

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biotechnologie

Analyse des Einflusses von kleinen Hitzeschockproteinen aus Cyanophagen auf die Stabilität der Photosysteme des Wirts

Sabine Christine Rittinger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Feige
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. D. Weuster-Botz

Die Dissertation wurde am 31.03.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 25.05.2016 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteinfaltung und molekulare Chaperone	1
1.2	Kleine Hitzeschockproteine.....	4
1.2.1	Aufbau und Struktur von sHsps	5
1.2.2	Funktion der sHsps	10
1.2.3	Substrat Erkennung der sHsps.....	12
1.3	Cyanobakterien.....	14
1.4	Cyanophagen	17
2	Motivation und Zielsetzung.....	23
3	Material und Methoden	25
3.1	Geräte.....	25
3.2	Chemikalien.....	26
3.3	Bakterienstämme	26
3.4	Plasmide	27
3.5	Enzyme und Standards	27
3.6	Medien.....	28
3.7	Cyanophagen	29
3.8	Sonstiges Material	29
3.9	Oligonucleotide	30
3.10	Computersoftware, Datenbanken und Internetbasierte Tools	31
3.11	Molekularbiologische Methoden.....	32
3.11.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
3.11.2	Restriktion	33
3.11.3	Ligation.....	34
3.11.4	Plasmidisolierung	35
3.11.5	Agarose-Gelelektrophorese	35
3.11.6	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	36
3.11.7	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i>	36
3.11.8	Zellaufschluss	37
3.12	Proteinchemische Methoden.....	37

3.12.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.12.2	Gelfärbung.....	38
3.12.3	Proteinreinigung	39
3.12.4	Western Blot.....	43
3.13	Spektroskopische Methoden	44
3.13.1	CD-Spektroskopie	44
3.13.2	Ultraviolett (UV)-Vis Spektroskopie	45
3.13.3	Fluoreszenz Spektroskopie.....	45
3.14	Strukturelle Analyse	46
3.14.1	Analytische Gelfiltrationschromatographie	46
3.14.2	Thermal-Stability-Assay (TSA)	46
3.14.3	Thermoübergang (CD-Spektroskopie).....	47
3.14.4	Guanidinium-Übergang.....	47
3.14.5	Elektronenmikroskopische Charakterisierung	48
3.15	Funktionelle Analyse.....	48
3.15.1	Aggregation der Citratsynthase	48
3.15.2	Inaktivierung der Citratsynthase	49
3.15.3	Reaktivierung der Citratsynthase	50
3.15.4	Lysat Aggregation	51
3.15.5	Co-Immunpräzipitation	52
3.16	Methoden zum Arbeiten mit Cyanobakterien	54
3.16.1	Kultivierung von Cyanobakterien	54
3.16.2	Bestimmung der Zellzahl	56
3.16.3	Cryopreservation von Cyanobakterien.....	56
3.16.4	Ernten und Aufschließen von Cyanobakterien.....	57
3.16.5	Bestimmung der Lysatkonzentration nach Bradford	57
3.16.6	Infektion von Cyanobakterien	58
3.17	Bioinformatische Methoden	58
3.17.1	Phylogenetische Analyse.....	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Bioinformatische Analyse	59
4.1.1	Phylogenetische Untersuchung cyanobakterieller und viraler sHsps	59
4.1.2	Charakterisierung des IXI Motivs	61

4.2	Untersuchung der charakteristischen Struktureigenschaften von sHsps	63
4.2.1	Analyse der Sekundärstruktur	63
4.2.2	Analyse der Quartärstruktur	65
4.2.3	Elektronenmikroskopische Untersuchung der sHsps	67
4.2.4	Temperaturstabilität der viralen und cyanobakteriellen sHsps.....	69
4.2.5	Analyse der thermischen Proteinfaltung mittels CD-Spektroskopie	70
4.3	Untersuchung der Chaperonaktivität	72
4.3.1	Unterdrückung der Aggregation von Citratsynthase	72
4.3.2	Bildung eines stabilen Enzym-Substrat-Komplexes	74
4.3.3	Inaktivierung der Citratsynthase.....	76
4.3.4	Reaktivierung der Citratsynthase.....	79
4.4	Kultivierung von Cyanobakterien	82
4.5	Potentielle in vivo Substrate der viralen und cyanobakteriellen sHsps.....	86
4.5.1	Syn9-Hsp20 stabilisiert das cyanobakterielle Lysat von WH7803	86
4.5.2	Stabilisierung der Fluoreszenz von Allophycocyanin durch Hsp20	90
4.5.3	Stabilisierung von Phycoerythrin durch Hsp20 unter Hitzeschock.....	92
4.6	Interaktion zwischen den viralen und cyanobakteriellen sHsps.....	94
4.6.1	Temperaturabhängige Interaktion von Syn9-Hsp20 und Sc8102-Hsp20.....	94
4.6.2	Verbesserte Reaktivierung von CS durch Kombination aus sHsps.....	96
4.7	Analyse der Infektion von <i>Synechococcus</i> WH7803 mit Syn9	98
4.8	Knock-down der viralen sHsps	102
4.9	Transformation von Cyanobakterien	103
4.9.1	Genetische Manipulation von Cyanobakterien durch Konjugation	103
4.9.2	Biolistische Transfektion mit Hilfe einer <i>Gene-Gun</i>	104
5	Diskussion.....	107
6	Zusammenfassung	115
7	Summary	117
8	Abkürzungsverzeichnis.....	119
9	Literaturverzeichnis	123
10	Danksagung.....	139

1 Einleitung

1.1 Proteinfaltung und molekulare Chaperone

Proteine sind essentielle Biomoleküle aller Organismen, da durch sie die in den Genen enthaltene Information in zelluläre Abläufe und Strukturen übersetzt wird. Sie regulieren wichtige Funktionen, wie die Gen-Expression oder den Stoffwechsel, oder werden als Biokatalysatoren zum Beschleunigen biochemischer Reaktionen eingesetzt. Obwohl Proteine eine große Vielfalt an Aufgaben bewältigen müssen, sind sie nur nach einem einfachen Prinzip aus durch Peptidbindungen verknüpften Aminosäuren aufgebaut. Bevor allerdings die diversen Aufgaben in den Zellen erfüllt werden können, muss das Protein eine ganz bestimmte dreidimensionale Struktur einnehmen. Dieser Prozess, von synthetisierter Polypeptidkette zur nativen Struktur, wird als Proteinfaltung bezeichnet (Dobson & Karplus, 1999).

Bereits 1961 konnte Anfinsen zeigen, dass die nötige Information für die korrekte Faltung eines Proteins in seiner linearen Aminosäureabfolge (Primärsequenz) festgelegt ist. Aus der Beobachtung, dass die Faltung von Proteinen meist ein schneller Prozess von wenigen Sekunden oder Millisekunden ist, hat Levinson geschlossen, dass die richtige Konformation nicht durch Durchtesten erreicht werden kann (2). Es müssen also spezifische Faltungswege existieren (Zwanzig, Szabo et al., 1992). In den aktuellen Modellen wird der Faltungsweg mit einer Energielandschaft ähnlich einem Trichter verglichen (Abbildung 1). Dabei haben sämtliche nicht nativen Konformationen eine höhere Energie als die native Struktur, und daher falten sich die Proteine den Energieberg herab. Auf dem Weg zur thermodynamisch stabileren nativen Struktur liegen lokale Energie Minima, die als Intermediate, Aggregate oder fehlgefaltetes Protein interpretiert werden können (Dinner, Sali et al., 2000, Udgaonkar, 2008).

Die spontane Proteinfaltung ist abhängig von vielen schwachen, nicht kovalenten Wechselwirkungen, die zur Anordnung der Polypeptidkette in Sekundärstrukturelemente wie α -Helices und β -Faltblättern führen. Die Tertiärstruktur entsteht dann durch die Interaktion der verschiedenen Sekundärstrukturelemente, bis diese eine definierte räumliche Position einnehmen (Daggett & Fersht, 2003, Dill & MacCallum, 2012). Ohne weitere Unterstützung kann meist die Proteinfaltung *in vitro* stattfinden, da diese in verdünnten Pufferlösungen und von isolierten Proteinen durchgeführt wird. Im Gegensatz dazu steht die Pro-

teinfaltung im Cytosol der Zelle, da hier nicht von Anfang an die gesamte notwendige Faltungsinformation zur Verfügung steht und zusätzlich hohe Proteinkonzentrationen von 300 - 400 g/l und viele andere Makromoleküle zu einer überfüllten Umgebung (*molecular crowding*) führen (Zimmerman & Trach, 1991). Unter diesen Bedingungen werden nicht mehr wie sonst die hydrophoben Aminosäuren der elongierenden Polypeptidkette möglichst schnell im Inneren verborgen, sondern an der Oberfläche exponiert.

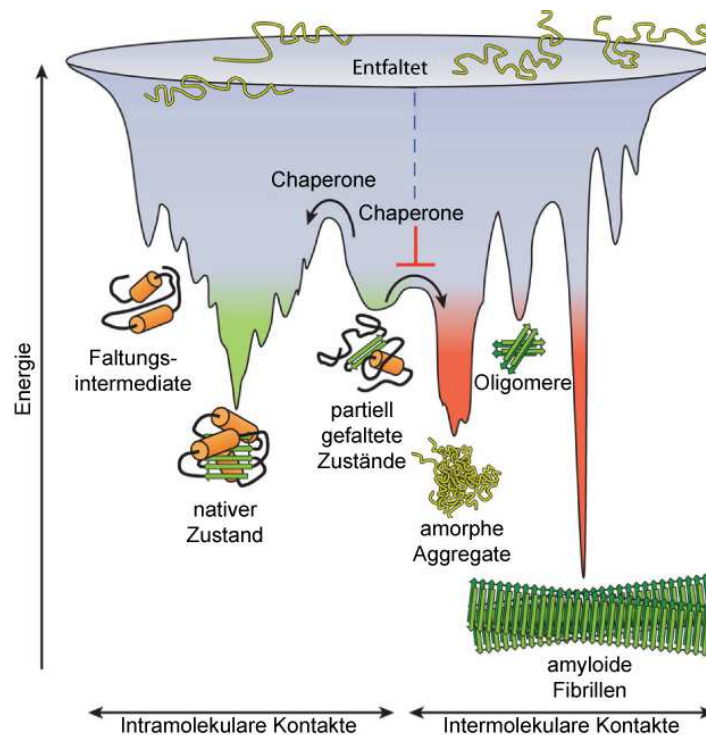


Abbildung 1: Konkurrierende Reaktionen während der Proteinfaltung und Aggregation. Schema der trichterförmigen freien Energielandschaft, die Proteine auf dem Weg zum nativen Zustand (grün) durch Ausbildung intramolekularer Kontakte durchlaufen. Die Unebenheit der freien Energielandschaft führt zur Ansammlung kinetisch gefangener Zustände, die Energiebarrieren überwinden müssen, um einen bevorzugten nach unten gerichteten Faltungspfad zu erreichen. *In vivo* können diese Schritte von Chaperonen beschleunigt werden. Falten mehrere Moleküle in demselben Kompartiment kann die freie Energielandschaft der Faltung mit der der intermolekularen Aggregation überlappen, was zur Ausbildung von amorphen Aggregaten, toxischen Oligomeren oder geordneten amyloiden Fibrillen führt (rot). Abbildung adaptiert mit der Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd: Nature (Hartl, Bracher et al., 2011), © 2011

Dadurch entstehen intermolekulare Wechselwirkungen, und die Bildung von Aggregaten wird gegenüber dem korrekten Proteinfaltungsweg bevorzugt (Ellis, 2001, Ellis & Minton, 2006). Zusätzlich dazu können sich noch verschiedene Sorten von Stress negativ auf die Fehlfaltung von Proteinen oder Aggregatbildung auswirken (Richter, Haslbeck et al., 2010, Tyedmers, Mogk et al., 2010). Die unkontrollierte Aggregation von Proteinen muss in Zellen verhindert werden, da dies nicht nur einen Verlust von funktionellen Proteinen dar-

stellt, sondern dadurch auch zelluläre Vorgänge gestört werden können. So werden neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Huntington mit der Aggregation bzw. der Bildung von amyloiden Fibrillen bestimmter Proteine assoziiert (Mulligan & Chakrabarty, 2013, Scheibel & Buchner, 2006).

Um die Aggregation der Proteine in den Zellen zu verhindern und deren korrekte Faltung zu unterstützen, hat sich ein Schutzsystem in den Zellen entwickelt. Dieses System besteht aus molekularen Chaperonen, welche in der Lage sind, mit den nicht nativen Polypeptiden zu interagieren, und dadurch in den Faltungsprozess eingreifen können, ohne ein Teil der finalen Proteinstruktur zu sein (Ellis, 1987, Ellis, van der Vies et al., 1989). Neben der Unterstützung bei der *de novo* Faltung von Polypeptidketten übernehmen molekulare Chaperone eine Vielzahl von Aufgaben bei der Proteinfaltung, wie Konformationsänderungen, Aktivierung, Rückfaltung, Unterdrückung von Fehlfaltungen oder Aggregationen. Auch bei dem Proteintransport, Proteinabbau und der genetischen Stabilität in der Zelle können bis zu 200 (Co-) Chaperone eine Rolle spielen (Hartl et al., 2011, Richter et al., 2010, Rutherford & Lindquist, 1998). Die molekularen Chaperone wurden als Teil der Hitzeschock-Antwort identifiziert, da ihre Expression unter diesen Bedingungen stark erhöht wird, weshalb sie auch als „Hitzeschockproteine“ (Hsps) bezeichnet werden (Ellis, 1987, Georgopoulos & Welch, 1993). Im Allgemeinen werden die molekularen Chaperone in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts in fünf Familien eingeteilt: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 oder Chaperonine und kleine Hitzeschockproteine (sHsps). Nach ihrer Funktion werden die Chaperone in zwei Klassen eingeteilt: „Foldasen“ und „Holdasen“ (Richter et al., 2010, Techtmann, 2009). Zu den Foldasen zählt das Hsp70/40 System, Hsp100, Hsp90 und die Chaperonine, die alle ATP-abhängig sind (Hartl et al., 2011). Teilweise ungefaltete Polypeptidketten können durch Vertreter der Hsp70/40 Klasse gebunden und entweder direkt oder wenn notwendig durch Weitergabe an das Hsp90-System in die native Struktur zurückgefaltet werden. Kleine Hitzeschockproteine dagegen arbeiten ATP-unabhängig und gehören dadurch der Klasse der Holdasen an. Sie können das System unter Stressbedingungen puffern und die entfalteten Substrate binden und mit Hilfe des Hsp70/40-Systems und/der des Hsp100-Systems rückfalten. Mit Hilfe von ClpB (Hsp100) können auch bereits aggregierte Proteine wieder gelöst werden und dem Rückfaltungsprozess zugeführt werden (Richter et al., 2010). Dieser Prozess ist effizienter wenn sHsps in den Aggregaten eingelagert sind (Haslbeck & Vierling, 2015, Mogk, Deuerling et al., 2003).

1.2 Kleine Hitzeschockproteine

Kleine Hitzeschockproteine (sHsps) sind sehr weit verbreitet und in allen Domänen des Lebens vertreten. Ausnahmen stellen dabei einige wenige pathogene Organismen dar. Dennoch sind die sHsps die am schlechtesten konservierte Gruppe innerhalb der molekularen Chaperonfamilie. Trotzdem haben sie charakteristische Eigenschaften, die sie als eine Proteinfamilie auszeichnen. Auch wenn keine große Konservierung der gesamten Sequenz besteht, so gibt es doch eine sehr gut konservierte Sequenz bestehend aus ca. 90 Aminosäuren: die α -Kristallin Domäne. Benannt wurde der Bereich auf Grund seiner Homologie zu dem vorherrschenden Protein in der Augenlinse von Säugetieren, dem α -Kristallin, welches gleichzeitig einer der bekanntesten Vertreter der sHsps-Familie ist (Augusteyn, 2004, de Jong, Leunissen et al., 1993). Um potentielle kleine Hitzeschockproteine dieser Familie zuzuordnen, wird meist ausschließlich das Vorhandensein der α -Kristallin Domäne als Kriterium genutzt, auch wenn die Vertreter dieser Superfamilie in der Regel zusätzlich fünf weitere, strukturelle und funktionelle Charakteristika aufweisen: (1) kleines Molekulargewicht der Monomere von 12-43 kDa, (2) Bildung großer Oligomere, (3) dynamische Quartärstruktur, (4) Induktion der Expression durch Stress, (5) Chaperonaktivität (Haslbeck, Miess et al., 2005b).

Aus phylogenetischen Analysen ist bekannt, dass sich sHsps schon sehr früh entwickelt haben müssen, da in den letzten gemeinsamen Vorläufern von Eukaryoten und Prokaryoten sHsps gefunden wurden (de Jong, Caspers et al., 1998, Kappe, Leunissen et al., 2002). Es ist wahrscheinlich, dass sie auch schon vor anderen Chaperonfamilien wie zum Beispiel DnaK (das in vielen Archaeen fehlt) etabliert wurden (Gribaldo, Lumia et al., 1999). Es werden immer mehr Genome komplett sequenziert, was eine genaue Aussage über die Existenz und die Anzahl der sHsps in vielen verschiedenen Organismen zulässt. Betrachtet man die Anzahl der sHsps genauer, ist vor allem auffällig, dass in höheren Eukaryoten und Pflanzen die Anzahl mit bis zu 19 sHsps deutlich über den bisher untersuchten Bakterien und einzelligen Eukaryoten mit meist nur einigen wenigen sHsps liegt. Die Anzahl der sHsps Gene scheint also mit der Evolution stark zugenommen zu haben (Narberhaus, 2002).

Auf den ersten Blick scheinen die sHsps unwichtig oder gar ersetzbar zu sein, da unter optimalen Bedingungen die meisten Bakterien keine oder vernachlässigbare Mengen an sHsps produzieren (Narberhaus, 2002). Allerdings kann das mRNA und Proteinlevel unter Stressbedingungen drastisch ansteigen. Für die Transkription von *ibpA* und *ibpB* wurde

durch Mikroarray basierte Expression gezeigt, dass sie sich durch Hitze induziert um den Faktor 300 erhöht (Richmond, Glasner et al., 1999). Auch wenn *E. coli* Δ *ibpAB* Mutanten einen kaum merklichen Wachstumsfehler bei erhöhten Temperaturen aufweisen, so konnte die Notwendigkeit der sHsps doch in anderen Organismen eindeutig nachgewiesen werden (Kitagawa, Matsumura et al., 2000, Thomas & Baneyx, 1998). Der stärkste Phänotyp wurde bei Knock-out Mäusen beobachtet, denen das Gen für das menschliche Homolog für α A-Kristallin fehlt. Diese entwickelten in den frühen Lebensjahren einen Katarakt in Folge von einer schnellen Formation von Einschlusskörperchen (Brady, Garland et al., 1997). Auch in dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 führte die Deletion des einzigen sHsps (Hsp16.6) unter Hitzestress zu einer signifikantem Wachstumsverlangsamung und einer reduzierten photosynthetischen Aktivität (Lee, Prochaska et al., 1998).

1.2.1 Aufbau und Struktur von sHsps

1.2.1.1 Primärstruktur

Obwohl die sHsps sich einen gemeinsamen Vorläufer teilen, entwickelten sie sich, wenn man die Primärsequenzen betrachtet, zu einer sehr heterogenen Proteinfamilie. Selbst nahverwandte sHsps, wie *E. coli* *Ibpa* und *IbpB* oder das menschliche α A- und α B-Kristallin, haben nicht mehr als 52 oder 58% identische Aminosäuren (Narberhaus, 2002). Wenn man die ganze Proteinfamilie betrachtet, weist lediglich die α -Kristallin Domäne eine höhere Konservierung, vor allem auf struktureller Ebene, auf. Neben der α -Kristallin Domäne bestehen die sHsps noch aus einer schlecht konservierten N-terminalen Region und einer kurzen variablen C-terminalen Region/Sequenz (Caspers, Leunissen et al., 1995, Kriehuber, Rattei et al., 2010).

Die N-terminale Region ist sehr vielfältig in ihrer Sequenz und damit zu einem Großteil für die Sequenzvariation der verschiedenen sHsps innerhalb eines Organismus verantwortlich. Auch in der Länge ist die N-terminale Region sehr variabel und kann wie bei Hsp12 aus *C.elegans* mit 25 Aminosäuren sehr kurz ausfallen oder aber auch eine Länge von 247 Aminosäuren wie in Hsp42 aus Hefe erreichen (Haslbeck, Franzmann et al., 2005a). Dadurch wird die große Varianz in der Gesamtlänge der Sequenz von 12-43 kDa erreicht. Die aromatischen Aminosäuren Trp und vor allem Phe und Pro sind in der N-terminalen Region überrepräsentiert (Bepperling, Alte et al., 2012). Die meisten posttranslationalen

Modifikationen scheinen ebenfalls in dieser Region positioniert zu sein (MacCoss, McDonald et al., 2002).



Abbildung 2: Anordnung der Domänen in sHsps. Die zentrale α -Kristallin Domäne (grün) wird von dem N- und dem C-terminalen Bereich (blau bzw. rot) flankiert. Die ungefähre Position der beiden konservierten Sequenzmotive IXI/V und A-x-x-x-n-G-v-L sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

Die zentrale α -Kristallin Domäne gilt als das Erkennungsmotiv der sHsp Familie. Jedoch haben Sequenz Alignments gezeigt, dass es nur wenige konservierte Aminosäuren gibt. Insgesamt gab es nur fünf Aminosäuren, die in mehr als 80 % der Sequenzen vorhanden waren. Drei davon sind Teil des Sequenzmotivs A-x-x-x-n-G-v-L, welches gegen Ende der α -Kristallin Domäne auftritt (Narberhaus, 2002). Dieses Motiv ist der signifikanteste Indikator für diese Domäne (Caspers et al., 1995, de Jong et al., 1998, Waters, Lee et al., 1996). Die genomische Datenanalyse ergab im Vergleich zu dem restlichen Genom ein hohes Vorkommen von geladenen Aminosäuren und ein verhältnismäßig geringes Vorkommen von aromatischen Aminosäuren in der α -Kristallin Domäne (Kriehuber et al., 2010).

Wie auch der N-terminale Bereich ist die C-terminale Region in Länge und Sequenz variabel. Dabei ist die C-terminale Region mit durchschnittlich 10 Aminosäuren aber deutlich kürzer. Meist wird eine Länge von 20 Aminosäuren nicht überschritten, und in manchen Mitgliedern der sHsp Familie, wie zum Beispiel bei dem menschlichen Hsp20, fehlt sie sogar komplett. Eine wichtige Ausnahme der sonst so divergenten Sequenz bilden zwei charakteristische Isoleucine in der C-terminalen Domäne. Dieses Motiv wird als IXI oder IXV Motiv bezeichnet. Jedoch können an dieser Position auch andere hydrophobe Aminosäuren wie Valin oder Leucin vorkommen, wobei die mittlere Position weitgehend variabel ist (Narberhaus, 2002). Für Metazoen ist an dieser Stelle allerdings ein Prolin charakteristisch, und ein Glutamat ist charakteristisch für Sequenzen, die nicht aus Metazoen stammen (Poulain, Gelly et al., 2010). Das IXI Motiv hat sich als wichtig für Inter-Dimer Kontakte herausgestellt (Basha, O'Neill et al., 2012, Haslbeck et al., 2005a, Hilton, Lioe et al., 2013). Grundsätzlich sind die polaren Aminosäuren in der C-terminalen Domäne überre-

präsentiert, während die aliphatischen und aromatischen Aminosäuren eher unterrepräsentiert sind (Kriehuber et al., 2010).

1.2.1.2 Das α -Kristallin Dimer

Die ersten beiden gelösten Kristallstrukturen von sHsps Oligomeren stammen von Hsp16.5 aus *M. jannaschii* und Hsp16.9 aus Weizen. Das Bemerkenswerte daran ist, dass sie beiden Strukturen der α -Kristallin Domänen lediglich eine mittlere quadratische Abweichung von 1,5 Å aufweisen, obwohl ihre Sequenzen nur zu 23 % identisch sind (van Montfort, Basha et al., 2001). Grundsätzlich ist es allerdings sehr schwierig, hoch auflösende Strukturdaten für die oligomere Form der sHsp zu erhalten. Gerade für die Gruppe der Metazoen entstehen durch die hohe Polydispersität der Oligomere Probleme für die Strukturauflösung (Horwitz, 2009). Es gibt aber eine immer größer werdende Anzahl verfügbarer Strukturen von isolierten α -Kristallin Domänen. Dadurch lässt sich ein detaillierter Einblick in den strukturellen Aufbau dieser Domäne gewinnen. Ein Dimer dieser Domäne bildet den Grundbaustein aller sHsps (Basha et al., 2012). Auch rekombinant hergestellte isolierte α -Kristallin Domänen verschiedener sHsps sind zwar noch in der Lage stabile Dimere auszubilden, aber reichen nicht mehr als Baustein für die Oligomerisierung aus (Bagneris, Bateman et al., 2009, Hilton et al., 2013). Alle α -Kristallin Domänen bilden eine Immunglobulin ähnliche Struktur aus, die aus einem β -Sandwich aus zwei antiparallelen β -Faltblättern aufgebaut ist. Dabei bestehen die beiden β -Faltblätter je nach Ursprungsorganismus aus mindestens sieben Strängen und werden in Anlehnung an die erste gelöste Struktur aus *M. jannaschii* entsprechend durchnummeriert (Poulain et al., 2010). Auch wenn die Struktur der α -Kristallin Domäne immer ähnlich ist, so sind doch zwei sehr verschiedene Arten der Dimerisierungen möglich. Der Unterschied entsteht durch das Vorhandensein eines Loops zwischen dem β_6 und β_7 -Faltblatt, der in allen bisher untersuchten Strukturen der Gruppe der Metazoen fehlt, und damit zu einem veränderten Dimeraufbau führt (McHaourab, Godar et al., 2009).

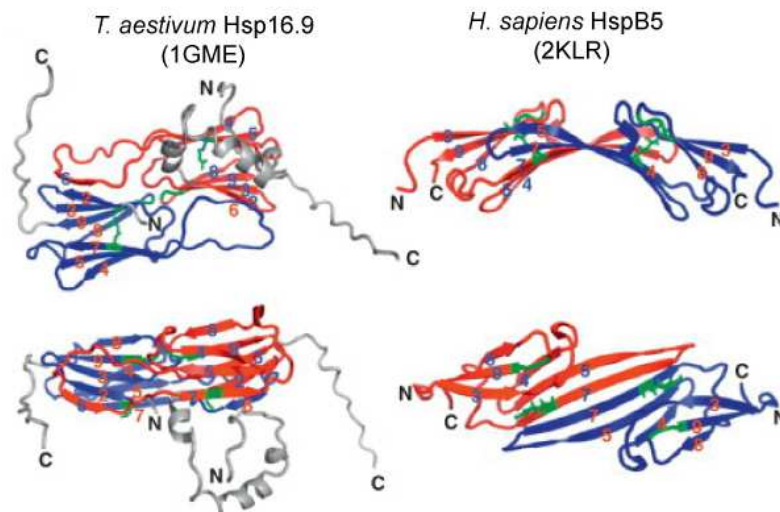


Abbildung 3: Unterschiedliche Dimerbildung bei sHsps aus Metazoen (rechts) und Nicht-Metazoen (links). Die Monomere sind jeweils in rot bzw. blau dargestellt. Der Unterschied in der Dimerisierung entsteht durch den Loop zwischen $\beta 6$ - $\beta 7$ Strang. Ist er wie in *T. aestivum* Hsp16.9 enthalten, dann dimerisieren die sHsps über einen Strangaustausch. Im Gegensatz dazu entsteht das Dimer bei Metazoen, wie dem humanen HspB5, wo der $\beta 6$ mit dem $\beta 7$ Strang fusioniert ist, durch eine antiparallele Kontaktfläche des verlängerten $\beta 7$ Strangs. Abbildung adaptiert nach (Basha et al., 2012) mit Erlaubnis von Elsevier.

Wenn der isolierte $\beta 6$ -Strang vorhanden ist, wie es bei den meisten Bakterien, Hefen und Pflanzen der Fall ist, dann wird das Dimer durch einen Strangaustausch zwischen den beiden Monomeren gebildet, wobei der $\beta 6$ -Strang zusammen mit vier weiteren Strängen des benachbarten Monomers eine Kontaktfläche bildet (Kim, Kim et al., 1998, Takeda, Hayashi et al., 2011, van Montfort et al., 2001). Im Vergleich dazu wird bei den Metazoen das Dimer durch eine antiparallele Kontaktfläche des verlängerten $\beta 7$ Stranges, da hier der $\beta 6$ und der $\beta 7$ Strang fusioniert sind (Bagneris et al., 2009, Jehle, Rajagopal et al., 2010).

1.2.1.3 Oligomerisierung der sHsps

Zu den charakteristischen Eigenschaften der sHsp-Familie zählt die Bildung großer oligomerer Strukturen. Dabei ist die Anzahl der identischen Untereinheiten sehr variabel: auch wenn viele sHsps aus 12 oder 24 Untereinheiten bestehen, wurden sowohl kleinere als auch deutlich größere Komplexe beobachtet. Damit es zu dem Zusammenschluss der Dimere als Grundbausteine zu den großen oligomeren Strukturen kommt, müssen einige Besonderheiten vorhanden sein. Dabei spielt das IXI Motiv der C-terminalen Region eine große Rolle, welches in über 90 % der sHsp Sequenzen gefunden wurde (Poulain et al.,

2010). Dieses hydrophobe Motiv bindet an eine aus den $\beta 4$ und $\beta 8$ Strängen gebildete hydrophobe Fläche benachbarter Dimere. Da sich das IXI Motiv in dem flexiblen Bereich des C-terminus befindet, können sich die Dimere in verschiedenen Geometrien orientieren, wodurch eine Vielfalt an Strukturen möglich wird, wie man am Beispiel der monodispersen Oligomere von Hsp16.5 aus *Methanocaldococcus* und Hsp16.9 aus Weizen sehen kann (Basha et al., 2012).

Kontakte im C-terminalen Bereich alleine sind allerdings für eine erfolgreiche Oligomerisierung der sHsps noch nicht ausreichend. Auch der N-terminale Bereich hat einen wichtigen Einfluss auf die Oligomerisierung. Die vollkommene oder teilweise Deletion der N-terminalen Region zerstört das Oligomer und führt meist zur Aggregation und nur selten zur stabilen Untereinheit, nämlich Dimeren. So wurde zum Beispiel für Hsp16.2 aus *C. elegans* für verschiedene Deletionsmutanten nachgewiesen, dass diese nicht mehr in der Lage sind, den nativen Oligomierzustand einzunehmen, und nur noch als Trimere oder Tetramere vorliegen (Leroux, Melki et al., 1997). Auch für andere Mitglieder der sHsp Familie wurde diese wichtige Rolle des N-terminalen Bereichs für die Oligomerisierung schon nachgewiesen, wobei die genaue Funktion des N-terminalen Bereichs dabei in weiten Bereichen noch nicht geklärt ist (Bova, McHaourab et al., 2000, Narberhaus, 2002).

Grundsätzlich scheint das hierarchische oligomerisierungs Prinzip, wie sich die Dimere durch Kontakte des N-terminalen und des C-terminalen Bereichs zusammenfügen innerhalb der sHsps konserviert zu sein. Damit wird eine Variation in der Anzahl der Untereinheiten und der Geometrie des Oligomers speziell durch den N-terminalen Bereich erreicht (Haslbeck & Vierling, 2015). Dies wird durch Untersuchungen an einer Variante von Hsp16.5 aus *M. jannaschii* verdeutlicht, da hier das Einbringen einer Sequenz von 14 Aminosäuren (aus dem N-terminalen Bereich des humanen Hsp27) zu einer Erhöhung der Anzahl der Untereinheiten des Oligomers von 24 auf 48 geführt hat (Mchaourab, Lin et al., 2012).

Insgesamt sind die sHsps sowohl auf der sekundären, tertiären als auch auf der quartären Strukturorganisation sehr dynamisch. Der Austausch der Untereinheiten wurde schon früh beobachtet und kann auf verschiedene Weisen wie z. B. durch FRET Messungen verfolgt werden. Während die Assoziation der Oligomere ein sehr schneller Prozess ist, scheint der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei dem Austausch der Untereinheiten die Dissoziation der Untereinheiten aus dem Oligomer zu sein (Basha et al., 2012, Narberhaus, 2002). Dadurch lässt sich normalerweise in Lösung nur das vollständige Oligomer detektieren (Basha et al., 2012, Narberhaus, 2002). Nur bei erhöhten Temperaturen können auch subo-

ligomere Spezies vorkommen. Die Dynamik der sHsp Oligomere ist allerdings auf vielerlei Weise beeinflussbar: über die Temperatur, die Ionenstärke, die Salzkonzentration oder posttranslationale Modifikationen (Bova et al., 2000). Einerseits wird durch einen so hohen Grad an Dynamik der Zugang zu hochauflösenden Kristallstrukturen erschwert, aber andererseits ist vermutlich nur so eine so hohe Löslichkeit und Aufgabendichte für diese Proteinfamilie zu erreichen (Laganowsky & Eisenberg, 2010).

1.2.2 Funktion der sHsps

Die Funktion der sHsps als molekulare Chaperone war noch lange nach ihrer Entdeckung ungeklärt. Erst in den frühen 1990er Jahren haben *in vitro* Studien die zelluläre Funktion aufgeklärt und gezeigt, dass sHsps nicht native Proteine binden und ATP-unabhängig ihre irreversible Aggregation verhindern können (Horwitz, 1992, Jakob, Gaestel et al., 1993). Seit damals wurde für zahlreiche sHsps aus den verschiedensten Organismen eine solche Holdase-Funktion nachgewiesen.

Eine der meist angewandten Methoden, um die Unterdrückung der Aggregation von (Model) Substraten durch sHsps zu beobachten, ist das Substrat chemisch oder thermisch zu denaturieren und die Aggregation durch Lichtstreuung zu verfolgen. Um ihre Aufgabe als molekulare Chaperone zu erfüllen, müssen die sHsps schon während der Entfaltung des Substrats anwesend sein. Bereits vollständig denaturierte oder aggregierte Proteine können von sHsps nicht mehr stabilisiert und in einen rückfaltungskompetenten Zustand gebracht werden. Allerdings ist es möglich, dass einige frühe Entfaltungszustände nur kurzzeitig an das sHsp gebunden bleiben, und ohne die Hilfe von ATP abhängigen Chaperonen vom sHsps dissoziieren und spontan zurückfalten (Bepperling et al., 2012, Haslbeck, Weinkauff et al., 2015, Treweek, Meehan et al., 2014).

Durch elektronenmikroskopische Analyse und Massenspektrometrie hat sich gezeigt, dass die gebildeten löslichen Komplexe aus sHsp und Substrat eine größere Spezies bilden als das sHsp Oligomer alleine (Basha, Lee et al., 2004b). Auch wenn es noch keine gelöste Struktur dieses sHsp/Substrat-Komplexes gibt, so liegt es doch nahe, dass sich der Komplex aus dissoziierten sHsp Oligomeren, die an das Substrat gebunden haben, wieder zusammensetzt (Haslbeck & Vierling, 2015, Stengel, Baldwin et al., 2010). Im Gegensatz zu den Mitgliedern der anderen molekularen Chaperonfamilien ist die Bindekapazität der sHsps deutlich höher. Sie sind in der Lage, bereits in äquimolaren Verhältnissen bezogen

auf ihre Monomerkonzentration die Aggregation eines Substrates zu inhibieren (Chang, Primm et al., 1996, Ehrnsperger, Gräber et al., 1997). Dabei hängt die Effizienz der Substratbindung allerdings stark von äußeren Bedingungen, wie der Temperatur oder dem verwendeten Modellsubstrat, ab (Narberhaus, 2002).

Ein einmal gebildeter sHsp/Substratkomplex ist sehr stabil. So bleiben Komplexe zwischen dem Modellsubstrat CS und Hsp25 für mehrere Stunden fest assoziiert und auch Hsp18.1 bildet für mehrere Wochen stabile Komplexe mit verschiedenen Substraten bei Raumtemperatur (Ehrnsperger et al., 1997, Lee, Roseman et al., 1997). Allerdings muss die Bindung mit einem sHsp keine Sackgasse sein. *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass nicht-native Proteine, die in einem solchen Komplex gefangen sind, durch ATP-abhängige Chaperone wieder freigegeben und zurückgefaltet werden können. In Säugerzellen und in Pflanzen wird dazu das Hsp70/Hsp40-System benötigt (Ehrnsperger et al., 1997, Lee & Vierling, 2000). Ganz ähnlich dazu werden in Bakterien wie *E. coli* die an die sHsps gebundenen Proteine an das DnaK-DnaJ-GrpE Chaperon System weitergeleitet (Mogk et al., 2003, Veinger, Diamant et al., 1998).

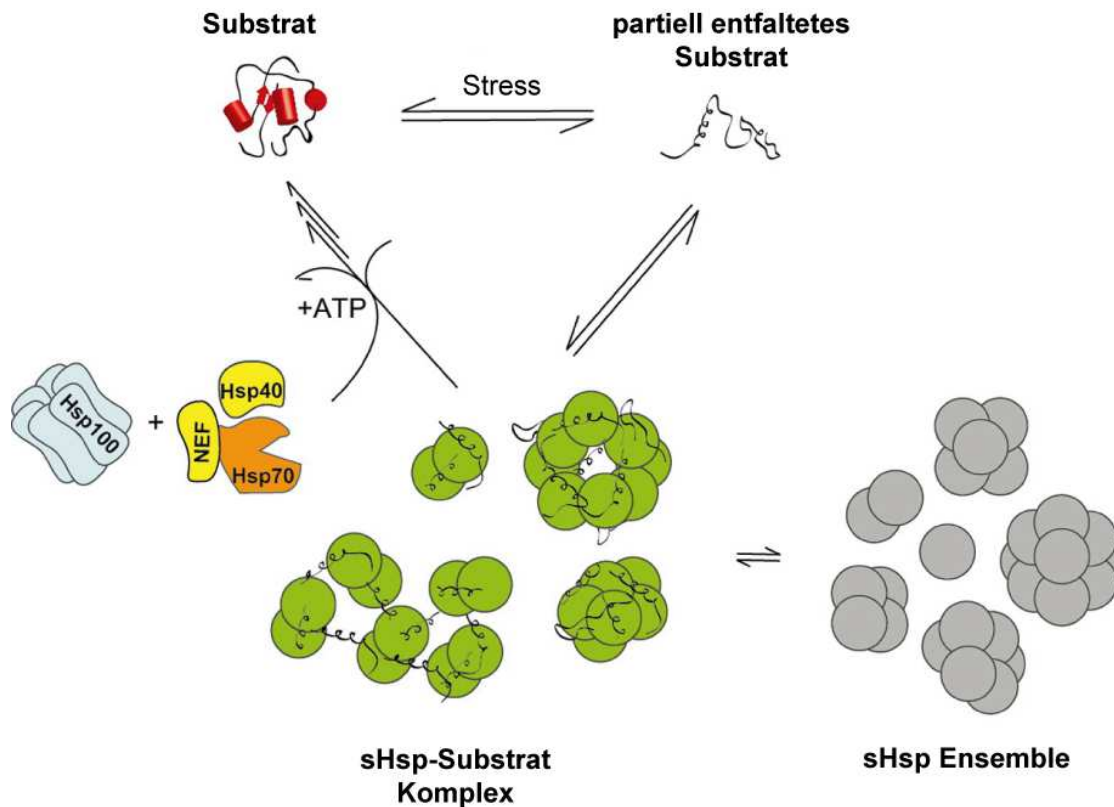


Abbildung 4: Model der Chaperonfunktion von sHsps. Unter Stressbedingungen, wenn Substratproteine destabilisiert werden und beginnen sich zu entfalten, dann binden sHsps an diese teilweise entfaltenen Substrate und halten sie in einem rückfaltungskompetenten Zustand. Das physiologische Ensemble aus sHsp Oligomeren (grau) wird durch eine Verlagerung des Gleichgewichts zu einem größeren Anteil an kleineren Spezies (oftmals Dimere) aktiviert (grün). Das Substrat wird durch dieses aktivierte sHsp Ensemble (grün) stabilisiert und kann daraus spontan reaktiviert werden, oder bleibt in einem stabilen sHsp-Substrat Komplex festgehalten. Gebundene Substrate werden anschließend mit Hilfe des ATP-abhängigen Hsp70 Chaperonsystem (bestehend aus Hsp70, Hsp40 und einem Nukleotid Austausch Faktor, NEF) zurückgefaltet, wobei in Zellen und zellulären Kompartimenten, in denen das Hsp100/ClpB System vorhanden ist, auch dieses mit einbezogen werden kann. Abbildung adaptiert nach (Haslbeck & Vierling, 2015) mit Erlaubnis von Elsevier.

In beiden Fällen müssen für eine erfolgreiche Reaktivierung zunächst lösliche sHsp/Substrat Komplexe gebildet werden. Dafür sollte das sHsp im Überschuss oder zumindest stöchiometrisch eingesetzt werden. Im Fall von einem Substratüberschuss kann das sHsp in amorphe Substrataggregate eingebaut werden, wodurch jetzt auch noch eine Proteindisaggregase wie ClpB aus *E. coli* zur Rückfaltung benötigt wird (Haslbeck & Vierling, 2015).

1.2.3 Substrat Erkennung der sHsps

Der genaue Mechanismus der Substraterkennung durch sHsps während der Denaturierung ist noch nicht vollständig bekannt. Jedoch wurden durch Proteomik-Studien bereits eine große Anzahl an cytosolischen Proteinen aus verschiedenen Organismen identifiziert, die

mit sHsps assoziiert werden oder unter Hitzeschock Bedingungen von ihnen löslich gehalten werden (Haslbeck & Vierling, 2015). Auch wenn die sHsps ein sehr breites Spektrum an *in vivo* Substraten aufweisen, so zeigt sich doch ein leichter Trend in Richtung von Proteinen, die mit der Translation zusammenhängen, wie Translationsfaktoren oder ribosomale Proteine und Enzyme des Metabolismus aus Bakterien (Bepperling et al., 2012, Fu, Shi et al., 2013). Insgesamt bleibt aber weiterhin unklar, welche Region der Substrate von den sHsps erkannt wird, oder ob überhaupt ein einheitliches Erkennungsmotiv existiert. Es hat sich aber gezeigt, dass die sHsps weniger effizient die Aggregation größerer Substratmoleküle unterdrücken als die kleiner Substratmoleküle. Dies weist darauf hin, dass die Interaktion zwischen sHsp und Substrat weniger von dem molaren Verhältnis, sondern eher von dem Verhältnis der Massen zueinander abhängt, und somit die Ladung bzw. die Hydrophobizität Einfluss auf die Bindung nimmt (Basha et al., 2012).

So korreliert zum Beispiel die Effizienz der Chaperonaktivität der α -Kristalline mit dem Grad ihrer Hydrophobizität (Narberhaus, 2002). Dazu passt auch die Beobachtung, dass während der Entfaltung von Proteinen die zuvor im Inneren verborgenen hydrophoben Flächen jetzt an der Oberfläche exponiert werden. Durch das Einbringen hydrophober Farbstoffe und durch Cross-linking Experimente hat sich die Vermutung zunehmend bestätigt, dass der N-terminale Bereich der sHsps eine große Rolle in der Substratbindung spielt (Åhrman, Lambert et al., 2007, Lee et al., 1997). Dies gründet insbesondere auf dem Aufzeigen hydrophober Stellen an der Oberfläche des N-terminalen Bereichs des Dimers von Hsp16.9 aus Weizen (Patel, Vierling et al., 2014). Diese hydrophoben Stellen sind Lösungsmittelzugänglich und können damit leicht mit den hydrophoben Flächen der sich entfaltenden Substrate interagieren (Patel et al., 2014). Neben dem N-terminalen Bereich sind in einem sHsp-Oligomer aber fast alle Bereiche lösungsmittelzugänglich und daher auch potentiell an der Substratbindung beteiligt (Jehle, Vollmar et al., 2011). Da sich aber in keinem der Bereiche durch die Substratbindung die Lösungsmittelzugänglichkeit deutlich ändert, scheinen die Substrate nicht durch eine spezifische Position des sHsp-Monomers bzw. Dimers erkannt zu werden, sondern eher über das Zusammenspiel mehrerer schwacher Interaktionen die über das ganze Oligomer verteilt und möglicherweise substratspezifisch sind (Basha et al., 2012, Cheng, Basha et al., 2008, Haslbeck et al., 2005a).

