

Systembiologie

Biosynthese von Glycerin in *Dunaliella tertiolecta* unter Salzstress

LINDA KEIL, NORBERT MEHLMER, DANIEL GARBE, THOMAS BRÜCK
WERNER SIEMENS-LEHRSTUHL FÜR SYNTHETISCHE BIOTECHNOLOGIE, TU MÜNCHEN,
GARCHING

The microalgae *Dunaliella tertiolecta* phototrophically generates glycerol as an osmolyte in response to salt stress. This biogenic carbon sink is also a platform intermediate for the chemical sector. A synergistic genome and time resolved proteome analysis deciphered the metabolic pathways activated under salt stress. Immediately (30 min) Ca^{2+} signaling pathways and ions channels are activated, while in the longer term (24 h) cellular energy production and homeostasis pathways are upregulated.

DOI: 10.1007/s12268-025-2374-3
© The Author(s) 2025

■ Mikroalgen sind effiziente photosynthetische Mikroorganismen, die das Treibhausgas CO_2 in hochwertige Stoffe umwandeln. Ausgewählte Mitglieder der *Dunaliella*-Mikroalgenfamilie können zellulär Glycerin bilden

und sehr hohe Salzkonzentrationen (ca. 5,5 M NaCl) tolerieren [1,2]. Glycerin wirkt hier als Osmolyt gegen den hohen osmotischen Druck und verhindert so die Zell-Lyse [3]. Glycerin wird entweder durch die photo-

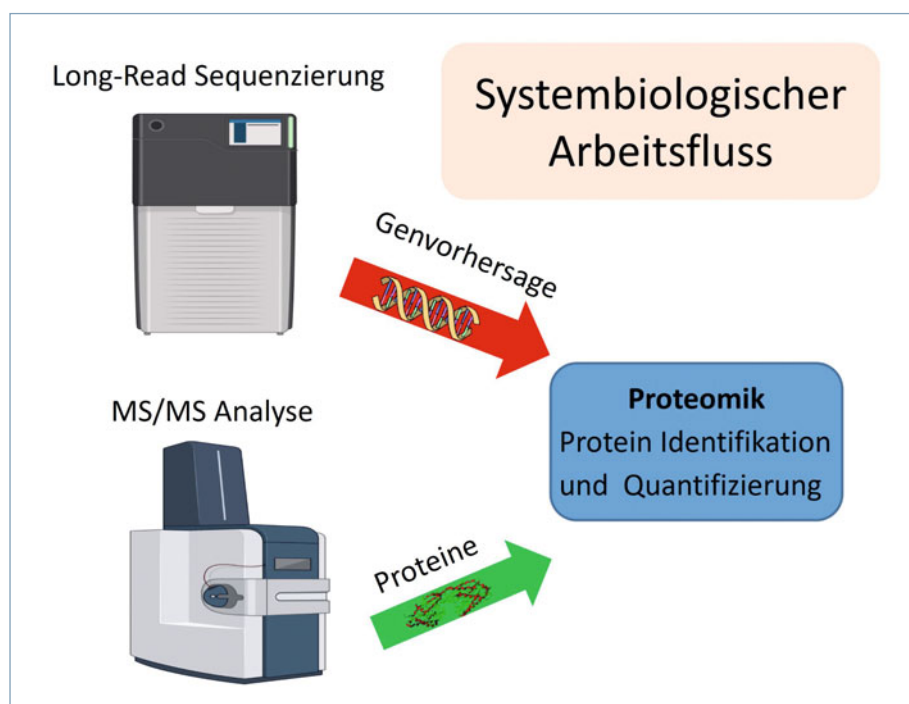
synthetische Fixierung von CO_2 oder durch den Abbau von intrazellulär akkumulierter Stärke synthetisiert [4].

Die Algen-basierte Glycerin-Biosynthese ist dank ihrer direkten Kohlenstofffixierung eine nachhaltige Methode zur umweltfreundlicheren Herstellung „grüner Chemikalien“, wie z. B. Acrylnitril oder Karbonfasern [5].

