

Evolutionäre Diversifikation von *groEL* Paralogen  
im stigonematalen Cyanobakterium  
*Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Julia Charlotte Weißenbach  
Kiel 2016

---

Aus dem Institut für Allgemeine Mikrobiologie,  
Arbeitsgruppe für Genomische Mikrobiologie  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Referent: Prof. Dr. T. Dagan

Korreferent: Prof. Dr. A. J. Scheidig

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Mai 2016

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

---

Die vorliegende Dissertation habe ich eigenständig, ohne unerlaubte Hilfe und unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der deutschen Forschungsgemeinschaft, angefertigt. Die Dissertation wurde weder in der vorgelegten, noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution eingereicht.

Ich bestätige außerdem, dass ich bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, 14.3.2016

.....

(Julia Weißenbach)

---

Im Laufe dieser Arbeit wurden mit Zustimmung des Betreuers folgende Beiträge veröffentlicht:

### **Tagungsbeiträge**

#### **Julia Weißbach**

Evolution and functional differentiation of *groESL* Paralogs in *Chlorogloeopsis fritschii*  
(Talk) IFAM Winter Symposium (2016), Kiel, Deutschland

**Julia Weißbach**, Judith Ilhan, David Bogumil, Tal Dagan

Evolution and functional diversification of chaperonin paralogues genes in Cyanobacteria  
(Poster) Life Science Student Conference (2015), Kiel, Deutschland.

**Julia Weißbach**, Judith Ilhan, David Bogumil, Karina Stucken, Tal Dagan

Evolution and functional diversification of chaperonin paralogues genes in Sektion V  
Cyanobacteria  
(Poster) *SMBE* (2015), Wien, Österreich.

**Julia Weißbach**, Judith Ilhan, Karina Stucken, Tal Dagan

Evolutionary diversification of chaperonin paralogs in the cyanobacterium  
*Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912  
(Poster) *9EWMBC* (2014), Texel, Niederlande.

**Julia Weißbach**, Karina Stucken, Tal Dagan

Comparative genomics of GroEL-GroES interacting partners  
(Poster) *FEMS* (2013), Leipzig, Germany.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1	Evolution von neuen Proteinfunktionen durch Genduplikation	4
2.1.1	Funktionelle Divergenz	5
2.2	Einfluss von Chaperonen auf die Evolution	8
2.2.1	GroESL	10
2.3	Cyanobakterien	14
2.4	GroESL in Cyanobakterien	17
2.4.1	GroESL in <i>Chlorogloeopsis fritschii</i> PCC 6912	20
2.5	Zielsetzung	23
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>24</b>
3.1	Stämme und Kultivierung	24
3.2	Isolierung von Nukleinsäuren	25
3.2.1	DNA-Isolation	25
3.2.2	RNA-Isolation	25
3.3	Amplifikation	26
3.4	Agarose-Gelelektrophorese	27
3.5	Klonierung	27
3.5.1	Ligation	27
3.5.2	Transformation von <i>E. coli</i>	28
3.5.3	Plasmid-Isolation	28
3.5.4	Restriktion	28
3.6	Transformation von <i>C. fritschii</i> PCC 6912	29
3.7	Transkriptionelle GFP-Fusion	30
3.7.1	Herstellung der GFP-Fusionskonstrukte	31
3.7.2	Stress-Induktion	32
3.7.3	Fluoreszenzmikroskopie	32
3.8	Protein-Protein Interaktionsnetzwerk	33
3.8.1	Identifikation positiver Interaktionen	33
3.8.2	Herstellung der Proteinfusionskonstrukte	34
3.9	Komplementierungstest	35

3.9.1	Herstellung der Komplementierungskonstrukte	36
3.9.2	Selektion auf positive Transformanten und Komplementation	37
3.10	Deletion der GroEL Paraloge in <i>C. fritschii</i> PCC 6912	38
3.10.1	Herstellung der Deletionskonstrukte	38
3.10.2	Verifizierung der cyanobakteriellen <i>groEL</i> Deletionsstämme	40
3.11	Expressionsanalyse der <i>groESL</i> Operons	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
4.1	Transkriptionelle Regulation und Expressionslokalisierung der <i>groEL</i> Paraloge in <i>C. fritschii</i> PCC 6912	46
4.1.1	Transkriptionelle Regulation und Expressionslokalisierung unter Hitzestress	47
4.1.2	Transkriptionelle Regulation und Expressionslokalisierung unter Lichtstress	48
4.1.3	Transkriptionelle Regulation und Expressionslokalisierung unter diazotrophen Bedingungen	50
4.2	<i>In vivo</i> Protein-Protein-Interaktionsanalysen	52
4.2.1	Detektion der physikalischen Interaktion	52
4.2.2	Interaktionsnetzwerk der GroESL Paraloge	54
4.3	Komplementierungsanalyse eines <i>groESL</i> defizienten <i>E. coli</i> Stamms	56
4.3.1	Funktionelle Komplementierung	58
4.3.2	Chaperonin-Assemblierung	60
4.4	Expressionsanalyse der bicistronischen GroEL Paraloge	61
4.5	Konstruktion von <i>groEL</i> Deletionsmutanten in <i>C. fritschii</i> PCC 6912	64
4.5.1	Deletion der <i>groEL</i> Paraloge in <i>C. fritschii</i> PCC 6912	64
4.5.2	Verifizierung der <i>groEL</i> Deletionsmutanten	65
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
5.1	Differentielle Transkription und Expressionslokalisierung der Paraloge	70
5.2	Chaperonin-Assemblierung und -Aktivität	73
5.3	Redundanz der Chaperonin Paraloge	76
5.4	Evolutionäre Entwicklung der Paraloge	78
5.4.1	Housekeeping-Funktion von <i>groESL1</i>	78
5.4.2	Subfunktionalisierung von <i>groESL2</i>	80
5.4.3	Putative Neofunktionalisierung von <i>groESL3</i>	82
5.5	Fazit	85
<b>6</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>87</b>

<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>88</b>
7.1	Abbildungen	88
7.2	Tabellen	97
7.3	Sequenzen	102
7.3.1	Nukleotid-Sequenzen	102
7.3.2	Aminosäure-Sequenzen	104
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>105</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Szenarien nach der Genduplikation	7
Abb. 2:	Struktur und Funktion des GroESL Chaperon-Komplex (Hartl 2011)	11
Abb. 3:	Vorkommen der GroES und GroEL Paraloge in Prokaryoten (D. Bogumil)	13
Abb. 4:	Morphologische Diversität der Cyanobakterien	15
Abb. 5:	GroEL Protein-Phylogenie	18
Abb. 6:	Mikroskopische Aufnahme von <i>Chlorogloeopsis fritschii</i> PCC 6912 (K. Stucken)	20
Abb. 7:	<i>groESL</i> Paraloge in <i>C. fritschii</i> PCC 6912	21
Abb. 8:	Relative Transkriptionslevel-Änderung der <i>groEL</i> Paraloge in <i>C. fritschii</i> PCC 6912 (nach J. Ilhan)	22
Abb. 9:	Schematische Darstellung des <i>triparental matings</i> zur Transformation von Sektion V Cyanobakterien (modifiziert nach K. Stucken)	29
Abb. 10:	Getestete Stressbedingungen der transkriptionellen Regulation der <i>groESL</i> Paraloge	30
Abb. 11:	Schematische Darstellung des GFP-Fusionskonstrukts	31
Abb. 12:	Schematische Darstellung des Prinzips des BACTH Tests	34
Abb. 13:	Komplementierungskonstrukte	37
Abb. 14:	Schematische Darstellung selektiver Bedingungen zur Identifikation der funktionellen Komplementierung	38
Abb. 15:	Deletionskonstrukt zur Erzeugung der $\Delta groEL$ <i>C. fritschii</i> PCC 6912 Stämme	40
Abb. 16:	Verifizierung der Deletionsstämme	41
Abb. 17:	Darstellung der Probenentnahme zur Analyse der Transkriptlevel der <i>groESL</i> Operons	44

---

Abb. 18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>C. fritschii</i> p <sub>groEL</sub> :gfp nach Hitze-Inkubation	48
Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>C. fritschii</i> p <sub>groEL</sub> :gfp nach Starklicht-Inkubation	49
Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>C. fritschii</i> p <sub>groEL1</sub> :gfp unter Diazotrophie	51
Abb. 21: Bacterial Two-Hybrid System (BACTH)	53
Abb. 22: Beta-Galactosidase-Test	54
Abb. 23: GroESL Protein-Interaktionsnetzwerk	55
Abb. 24: Schematische Darstellung der Komplementierungsstämme	57
Abb. 25: Funktionelle Komplementierung von MGM100	59
Abb. 26: Hetero-Oligomerisierung der Chaperonin-Untereinheiten	60
Abb. 27: Absoluter Transkriptpegel von <i>groESL1</i> in <i>C. fritschii</i> PCC 6912 unter Diazotrophie	62
Abb. 28: Absoluter Transkriptpegel von <i>groESL2</i> in <i>C. fritschii</i> PCC 6912 unter Diazotrophie	63
Abb. 29: Wachstum der positiven <i>C. fritschii</i> PCC 6912 Transformanten	65
Abb. 30: Absolute Transkriptlevel der <i>groEL</i> Gene in den <i>C. fritschii</i> PCC 6912 Deletionsstämmen	67
Abb. A1: Coomassie Gel zur Kontrolle der Expression der GroEL Paraloge (pASK-IBA3)	88
Abb. A2: Vorhergesagte Transkriptionsstartpunkte (TSS) der drei <i>groEL</i> Paraloge in <i>C. fritschii</i> PCC 6912	89
Abb. A3: Sekundärstruktur der GroES Paraloge	90
Abb. A4: Sekundärstruktur des GroEL1 Paralogs aus <i>C. fritschii</i> PCC 6912	91
Abb. A5: Sekundärstruktur des GroEL2 Paralogs aus <i>C. fritschii</i> PCC 6912	92
Abb. A6: Sekundärstruktur des GroEL3 Paralogs aus <i>C. fritschii</i> PCC 6912	93
Abb. A7: Tertiärstruktur der GroEL Paraloge aus <i>C. fritschii</i> PCC 6912 (J. Ilhan)	94
Abb. A8: Tertiärstruktur von GroEL3 aus <i>C. fritschii</i> PCC 6912	94
Abb. A9: Regulatorische Elemente der <i>groEL</i> Paraloge in <i>C. fritschii</i> PCC 6912	95
Abb. A10: Absolute Transkriptmenge der <i>groEL</i> Paraloge in <i>C. fritschii</i> PCC 6912	96

---

# Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Standard PCR-Programm bei Verwendung der Phusion Polymerase	26
Tab. 2: Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Herstellung der transkriptionellen GFP-Fusionskonstrukte	31
Tab. 3: Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Herstellung der Fusionskonstrukte zur Identifikation von Protein-Interaktion	35
Tab. 4: Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Herstellung der Komplementierungskonstrukte	36
Tab. 5: Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Herstellung der <i>C. fritschii</i> PCC 6912 <i>groEL</i> Deletionsstämme	39
Tab. 6: Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Verifizierung der cyanobakteriellen $\Delta groEL$ Stämme über PCR	40
Tab. 7: Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Verifizierung der cyanobakteriellen $\Delta groEL$ Stämme über qRT-PCR	42
Tab. 8: qRT-PCR zur Analyse der Transkriptionslevel der <i>groEL</i> Paraloge aus <i>C. fritschii</i> PCC 6912	42
Tab. 9: Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Expressionsanalyse der cyanobakteriellen <i>groESL</i> Operons	43
Tab. 10: Ratio der Operon-Einheiten von <i>groESL</i> in <i>C. fritschii</i> PCC 6912 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen	62
Tab. A1: Verwendete <i>Escherichia coli</i> Stämme	97
Tab. A2: Verwendete Antibiotika	97
Tab. A3: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	98
Tab. A4: Verwendete Plasmide	99
Tab. A5: Gemessene Enzymaktivität im Beta-Galactosidase-Test (BACTH)	100
Tab. A6: Absolute Transkriptpegel der <i>groEL</i> Paraloge in den <i>C. fritschii</i> PCC 6912 Deletionsstämmen	101
Tab. A7: Absolute Transkriptpegel der <i>groESL</i> Paraloge in den <i>C. fritschii</i> PCC 6912 unter diazotrophen Bedingungen	101

# 1 Zusammenfassung

Genduplikation gehört zu den wichtigsten Mechanismen zur Akquirierung neuer Gen- und Protein-Funktionen und hat somit einen bedeutenden Einfluss auf die Evolution von Organismen. Im Laufe der Evolution der multizellulären, Heterocysten-formenden Cyanobakterien hat mindestens zweimal eine Duplikation des Chaperonin Komplexes GroESL stattgefunden. Das molekulare Chaperonin GroEL und der zugehörige Ko-Faktor GroES vermitteln eine ATP-abhängige Faltung von nativen oder denaturierten Proteinen und sind bedeutend für die Stabilisierung der Protein-Homöostase. In Cyanobakterien, wie in der Mehrzahl der Eubakterien, ist dieser Chaperonin Komplex durch ein bicistronisches Operon reguliert, das die Gene für *groES* und *groEL* kodiert.

In dieser Arbeit wurde durch verschiedene *in vivo* Untersuchungen die evolutionäre und funktionelle Diversifikation der *groESL* Paraloge in stigonematalen Cyanobakterien untersucht. Hierfür wurde der erst kürzlich sequenzierte Stamm *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 als Modellorganismus verwendet, dessen Genom zwei bicistronische *groESL* Operons (*groESL1*, *groESL2*) sowie ein monocistronisches *groEL* (*groEL3*) Paralog kodiert. Differentielle Transkriptionslevel und Expressionslokalisierungen der verschiedenen Paraloge konnten sowohl unter Normal- als auch unter verschiedenen Stress-Bedingungen wie Hitze, Starklicht und Diazotrophie *in vivo* gezeigt werden. Diese Spezifikation deutet auf eine divergente Entwicklung und letztendliche funktionelle Spezialisierung der Genkopien im Laufe der cyanobakteriellen Evolution hin. Protein-Protein-Interaktionsstudien konnten den Nachweis erbringen, dass GroEL3 im Gegensatz zu den anderen Paralogen ausschließlich als Monomer vorliegt, während die anderen Chaperonin-Untereinheiten Homo- und Heteromere bilden. Diese differentielle Assemblierung lässt auch Rückschlüsse auf die Chaperonin Aktivität schließen, da die Tetradecamerstruktur des Chaperonins essentiell für die Faltungsaktivität ist. In einem Komplementierungstest eines *groESL* defizienten *E. coli* Stammes wurde gezeigt, dass sowohl GroEL1 als auch GroEL2 ausschließlich in Kombination mit dem Ko-Chaperonin GroES1 funktional sind. Für GroES2 liegt keine Ko-Chaperonin Aktivität vor, was auf einen dysfunktionalen GroESL2 Komplex hinweist. Diese Ergebnisse lassen deshalb auf eine Subfunktionalisierung von GroESL2 im Zuge der cyanobakteriellen Evolution schließen. Trotz der fehlenden Fähigkeit zur Assemblierung der Chaperonin-typischen Struktur wird nicht von einer Nonfunktionalisierung von *groEL3* ausgegangen. Eine spezifische Expressionslevel-Erhöhung unter Starklicht-Bedingungen, ein C-terminales GGM-Motiv, sowie die Konservierung des monocistronischen *groEL* Paralogs in allen Cyanobakterien weist auf eine spezifische Funktion von *groEL3* hin, welche gegebenenfalls mit der Phototrophie der Bakterien in Zusammenhang steht.

Anhand der auf RNA- und Proteinebene gezeigten Divergenz der *groEL* Kopien in *C. fritschii* PCC 6912 ist eine differentielle Evolution der Paraloge erkennbar, welche einen Einfluss auf die Fähigkeit zur Zelldifferenzierung und die Adaption des Organismus an verschiedene Umweltbedingungen haben könnte.

## Abstract

Gene duplication is an ongoing process in genome evolution and has a major impact on the gain of new protein functions. A phylogenetic analysis showed that the GroESL chaperonin genes were duplicated at least once during cyanobacterial evolution. The chaperonin GroEL and its co-factor GroES promote protein folding in an ATP-dependent manner and is known to have a huge influence on the adaptation to diverse stress conditions. In most eubacteria the GroESL chaperonin is encoded by a single-copy bicistronic operon that includes the *groES* and *groEL* genes.

Here, I study the functional diversification of GroEL paralogs in the filamentous, heterocyst forming *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 which genome encodes two *groESL* operons (*groESL1*, *groESL2*) and a monocistronic *groEL* gene (*groEL3*). A comparison of gene expression under stress conditions like heat, high light and diazotrophy showed diverse expression pattern of the paralogous *groEL* under one specific stress conditions. Also, translational GFP-fusion experiments revealed a different expression localization of the paralogs during diazotrophic conditions. Furthermore, to evaluate the GroEL-GroES specificity, a bacterial-two-hybrid system was employed to investigate the protein-protein interactions between the chaperonin subunits *in vivo*. GroEL3 subunits neither formed homo-oligomers nor interacted with any of the two co-chaperonins, whereas subunits encoded in the two operons were able to form hybrid complexes. The differential ability for chaperonin assembly indicated structural differences between the paralogs that could also influence the chaperonin activity. A complementation assay in a *groESL* deficient *Escherichia coli* strain additionally showed that the function of the three GroEL paralogs is not redundant. Functional chaperon activity was only detected for native *groESL1*, while *groEL2* could complement only in addition with *groES1*. The dysfunctionality of the GroESL2 chaperonin complex thus indicates that the GroEL2 underwent a subfunctionalization, which could have resulted in a diversification of the substrate set under different conditions. The obtained results further demonstrate a neofunctionalization of the monocistronic *groEL3* due to the fact that all cyanobacterial monocistronic *groEL* paralogs showed a conserved C-terminal GGM motif and a distinct response to high light. In conclusion, this study showed that the evolutionary consequences of *groEL* duplication is unrelated to dosage effects and provided evidence for sub- and neofunctionalization of the paralogous genes.

## 2 Einleitung

### 2.1 Evolution von neuen Proteinfunktionen durch Genduplikation

Organismen können neue Gene und Proteinfunktionen durch verschiedene, zum Teil überlappende Mechanismen akquirieren. Neben lateralem Gentransfer in Bakterien, z.B. durch Transduktion, Konjugation oder der *de novo* Synthese, ist Genduplikation einer der wichtigsten Mechanismen in der Evolution von Protein-Funktionen. Die evolutionäre Bedeutung der Genduplikation wurde bereits in den 1930ern beobachtet (Andersson et al. 2015; Haldane 1932), erlangte aber erst in den 1970ern Aufmerksamkeit durch den Artikel "*Evolution by Gene Duplication*" (Ohno 1970).

Genduplikation und die daraus resultierende Evolution von neuen (Gen/Protein-) Funktionen spielt eine wichtige Rolle in der Evolution aller drei Domänen des Lebens (Nei 1969; Zhang 2003; Qian and Zhang 2008) und wurde ebenfalls in Viren beobachtet. Nachweislich ist ein Großteil der Proteine durch Duplikation und anschließende Divergenz von Protein-kodierenden Sequenzen entstanden. Im Genom des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* sind beispielsweise etwa 65% der Gene auf ein Duplikationsereignis zurückzuführen (Initiative 2000). Die Duplikation kann durch verschiedene Mechanismen wie z.B. Aneuploidie, Retrotransposons oder ektopische homologe Rekombination hervorgerufen werden und unterschiedliche Resultate zur Folge haben. So wird die Genduplikation in unterschiedliche Kategorien, wie partielle Genduplikation, Duplikation vollständiger Gene (komplette Genduplikation), partielle oder gesamte Chromosomenduplikation sowie Genomduplikation eingeteilt (Graur and Li 1999).

Im Nachfolgenden wird sich ausschließlich mit der Thematik der kompletten Genduplikation beschäftigt. Die Duplikation eines Gens findet in hohen Raten statt und kann einmalig oder mehrfach vorkommen und somit zu einer Vervielfachung der Gene führen (Fryxell 1996). Lynch et al. kalkulierten, dass Eukaryoten eine sogenannte *Gene-Birth-Rate* von einem Gen pro 100 Millionen Jahren aufweisen (Lynch and Force 2000a). Eine Vielzahl der entstandenen Genkopien (Paraloge) wird durch Pseudogenisierung inaktiviert (Ohno 1970). Jedoch können Mutationen in dem Paralog auch die ursprüngliche Genaktivität verändern. Duplikation entsteht unabhängig im Individuum und wird ggf. in den Populationen fixiert vererbt. Wenn neutrale Selektion vorherrscht, ist die Chance auf eine Fixierung gering (Kimura 1989). Dabei wird davon ausgegangen, dass je nach Funktion der Gene Unterschiede in der Häufigkeit der Fixierung nach einer Duplikation existieren. Gene die für

---

die Physiologie verantwortlich sind, die zwischen den Spezies stark variiert, haben vermutlich eine hohe *Gen-Birth/Gen-Death rate* (Nei et al. 2000).

### 2.1.1 Funktionelle Divergenz

Bei der Entwicklung von paralogen Genen kann zwischen verschiedenen Szenarien unterschieden werden: 1) Retention (*Dosage Effekt*), 2) Nonfunktionalisierung und 3) Sub- bzw. Neofunktionalisierung (Abbildung 1). Die Duplikation ist ein andauernder Prozess und in der Literatur sind verschiedene Theorien zur Aufklärung des Erwerbs einer neuen Funktion und der anschließenden Genfixierung aufgeführt (Force 1999; Lynch and Force 2000a; Bergthorsson and Andersson 2007; Hittinger and Carroll 2007). Trotz Kontroversen über eine Redundanz der Gen-Kopien (Hughes 2002) ist allgemein anerkannt, dass die Paraloge im Verhältnis zu Genen in Einzelkopie eine erhöhte Mutationsrate aufweisen. Die Änderungen in der Gensequenz und der korrespondierenden Funktion können hierbei vorteilhaft oder schädlich für den Organismus sein (Ohno 1970; Force 1999; Lynch and Force 2000b).

Der sogenannte *Dosage Effekt* beschreibt die Konservierung der Genfunktion in den einzelnen Paralogen, wie es beispielsweise bei den Genen der rRNA und tRNA gezeigt wurde (Ikemura 1985). Das Beibehalten der Funktion des Vorläufergens in beiden Genkopien ist zwar für den Organismus vorteilhaft, um eine zusätzliche Menge an RNA oder Protein bereit zu stellen oder einen Genverlust auszugleichen, jedoch ist es unwahrscheinlich, dass zwei (oder mehr) Gene mit identischer Funktion in einem Genom dauerhaft fixiert werden (Nowak et al. 1997).

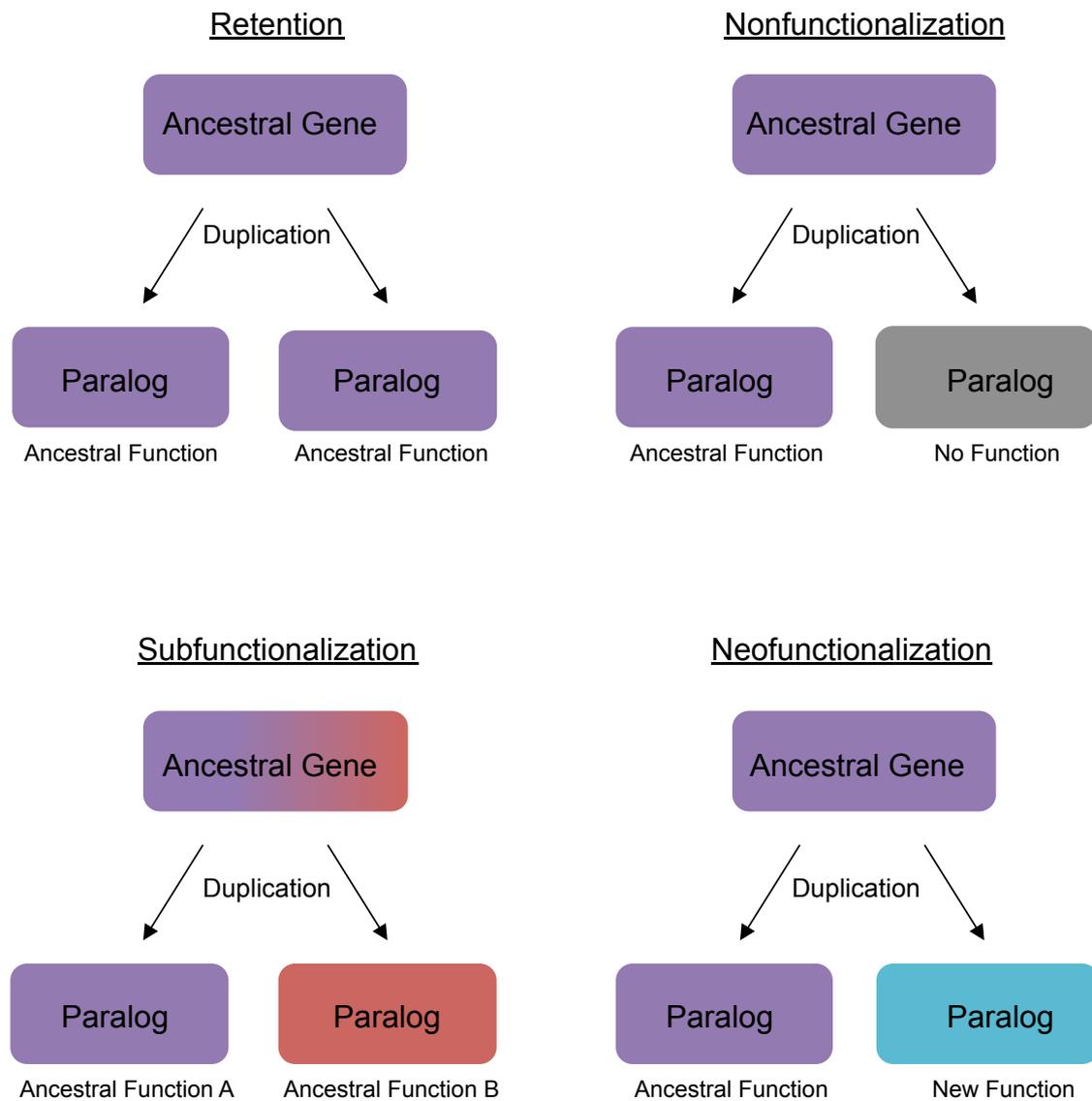
Bei der Nonfunktionalisierung wird die Genkopie durch mangelnde Regulierung nicht exprimiert oder akkumulierte Mutationen führen zu einem nicht-funktionalen Protein (Ohno 1970). Nach der Duplikation eines Gens tritt der Prozess der Nonfunktionalisierung mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auf, da deutlich mehr deletierende als vorteilhafte Mutationen akkumulieren. Beispielsweise ist eins von acht Genen in dem Modellorganismus *C. elegans* ein so genanntes Pseudogen (Harrison et al. 2001). Nonfunktionale Gene werden im Laufe der Evolution entweder deletiert oder sind aufgrund von akkumulierten Mutationen so divergent, dass sie nicht mehr anhand von Sequenz-Similarität identifiziert werden können. Im Gegensatz zu der Retention oder der Nonfunktionalisierung beschreibt die funktionelle Divergenz den Erwerb neuer oder spezialisierter Funktionen der Gene nach einem Duplikationsereignis.

Bei der Neofunktionalisierung erwirbt mindestens eines der Paraloge eine neue Funktion, die sich von der des Vorläufers unterscheidet. Da bei diesem Prozess für den Organismus vorteilhafte oder neutrale Mutationen vorausgesetzt werden, ist die Neofunktionalisierung deutlich seltener als die Nonfunktionalisierung (Ohno 1970). Eine aus dem Duplikationsereignis resultierende Divergenz der Paraloge, kann sich jedoch bereits bei wenigen Substitutionen ausbilden. Ein Beispiel hierfür ist die Malatdehydrogenase, die durch nur eine einzelne Substitution in der 317 Aminosäuren langen Sequenz, aus der Lactatdehydrogenase evolvierte (Wilks et al. 1988).

In dem sogenannten *Duplication-Degeneration-Complementation model* (DDC) von Force *et al.* wurde erstmalig eine weitere Möglichkeit der Divergenz von duplizierten Genen prognostiziert (Force 1999). Die sogenannte Subfunktionalisierung beschreibt den Umstand, dass zwei oder mehr Paraloge jeweils nur einen Teil der Funktion des vorläufigen Gens übernehmen. Subfunktionale Paraloge übernehmen grundsätzlich dieselbe Funktion, werden aber differentiell oder unter diversen Bedingungen exprimiert. Hierbei kann sich eine subfunktionale Divergenz sowohl auf Expressionsebene (Force 1999) als auch auf Proteinebene (Hughes and Hughes 1993; Hughes 2002) des jeweiligen Paralogs zeigen, wobei eine Änderung in der Genexpression der Paraloge ein häufiges Ereignis in der Genduplikation ist (Wagner 2000; Gu et al. 2002). Im Fall einer Subfunktionalisierung sollten die paraloge Gene äquivalent und untereinander austauschbar sein (Redundanz).

