYLLISDDESVL SKNCLKDLKNTYLALGVPLK  
 NAIRVFELMRDATISDLKSTVNSMKGEKEFLSD LISNTEFQFERIINLLR\*

#### **His-SCpcB aus *Synechococcus* sp. PCC7002**

MGSSHHHHHSQDPNSMFDIFTRVVSQADARGEFISSDKLEALKKVVAEGTKRSDAVSRMTN NASSIVT  
 NAARQLFADQPQLIAPGGNAYTNRRMAACL RDM EILRYVTYATFTGDASVLNDRCLNGLRETYVALGV  
 PGASVAAGVRAMGKAAVAIVMDPAGVTS GDCSSLQQEIELYFETAAKAVE\*

**StrepII-GtCPCX aus *Guillardia theta* CCMP2712 (Sequenzanhang ist in Blau markiert)**

MASWSHPQFEKGAETAVPNSNSACVREAAVKGLAMISEKGNRNVVLAMAELVEEERAITVRS AALQA  
 LTRVAERGDEVAVAPVLKLLRRVEGTERGDFFSPLHSPIISKNAAKALGSLAEYGDLKALKALHLRVLD  
 DPNPVVREAAARALGSIANMGDRQVIFALTICLEDEDEGVRRSAMRSLKSLKKKEKDDGSLSDLLAEE  
 DDMLEWYATWLWLVPLAWDC\*

**StrepII-GtCPEZ aus *Guillardia theta* CCMP2712 (Signalpeptid ist in Rot markiert)**

MASWSHPQFEKGAETAVPNSMISR VFILSTLLSSASAYSLAPVLQGLKAPSSAPLCHKFSARPGVRRGLT  
 PVRAGDQPIPEGFREFQAREKSLDEWFAKLADSRSSIRQMASIKIAEMHDKEGEEQEKAVIQRLFSYLT  
 EDVHERRAAVQALGMIGQKVLPLVDMLLATEDRVVRASCSKAIGAVALKNPPELLPEFPQLALDGMKK  
 AILDIPDPVTKIATISSLGQIGGGDVAHGYPGCERVRDSDLSVLLPSPLSSS\*

**His-GtCPCX aus *Guillardia theta* CCMP2712 (Sequenzanhang ist in Blau markiert)**

MGSSHHHHHSQDPNSNSACVREAAVKGLAMISEKGNRNVVLAMAELVEEERAITVRS AALQALTRVA  
 ERGDEVAVAPVLKLLRRVEGTERGDFFSPLHSPIISKNAAKALGSLAEYGDLKALKALHLRVLD DPNPVV  
 REAAARALGSIANMGDRQVIFALTICLEDEDEGVRRSAMRSLKSLKKKEKDDGSLSDLLAEEDDMLEWY  
 ATWLWLVPLAWDC\*

**His-GtCPEZ aus *Guillardia theta* CCMP2712 (Signalpeptid ist in Rot markiert)**

MGSSHHHHHSQDPNSMISR VFILSTLLSSASAYSLAPVLQGLKAPSSAPLCHKFSARPGVRRGLTPVR  
 AGDQPIPEGFREFQAREKSLDEWFAKLADSRSSIRQMASIKIAEMHDKEGEEQEKAVIQRLFSYLTLED  
 VHERRAAVQALGMIGQKVLPLVDMLLATEDRVVRASCSKAIGAVALKNPPELLPEFPQLALDGMKKA  
 IILDIPDPVTKIATISSLGQIGGGDVAHGYPGCERVRDSDLSVLLPSPLSSS\*

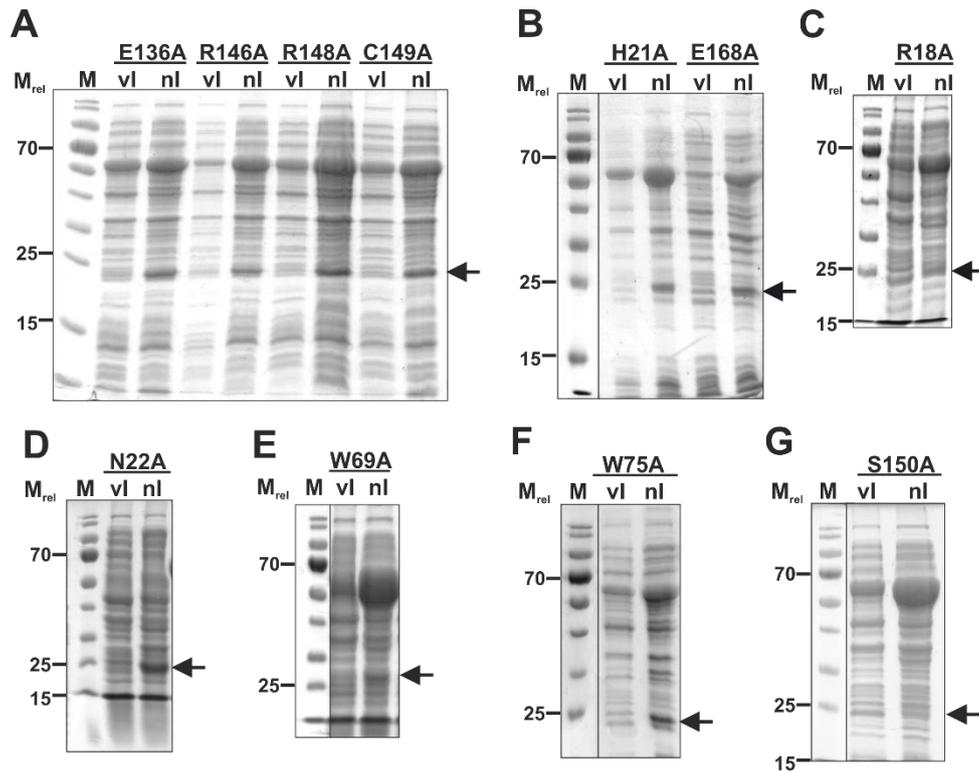
### 6.1.3 Protein- und Genidentifikationsnummern