Systembiologie eröffnet neue Einsichten zur Prozessoptimierung

Für eine effiziente Glycerin-Biosynthese in *Dunaliella* ist ein besseres Verständnis der biochemischen Prozesse von entscheidender Bedeutung. Nur so ist es zukünftig möglich, optimierte Kultivierungsstrategien zu entwickeln und gezielte gentechnische Modifikationen involvierter Biosynthese-Wege durchzuführen, um die Glycerinausbeute zu erhöhen. Zur Identifizierung der beteiligten Biosynthese-Wege wurde eine systembiologische Analysestrategie verfolgt, bei der zunächst Transkriptom- und Genomdaten erhoben wurden. Durch den Vergleich der codierenden mRNA-Sequenzen mit den DNA-Sequenzen des assemblierten Genoms konnten valide Genmodelle vorhergesagt werden, deren Funktion durch Motiv- und Sequenzdatenbanken ermittelt wurde. Da für *D. tertiolecta* keine Genomsequenz verfügbar war, wurden in dieser Arbeit umfassende Sequenzdaten mit der Next-Generation-Sequenzierungstechnologie von PacBio erhoben. Erst anhand der Datenbank aller codierenden Gene war eine genaue MS/MS basierte, vergleichende Proteomanalyse zur Quantifizierung der Proteine möglich (Abb. 1).

Die Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen erfordert eine umfassende Proteindatenbank aller exprimierten Gene. Daher wurden aus den Genom- und Transkriptomdaten Genmodelle und damit eine nicht redundante Proteindatenbank erstellt, die alle möglichen Peptidsequenzen enthält. Durch den Abgleich der aufgenommenen MS/MS-Spektren mit den aus den Peptidsequenzen berechneten Spektren können eindeutige (Unique) Peptide identifiziert und eindeutig einem Protein zugeordnet werden. Anhand der Anzahl und Qualität der Peptide



▲ **Abb. 1:** Vernetzung von genomischen (Next-Generation-Sequenzierungstechnologie) und proteomischen (MS/MS-Analyse von Peptidfragmenten nach einem tryptischen Verdau) Informationen in der Systembiologie, um die Reaktion des Zellmetabolismus auf z. B. äußere Reize zu evaluieren.

können schließlich quantitative Aussagen über ein Protein getroffen werden.

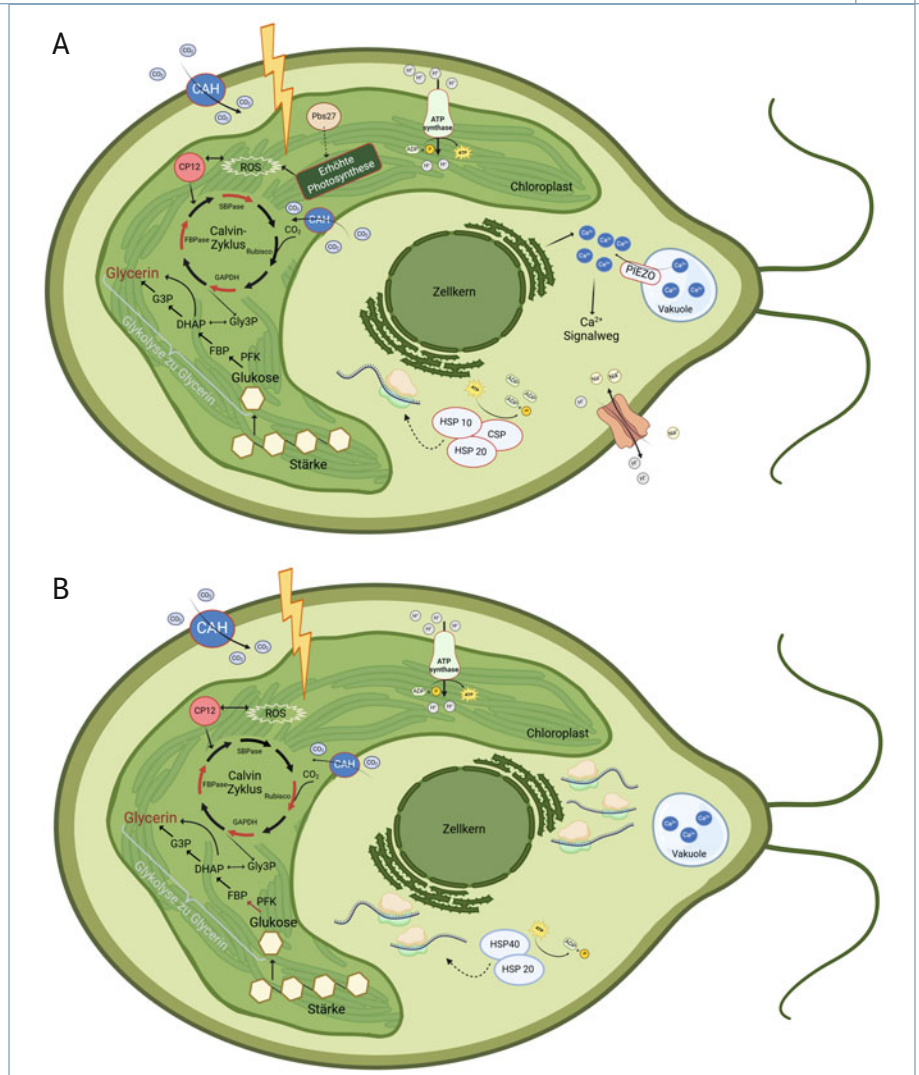
Vergleiche mit dem Modell-Organismus *Dunaliella salina*