So zeigen einige Studien, dass neben dem N-terminalen Bereich auch die α -Kristallin Domäne und der C-terminale Bereich in die Interaktion mit dem Substrat involviert sind. Mutationen sowohl in einem konservierten Motiv der α -Kristallin Domäne als auch im C-terminalen Bereich haben zu einer eingeschränkten Chaperonaktivität geführt, wobei

gleichzeitig keine anderen Eigenschaften der sHsps verändert wurden. Dies deutet darauf hin, dass sowohl die α -Kristallin Domäne als auch der flexible C-terminus für die Erkennung des Substrates oder die Löslichkeit des sHsp/Substrat Komplexes verantwortlich sind (Lentze, Aquilina et al., 2004, Treweek, Ecroyd et al., 2007). Eine zusätzliche potentielle hydrophobe Oberfläche zur Substratbindung wird aus dem β 4 und β 8 Strang gebildet und im sHsp-Oligomer durch das konservierte IXI Motiv verdeckt (Braun, Zacharias et al., 2011, van Montfort et al., 2001). Erst durch die Dissoziation der C-terminalen Kontakte des Oligomers stehen diese hydrophoben Flächen für eine Substratinteraktion zur Verfügung (Jehle et al., 2010, Pasta, Raman et al., 2004).

Insgesamt sind für die Substratbindung aber wohl hauptsächlich die nicht konservierten variablen Sequenzen außerhalb der α -Kristallin Domäne verantwortlich, was auch das große Spektrum an verschiedenen Substraten erklären könnte (Haslbeck & Vierling, 2015).

1.3 Cyanobakterien

Cyanobakterien, oft auch als Blaualgen bezeichnet, sind von grundlegender biologischer und biochemischer Bedeutung. Sie zeichnen sich gegenüber anderen Bakterien durch ihre Fähigkeit zur oxygenen Photosynthese aus (Berman-Frank, Lundgren et al., 2001). Vor 2,4 Milliarden Jahren wurde die Atmosphäre der Erde durch die Cyanobakterien durch den bei der Photosynthese als Nebenprodukt entstehenden Sauerstoff entscheidend verändert. Die sauerstofflose Gashölle wurde durch die massenhafte Produktion von Sauerstoff in eine für die Fortentwicklung von Leben außerhalb des Wassers notwendige oxydierende Atmosphäre mit einer schützenden Ozonschicht umgewandelt (Pisciotta, Zou et al., 2010).

Durch ihre typisch blau-grüne Färbung und einigen physiologischen Gemeinsamkeiten mit Pflanzen wurden Cyanobakterien früher fälschlicherweise den Algen zugeordnet (Pulz & Gross, 2004). Allerdings besitzen sie keinen echten Zellkern und sind somit nicht mit den Algen verwandt, sondern zählen zu den Prokaryoten (Kaneko & Tabata, 1997, Rippka, Deruelles et al., 1979). Dennoch ist die Systematik der Cyanobakterien einem ständigen Wandel unterworfen (Komarek, Kastovsky et al., 2014). Insgesamt bilden sie die größte Untergruppe der gram-negativen Bakterien, mit deren Zellwandbeschaffenheit, Ribosomen und Zellstruktur sie weitgehend übereinstimmen (Schlegel, 1992).

Der photosynthetische Apparat der meisten marinen Cyanobakterien beinhaltet zwei Photosysteme, Photosystem I (PSI) und Photosystem II (PSII), sowie eine Elektronentrans-

portkette, und ähnelt damit dem, der in höheren entwickelten Pflanzen gefunden wird (Barry, Boerner et al., 1994, Jordan, Fromme et al., 2001). Die Photosynthese selbst läuft ebenfalls ähnlich wie in den Thylakoiden der Chloroplasten von Pflanzen ab und findet in bzw. an den Thylakoidmembranen der Cyanobakterien statt. Die Thylakoide sind Einstülpungen der Cytoplasmamembran und liegen als Membranstapel vor. Während Chlorophyll *a* und Carotinoide in der Membran integriert sind, befinden sich auf ihrer Oberfläche große Multiproteinkomplexe mit einer Größe von 5000 – 20000 kDa, die als Lichtsammelstellen fungieren (Wehrmeyer, 1983).

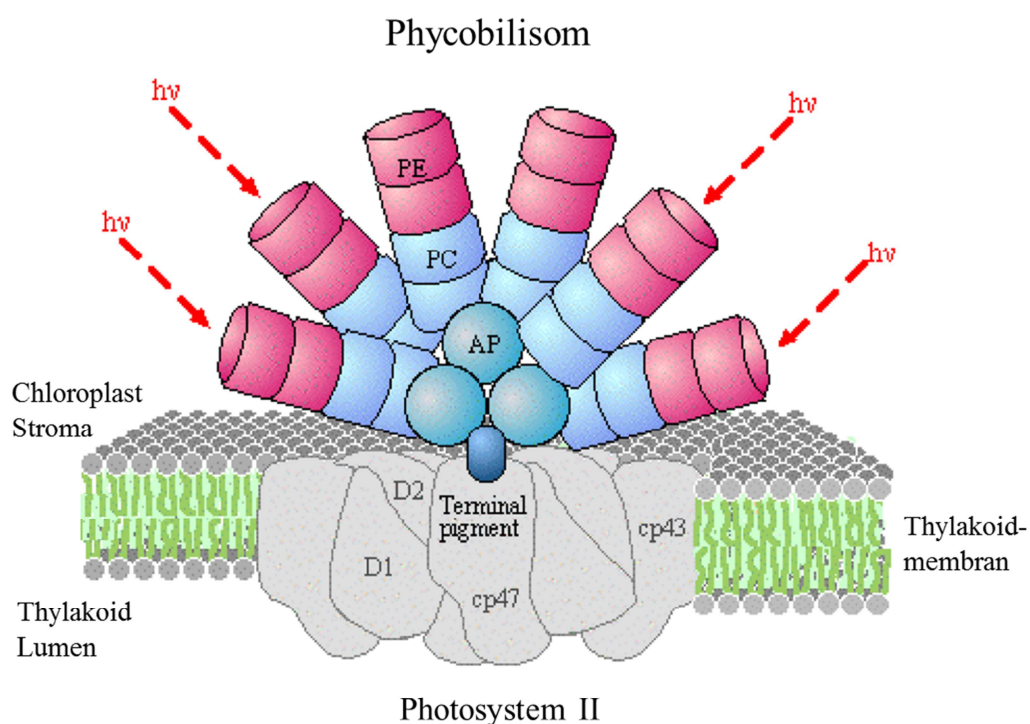


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Phycobilisomen. Cyanobakterien besitzen zusätzlich zu Chlorophyll *a* noch über einen weiteren Antennenkomplex in Form von Phycobilisomen. Die Energie der aufgenommenen Photonen wird über das außenliegende Phycoerythrin aufgenommen und über Phycocyanin an Allophycocyanin bis hin zu Chlorophyll *a* weitergegeben. Die Phycobilisomen sind im Zentrum aus drei Zylindern und sechs peripheren Stäben aufgebaut um die Oberfläche zu vergrößern. In die Thylakoidmembran eingebettet sind die beiden Kernproteine D1 und D2, die auch in einigen Genomen von Cynaophagen kodiert sind. Abbildung adaptiert nach (Karen).

Durch den hohen Anteil an Biliproteinen werden diese Komplexe als Phycobilisomen bezeichnet; auch unterscheiden sie sich dadurch deutlich von den Antennenkomplexen höher entwickelter Pflanzen. Die Phycobilisomen können bis zu 50 % der Gesamtproteinmenge einer Zelle ausmachen und ermöglichen es den Cyanobakterien, den nutzbaren Teil des Lichtspektrums über den der Pflanzen (Chlorophyll *a*) hinaus zu erweitern (Havel,

2006). Im Kern bestehen diese großen Komplexe aus Allophycocyanin (APC), umgeben von sechs peripheralen Stäben, welche jeweils in der Nähe des Kerns aus Phycocyanin (PC) und peripherer aus Phycoerythrin (PE) aufgebaut sind (Shan, Jia et al., 2008). Die darin enthaltenen Phycobiline, PC (blau) und PE (rot), sind zusammen mit Chlorophyll *a* für die Farbgebung der Cyanobakterien verantwortlich. Da das Verhältnis der Proteine zueinander stark schwanken kann und an die gegebenen Lichtverhältnisse angepasst werden kann, sind auch Grundzellfärbungen wie grün oder sogar schwarz möglich. Dies wird als chromatische Adaption bezeichnet (Schlegel, 1992).

In marinen *Synechococcus* Stämmen gibt es zwei Arten von PE, PEI und PEII, wobei PEII weiter weg vom Kern angeordnet ist. In allen anderen Cyanobakterien gibt es nur eine Art von Phycoerythrin: PEI (Wilbanks, de Lorimier et al., 1991). Die beiden Arten von PE liegen in unterschiedlichen Mengen vor und unterscheiden sich sowohl in ihrer Aminosäuresequenz als auch in ihrer Phycobilin-Zusammensetzung und ihrem Phycobilin-Inhalt (Ong & Glazer, 1991). So enthält das PE, das von Süßwasser Cyanobakterien produziert wird, (PEI) nur Phycoerythrobilin (PEB), wohingegen die marinen Cyanobakterien zusätzlich Phycourobilin (PUB) beinhalten (Swanson, Ong et al., 1991). Ein hoher Anteil an PUB ist besonders für Cyanobakterien Stämme im offenen Meer entscheidend, da das dort vorherrschende blaue Licht (400-500 nm) in den tieferen Gewässern dem PUB Absorptionsmaximum (490 nm) entspricht (Shan et al., 2008). *Synechococcus* Stämme, die eher in Küstennähe leben - wie WH7803 - weisen einen deutlich geringeren Anteil an PUB auf (Ong & Glazer, 1991).

Von der Sonnenenergie, welche die Erde erreicht, werden zwar nur 0,2 – 0,3 % von den Cyanobakterien genutzt, aber die Menge an Energie, die durch die Cyanobakterien fließt, übersteigt den Energieverbrauch der gesamten Menschheit um mehr als das 25-fache (Pisciotta et al., 2010). Auch haben Cyanobakterien einen großen Anteil an der jährlichen CO₂ Fixierung in energiereiche Biomasse (etwa 25 Giga Tonnen) (Paumann, Regelsberger et al., 2005, Waterbury, Watson et al., 1979). Dabei spielen gerade die beiden einzelligen Cyanobakterien der Gattung *Synechococcus* und *Prochlorococcus* eine wichtige Rolle (Ting, Roco et al., 2002, Whitman, Coleman et al., 1998). Diesen signifikanten Anteil an der globalen Photosynthese und Primärproduktion haben sie trotz ihrer geringen Größe (Ting et al., 2002). So sind Cyanobakterien der Gattung *Prochlorococcus* die kleinsten bekannten photosynthetisch aktiven Organismen, mit einem Durchmesser von 0,5-0,7 µm (Dufresne, Salanoubat et al., 2003). Allein im Nord-Atlantik werden bis zu 79 % der Pri-

märproduktion dem Stamm *Prochlorococcus* zugeschrieben, der Dichten von bis zu 700.000 Zellen pro Milliliter erreichen kann (Tolonen, Liszt et al., 2006).

Obwohl *Prochlorococcus* und *Synechococcus* nah verwandt sind und auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgehen, der einen Phycobilisomen-Antennenkomplex besitzt, hat sich bei *Prochlorococcus* ein anderer Lichtsammelkomplex in Laufe der Zeit entwickelt (Palenik & Haselkorn, 1992, Urbach, Scanlan et al., 1998). *Prochlorococcus* verwendet statt der Phycobilisomen einen Chlorophyll *a2/b2* Lichtsammelkomplex (Ting et al., 2002). Die Funktion dieser Proteine ist analog der von höheren Pflanzen, allerdings unterscheiden sich die beiden Systeme in Struktur und Abstammung (Moore, Goericke et al., 1995). Trotz dieser unterschiedlichen Antennenkomplexe koexistieren die beiden Gattungen häufig in den gleichen Lebensräumen (Scanlan & West, 2002, Ting et al., 2002). Allerdings befindet sich *Prochlorococcus* oft in größeren Tiefen der Gewässer. Dies ist möglich, da *Prochlorococcus* durch seine geringe Größe das vorhandene Licht effizienter nutzen kann, obwohl beide Stämme grundsätzlich gut ausgestattet sind, um das vorherrschende blaue Licht in oligotrophen Gewässern zu absorbieren (Moore et al., 1995).

1.4 Cyanophagen

Cyanophagen sind in der Lage, marine einzellige Cyanobakterien zu infizieren, und wurden das erste Mal im Jahr 1993 charakterisiert. Sie werden drei bekannten Familien der doppelsträngigen DNA-Viren zugeordnet: Myoviridae (kontraktile Schwänze), Styloviridae (lange nicht kontraktile Schwänze) und Podoviridae (kurze Schwänze). In den Meeren sind die auf genetischer Basis sehr unterschiedlichen Myoviridae, welche unter anderem *Synechococcus* Stämme infizieren, die verbreitetsten Cyanophagen. Siphoviridae und Podoviridae werden meist aus Süßwasser isoliert.

In den Ozeanen sind Viren die mit Abstand häufigste „Lebensform“ und eine Art Reservoir für die genetische Diversität in den Meeren. Auch wenn die Häufigkeit der Phagen gerade an der Oberfläche saisonalen Schwankungen unterliegt, so liegt doch typischerweise eine Anzahl von 10^7 Viren pro Milliliter Meerwasser vor (Mann, 2005). Auch wenn ihre Anzahl die der Bakterien und Archaea um das 15-fache übersteigt, so repräsentieren sie durch ihre geringe Größe doch nur ungefähr 5 % der prokaryotischen Biomasse.

Die in dieser Arbeit verwendeten Phagen zählen alle zu den T4-ähnlichen Phagen und damit zu der Familie der Myoviridae. Die T4-Phagen sind die wichtigsten Vertreter der T-Serie aus *E. coli*, woran vorwiegend der Aufbau der Bakteriophagen aufgeklärt wurde.

Charakteristischerweise besitzen T4-Phagen große, teilweise langgestreckte Kapside und ein verhältnismäßig großes Genom. Der Aufbau von T-Phagen ist gegenüber anderen Phagen deutlich komplexer (siehe Abbildung). Sie sind aus einer Grundplatte, einem Injektionsapparat und einem Kopf aufgebaut. Die Grundplatte ist mit Schwanzfäden und Spikes besetzt, die der Adsorption auf der Wirtszellwand dienen. Ein dünnes Rohr oberhalb der Grundplatte stellt den Injektionsapparat dar (Kanamaru, Leiman et al., 2002). Dieser wird zur Injektion der Phagen-DNA in die Wirtszelle benötigt. Dazu wird das Rohr von einer kontraktilen Schwanscheide umhüllt, welche sich während der Injektion zusammenzieht. Der Kopf besteht aus einem Kapsid und der darin enthaltenen Nukleinsäure. Das Kapsid ist wie die Grundplatte und der Injektionsapparat aus Proteinen aufgebaut. Es besitzt eine ikosaedrische Symmetrie, bestehend aus 160 Hexameren (Kanamaru et al., 2002, Leiman, Kanamaru et al., 2003).

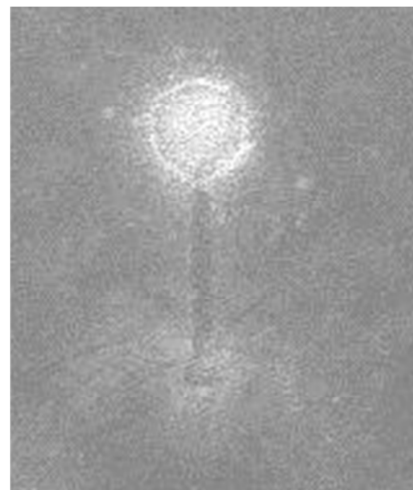
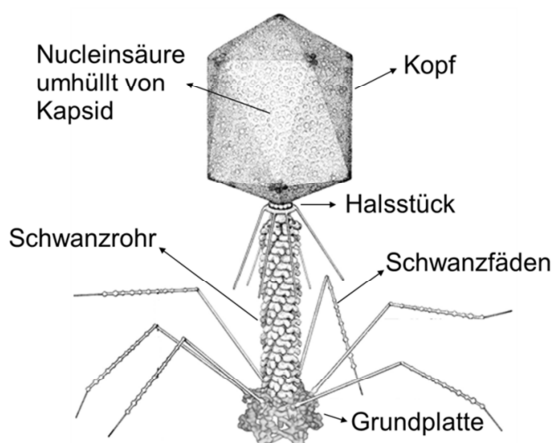


Abbildung 6: Aufbau eines T4-Bakteriophagen. Links ist der Aufbau eines T4-Phagen schematisch dargestellt. Der Phage besitzt ein Genom aus linearer ds-DNA innerhalb seines ikosaedrischen Kopfes. Das Schwanzröhre besteht aus einem hohlen Kern durch den die DNA während der Infektion injiziert werden kann. Die Schwanzfäden dienen zur Erkennung spezifischer Rezeptoren an der Oberfläche des Wirtes. Abbildung adaptiert nach (Miller, Kutter et al., 2003). Rechts ist ein Bild des Synchococcus Phagen Syn9 aufgenommen mit negativ-kontrastierter Transelektronenmikroskopie am Arbeitskreis für Elektronenmikroskopie der TUM.

Da Viren keinen eigenen Stoffwechsel besitzen, benötigen sie zur Vermehrung bzw. zur Reproduktion eine lebende Wirtszelle. Die Reproduktion lässt sich in sechs Abschnitte unterteilen. Zunächst adsorbiert der Phage irreversibel an spezifische Rezeptoren an der Zellwand ähnlich der Antigen-Antikörper Bindung. Dazu werden die Enden der Schwanzfäden an der Oberfläche der Zelle angelagert und die Abgabe von lytischem Phagenenzym soll die Zellwand für die Injektion der Phagen-DNA durchgängig machen (Aquilina,

Benesch et al., 2005). Durch die anschließende Injektion des Phagengenoms bleibt die leere Hülle als funktionslose Proteine auf der Oberfläche zurück. Der nächste Abschnitt wird als Latenzphase bezeichnet, da hier der Phage in der Wirtszelle selbst noch nicht nachgewiesen werden kann, es beginnt aber schon in dieser Phase die Transkription der viralen DNA und das Synthetisieren von Proteinen, welche die bakterieneigene DNA Synthese unterbrechen und die bereits vorhandene DNA in Bruchstücke zerlegen. Im weiteren Verlauf werden so sogenannte späte Gene des Phagengenoms transkribiert, wodurch die Produktion der Virusbestandteile, wie Hüllproteine, Schwanzrohr und Schwanzfäden beginnt (Aquilina et al., 2005). Anschließend werden die einzelnen Bestandteile zu neuen Phagen zusammengesetzt. Zunächst dienen Proteine im Inneren des Kapsids als Platzhalter, welche später dann durch die Phagen-DNA ersetzt werden. Im letzten Abschnitt werden die fertigen Viruspartikel durch Lyse der Wirtszelle freigesetzt. Die Lyse wird von dem Enzym Lysozym und dem stetig ansteigenden Innendruck der Zelle ausgelöst. Dadurch werden bis zu 200 virulente Phagen freigesetzt, die wiederum neue Zellen infizieren können (Trun & Trempy, 2003). Der gesamte Vermehrungszyklus ist in (Abbildung 7) schematisch dargestellt.

Obwohl Cyanobakterien und ihre Phagen eigentlich Kontrahenten sind, koexistieren sie schon seit Milliarden von Jahren. Noch ist nicht genau geklärt, wie die Phagen ihr eigenes Aussterben verhindern, da ihr Replikationszyklus deutlich schneller ist als der ihres Wirtes. Einerseits ist es möglich, dass durch abwechselnde Mutationen sowohl auf der Seite der Phagen als auch auf der Seite des Wirtes immer wieder zu Resistenzen und Infektionen kommt. Es kann aber auch eine dichte abhängige fluktuierende Selektion für die Koexistenz der bakteriellen Wirte und der Viren verantwortlich sein (Avrani, Schwartz et al., 2012, Hall, Scanlan et al., 2011).

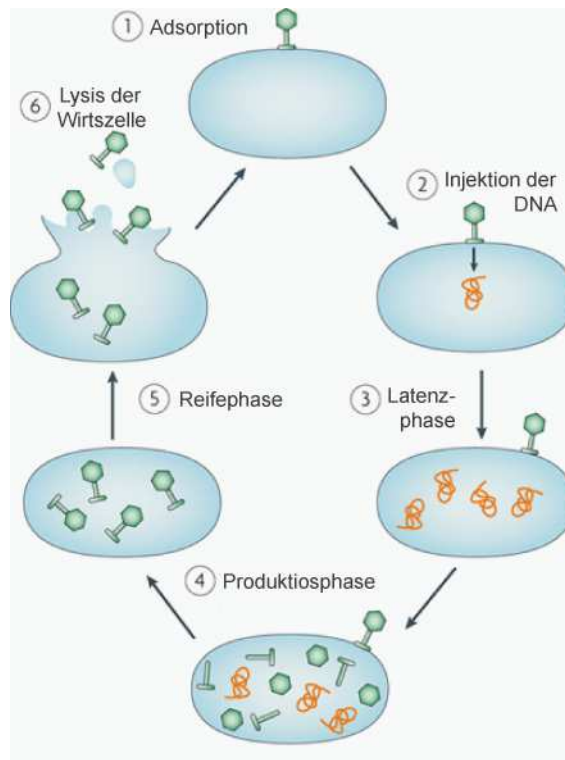


Abbildung 7: Schematischer lytischer Vermehrungszyklus von Bakteriophagen dargestellt in sechs Abschnitten. Zunächst adsorbiert der Phage über spezifische Rezeptoren an die Zellmembran der Wirtszelle, so dass er seine DNA injizieren kann. In der Latenzphase wird das Phagenom repliziert und die bakterielle DNA abgebaut. Anschließend werden die verschiedenen Bestandteile der Phagen produziert und zusammengesetzt bis die Wirtszelle unter dem ansteigendem physischen und chemischen Druck lysiert und bis zu 200 virulente neue Phagen freigesetzt werden. Abbildung adaptiert mit Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Microbiology (Labrie, Samson et al., 2010), © 2010

Phagen können nicht nur die dynamische Zusammensetzung und Vielfalt der Bakterien beeinflussen, sie können auch als Vektoren zum Austausch von physiologisch oder ökologisch wichtigen Genen dienen. So können Cyanophagen nicht nur ihren Wirt mit neuem genetischem Material versorgen bzw. dessen Gene mit ihren ersetzen, sondern auch die Evolution der Phagen wird durch die Aufnahme von cyanobakterieller DNA beeinflusst (Brüssow, Canchaya et al., 2004, Lindell, Sullivan et al., 2004). Wichtige Beispiele für die Aufnahme von „fremder“ DNA sind die beiden Gene *psbA* und *psbD* der cyanobakteriellen Photosynthese, die in vielen Cyanophagen Genomen gefunden wurden. Die beiden Gene *psbA* und *psbD* kodieren für die beiden Photosystem II Kernreaktionzentren Proteine D1 und D2 (Clokic, Shan et al., 2006a). Das D1 Protein muss unter normalen Bedingungen durch lichtinduzierten Schaden regelmäßig ausgetauscht werden, weshalb die *de novo* Synthese für die gleichbleibende Photosynthese erforderlich ist (Adir, Zer et al.,

2003, Lindell, Jaffe et al., 2005b). Auch während der Infektion ist die Aufrechterhaltung der Photosynthese wichtig, da so eine maximale Phagenproduktion gewährleistet werden kann (Lindell et al., 2005b). Es ist möglich, dass die lange Latenzphase vieler Süßwasser und mariner Cyanophagen von acht oder mehr Stunden zu einer Energie- und/oder Kohlenstoff-Limitierung für die Phagenreplikation führt und die Expression des Phagen-kodierten *psbA* die Photosynthese-Leistung des Wirtes fördert und damit die Phagenproduktion erhöht (Benson & Martin, 1981, Zeidner, Bielawski et al., 2005). Die Expression des Phagen-kodierten *psbA* während der Infektion konnte auch bereits nachgewiesen werden, was ebenfalls auf einen Fitness-Vorteil der Phagen hinweist (Clokic, Shan et al., 2006b, Lindell et al., 2005b).

Interessanterweise haben aber nicht alle Cynaophagen eine eigene Kopie des *psbA*-Gens in ihr Genom inkorporiert. Eine Studie zeigt, dass nur in 88 % der isolierten Cyanophagen das *psbA* Gen gefunden werden konnte, und auch das *psbD* Gen nur in kanpp 50 %. Wobei *psbD* nur in Kombination mit *psbA* und nur in Myoviren vorkommt. Es wird vermutet, dass Cyanophagen ohne *psbA*, wie *Synechococcus podovirus P60*, nur eine sehr kurze Latenzphase von etwa einer Stunde haben, was zu kurz ist, um die Expression von *psbA* vorteilhaft für den Phagen zu machen (Chen & Lu, 2002, Sullivan, Lindell et al., 2006).

2 Motivation und Zielsetzung

Viren haben üblicherweise nur wenige für sie zur Replikation wichtige oder vorteilhafte Gene auf ihrem Genom kodiert. In vorangegangenen Arbeiten wurde durch bioinformatische Analysen gezeigt, dass auch einige Virenproteine mit einer α -Kristallin Domäne existieren. Bei diesen Viren handelt es sich fast ausschließlich um marine Cyanophagen. Für diese Arbeit wurden drei dieser Cyanophagen ausgewählt, welche auf ihrem Genom ein potentiell kleines Hitzeschockprotein kodiert haben. Die drei Phagen S-PM2, P-SSM4 und Syn9 gehören zu der Familie der Myoviridae und sind daher ds-DNA Phagen. Sie haben die für ihre Klasse charakteristisch großen Genome, auf denen einige cyanobakteriellen Proteine kodiert sind, unter anderem das photosynthetische Gen *psbA*.

Zusätzlich wurden zwei *Synechococcus* und zwei *Prochlorococcus* Stämme ausgewählt, welche von den oben genannten Phagen infiziert werden können. Die beiden *Synechococcus* Stämme haben im Gegensatz zu den beiden *Prochlorococcus* Stämmen jeweils ebenfalls ein sHsp auf ihrem Genom kodiert.

Ziel dieser Arbeit war es, die phagen-kodierten potentiellen sHsps und die beiden cyanobakteriellen sHsps zu reinigen und hinsichtlich der charakteristischen Eigenschaften von sHsps zu untersuchen und miteinander zu vergleichen.

Da bereits bekannt ist, dass Phagen einige Gene aus ihrem Wirt über horizontalen Gentransfer in ihr Genom übernommen haben, liegt die Vermutung nahe, dass auch die sHsps auf diese Weise den Weg in die Cyanophagen gefunden haben. Mit Hilfe von phylogenetischen Analysen sollte die Evolution der sHsps in Cyanophagen untersucht werden.

Ebenso sollte durch Experimente mit dem Lysat der Cyanobakterien herausgefunden werden, ob und welche Proteine durch die sHsps bei einem Hitzeschock vor der Aggregation geschützt werden. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Proteine der Photosysteme gelegt, da ein Fortbestehen der Photosynthese während der Infektion für die Phagen essentiell ist.

Zusätzlich sollte der Einfluss der Infektion auf die Photosysteme bzw. die darin enthaltenen Proteine untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Name	Modell, Hersteller
Äkta Pure	GE Helthcare; Freiburg, Deutschland
CD-Spektrometer	Applied Photophysics Ltd, Surrey, UK
Feinwaage	Max 2109, Sartorius AG; Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzphotometer	Jasco FP-6500, Jasco Labor u. Datentechnik GmbH; Gross-Umstadt, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert200, Zeiss, Jena, Deutschland
Zellaufschlussgerät	Constant Systems Ltd; Northants, UK
HPLC System	FP Detektor 1520 UV/Vis Detektor 157 Jasco Labor u. Datentechnik GmbH; Gross-Umstadt, Deutschland
Kamera	Hamamatsu C4742-95, Hamamatsu, Hersching, Deutschland
Kugelmühle	MM400, Retsch®; Haan, Deutschland
PHEREAstar plus	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
pH-Meter	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH; Weilheim, Deutschland
Thermocycler	MWG; Ebersberg, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg, Deutschland
QPCR-Gradientencycler	MX 300P, Agilent Technologies; Waldbronn, Deutschland
Refraktometer	Leica Mark II, Leica, Wetzlar, Deutschland
UV/Vis-Spektrophotometer	Cary 50 Bio, Varian; CA USA Ultrospec 3100 pro, GE Healthcare Ultrospec 1100 pro, GE Jasco V-550, Jasco Labor u. Datentechnik GmbH; Gross-Umstadt, Deutschland
Waage	Denver Instrument; NY, USA
Zentrifugen	Centrifuge 5418, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg, Deutschland

Microcentrifuge; Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe,
 Deutschland
 ROTIN 420R, Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
 Avanti J26XP, Beckmann Coulter GmbH; Krefeld, Deutschland

3.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, in der Reinheit p.A. von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Serva (Heidelberg) bezogen.

3.3 Bakterienstämme

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgelistet. *E. coli* Mach1 Zellen wurden zur Plasmid Vermehrung verwendet. Zur Proteinexpression wurden *E. coli* HB101 für Syn9-Hsp20, S-PM2-Hsp20, P-SSM2-Hsp20 und Sc8102-Hsp20 und *E. coli* BL21 für Sc7803-Hsp20 für eine optimale Expression herangezogen.

Stamm	Geno-/Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ <i>mcrB mrr hsdS20</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>recA13 supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpaL20(Sm^r) xy15 λ⁻ leu mtl1</i>	Boyer & Roulland-Dussoix, 1969; Bolivar & Backman, 1979
<i>E. coli</i> Mach1	F ⁻ Φ80(<i>lacZ</i>) ΔM15 Δ <i>lacX74 hsdR</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) Δ <i>recA1398 endA1 tonA</i>	Invitrogen (Darmstadt)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm⁺ Tet^r gal 1</i> (DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW CamR</i>]	Stratagene (La Jolla, USA)
<i>Synechococcus sp.</i> WH7803		National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA)
<i>Synechococcus sp.</i> WH8102		NCMA

<i>Prochlorococcus marinus</i> NATL1A	NCMA
<i>Prochlorococcus marinus</i> NATL2A	NCMA

3.4 Plasmide

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgelistet. Für die Proteinexpression wurden die Konstrukte von Syn9-Hsp20, S-PM2-Hsp20 und P-SSM2-Hsp20 mit Hilfe der in 3.9 aufgeführten Primer umklontiert. Für die beiden cyanobakteriellen sHsps wurden die Expressionskonstrukte direkt aus den Zellen mit den entsprechenden Primern zunächst amplifiziert und anschließend in den pProEx HTa Vektor (Sc8102-Hsp20) bzw. in den pETSUMO Vektor kloniert. 7

Für den Knock-down bzw. der Überexpression einzelner sHsps in Cyanobakterien wurde der pRL153 Vektor verwendet.

Vektor	Marker/Beschreibung	Herkunft/Referenz
pProEx HTa	Amp ^R Trc promoter lac ^q (His) ₆ rTEV protease cleavage site	Invitrogen (Darmstadt)
pETSUMO		
pRL153		Wolfgang R. Hess, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Cyanolab

3.5 Enzyme und Standards

DNase I	Roche diagnostics GmbH; Mannheim, Deutschland
T4-DNA-Ligase	Promega GmbH; Mannheim, Deutschland
Pwo DNA Polymerase	Roche diagnostics GmbH; Mannheim, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Promega GmbH; Mannheim, Deutschland

Restriktionsenzyme Promega GmbH; Mannheim, Deutschland

Enzyme für Kalibriergerade HPLC

Thyroglobulin Sigma Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, Deutschland

Ribonuclease A Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH; Nümbrecht, Deutschland

Alkoholdehydrogenase Sigma Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, Deutschland

Albumin Sigma Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, Deutschland

Standards

Quick Load 1 kb DNA Ladder 50 µg/ml New England Biolabs GmbH; Frankfurt am Main, Deutschland

SDS Page Standard Low Range Bio-Rad Laboratories GmbH; München Deutschland

PEQLAB Protein Marker IV VWR International GmbH, Erlangen

3.6 Medien

Für *E. coli* Stämme:

LB Medium 20 g LB Medium Powder
auf 1 L H₂O
autoklavieren

Für *Synechococcus*-Stämme:

ASW f/2 250 ml Turks Island Salts
(alle Lösungen wurden vor der Zugabe autoklaviert oder steril filtriert) 1 ml Eisenchloridhexahydrat/EDTA Lösung
250 µl Spurenmetall-Lösung
250 µl Natrium-Phosphat-Lösung
1 ml Ammoniumsulfat-Lösung
500 µl Natriumhydrogencarbonat-Lösung
250 µl Vitamin B12
5 ml f/2

Für *Prochlorococcus*-Stämme:

ASW Siehe oben (ohne f/2)

3.7 Cyanophagen

S-PM2 Andrew Millard, University of Warwick,
School of Life Sciences

Syn9 Welkin Hazel Pope; Pittsburgh Bacterio-
phage Institute and Department of Biologi-
cal Sciences; University of Pittsburg

3.8 Sonstiges Material**Säulen**

ResourceQ, 6 ml GE Healthcare; Freiburg, Deutschland
HisTrap FF, 5 ml GE Healthcare; Freiburg, Deutschland
Hi Trap Butyl HP 5ml
Superdex 200 Prep Grade GE Healthcare; Freiburg, Deutschland
TSKgel G 4000 PW TosoHaas GmbH; Stuttgart, Deutschland
TSKgel PWH Guardcolumn TosoHaas GmbH; Stuttgart, Deutschland

Kits

Wizard[®] plus SV Minipreps DNA Purifica- Promega GmbH; Mannheim, Deutschland
tion System
PureYield[™] Plasmid Midiprep System Promega GmbH; Mannheim, Deutschland
Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up Sys- Promega GmbH; Mannheim, Deutschland
tem
Melon[™] Gel IgG Spin Purification Kit Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham,
USA

Küvetten

Einwegküvetten, Polystyrol, 10x4x45 mm	Sarstedt AG & Co.;Nümbrecht, Deutschland
Einwegküvetten, UV-Küvette mikro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Präzisions-Küvetten, Quarzglas Suprasil [®] , 1 cm	Hellma GmbH & Co. KG; Müllheim, Deutschland

Dialyseschlauch

Spectra/Por, MWCO 12-14000	Spectraum Laboratories Inc., USA
----------------------------	----------------------------------

3.9 Oligonucleotide

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide aufgelistet. Sie wurden von MWG Eurofins (Ebersberg) bezogen.

Beschreibung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
Y71 Xho1	GATCAGCTCGAGTTAAACTGC ATCACTGCTCGG	Klonierung Syn9-Hsp20 Einführen Xho1 Schnittstelle
Y71 fw Nco1	GATCAGCCATGGGAACCGGT CTGCGTAAATTTACC	Klonierung Syn9-Hsp20 Einführen Nco1 Schnittstelle
Y21 Xho1	GATCAGCTCGAGTTAGGTAAT ATCATACTTTTATGT	Klonierung P-SSM4 Einführen Xho1 Schnittstelle
Y21 fw Nco1	GATCAGCCATGGGAAATTATC TGACCCGTTGAACC	Klonierung P-SSM4 Einführen Nco1 Schnittstelle
Y19 Xho1	GATCAGCTCGAGTTATTTTAC TTCATACAGAATTTTTTTC	Klonierung S-PM2 Einführen Xho1 Schnittstelle
Y19 fw Nco1	GATCAGCCATGGGAACCAAA TTTACCTGGGATATTTATT	Klonierung S-PM2 Einführen Nco1 Schnittstelle
pRL153_fw_787	GGAGTTGGGTGGCTATCAGAT CAG	Sequenzierung
pRL153_rev_1081	CTTATGAACTCCTCGATCCGC C	Sequenzierung

Y19 AS Xho1 fw	GATCAGCTCGAGTTACTCCCC CCACTTTGTAGG	RNAi Konstrukt S-PM2-Hsp20 Einführen Xho1 Schnittstelle
Y19 AS Nco1 rev	GATCAGCCATGGGATGGTCTG GGACAACTTTTTC	RNAi Konstrukt S-PM2-Hsp20 Einführen Nco1 Schnittstelle
Y71 AS Xho1 fw	GATCAGCTCGAGAAGATCTTG GTGCCATCGTAG	RNAi Konstrukt Syn9-Hsp20 Einführen Xho1 Schnittstelle
Y71 AS Nco1 rev	GATCAGCCATGGGGATGGAG CAGGATTTTCAG	RNAi Konstrukt Syn9-Hsp20 Einführen Nco1 Schnittstelle
hsp7803_BamH1 _fw	GATCAGGGATCCATGATCACC CTTCGTCAATCACC	Klonierung Sc7803-Hsp20 Einführen BamH1 Schnittstelle
hsp7803_Xho1_ rev	GATCAGCTCGAGTCAGGCGTC GACG	Klonierung Sc7803-Hsp20 Einführen BamH1 Schnittstelle
pProEx Nhe1 fw	GATCAGGCTAGCAACGGTTCT GGCAAATATTCTG	Klonierung RNAi Konstrukte Einführung Nhe1 Schnittstelle
pProEx Nhe1 rev	GATCAGGCTAGCGCCAAAAC AGCCAAGCTTG	Klonierung RNAi Konstrukte Einführung Nhe1 Schnittstelle

3.10 Computersoftware, Datenbanken und Internetbasierte Tools

Computersoftware

Adobe Suite	Adobe System, San Jose, USA
Borwin	Jasco, Groß-Umstadt
CDNN	Applied Photophysics, UK
ChemDraw Ultra 12.0	PerkinElmer informatics (www.cambridgesoft.com)
Endnote X7	Adept Scientific, Herts, GB
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Jalview	University of Dundee
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Origin 8.6G	Originlab, Northhampton, USA

Datenbanken

Cyanobase	http://genome.microbedb.jp/cyanobase/
PFAM	http://pfam.xfam.org/
PubMed	www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
UniProt	www.uniprot.org

Internetbasierte Tools

ClustalW2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
iTol	http://itol.embl.de/
NCBI Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
OligoAnalyzer 3.1	http://eu.idtdna.com/calc/analyzer
Phylogeny.fr	http://www.phylogeny.fr/
ProtParam	http://web.expasy.org/protparam/

3.11 Molekularbiologische Methoden

3.11.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR kann ein genau definierter Teil der DNA exponentiell vervielfältigt werden. Die Amplifikation erfolgte mit verschiedenen Polymerasen wie der *Taq*- oder der *Pfu*- Polymerase, wobei die *Pfu*-Polymerase mit einer geringeren Fehlerquote arbeitet, da sie eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität besitzt.

Ein Standard-Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 100 µl) war wie folgt zusammengesetzt:

Substanz	Volumen [µl]
H ₂ O bidest.	84,5
Reaktionspuffer (10x)	10
Template DNA	1
dNTPs (10 mM)	2
Primer 1 (100 pmol/µl)	1
Primer 2 (100 pmol/µl)	1
DNA-Polymerase (1U/µl)	0,5

Es wurden für die jeweiligen Ansätze die Primer aus Kapitel 3.9 verwendet.

Die Annealing-Temperatur wurde anhand der Schmelztemperatur der Primer festgelegt und die Zeiten wurden an die Länge des Gens angepasst. Nach dem Aufheizen auf 95 °C wurde die Polymerase zugegeben. Nachfolgend ist ein typisches Temperaturprogramm dargestellt.

5 min (Denaturierung)	95 °C	
30 s (Denaturierung)	95°C	
30 s (Annealing)	55 °C	35 x
60 s (Synthese)	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	8 °C	

Zur Überprüfung des Erfolges wurden 10 µl des Ansatzes mit 1 µl DNA Auftragspuffer (10x) versetzt und wie in 3.11.5 beschrieben elektrophoretisch getrennt.

Falls nicht nur das gewünschte Produkt entstanden ist, wurde der gesamte PCR Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die gewünschte Bande wurde ausgeschnitten und nach Vorschrift mit dem PCR Clean-Up Kit gereinigt.

3.11.2 Restriktion

Um die DNA Fragmente in einen entsprechenden Vektor klonieren zu können, wurden zunächst sowohl die nach der PCR gereinigte DNA, als auch der gewünschte Vektor durch passende Restriktionsenzyme verdaut. Für die Klonierung der Gene von Syn9-Hsp20, S-PM2-Hsp20, P-SSM4-Hsp20 und Sc8120-Hsp20 in den pProEx Vektor wurden die beiden Restriktionsenzymen *NcoI* und *XhoI* und für die Klonierung von Sc7803-Hsp20 in den pETSUMO Vektor wurden *XhoI* und *BamHI* eingesetzt. Es wurde jeweils der von dem Hersteller empfohlene Reaktionspuffer für die entsprechenden Restriktionssenzyme verwendet. Ein Standard-Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 60 µl) war wie folgt zusammengesetzt:

Substanz	Volumen [μl]
Template DNA	50
Reaktionspuffer (10 x)	6
Restriktionsenzym 1 (20.000 U)	2
Restriktionsenzym 2 (20.000 U)	2

Der Ansatz wurde entweder über Nacht (präparativer Ansatz) oder mindestens 3 h (analytischer Ansatz) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA, wie in Kapitel 3.11.1 beschrieben, mit Hilfe des *Wizard® SV Gel Clean-Up Kits* gereinigt.

Der analytische Verdau wurde eingesetzt um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen. Dafür wurden Ansätze wie folgt zusammengestellt.

Substanz	Volumen [μl]
Template DNA	10
Reaktionspuffer (10 x)	1,5
Restriktionsenzym 1 (20.000 U)	0,3
Restriktionsenzym 2 (20.000 U)	0,3
H ₂ O (Nukleasefrei)	2,9

Der Ansatz wurde für 2,5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend wurden 1,5 μ l DNA Auftragspuffer zugefügt, um den erfolgreichen Einbau in das Plasmid mit Hilfe eines Agarosegels zu überprüfen.

3.11.3 Ligation

Für die Ligation wurden geschnittener Vektor und mit denselben Enzymen geschnittenes Fragment mit T4 DNA Ligase über Nacht bei 4 °C inkubiert. Ein Standard Ansatz war wie folgt zusammengesetzt:

Substanz	Volumen [μ l]
Ligationspuffer (10 x)	2
Insert	8
Vektor	1
ddH ₂ O	8
Ligase (3 U/ μ l)	1

Anschließend wurden wie in Kapitel 3.11.6 beschrieben, chemisch kompetente *E. coli* Zellen (mach1) mit dem kompletten Ansatz transformiert und auf einer Platte mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert. Die Selektionsplatte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Der Erfolg der Klonierung wurde durch Testanzuchten der resultierenden Kolonien und anschließender Plasmidisolierung wie in Kapitel 3.11.4 beschrieben überprüft. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung (MWG Eurofins, Ebersberg) nachgewiesen.

Zur Überprüfung der Ligation wurden 10-12 Testanzuchten von jeweils 3 ml LB_{Amp} Medium mit der resultierenden Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.11.4 Plasmidisolierung

Plasmide aus *E. coli* wurden je nach benötigter Menge DNA ausgehend von 4 ml ÜNK oder von 100 ml ÜNK mit Hilfe des *Wizard® Plus SV* Minipreps DNA Purification System oder dem Pure Yield™ Plasmid Midiprep System nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.11.5 Agarose-Gelelektrophorese

DNA Auftragspuffer (10x)	10 mM EDTA pH 8,0
	50% v/v Glycerin
	0,2% w/v Bromphenolblau
	0,2% w/v Xylencyanol
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris/Acetat pH 8,0
	50 mM EDTA pH 8,0

Die Agarose-Gelelektrophorese kann zur Identifizierung von DNA Fragmenten und Plasmid DNA genutzt werden. Dabei wurde eine Agarosekonzentration von 1 % Agarose (w/v) in 1x TAE Puffer verwendet. Zusätzlich wurde die Agaroselösung zum Anfärben der DNA mit 3 μ l pro 100 ml *Stain G* (Serva, Heidelberg) versetzt. Die Proben wurden mit 1/10 Probenvolumen an DNA-Auftragspuffer versetzt und zusammen mit 10 μ l Quick Load 1 kb DNA Ladder als Marker auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 125 V für 20-30min in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer in 1 %TAE Puffer. Die Detektion der DNA Banden erfolgte durch Anregung der *Stain G* Fluoreszenz bei 302 nm. Für präparative Gele wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des *Wizard® SV Gel Clean-Up Kits* gereinigt.