Bis dato ist der Prozess zur Entstehung der Spezifikation der Paraloge nicht geklärt und verschiedene Modelle zur Subfunktionalisierung einer Genkopie sind bekannt. Das DDC Modell beschreibt den Prozess durch die Akkumulierung von nicht-synonymen Mutationen in den Genkopien, wodurch die Subfunktionen des Vorläufers modifiziert werden (Force 1999). In einem neueren Modell von Hittinger und Carroll (Hittinger and Carroll 2007) wird der Subfunktionalisierungsprozess durch adaptive (nicht neutrale) Mutationen der Paraloge beschrieben. In dem sogenannten *Escape from Adaptive Conflict Model* (EAC) wird davon ausgegangen dass Subfunktionalisierung von Paralogen entsteht, wenn das ursprüngliche Gen verschiedene Funktionen besitzt, welche nicht simultan durch natürliche Selektion optimiert werden können. Da der Prozess der Subfunktionalisierung eine Spezifikation des Vorläufers beschreibt, ist diese evolutionäre Entwicklung eines Paralogs besonders wahrscheinlich, wenn das Vorläufergen für ein multifunktionales Protein (*Moonlighting* Protein) kodiert. Eine solche Multifunktionalität liegt beispielsweise bei dem hier untersuchten Chaperonin vor (Henderson et al. 2013). Gleichzeitig gehen aktuelle Studien aber auch davon aus, dass Genduplikation die Entwicklung von *Moonlighting* Funktionen begünstigt (Espinosa-Cantú et al. 2015).

## Entwicklung von Paralogen



**Abb. 1** Szenarien nach der Genduplikation

Abb. 1 stellt schematisch die möglichen evolutionären Entwicklungen von Genen nach einem Duplikationsereignis dar. Bei einer Subfunktionalisierung erlangt mindestens eine der Gen-Kopien eine spezialisierte Funktionen des ursprünglichen Gens. Die Neofunktionalisierung beschreibt den Prozess des Erwebs einer neuen Genfunktion eines der Paraloge, dass sich von der Funktion des Vorläufers deutlich unterscheidet. Bei einer Nonfunktionalisierung, oder anschließenden Pseudogenisierung, der Genkopie liegt das Paralog nicht aktiv im Genom vor (Zusammenfassung nach Force 1999).

## 2.2 Einfluss von Chaperonen auf die Evolution

Molekulare Chaperone beschreiben eine diverse Gruppe von Proteinen, welcher hauptsächlich eine Funktion in der Protein-Faltung zugesprochen wird (Ellis 1987). Das Aktivitätsspektrum von molekularen Chaperonen beinhaltet u. a. *de novo* Faltung von non-nativen Proteinen, Rückfaltung denaturierter Proteine, intrazelluläre Translokation von Proteinen sowie Assemblierung von Protein-Komplexen (Frydman 2001; Tang et al. 2008) (Saibil 2013). Die Bezeichnung "molekulares Chaperon" wurde erstmals 1978 bei Analysen zur Funktion des Kernproteins Nukleoplasmin, welches fatale Protein-Interaktionen unterbindet, geprägt (Laskey 1978). Chaperone weisen in allen drei Domänen des Lebens eine gleiche grundlegende Funktion auf und liegen in allen Zelltypen der bisher untersuchten Organismen vor (Lindquist and Craig 1988).

Die Änderung der funktional spezifischen Raumstruktur (Konformationsänderung) eines Proteins kann sowohl einen negativen als auch einen positiven Einfluss auf die Aktivität eines Proteins haben. Einige Proteine erlangen ihre native funktionale Aktivität autark (Anfinsen 1973), während andere zur Erlangung ihrer funktionellen Konformation Unterstützung von molekularen Chaperonen benötigen, mit denen sie fakultativ oder obligat interagieren (Kerner et al. 2005). Besonders große und/oder komplexe Proteine benötigen eine Chaperon-Assistenz um eine Aggregation zu vermeiden. Die Funktion eines Chaperons zur Erlangung der optimalen sterischen Konformation der gebundenen Proteine erfolgt jeweils ohne Zutun sterischer Informationen seitens des Chaperons (Ellis 1987). Häufig interagieren mehrere verschiedene Chaperone bis zur Erlangung der funktionalen Konformation mit demselben non-nativen Protein (Buchberger 1996; Young 2004). Generell ist die Chaperon-vermittelte Stabilisierung zur Aufrechterhaltung der Protein-Homöostase (Saibil 2013) sowie zur Assemblierung vieler essentieller Proteine ausschlaggebend. Chaperone entstanden mehrmals unabhängig voneinander im Laufe der Evolution (Ellis 1990; Hartl et al. 2011), wodurch diese eine heteromere Protein-Klasse darstellen.

Die Chaperon-vermittelte Protein-Faltung stellt einen wesentlichen Bestandteil der Stresstoleranz und Adaption vieler Organismen dar. Die Expression der Chaperone wird durch verschiedene Umweltreize wie beispielsweise Hitze, UV-Strahlung, Salinität, Licht- und oxidativer Stress beeinflusst (Henderson et al. 2013; Rajaram et al. 2014). Die Stabilität von denaturierenden Proteinen wird von den bei Stressbedingungen vermehrt exprimierten Chaperonen unterstützt. Chaperone tragen folglich zur Stabilisierung der Zellfunktion unter Stressbedingungen bei (Young 2004).

Aufgrund ihrer induzierten Expression durch Temperaturerhöhung werden Chaperone trotz konstitutiver Expression, auch als Hitzeschockproteine (Hsp) bezeichnet (Yura et al. 1993). Basierend auf ihrer Molekülmasse und Sequenzhomologie wird zwischen fünf verschiedenen Klassen von Chaperonen unterschieden (Frydman 2001; Bukau and Horwich 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde der GroESL Komplex untersucht, der zur Gruppe der Hsp60 Familie, auch Chaperonine genannt, gehört. Chaperonine lassen sich weiter in zwei Gruppen klassifizieren.

Die Faltung durch Chaperone bildet einen wichtigen Schutzmechanismus der Zelle, da Proteinen mit nicht optimaler Aminosäuresequenz die Möglichkeit gegeben wird, ihre funktionelle Konformation zu erhalten und nicht zu aggregieren. Durch die Änderung, der für das Protein kodierenden Aminosäuresequenz, kann die Expressionsgeschwindigkeit und die Translationsgenauigkeit dieses Proteins herabgesetzt werden. Infolgedessen unterliegen vor allem stark exprimierte Proteine einem Selektionsdruck, der sie zu einem möglichst optimalen Codon-Gebrauch zwingt, wodurch eine schnelle und genaue Translation bewirkt wird (Drummond 2005; Warnecke 2010). Durch Untersuchungen von Rutherford und Lindquist wurde gezeigt, dass Hsp90 Chaperone die Eigenschaft besitzen, Mutationen eines Proteins zu maskieren, so dass die Funktion des Proteins nicht beeinträchtigt wird (Rutherford 1998). Chaperone besitzen somit die Eigenschaft, destabilisierende Mutationen in der Aminosäuresequenz von Substratproteinen zu kompensieren.

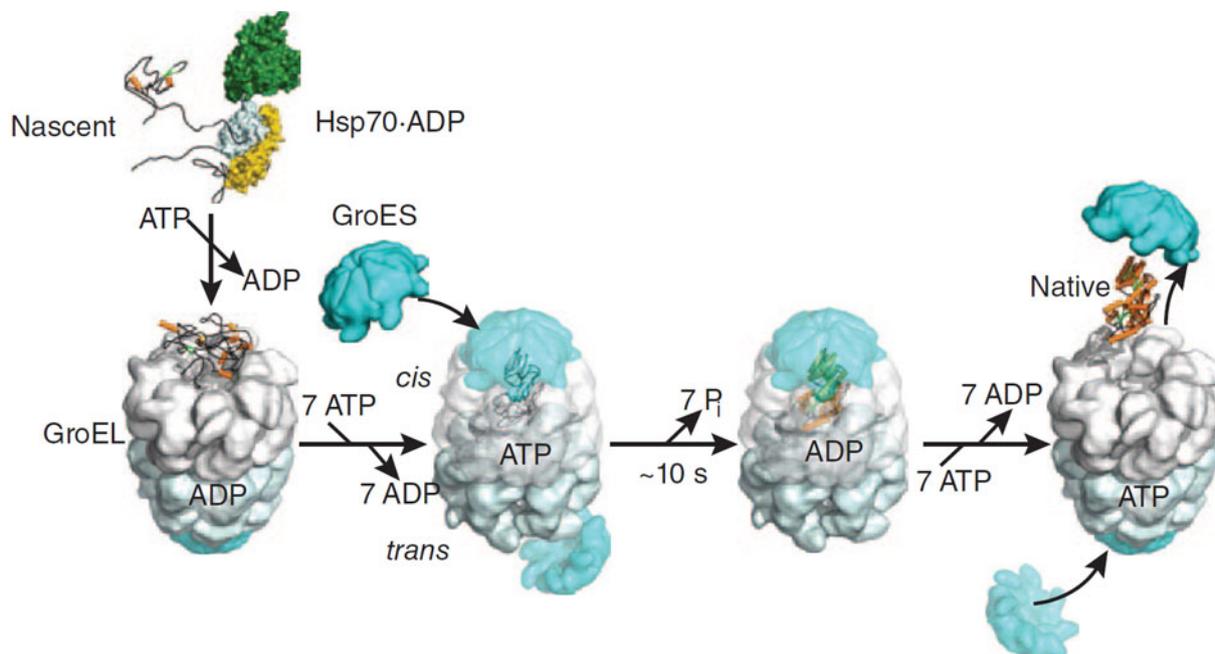
Die Chaperon-vermittelte Faltung ermöglicht eine erhöhte Mutationstoleranz der Substrate. Durch die kompensierende Wirkung stellen Chaperone einen wesentlichen Faktor in der Proteinevolution dar. In *E. coli* wurde durch Überexpression des Chaperonin-Komplexes GroESL gezeigt, dass die Chaperonin-vermittelte Faltung die evolutionäre Entwicklung der Substrate beschleunigt (Tokuriki 2009). Dieses Phänomen konnte durch genomische *in silico* Analysen von Orthologen der obligaten Substratproteine auch auf andere eubakterische Organismen übertragen werden (Bogumil and Dagan 2010; Warnecke 2010; Williams 2010). Ferner hat die Funktion von Chaperonen, Auswirkungen auf die Robustheit des Phänotyps eines Organismus (Queitsch 2002) und stellt eine Adaption an hohe Mutationsraten dar (Fares 2002; Sabater-Munoz et al. 2015; Fares et al. 2002; Queitsch 2002; Maisnier-Patin et al. 2005).

## 2.2.1 GroESL

Eins der bis dato am besten untersuchten Chaperonine ist das zur Klasse 1 gehörende eubakterielle Chaperonin GroESL (Fayet et al. 1989). Das endogen im Cytosol lokalisierte GroESL ist homolog zum eukaryotischen Hsp10/Hsp60-Komplex, welcher u. a. für den Protein-Import und die Faltungsaktivität in Mitochondrien und Chloroplasten verantwortlich ist (Hemmingsen et al. 1988). GroEL und der zugehörige Ko-Faktor GroES sind ubiquitär in Eubakterien und Mitochondrien vorhanden (Lund 2009) und essentiell für die Vitalität des Organismus (Fayet et al. 1989). Die bisherigen Untersuchungen zum Mechanismus des *groESL* Operons und der GroESL Proteine wurden überwiegend in *E. coli* durchgeführt.

Der Chaperoninkomplex wird aus den zwei polymeren Chaperonin-Untereinheiten GroES und GroEL zusammengesetzt. Der zylindrische Doppelringkomplex besteht aus 14 identischen GroEL Proteinen. Diese bilden eine fassartige Struktur die wiederum aus zwei heptameren Ringen (cis und trans) von je sieben GroEL-Proteinen zusammengesetzt ist. An deren apikaler Domäne werden die Substrate gebunden. Die kleinere Chaperonin-Untereinheit (Ko-Chaperonin) setzt sich aus einem heptameren GroES-Ring zusammen, der an der cis Domäne von GroEL bindet (Ranford et al. 2000). Die Faltung von Substraten durch GroESL findet aktiv unter ATP-Verbrauch statt, wobei der Prozess durch Regulation der ATPase-Aktivität in der Regel von GroES beeinflusst wird (Farr 2003). Die Erkennung der Substrate erfolgt über exponierte hydrophobe Bereiche des Substrats im Inneren der fassartigen Struktur von GroEL. Durch ATP-Bindung wird eine Konformationsänderung des GroEL-Rings mit Bildung einer stark hydrophilen Oberfläche in der Käfigstruktur herbeigeführt, die für eine effiziente Faltung der Substrate essentiell ist (Kumar and Mande 2011). Im bindungsaktiven Stadium liegt GroEL offen vor, so dass Substratproteine an den exponierten hydrophoben Gruppen der apikalen Domänen von GroEL binden können (Langer 1992; Horwich 1999). Durch diese Bindung wird die Affinität zu GroES und ATP an der anderen Seite des GroEL-Komplexes erhöht. Wenn ATP und GroES an dieser Seite binden, verschließen sie dadurch den Komplex und das nicht-native Substratprotein wird vom äußeren Milieu abgeschlossen und durch Konformationsänderungsprozesse in den nativen Zustand überführt (Xu 1997). Nach der ATP-Hydrolyse durch GroEL erfolgt die Dissoziation vom Ko-Chaperon GroES und die Entlassung des nativen Proteins (Abbildung 2).

Studien haben gezeigt, dass der GroEL-Chaperonin-Komplex in einigen Organismen sowohl ohne Assoziation mit dem Ko-Chaperon GroES, als auch ATP-unabhängig, die Rückfaltung denaturierter Proteine bewirken kann (Zhang et al. 2001; Zhang et al. 2010). Der exakte Ablauf der Konformationsänderung der gebundenen Proteine durch GroESL ist bis dato nicht vollständig geklärt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Mechanismus vom Substrat abhängig ist und gegebenenfalls variieren kann (Sigler 1998; Kovács et al. 2010).

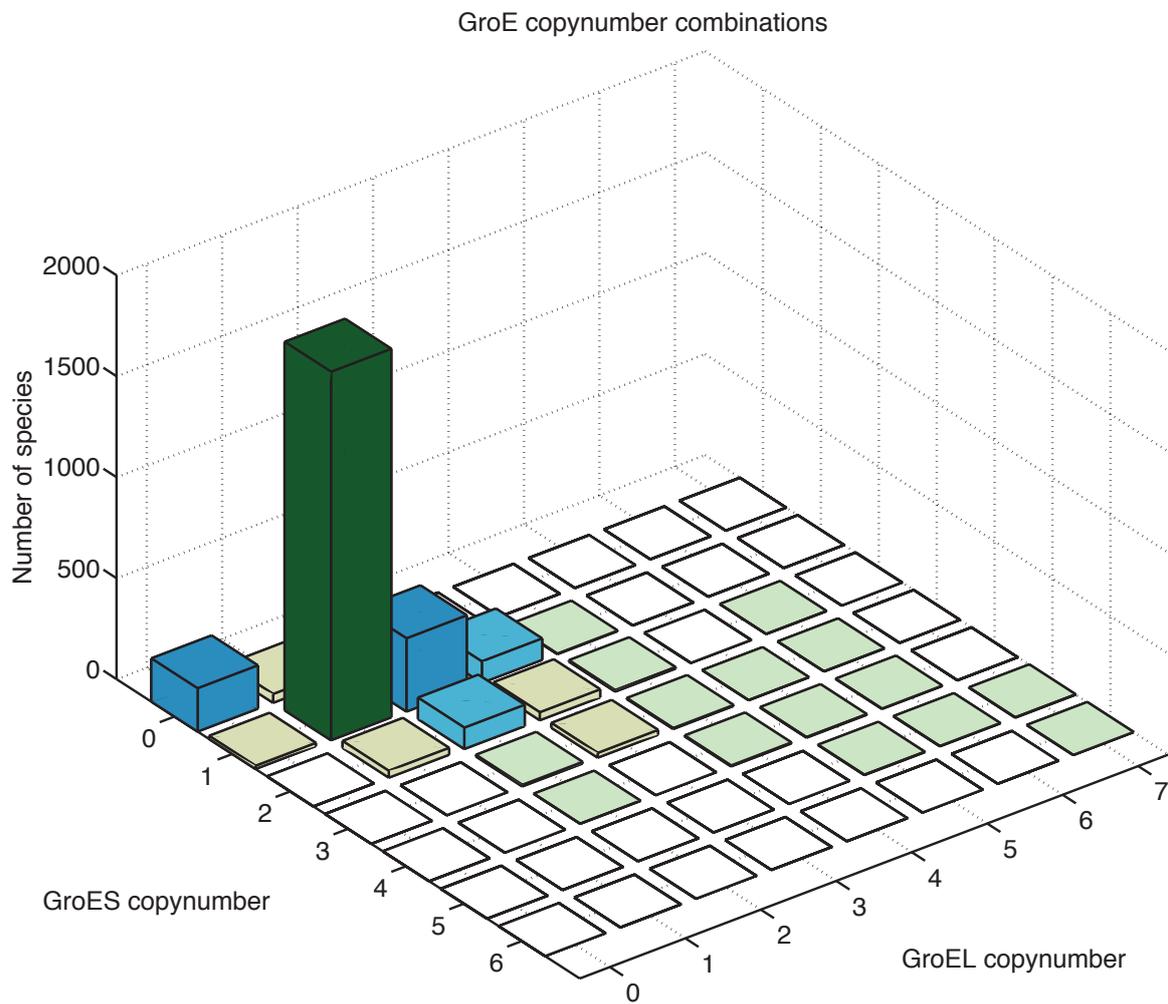


**Abb. 2** Struktur und Funktion des GroESL Chaperon-Komplex (Hartl 2011)

Der zur Gruppe der Hsp60 gehörende Chaperonin-Komplex GroESL ist in der Vielzahl der Eubakterien durch nur ein einzelnes Operon kodiert, welches die Sequenzen für die beiden Gene *groES* und *groEL* trägt. Ca. 30% dieser Taxa kodieren für multiple *groEL* Genkopien (Lund 2009). Diese *groEL* Paraloge können biscistronisch, d.h. zusammen mit *groES* in einem Operon (nachfolgend *groESL* genannt) vorliegen oder monocistronisch reguliert werden (Abbildung 3). Phylogenetische Analysen zeigen, dass *groEL* Paraloge innerhalb der Prokaryoten mehrmals unabhängig voneinander entstanden sind und demnach eine distinkte Adaption besitzen, was wiederum zu verschiedenen Funktionen und Regulationen der paralogen Genkopien geführt hat (Gould 2007; Goyal et al. 2006; Li et al. 2006).

In den Spezies, in denen bisher die Diversifikation der Paraloge untersucht wurde, trägt üblicherweise eines dieser Paraloge die *Houskeeping*-Funktion, welche essentiell für die Vitalität des Organismus ist (Furuki 1996; Kovács et al. 2001). Ein Beispiel für die vielfältige Differenzierung der *groEL* Genkopien ist die Entwicklung in dem gramnegativen Bakterium *Sinorhizobium meliloti*. In diesem übernimmt nur eines der insgesamt fünf *groEL* Paraloge, die *Housekeeping*-Funktion und ist essentiell für die Nodulation des Bakteriums. Zwar kann ein weiteres Paralog (*groEL2*) die *Houskeeping*-Funktion substituieren, jedoch ist das geringere Expressionslevel der Genkopie nicht ausreichend für die übliche Ausbildung der Symbiose mit höheren Pflanzen (Bittner et al. 2007). In dem Pathogen *Mycobacterium tuberculosis*, welches zwei vollständige *groESL* Operone in seinem Genom kodiert, sind beide *groEL* Paraloge in der Lage Oligomere auszubilden und einen *groEL* defizienten *E. coli* Stamm zu komplementieren. Diese Tatsache spricht für eine Konversierung der (Vorläufer-) Funktion in den Genkopien, jedoch ist nur eines der Paraloge essentiell (Fan et al. 2012).

Im Deltaproteobakterium *Myxococcus xanthus* DK1622 ist eine Deletion von je einem der beiden vorhandenen *groESL* Paraloge möglich, jedoch ist das Verhalten der jeweiligen Deletionsmutanten signifikant verschieden. Die Unterschiede zeigen sich hauptsächlich in der Prädation, Entwicklung und phänotypischen Ausbildung nach einem Hitzeschock. Dieses Phänomen lässt auf eine funktionale Divergenz der beiden *groESL* Paraloge schließen. Die Neofunktionalisierung der Paraloge zeigt sich zum einen durch ein signifikant diverses Expressionslevel der Genkopien sowie zum anderen durch ein spezialisiertes Substrat-Set der GroEL Paraloge. Lediglich 35% der GroEL Substrate in *M. xanthus* DK1622 interagieren mit beiden Paralogen (Wang et al. 2013).



**Abb. 3** Vorkommen der GroES und GroEL Paraloge in Prokaryoten (D. Bogumil)

Untersuchung der GroESL Homologe in vollständig sequenzierten prokaryotischen Genomen. 2604 der insgesamt 2818 Genome kodieren die Gene des GroESL Chaperonins. In 1825 Genomen liegt jeweils nur ein *groES* und *groEL* Gen vor. Nur 106 haben zwei vollständige Operons, während der Rest eine unterschiedliche Anzahl an *groES* und *groEL* Paralogen kodiert.

## 2.3 Cyanobakterien

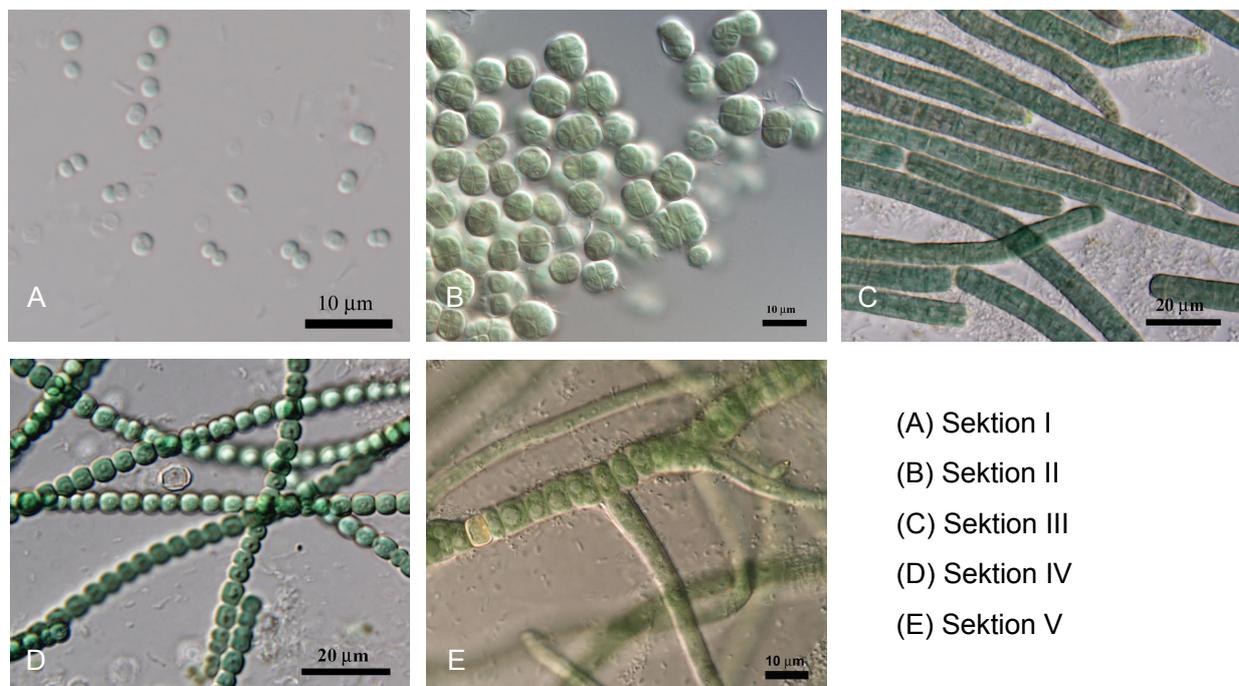
Das Phylum Cyanobakterien repräsentiert eine Gruppe gramnegativer, phototropher Bakterien, die als die ältesten autotrophen Organismen auf der Erde gelten. Cyanobakterien sind die einzigen oxygenen photosynthetischen Organismen in der Gruppe der Prokaryoten (Stanier 1977) und machen ein Hauptphyla in der Gruppe der Bakterien aus (Herrero 2001). Basierend auf der oxygenen Photosynthese der Cyanobakterien übernehmen diese eine Schlüsselrolle in der Evolution des Lebens (Martin 2001; Blankenship 1998). Als Stickstoff-Fixierer haben die Cyanobakterien signifikant zur initialen Oxygenierung der Atmosphäre beigetragen (Blankenship 1998; Martin 2001). Die mehr als 1500 Arten sind durch eine sehr hohe Diversität in ihrer Morphologie charakteristisch.

Cyanobakterien besiedeln sowohl terrestrische, als auch aquatische Habitate. Aufgrund ihrer hohen Anpassungsfähigkeit an verschiedene Umweltbedingungen haben diese Spezies extrem diverse ökologische Nischen mit einem hohen Temperatur- und Nährstoffspektrum erschlossen. Beispielsweise kann das Cyanobakterium *Synechococcus lividus* extreme Temperaturdifferenzen von -60 °C bis 74 °C überdauern (Whitton and Potts 2000). Einige cyanobakterielle Spezies sind außerdem durch ihre Fähigkeit zur Ausbildung spezialisierter Zellen in der Lage Stickstoff zu fixieren. Aufgrund der diversen Morphologie und den Unterschieden im Zellteilungsmechanismus der Bakterien, wurde eine Klassifizierung der Cyanobakterien in fünf Sektionen vorgenommen (Abbildung 4) (Rippka 1979) welche heute häufig auch mit "Subsektionen" beschrieben werden (Castenholz 2001).

Die Sektion I (*Chroococcales*) liegt einzellig oder in Aggregaten vor und reproduziert sich binär in ein bis drei Ebenen. Vertreter der Sektion II (*Pleurocapsales*) weisen ebenfalls eine einzellige oder aggregierte Morphologie auf, jedoch findet die Reproduktion dieser Gruppe durch interne multiple Zellteilung statt. Die Sektionen III bis V weisen allgemein eine höhere morphologische Komplexität auf. Cyanobakterien, die der Sektion III (*Oscillatoriales*) zugehörig sind, bilden Filamente aus vegetativen Zellen. Vertreter der filamentösen Sektion IV (*Nostocales*) besitzen darüber hinaus noch die Fähigkeit zur Zelldifferenzierung. Die filamentösen Cyanobakterien der Sektion V (*Stigonematales*) unterscheiden sich von Sektion IV durch ihre mehrdimensionalen Zellteilungsebenen.

Die Klassifizierung aufgrund der morphologischen Diversität der Cyanobakterien konnte zum Teil durch phylogenetische Studien bestätigt werden (Turner 1999; Tomitani 2006; Tomitani). Es ist allgemein anerkannt, dass Chloroplasten höherer Pflanzen durch die Symbiose mit einem cyanobakteriellen Vorläufer entstanden sind (Martin and Herrmann 1998; Douglas 2003) und Studien deuten auf einen Ursprung der Plastiden in Vorläufern der beiden Subsektionen IV und V hin (Deusch et al. 2008; Dagan et al. 2013).

Durch weitere molekulare Phylogenie-Studien wurde außerdem gezeigt, dass der gemeinsame Vorfahre der rezenten Cyanobakterien ein photoautotropher und einzelliger Organismus war. Die Fähigkeit zur Zelldifferenzierung, Stickstofffixierung, sowie Filamentbildung entstand somit erst in der evolutionären Entwicklung der Cyanobakterien (Sanchez Baracaldo 2005)



**Abb. 4** Morphologische Diversität der Cyanobakterien

Durchlicht Mikroskopische Aufnahmen von Cyanobakterien der fünf verschiedenen Sektionen. (A) *Synechocystis* (B) *Chroococcidiopsis* (C) *Microcoleus* (D) *Anabaena* (E) *Fischerella*. Die einzelnen Aufnahmen wurden von <http://ccala.butbn.cas.cz/en> entnommen

*Nostocales* und *Stigonematales* zeichnen sich durch ihre Multizellularität, das Potenzial der Stickstofffixierung in spezialisierten Zellen, sowie die multiplanare Zellteilung aus. Je nach Nährstoffversorgung bilden diese Spezies neben vegetativen Zellen auch Akineten (Überdauerungszellen ähnlich den Sporen) und Heterocysten (Zellen mit Fähigkeit zur Stickstofffixierung unter Diazotrophie) aus. Bei geringem Stickstoff-Milieu wird eine differentielle Genexpression induziert, welche die Heterocysten-Formierung steuert. Die ausdifferenzierten Heterocysten sind durch zusätzliche Polysaccharidschichten vom umgebenden Sauerstoff abgeschirmt. In den Sauerstoff-dezimierten Bedingungen innerhalb der Zelle sind die Heterocysten in der Lage Stickstoff zu fixieren, der anschließend an die benachbarten Zellen zu übertragen wird (Wolk et al. 1994).