**Tabelle 6.1: Protein- und Genidentifikationsnummern der putativen PBP Lyasen *GtCPCX* und *GtCPEZ*.**

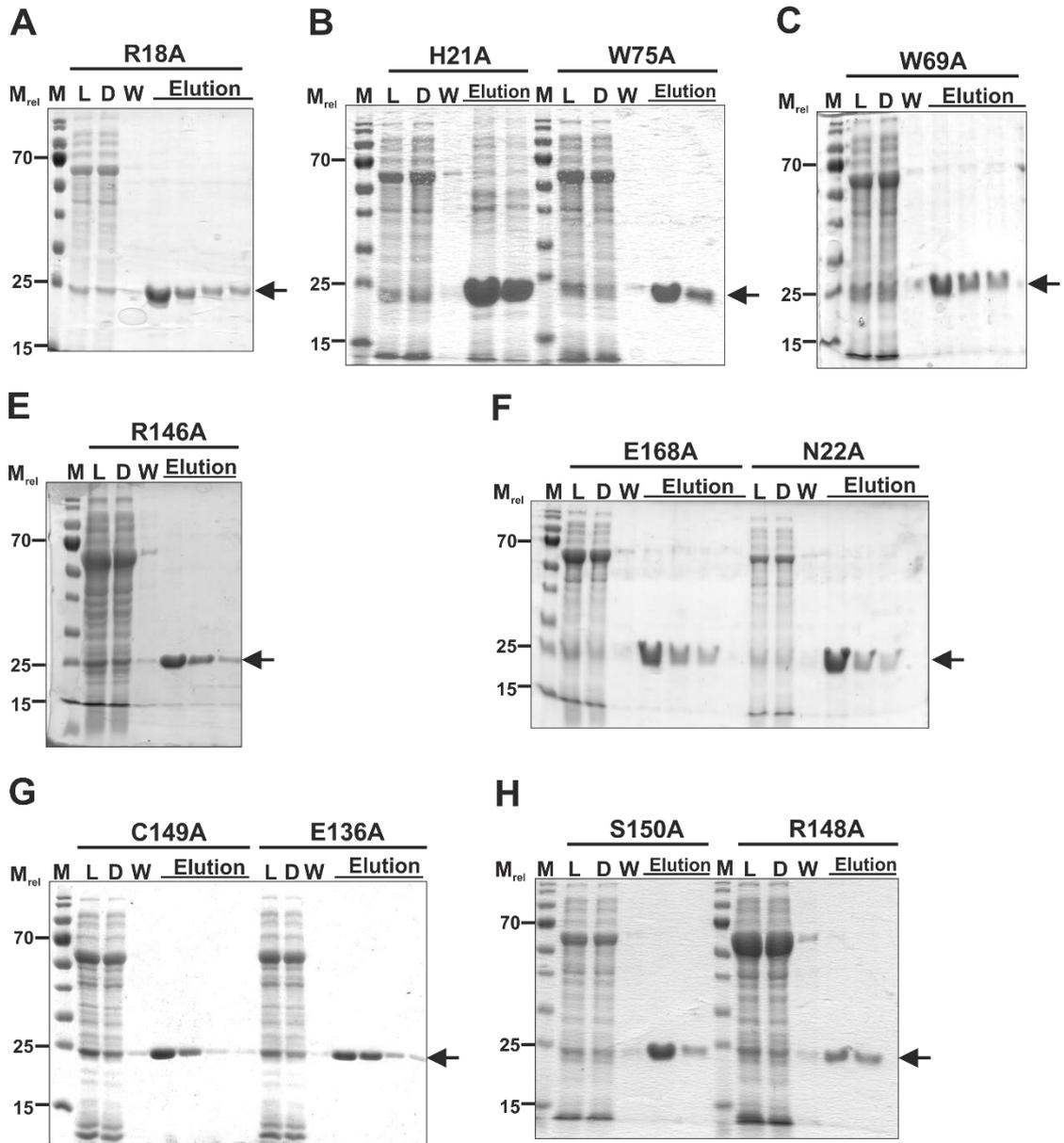
Protein	NCBI Referenznummer	GenBank	JGI <i>G. theta</i> ProteinID	Gene ID
<i>GtCPCX</i>	XP_005821529.1 (Hypothetisches Protein)	EKX34549.1	Guith1_98043	17291277
	XM_005821472.1 (mRNA)			
	NW_005434531.1 (Genomsequenz)			
<i>GtCPEZ</i>	XP_005833467.1 (Hypothetisches Protein)	EKX46487.1	Guith1_70527	17303167
	XM_005833410.1 (mRNA)			
	NW_005434644.1 (Genomsequenz)			

## 6.2 Abbildungen

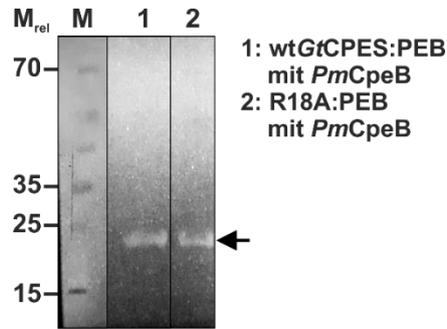
### 6.2.1 Charakterisierung der GtCPES-Struktur