3.11.6 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden je nach Bedarf verschiedene Stämme verwendet. Dabei wurden HB101 und *BL21DE3Cd+* ausschließlich zur Proteinexpression und Mach1 zur Plasmidvermehrung verwendet.

Für die Transformation wurden 200 μ l entsprechender *E. coli* Zellen mit 1 μ l gereinigtem Plasmid oder dem vollständigem Ligationsansatz in einem ERG vermischt und zunächst für 20-30 min auf Eis inkubiert, um die Anlagerung der Plasmid DNA an die Zellen zu ermöglichen. Es folgte ein Hitzeschritt für 1 min bei 42 °C, der dazu führt, dass die Plasmid DNA von den Zellen aufgenommen wird. Anschließend wurden die Zellen für 2 min auf Eis inkubiert, bevor sie mit 1 ml LB₀ Medium versetzt und für 45 bis 60 min bei 37 °C geschüttelt wurden. Nach Zentrifugation des Ansatzes wurde der Überstand verworfen und das Bakteriensediment im verbleibendem Überstand resuspendiert und auf einer entsprechenden Selektionsplatte (100 μ g/ml Ampicillin bzw. 35 μ g/ml Kanamycin) ausplattiert. Bei Inkubation über Nacht bei 37 °C können nur Zellen Kolonien bilden, die durch die Transformation mit pProEx eine Ampicillinresistenz bzw. durch pR1153 eine Kanamycinresistenz erhalten haben.

3.11.7 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

E. coli wurde entweder in LB-Flüssigkultur oder auf LB-Platten in einem Inkubator bei 37 °C kultiviert. Durch die Zugabe von entsprechendem Antibiotikum wurde selektioniert. Flüssigkulturen wurden 1:100 von einer frischen Übernachtskultur oder durch Zugabe einer

Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft. Das Bakterienwachstum wurde durch VIS-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 600 nm beobachtet.

Für die Langzeitlagerung wurden 500 µl Bakteriensuspension mit 500 µl 50%iger steriler Glycerinlösung vermischt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.11.8 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss erfolgte mittels einer Zellaufschlussmaschine nach Prahlsstrahlverfahren bei 2,5 kbar. Hierfür wurde das Zellpellet aus der Ernte in einem möglichst kleinen Volumen von Puffer A für die HisTrap Säule resuspendiert. Nach dem Aufschluss wurde die Lösung mit einer Spatelspitze DNaseI und mit Protease Inhibitor Mix HP versetzt. Die Zelltrümmer wurden bei 18000 Upm und 4 °C für 30 bis 45 min abzentrifugiert (Beckman coulter Avanti J-26 XP JA-25-50). Der Überstand wurde für die Proteinreinigung weiter verwendet.

3.12 Proteinchemische Methoden

3.12.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris/HCl pH 8,0 0,8% (w/v) SDS
Sammelgelpuffer (2x)	0,25 M Tris/HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
Laufpuffer (10x)	0,25 M Tris/HCl pH 8,8 1% (w/v) SDS 2 M Glycin

Die SDS-PAGE zur analytischen Trennung von Proteinen, erfolgte durch Trennung nach Molekulargewicht. Es wurden 15%-ige Trenngele in Kombination mit einem 5%-igen Sammelgel verwendet. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 3.1 angegeben.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel der SDS-PAGE

	Sammelgel (5%)	Trenngel (15%)
Acrylamid/Bisacrylamid (40%)	2,5 ml	7,5 ml
2x Sammelgelpuffer	10 ml	-
4x Trenngelpuffer	-	5 ml
ddH ₂ O	7,5 ml	7,5 ml
Gesamtvolumen	20,0 ml	20 ml
Polymerisation:		
APS (10%)	100 µl	100µl
TEMED	10µl	10 µl

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel (8,5cm x 8,5cm) mit 5 x SDS-Auftragspuffer versetzt. Unlösliche Fraktionen wurden in 1 x SDS-Auftragspuffer aufgenommen. Für eine vollständige Denaturierung der Proteine wurden die Proben 5 min bei 95 °C inkubiert. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine wurde ein LMW Standard der Firma Biorad verwendet. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 40 min bei 35 mA/pro Gel in Laufpuffer.

3.12.2 Gelfärbung

Fairbanks A	25% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure 0,05% (w/v) Coomassie BlauR
Fairbanks D	10% (v/v) Essigsäure
Kolloidal Coomassie	0,02% (w/v) Coomassie BlauG 5% (w/v) Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat 10% (v/v) Ethanol 2% (v/v) Orthophosphorsäure

Zur Visualisierung der Proteinbanden in Polyacrylamidgelen wurden die Gele nach einem verkürzten und modifizierten Protokoll von Fairbanks *et al.* (1971) (Fairbanks, Steck *et al.*, 1971) gefärbt. Dafür wurden die Gele nacheinander in Fairbanks A und Fairbanks D Lö-

sung kurz aufgeköcht und anschließend in Fairbanks D Lösung geschwenkt, bis die Banden sichtbar wurden.

Bei sehr geringen Proteinkonzentrationen wurden die SDS-Acrylamid Gele mit Kolloidal-Coomassie angefärbt. Dafür musste zunächst das SDS aus dem Laufpuffer nach der Elektrophorese durch mindestens zwei Waschschrirte mit Wasser für jeweils 10 Minuten entfernt werden. Für die Färbung wurde das Gel über Nacht in der Kolloidal-Coomassie Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfärben wurde das Gel in Wasser so lange inkubiert bis der Hintergrund ausreichend entfärbt war.

3.12.3 Proteinreinigung

3.12.3.1 Ni-Chelat-Affinitätschromatographie

His-Trap Puffer A	40 mM Natriumphosphat pH 7,7 300 mM NaCl 10 mM Imidazol
His-Trap Puffer B	40 mM Natriumphosphat pH 7,7 300 mM NaCl 20 mM Imidazol
His-Trap Puffer C	40 mM Natriumphosphat pH 7,7 300 mM NaCl 300 mM Imidazol
His-Trap Puffer D	40 mM Natriumphosphat pH 7,7 300 mM NaCl 500 mM Imidazol

Alle Puffer für die Reinigung von Sc7803-Hsp20 mit pH 8,5

Die cyanobakteriellen und viralen sHsps sind im Expressionsvektor auf Sequenzebene mit einem N-terminalem Histidin-tag (6x His) versehen, was die Reinigung über eine Ni-Chelat-Affinitätschromatographie ermöglicht. Um den Abbau durch Proteasen und Aggregate zu vermeiden wurden alle Reinigungsschritte bei einer Temperatur von 8 °C durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde dafür die HisTrap (5 ml FF) Säule mit His-Trap Puffer A äquilibriert und mit dem proteinhaltigen Überstand der Zentrifugation nach dem Zellaufschluss (siehe 3.11.8) mit einer Flussrate von 3 ml/min beladen. Anschließend wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen His-Trap Puffer A und 5 Säulenvolumen His-Trap Puffer B gespült. Durch die leicht erhöhte Imidazolkonzentration konnten unspezifisch gebundene Proteine entfernt werden. Die Elution der gebunden kleinen Hitzeschockproteine erfolgte mit 300 mM Imidazol (10 Säulenvolumen His-Trap Puffer C) wobei Fraktionen zu je 2 ml gesammelt wurden. Schließlich wurde die Säule durch Waschen mit 500 mM Imidazol (His-Trap Puffer D) von noch vorhandenen Proteinresten befreit. Die laut Absorptionsdetektion bei 280 nm proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (siehe 3.12.1) analysiert und alle Hsp20 haltigen Fraktionen anschließend vereinigt. Vor dem nächsten Reinigungsschritt wurde der His-tag mit Hilfe der TEV Protease bzw. der SUMO Protease entfernt. Dafür wurden die jeweilige Protease zusammen mit den vereinigten Proteinfraktionen über Nacht gegen His-Trap Puffer A der Ni-Chelat Affinitätschromatographie dialysiert. Bei einem erneuten Beladen der Ni-Chelat Säule mit dem dialysierten Protein konnte das Zielprotein ohne den His-tag jetzt nicht mehr an die Säule binden und wurde im Durchlauf aufgefangen. Die Protease selbst und auch evtl. noch nicht gespaltenes Protein binden an die Säule. Die Elution erfolgte erneut mit 300 mM Imidazol (His-Trap Puffer C) und es folgte ebenfalls ein Waschschritt mit His-Trap Puffer D. Alle Fraktionen wurden mit Hilfe von SDS-PAGE auf die Anwesenheit des Zielproteins überprüft und die entsprechenden Fraktionen anschließend für die weitere Reinigung vereinigt.

3.12.3.2 Resource Q Anionenaustauschchromatographie

Resource Q Puffer A	50 mM Tris/HCl pH 8,0
	50 mM KCl
	2 mM EDTA
Resource Q Puffer B	50 mM Tris/HCl pH 8,0
	1 M KCl
	2 mM EDTA

Alle Puffer für die Reinigung von Sc7803-Hsp20 mit pH 8,5

Die cynaobakteriellen und viralen kleinen Hitzeschockproteine besitzen einen berechneten Isoelektrischen Punkt zwischen 4,73 und 6,15 (Protparam Expasy) und kann über eine Anionenaustauschchromatographie mit dem entsprechendem Puffer (pH) gereinigt werden. Dafür wurden die vereinigten Fraktionen der Ni-NTA zunächst gegen den Resource Q Puffer A dialysiert um die Ionenstärke zu reduzieren und eine Bindung der sHsps an die Säule zu gewährleisten. Die dialysierte Proteinlösung wurde auf eine in Puffer A äquilibrierte Resource Q Anionenaustauscher Säule geladen und anschließend mit 6 Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Für die Elution wurde zunächst ein linearer Gradient gewählt, bei dem die KCl Konzentration innerhalb von 15 Säulenvolumen auf 750 mM erhöht wurde und anschließend wurde die KCl Konzentration direkt auf 1 M für 5 Säulenvolumen erhöht. Dabei wurden Fraktionen zu je 2 ml gesammelt und die Flussrate während der gesamten Reinigung bei 4 ml/min gehalten. Von den laut Absorptiondetektion bei 280 nm proteinhaltigen Fraktionen wurden Proben mittels SDS-PAGE analysiert.

3.12.3.3 Gelfiltration

Gelfiltrations-/Lagerpuffer für Syn9-Hsp20 und P-SSM4-Hsp20	50 mM Tris/HCl pH 8,0
	50 mM KCl
	2 mM EDTA
Gelfiltrations-/Lagerpuffer für Sc7803-Hsp20	50 mM Tris/HCl pH 8,5
	50 mM KCl
	2 mM EDTA

Für Syn9-Hsp20, P-SSM4-Hsp20 und Sc7803-Hsp20 folgte nach dem Anionenaustauscher als letzter Reinigungsschritt eine Gelfiltration. Dafür wurde zunächst das Volumen der proteinhaltigen Fraktionen auf 5-10 ml mit Hilfe eines Konzentrators (Amicon Ultra, Millipore) durch Zentrifugation bei 4000 Upm bei 4 °C eingeengt. Die Proteinlösung wurde über eine in Gelfiltrationspuffer äquilibrierte HiLoad Superdex200 *prep-grade* Gelfiltrationssäule (XK 16/60, GE Healthcare, Freiburg) bei einer Temperatur von 8 °C weiter gereinigt. Anschließend wurde die Proteinlösung mit 2 Säulenvolumen bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert wobei Fraktionen von jeweils 4 ml gesammelt wurden. Von den laut Absorptionsdetektion bei 280 nm proteinhaltigen Fraktionen wurden Proben genommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen die das Zielprotein enthielten, wurden schließlich vereinigt und erneut mit Hilfe eines Konzentrators auf ein Volumen von ca. 1 ml eingeengt. Nach Bestimmung der Konzentration wurde das Protein zu je 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

3.12.3.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie

HIC Puffer A	50 mM Tris/HCl pH 8,0 50 mM KCl 2 mM EDTA 25% (w/v) Ammoniumsulfat
HIC Puffer B/Lagerpuffer B	50 mM Tris/HCl pH 8,0 50 mM KCl 2 mM EDTA

Für S-PM2-Hsp20 und Sc8102-Hsp20 kam die Reinigung über eine Gelfiltrationssäule nicht in Frage, da in beiden Fällen das Protein nicht mehr von der Säule eluiert werden konnte. Daher wurde als letzter Reinigungsschritt eine Hydrophobe Interaktionschromatographie durchgeführt, da diese Methode den besten Reinigungserfolg lieferte. Dafür wurden die vereinigten Fraktionen der Resource Q langsam und auf Eis mit 25% Ammoniumsulfat versetzt und anschließend auf eine in HIC Puffer A äquilibrierte HIC Säule geladen. Nach Waschen mit 5 Säulenvolumen HIC Puffer A wurde der Gehalt an Ammoniumsulfat kontinuierlich über 10 Säulenvolumen auf 0% (100% HIC Puffer B) reduziert.

Hierbei wurden Fraktionen zu je 2 ml gesammelt. Die Flussrate betrug während der gesamten Reinigung 3 ml/min. Von den laut Absorptionsdetektion bei 280 nm proteinhaltigen Fraktionen wurden Proben mit Hilfe von SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen die das Zielprotein in sauberer Form enthielten wurden vereinigt und gegen Lagerpuffer über Nacht dialysiert. Anschließend wurde die Proteinlösung wie in 3.12.3.3 beschrieben aufkonzentriert, aliquotiert und schockgefroren.

3.12.4 Western Blot

Western Blot Transferpuffer	20 mM Tris/HCl pH 8,3 200 mM Glycin 20 % (v/v) MeOH 0,037 % (w/v) SDS
PBS-Tween20 (PBS-T)	4 mM KH_2PO_4 160 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times (\text{H}_2\text{O})$ pH 7,4 1,15 M NaCl 0,1 % (v/v) Tween

Der Western-Blot ist eine verbreitete Methode, die die gelelektrophoretische Auftrennung eines Proteingemisches mit der Spezifität des immunchemischen Nachweises verbindet.

Dabei wurden die nach der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (siehe Kapitel 3.12.1) elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran (Roti®-NC, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) übertragen und anschließend mit Hilfe von Antikörpern detektiert.

Dafür wurden sowohl die Nitrocellulosemembran als auch das SDS-PAGE Gel und sechs auf die gleiche Größe zugeschnittene Whatman™ 3MM Filterpapiere für 2 min in Westernblot Transferpuffer inkubiert. Für den Übertragungsvorgang wird ein Stapel von unten nach oben aus drei Whatman™ 3MM Filterpapieren, Nitrocellulose-Membran, SDS-PAGE Gel, drei Whatman™ 3MM Filterpapieren in eine *Semi Dry* Blot-Apparatur (BIOMETRA, Göttingen, Deutschland) gestapelt. Das Übertragen der Proteine erfolgte anschließend für 1 h bei $1,5 \text{ mA/cm}^2$ (72 mA pro SDS-PAGE Gel).

Nach dem Übertragen wurde die Membran mit den transferierten Proteinen für 30 min in PBS-T mit 5 % Magermilchpulver bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren.

Der primäre Antikörper wurde 1:5000 in PBS-T mit 1 % Magermilchpulver verdünnt und die Membran damit für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten mit jeweils 10 min in PBS-T wurde der sekundäre Antikörper (1:10000 in PBS-T mit 1 % - Magermilchpulver) zugegeben und ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuten drei Waschschritten konnten die Banden mittels Chemilumineszenz durch Verwendung des WesternBright ECL Spray (Advansta, California, USA) und des Image Quant LA S 4000 Detektions Systems (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) sichtbar gemacht werden.

3.13 Spektroskopische Methoden

3.13.1 CD-Spektroskopie

Von nativen Proteinen wurden Fern-UV-Circulardichroismus-Spektren an einem Chirascan-plus CD Spektrometer (Applied Photophysics Ltd, Surrey, UK) in Quarzglas Suprasil Küvetten (Hellma) und bei 10 °C aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 0,2 mg/ml, dabei wurden die Proteine in dem jeweiligen Lagerpuffer auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Die Fern-UV-Spektren wurden im Bereich von 195-260 nm bei einer Schichtdicke von 2 mm aufgenommen. Von 10 gemittelten Spektren wurde das Pufferspektrum subtrahiert und mit folgender Gleichung (1) die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure berechnet.

$$[\theta]_{MRW} = \frac{\theta \cdot 100}{c \cdot d \cdot N_{AS}} \quad (\text{Gleichung 1})$$

$[\theta]_{MRW}$ molare Elliptizität $\left[\frac{\text{deg} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right]$

θ Messwert [deg]

c Proteinkonzentration [M]

d Schichtdicke [cm]

N_{AS} Anzahl der Aminosäuren

3.13.2 Ultraviolet (UV)-Vis Spektroskopie

Durch verschiedene funktionelle Gruppen in Proteinen kann Licht im UV Bereich absorbiert werden. Die dafür verantwortlichen Chromophore sorgen dafür, dass Elektronen angeregt und vom Grundzustand in den angeregten Zustand versetzt werden. Dies kann man ausnützen um mit Hilfe von UV-Spektroskopie die Proteinkonzentration zu bestimmen. Die Berechnung der Proteinkonzentration ausgehend von der UV Absorption bei 280 nm erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (2).

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \leftrightarrow c = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} \quad (\text{Gleichung 2})$$

A	gemessene Absorption
ε	molarer Extinktionskoeffizient [$L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]
d	Schichtdicke [cm]

Die jeweiligen theoretischen molaren Extinktionskoeffizienten wurden mit ProtParam bestimmt (Wilkins, Gasteiger et al., 1999). Alle UV Spektren wurden an einem UV/Vis Spektrophotometer (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) im Bereich zwischen 240 und 350 nm aufgenommen.

3.13.3 Fluoreszenz Spektroskopie

Bei einer großen Zahl organischer Verbindungen, insbesondere bei Proteinen kann man nach Einstrahlung in deren Absorptionsbande eine Emission von Licht, die Fluoreszenz, beobachten. Nach Anregung durch Absorption befindet sich ein Molekül in Schwingungsniveaus des ersten elektronisch angeregten (S_1) oder eines höheren Singulettzustands (S_2 , S_3 ...) und kann durch verschiedene Prozesse wieder in seinen energetischen Grundzustand (S_0) übergehen. Von dem niedrigsten Schwingungsniveau des Singulettzustands S_1 erfolgen die Fluoreszenz und strahlungslose Prozesse wie die Rückkehr in den Elektronengrundzustand S_0 (internal conversion), der Übergang in das Triplettssystem (intersystem crossing) und Schwingungsrelaxation.

Die aromatischen Aminosäuren in Proteinen, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sind intrinsische Fluorophore. Dabei besitzt Tryptophan die größte Quantenausbeute und ist damit in der Lage die Fluoreszenz der Tyrosine durch Resonanz Energie Übertragung zu

quenchen. Daher wird meist die dominante Tryptophan Fluoreszenz verwendet um den räumliche Anordnung von Proteinen zu untersuchen.

3.14 Strukturelle Analyse

3.14.1 Analytische Gelfiltrationschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography – HPLC) ist eine analytische Methode bei der die zu untersuchende Substanz durch Trennsäule, welche eine stationäre Phase enthält unter hohem Druck gepumpt wird. Der Analyt wird dabei innerhalb einer kurzen Zeit und mit einer hohen Auflösung durch physikalische oder chemische Wechselwirkungen chromatographisch getrennt.

In dieser Arbeit wurde HPLC als analytische Gelfiltrationschromatographie zur Analyse der Quartärstruktur von Proteinen und Substrat-Komplexen verwendet. Als Gelfiltrations-säule wurde eine TSK G 4000 PW (Tosoh Biosciences) mit oder ohne entsprechender Vorsäule verwendet. Alle Experimente wurden in dem jeweiligen Lagerpuffer des verwendeten Proteins oder dem Assaypuffer bei einer Flussrate von 0,5 ml/min durchgeführt. Die Elutionsprofile der Proben wurden mit einem Fluoreszenz und einem UV Detektor aufgenommen. Die Einstellungen der Detektoren wurden der Konzentration der Probe und den experimentellen Bedingungen angepasst.

3.14.2 Thermal-Stability-Assay (TSA)

Erst bei der Entfaltung eines Proteins werden hydrophobe Flächen exponiert, die im gefalteten Zustand im Inneren verborgen sind. Der Fluoreszenzfarbstoff *Sypro-Orange* (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) ist in wässriger Umgebung gequenched und erst durch die Bindung an die hydrophoben Regionen eines Proteins entsteht eine Änderung des Fluoreszenzsignals. Dadurch kann die Entfaltung eines Proteins indirekt beobachtet werden.

Dazu wurden sHsp Konzentrationen zwischen 0,1 mg/ml und 0,4 mg/ml verwendet. Gemessen wurde in dem jeweiligen Lagerpuffer des sHsps und einer 1:1000 Verdünnung des *Sypro-Orange*. Die Änderung des Fluoreszenzsignals (Anregung 490 nm/Emission 575 nm) wurde in einem MX300P Realtime PCR-Gradientencycler (Agilent/Stratagene, Waldbronn) in einem Temperaturbereich von 25 °C bis 95 °C bei einer Heizrate von 1 °C/Zyklus gemessen. Die Schmelztemperaturen wurden als Nullstellen der 2. Ableitung der Schmelzkurve mit Hilfe eines Makros in Microsoft Excel bestimmt. Jede Schmelzkur-

ve wurde mindestens mit drei Wiederholungen aufgenommen, um daraus die mittlere Schmelztemperatur zu ermitteln.

3.14.3 Thermoübergang (CD-Spektroskopie)

Die thermische Stabilität von Proteinen kann unter anderem mit Hilfe der CD Spektroskopie untersucht werden. Dafür wurden die viralen und cyanobakteriellen sHps auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml mit dem entsprechenden Lagerpuffer verdünnt. CD-Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 205-260 nm bei einer Bandbreite von 1nm aufgenommen. Für den Thermoübergang wurde ein Temperaturbereich von 10 °C – 90 °C gewählt. Dabei wurde jeweils um 1 °C erhitzt und dann 30 sec gewartet bevor ein Spektrum aufgenommen wurde. Nach dem Erreichen von 90 °C wurde auf die gleiche Weise wieder auf 10 °C abgekühlt. Alle Messungen wurden an einem Chirascan-plus CD Spektrometer (Applied Photophysics Ltd, Surrey, UK) in 0,5 mm Quarzglas Suprasil Küvetten (Hellma) durchgeführt.

3.14.4 Guanidinium-Übergang

Guanidinium-Vorrats-Lösung	50 mM Tris/HCl pH 8,0
	50 mM KCl
	2 mM EDTA
	7 M GdmCl

Guanidiniumchlorid ist ein starkes Chaotrop und eines der stärksten Denaturierungsmittel und wird daher häufig in physikalisch-chemischen Studien zur Proteinfaltung eingesetzt. Durch das Erhöhen der Guanidiniumchlorid Konzentration verlieren Proteine nach und nach ihre geordnete Struktur und diese Veränderung lässt sich photometrisch verfolgen.

Dazu wurde zunächst die Guanidinium-Vorrats-Lösung hergestellt und die exakte Guanidinium Konzentration an einem Refraktometer bestimmt. Das zu untersuchende sHsp (Endkonzentration 1 µM) wurde anschließend mit dem entsprechenden Lagerpuffer und verschiedene Konzentrationen an GdmCl zwischen 0 und 4 M verdünnt. Die Proben wurden wenn nicht anders erwähnt für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Photometer (Jasco FP-6500) wurden von einer nativen sowie von einer denaturierten Proben ein Emissionsspektrum (Anregungswellenläng: 280 nm) von 300 bis 450 nm aufgenommen und die Wellenlänge der größten Differenz der beiden Spektren ermittelt. Anschließend werden alle

Proben der Denaturierungsreihe für 60 Sekunden bei der ermittelten Emissionswellenlänge vermessen und so der Faltungsübergang bestimmt.

3.14.5 Elektronenmikroskopische Charakterisierung

Die strukturelle Charakterisierung der cyanobakteriellen und viralen sHsps mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie wurde an negativkontrastierten Proben durchgeführt. Mit amorpher Kohle befilmte Trägernetzchen aus Kupfer (400 Mesh, Plano, Wetzlar) wurden durch Plasmaexposition für 30 s hydrophilisiert. Danach wurde die Proteinlösung aufgebracht und die Partikel für 60 s adsorbiert. Nach dem Absaugen der Proteinlösung mittels Filterpapier wurde Uranylacetatlösung (1% w/v in H₂O) aufgebracht, für 90 s auf der Probe belassen und anschließend ebenfalls mit einem Filterpapier abgesaugt, um die Probe anschließend an der Luft zu Trocknen. Die Proben wurden 1:10 verdünnt, da bei dieser Verdünnungsstufe für alle Proben ein ausreichender Abstand zwischen den Einzelpartikeln erreicht werden konnte. Die Präparate wurden anschließend an einem CM 200 Transmissionselektronenmikroskop (FEI, Hillsboro, OR, USA) bei einer Beschleunigungsspannung von 160 kV und einer nominellen Vergrößerung von 33 000 x mikroskopiert. Die Probenausschnitte wurden mit Hilfe einer 4k CCD Kamera (TVIPS, Gauting, Germany) dokumentiert.

3.15 Funktionelle Analyse

3.15.1 Aggregation der Citratsynthase

Assay-Puffer

40 mM HEPES pH 7,4

Wie bereits in der Einleitung erwähnt sind kleine Hitzeschockproteine in der Lage die Aggregation anderer Proteine ATP unabhängig zu unterdrücken indem sie an nicht-native Proteine binden. Ein beliebter *in vitro* Assay um diese Holdase Funktion zu untersuchen beinhaltet die Denaturierung von Substratproteinen entweder durch Hitze oder aber durch die Reduktion von Disulfidbrücken. Anschließend kann die fortschreitende Formierung der Aggregate, die zur Trübung der Lösung führen photometrisch verfolgt werden.

In dieser Arbeit wurde Citratsynthase (CS) als Modells substrat gewählt. In der Abwesenheit ihrer Substrate Oxalacetat (OAA) und Acetyl-CoenzymA (Ac-CoA) aggregiert die Citrat-

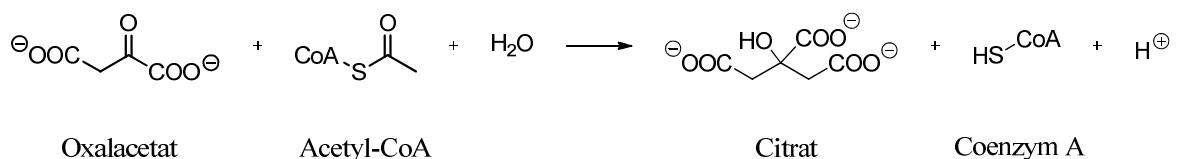
synthese spontan bei Temperaturen über 40 °C (Buchner, Grallert et al., 1998, Haslbeck & Buchner, 2015).

Um die Chaperonaktivität der viralen und cyanobakteriellen kleinen Hitzeschockproteine zu untersuchen wurden jeweils Lösungen hergestellt, die unterschiedliche Konzentrationen an sHsp enthielten. Die CS wurde erst nach einer 5 minütigen Inkubationszeit der Verdünnungen in einer Endkonzentration von 600 nM (Monomer) hinzugefügt. Die Absorption, und damit die Aggregation wurde bei einer Wellenlänge von 360 nm über 60 min bei 43 °C in einem UV/Vis Spektrophotometer mit temperierbarem Küvettenhalter (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) verfolgt.

3.15.2 Inaktivierung der Citratsynthase

Assay-Puffer	40 mM HEPES pH 7,4
Puffer für Küvetten	50 mM Tris/HCl pH 8,0
	10 mM Oxalacetat
	10 mM DTNB
	5 mM Ac-CoA

Citratsynthase katalysiert die Kondensation von Oxalacetat (OAA) mit Ac-CoA zu Citrat und CoA (Schema 3.1) (Wiegand & Remington, 1986). Die Enzymaktivität lässt sich durch einen kolorimetrischen Test mit Hilfe von 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) bestimmen. DTNB reagiert mit der freien Thiolgruppe des Reaktionsproduktes CoA, wird dadurch gespalten und es entstehen TNB²⁻ Ionen, welche eine gelbe Farbe besitzen. Diese Reaktion kann leicht mit Hilfe eines Spektrophotometers bei 412 nm verfolgt werden. Durch Temperaturen über 40 °C verringert sich die CS-Aktivität durch Entfaltung des Enzyms mit, wodurch immer weniger bis schließlich keine Substratumsetzung mehr erfolgt (Haslbeck & Buchner, 2015).



Schema 3.1: Katalysierte Reaktion der Citratsynthase.

Um den Einfluss der viralen und cyanobakteriellen sHsps auf die Inaktivierung der CS zu ermitteln, wurde die CS mit und ohne Zusatz der sHsps in Assay-Puffer auf eine Konzentration von 600 nM (Monomer) verdünnt. Die sHsps wurden äquimolar und in bis zu 8-fachem Überschuss zugegeben. Bis zum Starten der Inaktivierung bei 43 °C wurde die Mischung auf Eis gelagert. Um die verbliebene CS-Aktivität zu bestimmen wurde zu definierten Zeitpunkten eine Probe aus der Reaktionsmischung entnommen und in eine auf 25 °C vortemperierte Halbmikro-Einwegküvette mit dem entsprechenden Puffer gegeben. Die Aktivität der CS wurde bei 412 nm eine Minute lang mit Hilfe eines UV/Vis Spektrophotometers (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) verfolgt. Die Messung zum Zeitpunkt Null wurde als 100 % festgelegt und die Messungen ohne sHsp dienten als Kontrolle.

3.15.3 Reaktivierung der Citratsynthase

Assay-Puffer	40 mM HEPES pH 7,4
Rückfaltungspuffer	100 mM Tris/HCl pH 8,0
	10 mM MgCl ₂
	10 mM KCl

Um den Einfluss der viralen und cyanobakteriellen sHsps auf die Reaktivierung der CS zu untersuchen wurde zunächst wie in Kapitel 3.15.2 vorgegangen. Die CS wurde mit und ohne die Zugabe von einem 8-fachen Überschuss an sHsp auf eine Endkonzentration von 600 nM mit Assay-Puffer verdünnt. Zunächst wurde die CS bei 43 °C für 60 min vollständig inaktiviert. Anschließend wurde die Rückfaltung durch die Zugabe verschiedener Chaperone in Rückfaltungspuffer und einer Temperaturänderung auf 25 °C gestartet.

Getestete Chaperon-Systeme:

KJE	ClpB	KJE+ClpB
5 mM ATP	5 mM ATP	5 mM ATP
600 nM DnaK	600 nM ClpB	600 nM DnaK
1200 nM DnaJ		1200 nM DnaJ
600 nM GrpE		600 nM GrpE
		600 nM ClpB

Die Aktivität wurde analog zu Kapitel 3.15.2 zum Zeitpunkt Null (100 %), nach 60 min Inkubation bei 43 °C und nach 6, 12, 20, 30 und 45 min bestimmt. Als Kontrolle dienen Proben ohne sHsps.

3.15.4 Lysat Aggregation

Assay-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0
	2 mM EDTA
	50 mM KCl

Neben der Citratsynthase als Modellsubstrat der sHsps sollten auch biologisch relevante Substrate in dieser Arbeit untersucht werden. Dafür wurde mit dem Proteinlysate der beiden Cyanobakterienstämme *Synechococcus* WH7803 und *Synechococcus* WH8102 (siehe 3.16.4) gearbeitet. Um den Einfluss der sHsps auf die Fluoreszenzeigenschaften des Allophycocyanins zu untersuchen wurden 120 µl des Proteinlysats mit einer gesamt Proteinkonzentration von 2,8 mg/ml in Assay-Puffer eingesetzt. Das Lysat wurde mit und ohne die Zugabe von 10 µg cyanobakteriellem oder viralem Hsp20 oder einer Kombination von 5 µg von beidem bei 45 °C inkubiert. Als Kontrolle diente ein identisches Volumen an Puffer. Nach 0, 2, 5, 10, 20 und 40 min wurden Proben genommen und der lösliche von dem unlöslichen Proteinanteil durch Zentrifugation für 10 min bei 14.000 UPM (Kühlzentrifuge: Eppendorf 5418R FA-45-18-11) getrennt. Von den löslichen Proteinanteilen wurde anschließend ein Emissionsspektrum von 645 nm bis 750 nm bei einer Anregungswellenlänge von 635 nm aufgenommen.

Wenn die Fluoreszenzeigenschaften von Phycoerythrin untersucht wurden, konnte auf die wesentlich schnellere Auswertung mittels dem PHEREAstar plus mit einem FI Filter (Ex: 540 nm, Em: 590 nm) anstelle von individuellen Fluoreszenzspektren zurückgegriffen werden. Nach dem Trennen der löslichen von den unlöslichen Proteinanteilen wurden die einzelnen Proben 30-fach mit Assay-Puffer vor der Messung verdünnt.

3.15.5 Co-Immunpräzipitation

Als Immunpräzipitation versteht man eine Technik zur Präzipitation eines Protein Antigens aus einer Lösung indem man einen Antikörper verwendet der spezifisch an dieses bestimmte Protein bindet. Ist das Protein Teil eines Protein Komplexes, spricht man von Co-Immunpräzipitation. Durch das Verwenden dieses Proteins als Zielprotein, können unbekannte Interaktionspartner des Proteinkomplexes identifiziert werden.

Co-IP Experimente aus cyanobakteriellem Lysat

Lysis-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5 2 mM EDTA 150 mM NaCl
Wasch-Puffer 1	50 mM Tris/HCl pH 7,5 2 mM EDTA 150 mM NaCl 1% (w/v) NP-40 0,5% (w/w) Na-Deoxycholat
Wasch-Puffer 2	50 mM Tris/HCl pH 7,5 2 mM EDTA 500 mM NaCl 0,1% (w/v) NP-40 0,05% (w/w) Na-Deoxycholat
Wasch-Puffer 3	50 mM Tris/HCl pH 7,5 0,1% (w/v) NP-40 0,05% (w/w) Na-Deoxycholat
Elutions-Puffer	0,1 M Glycine pH 2,8

Die cyanobakteriellen Zellen wurden wie in 3.16.4 beschrieben geerntet und anschließend gewaschen und resuspendiert in Lysis-Puffer. Nach dem Lysieren der Zellen wurde NP-40

(0,5 %) zugegeben und alles wurde unter konstanter Rotation (25 Upm) bei 4 °C für 30 min inkubiert. Das Lysat (200 µg Gesamtprotein) wurde mit oder ohne Zugabe von 10 µg Syn9-Hsp20 für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurden 10 µl anti Syn9-Hsp20 Antikörper zugegeben. Die Mixtur wurde erneut für 1 h unter konstanter Rotation bei 4 °C inkubiert bevor 5 µl gewaschener Protein-G Sepharose Kugeln zur Probe zugegeben wurden. Nach zwei stündiger Inkubation bei 4 °C wurde die Mixtur zentrifugiert und der Überstand wurde als Wasch 0 behalten. Die Sepharose Kugeln wurden zweimal mit Waschpuffer 1, zweimal mit Waschpuffer 2 und einmal mit Waschpuffer 3 gewaschen. In einem letzten Schritt wurde mit 50 µl des Elutionspuffers eluiert. Alle Waschfraktionen und die Elutionsfraktion wurden mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt und die Elutionsbanden wurden noch weiter mittels Massenspektrometrie analysiert.

Co-IP Experimente zwischen cyanobakteriellen und viralen sHsps

Assay-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0 50 mM KCl 2 mM EDTA
Elutions-Puffer	0,1 M Glycine pH 2,8

Jeweils 10 µg von cyanobakteriellem Hsp20 und viralem Hsp20 wurden zusammen bei 57 °C für 40 min inkubiert. Anschließend wurden 10 µl Antikörper zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 4 °C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde anschließend zu 15 µl gewaschenen Protein G Sepharose Kugeln gegeben und für weitere 4 h bei 4 °C unter konstanter Rotation (25 Upm) inkubiert. Die Sepharose Kugeln wurden durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand als Wasch 0 behalten. Nach dreimaligem Waschen der Sepharose Kugeln mit Assay-Puffer (Wasch 1-3) wurde mit 40 µl Elutionspuffer eluiert. Alle Waschfraktionen und die Elutionsfraktion wurden mit Hilfe von SDS-PAGE analysiert.

3.16 Methoden zum Arbeiten mit Cyanobakterien

3.16.1 Kultivierung von Cyanobakterien

Turks Island Salts (1 L)	28 g NaCl 670 mg KCl 5,5 g MgCl ₂ · 6 H ₂ O 6,9 g MgSO ₄ · 7 H ₂ O 1,45 g CaCl ₂ · 2 H ₂ O
Eisenchloridhexahydrat/EDTA Lösung (500 ml)	270 mg FeCl ₃ · 6 H ₂ O (lösen in 10 ml 0,1 N HCl) 372 mg EDTA (lösen in 10 ml 0,1 N NaOH)
Spurenmittel-Lösung (1 L)	2,86 g Borsäure 1,81 g MnCl ₂ · 4 H ₂ O 0,222 g ZnSO ₄ · 7 H ₂ O 0,39 g Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O 0,049 g Co(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O
0,5 M Natrium-Phosphat-Lösung (50 mL)	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O pH 7,5
Ammoniumsulfat-Lösung (250 ml)	3,3 g (NH ₄) ₂ SO ₄
Natriumhydrogencarbonat-Lösung (300 ml)	25,2 g NaHCO ₃
Vitamin B12 (20ml)	20 mg Vitamin B12

Alle Cyanobakterien wurden unter photoautotrophen, nicht-stickstofffixierenden Bedingungen gezüchtet. Die Beleuchtung erfolgte durch paarweise angeordnete Leuchtstoffröhren der Typen Fluora L 77 und SunGlo, die in Kombination das gewünschte Tages-

lichtspektrum sehr gut abbildeten. Die Lichtintensität der verwendeten Leuchtstoffröhren wurde mit einem Quantummeter Li-250 A in Kombination mit einem Quantumsensor Li-190 SZ gemessen (Havel, 2006).

Bei der Kultivierung der Cyanobakterien musste darauf geachtet werden, dass alle verwendeten Stämme überaus sensitiv, bereits im picomolaren Bereich, auf die Anwesenheit von Kupferionen (Cu^{2+}) reagieren. Aus diesem Grund wurden alle Stämme in Gewebekulturflaschen aus Polystyrol kultiviert und bei der Herstellung des Meerwassers wurde ebenfalls darauf geachtet keine oder nur mit 1 N HCl vorbehandelte Glasgefäße zu verwenden.

Zunächst wurden alle Stämme in den von der Stammsammlung (The Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton CCMP) empfohlenen Medien angezogen (f/2 für *Synechococcus* WH7803 und *Synechococcus* WH8102 und Pro99 für NATL1A und NATL2A). Sobald sich die Stämme an die neue Umgebung (Gewebekulturflasche, Medium, Licht, Temperatur) gewöhnt hatten, wurde das f/2 bzw. das Pro99 Medium durch künstliches Meerwasser (engl.: *artificial sea water* (ASW)), ersetzt. Das ASW wurde aus den oben gelisteten Lösungen wie in Kapitel 3.6 beschrieben zusammengestellt.

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der Kultivierungsparameter für die verwendeten Cyanobakterien-Stämme

Cyanobakterium	Medium	Wachstumstemperatur [°C]	Lichtintensität [$\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$]
<i>Synechococcus</i> WH7803	ASW f/2	25	20
<i>Synechococcus</i> WH8102	ASW f/2	25	20
<i>Prochlorococcus</i> NATL1A	ASW	20	20
<i>Prochlorococcus</i> NATL2A	ASW	20	20

Für die Herstellung des Mediums mussten die verwendeten Glaswaren zunächst vorbehandelt werden, um das an den Oberflächen adsorbierte Kupfer zu entfernen. Zu diesem Zweck wurden die Glasgefäße über Nacht in 1 M Salzsäure eingelegt und anschließend sechsmal mit bidestilliertem Wasser (ddH_2O) ausgespült (Zinser, Coe et al., 2006).

Die Kultivierungsparameter sind von der Stammsammlung vorgegeben und in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Das Wachstum der Cyanobakterien wurde durch Messung der optischen Dichte bei 730 nm verfolgt. Bei dieser Wellenlänge ist die Absorption der cyanobakteriellen Pigmente vernachlässigbar (Stomp, Huisman et al., 2007). Für die Messung der optischen Dichte wurde ein Einstrahlphotometer und Einwegküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet.

3.16.2 Bestimmung der Zellzahl

Eine Methode zur Ermittlung der Gesamtzellzahl einer bakteriellen Kultur ist die direkte Auszählung der Zellen in einer Zählkammer. Dafür wurden zunächst verschiedene Verdünnungen der cyanobakteriellen Kulturen der beiden Stämme *Synechococcus* WH7803 und WH8102 mit ASW/f/2 hergestellt. Alle Verdünnungen wurden in einer Neubauer *improved* Zählkammer (Tiefe 0,100 mm) (Marienfeld Superior, Lauda Königshofen, Deutschland) unter einem Fluoreszenzmikroskop Axiovert200 (Zeiss, Jena, Deutschland) ausgestattet mit einer Hamamatsu C4742-95 Kamera (Hamamatsu, Hersching, Deutschland) betrachtet. Dabei wurde die Eigenfluoreszenz der Photosysteme der Cyanobakterien ausgenutzt, so dass mit einem entsprechenden Filter die Zellen in den Großquadraten der Neubauer Zählkammer sichtbar gemacht werden konnten. Da sich die Zellen auch in der Zählkammer noch bewegen können wurden mit der Kamera jeweils ein Bild mit Fluoreszenzfilter und ein Helllichtbild aufgenommen. Für ein einfacheres Auszählen der Großquadrate wurden die Bilder anschließend mit Hilfe des Programms ImageJ übereinander gelegt und ausgewertet.

3.16.3 Cryopreservation von Cyanobakterien

Für die Cryopreservation der verschiedenen Cyanobakterienstämme wurden jeweils Kulturen ausgewählt die sich in der frühen bis mittleren log-Phase befindet. Unter sterilen Bedingungen wurden 50 ml der entsprechenden Kulturen abgenommen und bei 4500 Upm für 25 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 800 µl des Überstandes wieder resuspendiert, so dass sich ein Gesamtvolumen von ~1 ml ergibt. Das resuspendierte Zellpellet wurde in ein Kryoröhrchen überführt und mit DMSO (siehe Tabelle 3.3) versetzt und sofort mehrfach invertiert. Kryoröhrchen mit *Synechococcus* WH7803 oder WH8102 wurden zunächst langsam mit -1/min bei -80 °C über Nacht abgekühlt bevor sie in flüssigem Stickstoff ge-

lagert wurden. Kryoröhrchen mit Prochlorococcus NATL1A bzw. NATL2A wurden direkt nach dem Invertieren in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tabelle 3.3: Benötigte DMSO Konzentrationen für Cryopreservation Cyanobakterien

Cyanobakterien Stamm	DMSO Konzentration
Synechococcus WH7803	5%
Synechococcus WH8102	6%
Prochlorococcus NATL1A	7,5%
Prochlorococcus NATL2A	7,5%

3.16.4 Ernten und Aufschließen von Cyanobakterien

Für alle Experimente mit cyanobakteriellem Zelllysat wurden die Zellen bei einer Dichte von etwa 2×10^7 Zellen \cdot ml⁻¹ geerntet. Dazu wurde die benötigte Menge der Kultur unter der Sterilbank entnommen und bei 4500 Upm (Hettich centrifuge: Rotina 420R 4723 Rotina 4 Place Swingout rotor) für 25 min bei 20 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in dem jeweiligen Assay- Puffer resuspendiert und in ein ERG überführt. Für den Aufschluss wurde die Zellsuspension mit 50% (v/v) Glasperlen ($\varnothing=0,1$ mm) versetzt und 4 x für je 2 min bei 30 s⁻¹ in der Kugelmühle bei 4 °C geschüttelt. Zwischen den Aufschlussequenzen wurde für 1 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden das Proteinlysat von den Glasperlen und den Zelltrümmern durch Zentrifugation bei 14000 Upm (Eppendorf Zentrifuge 5418R FA-45-18-11) bei 8 °C für 20 min getrennt.

3.16.5 Bestimmung der Lysatkonzentration nach Bradford

Nach dem Aufschließen der Cyanobakterien wurde der Gesamtproteingehalt des Lysats nach Bradford bestimmt. Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau R an Proteine in saurer Lösung. Diese Bindung verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Blau R von 465 (rot-violett) nm nach 595 nm (blau). Die kommerziell erhältliche Chromophorlösung (Bradford reagent, 5x) wurde zunächst 1:5 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Zu 1 ml der Bradford Lösung wurden 95 μ l des Aufschlusspuffers und 5 μ l des Lysats gegeben. Nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm in einem Photometer bestimmt. Die Proteinkonzentration konnte dann mit Hilfe einer BSA-Kalibrationskurve berechnet werden.