Die Fähigkeit der Stickstoff-Fixierung der Cyanobakterien ist von der Photosynthese-Kapazität des Organismus abhängig, da von den Heterocysten benötigte Photosynthese-Produkte aus den benachbarten vegetativen Zellen zur Verfügung gestellt werden müssen. Die Heterocysten selbst sind nicht in der Lage Photosynthese zu betreiben. Es wurde gezeigt, dass sowohl die Photosynthese, als auch die Fähigkeit zur Stickstoff-Fixierung durch verschiedene Stressbedingungen stark beeinflusst werden. In diversen Cyanobakterien, wie *Synechocystis* (Glatz et al. 1999), *Synechococcus* (Eriksson and Clarke 1996) und *Anabaena* (Chaurasia and Apte 2009) findet eine Inaktivierung des Photosystems bei Hitze statt.

## 2.4 GroESL in Cyanobakterien

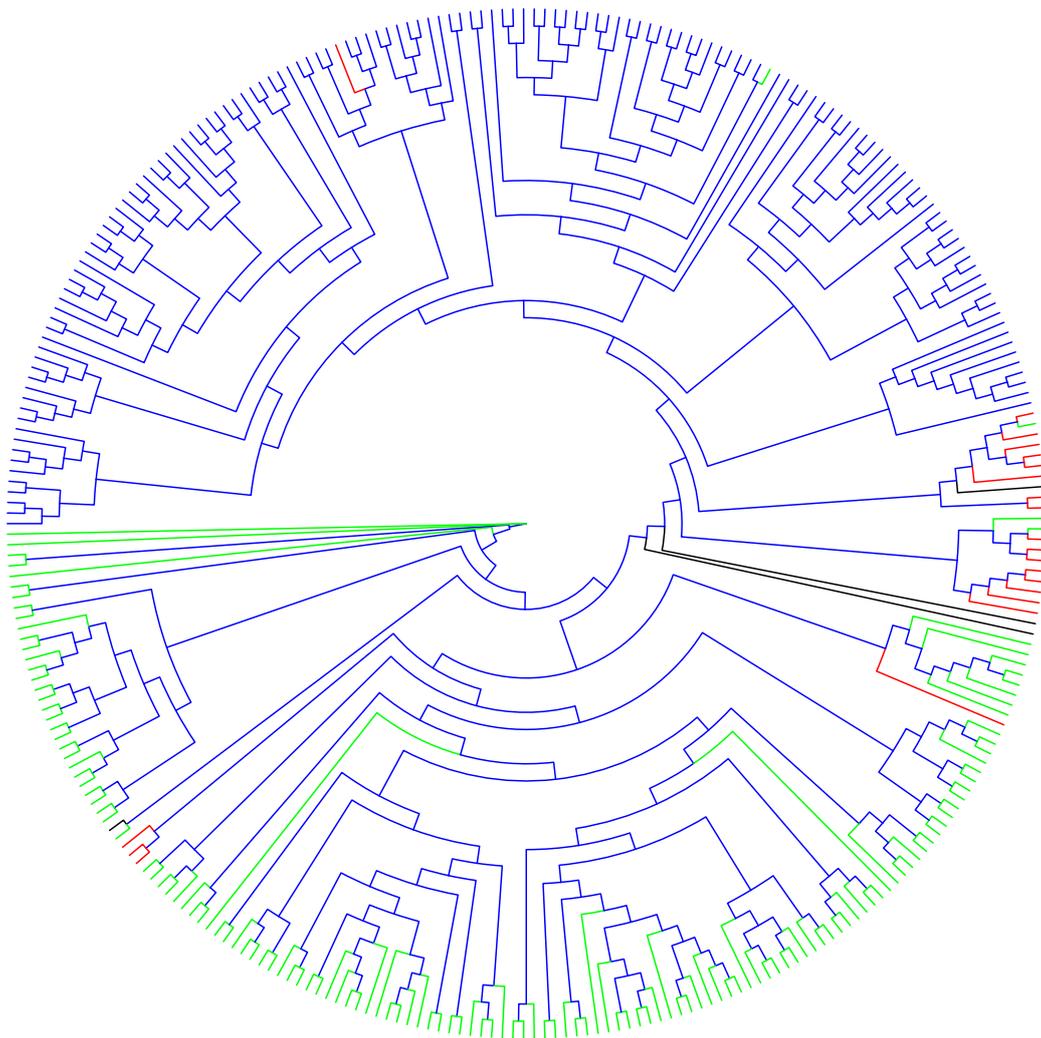
Durch die Fähigkeit, ihre Morphologie unter anderem durch Multizellularität an die vorhandenen Ressourcen anzupassen, können Cyanobakterien maximales Wachstum erreichen und ihre Reproduktion entsprechend der Umgebung regulieren (Rippka 1979). Besonders bemerkenswert ist hier auch die differentielle Regulation von molekularen Chaperonen, welche die Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der Protein-Homöostase unter diversen Stressbedingungen vermittelt und somit einen weiteren wichtigen Faktoren der Anpassungsfähigkeit der Cyanobakterien darstellt.

In den Cyanobakterien *Synechocystis* PCC 6803 (Slabas et al. 2006) und *Anabaena* L-31 (Rajaram and Apte 2010) konnte beobachtet werden, dass die Expression verschiedener Chaperone wie GroEL1, GroES, GroEL2, DnaK, HtpG und ClpB nach Hitzestress-Inkubation signifikant erhöht ist. In Vertretern unterschiedlicher Sektionen weist die Expression des GroESL Chaperonins auch unter anderen Stress-Bedingungen, wie beispielsweise Salz- oder osmotischem Stress, ein erhöhtes Level auf (Apte 2001; Castielli et al. 2009). Dadurch zählt GroEL und der Ko-Faktor GroES zu den wichtigsten Chaperonen, die in cyanobakteriellen Zellen akkumulieren (Roy et al. 1999; Chaurasia and Apte 2009; Rajaram et al. 2014) und steht folglich mit der Adaption der Cyanobakterien an verschiedene Stressbedingungen in Zusammenhang. Sowohl in einzelligen als auch in multizellularen Cyanobakterien wurde gezeigt, dass die *groEL* Paraloge besonders an die Thermotoleranz und der Anpassung an Diazotrophie beteiligt sind (Chaurasia and Apte 2009; Rajaram and Apte 2010).

GroEL Paraloge sind ubiquitär in allen bis dato sequenzierten cyanobakteriellen Genomen kodiert (Lund 2009), wobei nicht alle dieser Paraloge zusammen mit *groES* biscistronisch in einem Operon reguliert sind. Folglich wird die cyanobakterielle *groESL* Familie durch eine bicistronische, zusammen mit *groES* in einem Operon regulierte *groEL* Genkopie und einem monocistronischen Paralog charakterisiert (Kaneko et al. 2001; Furuki 1996; Tanaka et al. 1997; Kaneko et al. 2001). Es wird davon ausgegangen, dass eine Duplikation des Operons und anschließender Reduktion des *groES* Paralogs im Laufe der cyanobakteriellen Evolution stattgefunden hat (Sato et al. 2008).

Im Gegensatz zur essentiellen Ko-Chaperonin Funktion von GroES in *E. coli* (Horwich 1999; Paul et al. 2007) ist das cyanobakterielle GroES in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Huq et al. 2010) und *Anabaena* (Potnis et al. 2016) nicht maßgeblich an der Faltungsaktivität von GroEL beteiligt. Das bicistronische GroEL Paralog weist dennoch eine höhere Chaperonin- und ATPase-Aktivität als die monocistronische Kopie auf.

Die kürzlich erfolgte Genom-Sequenzierung von Stellvertretern der multizellularen, Heterocysten-formenden *Stigonematales* und *Nostocales* zeigte, dass diese Gruppen im Gegensatz zu den Spezies der morphologisch einfacheren Sektionen, drei *groEL* Paraloge kodieren (Dagan et al. 2013). Durch phylogenetische Analysen der GroEL Paraloge in 141 Cyanobakterien Genomen ist eine Stamm-spezifische Duplikation deutlich erkennbar. Die Protein-Sequenzen aller cyanobakteriellen GroEL1 Paraloge weisen eine erheblich höhere Ähnlichkeit zueinander, als zu den korrespondierenden GroEL2 oder GroEL3 Paralogen, auf (Abbildung 5).



**Abb. 5** GroEL Protein-Phylogenie

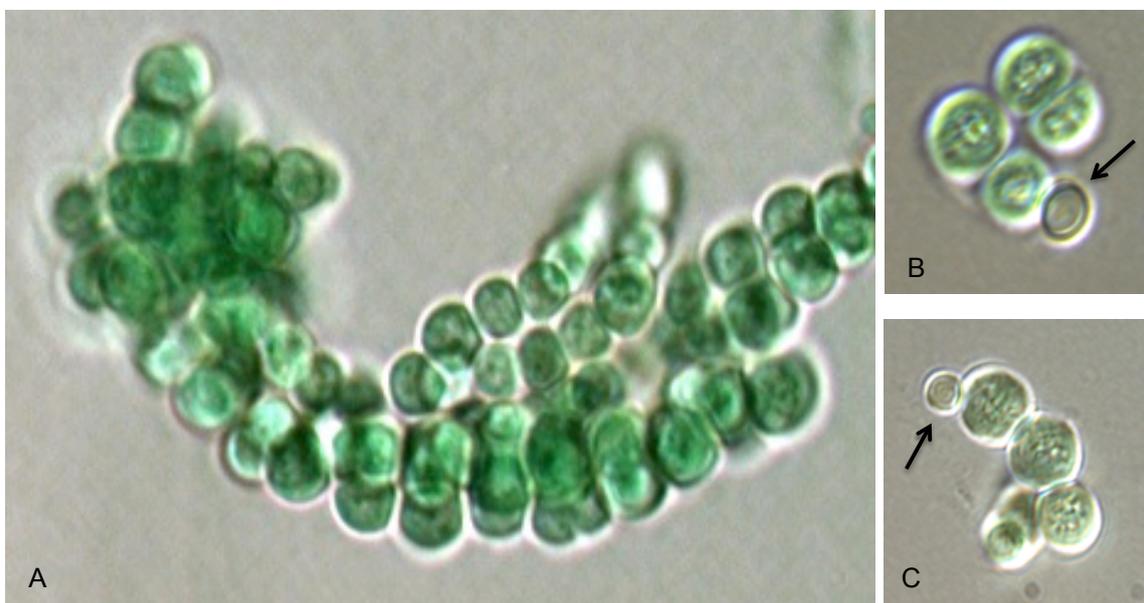
Protein-Phylogenie der GroEL Paraloge innerhalb des Taxa der Cyanobakterien.. Gezeigt sind phylogenetischen Rekonstruktionen der GroEL Paraloge von 141 cyanobakteriellen Spezies. Die Rekonstruktionen wurden von D. Bogumil mit der Maximum Likelihood Methode erstellt. Die Zweige sind entsprechend der Aminosäuresequenzen der Paraloge coloriert (blau) GroEL1 (bicistronisch mit GroES) (rot) GroEL2 (bicistronisch mit GroES) (grün) GroEL3 (monocistronisch).

Die transkriptionelle Aktivierung der *groEL* Paraloge in Cyanobakterien erfolgt mittels negative Regulierung durch das HrcA-Dimer, welches in allen Cyanobakterien vorliegt (Nakamoto et al. 2003). Durch Bindung an das CIRCE-Element (Zuber 1994) das in der *upstream* Region beider *groEL* Paraloge in *Synechocystis* (Kojima and Nakamoto 2007) und *Anabaena* (Rajaram and Apte 2010) detektiert wurde, wird die Expression dieser reguliert.

Insbesondere in Zusammenhang mit verschiedenen Stressbedingungen weisen die Paraloge ein differentielles Expressionslevel auf. Die regulatorische Änderung der *groEL* Expression bezüglich einer geänderten Umweltbedingung zeigt nicht in allen Paralogen die gleiche Auswirkung. Obwohl die Expression beider *groEL* Paraloge in *Synechocystis* (Asadulghani et al. 2004) und *Anabaena* (Rajaram and Apte 2008) während Hitze-Inkubation induziert wird, ist die Auswirkung der Transkriptionslevel-Änderungen der Genkopien innerhalb der Spezies signifikant verschieden. In dem Heterocysten-formierenden Cyanobakterium *Anabaena* ist das Expressionslevel des monocistronischen *groEL* Paralogs bei Hitzestress nur in Abhängigkeit von stickstofffixierenden Bedingungen reprimiert (Rajaram and Apte 2008). In Dunkelheit oder unter Photosystem-inhibierenden Bedingungen findet auch eine Reprimierung der monocistronischen *groEL* Kopie in *Synechocystis* PCC 6803 statt (Glatz 1997). Unabhängig vom CIRCE-Element findet zusätzlich eine Regulierung der *groEL* Gene durch verschiedene cis-Elemente, wie beispielsweise K-Box, N-Box und H-Box statt. Das Vorkommen dieser Elemente im *upstream* Bereich der *groEL* Paraloge ist nicht ubiquitär (Kojima and Nakamoto 2007; Rajaram et al. 2014). Die differentielle Expression der Paraloge weist auf eine funktionelle Divergenz der Genkopien in Cyanobakterien hin.

### 2.4.1 GroESL in *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912

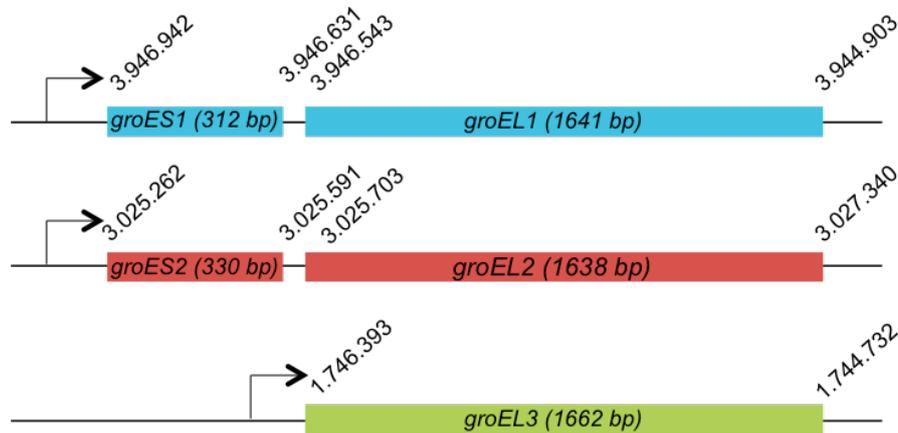
In bisherigen Studien wurde die Redundanz und funktionelle Divergenz der groEL Paraloge erst in wenigen Cyanobakterien (*Synechocystis* (Glatz et al. 1999; Asadulghani et al. 2003)), *Thermosynechococcus* (Sato et al. 2008) und *Anabaena* (Rajaram and Apte 2008)) untersucht. Keine dieser Studien fand in den morphologisch komplexen Spezies der Sektion V statt fand. Diese Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der Evolution und funktionellen Divergenz von Chaperon-Paralogen in stigonematalen Cyanobakterien. Als Stellvertreter dieser Sektion wurde das Cyanobakterium *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 (Abbildung 6) verwendet, welches erstmalig in indischen Reisfeldern isoliert (Rippka 1979) und durch die *Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria* (PCC, Paris) als Laborstamm kultiviert wurde.



**Abb. 6** Mikroskopische Aufnahme von *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 (K. Stucken)

Durchlicht-Mikroskopie von *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912. (B und C) Pfeile markieren ausdifferenzierte Heterozysten nach Kultivierung in diazotrophen Bedingungen (BG11<sub>0</sub> Medium)

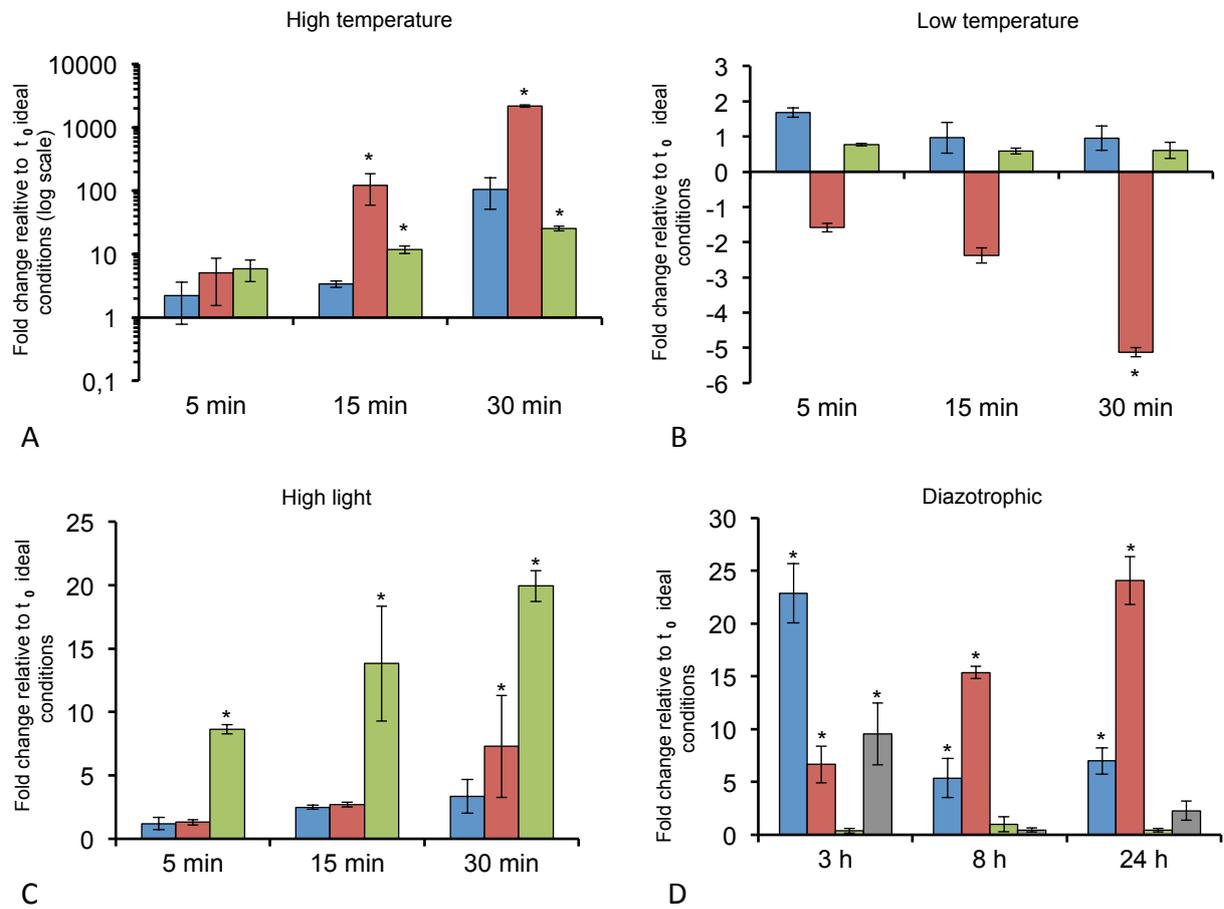
Von den drei im Genom von *C. fritschii* PCC 6912 kodierten *groEL* Paralogen sind zwei dieser Genkopien (*groEL1* und *groEL2*) bicistronisch zusammen mit *groES* (*groES1* und *groES2*) in Operons reguliert, während eine weitere Kopie monocistronisch (*groEL3*) vorliegt (Abbildung 7).



**Abb. 7** *groESL* Paraloge in *C. fritschii* PCC 6912

Organisation der *groES* und *groEL* Paraloge (inklusive der Positionen) im Genom von *C. fritschii* PCC 6912. Der in dieser Abbildung verwendete Farbcode der Paraloge ist für die weiteren Abbildungen dieser Arbeit fortlaufend.

In vorhergegangenen Studien (J. Ilhan) wurde bereits das Transkriptionslevel der drei *groEL* Paraloge unter verschiedenen Wachstumsbedingungen, wie Starklicht, Temperaturunterschiede und Stickstoffmangel (Diazotrophie) untersucht. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Expressionsanstieg aller drei Paraloge bei Hitze-Inkubation, der sich allerdings in den einzelnen Kopien unterschiedlich stark ausprägt (Abbildung 8A). Gegensätzlich zu dem zur Sektion I zugehörigen *Thermosynechococcus elongatus* (Sato et al. 2008) findet in *C. fritschii* PCC 6912 bei Kältestress keine Induktion der Expression des monocistronischen *groEL* Paralogs statt. Stattdessen wird das Transkriptionslevel von *groEL2* durch die Inkubation des Cyanobakteriums in 25 °C signifikant herabgesetzt (Abbildung 8B). Das Transkriptionslevel des monocistronischen *groEL* Paralogs hingegen zeigt eine starke Abhängigkeit zur Starklicht-Bedingung (Abbildung 8C), was mit Untersuchungen zur lichtabhängigen *groEL* Expression in *Synechocystis* konvergierend ist (Glatz et al. 1999; Asadulghani et al. 2003). Unter diazotrophen Bedingungen ist das Expressionsmuster der *groEL* Paraloge in *C. fritschii* PCC 6912 divers (Abbildung 8D). Basierend auf diesen Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um einen *Dosage* Effekt der Genkopien handelt.



**Abb. 8** Relative Transkriptionslevel-Änderung der *groEL* Paraloge in *C. fritschii* PCC 6912 (nach J. Ilhan)

## 2.5 Zielsetzung

Im Laufe der cyanobakteriellen Evolution hat mehrmals unabhängig voneinander eine Duplikation der für den Chaperonin-Komplex GroESL kodierenden Sequenzen stattgefunden. Im Gegensatz zu den Cyanobakterien der Sektionen I bis III, welche üblicherweise zwei *groEL* Kopien in ihrem Genom kodieren, weisen die Spezies der *Nostocales* und *Stigonematales* drei paraloge *groEL* Gene auf. Bis dato liegen keine Analysen über die Funktion dieser Paraloge in der Gruppe der *Stigonematales* vor, weshalb hier das Cyanobakterium *Cholorogloeopsis fritschii* PCC 6912 als Modellorganismus verwendet wurde. Bei dem in vorläufigen Studien dieser Arbeitsgruppe wurde hier bereits ein differentielles Transkriptionslevel dieser Genkopien gezeigt.

Um einen genaueren Einblick in eine mögliche funktionale Differenzierung der GroES und GroEL Paraloge zu erlangen wurden in dieser Arbeit verschiedene Analysen zur differentiellen evolutionären Entwicklung und Funktion der Paraloge *in vivo* durchgeführt. Anhand von *in silico* Untersuchungen der kodierenden Sequenzen sollten erste Hinweise auf eine divergierende evolutionäre Entwicklung gegeben werden, welche in den folgenden Experimenten weiter verifiziert werden sollten. Um zu überprüfen, ob eine homogene Entwicklung der im Operon regulierten Gene stattgefunden hat, wurde eine qRT-PCR Analyse von *groES* und *groEL* durchgeführt.

Durch transkriptionelle GFP-Fusion der Chaperonin Paraloge konnte zum einen die transkriptionelle Regulation und zum anderen eine Expressionslokalisation der Paraloge *in vivo* untersucht werden. Durch die Kultivierung der transgenen Stämme unter verschiedenen Stressbedingungen sollten Rückschlüsse auf die Entwicklung der Paralogen in Zusammenhang mit der Adaption, der Multizellularität und der Fähigkeit der Heterocysten-Formation der stigonematalen Cyanobakterien gezogen werden. Weiter sollte die Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion der paralogen Chaperonin-Untereinheiten Aufschluss über die strukturelle Differenzierung der Proteine und über die Möglichkeit der Chaperonin Assemblierung der einzelnen Paraloge geben. In einem Komplementierungstest in einem *groESL* defizienten *E. coli* Stamm wurde anschließend die Funktionalität der verschiedenen homo- und heteromeren Chaperonin-Komplexe untersucht. Anhand von homologer Rekombination sollten zudem cyanobakterielle *groEL* Deletionsmutanten erzeugt werden, um somit detailliertere Informationen über eine Redundanz der Genkopien in *C. fritschii* PCC 6912 zu erlangen.

## 3 Methoden

### 3.1 Stämme und Kultivierung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Cyanobakterium *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 und verschiedene Stämme der Art *Escherichia coli* verwendet. Die Stamm-Kulturen wurden photoautotroph in Flüssigmedium mit Stickstoff (BG11) oder ohne zugesetzten Stickstoff (BG11<sub>0</sub>) bei einer Lichtintensität von  $24 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  kultiviert (Rippka 1979). Die Standard-Wachstumsbedingungen von *C. fritschii* PCC 6912 betrug  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  in einem Belichtungszyklus von 12 Stunden. Für die Kultivierung der Stämme wurden, je nach Größe der Kultur, Erlenmeyerkolben mit einem Gesamtvolumen von 50 ml oder 200 ml verwendet, wobei das Volumen der cyanobakteriellen Kultur jeweils ein Fünftel des Gesamtvolumens des Kultivierungsgefäßes betrug.

Alle verwendeten *Escherichia coli* Stämme sind in Tabelle A1 (Anhang) gelistet. Die Stämme XL1 blue, DH5 $\alpha$ , BL21 und HB101 dienen für die Klonierungen zur Herstellung von Plasmiden und zur Konjugation für die Transformation von *C. fritschii* PCC 6912.

Die *in vivo* Protein-Protein-Interaktionsanalysen wurden in dem *E. coli* Stamm BHT101 durchgeführt. Dieser Stamm ist durch ein Defizit der Adenylatcyclase besonders für die Detektion der Interaktion der T25- und T18-Fusionsproteine geeignet (Battesti and Bouveret 2012). Für den Komplementierungstest wurde der *E. coli* Stamm MGM100 verwendet (McLennan and Masters 1998), in dem der native *pgroESL* Promotor durch einen induzierbaren *pBAD* Promotor ersetzt wurde.

Die Selektion der transformierten *E. coli* Stämme erfolgte, je nach verwendetem Konstrukt, mit den in Tabelle A2 (Anhang) aufgelisteten Antibiotika. Die Antibiotika-Stock-Lösungen wurden nach Sambrock et al. 1989 hergestellt. Alle verwendeten *E. coli* Stämme wurden in Luria Broth Medium (LB) oder auf LB-Agar Platten (Sambrock 1989), sofern nicht explizit anders angegeben, bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  kultiviert. Von allen *E. coli* Stämmen wurden Glycerol-Stock-Kulturen zur dauerhaften Lagerung hergestellt. Hierfür wurden  $500 \mu\text{l}$  Zellen einer frischen Übernacht-Kultur mit  $500 \mu\text{l}$  100% Glycerol versetzt und in flüssigem Stickstoff ( $\text{IN}_2$ ) schockgefroren. Die dauerhafte Lagerung erfolgte dann anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$ .

## 3.2 Isolierung von Nukleinsäuren

### 3.2.1 DNA-Isolation

Die Isolation der genomischen DNA (gDNA) aus dem Cyanobakterium *C. fritschii* PCC 6912 erfolgte mit der sogenannten CTAB-Methode. Bei dieser können durch Komplexbildung der DNA mit Cetyltrimethylammoniumbromid Polysaccharide und Proteine entfernt werden. Für die Isolation wurden 10 ml Kultur ( $OD_{750} \leq 0,6$ ) durch Zentrifugation ( $12.000 \times g$ , 10 min,  $4^\circ C$ ) der Bakterien pelletiert. Der Zellaufschluss für die Isolation von DNA und RNA aus dem Cyanobakterium erfolgte durch einen Homogenisator (Precellys24). Hierfür wurden die Zellen zusammen mit einer Mischung aus Glas- und Keramikkügelchen (Soil grinding mix SK38, Precellys 24) mit einem Durchmesser von 200-300  $\mu m$  in drei dreißig Sekunden Intervallen aufgeschlossen, da die Zellmembran durch die Reibungskräfte zerstört wird. Um eine RNA-Degradierung durch Überhitzung zu verhindern, wurden die Proben zwischen den Intervallen ebenfalls dreißig Sekunden lang auf Eis gelagert. Die Separation des Überstandes wurde mittels Zentrifugation ( $12.000 \times g$ , 5 min) bei RT durchgeführt. Der entstandene zelltrümmerfreie Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die weiteren Isolationsschritte (z.B. DNA-, RNA und Protein-Isolation) eingesetzt.