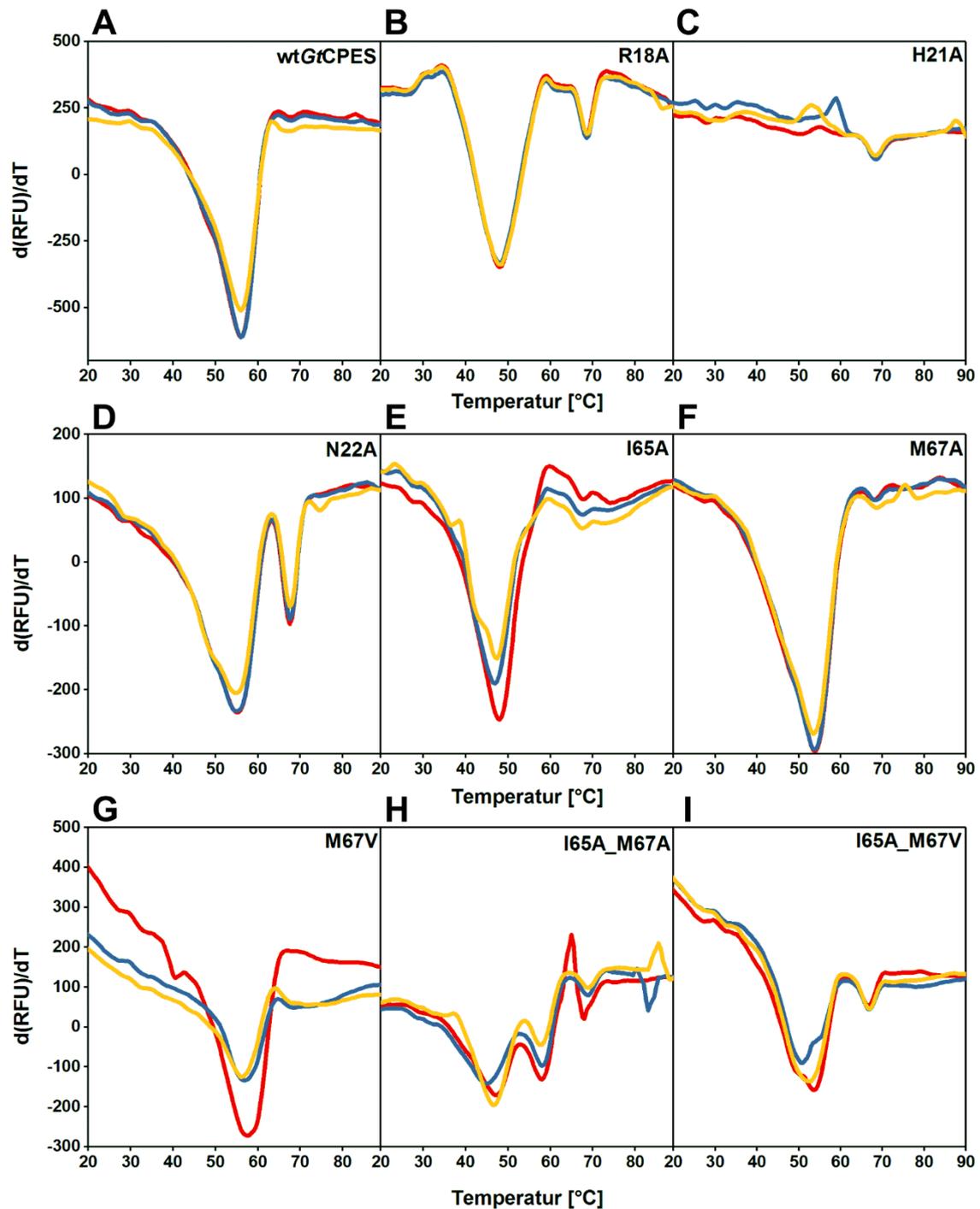
**Abbildung 6.1: SDS-PAGE der Produktion der verschiedenen GtCPES Varianten.** A-G. Die Produktion der Varianten in *E. coli* BL21(DE3) fand bei 17 °C über Nacht in Koexpression mit dem Chaperonplasmid pGro7 statt. Es wurde LB-BS-Medium verwendet. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie gefärbt. Der Pfeil markiert die produzierten Varianten mit einer Größe von etwa 21,6 kDa.  $M_{rel}$ : Relative Molekülmasse (x1000); M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher); vl: Zellprobe vor der Induktion; nl: Zellprobe nach der Induktion.