3.16.6 Infektion von Cyanobakterien

Synechococcus sp. WH7803 und *Synechococcus* sp. WH8102 wurden wie in Kapitel 3.16.1 beschrieben in ASWf/2 kultiviert. Während der exponentiellen Wachstumsphase (2×10^7 Zellen \cdot ml⁻¹) wurden von einer 300 ml Kultur jeweils 20 ml abgenommen und entweder mit dem marinen Phagen Syn9 oder S-PM2 infiziert. Da die genaue Phagenkonzentration unbekannt war wurden verschiedene Volumina der Phagen zwischen 1 und 4 ml verwendet. Es wurden sofort nach der Infektion und 3,6 und 9 Stunden nach der Infektion Proben genommen. Ebenso wurden Proben von einer nichtinfizierten Kultur (2×10^7 Zellen \cdot ml⁻¹) genommen. Zu jedem Zeitpunkt wurden 200 μ l Probe für die spektroskopische Analyse entnommen.

3.17 Bioinformatische Methoden

3.17.1 Phylogenetische Analyse

Für die Alignments wurden zunächst 17 marine Viren aus der PFAM Datenbank (PF00011) (Finn, Bateman et al., 2014) ausgewählt die alle ein sHsp, bzw. eine α -Kristallin-Domäne besitzen. Ausgehend von diesen α -Kristallin-Domänen wurden weitere Sequenzen aus den Bereichen Bakterien, Cyanobakterien, Pflanzen, und Mensch ausgewählt. Für die phylogenetische Analyse wurden nur die Sequenzen der α -Kristallin-Domänen verwendet und der N- und C-terminale Bereich ignoriert. Zunächst wurde ein Alignment mit dem Program ClustalW durchgeführt (Larkin, Blackshields et al., 2007). Der Stammbaum wurde mit dem Online-Tool der phylogeny.fr Plattform berechnet (Anisimova & Gascuel, 2006, Castresana, 2000, Chevenet, Brun et al., 2006, Dereeper, Audic et al., 2010, Dereeper, Guignon et al., 2008, Edgar, 2004, Guindon & Gascuel, 2003). Dabei wurde das WAG Substitutions Model verwendet. Der Stammbaum wurde so dargestellt, dass alle Verzweigungen mit einem `branch support value` unter 60 % oder einem Bootstrap Wert von unter 90 nicht berücksichtigt wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Bioinformatische Analyse

4.1.1 Phylogenetische Untersuchung cyanobakterieller und viraler sHsps

Erst seit kurzem ist bekannt, dass sHsps nicht nur in Archaeen, Bakterien, Pilzen Pflanzen und Tieren sondern auch in Viren vorkommen (Maaroufi & Tanguay, 2013). Im Rahmen einer detaillierten Analyse wurden die vollständigen sequenzierten Genome aller Viren verschiedener biologischer Datenbanken durchsucht (Maaroufi & Tanguay, 2013). Dabei zeigte sich, dass nur marine Viren, also Cyanophagen, die die einzelligen Cyanobakterien der Gattung *Synechococcus* und *Prochlorococcus* infizieren ein potentiell sHsp auf ihrem Genom kodiert haben. Interessanterweise kodieren aber nicht alle Phagen, die diese Wirte infizieren ein kleines Hitzeschockprotein. Ebenso sind in der PFAM Datenbank zusätzlich zu den Cyanophagen mit α -Kristallin Domäne ein Pelagibacter Phage und ein Vibrio Phage gelistet.

Da der horizontale Gentransfer zwischen Cyanophagen und Cyanobakterien für bestimmte Gene der Photosynthese gut dokumentiert ist (Lindell et al., 2004, Sullivan et al., 2006), scheint es wahrscheinlich, dass auch die sHsps ihren Weg in das Genom der Cyanophagen auf diese Weise gefunden haben. Um die verwandtschaftlichen Verhältnisse der sHsps von Cyanophagen und Cyanobakterien zu bestimmen sollte ein phylogenetischer Stammbaum berechnet werden. Für den Stammbaum wurden alle 35 in der PFAM Datenbank (PF00011) vorhandenen Viren mit einer α -Kristallin Domäne und damit mit einem potentiellen sHsp ausgewählt. Ebenfalls wurden 19 Cyanobakterienstämme, 2 Archaeen, 2 Pilze, 5 Tiere, 8 Pflanzen und weitere 10 Bakterien mit sHsps ausgewählt. Bereits bekannte phylogenetische Analysen haben gezeigt, dass die viralen sHsps näher mit bakteriellen sHsps wie IbpA aus *Pelagibacter ubique* oder IbpA aus *E. coli* (Zhao, Temperton et al., 2013) verwandt sind als mit sHsps aus Cyanobakterien (Maaroufi & Tanguay, 2013). Da in den letzten Jahren eine Vielzahl an vorher unbekanntem Cyanophagen sequenziert wurde, sollen die α -Kristallin Domänen der 35 *Synechococcus* und *Prochlorococcus* Phagen durch phylogenetische Analyse verglichen werden um zu untersuchen ob das vorgeschlagene evolutionäre Konzept noch korrekt ist (Finn et al., 2014).

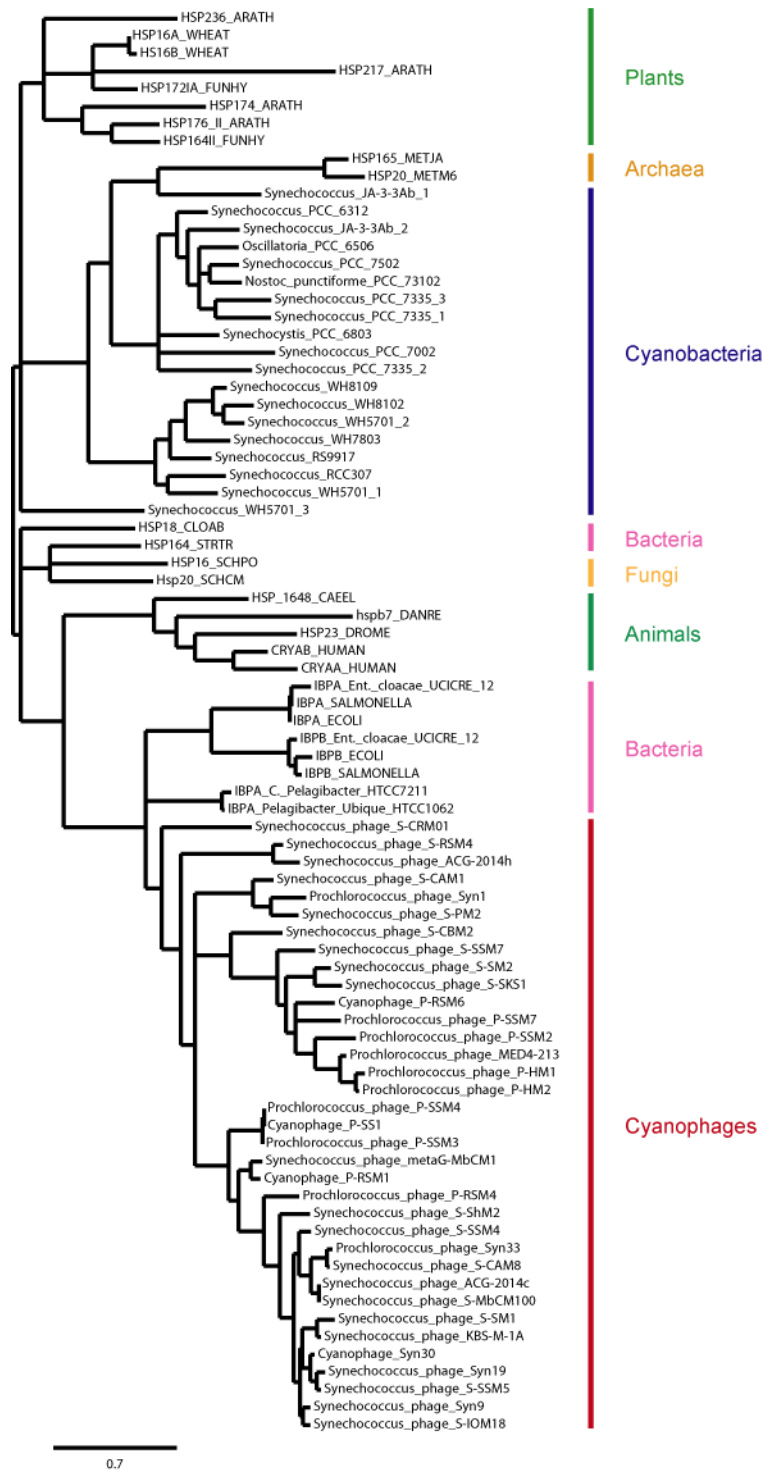


Abbildung 8: Phylogenetische Verwandtschaft von Cyanophagen und Cyanobakterien erhalten durch die maximale Wahrscheinlichkeit. Für die phylogenetische Analyse wurde ausschließlich die α -Kristallin Domäne der einzelnen Sequenzen verwendet. Das WAG Substitutionsmodell und die statistische Wahrscheinlichkeit der Knoten wurde von der phylogeny.fr Plattform berechnet (Anisimova & Gascuel, 2006, Castresana, 2000, Chevenet et al., 2006, Dereeper et al., 2010, Dereeper et al., 2008, Edgar, 2004, Guindon & Gascuel, 2003). Um die Verwandtschaftsverhältnisse besser darstellen zu können wurden alle Äste mit einem BSV unter 60% oder einem Bootstrap Wert von unter 90 nicht berücksichtigt.

Aus dem Stammbaum kann man zunächst deutlich eine Teilung in zwei Gruppen erkennen. Cyanobakterien, Archaeen und Pflanzen bilden eine Gruppe und Cyanophagen, Bakterien, Tiere und Pilze eine zweite Gruppe. Ebenso kann man die bereits erwähnte nähere Verwandtschaft der sHsps aus Cyanophagen mit den bakteriellen sHsps als zu den cyanobakteriellen sHsps erkennen. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Cyanophagen das sHsp Gen von einem Vorfahren der Bakterien über lateralen Gentransfer erhalten haben. Zusätzlich sollte beachtet werden, dass für den Stammbaum kein *Prochlorococcus* Stamm als Vertreter der Cyanobakterien ausgewählt werden konnte. Dies liegt daran, dass Cyanobakterien der Gattung *Prochlorococcus* keine sHsps auf ihrem Genom kodiert haben. Auch diese Beobachtung spricht gegen einen horizontalen Gentransfer, da auch Cyanophagen die *Prochlorococcus* Stämme infizieren ein sHsp auf ihrem Genom kodiert haben.

Zusätzlich dazu kann man bei den cyanobakteriellen sHsps eine relativ nahe Verwandtschaft mit den sHsps aus Pflanzen ablesen. Da die Cyanobakterien zu den ältesten Organismen der Erde zählen, lässt dies die Vermutung zu, dass die Pflanzen das sHsps Gen von cyanobakteriellen Endosymbionten erhalten haben, aus welchen später der Chloroplast hervorgegangen ist (Maaroufi & Tanguay, 2013).

4.1.2 Charakterisierung des IXI Motivs

In dem Alignment der kompletten Proteinsequenzen der analysierten sHsps aus dem Stammbaum kann man sehen, dass sich die Cyanobakterien von den Cyanophagen zusätzlich in ihrem IXI/V Motiv deutlich unterscheiden. Fast alle Cyanophagen besitzen ein konserviertes Tyrosin (Y) an der ersten Position des YXI Motivs gefolgt von einer nicht hydrophoben Aminosäure. Nicht bei allen Sequenzen ist die letzte Position noch mit einer Aminosäure besetzt, aber meist ist hier ein Isoleucin zu finden. Im Gegensatz dazu haben die Cyanobakterien ein V/I-X-V/I/L Motiv, wobei an der ersten Stelle ein Valin oder ein Isoleucin und an der letzten Stelle ein Valin, Isoleucin oder Leucin zu finden ist. Dabei ist sowohl an erster als auch an letzter Stelle Valin die häufigste Aminosäure. Beide Motive allignieren gut mit den bekannten klassischen IXI Motiven von *E. coli* oder *C. elegans* ausrichten.

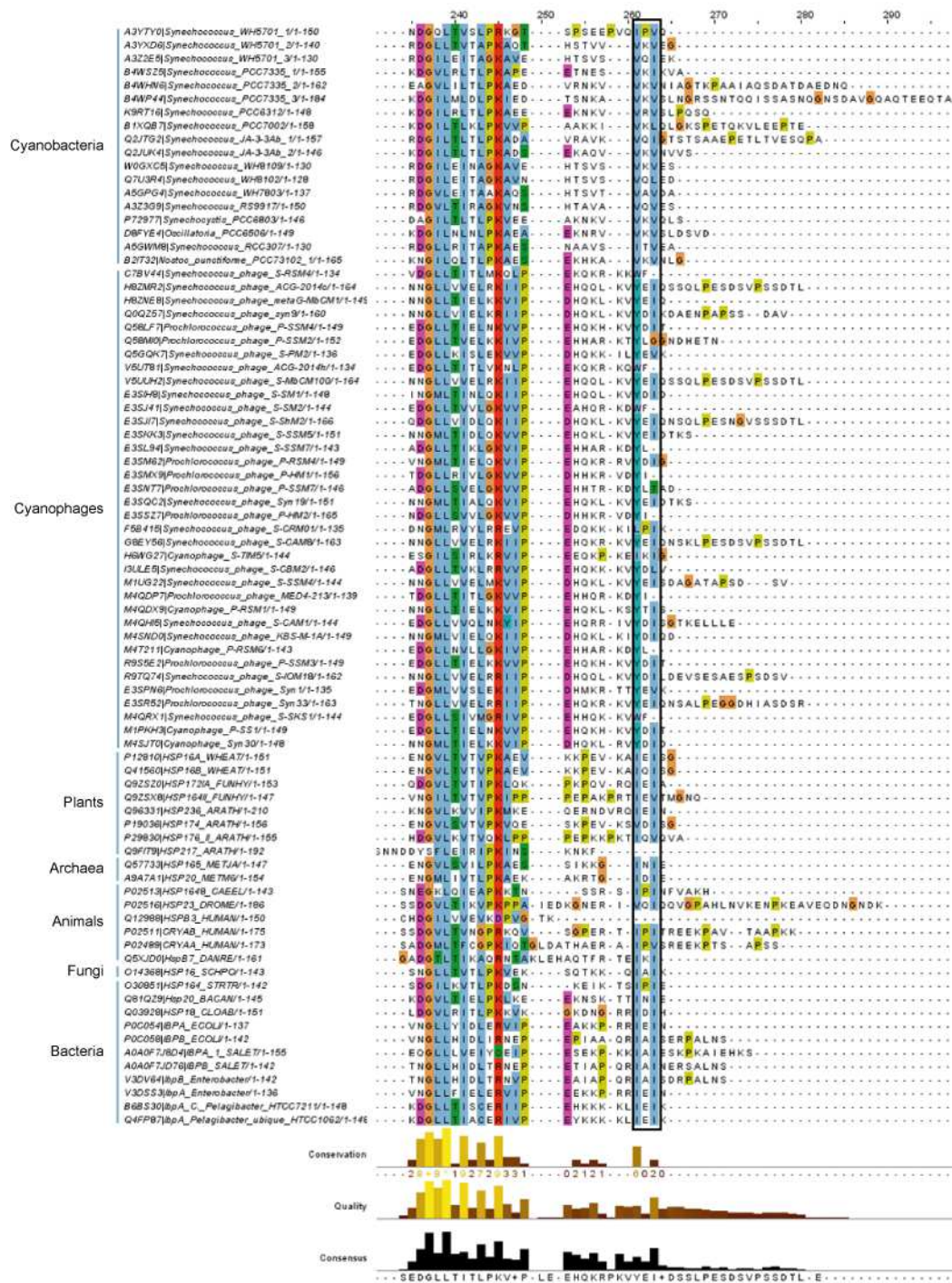


Abbildung 9: Alignment der vollständigen sHsp Sequenzen. Das Alignment zeigt nur den letzten Teil der α -Kristallin Domäne und das IXI/V Motiv (schwarzer Kasten) aller für den Stammbaum analysierten sHsps. In Cyanophagen ist die erste der beiden hydrophoben Aminosäuren des IXI/V Motivs meist ein Tyrosin wohingegen in Cyanobakterien meist beide hydrophoben Aminosäuren Valin entsprechen. Das Alignment wurde mit Clustal W erstellt und mit Jalview bearbeitet.

4.2 Untersuchung der charakteristischen Struktureigenschaften von sHsps

Als Kriterium für die Zuordnung zur Familie der sHsps wird von Sequenz-basierten Datenbanken wie PFAM ausschließlich das Vorhandensein der konservierten α -Kristallin Domäne verwendet. Für eine eindeutige, funktionelle Zuordnung der Proteine sollten allerdings andere Merkmale zusätzlich geprüft werden. Diese ist insbesondere im Rahmen der neueren Datenbank-Updates zu beachten anhand derer auch die Hsp20 Domänen der p23 Homologen derselben Hsp20-Familie zugeordnet werden wie sHsps. Daher wurden die drei viralen sHsps Syn9-Hsp20, S-PM2-Hsp20 und P-SSM4-Hsp20 und die beiden cyanobakteriellen sHsps Sc7803-Hsp20 und Sc8102-Hsp20 der zugehörigen Wirtsbakterien zunächst hinsichtlich der charakteristischen strukturellen Eigenschaften von sHsps untersucht.

4.2.1 Analyse der Sekundärstruktur

Um zu untersuchen, ob die cyanobakteriellen und viralen sHsps ähnliche strukturelle Eigenschaften aufweisen wurden zunächst alle Proteine mittels Fern-UV CD-Spektroskopie analysiert (Abbildung 10). Alle Spektren weisen ein Hauptminimum bei etwa 210 nm auf, was typisch für Proteine mit einem großen Anteil an β -Faltblättern ist. Da die Spektren ebenfalls darauf schließen lassen, dass alle fünf Proteine in gefaltetem Zustand vorliegen, wurde mittels des Programms CDNN die jeweiligen Sekundärstrukturanteile ermittelt.

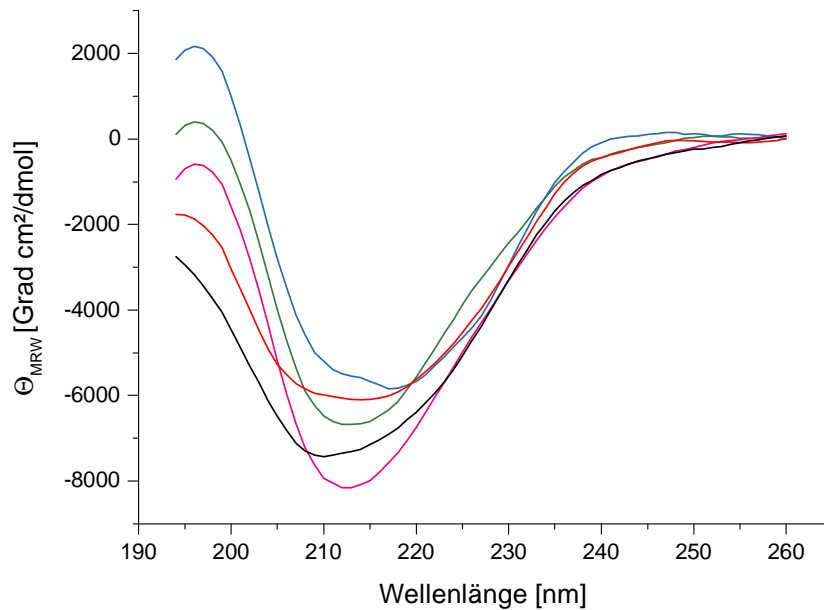


Abbildung 10: Sekundärstrukturanalyse der cyanobakteriellen und viralen sHsps. Fern-UV CD Spektren der drei viralen sHsps Syn9-Hsp20 (grün), S-PM2-Hsp20 (blau), P-SSM4-Hsp20 (pink) und der beiden cyanobakteriellen sHsps Sc7803-Hsp20 (schwarz) und Sc8102-Hsp20 (rot). Die Spektren der nativen Proteine wurden bei einer Konzentration von 0,2 mg/ml und in dem entsprechenden Lagerpuffer bei 20°C aufgenommen. Es wurden jeweils 10 Spektren akkumuliert.

Die berechneten Anteile sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst und ergeben eine Verteilung die typisch für kleine Hitzeschockproteine ist. So macht bei allen fünf Proteinen das β -Faltblatt den größten Strukturanteil aus, wobei sowohl Syn9-Hsp20 als auch Sc8102-Hsp20 mit fast 40% den größten Anteil an β -Faltblatt Struktur haben. Gleichzeitig enthalten alle untersuchten sHsps außer S-PM2-Hsp20 einen sehr geringen Anteil von unter 10% an α -Helix. Auch S-PM2-Hsp20 liegt mit 13% nur geringfügig darüber. Insgesamt ergibt sich aus diesen Daten eine Sekundärstruktur die gut mit der anderer sHsps aus unterschiedlichen Organismen übereinstimmt (Haslbeck, 2006, Kim et al., 1998, van Montfort et al., 2001).

Tabelle 4.1: Sekundärstrukturanteile der cyanobakteriellen und viralen sHsps, berechnet aus den aufgenommenen CD Spektren aus Abbildung mit dem Programm CDNN.

	Syn9- Hsp20	S-PM2- Hsp20	P-SSM4- Hsp20	Sc7803- Hsp20	Sc8102- Hsp20
α -Helix	7,1%	13%	9,9%	8,6%	7,1%
β -Faltblatt	39,1%	33,6%	34,6%	35,7%	39,2%
β -Turn	19,9%	19%	19,2%	21%	19,8%
Zufallsknäuel	35,2%	34,7%	34,8%	35,5%	35,2%

4.2.2 Analyse der Quartärstruktur

Eine der auffälligsten Struktureigenschaften von sHsps ist ihre Organisation in großen oligomeren Strukturen, die aus bis zu 50 Untereinheiten aufgebaut sein können (Haslbeck, 2002). Um das Oligomerisierungsverhalten der drei viralen sHsps Syn9-Hsp20, S-PM2-Hsp20 und P-SSM4-Hsp20 und der beiden cyanobakteriellen sHsps Sc7803-Hsp20 und Sc8102-Hsp20 zu untersuchen wurden analytische Größenausschlußchromatographieexperimente durchgeführt. Für einige sHsps wurde gezeigt, dass zur Aktivierung eine Änderung des Oligomerisierungszustandes notwendig ist und das Gleichgewicht von der großen Oligomeren Spezies zu einer deutlich kleineren oft Dimeren Spezies verlagert wird. Oft kann diese Aktivierung bzw. Dissoziation durch eine Erhöhung der Temperatur erreicht werden (Haslbeck et al., 2015). Daher wurde die Größenausschlußchromatographie bei 25°C, 37°C und 45°C auf temperierten Chromatographiesäulen durchgeführt. Hier konnte zunächst nur bei Syn9-Hsp20 eine Dissoziation des Oligomers bei 37 bzw. 45°C festgestellt werden. Um auszuschließen, dass die sHsps nur zu kurz der jeweiligen Temperatur ausgesetzt waren um zu dissoziieren wurden in einem nächsten Versuchsaufbau die sHsps vor der Chromatographie für 45 min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Die Chromatographie selbst fand dann allerdings immer bei 25°C statt. Interessanterweise führte dieser Versuchsaufbau dazu, dass keines der sHsps eine Dissoziation bei erhöhten Temperaturen zeigte. Dies zeigt, dass es sich um ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den oligomeren Spezies handelt, und dass sich dieses Gleichgewicht schnell wieder wie bei Syn9-Hsp20 in die Richtung der großen oligomeren Spezies verschieben kann, sobald sich die Temperatur wieder verringert. In einem letzten Versuchsaufbau wurden die sHsps also sowohl für 45 min bei der entsprechenden Temperatur inkubiert als auch die Säule während der Chromatographie erhitzt.

In Abbildung 11 wird deutlich, dass auch in diesem Versuchsaufbau nur Syn9-Hsp20 eine deutliche Verlagerung des Gleichgewichts zu einer kleineren Spezies (vermutlich dem Dimer) aufweist. Bei 37°C ist diese Verschiebung nur als kleine Schulter zu erkennen, aber bei 45°C ist der Peak bei etwa 19,8 min deutlich sichtbar. Diese Dissoziation bei erhöhten Temperaturen deutet auf eine temperaturregulierte Aktivität dieses sHsps hin.

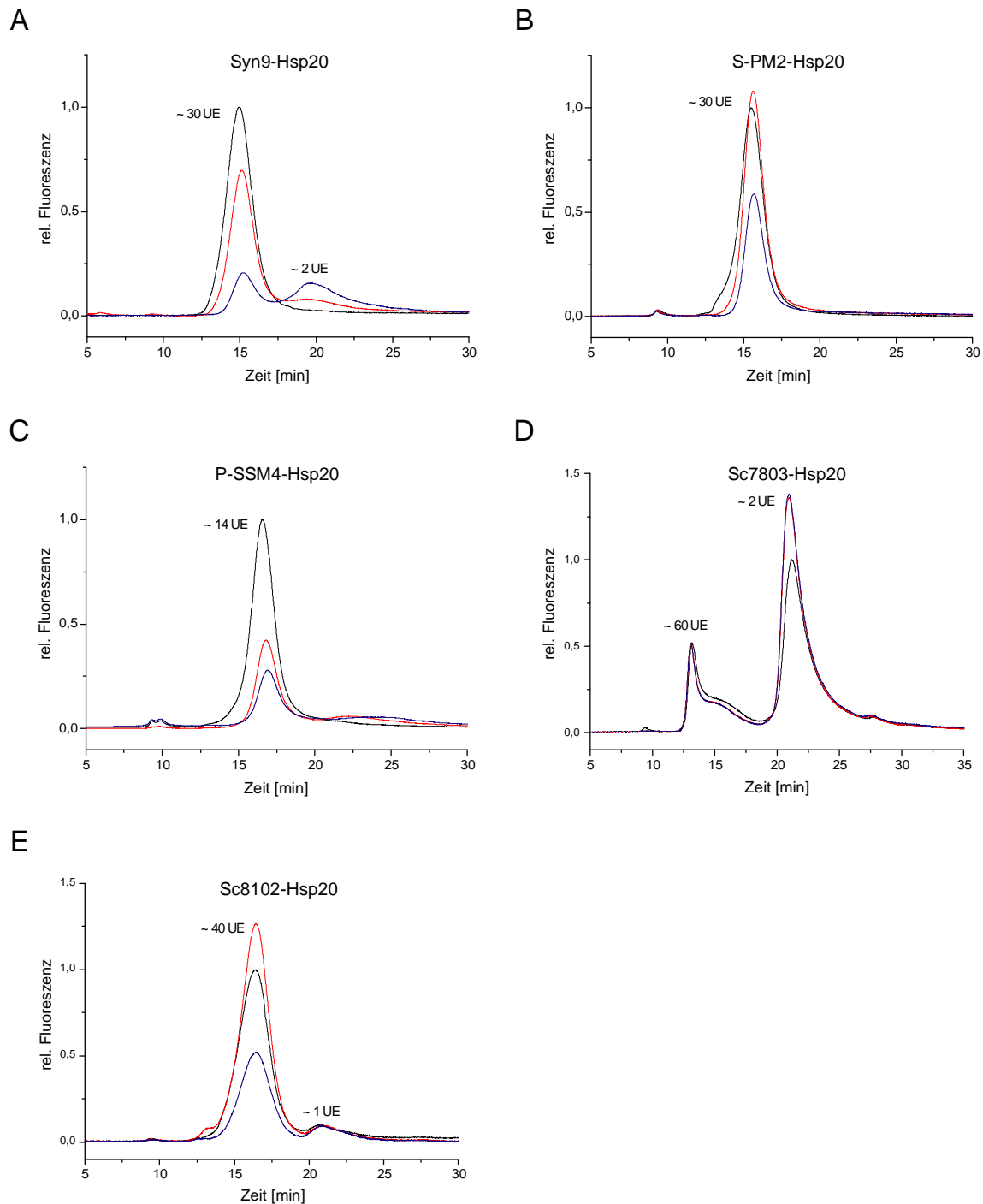


Abbildung 11: Temperaturabhängige Quartärstrukturanalyse der cyanobakteriellen und viralen sHsps. Die Quartärstruktur von (A) Syn9-Hsp20, (B) S-PM2-Hsp20, (C) P-SSM4-Hsp20, (D) Sc7803-Hsp20 und (E) Sc8102-Hsp20 wurde durch Größenausschlusschromatographie mit Hilfe einer TSK 4000 PW Säule analysiert. Alle sHsps wurden vor der Messung für 45 min bei 25°C (schwarz), 37°C (rot) oder 45°C (blau) inkubiert und auch die Säule selbst wurde auf die entsprechende Temperatur erhitzt. Als Laufpuffer wurde der jeweilige Lagerpuffer des Proteins verwendet. Die Kalibrierung der Säule erfolgte durch Standardproteine, so dass die einzelnen Peaks entsprechenden Komplexgrößen zugeordnet werden konnten. Die Anzahl der Untereinheiten ist neben den Peaks in den Spektren angegeben.

Wenn man nur die Spektren bei 25°C betrachtet zeigt sich, dass die drei viralen sHsps in nur einem einzelnen Peak eluieren, der jeweils einer molekularen Masse von 615 kDa für Syn9-Hsp20, 450 kDa für S-PM2 und 240 kDa für P-SSM4-Hsp20 zugeordnet werden können. Auch das cyanobakterielle sHsp Sc8102-Hsp20 zeigt nur einen prominenten Peak mit einer ähnlichen molekularen Masse wie die ersten beiden von 590 kDa. Im Gegensatz dazu werden für Sc7803-Hsp20 zwei prominente Peaks die jeweils einer molekularen Masse von 960 kDa bzw. 32 kDa zugeordnet werden können beobachtet. Insgesamt kann man sagen, dass sowohl die viralen als auch die cyanobakteriellen sHsps große oligomere Komplexe bilden, die 30 oder mehr als 40 Untereinheiten beinhalten. Im Fall von P-SSM4-Hsp20 besteht der größte Komplex allerdings nur aus etwa 14 Untereinheiten.

All diese oligomeren Zustände sind ähnlich zu denen die man auch für andere sHsps wie Hsp17 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Giese, Basha et al., 2005, Giese & Vierling, 2002), α -Kristallin (Dudich, Zav'yalov et al., 1995, Peschek, Braun et al., 2009) und Hsp27 aus dem Menschen (Shashidharamurthy, Koteiche et al., 2005), Hsp18 aus der Erbse (Basha et al., 2004b) und Hsp26 aus Hefe (Haslbeck, Walke et al., 1999, White, Orlova et al., 2006) beobachten kann. Auch der zweite prominente Peak aus dem cyanobakteriellen sHsps Sc7803-Hsp20 der einem Dimer zugeordnet werden kann wird ähnlich wie von Hsp17.7 aus *D. radiodurans* gebildet (Bepperling et al., 2012).

4.2.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung der sHsps

Um eine Abschätzung der Partikelgrößen durchführen zu können wurden die viralen und cyanobakteriellen sHsps mittels Transelektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Für die TEM-Aufnahmen wurden die Proteine mit dem entsprechenden Lagerpuffer 1:10 auf Konzentrationen zwischen 0,04 mg/ml (Sc7803-Hsp20) und 0,08 mg/ml (Syn9-Hsp20) verdünnt (siehe Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Zur Sichtbarmachung wurde eine Negativkontrastierung mit Uranylacetat verwendet. Die Aufnahme aller TEM-Bilder erfolgte bei einer Vergrößerung von 33000.

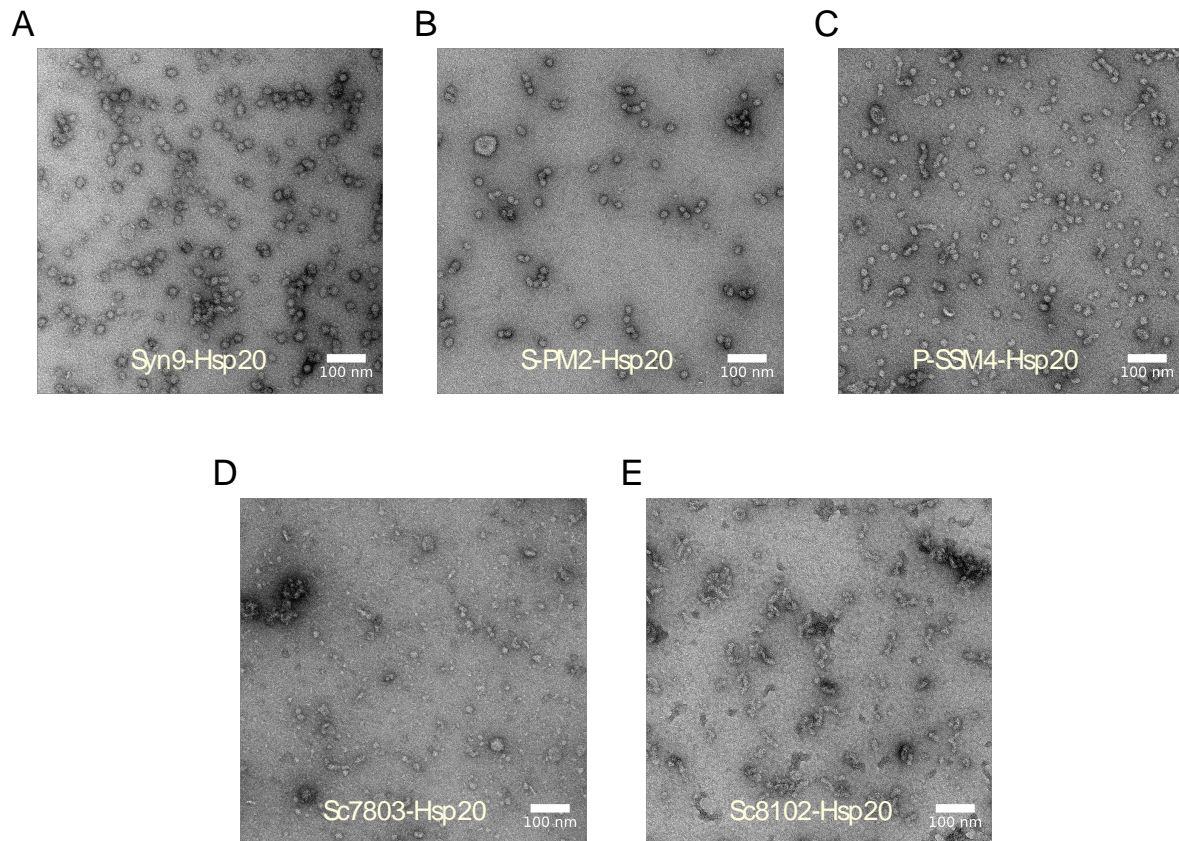


Abbildung 12: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der viralen und cyanobakteriellen sHsps. Es sind repräsentative Probenausschnitte von Proben der Verdünnungsstufe 1 zu 10 der viralen (Syn9-Hsp20, S-PM2-Hsp20, P-SSM4-Hsp20) und cyanobakteriellen (Sc7803-Hsp20 und Sc8102-Hsp20) dargestellt. Während die viralen sHsps relativ homogene globuläre Strukturen ausbilden, wirken die cyanobakteriellen Orthologen generell kleiner und bezüglich ihrer Oligomermorphologie und Größe heterogener. Sie bilden deutlich häufiger Ketten aus Oligomeren oder elongierte Partikelstrukturen aus.

Aus Abbildung 12 geht hervor, dass die drei viralen sHsps Syn9-Hsp20, S-PM2-Hsp20 und P-SSM4-Hsp20 relativ homogene globuläre Strukturen im Vergleich zu den cyanobakteriellen sHsps ausbilden. Diese zeigen sich bezüglich ihrer Oligomerenmorphologie und der Größe heterogener. Ebenso lassen sich hier Ketten aus Oligomeren oder elongierten Partikelstrukturen erkennen, was vor allem bei Sc8102-Hsp20 deutlich wird (Abbildung 12 E).

Ein Vergleich der abgeschätzten Partikelgrößen mit den Ergebnissen der Größenausschleuschromatographie weist darauf hin, dass bei den drei viralen sHsps die Größen relativ gut in Einklang zu bringen sind, auch wenn für eine genaue Bestimmung der Partikelgrößen noch mehr Partikel aufgenommen werden müssten. Bei den cyanobakteriellen sHsps zeigen sich bei Sc7803-Hsp20 hauptsächlich sehr kleine Partikel, auch wenn die SEC zwei Hauptpeaks ergeben hat, die 60 bzw. 2 Untereinheiten zuzuordnen waren. Dies kann an dem verwendeten Puffer mit einem pH von 8,0 statt 8,5 liegen, da sich erst später herausgestellt hat, dass dieses sHsp empfindlich auf pH Änderungen reagiert.

4.2.4 Temperaturstabilität der viralen und cyanobakteriellen sHsps

Um herauszufinden bis zu welchen Temperaturen die viralen und cyanobakteriellen sHsps stabil sind wurde ein *Thermal Shift Assay* durchgeführt. Bei diesem Assay wird mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Sypro Orange die Änderung der Hydrophobizität verfolgt und somit eine Schmelzkurve des Proteins aufgenommen. Daraus lässt sich bestimmen bei welchen Temperaturen ein Protein anfängt zu entfalten.

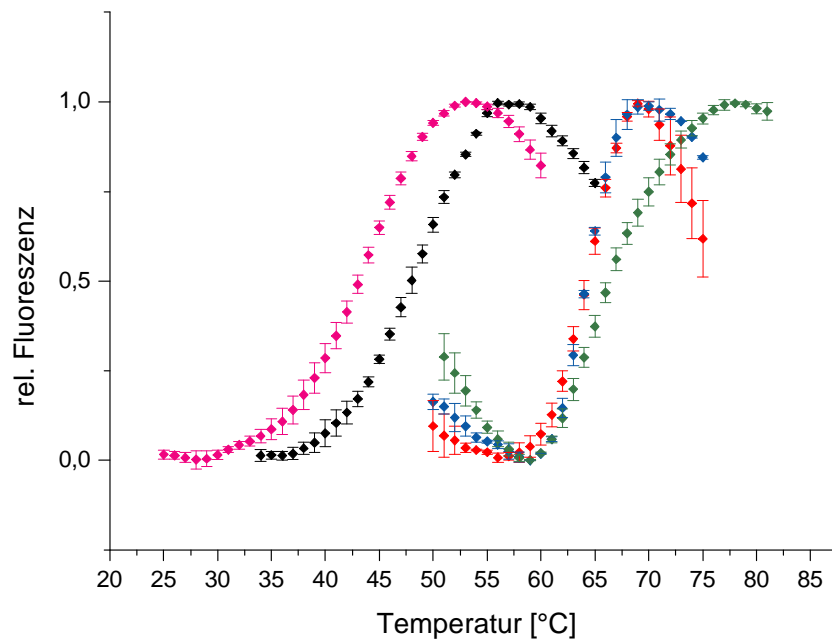


Abbildung 13: *Thermal Shift Assay* der cyanobakteriellen und viralen sHsps. Schmelzkurven von jeweils 0,3 mg/ml von Syn9-Hsp20 (grün), S-PM2-Hsp20 (blau), P-SSM4-Hsp20 (pink), Sc7803-Hsp20 (schwarz) und Sc8102-Hsp20 (rot) gemessen von 25°C bis 80°C in den entsprechenden Lagerpuffern. Das Fluoreszenzsignal wurde durch Sypro-Orange als Fluoreszenz-Farbstoff aufgezeichnet. Die berechneten Schmelztemperaturen T_m sind 68,5°C für Syn9-Hsp20, 64,5°C für S-PM2-Hsp20, 44°C für P-SSM4-Hsp20, 50°C für Sc7803-Hsp20 und 62,5°C für Sc8102-Hsp20. Alle T_m -Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

Die beiden viralen sHsps Syn9-Hsp20, S-PM2-Hsp20 und das cyanobakterielle sHsp Sc8102-Hsp20 zeigen relativ ähnliche Schmelzkurven mit hohen Schmelzbereichen zwischen 62°C und 69°C. Diese hohe Temperaturstabilität lässt sich auch bei anderen sHsps, wie α -Kristallin oder Hsp22 finden (Kazakov, Markov et al., 2009, Santini, Mordente et al., 1992). Kleine Hitzeschockproteine werden während Stresssituationen wie erhöhten Temperaturen exprimiert, um ihre Substrate vor Aggregation zu schützen. Auch in den hier durchgeführten Chaperonassays wird untersucht, ob die viralen und cyanobakteriellen sHsps in der Lage sind die Aggregation eines Modells substrates bei Temperaturen über

43°C zu unterdrücken. Dafür ist eine Schmelztemperatur der sHsps selbst von über 60°C mehr als ausreichend.

Für die beiden anderen sHsps Sc7803-Hsp20 und P-SSM4-Hsp20 ergibt sich aus dem Thermal Shift Assay eine deutlich niedrigere Schmelztemperatur von 50 bzw. 44°C. Die hier verwendete Methode zur Bestimmung der thermischen Entfaltung mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes ist allerdings nicht für alle Proteine gleich gut geeignet. Gerade bei kleinen Hitzeschockproteinen kann es zu unerwünschten Einflüssen auf Grund des dynamischen Oligomerisierungszustandes und der damit einhergehenden Freisetzung von hydrophoben Oberflächen kommen.

Daher sollte im Folgenden die thermische Entfaltung der sHsps zusätzlich ohne die Zugabe eines Farbstoffes mit Hilfe von CD-Spektroskopie bestimmt.

4.2.5 Analyse der thermischen Proteinentfaltung mittels CD-Spektroskopie

Für die Bestimmung des thermischen Übergangs der viralen und cyanobakteriellen sHsps wurden von allen Proteinen Fern-UV CD-Spektren in 1°C Schritten von 10 bis 90°C aufgenommen. Nur für das cyanobakterielle sHsp Sc7803-Hsp20 konnte mit dieser Methode eine vollständige Entfaltung des Proteins und durch Abkühlen der Probe auch wieder eine Rückfaltung erreicht werden (Abbildung 14 A und B). Die Fern-UV CD-Spektren die vor dem Erhitzen auf 90°C und nach dem Abkühlen bei 20°C aufgenommen wurden sind bis auf einen geringen Signalverlust nahezu identisch. Das Spektrum bei 90°C zeigt eindeutig, dass das Protein vollständig entfaltet vorlag. Daher fand durch das Abkühlen der Probe von 90°C auf 10°C eine Rückfaltung des Proteins in den nativen Zustand statt. Durch den Boltzmann Fit ergeben sich für die Entfaltung und die Rückfaltung leicht unterschiedliche Schmelztemperaturen von $T_m 48,1 \pm 1,0^\circ\text{C}$ bzw. $54,1 \pm 0,4^\circ\text{C}$. Die mit dieser Methode ermittelte Schmelztemperatur für Sc7803-Hsp20 weicht nur um 2°C von der ermittelten Schmelztemperatur mittels TSA ab. Für dieses sHsp scheinen somit beide Methoden für eine Bestimmung der thermischen Entfaltung geeignet zu sein.