### 3.2.2 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus *C. fritschii* PCC 6912 erfolgte stets mit mindestens drei biologischen Replikaten und wurde mit dem RNA Plant Purification Reagent (Invitrogen) nach modifiziertem Herstellerprotokoll durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der "single-step-" Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987). Die pelletierten Zellen aus 10 ml Kultur ( $OD_{750} \leq 0,6$ ) wurden in 0,5 ml Reagenz suspendiert und über den Homogenisator, wie oben beschrieben, aufgeschlossen und separiert. Zur Trennung der Proteine wurde der überführte Überstand mit 0,1 ml NaCl (5 M) versetzt. Anschließend wurde zur Phasentrennung der Proteinreste, der DNA und der RNA 0,3 ml Chloroform zugefügt. Nach Zentrifugation ( $12000 \times g$ ,  $4^\circ C$ ) wurde die wässrige, RNA enthaltende, Phase überführt und zur Fällung mit einem Volumen Isopropanol 10 min bei RT inkubiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation sedimentiert und anschließend wiederholt mit 75%-igem Ethanol gewaschen. Die Elution der isolierten RNA erfolgte in 30  $\mu l$   $H_2O$ . Nach erfolgter RNA-Isolation wurden die Proben mit 2 U DNaseI (Fermentas) behandelt um evtl. vorhandene DNA Kontaminationen zu eliminieren. Die Inaktivierung der DNase erfolgte durch das DNA-Inactivation Reagent (Ambion) nach Herstellerangaben. Durch Gelelektrophorese

wurde die Integrität der RNA-Proben überprüft. Die Konzentrationsbestimmung aller Nukleinsäure-Proben wurde mittels Spektralphotometrie (NanoDrop, Thermo Scientific) vorgenommen.

### 3.3 Amplifikation

Für die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis et al. 1983) verwendet. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Amplifikationen, die anschließend zur Klonierung verwendet wurden, erfolgten mit der Phusion-DNA-Polymerase (Thermo Scientific). Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen sind in den Tabellen 2-7 und 9 gelistet und wurden durch die Firma Eurofins synthetisiert. Die Berechnung der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der DNA-Stränge erfolgte durch die Formel  $T_m=4x(G+C)+2x(A+T)$ . Hierfür wurden die Oligonukleotidsequenzen berücksichtigt, welche mit der Template-DNA hybridisieren. Die Spezifität aller Oligonukleotidsequenzen wurde über den BLAST-Algorithmus (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul 1990) des NCBI (National Center for Biotechnology Information) identifiziert.

Zur Verifizierung der Konstrukte wurden sogenannte Test-PCR durchgeführt. Hierfür wurde die Taq DNA-Polymerase (New England Biolab) verwendet. Pro Ansatz wurden 25 pmol je Oligonukleotid-Primer, 10 mM dNTPs (Thermo Scientific) und 100 ng gDNA oder 10 ng Plasmid-DNA (pDNA) in einem Gesamtvolumen von 50 µl verwendet.

**Tab. 1:** Standard PCR-Programm bei Verwendung der Phusion Polymerase

Initiale Denaturierung	98 °C	10 min	
Denaturierung	98 °C	15 sec	} X 30
Hybridisierung	60 °C	15 sec	
Elongation	72 °C	10sec-2 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	

Die in den PCRs genutzten variablen Parameter setzen sich aus der Hybridisierungstemperatur und der Elongationszeit zusammen. Diese sind abhängig von den verwendeten Oligonukleotidsequenzen (siehe Berechnung oben) und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments.

## 3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (Johansson 1972; Sambrook 1989) der Größe nach aufgetrennt. Die Trennung der DNA-Fragmente ist von der Porengröße des Agarosegels abhängig und korreliert somit mit der Konzentration der Agarose. Hier wurden TAE-Agarosegele verwendet, die eine Konzentration von 1% aufweisen. Durch das dem Gel zugefügte Midori Green (1 µl pro 15 ml Agarosegel; Nippon Genetic Europe GmbH) konnte anschließend die Visualisierung mit dem ChemiDocMP® (Biorad Laboratories, USA) erfolgen. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein Größenstandard mit bekanntem Bandenmuster (Hyperladder I, Bioline) verwendet. Die Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mit der gerätespezifischen Software Image Lab 5.0 (Biorad Laboratories, USA).

Die synthetisierten DNA-Fragmente zur anschließenden Klonierung wurden mit Hilfe des Qiaquick Gel-Extraktion Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben aus dem Gel eluiert. Nachfolgend wurde die Konzentration der Proben photometrisch bestimmt (NanoDrop, Thermo Scientific). Die gereinigten DNA-Fragmente wurden durch die Firma Eurofins mit der Sanger-Sequenzierungsmethode auf ihre Sequenzgenauigkeit überprüft.

## 3.5 Klonierung

### 3.5.1 Ligation

Für die Insertion der DNA-Fragmente in die entsprechenden Vektoren wurde das QuickLigase Kit (New England Biolab) genutzt. Die verwendete Quick Ligase T4 katalysiert die Formation von Phosphatdiesterbindungen zwischen dem 5' Phosphat- und 3' Hydroxyl-Terminus in doppelsträngiger DNA (Sambrook und Russel 2001). Bei der Durchführung der Ligation wurde, unter Verwendung folgender Formel, auf das molare Verhältnis von Vektor und Insert geachtet. Grundsätzlich wurde die Ligation mit 100 ng Vektor, 0,5 µl Enzym, 5 µl 2 x Puffer und der entsprechenden Menge Insert in einem 10 µl Ansatz angesetzt.

$$((\text{Menge Vector (ng)} \times \text{Insertgröße (bp)}) / \text{Vektorgröße (bp)}) \times 3 = \text{Menge Insert (ng)}$$

### 3.5.2 Transformation von *E. coli*

In dieser Arbeit wurden, sofern nicht anders angegeben, ultrakompetente DH5 $\alpha$  oder XL1 Blue *E. coli* Zellen in allen Klonierungsschritten verwendet. Die Zellen wurden wie in Inoue et al. (1990) beschrieben vorbereitet und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Für die Transformation wurde ein 50  $\mu$ l Aliquot auf Eis aufgetaut, mit 5  $\mu$ l des Ligationsansatzes versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Die Selektion der Vektor-tragenden Zellen erfolgte durch Kultivierung auf selektiven LB-Agar Platten. Für die anschließende Plasmid-Isolation wurden Zellen einer Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium inokuliert und bei 37 °C schüttelnd 10 bis 16 Stunden kultiviert.

### 3.5.3 Plasmid-Isolation

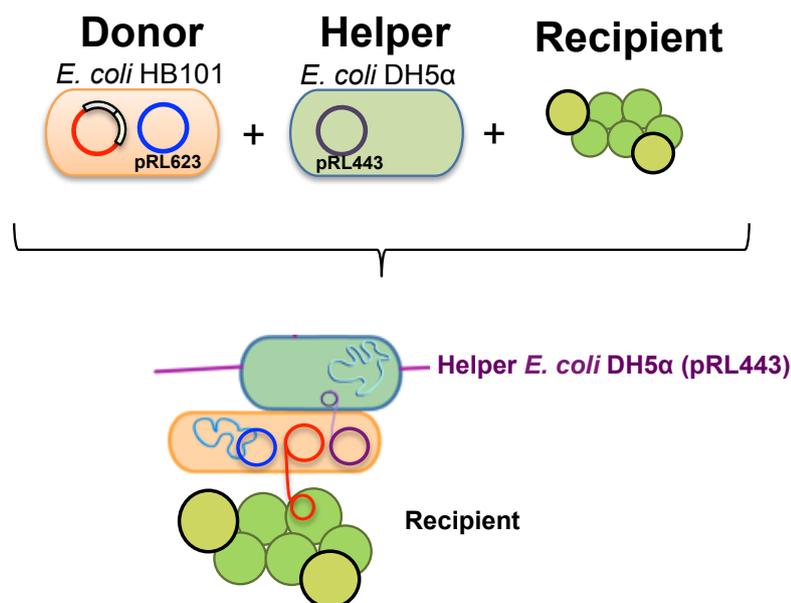
Für die Plasmid-Isolation aus den *E. coli* Stämmen wurde das GeneJET Plasmid Miniprep Kit der Firma Thermo Scientific verwendet. Diese Methode der Plasmid-Isolation beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Bimboim and Doly 1979). Die Durchführung erfolgte exakt nach Herstellerangaben des verwendeten Kits.

### 3.5.4 Restriktion

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von New England Biolab (NEB) bezogen. Die Restriktion erfolgte nach Herstellerangaben. Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung wurden sogenannte Test-Restriktionen durchgeführt. Hierfür wurde die Restriktion in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l angesetzt (100-1000 ng isolierte Plasmid-DNA, 0,1  $\mu$ l Enzym, 1  $\mu$ l 10 x Puffer und X  $\mu$ l H<sub>2</sub>O). Bei Restriktionen mit zwei Enzymen wurde zusätzlich die Kompatibilität der Temperaturoptima und der benötigten Puffer überprüft.

### 3.6 Transformation von *C. fritschii* PCC 6912

Zur Erzeugung genetisch modifizierter Cyanobakterien wurde das stigonematale Cyanobakterium *C. fritschii* PCC 6912 durch sogenanntes "triparental mating" transformiert. Die Transformation erfolgte laut Standardprotokoll (Wolk et al. 1988) mit einigen Modifikationen nach Stucken et al. (Stucken et al. 2012). Bei dieser Methode wird das zu exprimierende Plasmid durch Konjugation mit *E. coli* in *C. fritschii* PCC 6912 eingebracht. Das *triparental mating* ist eine Form der Konjugation, bei der drei verschiedene Bakterienstämme verwendet werden. In einem sogenannten Helfer-Stamm (*E. coli* DH5 $\alpha$ ) liegt ein Plasmid vor (pRL443), das die Gene zur Fähigkeit des Gen-Transfers kodiert. In einem zweiten Stamm (Donorstamm, *E. coli* HB101) liegt ein mobilisierbares Plasmid (pRL25c) vor, welches die in den Empfängerstamm zu übertragenden Sequenzabschnitte trägt. Das Besondere an dem durchgeführten *triparental mating* ist, dass der Donor-Stamm ein weiteres Plasmid (pRL623) trägt. Das pRL623 Plasmid trägt kodierende Sequenzen für verschiedene Methylasen, die cyanobakterielle Restriktionsenzyme methylieren. Dadurch kann die Transformationseffizienz der Cyanobakterien deutlich erhöht werden. Nach erfolgter Transformation wurden die Zelle auf 1% Agarose BG11 Platten inkubiert. Die Selektion erfolgte mit Spectinomycin (Sp) in einer Endkonzentration von 2,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  für die *groEL* Deletionsstämme und mit Neomycin (Nm) 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  für die transkriptionellen GFP-Fusionsstämme.

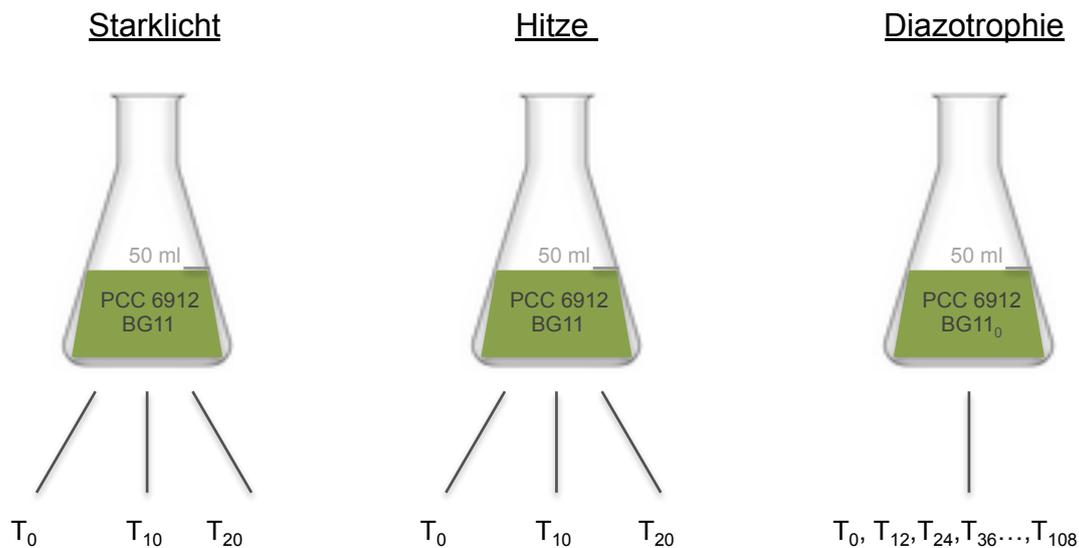


**Abb. 9** Schematische Darstellung des *triparental matings* zur Transformation von Sektion V Cyanobakterien (modifiziert nach K. Stucken)

### 3.7 Transkriptionelle GFP-Fusion

Zur Überprüfung der transkriptionellen Regulation der verschiedenen GroEL Paraloge aus *C. fritschii* PCC 6912 wurden GFP-Fusionskonstrukte synthetisiert. Hierfür wurde *downstream* der Promotorregion der verschiedenen GroEL Paraloge das Gen für das grün fluoreszierende Protein (Green Fluorescence Protein (GFP)) kloniert, wodurch die Expression von *gfp* durch *pgroEL* reguliert wird. Durch Fluoreszenzmikroskopie ist es dann möglich die transkriptionelle Regulation der Gene in der Zelle zu lokalisieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch diese Methode, die Expression der paralogen Chaperone unter verschiedenen Stressbedingungen analysiert. Als Stressbedingungen wurde Hitze (50 °C), Starklicht (140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und Stickstoffmangel (Diazotrophie) festgelegt. Die heterolog *gfp* exprimierenden *C. fritschii* PCC 6912 Stämme wurden mit unterschiedlicher Dauer unter den verschiedenen Bedingungen kultiviert und nach festgelegten Zeitpunkten (Abbildung 10) mikroskopisch dokumentiert.



**Abb. 10** Getestete Stressbedingungen der transkriptionellen Regulation der *groESL* Paraloge

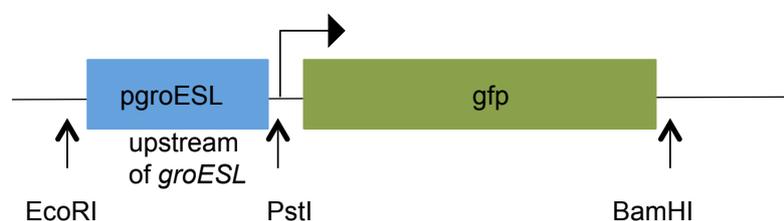
Die Abbildung zeigt eine graphische Darstellung der getesteten Stressbedingungen zur Analyse der transkriptionellen Regulation der *groESL* Paraloge in *C. fritschii* PCC 6912. Es wurden jeweils nach den angegebenen Zeitpunkten (Angaben in Minuten) Proben entnommen und direkt im Anschluss floureszenzmikroskopisch dokumentiert.

### 3.7.1 Herstellung der GFP-Fusionskonstrukte

Zur Herstellung der Plasmide für die Analyse der transkriptionellen Regulierung der cyanobakteriellen *groEL* Paraloge unter verschiedenen Stressbedingungen, wurden GFP-Fusionskonstrukte synthetisiert und über *triparental mating* in *C. fritschii* PCC 6912 eingebracht. Für die Vektoren wurde der vorhergesagte Promotor-Bereich jedes paralogen *groEL* Gens (250 bp großer 5' - Bereich *upstream* des Startcodons von *groES1* und *groES2* bzw. *groEL3*) amplifiziert und über die verwendeten Oligonukleotidsequenzen (Tabelle 2) mit den Erkennungssequenzen für *EcoRI* und *PstI* versehen. Der für GFP kodierende Sequenzabschnitt wurde über *PstI* und *BamHI* in das Plasmid pBSK+ subkloniert und anschließend die Promotorbereiche der *groEL* Paraloge N-terminal mit der kodierenden GFP Sequenz fusioniert. Der gesamte Sequenzabschnitt wurde über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *BamHI* in den Transformationsvektor pRL25C (Abbildung 11) ligiert und die erfolgreiche Klonierung mittels Test-PCR und Test-Restriktion verifiziert. Die Transformation von *C. fritschii* wurde wie in Kapitel 3.6 beschrieben durchgeführt und die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen bis zur exponentiellen Phase. Anschließend wurde die Kultur in drei biologische Replikate aufgeteilt.

**Tab. 2:** Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Herstellung der transkriptionellen GFP-Fusionskonstrukte

Primer	Sequenzen (5' - 3')
pGroEL1F_EcoRI	AGTAGAATTCGCTCCTGAAGTTTCTATACAATTAC
pGroEL1R_PstI	AGTACTGCAGACAAATTCGTGCCTTGTTAG
pGroEL2F_EcoRI	AGTAGAATTCAAAGTTCAGTTTTCTACACTCTT
pGroEL2R_PstI	AGTACTGCAGTATTTATTGAATTTACAACCTCGTACTA
pGroEL3F_EcoRI	AGTAGAATTCTTTGCCGCTTCCATCAT
pGroEL3R_PstI	AGTACTGCAGGCCGCTTCCATCATTAC



**Abb. 11** Schematische Darstellung des GFP-Fusionskonstrukts

Die Expression des Fluoreszenzproteins GFP in *C. fritschii* PCC 6912 wird durch N-terminale Fusion mit Promotoren der cyanobakteriellen *groEL* Paraloge (*pgroEL*) reguliert.

### 3.7.2 Stress-Induktion

Um die Transkription der GroEL Paraloge in *C. fritschii* PCC 6912 unter divergierenden Bedingungen analysieren zu können wurde die Kultivierung unter drei differentiellen Wachstumsbedingungen durchgeführt. Die GFP exprimierenden *C. fritschii* PCC 6912 Stämme wurden bis zur exponentiellen Wachstumsphase unter Standardbedingungen und anschließend unter Hitze (50 °C), Starklicht (140  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) oder Stickstoffmangel (Diazotrophie) kultiviert. Die Dokumentation des Fluoreszenzsignals in den Licht- und Temperaturstress-Proben erfolgte 10 und 20 Minuten nach der Stressinduktion. Die Proben zur Analyse der GroEL Paraloge unter diazotrophen Bedingungen wurden über einen Zeitraum von insgesamt einer Woche dokumentiert. Zur Betrachtung dieser Zellen am Fluoreszenzmikroskop wurde ein Objektträger mit einem speziellen Abdichtungskleberand (Gene Frame, ABgene) präpariert und mit 1% Agarose verfestigtem BG11<sub>0</sub> Medium überschichtet. Nach dem Aushärten wurden transformierte *C. fritschii* Zellen aufgetropft und mit einem Deckgläschen gasdicht verschlossen. Die Proben wurden dadurch, unter diazotrophen Bedingungen, auf diesem Objektträger kultiviert. Alle 12 Stunden wurde die Dynamik der Zelldifferenzierung und insbesondere der Heterocysten-Formation durch eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme dokumentiert.

### 3.7.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Visualisierung der transkriptionellen Regulation/GFP-Fluoreszenz erfolgte durch ein Axio 2 Lichtmikroskop (Carl Zeiss) mit einem Plan-Apochromat 63x/1.40. Öl-Objektiv. Das exprimierte GFP (GFPmut3.1) wurde mit einem Aron Laser bei 488 nm angeregt und die Emission in einem Wellenlängenbereich von 500 nm bis 530 nm detektiert. Die Autofluoreszenz der verwendeten Cyanobakterien liegt im Bereich von 630 nm bis 700 nm und verursacht daher keine Beeinflussung des GFP-Fluoreszenzsignals. Zur Überprüfung der Vitalität der Cyanobakterien wurde diese zusätzlich dokumentiert. Von jeder Probe wurden verschiedene fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von drei Replikate pro Stressbedingung analysiert. Diese wurden anschließend mit den Programmen Zen 1 (Zeiss) und Fiji (Schindelin et al. 2012) bearbeitet. Mit Hilfe der Software wurden die Durchlicht-, Autofluoreszenz- und GFP-Fluoreszenzaufnahmen von jeweils einer Einstellung übereinandergelagert dargestellt, um die exakte Lage und Intensität der Expression in den Zellen zu identifizieren. Dadurch ist zum einen eine Lokalisation der Expression und zum Anderen die Expressionsstärke unter den verschiedenen Stressbedingungen detektierbar.

## 3.8 Protein-Protein Interaktionsnetzwerk

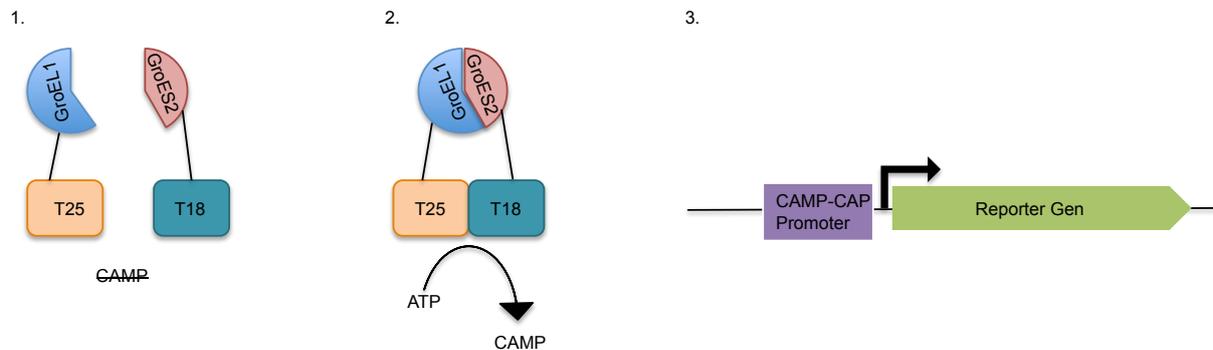
Im Genom von *C. fritschii* PCC 6912 werden drei GroEL (GroEL1, GroEL2 und GroEL3) Paraloge und zwei GroES (GroES1 und GroES2) Paraloge kodiert, wobei die beiden GroES Kopien in einem Operon mit je einem GroEL vorliegen (GroESL1 und GroESL2). Um testen zu können ob die unterschiedlichen Chaperonin-Untereinheiten auch untereinander interagieren wurde ein Interaktionstest durchgeführt. Dadurch kann die physikalische Protein-Protein-Interaktion und Assoziation der Paraloge untereinander analysiert werden. Hierfür wurde ein Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid (BACTH) System (EUROMEDEX) genutzt. In dem BACTH System (Karimova et al. 1998) wurden alle fünf Chaperonin Proteine aus *C. fritschii* PCC 6912 systematisch auf paarweise Interaktionen untereinander getestet. Das System basiert auf der interaktionsvermittelten Rekonstruktion der zyklischen Adenosinmonophosphat (AMP) Signal Kaskade. Durch physikalische Interaktion der beiden Adenylatcyclase Untereinheiten T18 und T25, wird diese Kaskade aktiviert und ein Reporter gen exprimiert.

Alle für die Expression der Chaperonin-Untereinheiten verwendeten Plasmide, sowie der genutzte *E. coli* Reporter Stamm BHT101, wurden durch das Kit zur Verfügung gestellt und die Durchführung des Experiments erfolgte nach Herstellerangaben.

### 3.8.1 Identifikation positiver Interaktionen

Die Identifikation der zu testenden Protein-Protein-Interaktion beruht auf der Expression des Reportergens *lacZ*. Durch physikalische Interaktion der Fusionsproteine werden die beiden Untereinheiten der Adenylatcyclase (T25 und T18) zusammengeführt und Adenosintriphosphat wird zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) umgesetzt (Abbildung 12). Durch diesen Schritt wird der Promotor des Reportergens *lacZ* aktiviert und die Genexpression induziert. Die Interaktion der Fusionsproteine bewirkt somit eine Interaktion der beiden Adenylatcyclase-Untereinheiten, was indirekt die Expression von *lacZ* ( $\beta$ -Galactosidase) bewirkt. Über LB-Platten, die mit X-gal ( $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), IPTG, (0,5 mM), Amp und Km versetzt wurden, erfolgte die Selektion der  $\beta$ -Galactosidase positiven Zellen. Eine blaue Färbung der Bakterien impliziert die Expression von *lacZ* und somit eine physikalische Interaktion der getesteten Proteine.

Die Ergebnisse des sogenannten Blau-Weiß-Screenings wurden über einen Beta-Galactosidase-Test verifiziert. Im diesem Test wird die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase durch Hydrolyse von ONPG ( $\sigma$ -Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) quantitativ bestimmt. Die Quantität wurde durch die sogenannte Miller-Unit angegeben (Miller 1992).



**Abb. 12** Schematische Darstellung des Prinzips des BACTH Tests

Die Abbildung wurde nach EUROMEDEX modifiziert. Durch physikalische Interaktion der Fusionsproteine wird die Adenylatcyclase durch ihre Untereinheiten T18 und T25 komplementiert und kann somit zyklisches cAMP umsetzen. Dadurch kommt es zur Aktivierung eines cAMP-CAP-Promotors der die Expression eines Reportergens (*lacZ*) reguliert.

### 3.8.2 Herstellung der Proteinfusionskonstrukte

Alle fünf Chaperonin-kodierenden Fragmente wurden über die in Tabelle 3 angegebenen Oligonukleotidsequenzen amplifiziert. Es wurde darauf geachtet, dass der Leserahmen zur Expression der Fusionsproteine verwendenden Plasmide beibehalten wurde. Hierfür wurden die verschiedenen DNA-Fragmente mit Oligonukleotidsequenzen amplifiziert, welche mit spezifischer Anzahl an zusätzlichen Nukleotiden ergänzt wurden.

Über die Restriktionserkennungssequenzen *PstI* und *BamHI* wurden die amplifizierten DNA-Abschnitte in die *Multiple Cloning Sequence* (MCS) der BACTH Vektoren (pKNT25, pKT25, pUT18, pUT18C) eingebracht. Die Sequenzgenauigkeit der Proteinfusions-Konstrukte wurde durch Sequenzierung der MCS aller Plasmide verifiziert. Um ausschließen zu können, dass die Position des verwendeten Fusionskonstrukts zu einem falsch-positiven Interaktionsergebnis führt, wurden alle GroES und GroEL Paraloge jeweils entweder N- und C-terminal mit den Adenylatcyclase-Untereinheiten (T18 und T25) versehen. Außerdem wurden alle durchführbaren Interaktionsmöglichkeiten getestet. Insgesamt wurden für die Analyse der Protein-Protein-Interaktion 20 Plasmide erstellt (Tabelle A4).

Für die Durchführung des Interaktionstests wurde der Reporter-Stamm BTH101 genutzt, welcher ultra-kompetent nach Inoue et al. transformiert wurde (Inoue et al. 1990).

**Tab. 3:** Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Herstellung der Fusionskonstrukte zur Identifikation von Protein-Interaktion

Primer	Sequenzen (5'- 3')
GroES1F_PstI N	CTGCAGCATGGCAGCTGTATCTCTAAG
GroES1R_BamHI NN	GGATCCGGGCTAACGATCGCCAAAAT
GroES1F_PstI NN	CTGCAGCCATGGCAGCTGTATCTCTAA
GroES1R_BamHI	GGATCCGCTAACGATCGCCAAAATGTC
GroEL1F_PstI N	CTGCAGCATGGCAAAGCGCATTATTTACA
GroEL1R_BamHI NN	GGATCCGGGTAATCGAAGTCGCCGCC
GroEL1F_PstI NN	CTGCAGCCATGGCAAAGCGCATTATTTAC
GroEL1R_BamHI	GGATCCGTAATCGAAGTCGCCGCC
GroES2F_PstI N	CTGCAGCATGCTTGGAGGATTAGATATG
GroES2F_PstI NN	CTGCAGCCATGCTTGGAGGATTAGATATG
GroES2R_BamHI	GGATCCTGTCAGTGTGCAAGGATG
GroEL2F_PstI N	CTGCACATGGCTAAACAAATAATTTATAACG
GroEL2R_BamHI NN	GGATCCGGGTAATCAAATCGCCACCCA
GroEL2F_PstI NN	CTGCAGCCATGGCTAAACAAATAATTTATAACG
GroEL2R_BamHI	GGATCCGTAATCAAATCGCCACCCA
GroEL3F_PstI N	CTGCAGCATGGCAAAAATTATTGCATTTGACGAAG
GroEL3R_BamHI NN	GGATCCGGCATCATACCCATGCCGCC
GroEL3F_PstI NN	CTGCAGCCATGGCAAAAATTATTGCATTTGACGAAG
GroEL3R_BamHI	GGATCCCATCATACCCATGCCGCC

### 3.9 Komplementierungstest

Um die funktionale Chaperonin-Aktivität der GroEL Paraloge in *C. fritschii* PCC 6912 zu untersuchen wurde ein Komplementierungstest mit einem *groESL* defizienten *E. coli* Stamm (MGM100) durchgeführt. In MGM100 wird die Expression von nativem *groESL* durch einen *pBAD* Promotor reguliert (McLennan and Masters 1998). Dadurch ist die Expression des nativen *groESL*, durch die Zugabe von 0,2 % Arabinose im Medium, regulierbar. Der  $\Delta$ *groESL* *E.coli* Stamm ist ohne die funktionelle Aktivität eines GroESL Chaperonin-Komplexes letal.