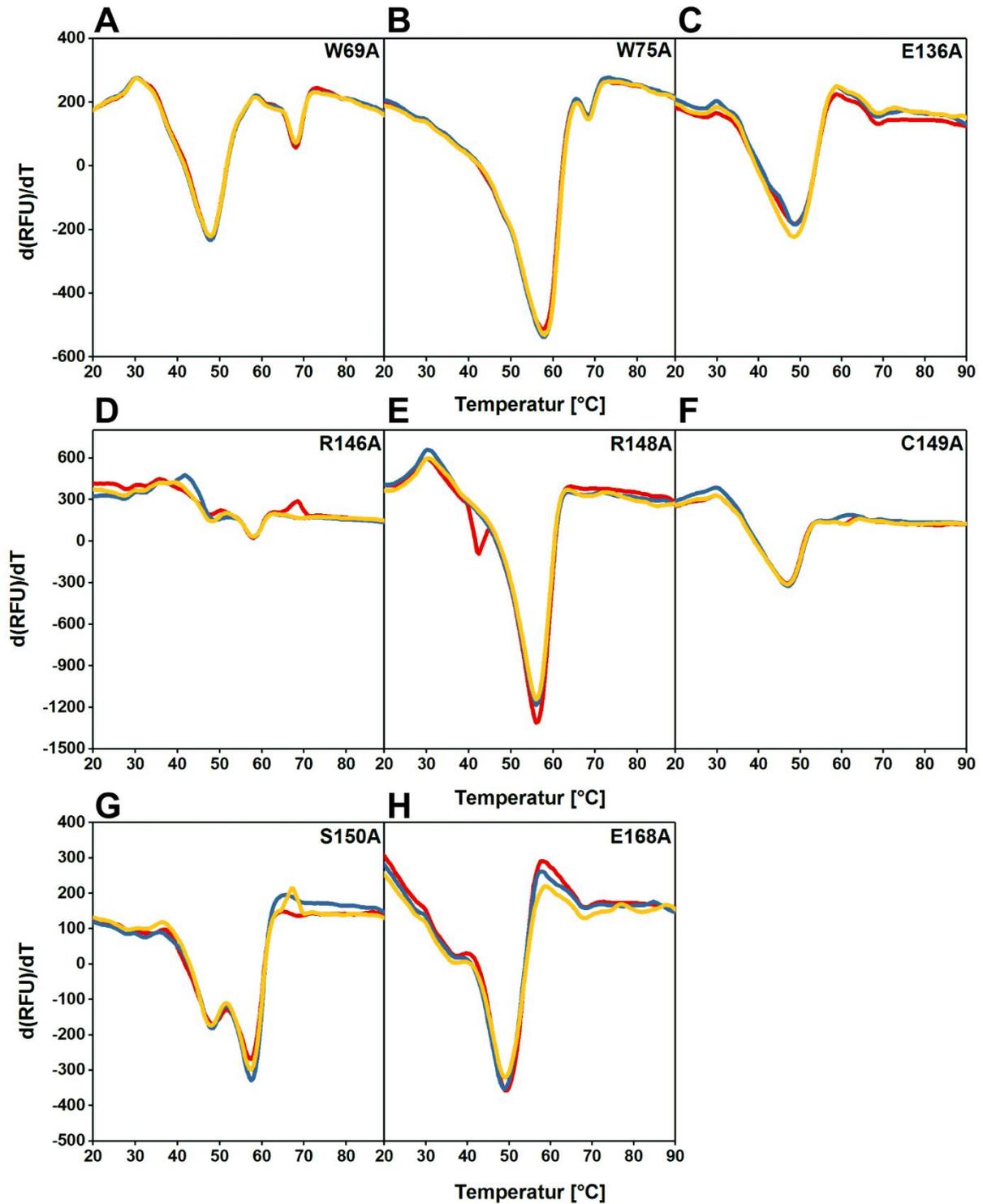
**Abbildung 6.2: SDS-PAGE der Reinigung verschiedener GtCPES Varianten.** A-H. Die Proteine wurden mittels Affinitätschromatographie (Strep-Tactin®) gereinigt und mittels SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie gefärbt. Der Pfeil markiert die Varianten mit einer Größe von etwa 21,6 kDa. M<sub>rel</sub>: Relative Molekülmasse (x1000); M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher); vI: Zellprobe vor der Induktion; nI: Zellprobe nach der Induktion; L: Lysat; D: Durchlauf; W: Waschfraktion.



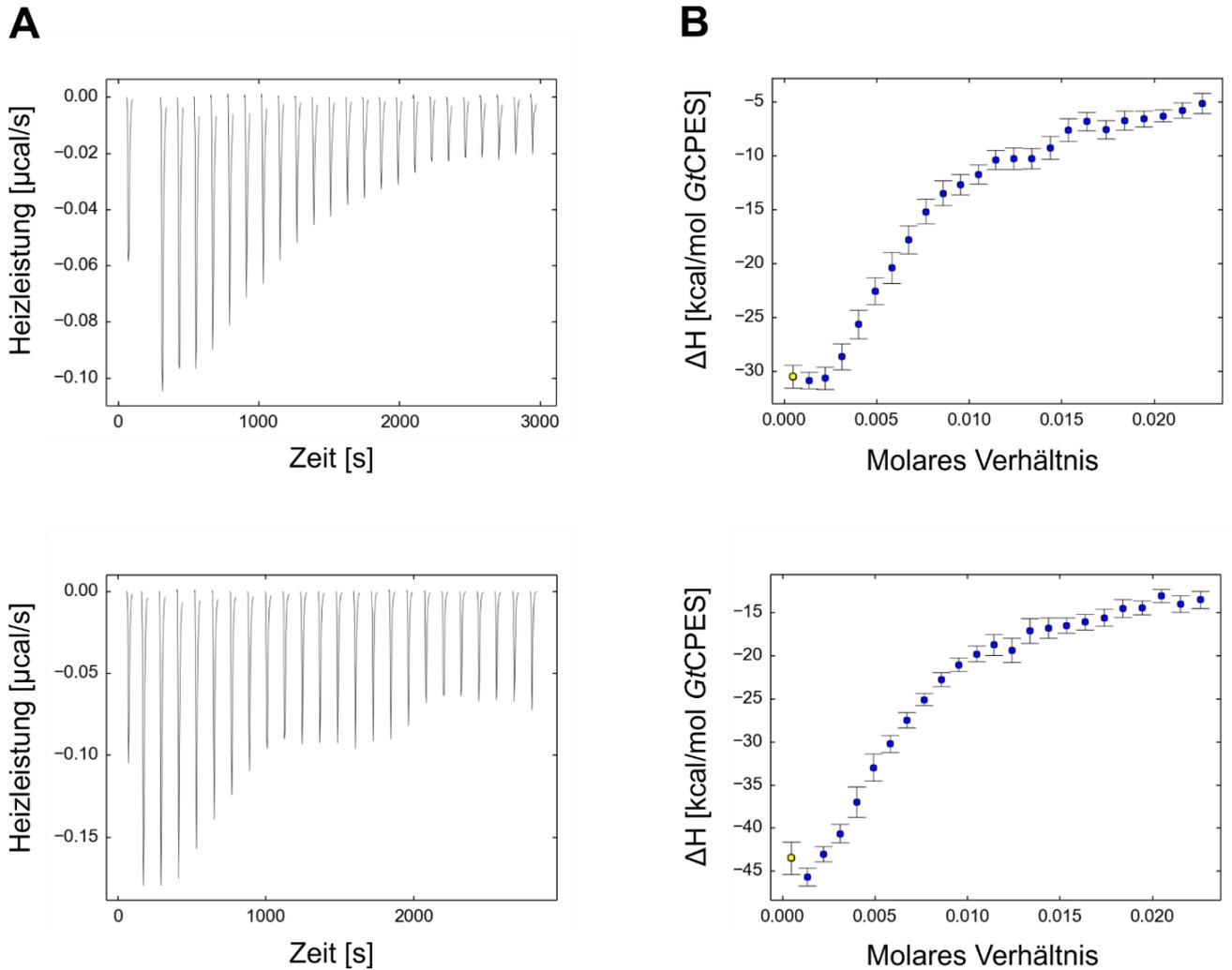
**Abbildung 6.3: Zink-Blot als Nachweis der gebildeten kovalenten Bindung durch die Übertragung von 3(Z)-PEB auf PmCpeB vermittelt durch GtCPES\_R18A. A.** Für die Messung wurden 5  $\mu$ M 3(Z)-PEB mit 20  $\mu$ M GtCPES oder GtCPES\_R18A und anschließend mit 20  $\mu$ M PmCpeB versetzt. Die Reaktionsproben wurden nach 45 min Messdauer für eine SDS-PAGE verwendet und auf eine PVDF-Membran überführt. Diese wurde für 1 h bei 4 °C in einer 1,3 M Zinkacetat-Lösung inkubiert und unter UV-Licht (312 nm) analysiert. Der Pfeil markiert PmCpeB-PEB mit einer Größe von ~21,9 kDa.  $M_{rel}$ : Relative Molekülmasse (x1000).