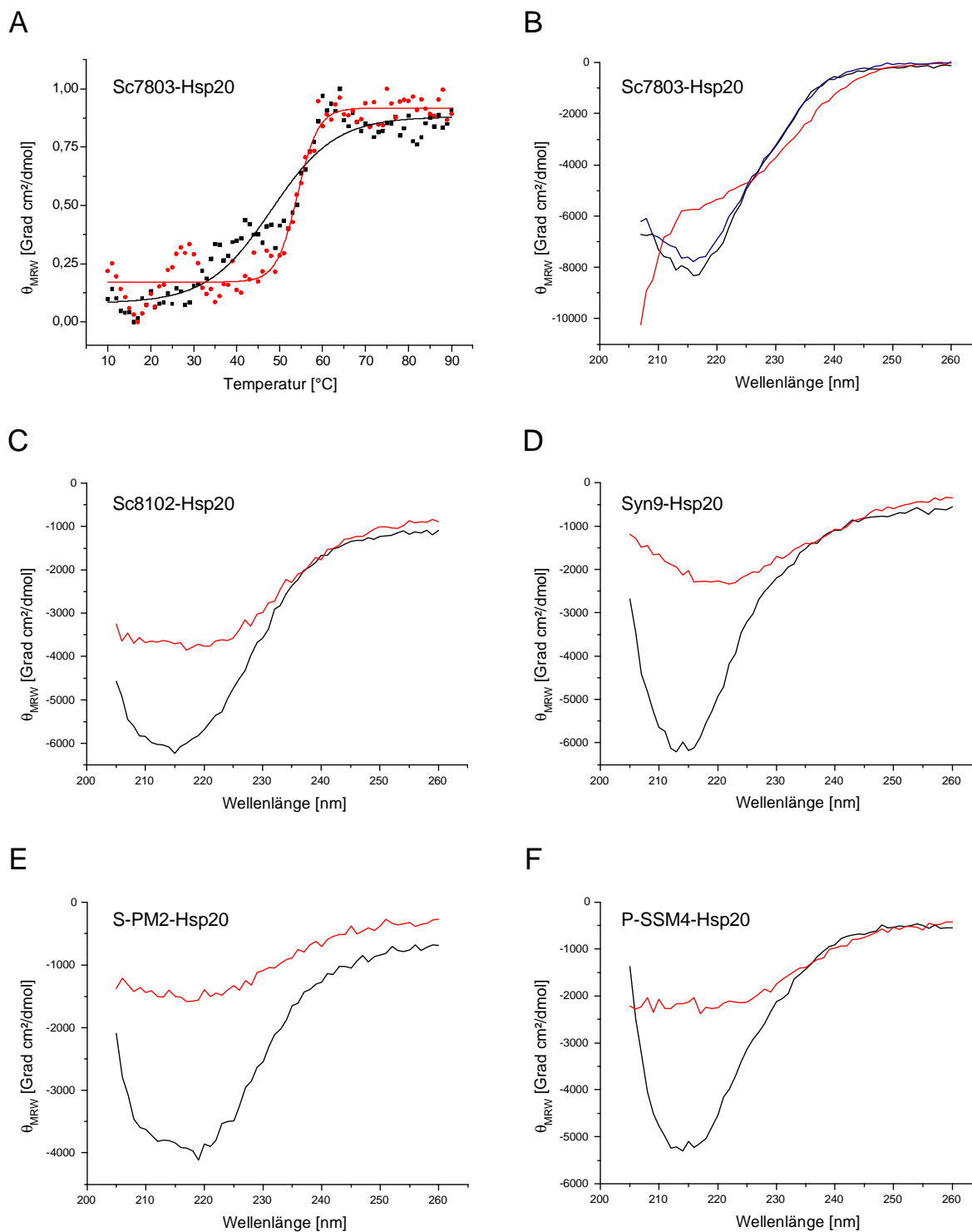


Abbildung 14: Analyse der thermischen Proteinentfaltung mittels CD-Spektroskopie. (A) Thermische Denaturierung (schwarz) und Renaturierung (rot) von Sc7803-Hsp20 analysiert mittels CD-Spektroskopie. Die Änderungen in der Elliptizität bei 215 nm wurden in 1°C Schritten aufgezeichnet. Die Proben wurden bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml in einer 0,5 mm Quarzküvette gemessen. Sowohl die Heizphase als auch die Abkühlphase wurden mit Hilfe des Boltzman Modells gefittet und ergaben einen T_m von $48,1 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ bzw. $54,1 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$. (B) Zugehörige CD-Spektren des thermischen Übergangs von Sc7803-Hsp20 bei 20°C vor dem Erhitzen (schwarz), bei 90°C (rot) und bei 20°C nach dem Erhitzen. (C)-(F) CD-Spektren des cyanobakteriellen sHsps Sc8102-Hsp20 und der viralen sHsps Syn9-Hsp20, S-PM2-Hsp20 und P-SSM4-Hsp20 bei 20°C (schwarz), bei 90°C (rot).

Für das zweite hier untersuchte cyanobakterielle sHsp Sc8102-Hsp20 und die drei viralen sHsps konnte mit Hilfe von CD-Spektroskopie keine Schmelztemperatur ermittelt werden. Wie auch für Sc7803-Hsp20 wurden im Schritten von 1°C zwischen 10 und 90°C Fern-UV CD-Spektren aufgezeichnet, allerdings fand bei diesen Proteinen auch bei 90°C keine vollständige Entfaltung der sHsps statt (Abbildung 14 C-F). Dadurch war die Veränderung der Elliptizität bei 215 nm nicht Aussagekräftig genug für eine thermische Entfaltung und das Boltzmann Modell konnte als Fit Funktion nicht angewandt werden. Die Spektren bei 90°C zeigen zwar kein vollständig gefaltetes Protein, allerdings hat das Erhitzen bei diesen zur Aggregation innerhalb der Küvette geführt, so dass es auch nach dem Abkühlen zu keinerlei Rückfaltung kam.

Insgesamt hat diese Methode die ermittelte Schmelztemperatur von Sc7803-Hsp20 von etwa 48-50°C bestätigt und gezeigt, dass Rückfaltung durch Abkühlen möglich ist. Dies ist für sHsps sehr ungewöhnlich und konnte bis jetzt auch für die beiden anderen untersuchten cyanobakteriellen sHsps Hsp17 aus *Synechocystis* und HspA aus *S. vulcanus* nicht gezeigt werden. Für die anderen vier hier untersuchten Proteine war durch CD-Spektroskopie keine Schmelztemperatur zu ermitteln, da sie bei zu hohen Temperaturen Aggregate gebildet haben.

4.3 Untersuchung der Chaperonaktivität

Um zu untersuchen ob es sich bei den viralen und cyanobakteriellen sHsps um Proteine mit Chaperonaktivität handelt, wie es bereits für viele andere sHsps gezeigt wurde, wurden die Proteine zusätzlich zur Strukturanalyse hinsichtlich ihrer Chaperonaktivität untersucht. Dazu wurde Citratsynthase als Modellsubstrat verwendet.

4.3.1 Unterdrückung der Aggregation von Citratsynthase

Ein charakteristisches Merkmal kleiner Hitzeschockproteine ist ihre Funktion als molekulare Chaperone. Diese sind in der Lage nicht-native Proteine zu binden und damit ihre irreversible Aggregation zu unterdrücken. Um zu untersuchen, ob die drei viralen und die beiden cyanobakteriellen sHsps eine typische Chaperonaktivität zeigen, wurde zunächst ein Entfaltungssassay wie in Kapitel 3.15.1 beschrieben mit Citratsynthase als Modellsubstrat durchgeführt. Die Citratsynthase liegt im nativen Zustand als Dimer vor und aggregiert bei Temperaturen über 40°C.

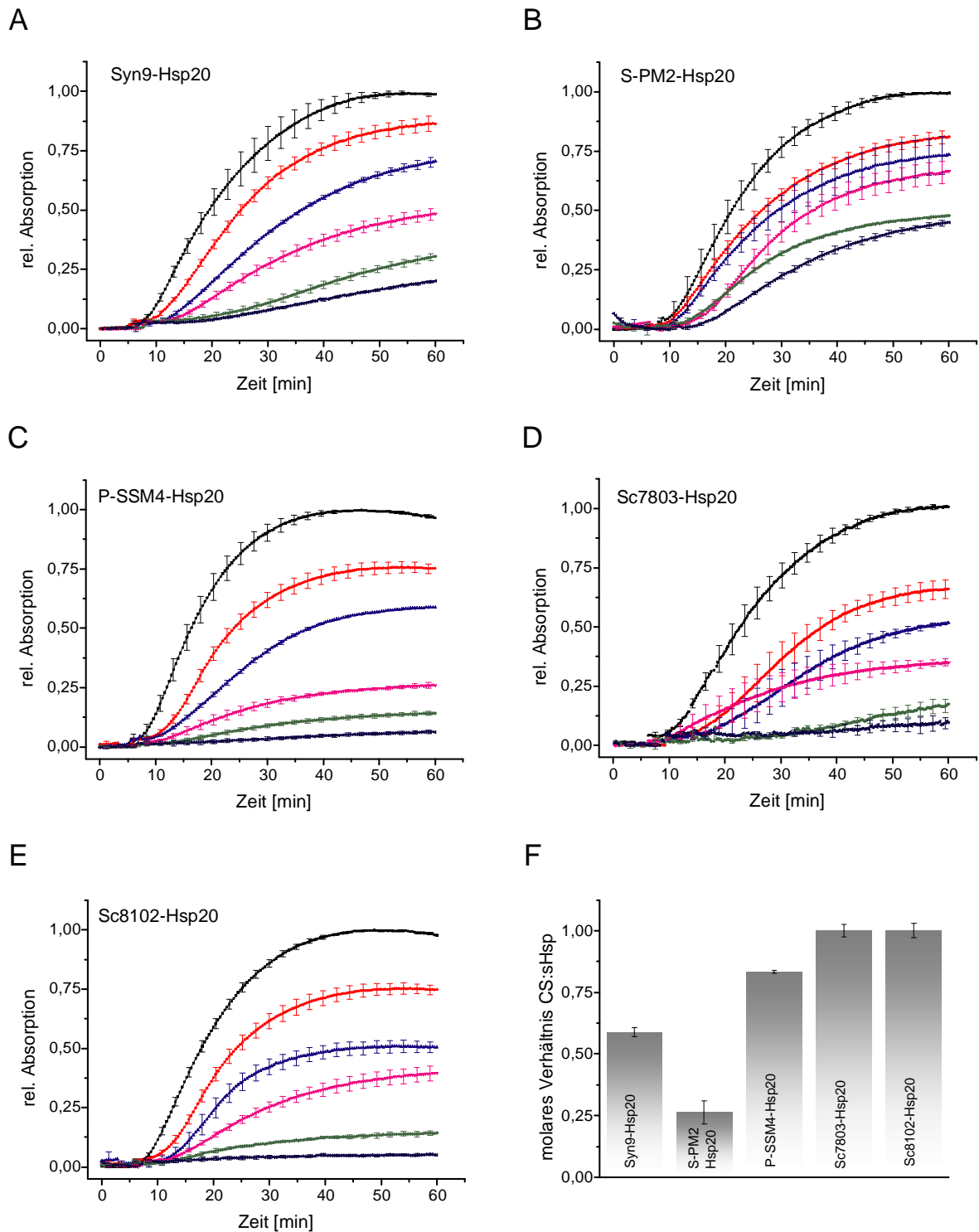


Abbildung 15: Chaperonaktivität der viralen und cyanobakteriellen sHsps hinsichtlich der Unterdrückung der thermischen Aggregation von CS. Einfluss von Syn9-Hsp20 (A), S-PM2-Hsp20 (B), P-SSM4-Hsp20 (C), Sc7803-Hsp20 (D) und Sc8102-Hsp20 (E) auf die thermische Aggregation von CS bei 43°C. Die CS wurde in einer Endkonzentration von 600 nm (Monomer) zu einer temperierten Lösung von Hsp20 in verschiedenen Konzentrationen 300 nM (rot), 600 nM (blau), 1,2 µM (pink), 2,4 µM (grün) und 4,8 µM (dunkelblau) gegeben. Die schwarze Kurve zeigt die spontane Aggregation der CS bei 43°C: Die Kinetik der Aggregation wurde durch die Messung der Lichtstreuung beim Durchgang der Proben bei 360 nm aufgenommen. (F) Vergleich der notwendigen Konzentration an Hsp20 für die halbmaximale Unterdrückung der Aggregation der CS.

Die spontane Aggregation der CS wurde durch die Messung der Lichtstreuung bei 360 nm und bei 43°C verfolgt. Der maximale Wert wurde dabei nach etwa 60 min erreicht (Abbildung 15). Bei allen fünf sHsps führte das Erhöhen des Verhältnisses von sHsps zu Substrat bis zu einem molaren Verhältnis von 8:1 (sHsp Monomer: CS Monomer) zu einer konzentrationsabhängigen Beschleunigung der Inhibierung der Aggregation von CS. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten sHsps wird bei den beiden viralen sHsps Syn9-Hsp20 und S-PM2-Hsp20 deutlich, dass auch der 8-fache Überschuss an sHsp nicht ausreichend ist um die Aggregation komplett zu unterdrücken. Der Vergleich der Chaperonaktivität zeigt, dass die beiden cyanobakteriellen sHsps bereits bei einem molaren Verhältnis von CS:sHsp von 1:1 eine halbmaximale Unterdrückung der thermischen Aggregation der CS aufweisen (Abbildung 15 F). Im Gegensatz dazu zeigen die drei viralen sHsps, insbesondere Syn9-Hsp20 und S-PM2-Hsp20 eine schwächere Chaperonaktivität. Hier führen erst CS:sHsp Verhältnisse von 0,25:1 und 0,6:1 zu einer halbmaximalen Inhibierung der Aggregation. Für das virale sHsp P-SSM4-Hsp20 ergibt sich ein Wert von 0,8:1 (Abbildung 15 F). Der Vergleich der beobachteten Verhältnisse von den viralen und cyanobakteriellen sHsps die für die halbmaximale Unterdrückung der Aggregation benötigt werden mit sHsps aus anderen Organismen zeigt, dass die Chaperonaktivitäten in einem für sHsps charakteristischem Bereich liegen (de Miguel, Braun et al., 2009). Während die beiden cyanobakteriellen sHsps die Aggregation der CS sehr wirkungsvoll inhibieren, wie das gut untersuchte menschliche Hsp27, verhalten sich die drei viralen sHsps ähnlich wie Hsp26 aus Hefe, wo das Verhältnis für die halbmaximale Unterdrückung für verschiedene Substrate zwischen 1 und 0,1 (Substrat:sHsp) schwankt (de Miguel et al., 2009, Haslbeck et al., 1999, Jakob et al., 1993).

4.3.2 Bildung eines stabilen Enzym-Substrat-Komplexes

Die Aggregation der CS wird unterdrückt, da sich ein stabiler Komplex aus sHsp und dem Substrat CS bilden kann, wodurch das denaturierende Substrat geschützt wird. Um die Existenz dieses Komplexes nachzuweisen, wurde eine Größenausschlußchromatographie durchgeführt. Dazu wurden zunächst die viralen und cyanobakteriellen sHsps in 8-fachen bzw. 16-fachen Überschuss im Fall von Sc7803-Hsp20 zu einer Lösung aus 600 nM CS gegeben die bereits auf 43°C erhitzt wurde.

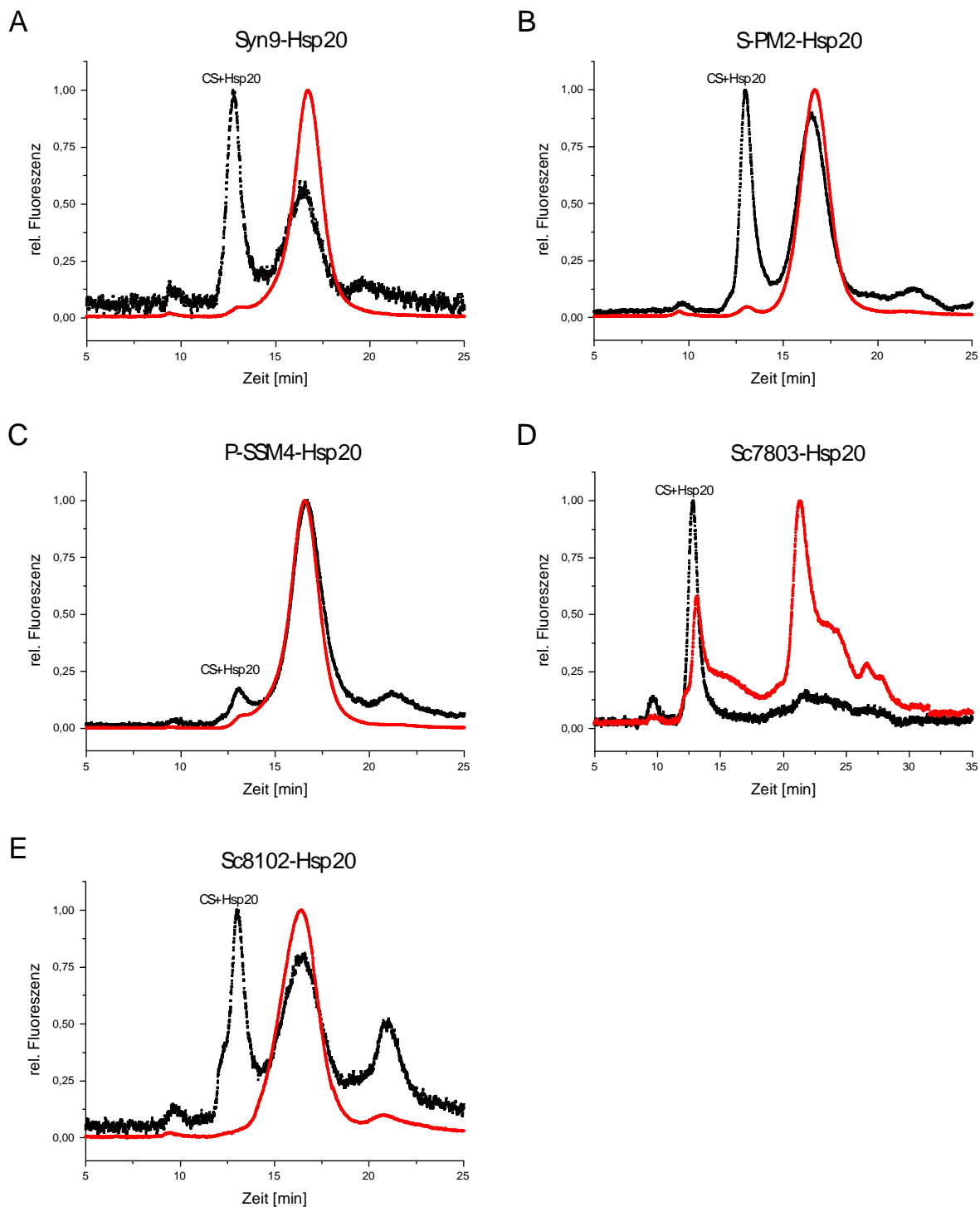


Abbildung 16: Bildung eines stabilen Enzym-Substratkomplexes aus sHsp und CS. Analyse der Komplexbildung zwischen dem Modellsubstrat CS und (A) Syn9-Hsp20, (B) S-PM2-Hsp20, (C) P-SSM4-Hsp20, (D) Sc7803-Hsp20 und (E) Sc8102-Hsp20. Dafür wurden jeweils 4,8 μM Hsp20 (9,6 μM für Sc7803-Hsp20) zusammen mit dem Substrat CS bei 43°C für 45 min inkubiert. Anschließend wurde die Mischung auf eine TSK4000 Säule aufgetragen und chromatographisch getrennt (schwarze Kurve). Als Vergleich ist das entsprechende Chromatogramm des sHsp ohne CS ebenfalls dargestellt (rot).

Ziel war hierbei die Generierung von löslichen sHsp/Substrat-Komplexen weshalb die jeweiligen sHsps im Überschuss eingesetzt wurden. Nach 45 min sollte die Komplexbildung erfolgt sein und die Mischung wurde zur Analyse auf einer TSK4000 Säule aufgetrennt. Die Säule wurde ebenfalls auf 43°C erhitzt und in dem jeweiligen Lagerpuffer des sHsps äquilibriert.

Zusätzlich zu den SEC-Läufen der Lösung aus CS und den viralen bzw. cyanobakteriellen sHsps, die vor dem Lauf für 45 min bei 43°C inkubiert wurden ist in jeder Grafik auch der Lauf des entsprechenden sHsps ohne CS dargestellt (Abbildung 16). Im direkten Vergleich der beiden Chromatogramme kann man deutlich erkennen, dass in allen fünf Fällen durch die Zugabe des Substrates CS ein zusätzlicher Peak bei etwa 13 min erscheint, der in dem Chromatogramm ohne CS nicht vorhanden ist. In Abbildung 16 ist der Peak jeweils mit CS+Hsp20 gekennzeichnet. Dieser Peak ist auf Grund seiner Retentionszeit bzw. der damit verbundenen Größe der Proteine vermutlich dem Enzym-Substratkomplex aus sHsp und CS zuzuordnen. In allen fünf Fällen ist auch zu erkennen, dass nicht alles an sHsp an CS gebunden hat, da der Peak bei etwa 16-17 min der für das jeweilige sHsp Oligomer steht auch weiterhin vorhanden ist. Bei Sc7803-Hsp20 ist dies am wenigsten deutlich, da fast alles an sHsp einen Komplex mit CS eingegangen ist und somit fast ausschließlich der Peak bei etwa 13 min sichtbar ist. Dies liegt vermutlich daran, dass hier doppelt so viel sHsp (9,6 µM) eingesetzt wurde wie bei den anderen vier sHsps (4,8 µM). Dies stimmt mit den bisherigen Ergebnissen überein, da die Aggregation der CS auch mit einem 8-fachen Überschuss (4,8 µM) von Sc7803-Hsp20 schon komplett unterdrückt werden konnte (siehe Kapitel 3.15.1).

4.3.3 Inaktivierung der Citratsynthase

Um die Chaperonaktivität der fünf sHsps noch weiter zu charakterisieren wurde ihr Einfluss auf die thermische Inaktivierung der CS analysiert. Im Vergleich zur Aggregation ist der Verlust der enzymatischen Aktivität einer der ersten Schritte im Entfaltungsprozess der Citratsynthase (Buchner et al., 1998). Einige sHsps können die frühen Entfaltungszustände transient binden und diese im Gegensatz zum vollständig entfalteten Protein ohne die Hilfe von weiteren Chaperonen oder ATP wieder aus dem Komplex entlassen (Haslbeck & Vierling, 2015). Dadurch kann die Inaktivierung der CS und anderen Modelproteinen verlangsamt werden.

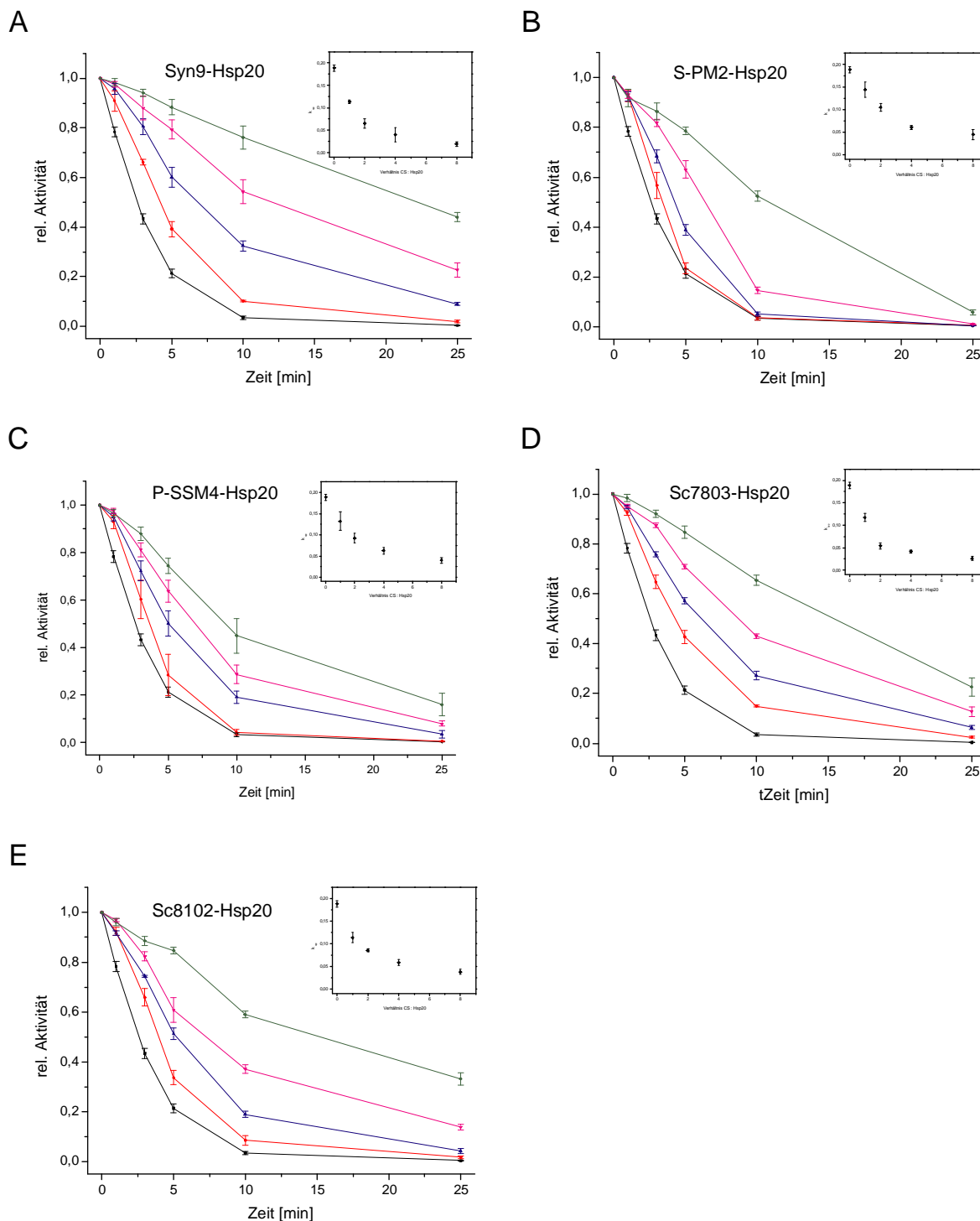


Abbildung 17: Einfluss der viralen und cyanobakteriellen sHsps auf die thermische Inaktivierung der CS. Dargestellt ist die thermische Inaktivierung der CS (600 nM Monomer) in der Abwesenheit (schwarz) und in der Anwesenheit von ansteigenden Konzentrationen an Hsp20; 600 nM (rot), 1,2 μ M (blau), 2,4 μ M (pink) und 4,8 μ M (grün). Die Inaktivierung wurde durch Inkubation der Proben bei 43°C und Messung der verbleibenden CS Aktivität zu den angegebenen Zeitpunkten verfolgt. Die Mittelwerte und die entsprechenden Fehlerbalken aus drei unabhängigen Messungen sind angegeben. In der eingesetzten Grafik ist der Einfluss der Hsp20 Konzentration auf die apparente Ratenkonstante der thermischen Inaktivierung der CS bei 43°C dargestellt.

Um herauszufinden, ob die hier untersuchten viralen und cyanobakteriellen sHsps in der Lage sind frühe Entfaltungszustände transient zu binden, wurde CS durch Inkubation bei 43°C inaktiviert, wobei zu definierten Zeitpunkten die Aktivität bestimmt wurde. Es wurde der Unterschied in der Aktivität mit und ohne die Zugabe von Hsp20 in unterschiedlichen Konzentrationen wie in Kapitel 3.15.2 beschrieben gemessen. In Abbildung 17 ist die relative Aktivität der CS über der Zeit dargestellt.

Für alle fünf Proteine kann man erkennen, dass sie die thermische Inaktivierung der CS beeinflussen (Abbildung 17). Ohne die Zugabe von Hsp20 sinkt die Aktivität der CS innerhalb der ersten fünf Minuten schnell auf 20% der ursprünglichen Aktivität ab. Anschließend sinkt die Aktivität langsam weiter bis bei zehn Minuten fast keine Aktivität mehr vorhanden ist. Durch die Zugabe von Hsp20 wird die Inaktivierungsreaktion konzentrationsabhängig verlangsamt. Dabei zeigt sich, dass für S-PM2-Hsp20 und P-SSM4-Hsp20 höhere Konzentrationen nötig sind um die Inaktivierung zu beeinflussen (Abbildung 17 B und C). Bei diesen beiden sHsps wird erst bei einer Zugabe von 1,2 μM bzw. 2,4 μM also einem 4- bzw. 8-fachen Überschuss eine Verlangsamung der Inaktivierung erreicht. Dies spiegelt sich auch in den molaren Verhältnissen wieder, die für den halbmaximalen Effekt benötigt werden. Für die beiden viralen sHsps S-PM2-Hsp20 und P-SSM4-Hsp20 ergibt sich ein molares Verhältnis von $\sim 1:2$ (CS:sHsp), wohingegen die anderen drei sHsps bereits bei einem molaren Verhältnis von $\sim 1:1$ deutliche stabilisierende Effekte zeigen. Diese Ergebnisse deuteten auf eine transiente Bindung zwischen allen fünf sHsps und frühen Entfaltungszuständen der CS hin. Diese frühen Entfaltungszustände der CS können ohne die Hilfe weiterer Chaperone von dem sHsp wieder getrennt werden und sich selbstständig in den aktiven Zustand zurückfalten. Dadurch kann auch noch nach einer Inkubation der CS bei 43°C von über 10 Minuten Aktivität gemessen werden. Im Gegensatz dazu wird durch das Binden der vollständig entfalteten CS an das sHsp und durch die Ausbildung des stabilen Enzym-Substratkomplexes zwar die Aggregation unterdrückt, aber gleichzeitig verliert das gebundene Substrat seine Aktivität.

4.3.4 Reaktivierung der Citratsynthase

Wie bereits in Kapitel 4.3.2 gezeigt, führt die Interaktion zwischen sHsps und entfalten Proteinen normalerweise zur Bildung von stabilen und definierten Enzym-Substratkomplexen und um das Substrat wieder von diesem Komplex zu trennen werden ATP-abhängige Chaperonsysteme benötigt. So wurde z. B. durch *in vitro* Experimente gezeigt, dass nicht-native Proteine die an das *E. coli* sHsp IbpB gebunden sind gezielt an das Hsp70 (DnaK/DnaJ/GrpE; KJE), Hsp100 (ClpB) Chaperonsystem übertragen und reaktiviert werden (Matuszewska, Kuczyńska-Wiśnik et al., 2005, Mogk et al., 2003).

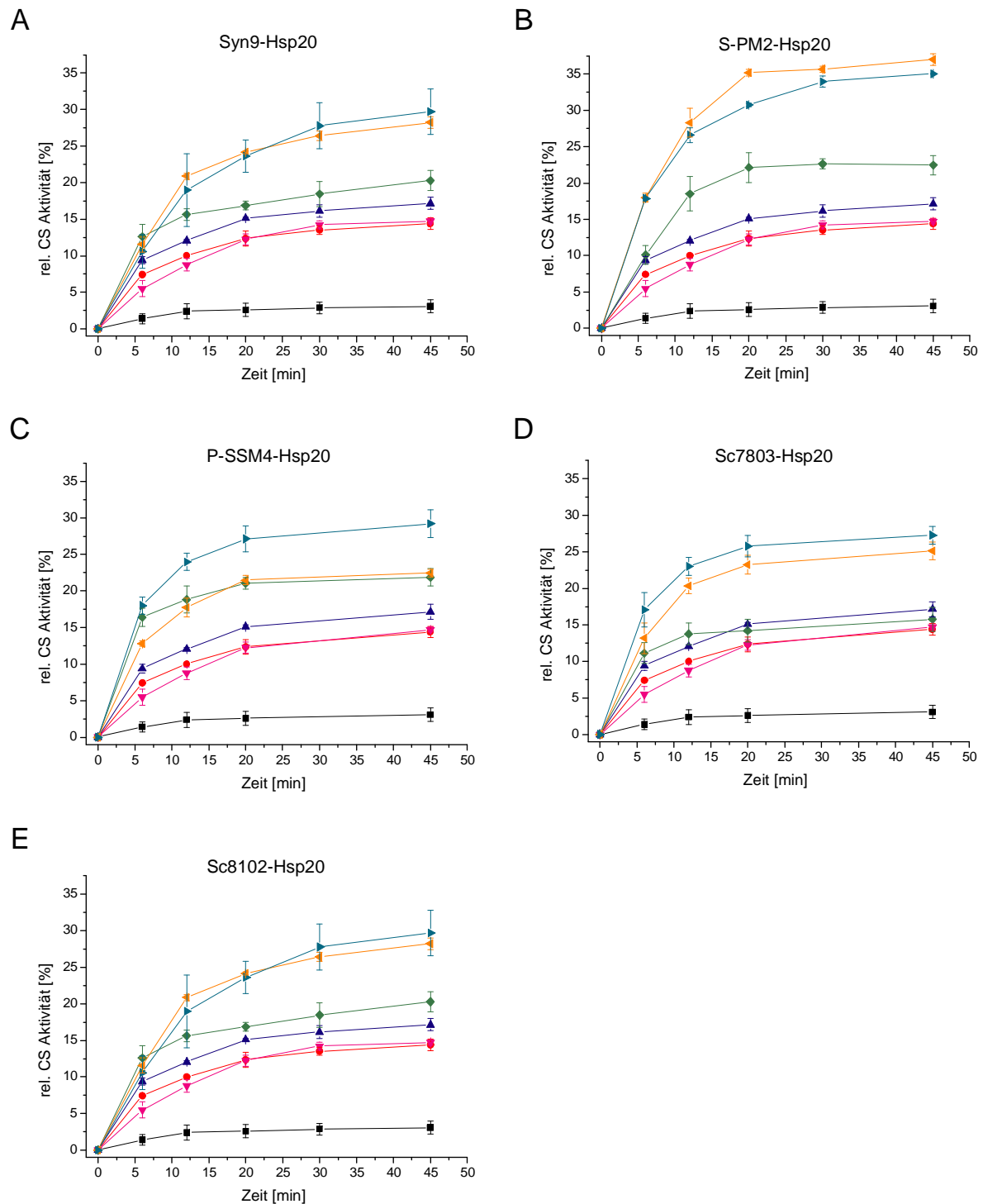


Abbildung 18: Rückfaltung chemisch denaturierter CS in der An- und Abwesenheit von Hsp20.

Einfluss von (A) Syn9-Hsp20, (B) S-PM2-Hsp20, (C) P-SSM4-Hsp20, (D) Sc7803-Hsp20 und (E) Sc8102-Hsp20 auf die Reaktivierung von chemisch denaturierter CS. Die CS wurde für eine Stunde in 6 M GdmCl denaturiert und anschließend 100-fach für eine Endkonzentration von 300 nM in eine Lösung die folgende Substanzen enthielt verdünnt: 2 mM ATP, 3 mM MgCl₂, versetzt mit DnaK/DnaJ/GrpE (KJE) (0,6, 1,2 und 0,6 μM) und 0,6 μM ClpB (pink), nur ClpB (rot), nur KJE (blau), ClpB und Hsp20 (grün), KJE und Hsp20 (orange) oder ClpB, KJE und Hsp20 (hellblau). Die Lösungen wurden bei 35°C inkubiert und bei den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen um die enzymatische Aktivität zu bestimmen. Es sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen und die entsprechenden Fehlerbalken angegeben.

Um zu überprüfen ob eine solche Übertragung und Reaktivierung von gebundenen Substraten auch für die hier untersuchten viralen und cyanobakteriellen sHsps möglich ist, wurde ihre Fähigkeit mit dem KJE und ClpB Chaperonsystem aus *E. coli* zu kooperieren und damit chemisch denaturierte CS in den nativen Zustand zurück zu falten untersucht.

In Abbildung 18 wird deutlich, dass durch alle fünf Proteine die Rückfaltung der CS beeinflusst wird. Weniger als 3% der chemisch denaturierten CS wurden nach 45 min spontan zurückgefaltet. Wurde die Rückfaltung durch die Chaperonsysteme Hsp70 oder Hsp100 induziert, so nähert sich der Rückfaltungsprozess ebenfalls nach 45 min der Sättigung.

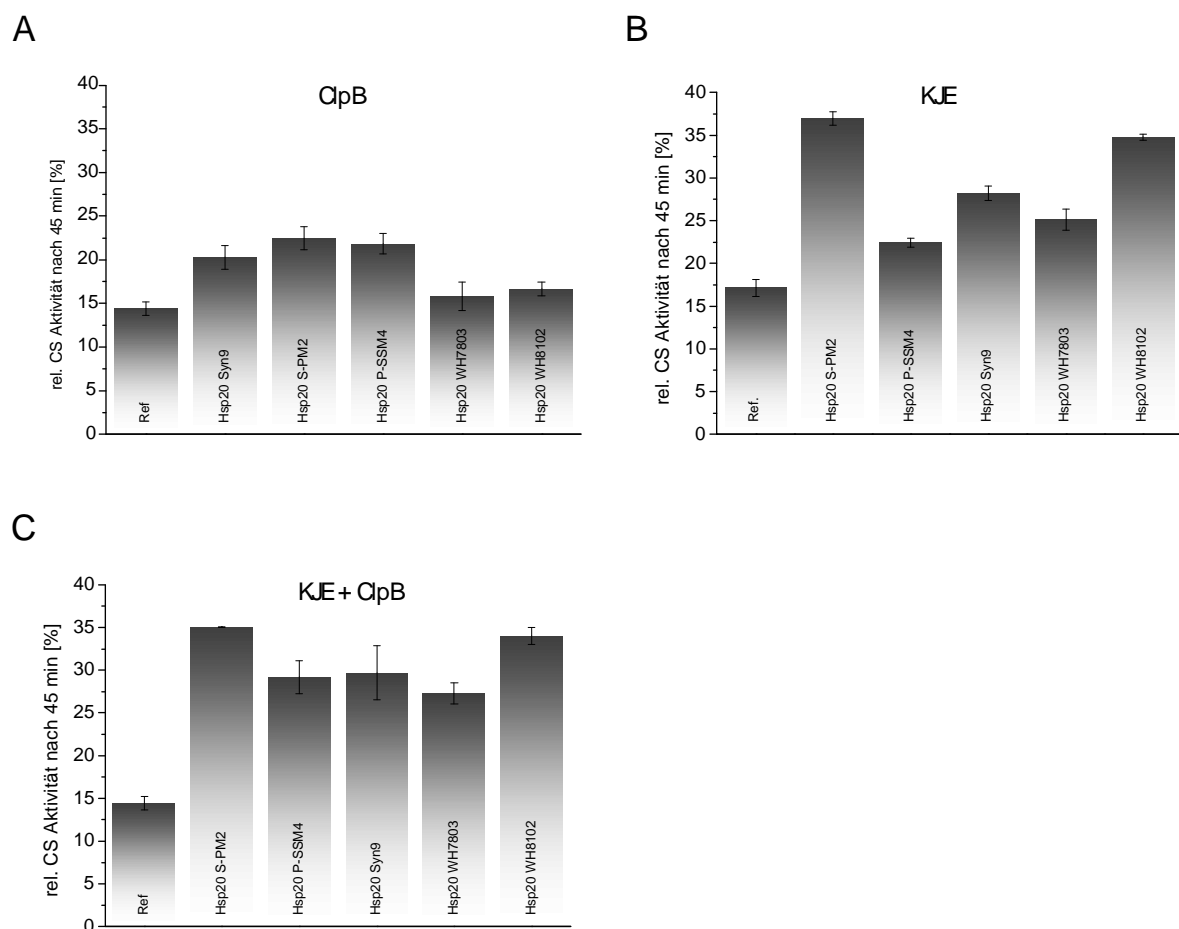


Abbildung 19: Vergleich der CS Reaktivierung mit Hilfe verschiedener Chaperonsysteme. Einfluss des verwendeten Chaperonsystems (A) ClpB, (B) KJE, oder (C) die Kombination aus Beiden auf die Reaktivierung chemisch denaturierter CS. Als Kontrolle wurde jeweils die Rückfaltung der CS mit dem entsprechenden Chaperonsystem gewählt, aber ohne die Zugabe von Hsp20. Die Aktivität wurde jeweils nach 45 min bestimmt.

Aus Abbildung 19 geht deutlich hervor, dass ohne die Zugabe von sHsps, aber in der Anwesenheit von Hsp70 und/oder Hsp100 im Rückfaltungspuffer etwa 14-17% der CS Aktivität zurückgewonnen werden können. Die Anwesenheit von Hsp100 alleine ohne Hsp70

führt nur bei den viralen sHsps zu einer leichten Erhöhung der Reaktivierung auf etwas über 20%. Im Gegensatz dazu liegt die Aktivität der CS durch die Zugabe der cyanobakteriellen sHsps in Anwesenheit von Hsp100 auf etwa dem gleichen Niveau wie ohne sHsps. Die Kombination von ClpB und des KJE Systems resultierte in einer Rückfaltungseffizienz von ~27% für Syn9-Hsp20, P-SSM4-Hsp20 und Sc7803-Hsp20 und von ~35% für S-PM2-Hsp20 und Sc8102-Hsp20. Interessanterweise konnte für die letzten beiden Proteine eine noch höhere Reaktivierung der CS (von über 35%) erreicht werden, wenn auf die Zugabe von Hsp100 verzichtet wurde. Für Syn9-Hsp20, P-SSM4-Hsp20 und Sc7803-Hsp20 führte die Verwendung von Hsp70 ohne die Zugabe von Hsp100 zu weniger Rückfaltung, was besonders im Fall von P-SSM4-Hsp20 deutlich wird. Dies deutet darauf hin, dass ClpB zu einer effizienteren Abspaltung der gebundenen CS aus dem Komplex verhilft. Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass das Hsp100 System außer im Fall von P-SSM4-Hsp20 nicht für die Freisetzung der sHsp-gebundenen CS nötig ist und dass beide Chaperonsysteme unabhängig voneinander arbeiten. Für eine effiziente Rückfaltung der CS scheint hier die Kooperation mit dem Hsp70 System ausreichend zu sein.

Für das Experiment wurde sowohl ein Modellsubstrat als auch die Chaperonsysteme aus *E. coli* verwendet. Cyanobakterien selbst besitzen auch ein Hsp70 System und einige Stämme haben zusätzlich auch das Hsp100 System kodiert, welches ähnlich zu dem in *E. coli* aufgebaut ist. Die hier untersuchten cyanobakteriellen Stämme *Synechococcus* WH7803 und WH8102 aus denen die beiden sHsps Sc7803-Hsp20 und Sc8102-Hsp20 stammen besitzen beide ein Hsp100 System. Die Phagen selbst sind allerdings auch in der Lage Cyanobakterien zu infizieren die selbst kein Hsp100 System kodiert haben, was zu dem Ergebnis passt, dass die beiden Systeme unabhängig voneinander arbeiten und keine wesentliche Erhöhung durch den Einsatz von ClpB und Hsp70 erreicht werden konnte. Die Wirte von P-SSM4 haben dagegen ein Hsp100 System auf ihrem Genom kodiert, so dass eine Kooperation von Hsp70 und ClpB wie hier an der erhöhten Rückfaltungseffizienz von CS gezeigt durchaus vorstellbar ist (Abbildung 18 C).

4.4 Kultivierung von Cyanobakterien

Auf dem Genom von Viren sind nur ausgewählte für sie wichtige Proteine kodiert, die sie zum infizieren des Wirtes oder für die Replikation benötigen. Bis jetzt ist noch nicht ge-

klärt warum auf dem Genom von einigen Cyanophagen ein kleines Hitzeschockprotein kodiert ist. Es konnte schon gezeigt werden, dass die ebenfalls überraschend in Cyanophagen vorhandenen Photosynthese Gene *psbA* und *psbD* notwendig sind, um die Photosynthese während der Infektion als Energielieferant aufrecht zu erhalten. Um herauszufinden, ob die sHps aus einem ähnlichen Grund auf dem Genom der Cyanophagen kodiert sind und Proteine, die mit der Photosynthese zusammenhängen vor der Aggregation bewahren, mussten zunächst einige Cyanobakterienstämme kultiviert werden. Dazu wurden fünf Stämme ausgewählt, die von den Cyanophagen infiziert werden, aus denen die sHps stammen, die hier analysiert wurden.

Tabelle 4.2: Wirte der Cyanophagen S-PM2, Syn9 und P-SSM4. Zusammenfassung einiger Cyanobakterienstämme die von den hier verwendeten Phagen S-PM2, P-SSM4 und Syn9 infiziert werden (modifiziert nach:(Sullivan, Waterbury et al., 2003)). Die gekauften und hier kultivierten Stämme sind mit einem (k) markiert. Stämme die über ein eigenes sHsp verfügen sind in blau markiert.

		Cyanophagen		
		S-PM2	Syn9	P-SSM4
High-light <i>Prochlorococcus</i>	MIT 9215	O	O	X
	MED 4	O	X	X
	MIT 9515	O	X	O
Low-light <i>Prochlorococcus</i>	MIT 9211	O	X	O
	MIT 9303	O	X	O
	MIT 9313	O	X	O
	NATL1A _(k)	O	O	X
	NATL2A _(k)	O	X	X
Marine <i>Synechococcus</i>	WH8102 _(k)	O	X	O
	WH6501	O	X	O
	WH8012	O	X	O
	WH8109	X	X	O
	WH8017	O	X	O
	WH8018	O	X	O
	WH7803 _(k)	X	X	O

Aus Tabelle 4.2 wird deutlich, dass der Phage Syn9 im Gegensatz zu den beiden anderen ein deutlich breiteres Spektrum an Cyanobakterienstämmen infizieren kann. Syn9 ist in der Lage sowohl high-light (HL) - und low-light (LL) *Prochlorococcus* Stämme, wie auch marine *Synechococcus* Stämme zu infizieren. Der Cyanophage S-PM2 dagegen befällt von den 20 getesteten Cyanobakterien nur zwei marine *Synechococcus* Stämme. Der Phage P-SSM4 ist zwar in der Lage zwei HL und zwei LL *Prochlorococcus* Stämme zu infizieren, allerdings gibt es keine Kreuzinfektionen zu *Synechococcus* Stämmen (Sullivan, Coleman et al., 2005). Auffällig ist, dass von den vier Stämmen, die von P-SSM4 befallen werden können, keiner ein eigenes kleines Hitzeschockprotein besitzt. Syn9 dagegen kann Stämme mit und ohne eigenes kleines Hitzeschockprotein befallen.