Aktuell konzentrieren sich Proteom- und Transkriptomstudien zur intrazellulären Reaktion auf Salzstress hauptsächlich auf *D. salina* [6]. Während *D. salina* jedoch zusätzlich das orange Pigment β -Carotin als Reaktion auf Stress akkumuliert, fehlt diese exzessive Carotin-Synthese in vielen anderen Arten, wie auch dem Stamm *D. tertiolecta*. Die unterschiedliche zelluläre Reaktion von *D. tertiolecta* im Vergleich zu *D. salina* auf Salzstress weist auf wesentliche Unterschiede in der metabolischen Stressantwort hin. Ziel der aktuellen Studie war es daher, die intrazellulären Veränderungen in *D. tertiolecta* auf Genom- und zeitaufgelöster Proteom-Ebene zu analysieren, die durch erhöhte Salzkonzentrationen hervorgerufen werden. Für den experimentellen Ansatz wurde *D. tertiolecta* für 30 Minuten und 24 h Hochsalzbedingungen ausgesetzt und anschließend auf Proteom-Ebene untersucht.

Dunaliella tertiolecta zeigt eine spezifische Stressantwort

Die vergleichende, quantitative Proteomanalyse ergab, dass unter Salzstress zu beiden Zeitpunkten mehr Proteine hoch- als herunterreguliert wurden. Die meisten Proteine mit signifikanten Veränderungen in der Häufigkeit wurden den Kategorien Energieproduktion und -umwandlung, Aminosäuretransport und -metabolismus sowie posttranslationale Modifikation zugeordnet (Abb. 2). Darüber hinaus wurde 24 h nach Salzstress eine signifikante Hochregulation von Proteinen beobachtet, die an der RNA-Prozessierung und -Modifikation, der Translation und der Biogenese der Ribosomen beteiligt sind.

30 Minuten nach Einleitung des Salzstress wurden u. a. Proteine hochreguliert, die mit der Ca^{2+} -Signaltransduktion in Verbindung stehen, wie Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen, Glutamatrezeptoren und mechanosensitive Ionen-Kanäle der PIEZO-Familie. Dies deutet darauf hin, dass der Ca^{2+} -Signalweg eine der ersten Reaktionen der *Dunaliella*-Zellen auf Salzstress sein könnte. Außerdem waren Ionenkanäle, die wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung eines ausgeglichenen Ionenhaushaltes (Ionenhomöostase) spielen, entweder hochreguliert oder sie wurden



▲ **Abb. 2:** Schematische Darstellung der Proteine, die (A) 30 Minuten oder (B) 24 Stunden nach der Induktion von Salzstress signifikant hochreguliert oder phosphoryliert wurden. Hochregulierte Proteine sind durch einen roten Rahmen oder einen roten Pfeil dargestellt. Insbesondere Proteine der Energieproduktion und -umwandlung, des Aminosäuretransports und -metabolismus sowie posttranslationale Modifikationen auslösende Proteine wurden hochreguliert. CAH: Carboanhydrase; CP12: Regulatorprotein des Calvin-Zyklus; CSP: Kälteschockprotein; HSP10/20/40: Hitzeschockprotein 10/20/40; Pbs27: Photosystem II Pbs27 Protein; ROS: Reaktive Sauerstoffspezies; Der Glycerinsyntheseweg wird zwar im Chloroplasten dargestellt, findet aber auch im Zytosol statt. Erstellt mit BioRender.com.

durch Phosphorylierung in kurzer Zeit aktiviert. Die Phosphorylierung versetzt die Zelle in die Lage, reversibel und innerhalb kurzer Zeit auf Änderungen von Umweltparametern, z. B. eine plötzliche Erhöhung der Salzkonzentration, durch An- und Abschalten der Proteinaktivität, zu reagieren. Darüber hinaus konnten Proteine identifiziert werden, die möglicherweise nur in *D. tertiolecta* vorkommen, da sie bisher noch nicht im Zusammenhang mit der entsprechenden Stoffwechselreaktion von *D. salina*-Zellen beschrieben wurden.