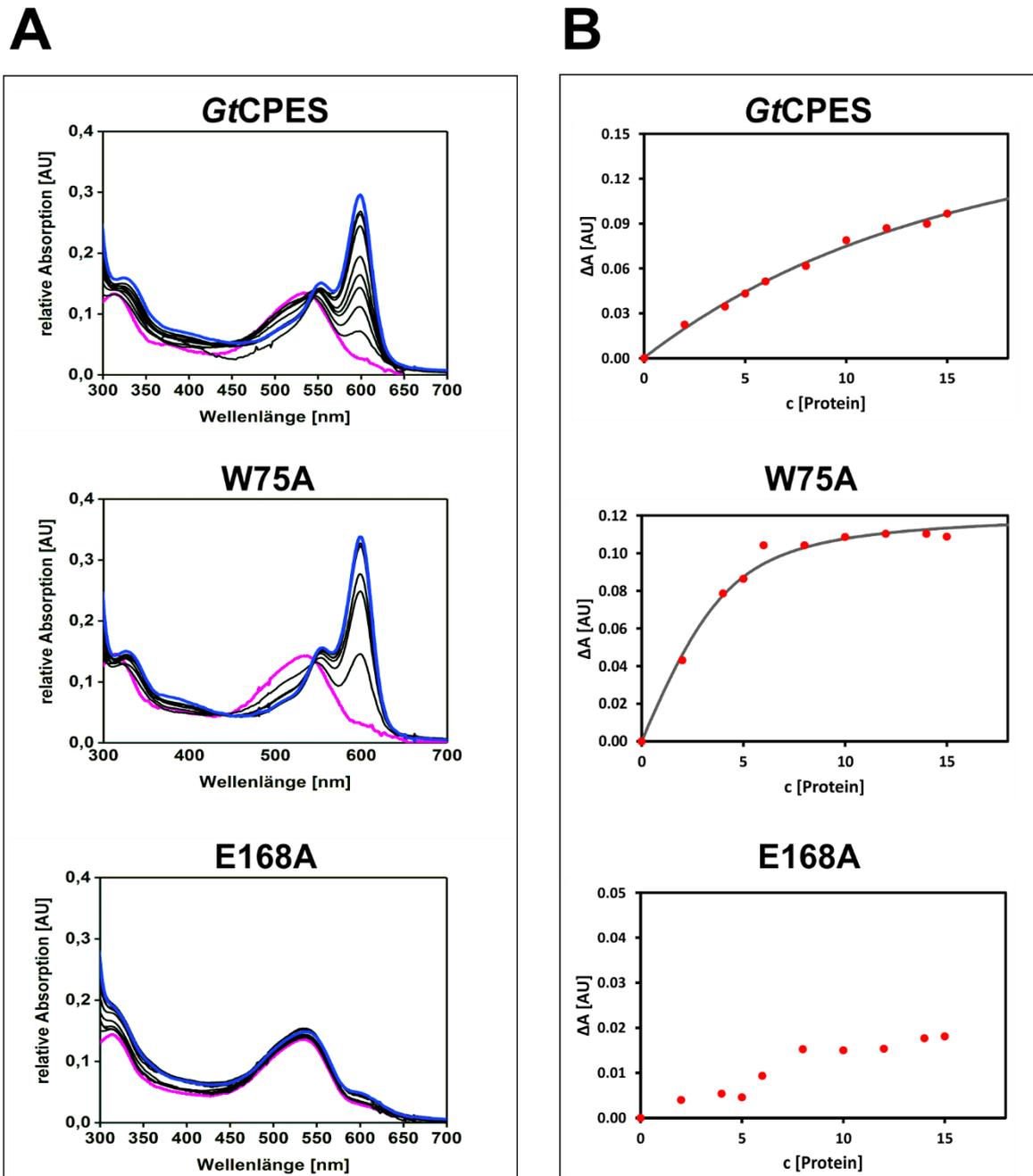
**Abbildung 6.4: Ableitung der Schmelzkurven für GtCPES (Varianten) zur Bestimmung der Schmelztemperatur.** A-I. Die Proteine wurden innerhalb eines ThermoFluor Assays mit 10x SYPRO Orange versetzt und in einem qPCR-Gerät der Firma Bio-Rad (CFX Connect™ Real-Time System) denaturiert. Es wurden 2 mg ml<sup>-1</sup> Protein in Lyaseassaypuffer eingesetzt. Anhand der dargestellten Ableitung der Fluoreszenz (in RFU) nach der Temperatur aufgetragen gegen die Temperatur wurden die jeweiligen Schmelzpunkte bestimmt.