Zur Analyse der cyanobakteriellen *groEL* Paraloge wurde dem Medium statt Arabinose 0,2 % Glucose zugesetzt, was die Aktivität des *pBAD* Promotors inhibiert, so dass kein natives *groESL* in MGM100 exprimiert wird.

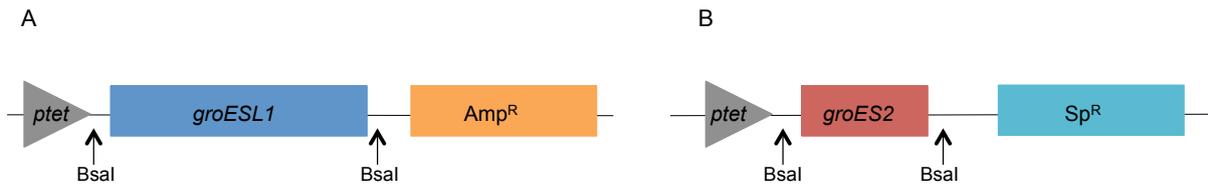
In diesem Assay wurden die beiden Operons *groESL1* und *groESL2*, so wie *groESL2* in Ko-Existenz von *groES1* heterolog in MGM100 exprimiert und so auf funktionale Komplementation getestet. Der MGM100 Stamm weist nur dann Vitalität auf, wenn die *groES* und *groEL* Paraloge aus *C. fritschii* PCC 6912 die Funktion des nativen *E. coli* Chaperonins vollständig komplementieren.

### 3.9.1 Herstellung der Komplementierungskonstrukte

Die beiden kodierenden Sequenzen der cyanobakteriellen *groESL* Operons (*groESL1* und *groESL2*) und die des Ko-Chaperonins *groES1* wurden mit Oligonukleotidsequenzen (Tabelle 4) amplifiziert und im 5'-und 3'-Bereich mit Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym *Bsal* versehen. Die DNA-Fragmente wurden über die entsprechende Schnittstelle in den Expressionsvektor pASK-IBA3plus und einen modifizierten pASK-IBA3plus Vektor (pASK-IBA3\_Sp) kloniert (Abbildung 13). Durch einen Überhang in der Erkennungssequenz von *Bsal* liegt automatisch eine gerichtete Insertion des Fragments vor. Die Expressionsvektoren tragen einen *ptet* Promotor, wodurch die Expression der klonierten Gene, durch die Zugabe von Anhydrotetrazyklin im Medium ( $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), aktiviert werden kann (Abbildung A1, Anhang).

**Tab. 4:** Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Herstellung der Komplementierungskonstrukte

Primer	Sequence (5'- 3')
GroEL1F_Bsal	CTGCTGGGTCTCCCATAGCTGATGGCTAATAG
GroEL1R_Bsal	GCCCGTCGGTCTCAGCGCTTTAGTAATCGAAGTCGCCGC
GroEL2F_Bsal	CTGCTGGGTCTCCTAATGTAGGAGTTAGGGGCTAG
GroEL2R_Bsal	CTGCTGGGTCTCTGCGCTTTAGTAATCAAAATCGCCAC
GroEL3F_Bsal	CTGGAGGGTCTCCTAATGCTGTATCCAACATCAGC
GroEL3R_Bsal	CAGCAGGGTCTCAGCGCTCTACATCATACCCATGCCGC
GroES1F_Bsal	GGTCTCTATGGCAGCTGTATCTCTAAGCG
GroES1R_Bsal	GGTCTCAGCGCTTAGCTAACGATCGCCAAAATGT
GroES2F_Bsal	GGTCTCTATGCTTGGAGGATTAGATATGGCG
GroE21R_Bsal	GGTCTCAGCGCCTATGTCAGTGTGCGCAAGGATG
pASK w.o. Amp F	GCCTCACTGATTAAGCATTGGTAGG
pASK w.o. Amp R	CAGGGTTATTGTCTCATGAGCGG

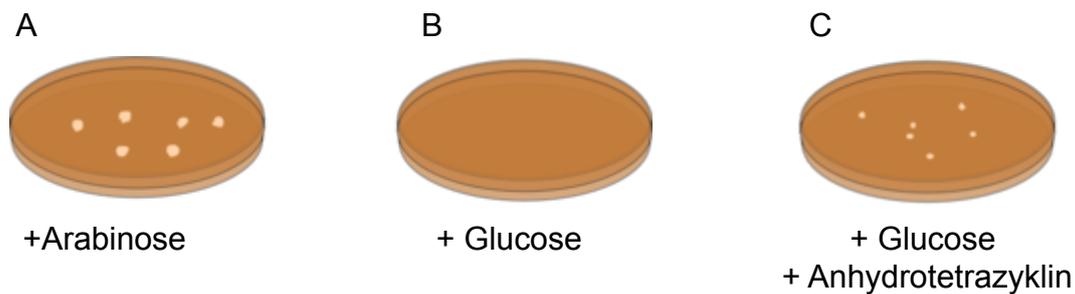


**Abb. 13** Komplementierungskonstrukte

Die Konstrukte wurden durch Klonierung in die MCS mit dem Expressionsvektor pASK-IBA 3plus hergestellt. (A) zeigt repräsentativ ein Konstrukt zur heterologen Expression der beiden cyanobakteriellen *groESL* Operons, sowie der drei GroEL Paraloge in  $\Delta$ *groESL* *E. coli* MGM101. (B) repräsentiert ein Expressionskonstrukt des Ko-Chaperonins *groES2* aus *C. fritschii* PCC 6912. Die *groES* Sequenzen wurden in die MCS von pASK-IBA 3 plus\_1 kloniert, bei welchem die vorhandene Resistenzkassette durch eine Sp/Sm- Resistenzkassette ersetzt wurde.

### 3.9.2 Selektion auf positive Transformanten und Komplementation

Zur Expression von den cyanobakteriellen *groESL* und *groEL* Paralogen in dem  $\Delta$ *groESL* *E. coli* Stamm MGM100 wurde dieser durch Elektroporation (1300 Volt, 1 mm Elektro-Gap Küvette, 150 ng pDNA) mit den Expressionsvektoren (Abbildung 13 A) transformiert. Zur Herstellung von MGM100 mit einer heterologen Ko-Expression von *groEL* und *groES* wurden beide Expressionsplasmide (Abbildung 13 A und B) zeitgleich über Elektroporation in MGM100 eingebracht. Anschließend wurden die Zellen zur Selektion nach der Transformation auf LB-Platten mit Km, Ara, Amp oder Km, Ara, Amp, Sp (für Ko-Expression) kultiviert. Für den Komplementierungstest wurden positive Klone über Nacht in LB mit 0,2% Arabinose und selektiven Antibiotika angezogen. Seriell verdünnte Kulturen wurden auf je drei verschiedene selektive LB Agar Platten (Abbildung 14) aufgebracht und für 18 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Kultivierung auf Arabinose versetzten LB-Platten diene als Positivkontrolle, während LB-Platten mit Glucose zur Negativkontrolle dienten. Auf Glucose und Anhydrotetrazyklin-versetzten Platten kann nur dann Wachstum von MGM100 detektiert werden, wenn die heterolog exprimierten cyanobakteriellen GroESL Proteine das *groESL* Defizit in MGM100 komplementieren können.



**Abb. 14** Schematische Darstellung selektiver Bedingungen zur Identifikation der funktionellen Komplementierung

Die Abbildung zeigt schematisch das idealisierte Wachstum von MGM100 bei heterologer Expression von cyanobakteriellen *groESL*, welches das Defizit des nativen *groESL* komplementiert. (A) Positiv-Kontrolle: Durch die Zugabe von Arabinose wird natives *groESL* exprimiert (B) Negativ-Kontrolle: Die Expression von nativem *groESL* wird durch Glucose reprimiert. (C) Glucose reprimiert die Expression von nativem *groESL*, während Anhydrotetracyclin die Expression der cyanobakteriellen *groESL* Paraloge induziert. Wachstum aus diesem Selektionsmedium impliziert funktionale Komplementation des *E. coli groESL* durch die *groESL* Paraloge aus *C. fritschii* PCC 6912

### 3.10 Deletion der GroEL Paraloge in *C. fritschii* PCC 6912

Durch Deletion je eines GroEL Paralogs in *C. fritschii* PCC 6912 soll untersucht werden, ob die Funktion des jeweiligen Paralogs durch die beiden anderen Paraloge übernommen werden kann bzw. wie sich das Expressionsmuster der Paraloge und ggf. der Phänotyp der Bakterien verhält. Hierfür wurden drei verschiedene Vektoren konstruiert, die jeweils die flankierenden Bereiche des Zielgens (*groEL*) sowie eine kodierende Sequenz für die Spectinomycin-Streptomycin-Resistenzkassette (*aadA*) tragen. Durch homologe Rekombination wird das *aadA* Gen gerichtet in die Gensequenz eines *groEL* Paralogs ins Genom von *C. fritschii* 6912 integriert. Die dadurch entstandene Mutante ( $\Delta$ *groEL C. fritschii*) verfügt somit über eine Deletion eines *groEL* Paralogs und trägt stattdessen eine Antibiotikaresistenz gegen Streptomycin.

#### 3.10.1 Herstellung der Deletionskonstrukte

Zur Herstellung der drei Deletionskonstrukte wurden die flankierenden Gensequenzen der *groEL* Paraloge aus *C. fritschii* PCC 6912 mit den in Tabelle 5 angegebenen Oligonukleotidsequenzen amplifiziert. Im Folgenden ist exemplarisch die Klonierung eines der drei Knock-Out Konstrukte beschrieben.

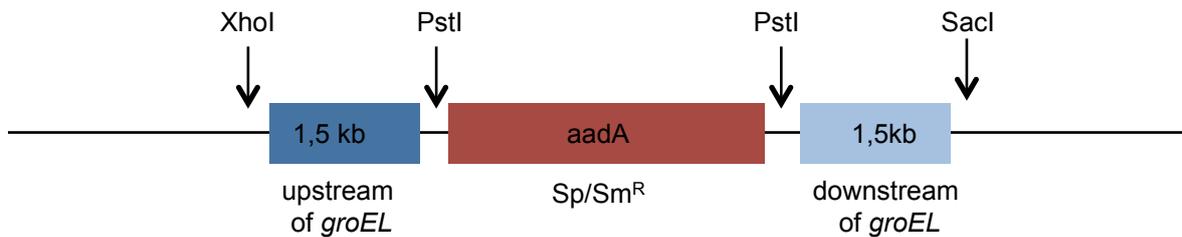
Für eine erfolgreiche homologe Rekombination und somit Deletion von *groEL* im cyanobakteriellen Genom, wurden jeweils ein 1,5 kb großer Bereich *up-* und *downstream* der für *groEL* kodierenden Gensequenz amplifiziert und mit Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme versehen.

Über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *PstI* wurde der *upstream*-Bereich von *groEL* in einen pBSK+ Vektor kloniert. Anschließend wurde der zweite flankierende Bereich (*downstream* von *groEL*) über *PstI* und *SacI* subkloniert. Durch Restriktion mit *PstI* wurde der Vektor für die Ligation mit der kodierenden Sequenz der Sp/Sm- Resistenzkassette (*aadA*) vorbereitet. Eine erfolgreiche Klonierung wurde durch die selektive Kultivierung auf LB-Sp/Sm- Platten verifiziert. Durch Test-PCR mit den angebenen Oligonukleotiden konnte die Insertionsrichtung der Resistenzkassette sichergestellt werden. Das gesamte 5'/*aadA*/3'-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen für *XhoI* und *SacI* mit dem eigentlichen Transformationsvektor (pRL271, Abbildung 15) ligiert und über die Ultrakompetenz-Transformationsmethode in *E. coli* HB101 eingebracht. Die Verifizierung erfolgte durch Wachstum auf selektivem Medium und der Test-Restriktion des isolierten Plasmids mit den Enzymen *XhoI* und *SacI*.

Nach überprüfter Klonierung wurde *C. fritschii* PCC 6912 mit dem Deletionskonstrukt über *triparental mating* (Kapitel 3.6) transformiert, um dort eine homologe Rekombination auszulösen und die kodierende *groEL* Sequenz im Genom durch die Sp/Sm-Resistenzkassette (*aadA*) zu ersetzen. Die Selektion der positiven Transformanten erfolgte zunächst auf mit sterilen Filtern versetzten, selektiven BG11-Platten und wurde anschließend durch Ausstrich der Kolonien auf Platten ohne Filter weitergeführt. Zur Vervielfältigung der Biomasse wurden die Bakterien in 3 ml Flüssigkultur überführt (BG11, Sm 2,5 µg/ml).

**Tab. 5:** Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Herstellung der *C. fritschii* PCC 6912 *groEL* Deletionsstämme

Primer	Sequenzen (5'- 3')
4098_XhoI_5'n_F	CTCGAGCAGACACCATCCGGGTAAAC
4098_PstI_5'n_R	CTGCAGACGGGCATTTTCGTTGTAAC
4098_PstI_3'n_F	CTGCAGGCCTGAGCCTAAAGATGGTG
4098_SacI_3'n_R	GAGCTCATTGCAGGAAGGATTCCACT
1816_XhoI_5'_F	CTCGAGGCCAGGGGTAICTCATAG
1816_PstI_5'_R	CATTTGACGAAGATTCGCGGCTGCAG
1816_PstI_3'n_F	CTGCAGCTCCTGACATGGGCGGTAT
1816_SacI_3'_R	GAGGTGCGAATATATTTGCGGAGCTC
3131_XhoI_5'_F	CTCGAGTTCGCTTCACGCTGCTAG
3131_PstI_5'_R	TAACGAAGAGGCTCGTCCTGCAG
3131_PstI_3'n_F	CTGCAGATGGGTGGCGATTTTGATTA
3131_SacI_3'n_R	GAGCTC ATCGCCTGCACTCCAAATAA



**Abb. 15** Deletionskonstrukt zur Erzeugung der  $\Delta groEL$  *C. fritschii* PCC 6912 Stämme

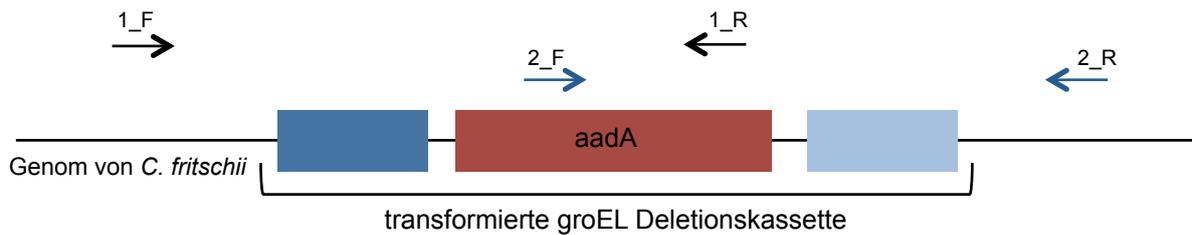
Im Genom von *C. fritschii* PCC 6912 wird *groEL* durch *aadA* mittels homologer Rekombination ersetzt. Die Insertion der Resistenzkassette ermöglicht eine Selektion von positiven Transformanten. Aufgrund der Sequenzhomologie zwischen den Deletionskonstrukten und den, im Genom von *C. fritschii* PCC 6912 kodierten, flankierenden Bereichen von *groEL*, soll ein Austausch von *groEL* und der Resistenzkassette stattfinden und cyanobakterielle *groEL* Deletionsstämme erzeugt werden ( $\Delta groEL$  *C. fritschii*).

### 3.10.2 Verifizierung der cyanobakteriellen *groEL* Deletionsstämme

Zur Analyse von  $\Delta groEL$  *C. fritschii* wurden, mit den in Tabelle 6 angegebenen Oligonukleotidsequenzen, verschiedene PCR Analysen durchgeführt, welche die Lokalisation der Resistenzkassette (*aadA*) im Genom von *C. fritschii* PCC 6912 validieren sollten. Durch die Spezifität der verwendeten Oligonukleotide kann nur dann ein Amplifikat entstehen, wenn eine homologe Rekombination und somit die Insertion der *aadA* Gensequenz in dem vorhergesagten Sequenzabschnitt stattgefunden haben. Pro *groEL* Paralog wurden zwei Primer-Sets für die Lokalisation der Resistenzkassette verwendet (Abbildung 16).

**Tab. 6:** Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Verifizierung der cyanobakteriellen  $\Delta groEL$  Stämme über PCR

Primer	Sequenzen (5'- 3')
groEL1 KO_locus_5'	GCACTTTCCCTAGCTTGCTG
groEL1 KO_locus_3'	AGCGATTTAGGGGTTGAGT
groEL2 KO_locus_5'	CCACCTTGTCCTATGGGTTG
groEL2 KO_locus_3'	GGCCCTGTTATGGGTTCTTT
groEL3 KO_locus_5'	GCCTACATCACGGGACAAGT
groEL3 KO_locus_3'	CTGCCACCGAAAGTGTTTTT
aadA_F	CCTTGACCGAACGCAGCGGT
aadA_R	TCCTCCGCCGCTGGACCTAC
groEL1_F	AGTAGAGCTCATGGCAAAGCGCATTATTTA
groEL1_R	AGTAGTCGACTTAGTAATCGAAGTCGCC
groEL2_F	AGTAGAGCTCATGGCTAAACAAATAATTTATAAC
groEL2_R	AGTAGTCGACTTAGTAATCAAAAATCGCCAC
groEL3_F	AGTAGAGCTCATGGCAA AAATTATTGCATTTGACGA
groEL3_R	AGTAGTCGACTACATCATACCCATGCCG



**Abb. 16** Verifizierung der Deletionsstämme

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der verwendeten Oligonukleotidsequenzen zur Verifizierung der Deletionsstämme. Um die Lokalisation der Resistenzkassette im Genom der potentiellen *C. fritschii* PCC 6912 *groEL* Deletionsstämme bestimmen zu können, wurden verschiedene PCR Analysen durchgeführt.

Des Weiteren wurden PCR mit Oligonukleotidsequenzen zur Amplifikation der drei *groEL* Paraloge durchgeführt. In einem Deletionsstamm sollte es nicht möglich sein *groEL* aus genomischer DNA der Mutanten zu amplifizieren. Hierfür wurde gDNA wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben aus den transformierten *C. fritschii* PCC 6912 Stämmen isoliert und als *Template* verwendet. Als Positiv-Kontrolle einer erfolgreichen PCR diente das Amplifikat von gDNA aus einem *C. fritschii* PCC 6912 Wildtyp Stamm.

Da durch PCR Analysen weder die Lokalisation der Sp/Sm-Resistenzkassette im cyanobakteriellen Genom bestimmt werden konnte, noch eine vollständige Deletion von *groEL* nachgewiesen wurde, wurden quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) der potentiellen Deletionsstämme durchgeführt. Hierfür wurde RNA der selektierten *C. fritschii* PCC 6912 Stämme isoliert und das Transkriptionslevel des (deletierten) *groEL* Gens im Verhältnis zum Wildtyp bestimmt. Die Isolation der RNA wurde durch Nutzung des Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen, Germany) nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Durch anschließende Behandlung mit DNaseI™ (DNA-free, Ambion, Germany) wurde vorhandene DNA abgebaut und die RNA-Proben wurden durch Gelelektrophorese und Spektralphotometrie (NanoDrop) qualitativ und quantitativ bestimmt. Jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurde zur cDNA Synthese mit iScript™ (Biorad, Germany) verwendet. Für die quantitative RT-PCR wurden spezifische Oligonukleotide (Tabelle 7) verwendet, die nur in einem der drei paralogen *groEL* Gensequenzen binden.

**Tab. 7:** Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Verifizierung der cyanobakteriellen  $\Delta groEL$  Stämme über qRT-PCR

Primer	Sequenzen (5'- 3')
q_rnpB_F	ACCAAACCTTGCTGGGTAACG
q_rnpB_R	CACCTTTGCACCCTTACCTT
q_groEL1_F	CGATTCTGCTCAAGCGTGGTA
q_groEL1_R	CCAGCAGAGATGGCACCT
q_groEL2_F	TGTTGCCCGTGCCCTTTA
q_groEL2_R	ATCAAATGGTTTTTCCTTCACTCG
q_groEL3_F	ATTGGCCAAATTCGCAAGCAAC
q_groEL3_R	TCCGCAATTTGCGGTCTTTAAG

Die Transkriptionslevel-Bestimmung wurde im StepOne Real-Time PCR System (Biorad, Germany) mit dem Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Germany) und 50 ng cDNA als Template durchgeführt. Für alle Proben wurden sowohl biologische als auch technische Triplikate verwendet. Das Transkriptionslevel der *groEL* Paraloge von *C. fritschii* PCC 6912 wurde durch das Housekeeping-Gen *rnpB* normalisiert. Die relativen Transkriptionslevel aller untersuchten Gene wurden durch die  $\Delta\Delta C_t$  Methode (Livak and Schmittgen 2001) kalkuliert. Für die Durchführung der qRT-PCR wurde folgendes Programm im CFX Connect PCR-Cycler (Biorad) verwendet.

**Tab. 8:** qRT-PCR zur Analyse der Transkriptionslevel der *groEL* Paraloge aus *C. fritschii* PCC 6912

Polymerase-Aktivierung	95 °C	10 min	] X 39
Denaturierung	95 °C	15 sec	
Hybridisierung	55 °C	15 sec	
Elongation/Fluoreszenzmessung	60°C	1 min	

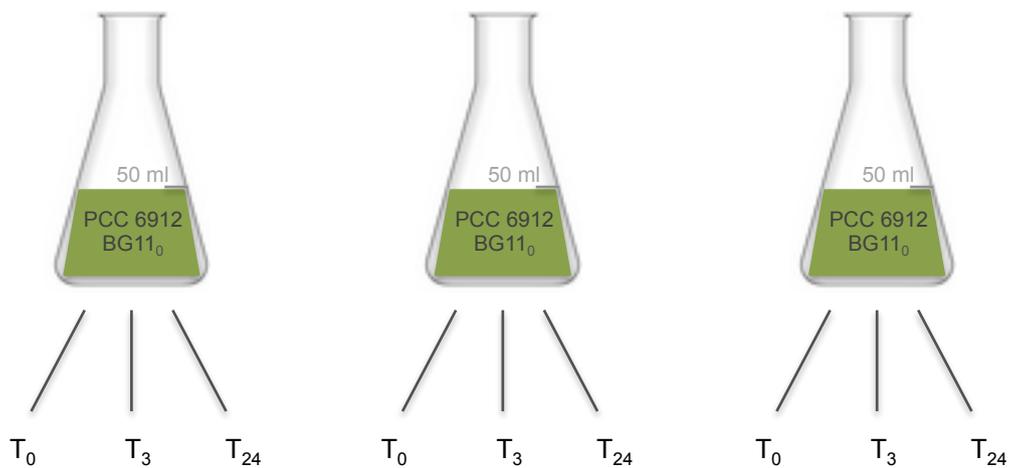
### 3.11 Expressionsanalyse der *groESL* Operons

Die beiden Paraloge, *groEL1* und *groEL2*, werden jeweils bicistronisch zusammen mit *groES1* und *groES2* reguliert. Um die Expression der im Operon regulierten Chaperonin-Untereinheit zu analysieren wurde qRT-PCR mit hoch spezifischen Oligonukleotidsequenzen (Tabelle 9) durchgeführt. Die spezifischen Primer der *groEL* Paraloge wurden bereits in der transkriptionellen Analyse der *groEL* Paraloge unter verschiedenen Stressbedingungen (Abschnitt 2.4.1) verwendet. Wie in 3.10.2 wurden auch hier die Transkriptionslevel über die des Housekeeping-Gens *rnpB* normalisiert. Eine zusätzliche Amplifikation der Glutaminsynthetase *glnA*, gilt als Indikator für die Induktion der Formation von Heterozysten in Cyanobakterien und erreicht ein Maximum des Transkriptlevels bereits 3 Stunden nach der Überführung in diazotrophe Bedingungen (Ehira 2003). Alle Primer wurden vor ihrer Verwendung in der qRT-PCR-Analyse auf ihre Spezifität untersucht und Schmelzkurvenanalysen durchgeführt. Hierfür wurden die Oligonukleotidsequenzen über die BLAST-Suche (Altschul 1990) am NCBI sowie lokal abgeglichen. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Primer sequenzspezifisch an den einzelnen *groES* und *groEL* Paralogen binden. Die RNA-Isolation und qRT-PCR Durchführung erfolgte wie in 3.2.2 beschrieben.

**Tab. 9:** Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Expressionsanalyse der cyanobakteriellen *groESL* Operons

Primer	Sequenzen (5'- 3')
qGS1_6912 F	TGTGAAAGTGAGCGCCTCT
qGS1_6912 R	CGACCACCATCGTCTTTAACT
qGS2_6912 F	AGGTGAATCAGAGGAGAAGAC
qGS2_6912 R	GGCGTGAAGCGTCTTCATTC
q_rnpB_F	ACCAAACCTTGCTGGGTAACG
q_rnpB_R	CACCTTTGCACCCTTACCTT
q_glnA_F	CTGCAAGATATGCGGACAGA
q_glnA_R	AAGCCCAATTCACACTGACC
q_groEL1_F	CGATTCTGCTCAAGCGTGGTA
q_groEL1_R	CCAGCAGAGATGGCACCT
q_groEL2_F	TGTTGCCCGTGCCCTTTA
q_groEL2_R	ATCAAATGGTTTTTCCTTCACTCG
q_groEL3_F	ATTGGCCAAATTCGCAAGCAAC
q_groEL3_R	TCCGCAATTTGCGGTCTTTAAG

Aufgrund vorläufiger Erkenntnisse über das Expressionsmuster der *groEL* Paraloge wurde für dieses Experiment die Untersuchung der Transkriptlevel der Operons unter Stickstoffmangel-Bedingung zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Zur Quantifizierung der Genexpression wurde RNA aus drei biologischen Replikaten zu drei verschiedenen Zeitpunkten ( $T_0$ ,  $T_3$  und  $T_{24}$ ) nach Induktion der Stressbedingung isoliert (Abbildung 17). Die Auswertung der Transkriptionslevel der *groES* und *groEL* Paraloge erfolgte über die  $\Delta\Delta C_t$  Methode (Livak and Schmittgen 2001).



**Abb. 17** Darstellung der Probenentnahme zur Analyse der Transkriptlevel der *groESL* Operons

Für die Validierung der Transkriptlevel der *groESL* Paraloge unter Stickstoffmangel-Bedingung, wurden Proben aus drei biologischen Replikaten zu drei verschiedenen Zeitpunkten (Angaben in Stunden) entnommen und direkt im Anschluss die RNA isoliert.

## 4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die evolutionäre Entwicklung und die, möglicherweise daraus resultierende, funktionelle Divergenz von Chaperon-Paralogen in Cyanobakterien untersucht. Der Fokus lag auf der Charakterisierung der *groESL* Duplikate des stigonematalen Cyanobakteriums *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912. Das Genom von *C. fritschii* PCC 6912 kodiert zwei *groESL* Operons (*groESL1* und *groESL2*), bestehend aus den beiden Untereinheiten *groES* (*groES1* und *groES2*) und *groEL* (*groEL1* und *groEL2*), sowie ein monocistronisches *groEL* (*groEL3*) Gen. Ein Sequenzvergleich der kodierenden Aminosäuren der cyanobakteriellen *groEL* und *groES* Paraloge ergab eine Identität von mindestens 65 %. Die Sequenzidentität der beiden bicistronischen *groEL* Paraloge lag sogar bei 87,5%. Bei dem Vergleich zweier Proteinsequenzen beschreibt die Identität die Menge der Aminosäuren zwischen den beiden Sequenzen, die exakt übereinstimmen. Dabei ist die Wertung rational zu der kürzesten Sequenz und die Identität somit transitiv ist.

Die charakteristische Eigenschaft der einzelnen Sequenzen, wie beispielsweise Ladung oder physikalisch-chemische Gruppierung der Aminosäuren, wird durch die Ähnlichkeit untereinander beschrieben.