Die Kultivierung von Cyanobakterien gestaltet sich grundsätzlich schwierig, da Cyanobakterienstämme sehr unterschiedliche und definierte Bedingungen an ihre Umgebung (Licht, Temperatur, Medium) stellen. Speziell die Anforderungen an die Lichtintensität kann sich stark unterscheiden, da manche Arten schwach beleuchtete Höhlen oder die Unterseite von Felsen besiedeln, während andere Arten mikrobielle Matten bilden die dem vollen Sonnenlicht ausgesetzt sind (Waterbury, 2006). Cyanobakterien besitzen zwar die Fähigkeit sich innerhalb bestimmter Grenzen über Photoadaptation an die gegebenen Lichtverhältnisse anzupassen (Rubio, Camacho et al., 2003), allerdings besitzt jeder phototrophe Organismus auch eine spezifische Lichtintensitätsgrenze, bei deren Überschreitung es zu einer Schädigung des Photosyntheseapparates kommt (Barber & Andersson, 1992). Idealerweise sollte eine Cyanobakterienkultur mit einer Lichtintensität bestrahlt werden, die ihre spezifische Sättigungsgrenze weder über- noch unterschreitet, um eine mögliche Lichtlimitierung oder -inhibition zu vermeiden (Pulz, 2001). Auch an die Umgebungstemperatur werden sehr unterschiedliche Bedingungen gestellt. Während die meisten Cyanobakterien mesophil sind und Wachstumsoptima zwischen 20 und 30°C besitzen, gibt es auch psychrophile Stämme, die Seen in der Antarktis bewohnen und nur Temperaturen unter 20°C tolerieren (Seaburg, Parked et al., 1981, Waterbury, 2006). Es existieren aber auch thermophile Stämme die in heißen Quellen leben und bei einer Temperatur oberhalb von 45°C optimal wachsen.

An das Medium werden von vielen Cyanobakterien der Gattung *Prochlorococcus* zusätzliche Ansprüche gestellt, da sie bereits im picomolaren Bereich überaus sensitiv auf die Anwesenheit von Kupferionen reagieren (Mann, Ahlgren et al., 2002). Tendenziell wird das Wachstum mariner *Synechococcus* Stämme erst bei 10-fach höheren Kupferkonzentrationen

nen inhibiert, allerdings ist die Sensitivität stark Stammesabhängig und es gibt auch sehr kupferempfindliche *Synechococcus* Stämme (Brand, Sunda et al., 1986, Mann et al., 2002). Die ausgewählten Stämme wurden zunächst in den von der Stammsammlung empfohlenen Medien (f/2 für *Synechococcus* und Pro99 für *Prochlorococcus*) kultiviert. Außerdem wurden die empfohlenen Temperaturen und Lichtintensitäten eingestellt. Nachdem alle Stämme erfolgreich in dem gekauften Medium angewachsen waren, wurde das Medium in künstlich hergestelltes Meerwasser (ASW) wie in Kapitel 3.16.1 beschrieben geändert. Alle Stämme haben sich als sehr empfindlich gegenüber jeglicher Veränderung (wie umstellen des Mediums, größere Zellkulturflaschen oder leicht veränderte Lichtintensität) herausgestellt.

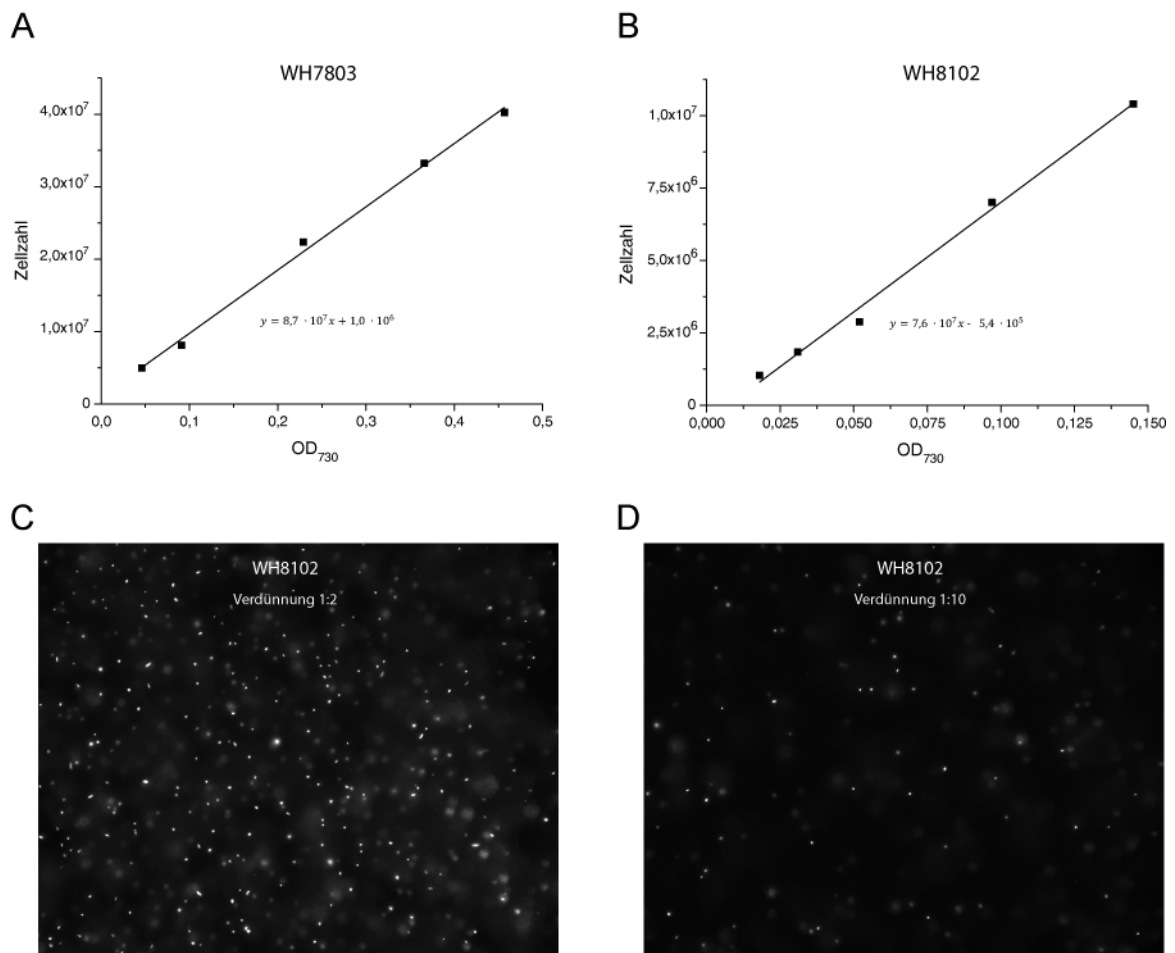


Abbildung 20: Korrelation von Zellzahl und Optischer Dichte. Von Zellen der beiden *Synechococcus* Stämme WH7803 und WH8102 wurden verschiedene Verdünnungen mit ASW f/2 hergestellt und von jeder Verdünnung sowohl die optische Dichte OD_{730} als auch die Zellzahl durch auszählen in der Zählkammer unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt. (A) zeigt die Korrelation zwischen OD_{730} und Zellzahl für *Synechococcus* WH7803 und (B) für *Synechococcus* WH8102. In (C) ist die Aufnahme des Fluoreszenzmikroskops von *Synechococcus* WH8102 bei einer Verdünnung von 1:2 und in (D) bei einer Verdünnung von 1:10 dargestellt.

Das Wachstum der verschiedenen Kulturen wurde durch regelmäßiges messen der OD_{730} überprüft. Für die Korrelation dieser OD_{730} Werte mit einer genauen Zellzahl wurden die Zellen in einer Zählkammer unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Für alle weiteren Experimente mit Cyanobakterien wurde nur die OD_{730} gemessen und die Zellzahl anhand der ermittelten Gleichung (siehe Abbildung 20) bestimmt.

4.5 Potentielle in vivo Substrate der viralen und cyanobakteriellen sHsps

4.5.1 Syn9-Hsp20 stabilisiert das cyanobakterielle Lysat von WH7803

Um die Chaperoneigenschaften der viralen sHsps noch weiter zu analysieren, wurde untersucht, ob sie auch in der Lage sind die Proteinaggregation in ihren Wirten zu unterdrücken bzw. das Lysat der Cyanobakterien zu stabilisieren. Dafür wurden Zellen des *Synechococcus* Stammes WH7803 bei einer Zelldichte von etwa $2,0 \cdot 10^7$ geerntet und anschließend lysiert. Das Lysat wurde in der An- und Abwesenheit von Syn9-Hsp20 bei 25 und 45°C für 45 min inkubiert und anschließend wurde der lösliche vom unlöslichen Anteil getrennt und mit Hilfe von SDS-PAGE analysiert.

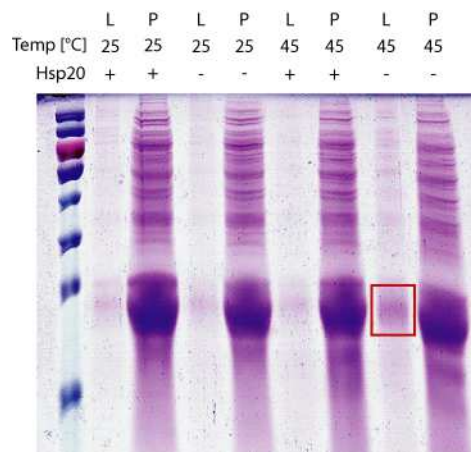


Abbildung 21: Aggregation von cyanobakteriellem Lysat bei verschiedenen Temperaturen.

Coomassie gefärbtes SDS-Gel des löslichen Anteils (L) und des Pellets (P) von *Synechococcus* sp. WH7803. Zellen von *Synechococcus* sp. WH7803 wurden bei einer Dichte von 2×10^7 Zellen ml^{-1} geerntet, lysiert und anschließend bei 25 oder 45°C für 25 min in der An- und Abwesenheit von 10 μg Syn9-Hsp20 inkubiert. Die löslichen Proteine wurden von den unlöslichen Anteilen getrennt und anschließend via SDS-PAGE analysiert. Die rot markierte Bande wurde mit Hilfe von Massenspektrometrie untersucht und als C-Phycocyanin Klasse II identifiziert.

Während bei physiologischen Bedingungen (25°C) kein direkter Einfluss durch die Zugabe von Syn9-Hsp20 auf die Proteinaggregation beobachtet werden kann, zeigt sich bei Hitze-stress Bedingungen (45°C), dass die Menge an unlöslichem Protein in der Abwesenheit

von Syn9-Hsp20 zunimmt (Abbildung 21). Besonders deutlich wird dies durch eine prominente Proteinbande im Bereich von 20 kDa, welche durch die Anwesenheit von Syn9-Hsp20 signifikant stabilisiert wird. Um herauszufinden um welches Protein es sich bei der entsprechenden Bande handelt, die so effizient von Syn9-Hsp20 stabilisiert wird, wurde diese Bande mit Hilfe von Massenspektrometrie analysiert. Das Protein wurde als C-Phycoerythrin-Klasse II identifiziert, ein Protein der Phycobilisomen aus marinen Cyanobakterien. Dies deutet darauf hin, dass die viralen sHsps speziell für die Stabilisierung einzelner Bestandteile des Photosystems ihres Wirtes gebraucht werden könnten.

Um zu untersuchen, ob es sich bei dieser Stabilisierung tatsächlich um eine spezifische Inhibierung der Aggregation von Phycoerythrin durch das virale sHsp Syn9-Hsp20 handelt wurden weitere Untersuchungen mit dem cyanobakteriellen Lysat unter Hitzestress-Bedingungen durchgeführt. Dafür wurde das Lysat von WH7803 in der Anwesenheit von drei verschiedenen Konzentrationen an Syn9-Hsp20 bei 45°C für 40 min inkubiert. Dabei wurden zu definierten Zeitpunkten Proben genommen und der lösliche Anteil von dem unlöslichen getrennt. Die löslichen Fraktionen wurden mit Hilfe von SDS-PAGE getrennt und die fluoreszierenden Banden quantifiziert.

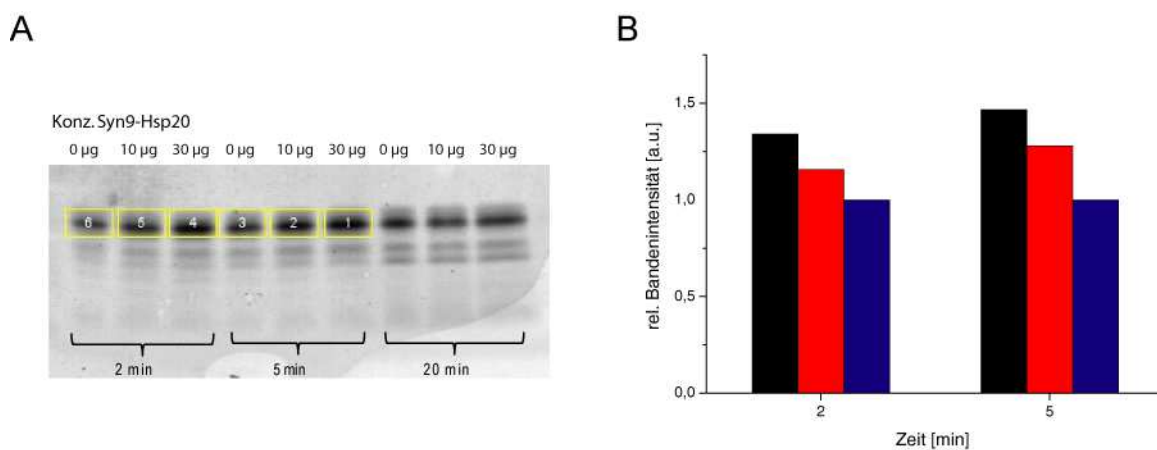


Abbildung 22: Konzentrationsabhängige Stabilisierung durch Syn9-Hsp20. Syn9-Hsp20 zeigt eine konzentrationsabhängige Stabilisierung der fluoreszierenden Anteile des Lysats von WH7803. (A) SDS-PAGE von 0 µg (blau), 10 µg (rot) und 30 µg (schwarz) Syn9-Hsp20 zusammen inkubiert mit dem Lysat von WH7803 bei 45°C. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen, wobei die Detektion über ihre Eigenfluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm erfolgte (Typhoon9200). (B) Die gelb markierten Banden wurden mit Hilfe von ImageJ quantifiziert und auf die Bandenintensität bei der Zugabe von 0 µg Syn9-Hsp20 (blau) normiert. Die Banden der 20 min Messung konnten nicht mit in die Auswertung aufgenommen werden.

Abbildung 22 zeigt, dass Syn9-Hsp20 ein oder mehrere Proteine mit Eigenfluoreszenz aus dem cyanobakteriellen Lysat bei Hitzestress Bedingungen stabilisieren bzw. die Aggregation hinauszögern kann. Das SDS-Gel zeigt eine Hauptbande bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm und einem Emissionsbereich von 545-565 nm. Diese Bande lässt sich mit großer Wahrscheinlichkeit Phycoerythrin zuordnen, da Phycoerythrin eine maximale Emission bei 560 nm besitzt und auch das molekulare Gewicht dem der Bande entspricht. Bei den schwächeren Banden bei niedrigeren Molekulargewichten handelt es sich vermutlich um Abbaubanden. Da diese mit der Zeit zunehmen entstehen sie vermutlich größtenteils durch den Hitzeschock während des Experiments. Durch die Quantifizierung der Banden in Abbildung 22B erkennt man, dass sich auch schon nach zwei Minuten ein deutlicher Stabilisierungseffekt zeigt. Durch die Zugabe von 30 µg Syn9-Hsp20 ist nach zwei Minuten noch 25% mehr Phycoerythrin vorhanden als ohne die Zugabe von Syn9-Hsp20. Nach fünf Minuten zeigt sich der Effekt sogar noch stärker, da hier das Phycoerythrin noch weiter aggregiert ist. Durch die Zugabe von 30 µg Syn9-Hsp20 ist hier sogar fast ein Drittel mehr Phycoerythrin enthalten. Auch wenn hier die Verwendung einer Ladekontrolle nicht möglich ist, so scheinen die Ergebnisse doch darauf hinzuweisen, dass Phycoerythrin eines der *in vivo* Substrate von Syn9-Hsp20 ist.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Co-IPs mit dem cyanobakteriellen Lysat von *Synechococcus* WH7803 und dem viralen sHsp Syn9-Hsp20 durchgeführt. Dafür wurde wie weiter oben beschrieben die cyanobakteriellen Zellen geerntet, lysiert und mit Syn9-Hsp20 inkubiert. Als Kontrolle wurde eine weitere Co-IP ohne die Zugabe von Syn9-Hsp20 durchgeführt, um unspezifische Bindungen des Lysats an die verwendete Matrix analysieren zu können. Um diese Bindungen so gering wie möglich zu halten wurde vor der Elution mehrfach mit drei verschiedenen Puffern gewaschen.

Allerdings konnten sowohl Phycoerythrin I und II auch in der Elutions-Spur des Kontrollgels gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass die unspezifischen Bindungen trotz intensiven Waschens der Protein G Sepharose Matrix nicht unterbunden werden konnten. Auf dem SDS-Gel in Abbildung 21 kann man auch erkennen, dass vermutlich der größte Anteil der Proteine des Lysates auf Phycoerythrin zurückzuführen ist. Dabei sorgt der große Anteil an Phycoerythrin mit seinem Absorptionsmaximum bei 490 nm im Verhältnis zu den anderen Pigmentproteinen für die rote Farbe von *Synechococcus* WH7803. Dieser unverhältnismäßig große Anteil an Phycoerythrin kann auch dazu beigetragen haben, dass Phycoerythrin ebenfalls in der negativ-Kontrolle identifiziert werden konnte. Aber gleichzeitig spricht es dafür, dass die Hauptbande in Abbildung 22A tatsächlich Phycoerythrin und nicht einem anderen Protein des Photosystems zuzuordnen ist.

Da Allophycocyanin (Alpha Kette) nur zusammen mit der Verwendung von Syn9-Hsp20 nachgewiesen werden konnte, wurde zunächst diese Interaktion genauer analysiert. Für weitere Aggregations-Experimente, um zu sehen ob die viralen und cyanobakteriellen sHsps für die Stabilisierung des Photosystems benötigt werden, wurden daher die Fluoreszenzeigenschaften von Allophycocyanin ausgenutzt.

4.5.2 Stabilisierung der Fluoreszenz von Allophycocyanin durch Hsp20

Da sHsps in der Lage sind die Inaktivierung und Aggregation von Proteinen während Hitzeschockbedingungen zu verhindern, wurde die Inaktivierung der cyanobakteriellen Photosystemkomponente Allophycocyanin bei 45°C in der An- und Abwesenheit der cyanobakteriellen und viralen hier untersuchten Hsp20 Proteine untersucht. Dafür wurden das Proteinlysate von *Synechococcus* WH7803 entweder mit 10 µg cyanobakteriellem Hsp20, 10 µg viralem Hsp20 oder einer Kombination aus 5 µg von Beidem bei 45°C inkubiert. In einem Kontrollexperiment wurde die gleiche Menge an Puffer zugegeben. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben genommen und die löslichen Proteine von den unlöslichen Proteinen getrennt. Von den löslichen Fraktionen wurden Fluoreszenz-Spektren von 645 nm bis 750 nm mit einer Anregungswellenlänge von 635 nm aufgenommen. Das Absorptionsmaximum von Allophycocyanin liegt mit 652 nm sehr nah bei der Emissionswellenlänge von 655-657 nm (Gantt & Lipschultz, 1973, Ono & Murata, 1981). Daher wurde eine Anregungswellenlänge von 635 nm gewählt, die ein ausreichendes Signal und gleichzeitig eine deutliche Abtrennung des Anregungspeaks von dem eigentlichen Signal gewährleistet.

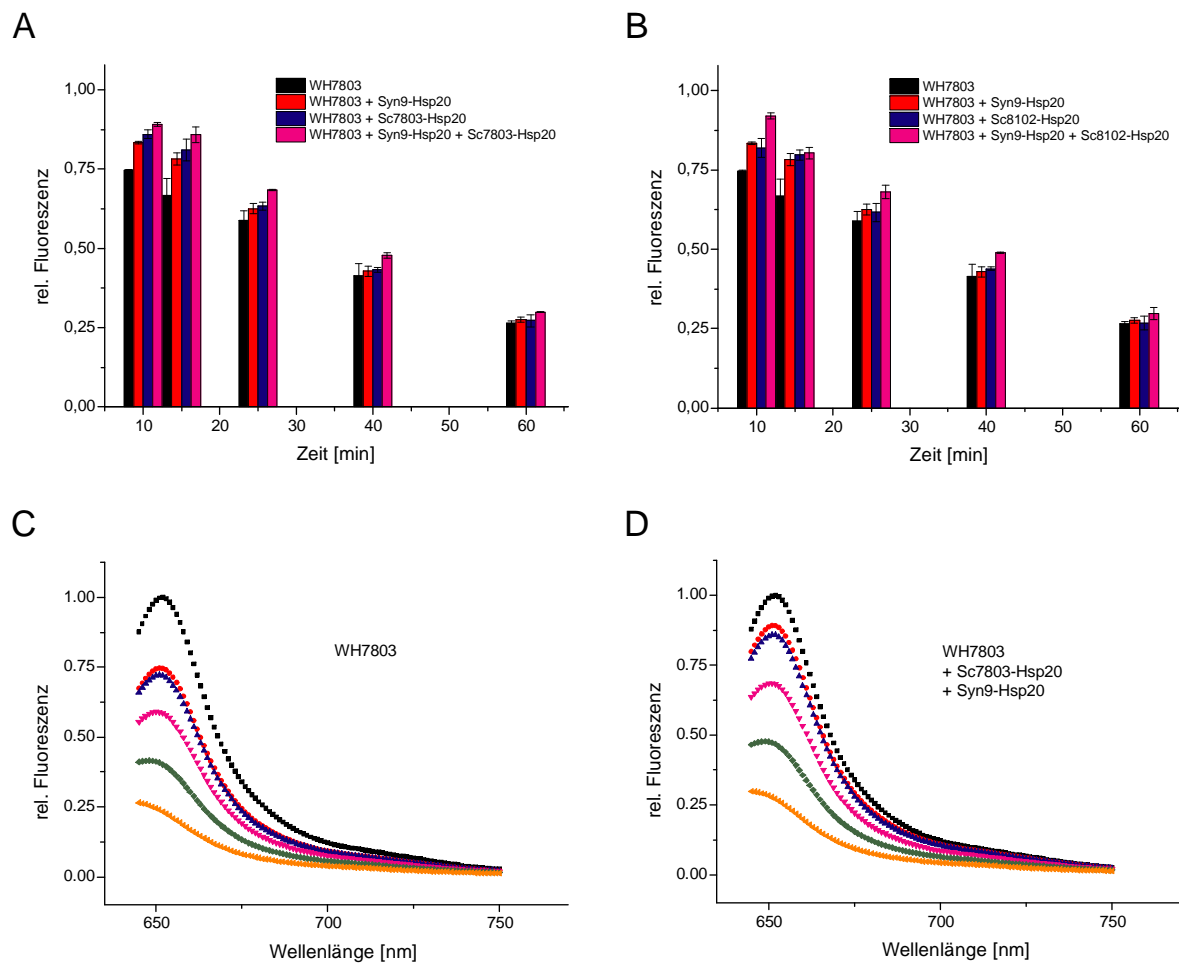


Abbildung 24: Stabilisierung der Fluoreszenz von Allophycocyanin durch Hsp20 unter Hitzeschockbedingungen. Abnahme des Fluoreszenzsignals von Allophycocyanin bei 655 nm mit der Zeit, in der An- und Abwesenheit von Syn9-Hsp20 allein und in der Kombination mit einem cyanobakteriellem kleinem Hitzeschockprotein. Das eingesetzte cyanobakterielle sHsp war entweder das von (A) *Synechococcus* WH7803 ursprünglich produzierte oder das von (B) *Synechococcus* WH8102. Die Zellen von *Synechococcus* WH7803 wurden lysiert und bei 45°C ohne jegliche Zugabe von Hsp20 als Kontrolle (schwarz), mit der Zugabe des viralen Syn9-Hsp20 (rot), dem cyanobakteriellen Hsp20 (blau) oder einer Kombination aus beidem (pink) inkubiert. Die Fluoreszenzspektren wurden von 645 nm bis 750 nm bei einer Anregungswellenlänge von 635 nm aufgenommen und die Maxima bei 655 nm wurden normiert. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen und die entsprechenden Fehlerbalken sind angegeben. (C) Zugrunde liegende Spektren zur Abnahme des Fluoreszenzmaximums von Allophycocyanin ohne jegliche Zugabe von Hsp20 als Kontrolle und (D) mit einer Kombination aus viralem und cyanobakteriellem Hsp20. Nach 5 min (schwarz), 10 min (rot), 15 min (blau), 25 min (pink), 40 min (grün) and 60 min (orange) Inkubation bei 45°C wurden Proben genommen und von den löslichen Fraktionen wie in Kapitel 3.15.4 beschrieben Fluoreszenzspektren aufgenommen.

Abbildung 24 zeigt die Abnahme des Fluoreszenzmaximums bei 655 nm von Allophycocyanin über 60 min. Ohne die Zugabe jeglicher sHsps nimmt das Fluoreszenzsignal innerhalb der ersten 10 Minuten auf etwa 75% ab wohingegen durch die Zugabe von beiden – dem viralen und dem cyanobakteriellen Hsp20 – fast 90% des ursprünglichen Signals nach 10 minütigem Hitze-Schock erhalten bleiben. Interessanterweise scheint es kei-

nen Unterschied zu machen ob das eingesetzte cyanobakterielle sHsps das gleiche ist, das ebenfalls in dem verwendeten *Synechococcus* Stamm vorkommt oder ob ein anderes cyanobakterielles sHsp eingesetzt wurde. Wenn nur ein Hsp20 zu dem Lysat gegeben wurde – viral oder cyanobakteriell – konnte die Photosystemkomponente trotzdem eindeutig stabilisiert werden, auch wenn die Stabilisierung effizienter zu sein scheint wenn eine Kombination des cyanobakteriellen Wirt-sHsps und des viralen sHsps anwesend ist.

Ebenso lässt der stabilisierende Effekt mit der Zeit deutlich nach, wobei er wenn die Kombination aus cyanobakteriellem und viralem sHsp eingesetzt wurde noch bis 25 Minuten und sehr schwach auch noch bei 40 Minuten sichtbar ist. Wenn nur ein Hsp20 eingesetzt wurde, ist die Fluoreszenz von Allophycocyanin nach 25 Minuten bereits auf das gleiche Level wie in der Kontrolle ohne die Zugabe von Hsp20 abgefallen.

Insgesamt ist das virale sHsp Syn9-Hsp20 also in der Lage die Fluoreszenz von Allophycocyanin unter Hitzestress aufrecht zu erhalten. Ebenso wie auch durch das Co-IP Experiment (Kapitel 4.5.1) deutet dies darauf hin, dass Allophycocyanin zu den *in vivo* Substraten von Syn9-Hsp20 gehört und durch das Hsp20 die Aggregation unter Stressbedingungen unterdrückt werden kann.

4.5.3 Stabilisierung von Phycoerythrin durch Hsp20 unter Hitzeschock

Auch wenn durch Co-IP Experimente nicht eindeutig Phycoerythrin als Interaktionspartner der viralen bzw. cyanobakteriellen sHsps nachgewiesen werden konnte, so ist es doch in den beiden hier untersuchten *Synechococcus* Stämmen WH7803 und WH8102 in großen Mengen vorhanden (Barlow & Alberte, 1985). In beiden Fällen gibt es den Cyanobakterien ihre rote Färbung und ist Hauptbestandteil des Photosystems. Die Vermutung liegt also nahe, dass auch dieser Teil des Photosystems durch die sHsps während eines Hitzeschocks geschützt werden kann. Auch die ersten Aggregations-Experimente haben Hinweise in diese Richtung geliefert (siehe Kapitel 4.5.1). Daher wurde neben der Inaktivierung von Allophycocyanin auch die Inaktivierung von Phycoerythrin in der An- und Abwesenheit von cyanobakteriellen und viralen sHsps analysiert. Dafür wurde genauso wie bei den Untersuchungen zu Allophycocyanin vorgegangen, außer dass die Auswertung nicht über individuelle Fluoreszenzspektren, sondern im 96-well Format und mit Hilfe eines PHEREAstar plus Fluoreszenz-Lesegeräts mit einem FI Filter (Ex: 540 nm, Em: 590 nm) erfolgte. Durch die starke Eigenfluoreszenz von Phycoerythrin und die hohen Konzentrationen im Proteinlysate ist es möglich mit diesem Filter die Fluoreszenz von Phycoerythrin zu

detektieren auch wenn die eigentlichen Absorptions- und Emissionsmaxima nicht genau getroffen wurden (Ex: 490 nm, Em: 560 nm). Die Emissionsmaxima der anderen Phycobiliproteine liegen allerdings zwischen 642 nm (Phycocyanin) und 684 nm (Chlorophyll *a*) so dass man davon ausgegangen werden kann, dass hier nur die Emission von Phycoerythrin aufgenommen wird (Wolf & Schübler, 2005).

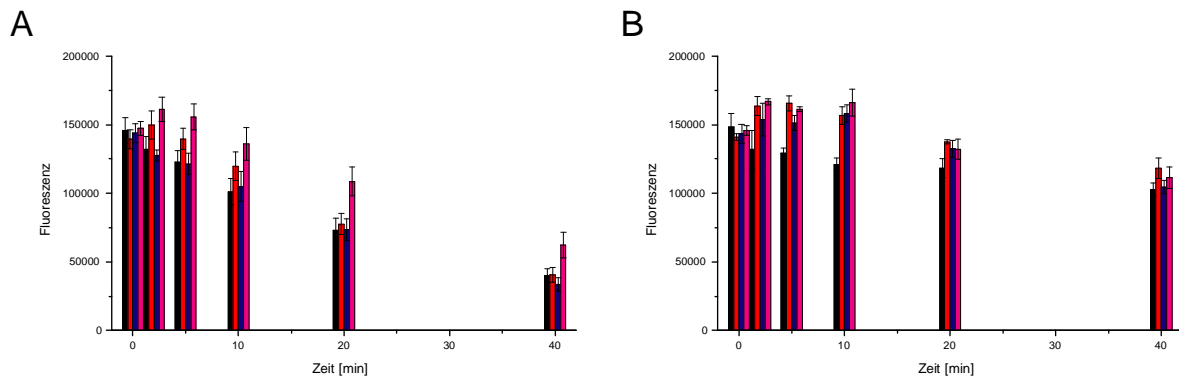


Abbildung 25: Stabilisierung von Phycoerythrin durch Hsp20 unter Hitzestress. Abnahme des Fluoreszenzsignals von Phycoerythrin über die Zeit mit und ohne die Zugabe von viralem und/oder cyanobakteriellem kleinem Hitzeschockprotein. Das eingesetzte cyanobakterielle Hsp20 stammte entweder aus dem für die Herstellung des Proteinlysats verwendeten *Synechococcus* Stamm WH8102 (A) oder aus einem anderen marinen *Synechococcus* Stamm WH7803 (B). Das Proteinlysat wurde bei 57°C mit und ohne die Zugabe von jeglichem Hsp20 als Kontrolle (schwarz), viralem Syn9-Hsp20 (rot), cyanobakteriellem Hsp20 (blau) und einer Kombination aus viralem und cyanobakteriellem Hsp20 (pink) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und von dem löslichen Proteinanteil wurde die Fluoreszenz mit einem PHERAstar plus (Ex: 540 nm, Em: 590 nm) bestimmt.

Durch die Inkubation bei 57°C nimmt das Fluoreszenzsignal von Phycoerythrin ohne jegliche Zugabe von stabilisierenden sHsps schnell ab (siehe Abbildung 25 A). Nach 5 minütiger Inkubation ist das Signal bereits auf knapp 80% abgefallen, wohingegen durch die Zugabe von viralem Hsp20 fast 100% des ursprünglichen Signals erhalten werden können. Durch eine Kombination von viralen und cyanobakteriellem Hsp20 steigt das Signal sogar kurzfristig nach der Inkubation auf über 100% an, bevor es dann ebenfalls anfängt langsam zu sinken. Dabei scheint die stabilisierende Wirkung der sHsps sogar bis 40 min nach Start des Hitzeschocks bei 57°C noch anzuhalten, da selbst hier noch eine deutlich höhere Fluoreszenz von Phycoerythrin messbar ist. Durch die Zugabe von einer Kombination von viralem und cyanobakteriellem Hsp20 ist nach 20 Minuten etwa ein Drittel mehr Phycoerythrin löslich und nach 40 Minuten ist fast doppelt so viel lösliches Phycoerythrin wie ohne die Zugabe von Hsp20 vorhanden. Bis zu einer Inkubationszeit von 10 Minuten ist auch noch eine leichte Stabilisierung durch die Zugabe des viralen Hsp20 alleine sichtbar, aller-

dings wird auf diese Weise kein so starker Effekt wie durch den Einsatz der Kombination von viralem und cyanobakteriellem Hsp20 erreicht.

In Abbildung 25 B wurde ebenfalls die Inaktivierung von Phycoerythrin unter Hitzestress verfolgt. Allerdings wurde hier als cyanobakterielles sHsp nicht das aus dem *Synechococcus* Stamm verwendet, welcher auch für die Herstellung des Proteinlysates eingesetzt wurde, sondern ein sHsp aus einem anderen marinen *Synechococcus* Stamm (WH7803). In beiden Fällen ist der Virus aus dem das eingesetzte Hsp20 stammt in der Lage die *Synechococcus* Stämme zu infizieren. In Abbildung 25 B kann man erkennen, dass sich das Fluoreszenzsignal von Phycoerythrin ohne die Zugabe von Hsp20 nur bis etwa 5 Minuten nach Start des Hitzeschocks ähnlich verhält wie in Abbildung 25 A. Zu den späteren Zeitpunkten nimmt die Fluoreszenz nicht mehr merklich ab, und bleibt etwa bei 60% der ursprünglichen Signalintensität bestehen. Das Lysat bzw. die Photosystemkomponenten innerhalb des Lysats reagieren sehr empfindlich auf äußere Einflüsse, so ist es möglich, dass unterschiedliche Lichtverhältnisse oder Umgebungstemperaturen an den Versuchstagen zu den Abweichungen geführt haben. Dennoch kann man eine ähnliche Tendenz wie auch in Abbildung 25 A erkennen. Auch hier tritt zunächst eine Stabilisierung des Fluoreszenzsignals von Phycoerythrin auf über 100% durch die Zugabe von Hsp20 ein. Dabei ist es egal ob die sHsps einzeln oder als Kombination aus viralem und cyanobakteriellem sHsp eingesetzt wurden. Auffällig ist, dass hier auch das cyanobakterielle Hsp20 oder das virale Hsp20 alleine eine ähnlich starke Wirkung wie die Kombination aus beiden zu entfalten scheinen. Auch durch die Kombination aus viralem und cyanobakteriellem Hsp20 ist hier nach 20 oder 40 minütigem Hitzeschock kein stabilisierender Effekt auf Phycoerythrin mehr vorhanden. Da dies aber auch an der fehlenden Aggregation von Phycoerythrin mit der Zeit im Vergleich zu dem Experiment aus Abbildung 25 A liegen könnte, wurde die Interaktion zwischen viralen und cyanobakteriellen sHsps dennoch genauer untersucht.

4.6 Interaktion zwischen den viralen und cyanobakteriellen sHsps

4.6.1 Temperaturabhängige Interaktion von Syn9-Hsp20 und Sc8102-Hsp20

Sowohl die Experimente mit zur Stabilisierung von Allophycocyanin als auch zur Stabilisierung von Phycoerythrin haben Hinweise darauf geliefert, dass das virale sHsp mit dem cyanobakteriellem sHsp interagiert. Durch die Interaktion der beiden sHsps konnte eine deutlich effektivere Unterdrückung der Aggregation des Substrates als durch die sHsps

alleine. Um die Interaktion zwischen den viralen und cyanobakteriellen sHsps nachzuweisen, wurden Co-IPs bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Dafür wurden zunächst die beiden sHsps bei Temperaturen zwischen 25 und 57°C inkubiert und anschließend über einen gegen das virale sHsp gerichteten Antikörper an eine Matrix gebunden. Alle nicht gebundenen Bestandteile wurden durch Waschen der Matrix entfernt und das Eluat wurde über SDS-PAGE analysiert.

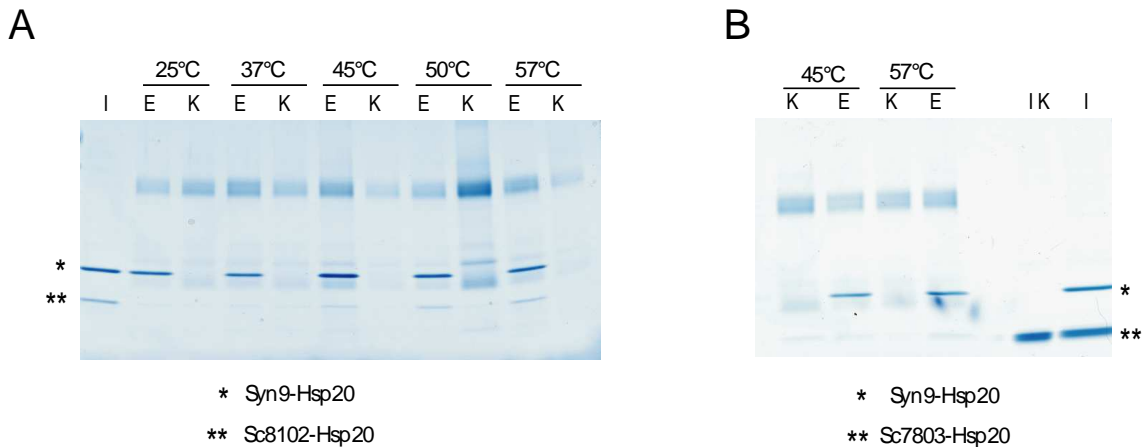


Abbildung 26: Co-IP von viralen und cyanobakteriellen sHsps bei steigenden Temperaturen. (A) Temperaturabhängige Interaktion von Syn9-Hsp20 und Sc8102-Hsp20. (B) Interaktion von Syn9-Hsp20 und Sc7803-Hsp20 bei 47 bzw 57°C. Co-IP von 10 µg viralem und cyanobakteriellem Hsp20 (E) bei steigenden Temperaturen zwischen 25 und 57°C. Zur Kontrolle (K) wurde unter gleichen Bedingungen auch eine Co-IP ohne die Zugabe von viralem sHsp durchgeführt. Zu der Proteinmischung wurde ein polyklonaler Antikörper gegen Syn9-Hsp20 gegeben und an Protein G Sepharose gekoppelt. Vor der Zugabe des Antikörpers wurde eine Probe des Inputs (I) genommen. Um die Interaktion zwischen den sHsps zu detektieren wurden die Proteine von dem Antikörper nach mindestens fünf Waschschritten getrennt und durch SDS-PAGE analysiert.

Das virale sHsp Syn9-Hsp20 und das cyanobakterielle sHsp Sc8102-Hsp20 zeigen eine temperaturabhängige Interaktion (Abbildung 26 A). Erst ab einer Temperatur von 45°C lassen sich in der Elutionsfraktion beide Proteine (Syn9-Hsp20 und Sc8102-Hsp20) eindeutig detektieren. Um sicher zu stellen, dass es sich bei der Bande von Sc8102-Hsp20 nicht um eine unspezifische Bindung an die Protein G Sepharose Matrix handelt wurde bei jeder Temperatur zusätzlich eine Kontrolle ohne die Zugabe des viralen sHsps durchgeführt. Da in den entsprechenden Kontrollspuren keine Banden auf der Höhe von Sc8102-Hsp20 erkennbar sind, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um eine spezifische Interaktion zwischen Syn9-Hsp20 und Sc-8102-Hsp20.

Für das Zustandekommen einer solchen Interaktion ist es denkbar, dass einzelne Untereinheiten der kleinen Hitzeschockproteine ausgetauscht werden. Speziell im Fall von Syn9-Hsp20 konnte bereits gezeigt werden, dass sich bei erhöhten Temperaturen der Oligomer-

zustand verändert und das sHsp nun nicht mehr als großes Oligomer sondern als deutlich kleineres Dimer vorliegt. Dies würde den Austausch von Untereinheiten mit Sc8102-Hsp20 begünstigen.

Da für das Syn9-Hsp20 und Sc8102-Hsp20 bereits gezeigt werden konnte, dass sich eine Interaktion erst bei Temperaturen über 45°C nachweisen lässt und auch aus den Experimenten zur Lysat-Aggregation eine Interaktion bei erhöhten Temperaturen hervorgeht, wurde für Syn9-Hsp20 und Sc7803-Hsp20 die Co-IP nur bei 45 und 57°C durchgeführt. Hier konnte allerdings keine eindeutige Interaktion detektiert werden. Sehr schwach erkennbare Banden zeigen sich sowohl in der Kontrolle als auch nach den Waschschritten in den Elutionsfraktionen. Dies lässt auf eine unspezifische Bindung von Sc7803-Hsp20 an die Protein G Sepharose Matrix schließen. Bei 57°C ist die Bande für Sc7803-Hsp20 in der Elutions-Spur etwas deutlicher und in der Kontroll-Spur kaum erkennbar. In Kapitel 4.2.4 hat der TSA Assay gezeigt, dass Sc7803-Hsp20 deutlich temperatursensitiver ist als Syn9-Hsp20 und schon ab etwa 45°C beginnt sich zu entfalten. Die hohen Temperaturen sind also auch hier unter Umständen nötig um die unspezifischen Bindungen zu verhindern und eine Interaktion zwischen den beiden sHsps möglich zu machen.

In beiden Fällen wurden nur die Interaktionen zwischen sHsps getestet, bei denen der Virus aus dem das sHsps stammt in der Lage ist den cyanobakteriellen Stamm aus dem das sHsp stammt zu infizieren. Die gewählten Temperaturen für die Interaktion sind deutlich über den natürlich vorkommen Temperaturen im Meerwasser. Als Hitzeschocktemperaturen für Cyanobakterien werden aber häufig Temperaturen über 45°C gewählt (Singh, Summerfield et al., 2006, Srivastava, Rai et al., 2013).

4.6.2 Verbesserte Reaktivierung von CS durch Kombination aus sHsps

Die Kombination aus viralem und cyanobakteriellem Hsp20 hat sowohl die Effizienz der Stabilisierung von Phycoerythrin als auch von Allophycocyanin verbessert. Die Co-IP hat bestätigt, dass die beiden sHsps, wenn auch temperaturabhängig tatsächlich miteinander interagieren. Die verstärkende Wirkung der Kombination sollte nun auch an CS als Modells substrat getestet werden. Dafür wurde wie schon in Kapitel 4.3.4 beschrieben die Reaktivierung der CS mit Hilfe von KJE und dem viralen, dem cyanobakteriellen oder einer Kombination aus beiden Hsp20 untersucht.