**Abbildung 6.5: Ableitung der Schmelzkurven für GtCPES (Varianten) zur Bestimmung der Schmelztemperatur.** A-H. Die Proteine wurden innerhalb eines ThermoFluor Assays mit 10x SYPRO Orange versetzt und in einem qPCR-Gerät der Firma Bio-Rad (CFX Connect™ Real-Time System) denaturiert. Es wurden  $2 \text{ mg ml}^{-1}$  Protein in Lyaseassaypuffer eingesetzt. Anhand der dargestellten Ableitung der Fluoreszenz (in RFU) nach der Temperatur aufgetragen gegen die Temperatur wurden die jeweiligen Schmelzpunkte bestimmt.

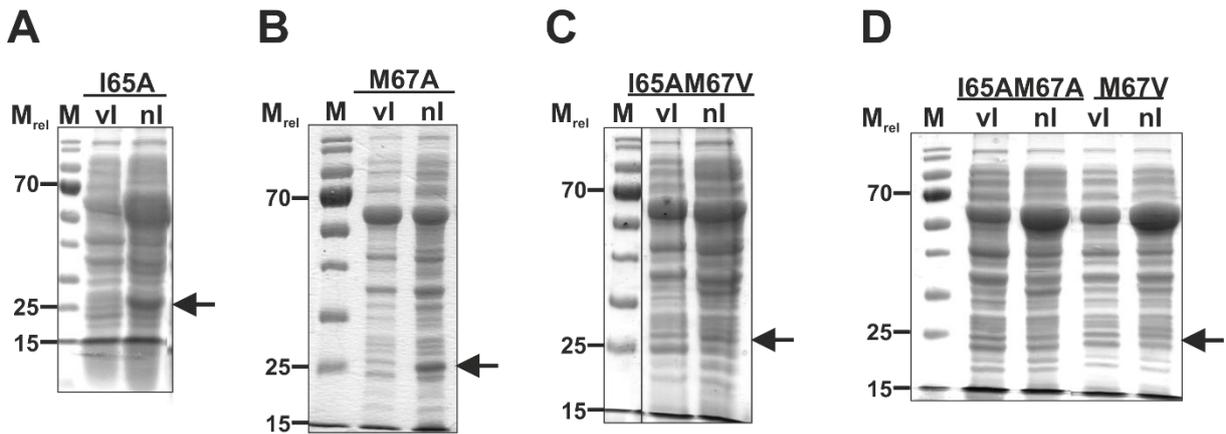


**Abbildung 6.6: Thermogramme und Isothermen der ITC-Messungen für GtCPES mit PEB.** 30  $\mu\text{M}$  3(Z)-PEB wurden in der Temperatur-kontrollierten Probekammer vorgelegt und 300  $\mu\text{M}$  GtCPES-Lösung in 1,7  $\mu\text{l}$ -Schritten hinzutitriert. Die Messungen wurden bei 20  $^{\circ}\text{C}$  in LAP durchgeführt. **A.** Die Änderung der Heizleistung wurde mittels eines Titrationskalorimeters (iTC200, Malvern Instruments) detektiert. **B.** Bei Integration der Heizleistung wurde die Bindungsenthalpie erhalten und gegen das molare Verhältnis von PEB und GtCPES aufgetragen. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  wurde mit Hilfe der frei verfügbaren Software-Pakete *NITPIC* und *SEDPHAT* (Keller *et al.*, 2012; Scheuermann und Brautigam, 2015; Brautigam *et al.*, 2016) automatisch berechnet und über zwei Messungen gemittelt.  $\Delta\text{H}$ : Bindungsenthalpie.