	GroES_1	GroES_2	% Identität
GroES_1		73,4	
GroES_2	81,7		

% Ähnlichkeit

	GroEL_1	GroEL_2	GroEL_3	% Identität
GroEL_1		87,2	65,5	
GroEL_2	93,6		63,6	
GroEL_3	80,5	79,6		

% Ähnlichkeit

Durch phylogenetische Analysen und Homologie-Studien konnte eine Abstammungsfolge ermittelt werden, welche in der Namensgebung der Paraloge aufgegriffen wurde und als Grundlage zur Benennung diente. In vorhergehenden qRT-PCR-Analysen zur Bestimmung der Transkriptionslevel aller drei cyanobakteriellen *groEL* Paraloge unter optimalen Wachstumsbedingungen (37°C; 24  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), sowie unter

verschiedenen Stressbedingungen (Hitze, Starklicht, Diazotrophie), zeigten sich signifikante Unterschiede in der Änderung der Expressionslevel der verschiedenen Paraloge unter den getesteten Bedingungen. Differentielle Expression unter verschiedenen Bedingungen weist auf eine funktionelle Divergenz der Paraloge hin. Um diese Hypothese näher untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit verschiedene *in silico*, *in vitro* und *in vivo* Analysen zur Verifikation einer funktionellen Divergenz durchgeführt.

## 4.1 Transkriptionelle Regulation und Expressionslokalisierung der *groEL* Paraloge in *C. fritschii* PCC 6912

In früheren Studien konnte mit Hilfe der qRT-PCR Methodik gezeigt werden, dass die *groEL* Paraloge in *C. fritschii* PCC 6912 sowohl unter idealen Wachstumsbedingungen, als auch unter bestimmten Stressbedingungen ein differentielles Expressionslevel aufweisen (Abschnitt 2.4.1).

Zur Verifikation dieser Ergebnisse sollte in dieser Arbeit eine Lokalisation der transkriptionellen Aktivität der Paraloge innerhalb des Zellverbandes von *C. fritschii* PCC 6912 und nach Möglichkeit subzellulär vorgenommen werden. Dazu wurden regulatorische *gfp*-Fusionskonstrukte erzeugt, über *triparental mating* in das Sektion V Cyanobakterium eingebracht und dort heterolog exprimiert. In dieser *in vivo* Analyse der *groEL* Promotoraktivität wurde ein besonderer Schwerpunkt auf die Lokalisation der Expression während den Zelldifferenzierungsprozessen gelegt. Mit Hilfe der exogenen Regulation des Reportgens *gfp*, durch die verschiedenen *groEL* Promotoren, konnte indirekt eine Lokalisation und Quantifizierung der *groEL* Expression in den Zellen erfolgen.

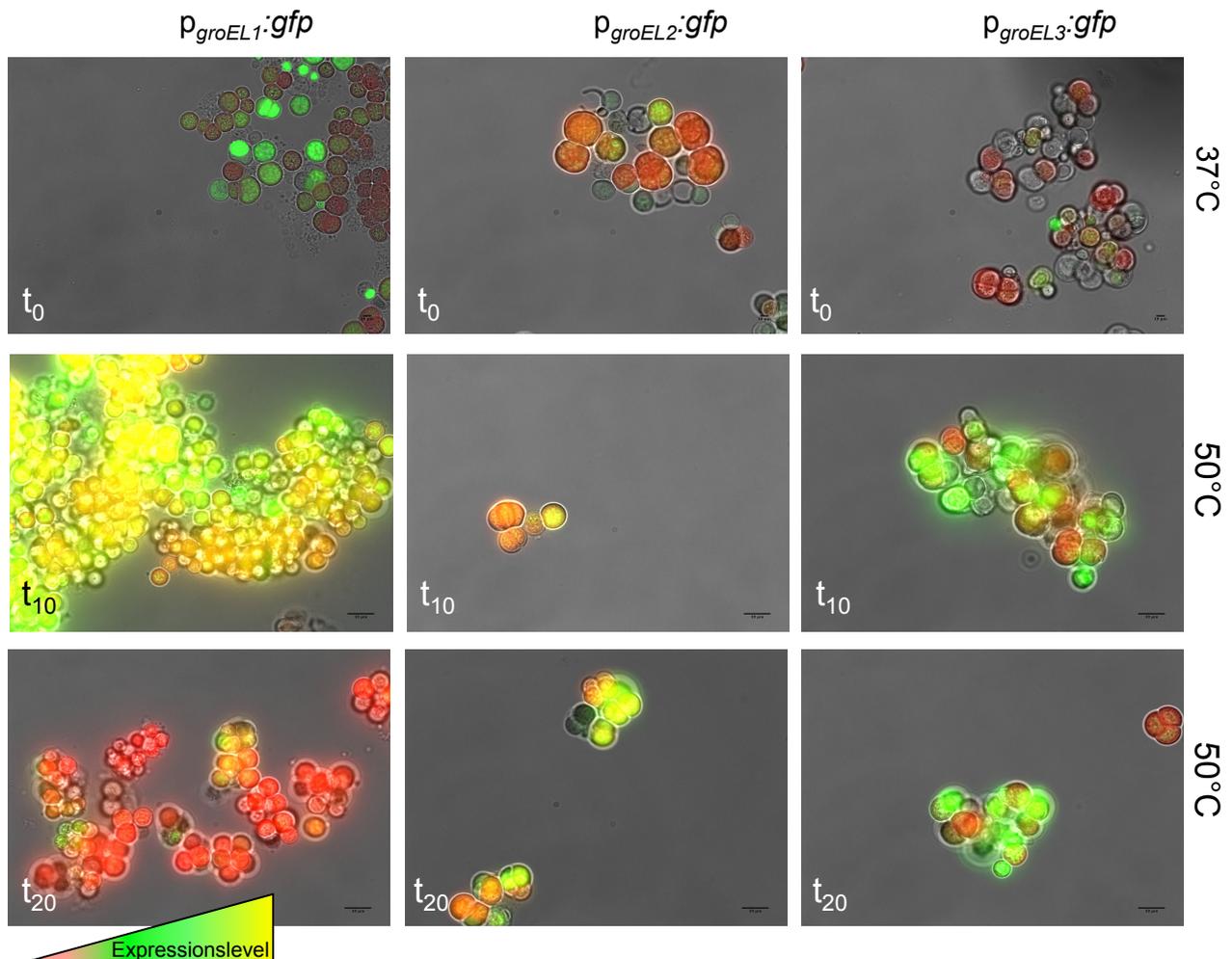
Die regulatorische Aktivität der drei *groEL* Promotoren wurde unter verschiedenen Stressbedingungen analysiert. Hierfür wurden die transformierten Cyanobakterien unter Temperaturstress (50 °C; 24  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), Lichtstress (37 °C; 140  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und diazotrophen Bedingungen kultiviert und nach verschiedenen Zeitpunkten mikroskopisch observiert. GFP-Fusion ist eine gängige Methode zur Visualisierung von Expressionsmustern der zu untersuchenden Gene in einer Zelle (Chalfie et al. 1994). Ein erhöhtes GFP-Fluoreszenzsignal ermöglicht dabei die Detektion einer erhöhten positiven transkriptionellen Regulation.

#### 4.1.1 Transkriptionelle Regulation und Expressionslokalisierung unter Hitzestress

Um die transkriptionelle Aktivität der verschiedenen *groEL* Promotoren unter Hitzestress zu analysieren wurden die verschiedenen *gfp*-Fusionskonstrukte in *C. fritschii* PCC 6912 eingebracht. Die transformierten Stämme wurden anschließend bei einer Temperatur von 50 °C inkubiert. Dies entsprach einer Temperaturerhöhung von 13 °C gegenüber den Normalbedingungen (Referenzzeitpunkt  $t_0$ ). Abbildung 18 zeigt die detektierte GFP-Fluoreszenz bei Hitzeinkubation in den einzelnen *C. fritschii* Stämmen, welche je durch die Aktivität der *groEL* Promotoren reguliert ist. Das Fluoreszenzsignal von GFP bei Kultivierung von *C. fritschii* bei 50 °C wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten (Startzeitpunkt, 10 Minuten und 20 Minuten) dokumentiert. In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ist in allen mit GFP exprimierenden *C. fritschii* Kulturen ( $p_{groEL1:gfp}$ ,  $p_{groEL2:gfp}$  und  $p_{groEL3:gfp}$ ) eine basale GFP-Expression durch ein grünes Fluoreszenzsignal sichtbar. Das rote Fluoreszenzsignal entsteht durch das in den Zellen enthaltene Chlorophyll und zeigt somit die Eigenfluoreszenz der Zellen an. Die Dokumentation dieses Signals dient zur Kontrolle der Vitalität der cyanobakteriellen Zellen und zur optischen Auswertung der Expressionslokalisation. In den weiteren Beschreibungen wird daher ausschließlich auf das GFP-Fluoreszenzsignal eingegangen.

Zu Startpunkt der Hitzeinkubation ( $t_0$ ) ist ein stärkeres Fluoreszenz-Signal in Probe  $p_{groEL1:gfp}$  gegenüber den anderen Paralogen zu erkennen. Dies lässt auf eine stärkere Basalaktivität des Promotors von *groEL1* unter Normalbedingungen schließen. Eine Inkubation der Proben bei 50 °C führte bereits nach zehn Minuten ( $t_{10}$ ) zu einem erhöhten GFP-Signal, und folglich zu erhöhter Promotoraktivität in allen drei Proben. Nach weiterer zehnmütiger Hitzeinkubation ( $t_{20}$ ) erreichte das schwächere Signal in der Probe  $p_{groEL2:gfp}$  durch Anstieg ein ähnliches Level wie in der Probe  $p_{groEL3:gfp}$ , während das Signal in dieser nach 10 und 20 Minuten unverändert hoch bleibt.

In Probe  $p_{groEL1:gfp}$  ist das Fluoreszenzsignal von GFP bei  $t_{20}$ , im Verhältnis zu dem an Zeitpunkt  $t_{10}$  deutlich verringert, jedoch im Verhältnis zu den Normalbedingungen ( $t_0$ ) nicht erkennbar schwächer. Die steigende Intensität des Fluoreszenzsignals von den Proben  $p_{groEL2:gfp}$  und  $p_{groEL3:gfp}$  bestätigt die in der qRT-PCR gemessene Transkriptionslevel-Änderung, der *groEL* Paraloge unter Temperaturstress. Ein Expressionsmuster innerhalb der Zellen von *C. fritschii* PCC 6912 konnte nicht detektiert werden. Unter Hitzestress wurde keine Akkumulierung erkennbar.



**Abb. 18** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *C. fritschii*  $p_{groEL}:gfp$  nach Hitze-Inkubation

Die Aufnahmen zeigen die subzelluläre Lokalisation von GFP durch die regulatorische Kontrolle der *groEL* Promotoren ( $p_{groEL}$ ) von *C. fritschii* nach Inkubation bei 50 °C. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen der Dokumentation von drei biologischen Replikaten zu verschiedenen Zeitpunkten. Es sind übereinander gelagerte Fluoreszenzaufnahmen der Zellen im Durchlicht, im grünen (GFP) und im roten Kanal (Chlorophyll) dargestellt. Der Größenstandard repräsentiert 10  $\mu\text{m}$ . Die Fluoreszenz wurde unter idealen Wachstumsbedingungen ( $t_0$ ), sowie 10 Minuten ( $t_{10}$ ) und 20 Minuten ( $t_{20}$ ) nach Stressinduktion dokumentiert.

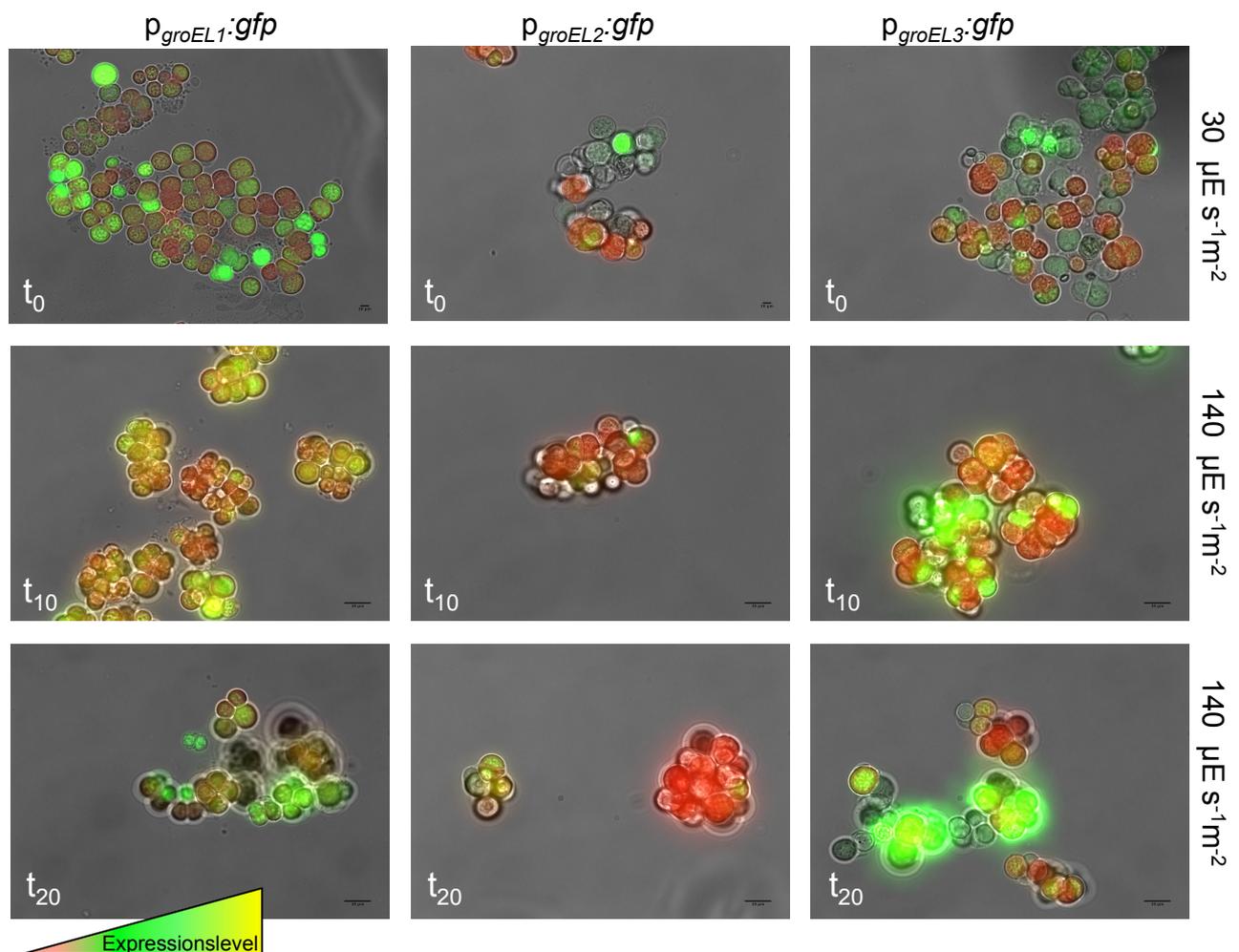
#### 4.1.2 Transkriptionelle Regulation und Expressionslokalisierung unter Lichtstress

Abbildung 19 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der transkriptionellen Aktivität der *groEL* Paraloge in *C. fritschii* PCC 6912 unter Lichtstress. Wie schon in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, ist eine deutliche GFP-Fluoreszenz in allen Kulturen unter Normalbedingung vorhanden ( $t_0$ ). Durch Inkubation der Stämme unter Starklicht ( $140 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) wird die Expression von GFP in der Probe  $p_{groEL3}:gfp$  im Verhältnis zur basalen Expression drastisch erhöht. Schon zum Zeitpunkt  $t_{10}$  zeigt sich ein deutlich

verstärktes Fluoreszenzsignal in der Probe was sich zum Zeitpunkt  $t_{20}$  weiter verstärkt. Die Intensität des Fluoreszenzsignals in Probe  $p_{groEL2}:gfp$  zeigt während des gesamten Testzeitraums wenig Änderung in ihrer Intensität und bleibt zu allen dokumentierten Zeitpunkten relativ konstant.

Das Fluoreszenzsignal, reguliert durch den nativen Promotor von *groEL1*, zeigt gegenüber  $t_0$ , eine leicht erhöhte Intensität nach zehnminütiger Inkubation der Kulturen unter Starklicht ( $t_{10}$ ), welche zu Zeitpunkt  $t_{20}$  wenig verändert vorliegt.

Verglichen mit den Ergebnissen der qRT-PCR (2.4.1) ist der Anstieg des GFP-Fluoreszenzsignals und die damit verbundene gesteigerte transkriptionelle Regulation von *groEL3* konvergierend.



**Abb. 19** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *C. fritschii*  $p_{groEL}:gfp$  nach Starklicht-Inkubation

Die Aufnahmen zeigen die subzelluläre Lokalisation von GFP durch die regulatorische Kontrolle der *groEL* Promotoren ( $p_{groEL}$ ) von *C. fritschii* nach Inkubation mit  $140 \mu E m^{-2} s^{-1}$ . Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen von der Dokumentation von drei biologischen Replikaten zu verschiedenen Zeitpunkten. Es sind übereinander gelagerte Fluoreszenzaufnahmen der Zellen im Durchlicht, im grünen (GFP) und im roten Kanal (Chlorophyll) dargestellt. Der Größenstandard repräsentiert  $10 \mu m$ . Die Fluoreszenz wurde unter Normalbedingungen ( $t_0$ ), sowie 10 Minuten ( $t_{10}$ ) und 20 Minuten ( $t_{20}$ ) nach Stressinduktion dokumentiert.

### 4.1.3 Transkriptionelle Regulation und Expressionslokalisierung unter diazotrophen Bedingungen

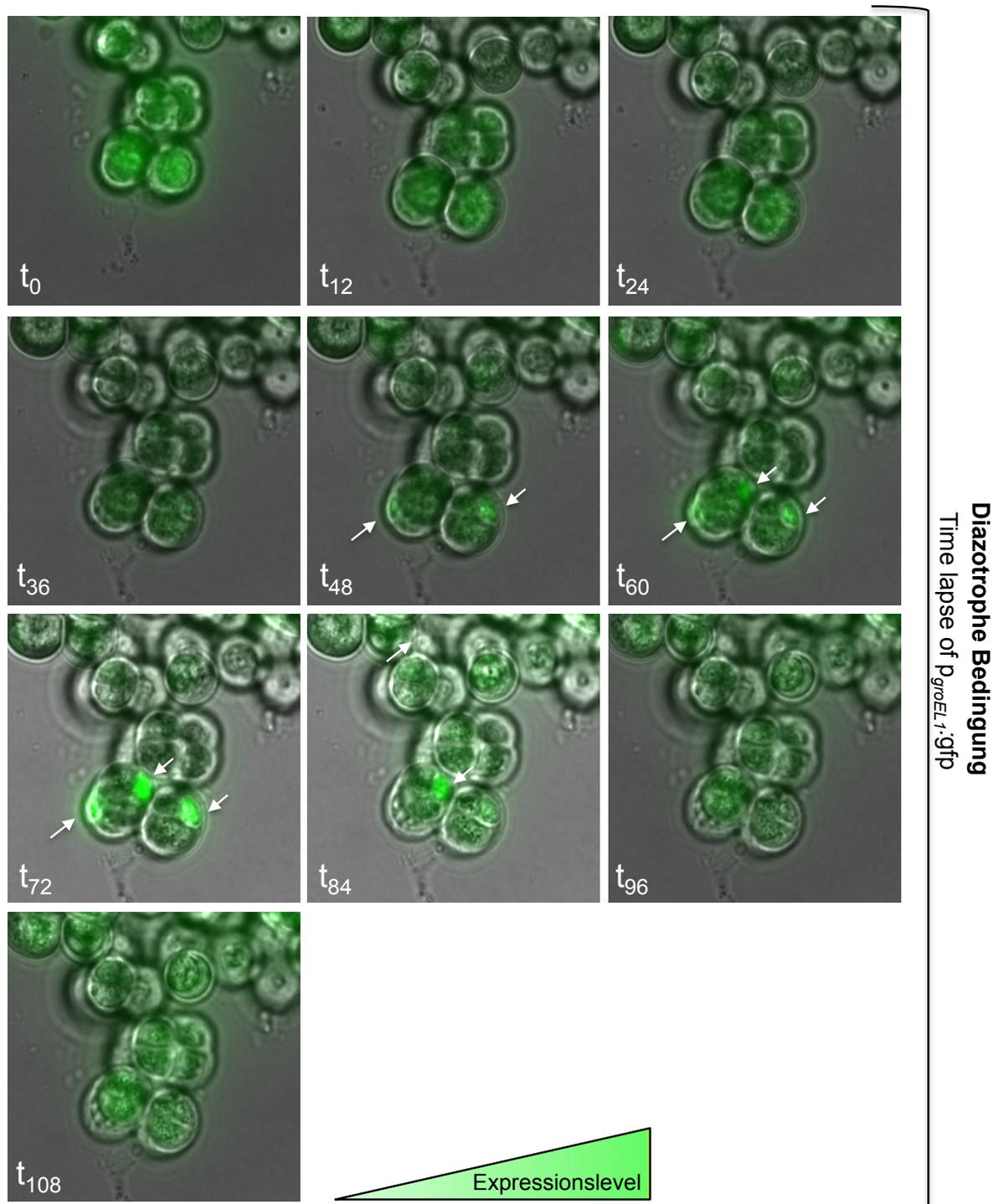
Die in vorherigen Studien ermittelte transkriptionelle Aktivität der *groEL* Paraloge unter stickstofffixierenden Bedingungen, lässt Rückschlüsse auf eine spezifische Aktivität der *groEL* Promotoren während der Heterozystenformation zu. Dementsprechend wurden die transkriptionellen GFP-fusionierten *C. fritschii* PCC 6912 Stämme *in vivo* während der Kultivierung unter diazotrophen Bedingungen konstant über einen Zeitraum von einer Woche observiert. Um die genaue Lokalisation der *groEL* Promotor-Aktivität durch das exprimierte GFP-Signal untersuchen zu können, wurden Zeitraffer-Aufnahmen angefertigt. Durch die konstante Observation derselben Zellen über den gesamten Zeitraum des Experiments hinweg, konnte die Promotor-Aktivität während der Zelldifferenzierung studiert werden. Die Dokumentation dieses Prozesses erfolgte alle 12 Stunden. Die Zeitraffer-Aufnahmen der GFP-Expression reguliert durch die Promotoren der beiden Paraloge *groEL2* und *groEL3* zeigten keine Veränderungen in der Intensität der GFP-Fluoreszenz (Aufnahmen hier nicht gezeigt).

In Abbildung 20 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der  $p_{groEL1}:gfp$ -Kultur unter diazotrophen Bedingungen gezeigt. Zur deutlicheren Visualisierung des GFP-Signals wird auf die Darstellung der Chlorophyll-Fluoreszenz verzichtet. Im ersten Bild ( $t_0$ ) zeigt sich, wie schon in den vorhergegangenen Studien, eine basale Expression von GFP unter Normalbedingungen. Um die Zellen vor dem Ausbleichen zu schützen, wurde für die dauerhafte Inkubation über einen Zeitraum von mehreren Tagen eine schwächere Anregungszeit gewählt. Dies erklärt den Unterschied in der Fluoreszenzintensität gegenüber den Aufnahmen der anderen beiden Stressbedingungen.

Nach 48 Stunden Inkubation unter diazotrophen Bedingungen ist eine Anreicherung des Fluoreszenzsignals in bestimmten Zellen erkennbar. Hier zeigt sich eine deutliche Akkumulation in bestimmten Bereichen der Zellen. Dieses Fluoreszenzsignal steigt über den weiteren Zeitraum an und erreicht sein Maximum nach 72 Stunden ( $t_{72}$ ). Bei längerer Inkubation der Zellen unter diazotrophen Bedingungen lässt die Intensität des Fluoreszenzsignals zu den gewählten Zeitpunkten deutlich nach und zeigt bei  $t_{108}$  eine ähnliche Intensität wie zum Startzeitpunkt des Experiments ( $t_0$ ).

Es ist besonders darauf hinzuweisen, dass es bei diesem Versuch möglich war die Kulturen dauerhaft unter diazotrophen Bedingungen zu kultivieren, bedingt durch den Versuchsaufbau aber sowohl Lichtintensität als auch Temperatur nicht dauerhaft gleichbleibend gehalten werden konnten.

Es konnte dementsprechend nicht nur die Änderung eines Parameters exakt kontrolliert werden. Jedoch weist die unterschiedliche Entwicklung der Lichtintensität in den einzelnen Proben auf ein durch Stickstoffmangel bedingtes Phänomen hin.



**Abb. 20** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *C. fritschii*  $p_{groEL1}:gfp$  unter Diazotrophie

Die Aufnahmen zeigen die subzelluläre Lokalisation von GFP durch die regulatorische Kontrolle der *groEL* Promotoren ( $p_{groEL}$ ) von *C. fritschii* nach Inkubation unter diazotrophen Bedingungen. Es sind übereinander gelagerte Durchlicht- und GFP-Fluoreszenzaufnahmen der Zellen dargestellt. Die GFP-Fluoreszenz wurde alle 12 Stunden über einen Zeitraum von insgesamt 108 Stunden dokumentiert. Pfeile zeigen eine Akkumulation des Fluoreszenzsignals innerhalb der Zellen an.

## 4.2 *In vivo* Protein-Protein-Interaktionsanalysen

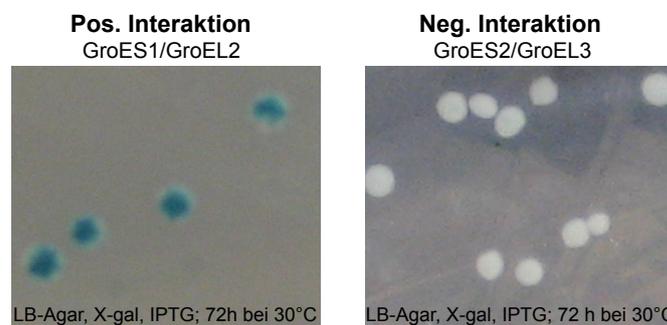
Die Ergebnisse der transkriptionellen Regulations-Analyse zeigten eine divers ausgeprägte Expression der *groEL* Paraloge unter verschiedenen Bedingungen. Dies weist auf eine funktionelle Divergenz der drei Genkopien hin. Ziel der Protein-Protein-Interaktionsanalyse war es, Erkenntnisse über die differentielle Funktion der GroEL-Paraloge auf Proteinebene zu erlangen. Hierfür wurde die spezifische Interaktion der paralogen GroES und GroEL Proteine untersucht. Dazu wurden alle zu testenden GroESL Proteine (GroES1, GroES2, GroEL1, GroEL2 und GroEL3) N- und C-terminal markiert und in jeder Kombination auf ihre Bindeaffinität hin untersucht.

### 4.2.1 Detektion der physikalischen Interaktion

In Abbildung 23 sind exemplarisch die Ergebnisse der Protein-Protein-Interaktionsanalysen dargestellt. Diese direkte paarweise Interaktion der Chaperonin-Untereinheiten wurde *in vivo* durch ein Bacterial-Two-Hybrid (BACTH) System getestet. Das BACTH System basiert auf der *in vivo* Rekonstruktion der Adenylatcyclase in einem *E. coli* Reporterstamm (Karimova et al. 1998; Battesti and Bouveret 2012). Zur Durchführung dieses Interaktionstests wurden Fusionproteine synthetisiert, die zum einen aus dem zu testeten Interaktionsprotein und zum anderen aus einer Untereinheit der Adenylatcyclase (T18 und T25) bestehen.

Die zu untersuchenden Proteine, können dabei C- oder N-terminal mit einer der Adenylatcyclase-Untereinheiten fusioniert werden. Bei physikalischer Interaktion der Fusionsproteine werden die beiden Untereinheiten (T18 und T25) vervollständigt, der cAMP-CAP-Promotor positiv reguliert und das Reporterogen *lacZ* ( $\beta$ -Galactosidase) exprimiert. Dies führt zu einer sichtbaren Blaufärbung der *E. coli*-Kolonien (Abbildung 21). Die paarweise Kombination der Interaktion aller GroESL Paraloge, inklusive beider Markierungsvarianten an den Termini wurde in dem *E. coli* Reporterstamm *in vivo* bei 30 °C getestet. Pro Interaktions-Test wurden mindestens vier unabhängige Versuchswiederholungen durchgeführt.