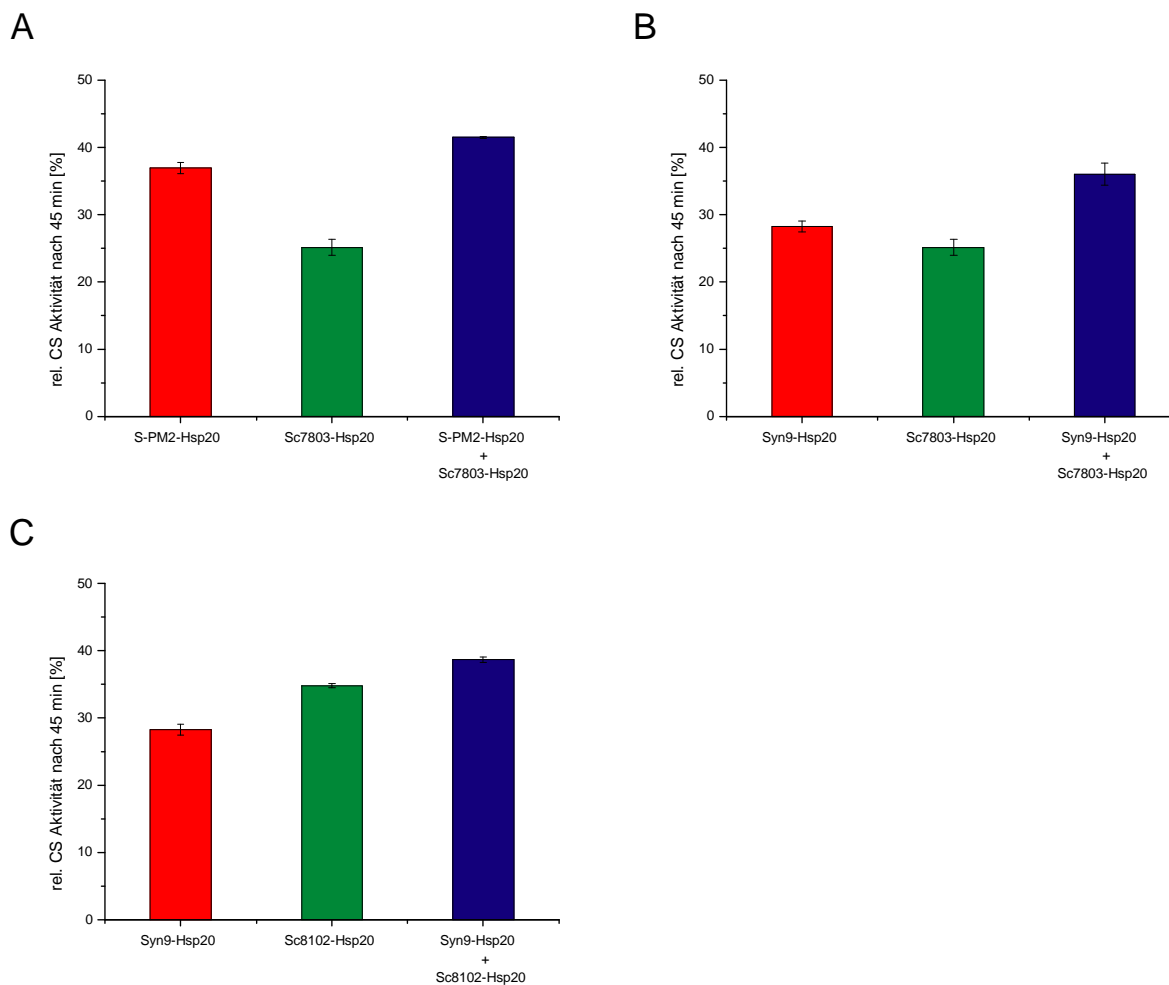


Abbildung 27: Verbesserte Reaktivierung durch die Kombination von viralem und cynaobakteriellem sHsps. Vergleich des Einflusses von den viralen, den cyanobakteriellen und der Kombination aus beiden sHsps auf die Reaktivierung von chemisch denaturierter CS. Die CS wurde für eine Stunde in 6 M GdmCl denaturiert und anschließend für eine Endkonzentration von 300 nM 100-fach in eine Lösung bestehend aus folgenden Substanzen verdünnt: 2 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 0,6 μM DnaK, 1,2 μM DnaJ, 0,6 μM GrpE und 2,4 μM Hsp20 – nur virales Hsp20 (rot), nur cyanobakterielles Hsp20 (grün) oder eine 1:1 Kombination aus beidem (blau). Die Lösungen wurden bei 35°C inkubiert und die CS Aktivität wurde nach 45 min bestimmt. Die CS Aktivität ist relativ zu der Aktivität vor der Denaturierung dargestellt. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen und die entsprechenden Fehlerbalken sind angegeben.

In dem Vergleich der Reaktivierung der CS mit Hilfe von KJE und einem viralen Hsp20, einem cyanobakteriellen Hsp20 oder einer Kombination aus beidem zeigt sich, dass durch die Kombination die höchsten Reaktivierungswerte erzielt werden können (Abbildung 27). Durch die Kombination von S-PM2-Hsp20 und Sc7803-Hsp20 konnte die CS zu über 40% reaktiviert werden. Der einzelne Einsatz führte nur zu einer Rückfaltung von 36% bzw. 25%. Im Falle eines additiven Zusammenwirkens hätte die Kombination also in einer Reaktivierung von etwa 30% resultieren müssen. Es ist also wahrscheinlich, dass die beiden sHsps nicht einzeln und unabhängig voneinander gearbeitet haben, sondern miteinander

interagiert haben und dadurch in synergistischer Weise ihre Effizienz gesteigert wurde. So wie es auch schon mit Phycoerythrin und Allophycocyanin als Substrat der Fall war.

Auch in den anderen Kombinationen von Syn9-Hsp20 mit den beiden cyanobakteriellen sHsps Sc7803-Hsp20 und Sc8102-Hsp20 ist diese Tendenz deutlich zu erkennen. Der Einsatz der einzelnen sHsps führt zu einer geringeren Rückfaltungseffizienz als die Kombination der beiden sHsps. Interessanterweise scheint es hier zu einer Interaktion der beiden sHsps zu kommen obwohl die Rückfaltung der CS bei nur 35°C durchgeführt wurde. In Kapitel 4.6.1 konnte mit Hilfe von Co-IPs nur eine Interaktion bei Temperaturen ab 45°C detektiert werden. Es scheinen also noch weitere Faktoren (Puffer, pH) neben der Temperatur eine wichtige Rolle für die Entstehung der Interaktion eine Rolle zu spielen.

Auch hier wurden nur die Kombinationen getestet, bei denen der Virus aus dem das virale sHsp stammt, den entsprechenden *Synechococcus* Stamm des cyanobakteriellen sHsps infizieren kann.

4.7 Analyse der Infektion von *Synechococcus* WH7803 mit Syn9

Um den Einfluss der Infektion auf das cyanobakterielle Photosystem zu untersuchen wurden mit Syn9 infizierte *Synechococcus* WH7803 Zellen zunächst durch Absorptionsspektroskopie analysiert. Gleichzeitig wurde untersucht, wie sich eine Erhöhung der Temperatur auf 35°C auf die Infektion und die Absorption der einzelnen Photosystemkomponenten auswirkt.

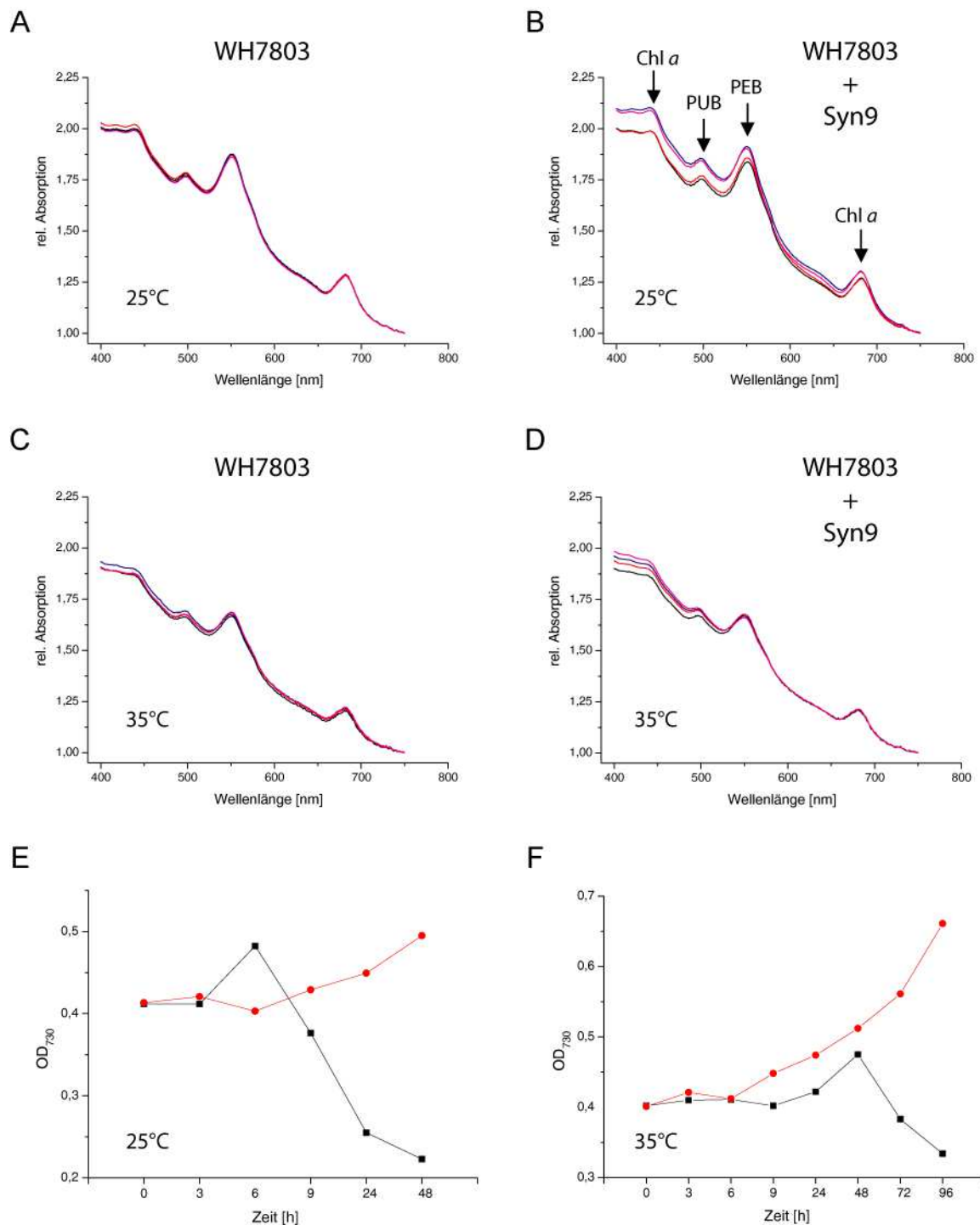


Abbildung 28: Analyse von Syn9 infizierten Synechococcus WH7803 Zellen durch Absorptionsspektroskopie. Von Syn9 infizierten Synechococcus WH7803 Kulturen wurden vor der Infektion (schwarz), 3 Std. (rot), 6 Std. (blau) und 9 Std. (pink) nach Infektion Proben genommen und Absorptionsspektren von 400-750 nm aufgenommen. Die Spektren wurden auf die OD₇₅₀ normiert um Unterschiede die durch verschiedene Zelldichten entstehen könnten zu eliminieren und eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Peaks die der Absorption von PUB, PEB und Chl *a* entsprechen sind in (B) eingezeichnet. Die Infektion mit Syn9 wurde bei 25°C (A) und (B) und bei 35°C (C) und (D) durchgeführt. Als Kontrolle wurden jeweils Proben von einer nicht infizierten Kultur (A) und (C) bei der gleichen Temperatur genommen. Der Verlauf der Infektion wurde über die OD₇₃₀ verfolgt (E) 25°C und (F) 35°C. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden von der mit Syn9 infizierten Kultur (schwarz) und von einer nicht infizierten Kontrolle (rot) Proben genommen und die OD₇₃₀ bestimmt.

Das *in vivo* Absorptionsspektrum von *Synechococcus* WH7803 sowohl von infizierten als auch von nicht infizierten Zellen weist zwei Peaks bei 500 und 550 nm auf die sich den Phycoerythrin-assoziierten Phycobilinen (PUB und PEB) zuordnen lassen. Durch den deutlich geringeren Anteil an Phycocyanin (640 nm) und Allophycocyanin (650 nm) sind hier keine Peaks mehr erkennbar. Die Peaks bei 680 und 440 nm sind hauptsächlich der Absorption von Chl *a* zuzuordnen. Durch das Normieren der Absorptionsspektren auf die Zelldichte (OD_{750}) (Wilson, Carr et al., 1996), zeigen sich deutliche Unterschiede im Vergleich der Absorptionsspektren der mit Syn9 infizierten Zellen (Abbildung 28B) und der nicht infizierten Kontrolle (Abbildung 28A). Die Signalstärke der Peaks die sich PE und Chl *a* zuordnen lassen nimmt 6 bzw. 9 Stunden nach der Infektion deutlich zu. Dies weist darauf hin, dass der zelluläre Anteil an PE und Chl *a* während des Infektionszyklus angestiegen ist. Die beiden Chromophore PUB und PEB werden mit verschiedenen Phycobiliproteinen assoziiert. PEB kann sowohl in PEI, PEII und PC gefunden werden, wohingegen PUB nur in PEII auftritt (Ong & Glazer, 1991). Dadurch weist die Erhöhung der PUB Absorption auf eine spezifische Anreicherung von PEII in den infizierten Zellen hin. Der ebenfalls erhöhte Anteil an Chl *a* könnte durch eine Strategie des Wirtes erklärt werden, wodurch er versucht den erhöhten Energiefluss in die Photosystem Reaktionszentren, verursacht durch die vergrößerte Anzahl an Lichtsammelpigmenten, zu bewältigen (Shan et al., 2008).

Findet die Infektion bei einer Stresstemperatur von 35°C statt, dann lässt sich kaum noch eine Erhöhung der Phycobiline PUB und PEB oder Chl *a* feststellen. Dies könnte mit einer Anpassungsphase des infizierten Wirtes bzw. des Virus an die ungewöhnlich hohe Temperatur zusammenhängen. Die eigentliche Phagenproduktion würde erst zu einem späteren Zeitpunkt stattfinden und damit auch die Anpassung des Photosystems an die höhere Energieanforderung während dieser Phase der Infektion.

Um die Anteile der Phycobiliproteine während der Infektion genauer zu untersuchen wurden zusätzlich Fluoreszenzspektren von Syn9 infizierten *Synechococcus* WH7803 Zellen aufgenommen. Die Spektren wurden bei einer Emissionswellenlänge von 490 nm aufgenommen, was der maximalen Absorption von PUB entspricht.

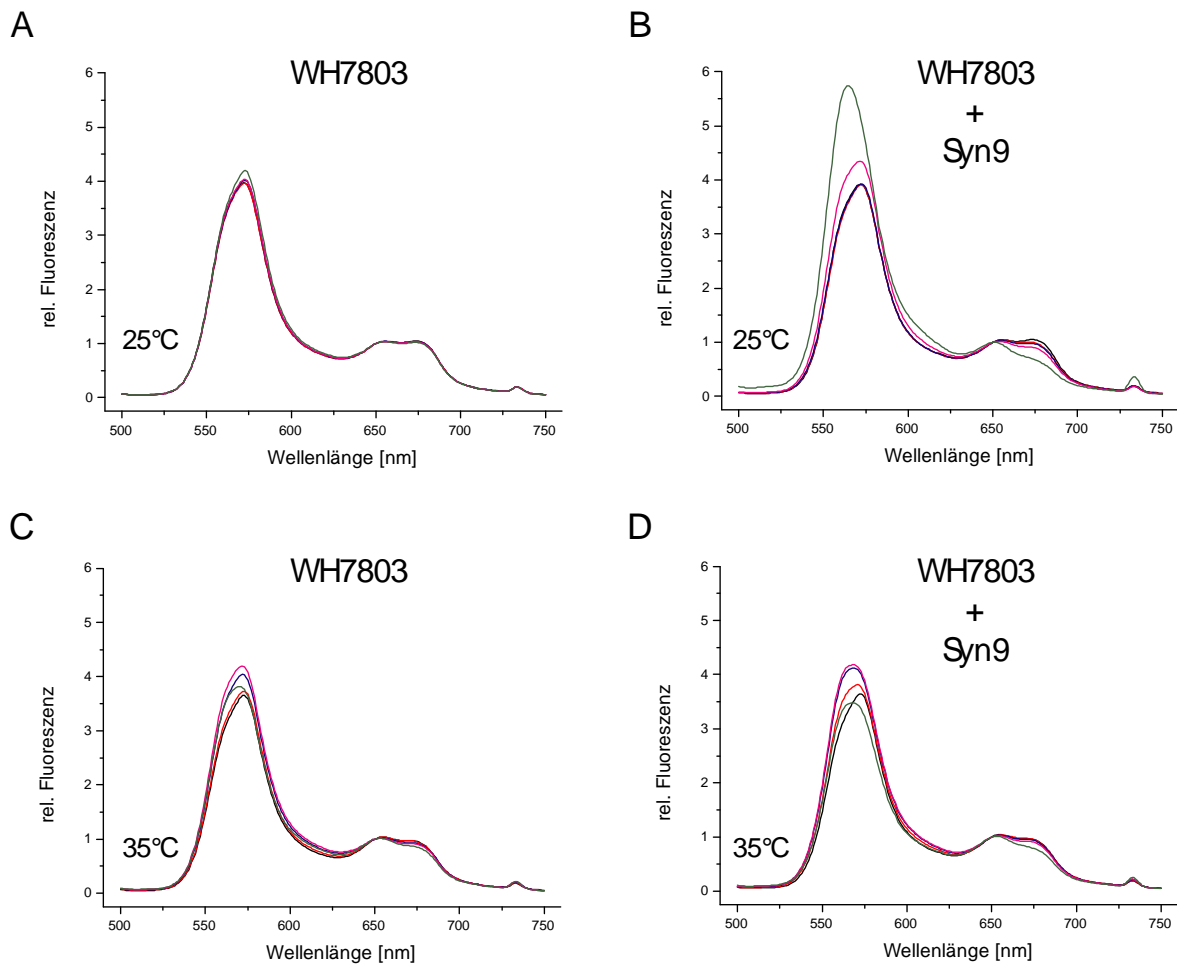


Abbildung 29: Analyse von Syn9 infizierten *Synechococcus* WH7803 Zellen durch Fluoreszenzspektroskopie. Von Syn9 infizierten *Synechococcus* WH7803 Kulturen wurden vor der Infektion (schwarz), 3 Std. (rot), 6 Std. (blau), 9 Std. (pink) und 24 Std (grün) nach Infektion Proben genommen und Fluoreszenzspektren von 500-750 nm bei einer Emissionswellenlänge von 490 nm aufgenommen. Die Spektren wurden auf das Phycoerythrin-Maximum bei 650 nm normiert, um Unterschiede die durch verschiedene Zelldichten entstehen könnten zu eliminieren und eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Infektion mit Syn9 wurde bei 25°C (A) und (B) und bei 35°C (C) und (D) durchgeführt. Als Kontrolle wurden jeweils Proben von einer nicht infizierten Kultur (A) und (C) bei der gleichen Temperatur genommen.

Das Fluoreszenzemissionsspektrum von *Synechococcus* WH7803 Zellen bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm zeigt zwei Hauptpeaks bei etwa 565 nm and 650 nm. Diese können der Emission von Phycoerythrin bzw. Phycocyanin zugeordnet werden (Ong & Glazer, 1991). Durch die Normierung der Fluoreszenzspektren auf das PC Maximum bei 650 nm werden deutliche Unterschiede in den Spektren bei 25°C zwischen der nicht infizierten Kultur und der mit Syn9 infizierten Kultur sichtbar (siehe Abbildung 29 A und B). Durch die Infektion nimmt der PE Emissions-Peak ab 9 h nach der Infektion deutlich an Intensität zu. 24 Stunden nach der Infektion ist das Signal fast 3-mal so hoch. Das zeigt, dass sich das Verhältnis von PE zu PC durch die Anreicherung von PE Molekülen ver-

schoben hat. Genauer ist die Erhöhung der Fluoreszenzintensität PEII zuzuschreiben, da die Anregung bei 490 nm dem Absorptionsmaximum des PEII assoziierten Chromophors PUB entspricht. Zusätzlich lässt sich eine Wellenlängenverschiebung des PE Peaks von 572 nm zu Beginn der Phageninfektion zu 565 nm 24 Stunden nach Infektionsstart beobachten. Diese Verschiebung deutet auf eine durch den Phagen induzierte Veränderung in dem relativen Verhältnis von PEI zu PEII hin (Shan et al., 2008). Im Gegensatz zu der PE Fluoreszenz hat das Verhältnis der relativen Fluoreszenz bei 680 nm zu der PC Fluoreszenz leicht abgenommen. Zu der Emission bei 680 nm tragen beide endständigen Akzeptoren der Phycobilisomen, also Allophycocyanin und Chl *a* bei. Die Abnahme der Emission bei 680 nm könnte also folglich durch eine teilweise Trennung der Phycobilisomen von PSII oder einer teilweisen Trennung der Stabstrukturen von dem Phycobilisom-Kern verursacht werden (Shan et al., 2008).

Wie auch schon bei der Analyse der Infektion durch Absorption konnte bei einer Infektion bei 35°C keine eindeutige Erhöhung des PE Anteils festgestellt werden. Sowohl in der Kontrolle als auch in der infizierten Kultur ergibt sich ein sehr ähnliches Bild der Fluoreszenzspektren. Allerdings ist auch hier eine leichte Verschiebung des PE Peaks zu kleineren Wellenlängen und damit hin zu PEII sichtbar (Abbildung 29 D). Die Infektion verläuft bei der erhöhten Temperatur von 35°C deutlich langsamer und somit findet vermutlich auch die Anpassung des Photosystems durch den Phagen an die seine optimalen Reproduktionsbedingungen dementsprechend verzögert statt (Abbildung 28 F).

4.8 Knock-down der viralen sHsps

Um den Einfluss der viralen sHsp auf die Infektion nachzuweisen, wurde ein Knock-down der sHsp geplant. Da ein direkter Knock-out von Phagen-Genen schwierig ist, wurde ein Antisense-Konstrukt der viralen sHsps für einen statistischen Knock-down der Gene konstruiert. Dafür wurden zunächst die entsprechenden Antisense-Sequenzen der viralen sHsps in einen pProEx Hta Vektor kloniert. Der hier enthaltene trc-Promotor konnte anschließend erfolgreich mit Hilfe entsprechend designter Primer zusammen mit der Antisense-Sequenz amplifiziert und in einen pRL153 Vektor kloniert werden. Von diesem Vektor ist bekannt, dass er sich in sowohl in *Prochlorococcus* als auch in *Synechococcus* replizieren kann (Brahamsha, 1996, Tolonen et al., 2006).

4.9 Transformation von Cyanobakterien

Nach der erfolgreichen Klonierung der Antisense-Sequenzen der viralen sHsps Syn9-Hsp20 und S-PM2-Hsp20 in den Vektor pRL153, sollten die Antisense-Konstrukte in *Synechococcus* WH7803 und WH8102 zur Beobachtung möglicher Unterschiede im Verlauf einer Phageninfektion durch den Knock-down der viralen sHsps, transformiert werden. Für die gut untersuchten Stämme *Synechocystis* 6803 und *Synechococcus* 7942 ist bekannt, dass sie natürlich transformierbar und dadurch leicht zugänglich für genetische Manipulationen sind (Golden, Brusslan et al., 1986). Für die hier untersuchten *Synechococcus* Stämme WH7803 und WH8102 konnte keine entsprechende direkte Transformierbarkeit festgestellt werden. Für einige cyanobakterielle Stämme ist die Transformation auch über Elektroporation möglich (Thiel & Poo, 1989), doch auch diese Methode war für die hier untersuchten Stämme nicht erfolgreich. Daher wurde als nächstes eine etwas aufwändigere Methode der Transformation, die Konjugation getestet.

4.9.1 Genetische Manipulation von Cyanobakterien durch Konjugation

Die Transformation von Cyanobakterien ist vielfältig und nicht immer einfach. Für *Prochlorococcus* Stämme gibt es noch keine Hinweise auf eine natürliche Kompetenz der Zellen oder eine Zugänglichkeit über Elektroporation (Tolonen et al., 2006). Allerdings konnte sowohl für *Prochlorococcus* als auch für die hier untersuchten *Synechococcus* Stämme eine genetische Manipulierbarkeit über Konjugation gezeigt werden (Brahamsha, 1996, Tolonen et al., 2006). Für die Konjugation wurde der *E. coli* Donor Stamm BW19851 verwendet, der das konjugative Plasmid pRK24 und das zu übertragende Plasmid pRL153 enthielt. Das konjugative Plasmid enthält die Informationen für die Kontaktaufnahme zu der Akzeptorzelle, so dass die Konjugationsbrücke für die DNA Übertragung ausgebildet werden kann. Nach der eigentlichen Konjugation wurden die Zellen in flüssiges Medium unter Kanamycin Selektion überführt und das Wachstum über die OD₇₃₀ überwacht. Durch das langsame Wachstum von Cyanobakterien kann es hier bis zu 50 Tage dauern bis die Zellen in Kanamycin haltigem Medium wachsen. Der pRL153 Vektor mit dem Antisense-Konstrukt der viralen sHsps konnte im Verlauf dieser Arbeit nicht erfolgreich mit Hilfe dieser Methode transformiert werden.

4.9.2 Biolistische Transfektion mit Hilfe einer *Gene-Gun*

Bei der biolistischen Transfektion werden mit DNA überzogene Partikel mit großer Geschwindigkeit auf die zu transfizierenden Zellen geschossen. Diese Art der Transfektion eignet sich normalerweise vor allem um einen ausgewählten Anteil an Zellen in Gewebeproben durch Fluoreszenz zu markieren.

Um diese Methode für Cyanobakterien anwenden zu können, wurden als Träger für die DNA Gold Nano-Partikel mit einem Durchmesser von 40 nm ausgewählt. Die normalerweise verwendeten Goldpartikel mit einem Durchmesser von 2 μm sind etwa halb so groß sind wie die Cyanobakterien selbst und damit ungeeignet für die Transfektion. Dass die biolistische Transfektion auch mit Nano-Partikeln mit nahezu identischer Effizienz möglich ist wurde bereits anhand von HEK 293 Zellen gezeigt (O'Brien & Lummis, 2011).

Es konnten *Gene-Gun* Patronen mit dem Antisense-Konstrukt von Syn9-Hsp20 und S-PM2-Hsp20 hergestellt werden und die Transfektion wurde mit auf Meerwasserplatten gespotteten Kulturen getestet (Woods & Zito, 2008). Bevor die Kulturen wieder in flüssiges Medium überführt wurden und die Selektion durch Antibiotikum begann, wurden die transfizierten Kulturen bei den für sie optimalen Bedingungen zunächst über Nacht inkubiert.

Zusätzlich zu den transfizierten Kulturen wurde auch immer eine nicht transfizierte Kultur als Kontrolle mit Antibiotikum versetzt. Das Wachstum beider Kulturen wurde durch regelmäßige Messungen der OD_{730} überwacht. Die OD_{730} sowohl der Kontrolle als auch der transfizierten Kulturen ist zunächst für 1-3 Tage leicht gestiegen bevor sie schnell bis auf annähernd null abgesunken ist. Dies war auch an dem Nachlassen der Farbigkeit der Kulturen deutlich zu erkennen.

Dass die biolistische transfektion mit Hilfe der *Gene-Gun* nicht erfolgreich war, kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte durch eine höher konzentrierte DNA, die Menge an DNA auf den Gold Nano-Partikeln erhöht werden und dadurch die Effizienz der Transfektion verbessert werden. Zum anderen könnte die Verteilung der Nano-Partikel in den Patronen ein Problem sein. Durch das wesentlich geringere Gewicht der Nano-Partikel im Vergleich zu den Gold Partikeln mit 2 μm Durchmesser sinken die Partikel nicht so schnell ab und lassen sich daher auch durch Rotation des Patronen-Schlauches über längere Zeit nur schwer gleichmäßig über den ganzen Patronen-Schlauch verteilen. Bisher wurde mit verschiedenen Abständen von 2-6 cm von den Zellen und mit einem Druck zwischen 140 und 180 PSI geschossen. Zusätzlich wurden die Zellen vor der Transfektion für 2

Stunden entweder bei 25 μ E oder im Dunkeln auf der Meerwasserplatte inkubiert, bis die Oberfläche abgetrocknet war. Durch die Vielzahl an Variablen ist es möglich, dass die richtige Kombination im Rahmen dieser Arbeit noch nicht gefunden wurde.

Zusammenfassend lässt sich allerdings sagen, dass bisher keine Transformation von *Synechococcus* WH7803 und WH8102 möglich war. Hierbei bleibt unklar, ob das auf eine grundsätzlich sehr schlechte Transformierbarkeit oder auf ungeeignete Methodiken zurückzuführen ist.

5 Diskussion

Die phylogenetische Analyse zeigt, dass die Cyanophagen ihr sHsp nicht durch horizontalen Gentransfer von ihrem Wirt, den Cyanobakterien erhalten haben. Die Cyanophagen zeigen eine nähere Verwandtschaft zu einer anderen Gruppe von Bakterien und Eukaryoten (Abbildung 8). Zu der Gruppe der nah verwandten Bakterien gehört unter anderem *Pelagibacter ubique*, was vermutlich eine der häufigsten Bakterienarten ist und in den Meeren auf der ganzen Welt gefunden werden kann (Suttle, 2007). Dies könnte darauf hinweisen, dass die Cyanophagen das sHsp von den bakteriellen Vorfahren von *P. ubique* über lateralen Gentransfer erhalten haben. Zusätzlich konnte ebenfalls über phylogenetische Untersuchungen gezeigt werden, dass Phagen die *Pelagibacter* infizieren eng verwandt sind mit Cyanophagen die *Synechococcus* und *Prochlorococcus* infizieren (Zhao et al., 2013). Auch hier zeigt, sich die enge Bindung der sHsp codierenden Phagen an eine Gruppe von Bakterien, die heute nicht mehr direkt von diesen Cyanophagen infiziert werden können und daher nicht mehr zu deren Wirten gehören. Interessanterweise gehören zu den 39 in der PFAM Datenbank enthaltenen Viren, die ein sHsp auf ihrem Genom kodiert haben nicht nur 37 Cyanophagen, sondern auch Pelagibacter Phagen. Diese Beobachtung unterstreicht zusätzlich die Annahme der phylogenetischen Abstammung der Cyanophagen-sHsps von Bakterien die wohl früher auch durch diese Phagen infiziert werden konnten.

Interessant ist auch, dass die cyanobakteriellen sHsps einen Stamm ausbilden, der dem der Pflanzen phylogenetisch näher steht als dem der Cyanophagen (Abbildung 8) Cyanobakterien gehören zu den ältesten Organismen der Erde und Fossilien dieser Bakterien deuten auf eine bemerkenswerte Ähnlichkeit der gegenwertigen Spezies mit denen die seit über zwei Milliarden Jahren ausgestorbenen sind hin (Schopf, 2006). Die α -Kristallin-Domäne der sHsp Familie scheint daher mindestens zwei Milliarden Jahre alt zu sein (Maaroufi & Tanguay, 2013), und die Pflanzen könnten ihr sHsp Gen von cyanobakteriellen Endosymbionten erhalten haben, aus denen später die Chloroplasten hervorgegangen sind (Maaroufi & Tanguay, 2013).

Für die phylogenetische Analyse wurden alle in der PFAM Datenbank hinterlegten Viren mit einem kleinen Hitzeschockprotein verwendet. Von den 39 in der Datenbank vorhandenen Viren gehören 37 zu der Gruppe der Cyanophagen. Die beiden anderen sind ebenfalls Viren mariner Bakterien (Pelagibacter Phage und Vibrio Phage). All diese Cyanophagen beinhalten nur eine einzelne Kopie des sHsp Gens wohingegen ihre cyanobakteriellen Wir-

te bis zu sieben Kopien enthalten. Es gibt aber auch Cyanophagen und auch Cyanobakterien die kein sHsp Gen in ihrem Genom enthalten haben. Dazu gehören alle *Prochlorococcus* Stämme aber auch einige *Synechococcus* Stämme, die wohl das oder die zugehörige(n) Gen(e) wieder verloren haben (Maaroufi & Tanguay, 2013). Dass *Prochlorococcus* Stämme keine sHsp Gen enthalten, aber *Prochlorococcus* Phagen mit sHsp Gen existieren unterstützt hierbei die These, dass die Phagen das Gen nicht von den aktuellen cyanobakteriellen Wirten erhalten haben. Das bedeutet auch, dass sich die Gene für sHsps in Cyanophagen über einen relativ langen Zeitraum der Ko-Evolution in den Cyanophagen erhalten haben, was wiederum auf ihre funktionelle Bedeutung für die Phagenreplikation schließen lässt.

Die Existenz der konservierten Hsp20/ α -Kristallin Domäne wird von den Sequenzbasierten Protein Familien Datenbanken als einziges Kriterium verwendet um Proteine zu der Familie der kleinen Hitzeschockproteine zuzuordnen. Für die hier untersuchten viralen und cyanobakteriellen sHsps sollte überprüft werden, ob sie zusätzlich zu der α -Kristallin Domäne auch die charakteristischen strukturellen und funktionellen Eigenschaften von sHsps aufweisen. Zusammengefasst zeigen die hier dargestellten Experimente, dass alle fünf Proteine tatsächlich strukturelle und funktionelle Mitglieder der sHsp Protein Familie sind.

Dies ist von speziellem Interesse, da Hsp17 aus *Synechocystis* sp PCC6803 und HspA aus *Synechococcus vulcanus* bis jetzt die einzigen beiden untersuchten cyanobakteriellen sHsps sind.

Für die viralen und cyanobakteriellen sHsps ergaben sich typische Sekundärstrukturanteile mit einem hohen β -Faltblatt Anteil (Tabelle 4.1), die gut mit denen anderer sHsps aus unterschiedlichen Organismen übereinstimmen (Haslbeck, 2006, Kim et al., 1998, van Montfort et al., 2001). Ebenso sind alle fünf sHsps in großen oligomeren Strukturen von 14-60 Untereinheiten organisiert (Abbildung 11). HspA aus *S.vulcanus* bildet ähnlich wie die beiden viralen sHsps Syn9-Hsp20 und S-PM2 ein Oligomer aus 24 Untereinheiten (Roy, Hiyama et al., 1999). Im Gegensatz dazu formt Hsp17 aus *Synechocystis* ein deutlich kleineres Tetramer mit nur 70 kDa, wobei auch ein schwaches Oktamer oder Dodekamer gebildet werden kann (Torok, Goloubinoff et al., 2001). Eine Dissoziation wie für Syn9-Hsp20 bei erhöhten Temperaturen konnte bei Hsp17 ebenfalls nicht beobachtet werden (Torok et al., 2001).

Von den hier untersuchten sHsps wurde der Oligomerisierungszustand bei Temperaturen über 37°C nur für das virale sHsp Syn9-Hsp20 beeinflusst. Für Hsp26 wurde ebenfalls Dissoziation bei Temperaturen über 37°C in das Dimer beschrieben, dabei war die Disso-

ziation für die Aktivität des sHsp nötig (Haslbeck et al., 1999). Für Syn9-Hsp20 scheint die Dissoziation für die Aktivität allerdings nicht essentiell zu sein, da die Reaktivierung der CS auch bei 35°C noch beeinflusst werden konnte.

Die Temperaturstabilität der viralen und cyanobakteriellen sHsps wurde mit Hilfe von TSA und CD-Spektroskopie analysiert. Für Sc8102-Hsp20, Syn9-Hsp20 und S-PM2-Hsp20 haben sich dadurch Schmelztemperaturen in einem Bereich von 62-69°C ergeben (Abbildung 13), wie sie sich auch bei anderen sHsps wie α -Kristallin oder Hsp22 finden lassen (Kazakov et al., 2009, Santini et al., 1992). Da der klassische Chaperonassay der zur Bestimmung der Chaperonaktivität eingesetzt wird bei 43°C durchgeführt wird, sollten hier für diese drei Proteine keine Schwierigkeiten auftreten. Auch wenn für Sc7803-Hsp20 und P-SSM4-Hsp20 niedrigere Schmelztemperaturen von 50°C bzw. 44°C ermittelt wurden, so wurde dennoch ihre Chaperonaktivität nicht beeinflusst.

Ebenso zeigen die untersuchten viralen und cyanobakteriellen sHsps Chaperonaktivität hinsichtlich der Unterdrückung der thermischen Aggregation von CS. Dabei sind alle fünf Proteine in der Lage die Aggregation von CS konzentrationsabhängig zu inhibieren, wobei bei den cyanobakteriellen sHsps schon ein geringes molares Verhältnis von sHsp:CS von 1:1 zu einer halbmaximalen Unterdrückung der Aggregation führt (Abbildung 15). Eine ähnlich wirkungsvolle Inhibierung der Aggregation seines Substrates wurde für HspA aus *S. vulcanus* beobachtet (Roy et al., 1999). Noch effektiver kann HspA die Aggregation von Malatdehydrogenase (MDH) unterdrücken. Hier kann selbst im Überschuss (3,4:1 MDH:sHsp) des sHsps schon eine maximale Unterdrückung erreicht werden (Roy et al., 1999). Für die viralen sHsps werden molare Verhältnisse von 0,25 bis 0,8:1 für die halbmaximale Unterdrückung der Aggregation der CS benötigt. Auch diese Verhältnisse bewegen sich in einem für kleine Hitzeschockproteine typischem Bereich, wie etwa Hsp26 aus Hefe, bei dem das Verhältnis für die halbmaximale Unterdrückung für verschiedene Substrate zwischen 0,1 und 1:1 schwankt (Haslbeck et al., 1999, Jakob et al., 1993).

Für die hier untersuchten sHsps konnte gezeigt werden, dass sich ein stabiler Enzym-Substrat-Komplex aus sHsp und CS bilden kann. Auch wenn Hsp17 aus *Synechocystis* in nativer Form im Gegensatz zu den hier untersuchten sHsps als deutlich kleineres Tetramer vorliegt, so bildet es doch ebenso große Enzym-Substrat-Komplexe aus (Torok et al., 2001).

Auch die thermische Inaktivierung der CS wurde durch die Anwesenheit der viralen und cyanobakteriellen sHsps beeinflusst. Alle fünf Proteine konnten die frühen Entfaltungszu-

stände der CS kurzzeitig stabilisieren, so dass diese auch ohne die Hilfe weiterer Chaperone oder ATP wieder in den aktiven Zustand zurückfalten können (Abbildung 17). Diese transiente Bindung zwischen sHsp und Substrat konnte auch schon für andere sHsps wie Hsp17.7 aus *D. radiodurans* gezeigt werden (Bepperling et al., 2012). Das cyanobakterielle HspA aus *S. vulcanus* ist allerdings nicht in der Lage die thermische Inaktivierung von MDH zu unterdrücken (Roy et al., 1999).

Cyanobakterien verfügen über ein Hsp70 (DnaK/DnaJ/GrpE) und ein GroEL/ES Chaperon System, an welche Substrat-Proteine aus dem sHsp-Substrat-Komplex für eine ATP abhängige Rückfaltung transferiert werden können. Einige Cyanobakterien wie auch die beiden hier untersuchten Stämme *Synechococcus* WH7803 und WH8102 besitzen zur besseren Abspaltung des Substrates das Hsp100 Chaperon System. Für die viralen und cyanobakteriellen sHsps konnte eine effiziente Übertragung von denaturierter CS an das Hsp70 Chaperon System für eine anschließende Rückfaltung gezeigt werden. Dabei konnte eine Rückfaltung der CS von über 35% für die beiden sHsps S-PM2-Hsp20 und Sc8102-Hsp20 erreicht werden (Abbildung 19). Der Einsatz von Hsp100 in Kombination mit dem Hsp70 Chaperon System hat die Rückfaltungseffizienz nicht wesentlich verbessert, was darauf schließen lässt, dass eine Kooperation mit dem Hsp70 System für eine effiziente Rückfaltung ausreichend ist. Auch für Hsp17 aus *Synechocystis* konnte die Rückfaltung von Substraten mit Hilfe der Hsp70/40 und GroEL/ES Systeme gezeigt werden. Allerdings kann die Rückfaltungseffizienz von MDH in der Anwesenheit von Hsp17 durch die Addition von Hsp70 und GroEL/ES im Vergleich zu Hsp70 alleine fast verdoppelt werden (Torok et al., 2001).

Die Transkription von Hsp17 aus *Synechocystis* wird nicht nur durch hohe Temperaturen und Licht Bedingungen reguliert (Torok et al., 2001), sondern auch durch Änderungen in der physikalischen Ordnung der Thylakoidmembranen (Torok et al., 2001). Zusätzlich dazu, findet sich das meiste neu synthetisierte Hsp17 gebunden an die Thylakoidmembranen (Horváth, Glatz et al., 1998). Ein Hsp17 Knock-out zeigt eine verminderte Wachstumsrate für mindestens 5 Tage nach einem Hitzeschock und auch die Aktivität der photosynthetischen Sauerstoff Entwicklung in Hitze gestressten Zellen ist deutlich verringert. Die Inaktivierung von Hsp17 führt also zu Hitze sensitiveren Zellen, was bedeutet, dass Hsp17 eine wichtige Rolle in der zellulären Hitzeschock Antwort von *Synechocystis* spielt (Lee et al., 1998).

Um zu überprüfen, ob die phagen-kodierten sHsps einen Einfluss auf die Infektion haben, wurde ein Knock-down der viralen sHsps mittels Anti-sense Konstrukten der entsprechenden sHsps geplant. Hierbei sei angemerkt, dass im Gegensatz zu einigen anderen gut untersuchten Cyanobakterien (z.B. *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Golden et al., 1986, Williams, 1988)) für die hier untersuchten Stämme die als Wirte für die Cyanophagen nur die Konjugation als Transformationsmethode publiziert ist (Brahamsha, 1996). Die für die Konjugation verwendeten Plasmide sind in den entsprechenden Stämmen replikationsfähig (Brahamsha, 1996) und wurden auch in dieser Arbeit verwendet... Bisher war die Transformation der Anti-sense Konstrukte in die cyanobakteriellen Stämme *Synechococcus* WH7803 und WH8102 auch noch nicht erfolgreich. Die Infektion mit entsprechenden Knock-down Zellen konnte daher noch nicht durchgeführt werden. Für zukünftige Studien müssten hierzu erst die zugehörigen molekularbiologischen Methoden weiter etabliert werden.

Auch wenn der Einfluss der viralen sHsps auf die Infektion noch nicht direkt analysiert werden konnte, so sollten dennoch potentielle *in vivo* Substrate der viralen und cyanobakteriellen sHsps identifiziert werden. Für die Identifizierung der spezifisch mit Hsp17 interagierenden *in vivo* Substrate während eines Hitzeschocks wurden bereits mit Hilfe von Immunopräzipitation und Affinitätschromatographie 42 Proteine gefunden und 13 davon mittels Massenspektrometrie identifiziert. Allerdings konnte keines der identifizierten potentiellen Substrate photosynthetischen Membranproteinen zugeordnet werden (Basha, Lee et al., 2004a).

Im Gegensatz dazu konnten in der vorliegenden Arbeit zwei Proteine die dem cyanobakteriellen Photosystem angehören mit Hilfe von Co-Immunopräzipitation und SDS-PAGE und anschließender massenspektrometrischer Analyse als potentielle Interaktionspartner des viralen sHsps Syn9-Hsp20 identifiziert werden. Wenn Syn9-Hsp20 mit den löslichen Proteinen von *Synechococcus* WH7803 erhitzt wurde konnte mit Hilfe von SDS-PAGE ein schützender Effekt auf ein etwa 20 kDa großes Protein, welches als Phycoerythrin identifiziert wurde beobachtet werden (Abbildung 21). In einem sehr ähnlichen Experiment von Pike et al. (2001) wurde Hsp17 aus *Synechocystis* ebenfalls mit den löslichen Proteinen aus *Synechococcus* PCC7942 erhitzt (Pike, Grieve et al., 2001). Durch den Zusatz von Hsp17 konnte ein Verlust der Farbtintensität verhindert werden, was zu der Vermutung führte, dass es sich bei dem vor Aggregation geschützten Protein im Bereich von 15-18 kDa um Phycocyanin handelt (Pike et al., 2001). Wie auch bei dem in dieser Arbeit untersuchten

viralen sHsp Syn9-Hsp20 wurde das vorherrschende Lichtsammelpigment des Photosynthese Apparates durch die Zugabe des sHsps geschützt. Die Interaktion von Syn9-Hsp20 und Phycoerythrin konnte mittels Co-IP durch unspezifische Bindungen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Dafür konnte ein anderer Interaktionspartner von Syn9-Hsp20 und den Proteinen des Photosynthese Apparats von *Synechococcus* WH7803 gefunden werden. Neben dem Phycobiliprotein Phycoerythrin scheint auch Allophycocyanin ein *in vivo* Substrat von Syn9-Hsp20 zu sein.