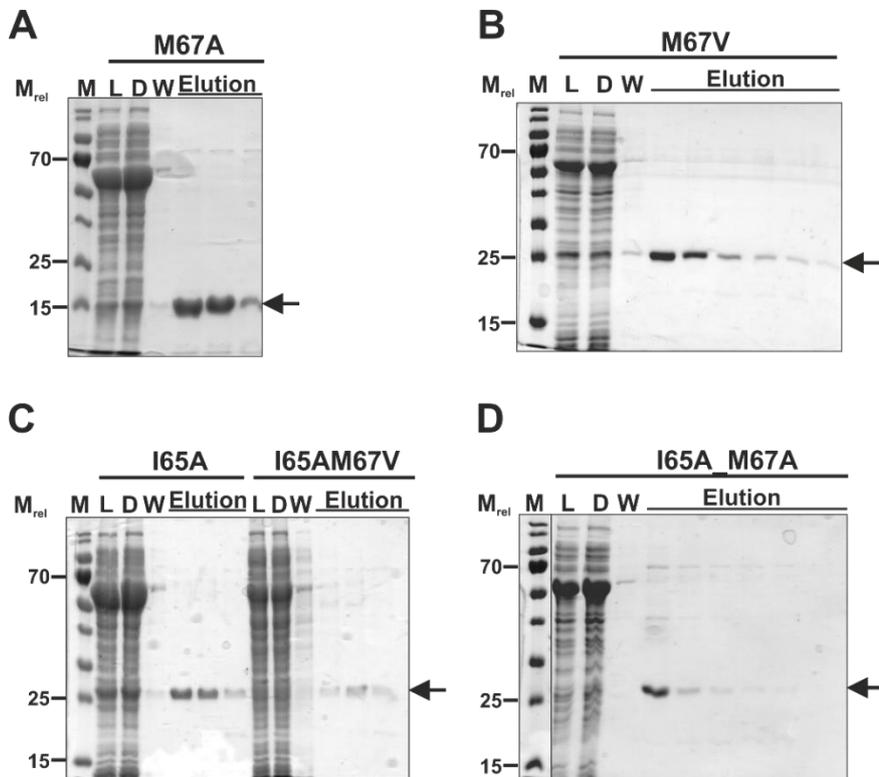


**Abbildung 6.7: Bestimmung von Bindungsaffinitäten für die Bindung zwischen GtCPES (Varianten) und 3(Z)-PEB mit Hilfe von UV/vis-Spektroskopie basierter Titration.** **A.** Absorptionsspektren für die Titration von 2-15  $\mu\text{M}$  PBP Lyase zu 10  $\mu\text{M}$  3(Z)-PEB. Die pinke Linie zeigt das Absorptionsspektrum von freiem 3(Z)-PEB zu Beginn der Messung, die blaue das letzte Spektrum nach Titration von 15  $\mu\text{M}$  GtCPES (Variante). **B.** Auftragung der gemittelten Differenz  $\Delta A$  der in A gemessenen Absorptionsmaxima zur Basislinie gegen die jeweils eingesetzte Konzentration an GtCPES (Variante). Die schwarze Linie beschreibt das mit Gleichung 2 an die experimentellen Daten angepasste Kurvenmodell, aus dem mit Hilfe der Solver-Funktion von Microsoft Excel der  $K_D$ -Wert berechnet wurde. Gezeigt ist jeweils nur eine Messung der Doppelbestimmung.

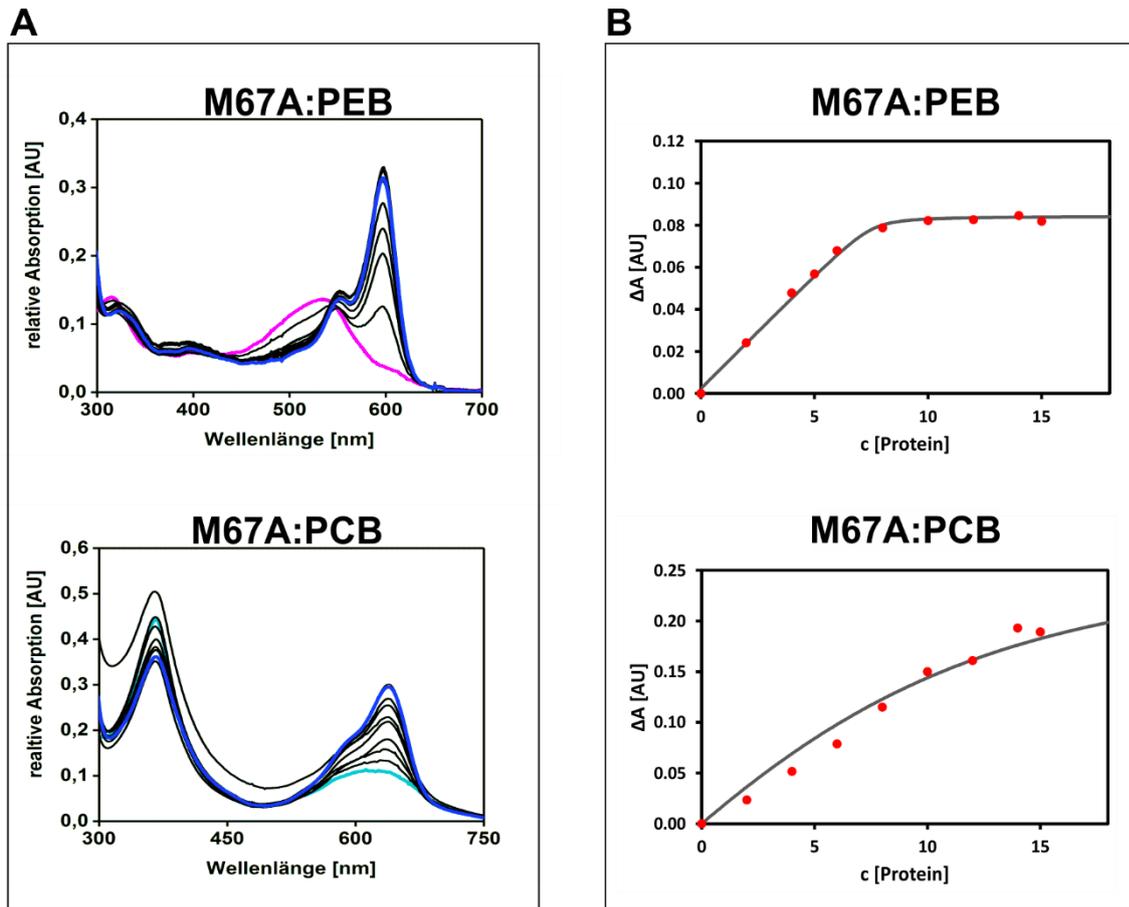
### 6.2.2 Analyse der Substratspezifität von *GtCPES*



**Abbildung 6.8: SDS-PAGE der Produktion der verschiedenen *GtCPES* Varianten zur Untersuchung der *GtCPES* Bindetasche und Substratspezifität.** A-D. Die Produktion der Varianten in *E. coli* BL21(DE3) fand bei 17 °C über Nacht in Koexpression mit dem Chaperonplasmid pGro7 statt. Es wurde LB-BS-Medium verwendet. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie gefärbt. Der Pfeil markiert die produzierten Varianten mit einer Größe von etwa 21,6 kDa.  $M_{rel}$ : Relative Molekülmasse (x1000); M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher); vi: Zellprobe vor der Induktion; nl: Zellprobe nach der Induktion.