Aufgrund der Tatsache, dass die Position der fusionierten Adenylatcyclase-Untereinheit Einfluss auf die Interaktion der zu testenden Proteine haben kann, und somit die Funktionalität dieses Tests beeinflussen könnte, wurden verschiedene Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. Zusätzlich wurden dafür, in diesem zweiten Versuchsaufbau, alle GroES und GroEL Proteine auf eine Interaktion mit dem ebenfalls cyanobakteriellen Zytoskelett-Protein FtsZ (auch jeweils N- und C-terminal fusioniert), sowie mit einem Leervektor getestet. In keiner dieser Protein-Protein-Interaktionsanalysen, zeigte sich eine Expression des Reportergens ( $\beta$ -Galactosidase), was die nicht vorhandene Bindung zwischen den FtsZ- und GroESL Proteinen aufzeigt und somit die vorhergegangenen Ergebnisse absichert.

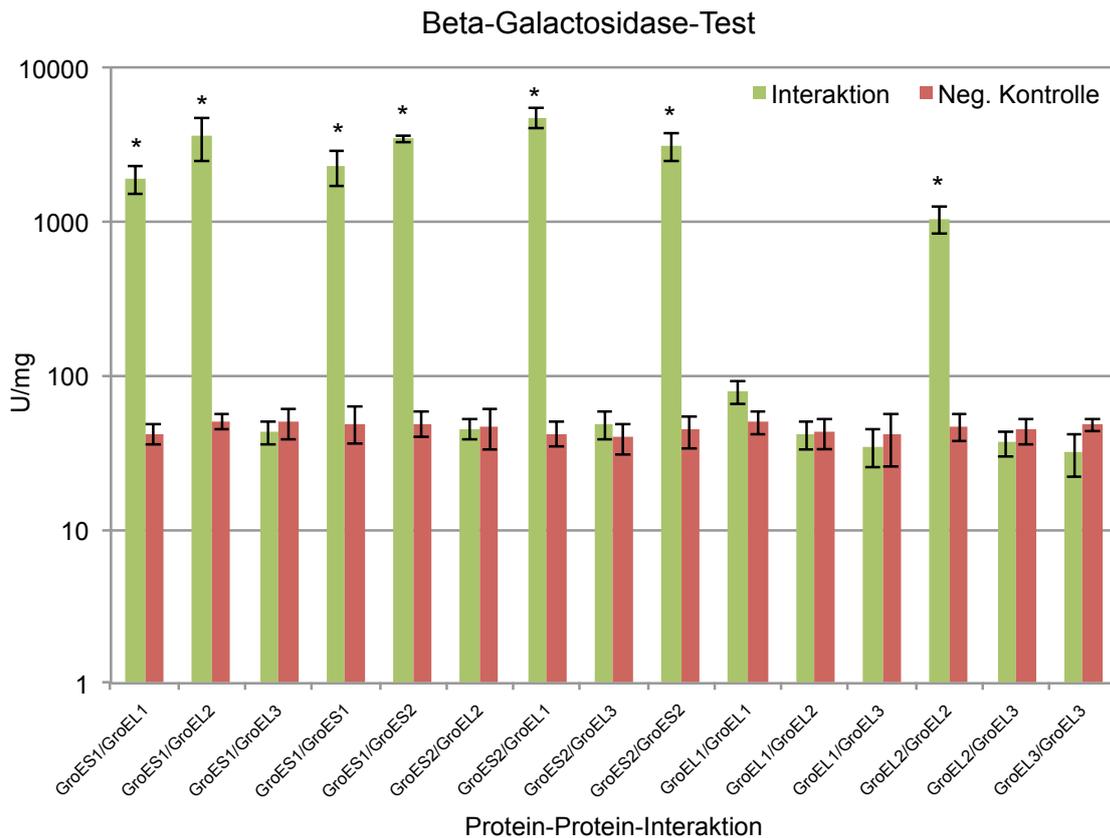


**Abb. 21** Bacterial Two-Hybrid System (BACTH)

BACTH zur Identifizierung von GroESL Chaperon Untereinheiten. Expressionsvektoren mit GroES und GroEL Paralogen wurden konstruiert und in den *E. coli* Stamm BHT101 eingebracht. Dieser Reporterstamm wurde auf LB-Agar, IPTG, X-Gal und selektive Antibiotika ausgestrichen und für 72 h bei 30°C inkubiert. Blaue Kolonien repräsentieren  $\beta$ -Galactosidase Aktivität, welche durch die Aktivierung des lacZ Reportergens nach Protein-Protein-Interaktion entsteht. Pro Interaktionstest wurden mindestens zwei Negativkontrollen und mindestens vier unabhängige Versuchswiederholungen durchgeführt.

Eindeutig positive Protein-Interaktionen wurden anschließend mehrfach durch Messung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in den *E. coli* Zellen verifiziert. Zudem wurden von jeder Protein-Protein-Interaktionsanalyse, unabhängig vom Interaktions-Ergebnis,  $\beta$ -Galactosidase-Tests (Abbildung 22) zur Kontrolle durchgeführt. Die Messung der Enzymaktivität in den Galactosidase-Tests ist deutlich sensitiver als die Identifikation der Protein-Protein-Interaktion durch Blau-Weiß-Selektion.

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der  $\beta$ -Galactosidase-Tests dargestellt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ( $n=3$ ) der Wertegruppe mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Ergebnisse der GroESL-Protein-Interaktionsanalyse werden zusammenfassend in Kapitel 4.2.2 als Interaktionsnetzwerk präsentiert. Die detaillierten Ergebnisse aller durchgeführten Interaktionsversuche sind Tabelle A5 (Anhang) zu entnehmen.



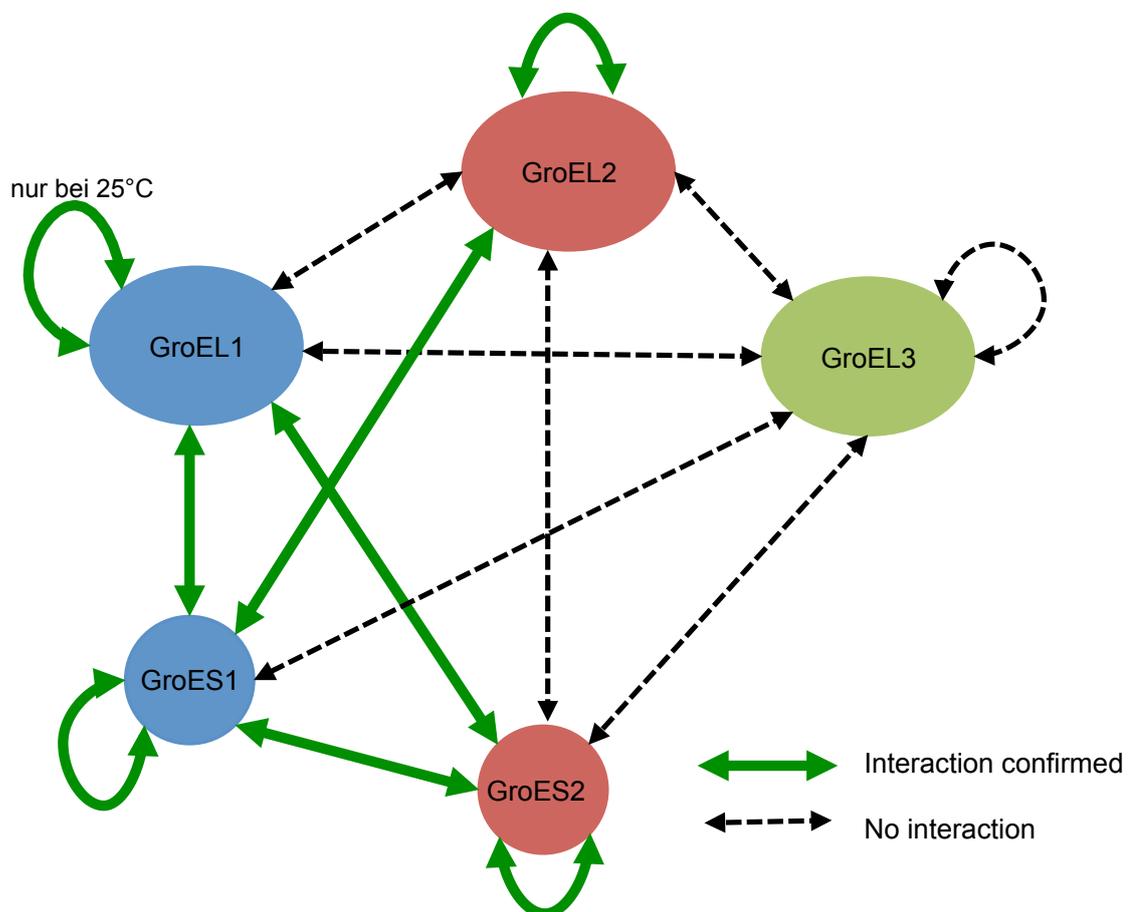
**Abb. 22** Beta-Galactosidase-Test

Ergebnisse des zum BACTH-System zugehörigen  $\beta$ -Galactosidase Assay. Zusätzlich zur Blau-Weiß-Selektion wurden drei Replikate der jeweils getesteten Protein-Protein-Interaktion untersucht. Gezeigt sind die exprimierten Miller-Units pro Milligramm LacZ der getesteten Kulturen in logarithmischer Auftragung. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert der Wertegruppe  $\pm$  Standardabweichung (t-Test,  $n \geq 5$ ),  $P < 0,05$ ) gegenüber der zugehörigen Negativkontrolle.

#### 4.2.2 Interaktionsnetzwerk der GroESL Paraloge

Entsprechend der Reportergenexpression, wurde ein Interaktionsnetzwerk der getesteten GroES und GroEL Paraloge rekonstruiert und in Abbildung 23 dargestellt. Alle durchgeführten Kontrollen bestätigten die gezeigten spezifischen Bindungen der GroEL- und GroES-Untereinheiten. Grüne Pfeile indizieren eine positiv getestete Interaktion zwischen den dargestellten Proteinen. Schwarze Pfeile indizieren hingegen, dass keine  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität gezeigt wurde, was bedeutet, dass keine Interaktion der getesteten Chaperonin-Untereinheiten stattgefunden hat.

Bei allen getesteten GroES und GroEL Paralogen, mit Ausnahme von GroEL3, konnte eine homogene Interaktion gezeigt werden. Es ist jedoch anzumerken, dass diese uniforme Interaktion von GroEL1 lediglich bei herabgesetzter Temperatur (25 °C) observiert wurde. Zwischen den drei GroEL Paralogen von *C. fritschii* PCC 6912 wurde keine Interaktion beobachtet. GroEL1 zeigte sowohl mit dem zugehörigen Ko-Chaperonin GroES1, als auch mit GroES2 eine Interaktion. Das ebenfalls im Operon regulierte GroEL2 interagiert nur mit GroES1, nicht aber mit dem im selben Operon regulierten GroES2. Beide bicistronischen GroEL Paraloge (GroEL1 und GroEL2) formen somit homogene Polymere, während GroEL3 mutmaßlich als Monomer agiert. Im Gegensatz zu den homogenen Polymeren der GroEL Paraloge, wurde eine Interaktion zwischen den kleinen Chaperonin-Untereinheiten GroES1 und GroES2 gezeigt. Die beiden Ko-Chaperonine können somit vermutlich heterogene Strukturen ausbilden.



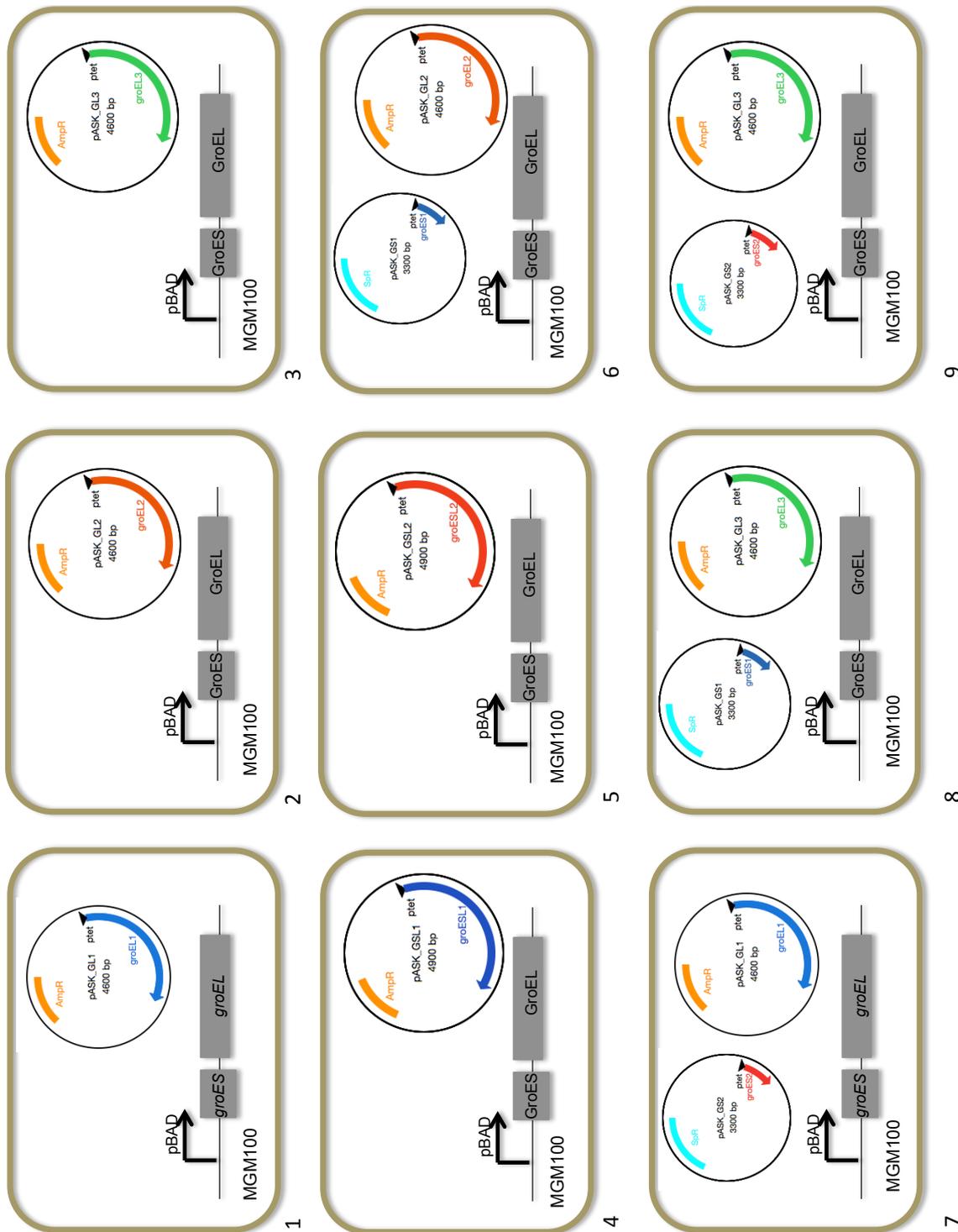
**Abb. 23** GroESL Protein-Interaktionsnetzwerk

Schematische Darstellung der *in vivo* Protein-Protein-Interaktion der drei GroEL und zwei GroES Paralogen von *C. fritschii* PCC 6912. Pro Interaktion wurden mindestens zwei Negativkontrollen und mindestens vier unabhängige Versuchswiederholungen durchgeführt. Von jeweils drei biologischen Replikaten wurde, zusätzlich zur Blau-Weiß-Selektion, die Protein-Protein-Interaktion mittels eines  $\beta$ -Galactosidase-Tests verifiziert.

### 4.3 Komplementierungsanalyse eines *groESL* defizienten *E. coli* Stamms

Zur Verifikation der Hypothese der funktionellen Divergenz der stigonematalen *groEL* Paraloge wurden Komplementierungsanalysen in einem *groESL* defizienten *E. coli* Stamm (MGM100) durchgeführt. In MGM100 wurde ein Austausch des nativen *pgroESL* Promotors durch einen leicht regulierbaren pBAD Promotor etabliert (McLennan and Masters 1998). Die Expression von *groESL* ist somit abhängig von der pBAD Promotoraktivität und kann durch die Zugabe von Arabinose induziert und durch Zugabe von Glukose reprimiert werden.

Durch exogene Expression der drei einzelnen *groEL* Paraloge, sowie der beiden bicistronischen *groESL* Kopien (Abbildung 24, 1-5) von *C. fritschii*, wurde die Funktionalität der Chaperonin Paraloge getestet. Erst nach einer funktionellen Komplementierung von MGM100 durch die cyanobakteriellen Genkopien kann ein Wachstum auf dem selektiven Glucose-Medium stattfinden. Hierfür wurden die beiden operonalen *groESL* Genkopien mit Hilfe eines Expressionsvektors in MGM101 exprimiert und anschließend die Komplementierung des  $\Delta groESL$  Stammes durch selektive Kultivierung untersucht. Zusätzlich wurde, aufgrund der vorhergehenden Ergebnisse der Protein-Protein Interaktionsanalyse, die gezeigte Bindefähigkeit der beiden Chaperonin-Untereinheiten GroEL2 und GroES1, sowie alle anderen Kombinationen zwischen den Chaperonin- und Ko-Chaperonin Paralogen getestet (Abbildung 24, 5-9). Durch die Ko-Expression von einzelnen *groEL* Paralogen zusammen mit einzelnen GroES Paralogen konnte die Funktionalität von heteromeren Chaperonin Komplexen *in vivo* getestet werden.



**Abb. 24** Schematische Darstellung der Komplementierungsstämme

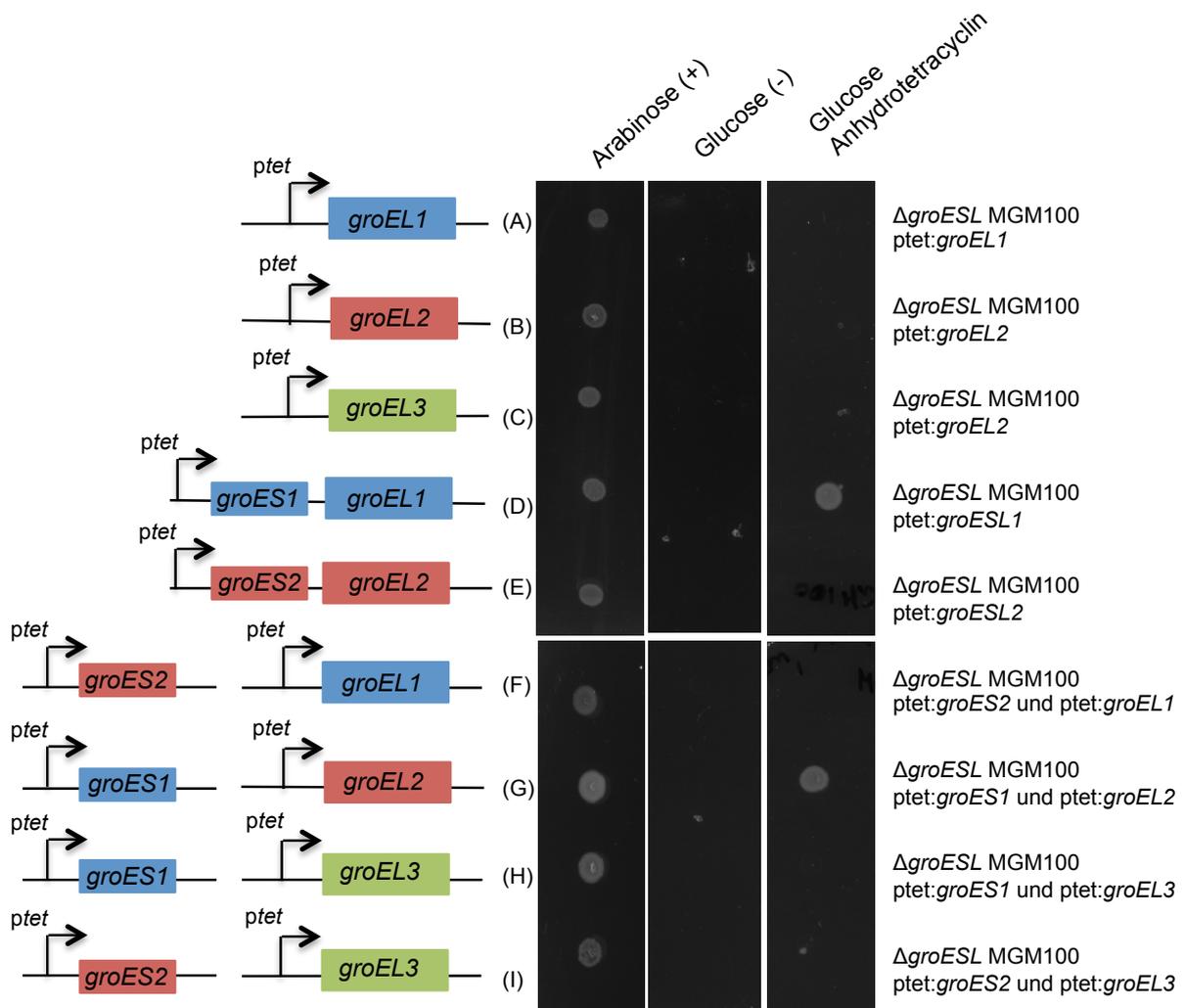
Zur Überprüfung der funktionalen Komplementierung von MGM100 mit cyanobakteriellen *groESL* Paralogen wurden verschiedene Transformationen durchgeführt. (1) Heterologe Expression von *C. fritschii* PCC 6912 *groEL1* (2) Heterologe Expression von *C. fritschii* PCC 6912 *groEL2* (3) Heterologe Expression von *C. fritschii* PCC 6912 *groEL3* (4) Heterologe Expression von *C. fritschii* PCC 6912 *groESL1* (5) Heterologe Expression von *C. fritschii* PCC 6912 *groESL2* (6) Heterologe Expression von *C. fritschii* PCC 6912 *groEL2* und Ko-Expression von *groES1* (7) Heterologe Expression von *C. fritschii* PCC 6912 *groEL1* und Ko-Expression von *groES2* (8) Heterologe Expression von *C. fritschii* PCC 6912 *groEL3* und Ko-Expression von *groES1* (9) Heterologe Expression von *C. fritschii* PCC 6912 *groEL3* und Ko-Expression von *groES2*.

### 4.3.1 Funktionelle Komplementierung

Die Komplementierung des  $\Delta groESL$  *E. coli* Stammes MGM100 durch die cyanobakteriellen Chaperonine von *C. fritschii* PCC 6912 wurde durch Wachstum der transformierten Stämme auf selektivem Medium bei 30°C untersucht. Die Validierung der Expression der *groESL* Paraloge durch die Induktion mit Anhydrotetrazyklin wurde mit Hilfe der Coomassie-Färbung durchgeführt. In Abbildung 25 ist repräsentativ das Wachstum der transformierten MGM100 Kulturen auf Arabinose (Positivkontrolle); Glucose (Negativkontrolle) und Glucose plus Anhydrotetrazyklin versetztem Medium dargestellt. Zum besseren Verständnis ist zudem der Expressionsvektor mit dem getesteten cyanobakteriellen Paralog schematisch dargestellt. Zur Kontrolle wurde MGM100 mit einem Vektor kloniert, der keine kodierenden Sequenzen der *groESL* Paraloge trägt. Für diesen Stamm konnte kein Wachstum auf selektivem Medium detektiert werden. Lediglich die Positivkontrolle zeigte Wachstum der Bakterien bei Inkubation auf mit Arabinose versetzten LB-Platten.

Aufgrund einer in *Anabaena* gezeigten Faltungsaktivität eines GroEL Paralogs unabhängig von GroES (Potnis et al. 2016) wurde hier u. A. die Komplementierung durch die drei GroEL Paraloge ohne Expression eines Ko-Chaperonins untersucht. Für keines der Proteine konnte normales Wachstum von MGM100 auf selektivem Medium (Glucose und Anhydrotetrazyklin) detektiert werden (Abbildung 25 (A)(B)(C)). Somit war keines der GroEL Paraloge in der Lage eine funktionelle Komplementierung von MGM100 zu bewirken.

Im Gegensatz dazu zeigten die Untersuchungen bei Expression des cyanobakteriellen *groESL1* Paralogs Wachstum von MGM100 (Abbildung 25 (D)). Dies zeigt eine erfolgreiche Komplementierung des  $\Delta groESL$  *E. coli* Stammes durch *groESL1* aus *C. fritschii* PCC 6912. Indes fand kein Wachstum und somit keine funktionelle Komplementierung des *E. coli* nativen *groESL* Operons durch *groESL2* statt (Abbildung 25 (E)). Dieses Resultat bestätigt die bereits gezeigte, mangelnde Interaktion von GroEL2 mit seinem Ko-Chaperonin GroES2. Bei zusätzlich exogener Expression von *groES1* wurde jedoch Wachstum der Bakterien auf selektivem Medium observiert (Abbildung 25 (G)). Durch die Komplementierung von MGM100 konnte somit die Funktionalität des heterogenen Chaperon-Komplexes bestehend aus GroES1 und GroEL2 gezeigt werden. Die im Protein-Protein-Interaktionstest gezeigte Interaktion zwischen GroES2 und GroEL1 führte jedoch nicht zu einem Chaperonin-Komplex, der eine funktionelle Komplementierung von MGM100 bewirkte (Abbildung 25 (F)). Für GroEL3 konnte weder bei Ko-Expression von GroES1 noch von GroEL2 Wachstum der Bakterien auf selektivem Medium beobachtet werden (Abbildung 25 (H)(I)).



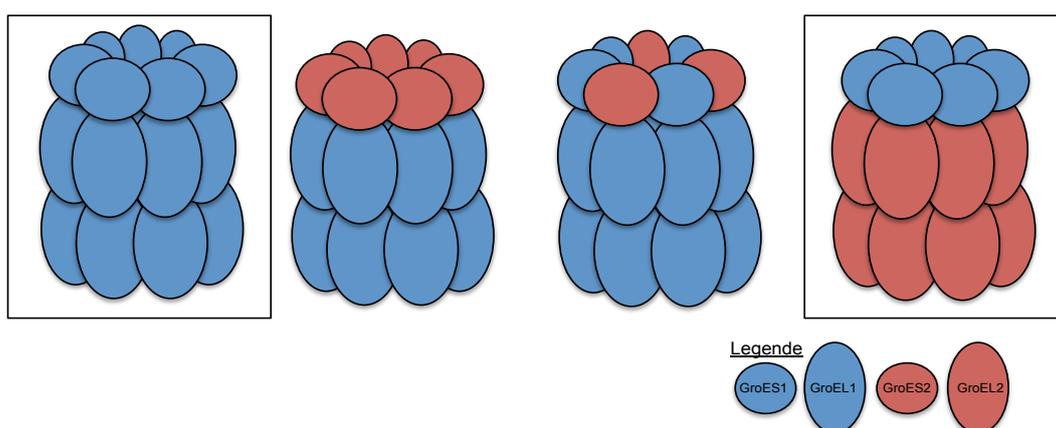
**Abb. 25** Funktionelle Komplementierung von MGM100

*In vivo* Komplementierungstest der *groESL* Operon-Paralogue von *C. fritschii* PCC 6912. Die Gen kodierenden Sequenzen der Operons wurden, unter der Kontrolle eines Anhydrotetracyclin induzierbaren Promotors (*ptet*), in einem *groESL* defizienten *E. coli* Stamm (MGM100) exprimiert. Das *groESL* Defizit in MGM100 ist durch Arabinose/Glucose Behandlung steuerbar. Ohne funktionelle Komplementierung durch die cyanobakteriellen *groEL* Gene ist kein Wachstum auf Glucose supplementärem Medium möglich. Positive Transformanten wurden auf selektive Medien getropft und 18 h bei 30 °C kultiviert. Pro Stamm wurden fünf biologische Replikate untersucht.

### 4.3.2 Chaperonin-Assemblierung

In dem Protein-Protein-Interaktionstest wurden verschiedene Möglichkeiten der Chaperonin-Assemblierung detektiert. Die in Abbildung 26 schematisch dargestellten Chaperon-Komplexe zeigen eine idealisierte Visualisierung der Ergebnisse dieser Analyse. Basierend auf diesen Ergebnissen kann eine Hetero-Oligomersierung einiger GroES und GroEL Paraloge stattfinden, wessen Funktionalität in dem Komplementierungstest getestet wurde. Durch das Interaktionsmuster von GroESL1 kann angenommen werden, dass die zusammen im Operon kodierten Proteine einen funktionalen Chaperon-Komplex ausbilden, während die GroESL2 Untereinheiten nicht miteinander interagieren. Diese Ergebnisse wurden weiter durch den Komplementierungstest in MGM100 validiert. Die gezeigte Interaktion der beiden kleinen Chaperonin-Untereinheiten GroES1 und GroES2 lässt auf die Bindung von hetero-oligomerisierten GroES-Komplexen schließen. Eine Interaktion zwischen GroEL2 und GroES1, sowie zwischen GroEL1 und GroES2 lässt Rückschlüsse auf die Ausbildung von hybriden GroESL Chaperon-Komplexen zu. Die Funktionalität dieser Chaperonin Komplexe wurde durch den Komplementierungstest jedoch nur für GroEL2 und GroES1 bestätigt. Somit weisen nur die beiden mit Boxen markierten Komplexe Chaperonin-Aktivität *in vivo* auf (Abbildung 26).