Für beide Proteine konnte gezeigt werden, dass Syn9-Hsp20 in der Lage ist sie bei erhöhten Temperaturen zu stabilisieren und vor der Aggregation zu bewahren. Der Effekt der Stabilisierung konnte durch eine Kombination des viralen sHsps mit einem cyanobakteriellen sHsps wie Sc7803-Hsp20 oder Sc8102-Hsp20 noch verstärkt werden. Besonders deutlich ist die Stabilisierung in den ersten 10 Minuten nach Beginn des Hitzeschocks zu erkennen (Abbildung 25). Hier wird durch den Einsatz der Kombination aus viralem und cyanobakteriellem sHsp ein Fluoreszenzsignal von Phycoerythrin erreicht, dass den zu erwartenden Wert, ausgehend von den beiden sHsps alleine um 10 bzw. 20% übersteigt. Dies weist auf eine synergistische Kooperation der beiden Proteine hin, wodurch die Stabilisierung des Photosystems noch verstärkt wird. Dieser Effekt konnte auch *in vitro* bei der Reaktivierung der chemisch denaturierten CS beobachtet werden (Abbildung 27). Der Einsatz von viralem und cyanobakteriellem sHsp in Kombination hat den erwarteten Wert der Reaktivierung der CS ausgehend von der Reaktivierung der beiden sHsps alleine zwischen 20 und 40% übertroffen. Dass die beiden sHsps miteinander interagieren können konnte auch über Co-IP bestätigt werden. Allerdings konnte hier nur eindeutig eine Interaktion zwischen Syn9-Hsp20 und Sc8102-Hsp20 bei Temperaturen ab 37°C nachgewiesen werden (Abbildung 26). Für Kombinationen mit dem cyanobakteriellen Sc7803-Hsp20 war die Interaktion zu schwach bzw. unspezifisch und konnte daher nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die beobachteten stabilisierenden Effekte für HspA aus *S. vulcanus* gegenüber dem cyanobakteriellem PSII unter Hitzestress *in vivo* (Nakamoto, Suzuki et al., 2000). Dabei wurde HspA in *Synechococcus* sp. PCC7942 exprimiert und einem Hitzeschock von 50°C ausgesetzt. Auf die Wild-Typ Zellen hatte der Hitzeschock einen letalen Effekt wohingegen die Überexpression von HspA die Licht Absorptionsfähigkeiten von Phycocyanin, aufrechterhalten konnte und dadurch die Zellen geschützt hat (Nakamoto et al., 2000).

Die Photosynthese stellt die empfindlichste der zellulären Funktionen in photosynthetischen Organismen dar und im speziellen die Stabilität des PSII Komplexes reagiert empfindlich gegenüber Hitze und anderen Umwelt Einflüssen (Balogi, Cheregi et al., 2008). Es ist aber gerade ein gut funktionierender photosynthetischer Apparat, der sich für die Cyanophagen als wichtig herausgestellt hat. Während der Infektion benötigen die Cyanophagen das Photosystem des Wirtes als Energiequelle für die Phagenvermehrung und die DNA Replikation (Lindell, Jaffe et al., 2005a). Interessanterweise führt die Infektion durch Cyanophagen zu einer Hochregulierung des Lichtsammelpigmentes Phycoerythrin in dem marinen *Synechococcus* Stamm WH7803 (Abbildung 29). Dadurch kann eine größere Menge Lichtquanten aufgenommen werden und die Energie steht für die Phagenreplikation zur Verfügung. Eine leichte Anreicherung von Chl *a* weist ebenfalls auf einen erhöhten Energiefluss in Richtung der Photosystem Reaktionszentren während der Infektion hin (Shan et al., 2008). Diese Korrelation zwischen einer erhöhten Produktion von Phycoerythrin und seiner Stabilisation durch die auf den Cyanophagen kodierten sHsps verdeutlicht noch einmal die Wichtigkeit des Photosystems für den viralen Infektionszyklus.

Wie das Beispiel von HspA aus *S. vulcanus* zeigt, sind auch cyanobakterielle sHsps in der Lage die Lichtsammelpigmente wie Phycocyanin des PSII zu stabilisieren (Nakamoto & Honma, 2006). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen allerdings, dass die beiden Phycobiliproteine Phycoerythrin und Allophycocyanin besser stabilisiert werden, wenn nicht nur ein cyanobakterielles sHsp sondern auch ein virales sHsps anwesend ist. Für den Phagen könnte dadurch während der Infektion ein Vorteil entstehen, wenn er Cyanobakterien, die selbst ein sHsp kodiert haben, infiziert. Die stabilisierende Wirkung des phagen-kodierten sHsps würde verstärkt werden. Da Cyanophagen wie Syn9 aber auch Cyanobakterien ohne eigenes sHsp infizieren können ist eine stabilisierende Wirkung auch ohne eine Kooperation mit einem cyanobakteriellen sHsp erforderlich.

6 Zusammenfassung

Viren haben üblicherweise nur sehr wenige für sie zur Replikation wichtige oder vorteilhafte Gene auf ihrem Genom kodiert. In vorangegangenen Arbeiten wurde durch bioinformatische Analysen gezeigt, dass auch einige Virenproteine mit einer α -Kristallin Domäne existieren. Die α -Kristallin Domäne kennzeichnet die Familie der kleinen Hitzeschockproteine. Diese gehören zu den molekularen Chaperonen und sind in der Lage, nicht native Substrate-Proteine zu binden und dadurch ihre irreversible Aggregation zu verhindern. Durch die Weitergabe des Substrates an ATP-abhängige Chaperonsysteme wie Hsp70 kann eine (Rück-)Faltung des Substrates in seine native Form stattfinden.

Da es sich bei den Viren mit einer α -Kristallin Domäne und damit mit einem potentiellen sHsp fast ausschließlich um marine Cyanophagen handelt, war ein Ziel dieser Arbeit zu verstehen, warum sHsps auf dem Genom dieser Phagen kodiert sind. Daher wurden für diese Arbeit drei dieser Phagen, S-PM2, P-SSM4 und Syn9, ausgewählt. Sie gehören zu der Familie der Myoviridae und haben die für ihre Klasse charakteristisch großen Genome, auf denen einige cyanobakteriellen Proteine kodiert sind, unter anderem das photosynthetische Gen *psbA*.

Zusätzlich wurden zwei *Synechococcus* und zwei *Prochlorococcus* Stämme ausgewählt, welche von den oben genannten Phagen infiziert werden können. Die beiden *Synechococcus* Stämme haben im Gegensatz zu den beiden *Prochlorococcus* Stämmen jeweils ebenfalls ein sHsp auf ihrem Genom kodiert.

Die phagen-kodierten potentiellen sHsps und die beiden cyanobakteriellen sHsps wurden in dieser Arbeit hinsichtlich der charakteristischen funktionellen und strukturellen Eigenschaften von sHsps untersucht und miteinander verglichen. Sie konnten dadurch eindeutig der Familie der kleinen Hitzeschockproteine zugeordnet werden.

Durch phylogenetische Analyse konnte gezeigt werden, dass die Cyanophagen ihr sHsp nicht durch horizontalen Gentransfer von ihrem Wirt den Cyanobakterien erhalten haben. Interessanterweise gilt dies nicht für einige Photosynthese-Gene, für die bereits gezeigt wurde, dass sie auf diese Weise ihren Weg in die Cyanophagen gefunden haben. Die viralen sHsps zeigen eine deutlich nähere Verwandtschaft zu dem bakteriellen sHsp aus *Pelagibacter ubique*, einer der häufigsten Bakterienarten, die in Meeren auf der ganzen Welt vertreten ist, als zu den cyanobakteriellen sHsps. Dass auch der Peligabacter Phage

zu den wenigen viralen Vertretern mit einem potentiellen sHsp gehört, unterstreicht die Annahme einer Abstammung des cyanophagen-sHsps von dem sHsp aus *P. ubiqua*.

Des Weiteren konnten zwei potentielle *in vivo* Substrate des viralen sHsps Syn9-Hsp20 aus dem photosynthetischen Apparat seines Wirts identifiziert werden. Syn9-Hsp20 ist in der Lage, die Aggregation der beiden Phycobiliproteine Phycoerythrin und Allophycocyanin bei erhöhten Temperaturen zu unterdrücken. Durch eine Interaktion des viralen sHsps mit einem cyanobakteriellem sHsp kann der stabilisierende Effekt noch verstärkt werden. Dies konnte gegenüber der *in vivo* Substrate Phycoerythrin und Allophycocyanin als auch dem Modellsupstrat Citratsynthase beobachtet werden.

Während der Infektion benötigen die Cyanophagen das Photosystem des Wirtes als Energiequelle für die Phagenvermehrung und die DNA Replikation. Dies wird vor allem durch die beiden ursprünglich cyanobakteriellen Gene *psbA* und *psbD*, die auf den Cyanophagen kodiert sind, deutlich. Sie werden benötigt, um während der Infektion die beiden Kernreaktionszentren des PSII laufend zu ersetzen, da sie durch Photobleaching leicht beschädigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der zelluläre Anteil an Phycoerythrin als Reaktion auf die Infektion spezifisch angereichert wird. Die Stabilisierung von Phycoerythrin als Teil des cyanobakteriellen Photosystems durch phagen-kodierte sHsps scheint somit für den Infektionszyklus der Cyanophagen von Vorteil zu sein, um die Photosynthese als Energiequelle so effizient wie möglich nutzen zu können.

7 Summary

Viruses usually only have very few genes encoded on their genome which are advantageous or important for their replication. In previous studies bioinformatic analysis revealed that there are also some virus proteins with an α -crystallin domain existing. The α -crystallin domain is the characteristic feature of the small heat shock protein family. The sHsps belong to the molecular chaperones and are able to bind non-native substrate proteins and thereby prevent their irreversible aggregation. By the transfer of the substrate to ATP-dependent chaperon systems like Hsp70 the substrate can be refolded to its native structure.

As viruses with an α -crystallin domain and therefore with a potential sHsp are almost exclusively marine cyanophages, one aim of this thesis was to understand why these sHsps are encoded on the genome of phages. Hence, three of these phages, Syn9, S-PM2 and P-SSM4, were chosen for this thesis. They belong to the family of myoviridae with the distinctive large genomes, which also have some cyanobacterial proteins encoded, such as the photosynthetic gen *psbA*.

Additionally two *Synechococcus* and two *Prochlorococcus* strains were chosen, which can be infected by the phages named above. In contrast to the two *Prochlorococcus* strains the two *Synechococcus* strains do each have one sHsp encoded on their genome. The phage-encoded potential sHsps and the two cyanobacterial sHsps were analyzed in this thesis with regards to their characteristic functional and structural features of sHsps and were compared to each other. This way they could be clearly assigned to the small heat shock protein family.

Phylogenetic analysis revealed that cyanophages did not receive their sHsp through horizontal gene transfer from their cyanobacterial host. Interestingly the same is not true for some photosynthetic genes, as has been already shown that they came to the cyanophages by horizontal gene transfer. The viral sHsps show a much closer relationship to the bacterial sHsp from *Pelagibacter ubique*, one of the most abundant bacteria which can be found in oceans all over the world, than to the cyanobacterial sHsps. The pelagibacter phage also belongs to few representatives of viruses with a potential sHsps, which also underlines the hypothesis that cyanophages acquired the sHsp gene from the bacterial *P. ubique* ancestor. Furthermore two potential in vivo substrates of the viral sHsps Syn9-Hsp20 could be identified from the photosynthetic host apparatus. Syn9-Hsp20 is able to suppress the aggrega-

tion of the two phycobiliproteins phycoerythrin and allophycocyanin at elevated temperatures. By the interaction of the viral sHsp with a cyanobacterial one the stabilizing effect could be increased. This could be observed in the *in vivo* substrates phycoerythrin and allophycocyanin as well as the model substrate CS.

Cyanophages need the host's photosystem during the infection as energy source for phage reproduction and DNA replication. This is especially emphasized by the two originally cyanobacterial genes *psbA* and *psbD*. They are needed by the phage throughout infection for the replacement of the reaction core centers of PSII, as they are constantly damaged by light. The results of this thesis show that the cellular content of phycoerythrin is specifically increased in response to phage infection. The stabilization of phycoerythrin as part of the cyanobacterial photosystem by phage-encoded sHsps seems to be advantageous for the cyanophage infectious cycle in order to use the photosynthesis as energy source as efficient as possible.

8 Abkürzungsverzeichnis

Ac-CoA	Acetyl-Coenzym A
Amp	Ampicillindihydrat
APC	Allophycocyanin
APS	Amoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASW	Artificial sea water (künstliches Meerwasser)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
BSV	Branch support value
CD	Circulardichroismus
Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>
CoA	Coenzym A
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
CS	Citratsynthase
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds-DNA	double stranded DNA (doppelsträngige DNA)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
ES Komplex	Enzym-Substrat-Komplex
FF	fast-forward
h	Hour (Stunde)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HL	high-light
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hsp	Hitzeschockprotein
I	Isoleucin
Kana	Kanamycin

KJE	DanK/DnaJ/GrpE
IPTG	Isopopyl- β -D-galactopyranosid
L	Leucin
LB	Luria broth
LL	low-light
LMW	Low-molecular-weight
min	Minute
mRNA	messenger RNA
NCMA	National Center for Marine Algae and Microbiota
OAA	Oxalacetat
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PC	Phycocyanin
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PEB	Phycoerythrobilin
PEP	Phosphoenolpyruvat
pI	Isoelektrischer Punkt
PS	Photosystem
PUB	Phycourobilin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Size-exclusion-chromatography (Größenausschlusschromatographie)
sHsp	Small heat shock protein (Kleines Hitzeschockprotein)
SV	Säulenvolumen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEV	Tobacco etch virus
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TSA	Thermal-Shift-Assay
UE	Untereinheiten
UpM	Umdrehungen pro Minute

UV	Ultraviolett
Y	Tyrosin
μE	Microeinstein

9 Literaturverzeichnis

- Adir N, Zer H, Shochat S, Ohad I (2003) Photoinhibition—a historical perspective. *Photosynthesis Research* 76: 343-370
- Åhrman E, Lambert W, Aquilina JA, Robinson CV, Emanuelsson CS (2007) Chemical cross-linking of the chloroplast localized small heat-shock protein, Hsp21, and the model substrate citrate synthase. *Protein science* 16: 1464-1478
- Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic biology* 55: 539-52
- Aquilina JA, Benesch JL, Ding LL, Yaron O, Horwitz J, Robinson CV (2005) Subunit exchange of polydisperse proteins: mass spectrometry reveals consequences of alphaA-crystallin truncation. *The Journal of biological chemistry* 280: 14485-91
- Augusteyn RC (2004) alpha-crystallin: a review of its structure and function. *Clinical & experimental optometry* 87: 356-66
- Avrani S, Schwartz DA, Lindell D (2012) Virus-host swinging party in the oceans: Incorporating biological complexity into paradigms of antagonistic coexistence. *Mobile genetic elements* 2: 88-95
- Bagneris C, Bateman OA, Naylor CE, Cronin N, Boelens WC, Keep NH, Slingsby C (2009) Crystal structures of alpha-crystallin domain dimers of alphaB-crystallin and Hsp20. *J Mol Biol* 392: 1242-52
- Balogi Z, Cheregi O, Giese KC, Juhasz K, Vierling E, Vass I, Vigh L, Horvath I (2008) A mutant small heat shock protein with increased thylakoid association provides an elevated resistance against UV-B damage in *synechocystis* 6803. *The Journal of biological chemistry* 283: 22983-91
- Barber J, Andersson B (1992) Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends in biochemical sciences* 17: 61-66
- Barlow R, Alberte R (1985) Photosynthetic characteristics of phycoerythrin-containing marine *Synechococcus* spp. *Marine Biology* 86: 63-74
- Barry BA, Boerner RJ, de Paula JC (1994) The use of cyanobacteria in the study of the structure and function of photosystem II. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, pp 217-257. Springer
- Basha E, Lee GJ, Breci LA, Hausrath AC, Buan NR, Giese KC, Vierling E (2004a) The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress in vivo indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions. *The Journal of biological chemistry* 279: 7566-75

- Basha E, Lee GJ, Demeler B, Vierling E (2004b) Chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from wheat. *European journal of biochemistry / FEBS* 271: 1426-36
- Basha E, O'Neill H, Vierling E (2012) Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends in biochemical sciences* 37: 106-17
- Benson R, Martin E (1981) Effects of photosynthetic inhibitors and light-dark regimes on the replication of cyanophage SM-2. *Archives of Microbiology* 129: 165-167
- Bepperling A, Alte F, Kriehuber T, Braun N, Weinkauff S, Groll M, Haslbeck M, Buchner J (2012) Alternative bacterial two-component small heat shock protein systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 20407-12
- Berman-Frank I, Lundgren P, Chen Y-B, Küpper H, Kolber Z, Bergman B, Falkowski P (2001) Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Science (New York, NY)* 294: 1534-1537
- Bova MP, McHaourab HS, Han Y, Fung BK (2000) Subunit exchange of small heat shock proteins. Analysis of oligomer formation of alphaA-crystallin and Hsp27 by fluorescence resonance energy transfer and site-directed truncations. *The Journal of biological chemistry* 275: 1035-42
- Brady JP, Garland D, Douglas-Tabor Y, Robison WG, Jr., Groome A, Wawrousek EF (1997) Targeted disruption of the mouse alpha A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 884-9
- Brahamsha B (1996) A genetic manipulation system for oceanic cyanobacteria of the genus *Synechococcus*. *Applied and environmental microbiology* 62: 1747-1751
- Brand LE, Sunda WG, Guillard RR (1986) Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 96: 225-250
- Braun N, Zacharias M, Peschek J, Kastenmuller A, Zou J, Hanzlik M, Haslbeck M, Rappsilber J, Buchner J, Weinkauff S (2011) Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone alphaB-crystallin elucidated by a triple hybrid approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 20491-6
- Brüssow H, Canchaya C, Hardt W-D (2004) Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 560-602

- Buchner J, Grallert H, Jakob U (1998) Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein. *Methods in enzymology* 290: 323-38
- Caspers GJ, Leunissen JA, de Jong WW (1995) The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "alpha-crystallin domain". *Journal of molecular evolution* 40: 238-48
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular biology and evolution* 17: 540-52
- Chang Z, Primm TP, Jakana J, Lee IH, Serysheva I, Chiu W, Gilbert HF, Quioco FA (1996) Mycobacterium tuberculosis 16-kDa antigen (Hsp16. 3) functions as an oligomeric structure in vitro to suppress thermal aggregation. *Journal of Biological Chemistry* 271: 7218-7223
- Chen F, Lu J (2002) Genomic sequence and evolution of marine cyanophage P60: a new insight on lytic and lysogenic phages. *Applied and environmental microbiology* 68: 2589-2594
- Cheng G, Basha E, Wysocki VH, Vierling E (2008) Insights into small heat shock protein and substrate structure during chaperone action derived from hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry* 283: 26634-26642
- Chevenet F, Brun C, Banuls AL, Jacq B, Christen R (2006) TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC bioinformatics* 7: 439
- Clokier MR, Shan J, Bailey S, Jia Y, Krisch HM, West S, Mann NH (2006a) Transcription of a 'photosynthetic' T4-type phage during infection of a marine cyanobacterium. *Environmental microbiology* 8: 827-35
- Clokier MR, Shan J, Bailey S, Jia Y, Krisch HM, West S, Mann NH (2006b) Transcription of a 'photosynthetic' T4-type phage during infection of a marine cyanobacterium. *Environmental microbiology* 8: 827-835
- Daggett V, Fersht A (2003) The present view of the mechanism of protein folding. *Nature reviews Molecular cell biology* 4: 497-502
- de Jong WW, Caspers GJ, Leunissen JA (1998) Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily. *International journal of biological macromolecules* 22: 151-62
- de Jong WW, Leunissen JA, Voorter CE (1993) Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. *Molecular biology and evolution* 10: 103-26
- de Miguel N, Braun N, Bepperling A, Kriehuber T, Kastenmuller A, Buchner J, Angel SO, Haslbeck M (2009) Structural and functional diversity in the family of small heat

- shock proteins from the parasite *Toxoplasma gondii*. *Biochimica et biophysica acta* 1793: 1738-48
- Dereeper A, Audic S, Claverie JM, Blanc G (2010) BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC evolutionary biology* 10: 8
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research* 36: W465-9
- Dill KA, MacCallum JL (2012) The protein-folding problem, 50 years on. *Science (New York, NY)* 338: 1042-6
- Dinner AR, Sali A, Smith LJ, Dobson CM, Karplus M (2000) Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends in biochemical sciences* 25: 331-9
- Dobson CM, Karplus M (1999) The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Current opinion in structural biology* 9: 92-101
- Dudich IV, Zav'yalov VP, Pfeil W, Gaestel M, Zav'yalova GA, Denesyuk AI, Korpela T (1995) Dimer structure as a minimum cooperative subunit of small heat-shock proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1253: 163-8
- Dufresne A, Salanoubat M, Partensky F, Artiguenave F, Axmann IM, Barbe V, Duprat S, Galperin MY, Koonin EV, Le Gall F (2003) Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 10020-10025
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32: 1792-7
- Ehrnsperger M, Gräber S, Gaestel M, Buchner J (1997) Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *The EMBO journal* 16: 221-229
- Ellis J (1987) Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328: 378-9
- Ellis RJ (2001) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends in biochemical sciences* 26: 597-604
- Ellis RJ, Minton AP (2006) Protein aggregation in crowded environments. *Biological chemistry* 387: 485-97
- Ellis RJ, van der Vies SM, Hemmingsen SM (1989) The molecular chaperone concept. *Biochemical Society symposium* 55: 145-53

- Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10: 2606-17
- Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer EL, Tate J, Punta M (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic acids research* 42: D222-30
- Fu X, Shi X, Yan L, Zhang H, Chang Z (2013) In vivo substrate diversity and preference of small heat shock protein IbpB as revealed by using a genetically incorporated photo-cross-linker. *The Journal of biological chemistry* 288: 31646-54
- Gantt E, Lipschultz C (1973) Energy transfer in phycobilisomes from phycoerythrin to allophycocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 292: 858-861
- Georgopoulos C, Welch WJ (1993) Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annual review of cell biology* 9: 601-34
- Giese KC, Basha E, Catague BY, Vierling E (2005) Evidence for an essential function of the N terminus of a small heat shock protein in vivo, independent of in vitro chaperone activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 18896-901
- Giese KC, Vierling E (2002) Changes in oligomerization are essential for the chaperone activity of a small heat shock protein in vivo and in vitro. *The Journal of biological chemistry* 277: 46310-8
- Golden SS, Brusslan J, Haselkorn R (1986) Genetic engineering of the cyanobacterial chromosome. *Methods in enzymology* 153: 215-231
- Gribaldo S, Lumia V, Creti R, Conway de Macario E, Sanangelantoni A, Cammarano P (1999) Discontinuous occurrence of the hsp70 (dnaK) gene among Archaea and sequence features of HSP70 suggest a novel outlook on phylogenies inferred from this protein. *Journal of bacteriology* 181: 434-43
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology* 52: 696-704
- Hall AR, Scanlan PD, Morgan AD, Buckling A (2011) Host-parasite coevolutionary arms races give way to fluctuating selection. *Ecology letters* 14: 635-642
- Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475: 324-32
- Haslbeck M (2002) sHsps and their role in the chaperone network. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 59: 1649-57

- Haslbeck M (2006) Recombinant expression and in vitro refolding of the yeast small heat shock protein Hsp42. *International journal of biological macromolecules* 38: 107-14
- Haslbeck M, Buchner J (2015) Assays to characterize molecular chaperone function in vitro. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 1292: 39-51
- Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurtner D, Buchner J (2005a) Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nature structural & molecular biology* 12: 842-6
- Haslbeck M, Miess A, Stromer T, Walter S, Buchner J (2005b) Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol. The cooperation of Hsp26 with Ssa1 and Hsp104. *The Journal of biological chemistry* 280: 23861-8
- Haslbeck M, Vierling E (2015) A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *J Mol Biol* 427: 1537-48
- Haslbeck M, Walke S, Stromer T, Ehrnsperger M, White HE, Chen S, Saibil HR, Buchner J (1999) Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *The EMBO journal* 18: 6744-51
- Haslbeck M, Weinkauff S, Buchner J (2015) Regulation of the chaperone function of small Hsps. In *The Big Book on Small Heat Shock Proteins*, pp 155-178. Springer
- Havel JM (2006) *Asymmetrische Synthesen mit phototrophen Mikroorganismen*. In Technische Universität München
- Hilton GR, Lioe H, Stengel F, Baldwin AJ, Benesch JL (2013) Small heat-shock proteins: paramedics of the cell. *Topics in current chemistry* 328: 69-98
- Horváth I, Glatz A, Varvasovszki V, Török Z, Páli T, Balogh G, Kovács E, Nádasi L, Benkő S, Joó F (1998) Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17 as a “fluidity gene”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 3513-3518
- Horwitz J (1992) Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 10449-53
- Horwitz J (2009) Alpha crystallin: the quest for a homogeneous quaternary structure. *Experimental eye research* 88: 190-4
- Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *The Journal of biological chemistry* 268: 1517-20
- Jehle S, Rajagopal P, Bardiaux B, Markovic S, Kuhne R, Stout JR, Higman VA, Klevit RE, van Rossum BJ, Oschkinat H (2010) Solid-state NMR and SAXS studies provide a structural basis for the activation of alphaB-crystallin oligomers. *Nature structural & molecular biology* 17: 1037-42

- Jehle S, Vollmar BS, Bardiaux B, Dove KK, Rajagopal P, Gonen T, Oschkinat H, Klevit RE (2011) N-terminal domain of α B-crystallin provides a conformational switch for multimerization and structural heterogeneity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 6409-6414
- Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W, Krauß N (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411: 909-917
- Kanamaru S, Leiman PG, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Mesyanzhinov VV, Arisaka F, Rossmann MG (2002) Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. *Nature* 415: 553-557
- Kaneko T, Tabata S (1997) Complete genome structure of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant and Cell Physiology* 38: 1171-1176
- Kappe G, Leunissen JA, de Jong WW (2002) Evolution and diversity of prokaryotic small heat shock proteins. *Progress in molecular and subcellular biology* 28: 1-17
- Karen F Sugarbeet Unigenes Assigned to KEGG Pathways.
- Kazakov AS, Markov DI, Gusev NB, Levitsky DI (2009) Thermally induced structural changes of intrinsically disordered small heat shock protein Hsp22. *Biophysical chemistry* 145: 79-85
- Kim KK, Kim R, Kim SH (1998) Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* 394: 595-9
- Kitagawa M, Matsumura Y, Tsuchido T (2000) Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters* 184: 165-71
- Komarek J, Kastovsky J, Mares J, Johansen JR (2014) Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86: 295-335
- Kriehuber T, Rattei T, Weinmaier T, Bepperling A, Haslbeck M, Buchner J (2010) Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24: 3633-42
- Labrie SJ, Samson JE, Moineau S (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology* 8: 317-327
- Laganowsky A, Eisenberg D (2010) Non-3D domain swapped crystal structure of truncated zebrafish alphaA crystallin. *Protein science : a publication of the Protein Society* 19: 1978-84

- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* (Oxford, England) 23: 2947-8
- Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR, Vierling E (1997) A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *The EMBO journal* 16: 659-671
- Lee GJ, Vierling E (2000) A Small Heat Shock Protein Cooperates with Heat Shock Protein 70 Systems to Reactivate a Heat-Denatured Protein. *Plant Physiology* 122: 189-198
- Lee S, Prochaska DJ, Fang F, Barnum SR (1998) A 16.6-kilodalton protein in the Cyanobacterium *synechocystis* sp. PCC 6803 plays a role in the heat shock response. *Current microbiology* 37: 403-7
- Leiman P, Kanamaru S, Mesyanzhinov V, Arisaka F, Rossmann M (2003) Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 60: 2356-2370
- Lentze N, Aquilina JA, Lindbauer M, Robinson CV, Narberhaus F (2004) Temperature and concentration-controlled dynamics of rhizobial small heat shock proteins. *European Journal of Biochemistry* 271: 2494-2503
- Leroux MR, Melki R, Gordon B, Batelier G, Candido EP (1997) Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *The Journal of biological chemistry* 272: 24646-56
- Lindell D, Jaffe JD, Johnson ZI, Church GM, Chisholm SW (2005a) Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection. *Nature* 438: 86-89
- Lindell D, Jaffe JD, Johnson ZI, Church GM, Chisholm SW (2005b) Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection. *Nature* 438: 86-9
- Lindell D, Sullivan MB, Johnson ZI, Tolonen AC, Rohwer F, Chisholm SW (2004) Transfer of photosynthesis genes to and from *Prochlorococcus* viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 11013-8
- Maaroufi H, Tanguay RM (2013) Analysis and phylogeny of small heat shock proteins from marine viruses and their cyanobacteria host. *PloS one* 8: e81207
- MacCoss MJ, McDonald WH, Saraf A, Sadygov R, Clark JM, Tasto JJ, Gould KL, Wolters D, Washburn M, Weiss A, Clark JI, Yates JR, 3rd (2002) Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 7900-5

- Mann EL, Ahlgren N, Moffett JW, Chisholm SW (2002) Copper toxicity and cyanobacteria ecology in the Sargasso Sea. *Limnology and oceanography* 47: 976-988
- Mann NH (2005) The third age of phage. *PLoS biology* 3: e182
- Matuszewska M, Kuczyńska-Wiśnik D, Laskowska E, Liberek K (2005) The small heat shock protein IbpA of *Escherichia coli* cooperates with IbpB in stabilization of thermally aggregated proteins in a disaggregation competent state. *Journal of Biological Chemistry* 280: 12292-12298
- McHaourab HS, Godar JA, Stewart PL (2009) Structure and mechanism of protein stability sensors: chaperone activity of small heat shock proteins. *Biochemistry* 48: 3828-37
- Mchaourab HS, Lin Y-L, Spiller BW (2012) Crystal structure of an activated variant of small heat shock protein Hsp16. 5. *Biochemistry* 51: 5105-5112
- Miller ES, Kutter E, Mosig G, Arisaka F, Kunisawa T, Rügner W (2003) Bacteriophage T4 genome. *Microbiology and molecular biology reviews* 67: 86-156
- Mogk A, Deuerling E, Vorderwulbecke S, Vierling E, Bukau B (2003) Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Molecular microbiology* 50: 585-95
- Moore LR, Goericke R, Chisholm SW (1995) Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*: influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. *Marine ecology progress series* Oldendorf 116: 259-275
- Mulligan VK, Chakrabarty A (2013) Protein misfolding in the late-onset neurodegenerative diseases: common themes and the unique case of amyotrophic lateral sclerosis. *Proteins* 81: 1285-303
- Nakamoto H, Honma D (2006) Interaction of a small heat shock protein with light-harvesting cyanobacterial phycocyanins under stress conditions. *FEBS letters* 580: 3029-34
- Nakamoto H, Suzuki N, Roy SK (2000) Constitutive expression of a small heat-shock protein confers cellular thermotolerance and thermal protection to the photosynthetic apparatus in cyanobacteria. *FEBS letters* 483: 169-74
- Narberhaus F (2002) Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 66: 64-93; table of contents

- O'Brien JA, Lummis SC (2011) Nano-biolytics: a method of biolytic transfection of cells and tissues using a gene gun with novel nanometer-sized projectiles. *BMC biotechnology* 11: 1
- Ong L, Glazer A (1991) Phycoerythrins of marine unicellular cyanobacteria. I. Bilin types and locations and energy transfer pathways in *Synechococcus* spp. phycoerythrins. *Journal of Biological Chemistry* 266: 9515-9527
- Ono T-A, Murata N (1981) Chilling susceptibility of the blue-green alga *Anacystis nidulans* I. Effect of growth temperature. *Plant physiology* 67: 176-181
- Palenik B, Haselkorn R (1992) Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyllb-containing prokaryotes.
- Pasta SY, Raman B, Ramakrishna T, Rao Ch M (2004) The IXI/V motif in the C-terminal extension of alpha-crystallins: alternative interactions and oligomeric assemblies. *Molecular vision* 10: 655-62
- Patel S, Vierling E, Tama F (2014) Replica exchange molecular dynamics simulations provide insight into substrate recognition by small heat shock proteins. *Biophysical journal* 106: 2644-2655
- Paumann M, Regelsberger G, Obinger C, Peschek GA (2005) The bioenergetic role of dioxygen and the terminal oxidase (s) in cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1707: 231-253
- Peschek J, Braun N, Franzmann TM, Georgalis Y, Haslbeck M, Weinkauff S, Buchner J (2009) The eye lens chaperone alpha-crystallin forms defined globular assemblies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 13272-7
- Pike CS, Grieve J, Badger MR, Price GD (2001) Thermoprotective properties of small heat shock proteins from rice, tomato and *Synechocystis* sp. PCC6803 overexpressed in, and isolated from, *Escherichia coli*. *Functional Plant Biology* 28: 1219-1229
- Pisciotta JM, Zou Y, Baskakov IV (2010) Light-dependent electrogenic activity of cyanobacteria. *PloS one* 5: e10821
- Poulain P, Gelly JC, Flatters D (2010) Detection and architecture of small heat shock protein monomers. *PloS one* 5: e9990
- Pulz O (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology* 57: 287-293
- Pulz O, Gross W (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology* 65: 635-648

- Richmond CS, Glasner JD, Mau R, Jin H, Blattner FR (1999) Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic acids research* 27: 3821-35
- Richter K, Haslbeck M, Buchner J (2010) The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular cell* 40: 253-66
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General microbiology* 111: 1-61
- Roy SK, Hiyama T, Nakamoto H (1999) Purification and characterization of the 16-kDa heat-shock-responsive protein from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which is an α -crystallin-related, small heat shock protein. *European Journal of Biochemistry* 262: 406-416
- Rubio FC, Camacho FG, Sevilla J, Chisti Y, Grima EM (2003) A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. *Biotechnology and Bioengineering* 81: 459-473
- Rutherford SL, Lindquist S (1998) Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396: 336-42
- Santini S, Mordente A, Meucci E, Miggiano G, Martorana G (1992) Conformational stability of bovine α -crystallin. Evidence for a destabilizing effect of ascorbate. *Biochemical Journal* 287: 107-112
- Scanlan DJ, West NJ (2002) Molecular ecology of the marine cyanobacterial genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *FEMS microbiology ecology* 40: 1-12
- Scheibel T, Buchner J (2006) Protein aggregation as a cause for disease. *Handbook of experimental pharmacology*: 199-219
- Schlegel H (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. überarbeitete Auflage/unter Mitarbeit von Christiane Zaborosch. In Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Schopf JW (2006) Fossil evidence of Archaean life. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 361: 869-885
- Seaburg KG, Parked BC, Wharton RA, Simmons GM (1981) Temperature-growth responses of algal isolates from antarctic oases. *Journal of Phycology* 17: 353-360
- Shan J, Jia Y, Clokie MR, Mann NH (2008) Infection by the 'photosynthetic' phage S-PM2 induces increased synthesis of phycoerythrin in *Synechococcus* sp. WH7803. *FEMS microbiology letters* 283: 154-61
- Shashidharamurthy R, Koteiche HA, Dong J, McHaourab HS (2005) Mechanism of chaperone function in small heat shock proteins: dissociation of the HSP27 oligomer

- is required for recognition and binding of destabilized T4 lysozyme. *The Journal of biological chemistry* 280: 5281-9
- Singh AK, Summerfield TC, Li H, Sherman LA (2006) The heat shock response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and regulation of gene expression by HrcA and SigB. *Archives of microbiology* 186: 273-286
- Srivastava AK, Rai AN, Neilan BA (2013) *Stress biology of cyanobacteria: molecular mechanisms to cellular responses*. CRC Press,
- Stengel F, Baldwin AJ, Painter AJ, Jaya N, Basha E, Kay LE, Vierling E, Robinson CV, Benesch JLP (2010) Quaternary dynamics and plasticity underlie small heat shock protein chaperone function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 2007-2012
- Stomp M, Huisman J, Stal LJ, Matthijs HC (2007) Colorful niches of phototrophic microorganisms shaped by vibrations of the water molecule. *The ISME journal* 1: 271-82
- Sullivan MB, Coleman ML, Weigele P, Rohwer F, Chisholm SW (2005) Three *Prochlorococcus* cyanophage genomes: signature features and ecological interpretations. *PLoS biology* 3: e144
- Sullivan MB, Lindell D, Lee JA, Thompson LR, Bielawski JP, Chisholm SW (2006) Prevalence and evolution of core photosystem II genes in marine cyanobacterial viruses and their hosts. *PLoS biology* 4: e234
- Sullivan MB, Waterbury JB, Chisholm SW (2003) Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Nature* 424: 1047-51
- Suttle CA (2007) Marine viruses--major players in the global ecosystem. *Nature reviews Microbiology* 5: 801-12
- Swanson RV, Ong L, Wilbanks SM, Glazer A (1991) Phycoerythrins of marine unicellular cyanobacteria. II. Characterization of phycobiliproteins with unusually high phycourobilin content. *Journal of Biological Chemistry* 266: 9528-9534
- Takeda K, Hayashi T, Abe T, Hirano Y, Hanazono Y, Yohda M, Miki K (2011) Dimer structure and conformational variability in the N-terminal region of an archaeal small heat shock protein, StHsp14.0. *Journal of structural biology* 174: 92-9
- Techtmann SM (2009) *A Genomic and Biochemical Characterization of Carbon Monoxide Utilizing Thermophilic Bacteria*. ProQuest,
- Thiel T, Poo H (1989) Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. *Journal of bacteriology* 171: 5743-5746

- Thomas JG, Baneyx F (1998) Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG *In vivo*. *Journal of bacteriology* 180: 5165-72
- Ting CS, Rocap G, King J, Chisholm SW (2002) Cyanobacterial photosynthesis in the oceans: the origins and significance of divergent light-harvesting strategies. *Trends in microbiology* 10: 134-142
- Tolonen AC, Liszt GB, Hess WR (2006) Genetic manipulation of *Prochlorococcus* strain MIT9313: green fluorescent protein expression from an RSF1010 plasmid and Tn5 transposition. *Applied and environmental microbiology* 72: 7607-7613
- Torok Z, Goloubinoff P, Horvath I, Tsvetkova NM, Glatz A, Balogh G, Varvasovszki V, Los DA, Vierling E, Crowe JH, Vigh L (2001) *Synechocystis* HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 3098-103
- Treweek TM, Ecroyd H, Williams DM, Meehan S, Carver JA, Walker MJ (2007) Site-directed mutations in the C-terminal extension of human alphaB-crystallin affect chaperone function and block amyloid fibril formation. *PloS one* 2: e1046
- Treweek TM, Meehan S, Ecroyd H, Carver JA (2014) Small heat-shock proteins: important players in regulating cellular proteostasis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72: 429-451
- Trun N, Trempy J (2003) Bacteriophage. *Fundamental Bacterial Genetics*
- Tyedmers J, Mogk A, Bukau B (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature reviews Molecular cell biology* 11: 777-88
- Udgaonkar JB (2008) Multiple routes and structural heterogeneity in protein folding. *Annual review of biophysics* 37: 489-510
- Urbach E, Scanlan DJ, Distel DL, Waterbury JB, Chisholm SW (1998) Rapid diversification of marine picophytoplankton with dissimilar light-harvesting structures inferred from sequences of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (Cyanobacteria). *Journal of molecular evolution* 46: 188-201
- van Montfort RL, Basha E, Friedrich KL, Slingsby C, Vierling E (2001) Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nature structural biology* 8: 1025-30
- Veinger L, Diamant S, Buchner J, Goloubinoff P (1998) The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *Journal of Biological Chemistry* 273: 11032-11037

- Waterbury JB (2006) The cyanobacteria— isolation, purification and identification. In *The prokaryotes*, pp 1053-1073. Springer
- Waterbury JB, Watson SW, Guillard RR, Brand LE (1979) Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. *Nature* 277: 293-294
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* 47: 325-338
- Wehrmeyer W (1983) Organization and composition of cyanobacterial and rhodophycean phycobilisomes. *Photosynthetic prokaryotes: cell differentiation and function*: 1-22
- White HE, Orlova EV, Chen S, Wang L, Ignatiou A, Gowen B, Stromer T, Franzmann TM, Haslbeck M, Buchner J, Saibil HR (2006) Multiple distinct assemblies reveal conformational flexibility in the small heat shock protein Hsp26. *Structure* (London, England : 1993) 14: 1197-204
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 6578-6583
- Wiegand G, Remington SJ (1986) Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry* 15: 97-117
- Wilbanks S, de Lorimier R, Glazer AN (1991) Phycoerythrins of marine unicellular cyanobacteria. III. Sequence of a class II phycoerythrin. *Journal of Biological Chemistry* 266: 9535-9539
- Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF (1999) Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 112: 531-52
- Williams JG (1988) [85] Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods in enzymology* 167: 766-778
- Wilson WH, Carr NG, Mann NH (1996) The effect of phosphate status on the kinetics of cyanophage infection in the oceanic cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH78031. *Journal of Phycology* 32: 506-516
- Wolf E, Schübler A (2005) Phycobiliprotein fluorescence of *Nostoc punctiforme* changes during the life cycle and chromatic adaptation: characterization by spectral confocal laser scanning microscopy and spectral unmixing. *Plant, Cell & Environment* 28: 480-491
- Woods G, Zito K (2008) Preparation of gene gun bullets and biolistic transfection of neurons in slice culture. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*: e675-e675

- Zeidner G, Bielawski JP, Shmoish M, Scanlan DJ, Sabehi G, Béjà O (2005) Potential photosynthesis gene recombination between *Prochlorococcus* and *Synechococcus* via viral intermediates. *Environmental microbiology* 7: 1505-1513
- Zhao Y, Temperton B, Thrash JC, Schwalbach MS, Vergin KL, Landry ZC, Ellisman M, Deerinck T, Sullivan MB, Giovannoni SJ (2013) Abundant SAR11 viruses in the ocean. *Nature* 494: 357-60
- Zimmerman SB, Trach SO (1991) Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 222: 599-620
- Zinser ER, Coe A, Johnson ZI, Martiny AC, Fuller NJ, Scanlan DJ, Chisholm SW (2006) *Prochlorococcus* ecotype abundances in the North Atlantic Ocean as revealed by an improved quantitative PCR method. *Applied and environmental microbiology* 72: 723-32
- Zwanzig R, Szabo A, Bagchi B (1992) Levinthal's paradox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 20-2

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Johannes Buchner für die Möglichkeit meine Arbeit an seinem Lehrstuhl anfertigen zu können bedanken, für das Vertrauen in meine Arbeit und die Freiheit bei der Bearbeitung dieses neuen Themenbereichs.

Ein besonderer Dank gilt Martin Haslbeck für die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung, die wertvollen Anregungen und das Interesse, dass er meiner Arbeit entgegengebracht hat.

Prof. Dr.-Ing. Weuster-Botz danke ich für die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl die Kultivierung der Cyanobakterien durchführen zu können. Besonderer Dank gilt dabei Dr. Kathrin Castiglione für die tolle Zusammenarbeit und die vielen hilfreichen Tipps im Umgang mit Cyanobakterien.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Sevil Weinkauff und Christoph Kaiser für die TEM Aufnahmen meiner sHsps und deren nicht immer einfacher Auswertung bedanken.

Vielen Dank auch an die vielen Mitglieder des Lehrstuhls für Biotechnologie, die für eine tolle Atmosphäre und auch interessante fachliche Diskussionen gesorgt haben. Dabei möchte ich mich vor allem bei meiner Labor- und später auch Bürokollegin Patzi bedanken, ohne die es bestimmt nicht so lustig gewesen wäre und die mich immer wieder motivieren konnte weiter zu machen. Ein besonderer Dank gilt vor allem auch meinen Kollegen aus Büro 2 Katrin, Marina, Christine und Chris sowie meinen Kollegen aus Büro 6 Chrissy, Philipp und Patzi für die immer mal wieder willkommene Ablenkung vom Laboralltag.

Ein großer Dank gilt auch meine Kollegen außerhalb des Lehrstuhls, die mich schon seit dem ersten Semester begleiten. Vielen Dank für die schöne gemeine Zeit und die interessanten fächerübergreifenden Gespräche Freitag Mittag.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen Mädels, die mich immer unterstützt haben und auf die ich mich immer verlassen kann. Ich weiß was ich an euch hab!

Der größte Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Alex, für die Unterstützung und die Geduld die sie für mich aufbringen mussten. Vielen Dank, ohne Euch wäre dies alles nicht möglich gewesen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

München,

Sabine Rittinger