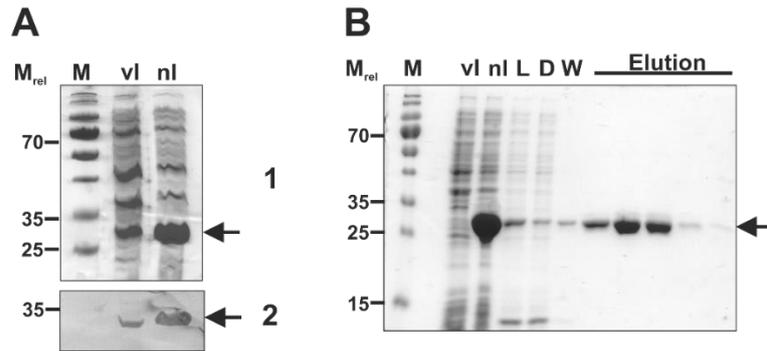


**Abbildung 6.9: SDS-PAGE der Reinigung der verschiedenen *GtCPES* Varianten für die Untersuchung der *GtCPES* Bindetasche und Substratspezifität.** A-D. Die Proteine wurden mittels Affinitätschromatographie (Strep-Tactin®) gereinigt und Proben hiervon mittels SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie gefärbt. Der Pfeil markiert die Varianten mit einer Größe von ~21,6 kDa.  $M_{rel}$ : Relative Molekülmasse (x1000); M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher). L: Lysat; D: Durchlauf; W: Waschfraktion.

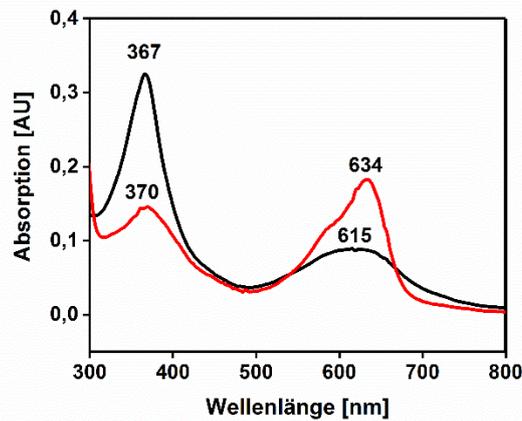


**Abbildung 6.10: Bestimmung von Bindungsaffinitäten für die Bindung zwischen *GtCPES\_M67A* und 3(Z)-PEB bzw. 3(E)-PCB mit Hilfe von UV/vis-Spektroskopie basierter Titration.** **A.** Absorptionsspektren für die Titration von 2-15  $\mu\text{M}$  PBP Lyase zu 10  $\mu\text{M}$  Phycobilin. Die pinke bzw. türkise Linie zeigt das Absorptionsspektrum von freiem Phycobilin zu Beginn der Messung, die blaue das letzte Spektrum nach Titration von 15  $\mu\text{M}$  *GtCPES\_M67A*. **B.** Auftragung der gemittelten Differenz  $\Delta A$  der in A gemessenen Absorptionsmaxima zur Basislinie gegen die jeweils eingesetzte Konzentration an *GtCPES\_M67A*. Die schwarze Linie beschreibt das mit Gleichung 2 an die experimentellen Daten angepasste Kurvenmodell, aus dem mit Hilfe der *Solver*-Funktion von *Microsoft Excel* der  $K_D$ -Wert berechnet wurde. Gezeigt ist beispielhaft jeweils nur eine Messung der Doppelbestimmung.

### 6.2.3 Untersuchungen zum PCB-Transfer durch *GtCpES\_M67A*



**Abbildung 6.11: SDS-PAGE-Gele der Produktion und Reinigung von His-NCpcS und Nachweis mittels Western-Blot.** A. Die Produktion wurde in *E. coli* BL21(DE3) bei 17 °C über Nacht durchgeführt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie gefärbt (1) oder auf eine PVDF-Membran für den anschließenden Nachweis mittels Western-Blot Analyse transferiert (2). B. Die Reinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie (TALON). Für die Detektion wurden Anti-Penta-His-Antikörper und Anti-Mouse IgG AP-Konjugat verwendet. Der Pfeil markiert His-NCpcS mit einer Größe von 25,2 kDa. M<sub>rel</sub>: Relative Molekülmasse (x1000); M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher); vi: Zellprobe vor der Induktion; ni: Zellprobe nach der Induktion; L: Lysat; D: Durchlauf; W: Waschfraktion.



**Abbildung 6.12: Absorptionsspektrum der 3(E)-PCB-Bindung durch NCpcS.** Absorptionsspektrum von ungebundenem 3(E)-PCB (5 μM; schwarz) im Vergleich zum Absorptionsspektrum nach Zugabe von NCpcS im Überschuss (20 μM; rot). Dargestellt werden jeweils die relativen Absorptionen beider Spektren zueinander. Die Absorptionsmaxima sind angegeben (in nm).

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken sind ausnahmslos als solche kenntlich gemacht. Die Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie der TU Kaiserslautern ist mir in der derzeit gültigen Fassung bekannt. Die Ergebnisse anderer Mitarbeiter sowie anderer Autoren wurden klar gekennzeichnet. Die Dissertation oder Teile daraus wurden in keinem anderen Fachbereich oder keiner anderen Fakultät als Prüfungsarbeit eingereicht. Ich habe zu keinem früheren Zeitpunkt an einer anderen Universität ein Promotionsverfahren beantragt.

Hanau, den 24.07.2019

Natascha Tomazic

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Natascha Tomazic, geb. Riedel

### Promotion

05/2015 – 12/2018  
Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
Abteilung Mikrobiologie, TU Kaiserslautern

### Akademische Laufbahn

10/2011 – 02/2014  
Studium der Chemischen Biologie, TU Dortmund  
Abschluss: Master of Science

10/2008 – 10/2011  
Studium der Chemischen Biologie, TU Dortmund  
Abschluss: Bachelor of Science

### Publikationen

Gasper R, Schwach J, Hartmann J, Holtkamp A, Wiethaus J, Riedel N, Hofmann E, Frankenberg-Dinkel N. 2017. Distinct Features of Cyanophage-encoded T-type Phycobiliprotein Lyase  $\Phi$ CpeT. *Journal of Biological Chemistry* 292: 3089-3098.

Kampmann M, Riedel N, Mo Y, Beckers L, Wichmann R. 2016. Tyrosinase catalyzed production of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid using immobilized mushroom (*Agaricus bisporus*) cells and *in situ* adsorption. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 123: 113-121.