Während die Stärke abbauenden Enzyme keine Veränderungen in ihrer Häufigkeit zeigten, konnten eine Hochregulierung verschiedener Photosynthese-assoziiierter Proteine festgestellt werden, insbesondere kurze

Zeit nach Einleitung des Salzstress. Außerdem wurden Carboanhydrasen und Enzyme, die mit dem Calvin-Zyklus in Verbindung stehen, hochreguliert. Dies deutet darauf hin, dass in unserer Studie das Glycerin hauptsächlich Photosynthese-basiert hergestellt wird. Trotz des Vorhandenseins gemeinsamer Mechanismen bei der Reaktion auf Salzstress in verschiedenen Algenstämmen, z. B. die Anhäufung von Osmolyten und die Ionenhomöostase, gibt es erhebliche Unterschiede. Wir haben viele Proteine identifiziert, die nach Salzstress entweder herab- oder hochreguliert werden, die nicht in früheren Studien identifiziert wurden. Es ist wahrscheinlich, dass diese Enzyme spezifisch für *D. tertiolecta* sind. Zum Beispiel wurde CP12 (Regulatorprotein des Calvin-Zyklus, das

einen Komplex mit der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase bildet) zu jedem analysierten Zeitpunkt hochreguliert. Da es für seine schützende Rolle gegen oxidativen Stress bekannt ist, könnte es als alternativer Weg zum Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies dienen. Dieser Mechanismus könnte eine Alternative zur Synthese antioxidativ wirkender Pigmente, wie β -Carotin, darstellen.

Metabolische Optimierung mit Systembiologie

Die Proteomanalyse erlaubt durch die neu erstellte Proteom-Datenbank eine Identifizierung von Proteinen, die unterschiedlich exprimiert werden und an der Anpassung der Zelle an äußeren Salzstress beteiligt sind. Obwohl wir keine Hochregulierung von Proteinen gefunden haben, die an einem möglichen Glycerin-Syntheseweg direkt beteiligt sein könnten, konnten wir alternativ eine chimäre Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase identifizieren. Dieses Enzym ermöglicht eine direkte Umwandlung von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zu Glycerin, wozu normalerweise zwei verschiedene Enzyme benötigt werden. Dadurch könnte dieses Enzym in der Lage sein, die Glycerin-Ausbeute zu verbessern. Darüber hinaus

könnten die anderen identifizierten, hochregulierten Proteine die Glycerin-Synthese fördern, indem sie beispielsweise die Zelle vor schädlichen Substanzen (wie reaktiven Sauerstoffspezies) schützen. Zukünftige Forschung könnte auf den in dieser Studie gewonnenen Resultaten aufbauend Algenzellen gentechnisch so modifizieren, dass eine maximierte Glycerin-Biosynthese die Folge wäre. ■

Literatur

- [1] Chen H, Jiang J-G (2009) Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *J Cell Physiol* 219: 251–258
- [2] Oren A (2014) The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments. *J Biol Res Thessaloniki* 21: 23
- [3] Chen H, Jiang J-G, Wu G-H (2009) Effects of salinity changes on the growth of *Dunaliella salina* and its isozyme activities of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *J Agric Food Chem* 57: 6178–6182
- [4] Shariati M, Reza M (2011) 22. Microalgal Biotechnology and Bioenergy in *Dunaliella*. In: Carpi A (Hrsg.) *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications*. InTech, London, UK. DOI: 10.5772/19046
- [5] Arnold U, Brück T, de Palmenaer A et al. (2018) Carbon Capture and Sustainable Utilization by Algal Polyacrylonitrile Fiber Production: Process Design, Techno-Economic Analysis, and Climate Related Aspects. *Ind Eng Chem Res* 57: 7922–7933
- [6] Polle JE, Calhoun S, McKie-Krisberg Z et al. (2020) Genomic adaptations of the green alga *Dunaliella salina* to life under high salinity. *Algal Res* 50: 101990

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und

angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Linda Keil (links) und Norbert Mehler



Daniel Garbe (links) und Thomas Brück

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Thomas Brück
 Werner Siemens-Lehrstuhl für Synthetische Biotechnologie
 TUM School of Natural Sciences
 Technische Universität München
 Lichtenbergstraße 4
 D-85748 Garching
brueck@tum.de