Die Tatsache, dass weder Polymerisierung noch Interaktion mit anderen Paralogen von GroEL3 nachgewiesen wurde, weist darauf hin, dass GroEL3 nicht den typischen GroESL Chaperon-Komplex ausbildet, sondern als Monomer vorliegt und somit eine Faltungsaktivität zeigt. Dies wurde in dem Komplementierungstest bestätigt.



**Abb. 26** Hetero-Oligomerisierung der Chaperonin-Untereinheiten

Schematische Darstellung möglicher Chaperon-Komplexbindungen basierend auf den Ergebnissen des Protein-Protein-Interaktionstests der GroES und GroEL Paraloge von *C. fritschii* PCC 6912. (Box) Schematische Darstellung funktionaler Chaperonin-Komplexbindungen basierend auf den Ergebnissen des Komplementierungstests der GroES und GroEL Paraloge von *C. fritschii* PCC 6912 in MGM100.

## 4.4 Expressionsanalyse der bicistronischen GroEL Paraloge

Zwei der drei *groEL* Paraloge von *C. fritschii* PCC6912 sind zusammen mit *groES* bicistronisch in einem Operon reguliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben jedoch Hinweise auf eine Alternanz von *groES2*. Zum einen hat der Protein-Protein-Interaktionstest gezeigt, dass die beiden Proteine der im *groESL2* Operon kodierten Untereinheiten nicht aneinander binden und zum anderen konnte im Komplementierungstest gezeigt werden dass der heterologe Chaperonin-Komplex bestehend aus GroEL1 und GroES2 nicht funktional war. Durch *in silico* Analysen (Abbildung A2) wurde außerdem eine Vorhersage über mögliche Transkriptionsstartpunkte (TSS) der *groESL* und *groEL* kodierten Gene getroffen. In diesen Analysen wurden zwei potentielle TSS für die Expression von *groEL2* angegeben. In vorherigen Studien wurde durch Sequenzstudien des *upstream*-Bereichs der drei *groEL* Paraloge, außerdem die Abwesenheit des CIRCE Elements des *groEL2* Paralogs detektiert. Das CIRCE- Element (TTAGCACTC-N<sub>9</sub>-GAGTGCTAA) (Zuber 1994) sowie eine K- und N-Box sind nachweislich regulatorische Elemente in cyanobakteriellen *groEL* Genen (Kojima and Nakamoto 2007). In diesem Versuch sollte deshalb via qRT-PCR getestet werden, ob eine differentielle Expression dieser beiden Gene vorliegt.

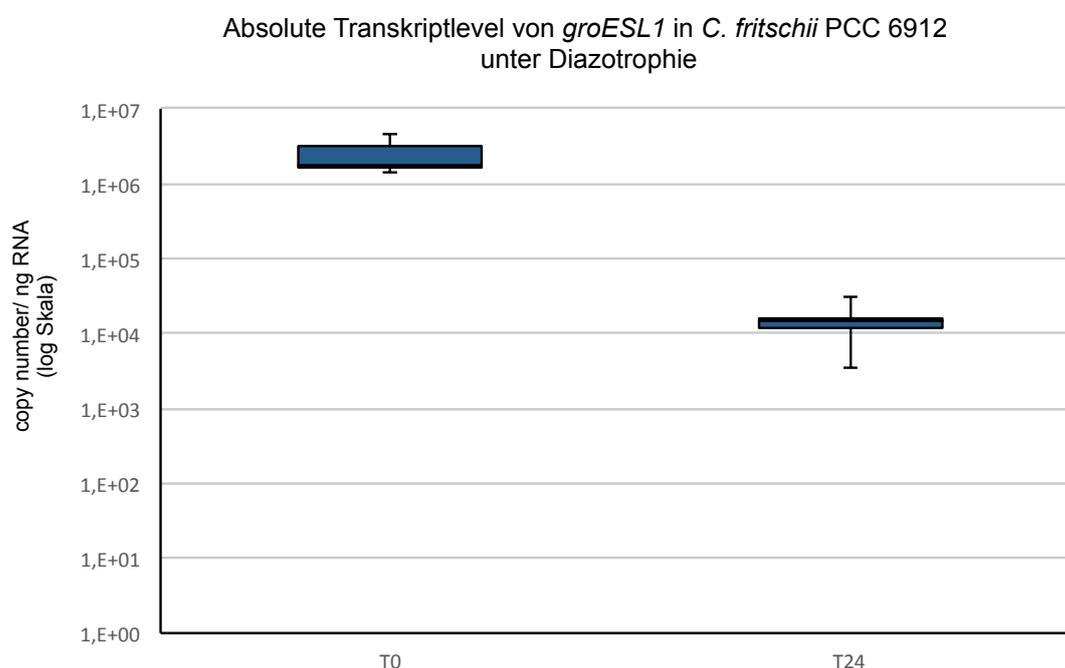
Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transkriptionslevel Analysen wurden mit *C. fritschii* PCC 6912 Proben aus Normalwachstumsbedingungen und nach Kultivierung unter Diazotrophie durchgeführt. Wie bereits beschrieben, wurden die Transkriptionslevel anhand des Housekeeping-Gens *rnpB* normalisiert.

Durch Amplifikation mit *groES* und *groEL* spezifischen Oligonukleotidsequenzen konnte die Kopienzahl der Gene pro ng RNA bestimmt werden. Hierbei wird das Verhältnis zu den im Operon regulierten *groES* und *groEL* Genen untersucht. Durch die Ratio der beiden Operon-Untereinheiten können Rückschlüsse über die Regulierung durch alternative TSS gezogen werden, welche ggf. nur die Transkription eines im Operon regulierten Gens aktivieren. Bei einem gleichen Transkriptionslevel der getesteten Gene ist davon auszugehen, dass die Expression beider Gene durch das Selbe regulatorische Element gesteuert wird. Durch die qRT-PCR Analyse mit hoch spezifischen Oligonukleotidsequenzen ist wurde gezeigt, dass zu allen getesteten Zeitpunkten eine Gleichverteilung der Transkriptmenge der Operon-Untereinheiten vorliegt. Die Ratio von *groEL1* zu *groES1*, sowie die Ratio von *groEL2* zu *groES2* weist zu allen Zeitpunkten einen Wert von ungefähr 1 auf (Tabelle 10). Es werden die Mittelwerte aus sechs biologischen und drei technischen Replikaten kalkuliert. Die bicistronischen Chaperon Paraloge werden, zumindest unter den getesteten Bedingungen, gleich stark exprimiert.

**Tab. 10:** Ratio der Operon-Einheiten von *groESL* in *C. fritschii* PCC 6912 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

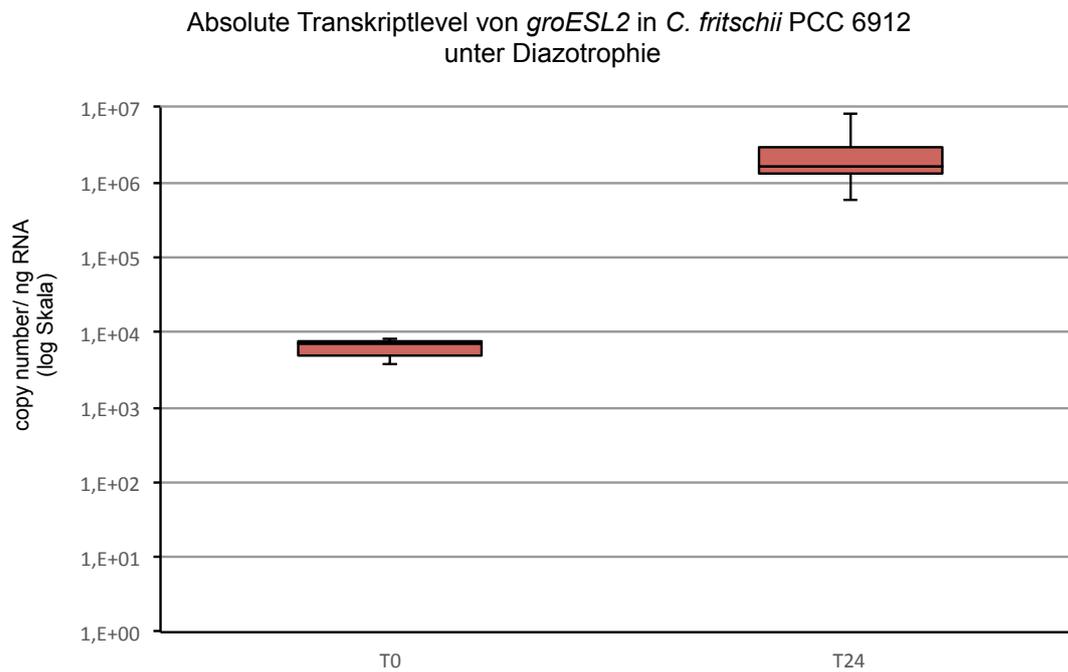
Ratio	Normalbedingung	Diazotrophie 3h	Diazotrophie 24h
<i>groES1/groEL1</i>	1,01	0,93	0,94
<i>groES2/groEL2</i>	1,02	0,92	0,95

Wie bereits in 2.4.1 und 4.1 gezeigt ist ein Unterschied zwischen der Transkriptmenge der beiden Operons untereinander unter Normal- und diazotrophen Bedingungen zu verzeichnen. Unter Normalbedingungen ist der Transkriptpegel von *groESL1* mit einem Wert von  $2,48^6$  deutlich höher als der von *groESL2* ( $6,25^3$ ) (Abbildung 27 und 28 T0). Während der Transkriptpegel von *groESL1* nach 24 Stunden Inkubation unter diazotrophen Bedingungen absinkt ( $1,51^4$ ), wird die Transkription von *groESL2* induziert ( $2,94^6$ ). Aufgrund der basalen Transkriptpegel der Paraloge ist der absolute Wert von *groESL2*, trotz des Anstiegs bei Diazotrophie jedoch annähernd gleich wie Transkriptmenge von *groESL1* unter Normalbedingung.



**Abb. 27** Absoluter Transkriptpegel von *groESL1* in *C. fritschii* PCC 6912 unter Diazotrophie

Die Abbildung zeigt den Transkriptpegel von *groESL1* in *C. fritschii* PCC 6912 zu verschiedenen Zeitpunkten unter diazotrophen Bedingungen. Die Werte wurden über qRT-PCR ermittelt. Gezeigt sind die Verteilungen der absoluten Transkriptpegel in logarithmischer Auftragung. Jedes der Boxplot-Diagramme repräsentiert den Median sowie die Quartile der Wertegruppe ( $n \geq 4$ ).



**Abb. 28** Absoluter Transkriptpegel von *groESL2* in *C. fritschii* PCC 6912 unter Diazotrophie

Die Abbildung zeigt den Transkriptpegel von *groESL2* in *C. fritschii* PCC 6912 zu verschiedenen Zeitpunkten unter diazotrophen Bedingungen. Die Werte wurden über qRT-PCR ermittelt. Gezeigt sind die Verteilungen der absoluten Transkriptpegel in logarithmischer Auftragung. Jedes der Boxplot-Diagramme repräsentiert den Median sowie die Quartile der Wertegruppe ( $n \geq 4$ ).

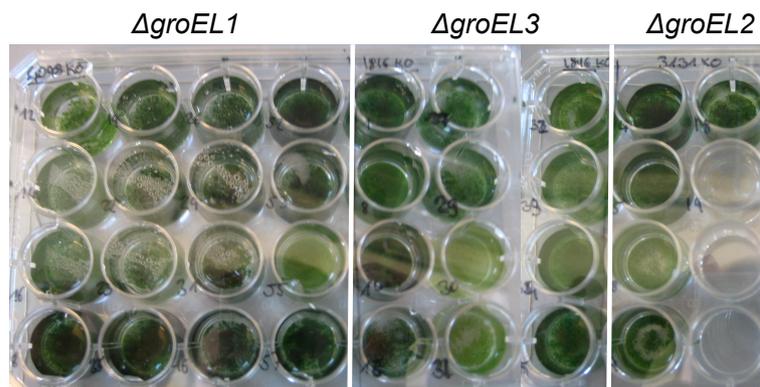
## 4.5 Konstruktion von *groEL* Deletionsmutanten in *C. fritschii* PCC 6912

Das Genom von *C. fritschii* PCC 6912 kodiert für insgesamt drei *groEL* Paraloge, welche eine hohe Sequenz-Ähnlichkeit untereinander aufweisen. Durch vorherige Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression der Paraloge unter unterschiedlichen Stressbedingungen verschieden reguliert wird. Die regulatorische Divergenz der Genkopien legt eine Spezifikation eines jeden Paralogs nahe. Um zum einen die *Housekeeping*-Funktion der Paraloge und zum anderen die Redundanz dieser zu testen, sollten cyanobakterielle Stämme konstruiert werden, in denen jeweils eine *groEL* Genkopie im Genom über homologe Rekombination durch eine Antibiotikaresistenz ausgetauscht wird. In diesen cyanobakteriellen  $\Delta groEL$  Stämmen sollte anschließend untersucht werden, inwieweit die Paraloge die spezifische Funktion der deletierten Genkopie ausgleichen können. Es wurde bereits in anderen Cyanobakterien gezeigt, dass einige *groEL* Paraloge essentiell für den Organismus sind, während die Expression des anderen Paralogs keinen Effekt auf die Vitalität des Organismus hat.

### 4.5.1 Deletion der *groEL* Paraloge in *C. fritschii* PCC 6912

Für die Deletion der *groEL* Paraloge in *C. fritschii* PCC 6912 wurden die Methode des Gen-*Knockouts* durch homologe Rekombination gewählt. Hierfür wurden verschiedene Konstrukte synthetisiert, welche flankierende Sequenzen der *groEL* Paraloge beinhalten, wodurch ein Genaustausch über homologe Rekombination stattfinden kann. Die Deletionskonstrukte wurden durch eine Test-Restriktion und Sequenzierung auf ihre Genauigkeit hin überprüft und durch *triparental mating* (3.6) in *C. fritschii* PCC 6912 eingebracht und wie in 3.9.2 beschrieben selektiert.

Abbildung 27 zeigt die positiven Transformanten nach 6-monatiger Selektion. Pro Konstrukt wurde die höchstmögliche Anzahl an Transformanten kultiviert. Um den Selektionsdruck weiter zu erhöhen, wurde die Antibiotika-Konzentration im Medium auf 10  $\mu\text{g/ml}$  erhöht. Bei ausreichender Biomasse wurde mit dieser Startkultur ein größeres Kulturvolumen inokuliert.



**Abb. 29** Wachstum der positiven *C. fritschii* PCC 6912 Transformanten

Selektion der potentiellen Deletionsstämme  $\Delta groEL$  *C. fritschii* PCC 6912. Positive Transformanten wurden nach dem Wachstum auf selektive Platten in 3 ml Flüssigkultur (BG11 + Sm 10 $\mu$ g/ml) überführt. Je nach Erfolgsrate der Transformation mit den Deletionskonstrukten wurden mehrere positive Transformanten pro *groEL* Paralog kultiviert (n ( $\Delta groEL1$ ) = 16; n ( $\Delta groEL2$ ) = 5; n ( $\Delta groEL3$ ) = 8). Alle hier gezeigten selektierten Transformanten wurden für die Verifizierung der drei verschiedenen  $\Delta groEL$  *C. fritschii* Stämme durch PCR überprüft. Für die anschließende RNA-Isolation zur Transkriplevelbestimmung durch qRT-PCR wurden drei Replikate pro *groEL* Paralog verwendet.

#### 4.5.2 Verifizierung der *groEL* Deletionsmutanten

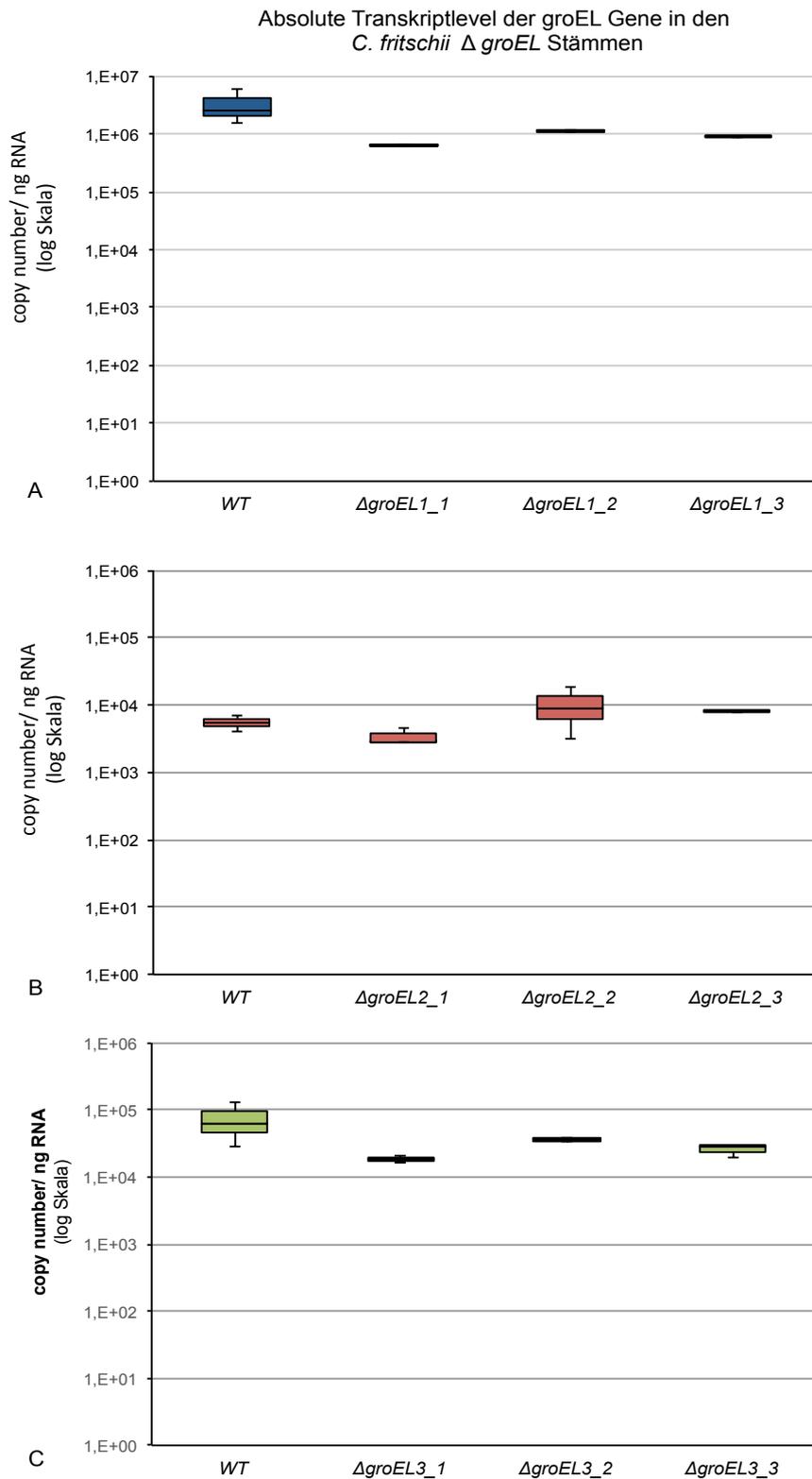
In den transformierten *C. fritschii* PCC 6912 Kulturen konnte eine Sucrose-Sensitivität neben der Spectinomycin-Resistenz festgestellt werden. Die Antibiotika-Resistenz der Kulturen zeigte lediglich positive Transformanten an, während die Sucrose-Sensitivität auf anschließenden Verlust des Plasmids hinwies. Die Tatsache, dass das Deletionskonstrukt in den cyanobakteriellen Zellen nicht mehr vorlag, diese jedoch eine Toleranz gegenüber Spectinomycin aufwiesen, ließ eine Integration der Resistenz-Kassette in das Genom der Cyanobakterien vermuten. Entsprechende Kulturen wurden durch PCR mit *aadA* spezifischen Oligonukleotidsequenzen auf das Vorhandensein der Resistenz-Kassette getestet, welche diese Vermutung bestätigt hat.

Je nach Erfolgsrate der Transformation mit den Deletionskonstrukten, wurden mehrere positive Transformanten pro *groEL* Paralog untersucht: n( $\Delta groEL$ ) = 16; n( $\Delta groEL2$ ) = 5; n( $\Delta groEL3$ ) = 8. Durch weitere PCR-Analysen mit Oligonukleotiden, welche in den flankierenden Bereichen der gesamten Deletionskassette binden (Abbildung 16), sollte die Lokalisation der homologen Rekombination ermittelt werden. Die Kassette konnte hierüber jedoch nicht amplifiziert und somit nicht lokalisiert werden.

Deshalb wurden im Anschluss ebenfalls PCR-Analysen mit *groEL* spezifischen Oligonukleotidsequenzen durchgeführt. Diese wurden im Vorhinein auf ihre Spezifität überprüft, sodass gewährleistet war, dass je Oligonukleotidsequenz-Set nur ein spezifisches *groEL* Paralog amplifiziert wurde. Für die folgende PCR-Analyse wurde Wildtyp-DNA als Kontrolle und DNA der potentiellen *groEL* Deletionsstämmen von *C. fritschii* PCC 6912 verwendet. Die Auswertung der Amplifikation durch Agarose-Gelelektrophorese zeigte in allen Proben eine *groEL* spezifische Genbande. Dieses Ergebnis zeigt, dass in keiner der insgesamt 29 getesteten Kulturen eine Deletion von *groEL* stattgefunden hat.

Da das Genom von *C. fritschii* PCC 6912 jedoch in hoher, bisher nicht genau bekannter, Kopienzahl vorliegt, ist es möglich, dass keine vollständige Deletion der *groEL* Paraloge stattgefunden hat. Durch die PCR-Analyse kann jedoch nicht detektiert werden, ob eine herabgesetzte *groEL*-Menge in den potentiellen cyanobakteriellen Deletionsstämmen vorliegt. Daher wurde im Anschluss durch qRT-PCR bestimmt, ob das Transkriptlevel von *groEL* in den potentiellen  $\Delta groEL$  *C. fritschii* Kulturen gegenüber der Wildtyp Kultur herabgesetzt ist. Die Analyse durch qRT-PCR ist deutlich sensitiver als bei einer herkömmlichen PCR. Für die Transkriptlevel-Bestimmung wurde RNA aus insgesamt 12 Kulturen isoliert ( $n(\Delta groEL1) = 3$ ;  $n(\Delta groEL2) = 3$ ;  $n(\Delta groEL3) = 3$ ;  $n(\text{Wildtyp } C. fritschii) = 3$ ). Zur Auswertung wurde die relative Transkriptmenge der *groEL* Paraloge im Verhältnis zur Transkriptmenge des jeweiligen *groEL* Paralogs im Wildtyp ermittelt.

In keinem der potentiellen Deletionsstämmen konnte ein signifikant herabgesetztes Transkriptlevel von *groEL* detektiert werden (Abbildung 28). Die resultierenden Ergebnisse der Transkriptpegel der *groEL* Paraloge in den genetisch modifizierten *C. fritschii* PCC 6912 Stämmen weisen darauf hin, dass keine Deletion der Chaperon kodierenden Gene stattgefunden hat. Die Transkriptionslevel des jeweiligen *groEL* Gens im potentiellen Deletionsstamm und im Wildtyp-Stamm sind bei allen drei Paralogen nahezu identisch.



**Abb. 30** Absolute Transkriptlevel der *groEL* Gene in den *C. fritschii* PCC 6912 Deletionsstämmen

Gezeigt sind die Verteilungen (in logarithmischer Auftragung) der absoluten Transkriptpegel der *groEL* Gene in den jeweiligen *C. fritschii* PCC 6912  $\Delta groEL$  Stämmen und einer Wildtyp-Probe. Jedes der Boxplot-Diagramme repräsentiert den Median sowie die Quartile der Wertegruppe ( $n \geq 3$ ). (A) Transkriptionslevel von *groEL1* in den korrespondierenden Deletionsstämmen (B) Transkriptionslevel von *groEL2* in den korrespondierenden Deletionsstämmen (C) Transkriptionslevel von *groEL3* in den korrespondierenden Deletionsstämmen.

## 5 Diskussion

Die Duplikation von Gen kodierenden Sequenzabschnitten ist in der Evolution von neuen Protein-Funktionen innerhalb eines Organismus von großer Bedeutung. Paraloge Genkopien können Mutationen schneller akkumulieren und weisen somit eine erhöhte Sequenzevolutionsrate gegenüber Genen in Einzelkopie auf. Eine aus dem Duplikationsereignis resultierende Divergenz der Paraloge kann sich bereits bei wenigen Substitutionen ausbilden (Wilks et al. 1988). Im Gegensatz zur Mehrheit der prokaryotischen Organismen weisen alle Cyanobakterien mindestens zwei paraloge Chaperonin kodierende *groEL* Gene auf (Lund 2009), welche im Allgemeinen hoch konserviert sind (Goyal et al. 2006). Von verschiedenen Organismen ist bekannt, dass Chaperone einen erheblichen Einfluss bei der Adaption an unterschiedliche Wachstumsbedingungen haben (Lund 2009).

Das Vorkommen der Chaperonin kodierenden Gene *groES* und *groEL* ist, mit wenigen Ausnahmen in den parasitisch lebenden Mollicutes, ubiquitär in allen bakteriellen Spezies. In der Regel liegen diese Gene bicistronisch in einem Operon kodiert vor (*groESL*). Duplikationen oder Verlust von *groESL* fanden hauptsächlich in den Spezies der Chlamydia, Actinobakterien und Cyanobakterien statt. Letztere kodieren mindestens zwei *groEL* Paraloge, wovon eines häufig monocistronisch vorliegt. In den morphologisch komplexeren Cyanobakterien (*Nostocales* und *Stigonematales*) hat zusätzlich eine Fixierung eines weiteren *groESL* Paralogs stattgefunden (Dagan et al. 2013). Für die monocistronisch regulierten *groEL* Paraloge kann nicht eindeutig gezeigt werden, ob diese durch die Duplikation des einzelnen *groEL* Gens entstanden sind oder ein Verlust von *groES* stattgefunden hat. Wahrscheinlicher ist jedoch eine Duplikation des gesamten Operons mit anschließendem Verlust der *groES* Sequenz. Dieses Szenario wird, aufgrund von Genomanalysen in *M. tuberculosis* (Stewart 2002), auch für den gemeinsamen Vorläufer der Actinobakterien angenommen (Goyal 2006) und lässt darauf schließen, dass *groES* im Verhältnis zu *groEL* unter geringerem Selektionsdruck steht.

Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass eine Diversifikation der *groESL* Paraloge im Laufe der Evolution zur Anpassung an extreme Umweltbedingungen beigetragen hat (Sato et al. 2008; Sun et al. 2003; Henderson et al. 2013). Bis dato sind jedoch keine Untersuchungen zur Gen-Duplikation und der ggf. daraus resultierenden funktionellen Divergenz des GroESL Chaperon-Komplexes in stigonematalen Cyanobakterien bekannt. Die vorliegende Arbeit befasst sich daher mit der Studie dieser Paraloge. Hierfür wurde das Cyanobakterium *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 als Modellorganismus verwendet. Zwischen den drei *groEL* Paralogen aus *C. fritschii* PCC 6912 liegt eine Aminosäuresequenz-Identität von bis zu 87,2 % zwischen *groEL1* und *groEL2* vor und eine Ähnlichkeit von 93,5%. Mit 63,6 % Sequenz-Identität besteht die größte sequenzielle Differenz zwischen den Genkopien *groEL2* und *groEL3*. Die beiden *groES* Paraloge sind mit einer Identität von 73,4 % ebenfalls hoch konserviert.

In dieser Arbeit wurden verschiedene *in vivo* Methoden verwendet, um die funktionelle Divergenz dieser Chaperonin Paraloge sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen eine Differenzierung der verschiedenen *groES* und *groEL* Paraloge, welche im Laufe der cyanobakteriellen Evolution entstanden ist und sich auf die Expression und Funktion der Paraloge ausprägt. Sowohl unter Normal- als auch unter Stress-Bedingungen zeigt sich eine diverse transkriptionelle Regulierung der *groEL* Gene. Auch in der Expressionslokalisierung innerhalb der Zellen konnten, zumindest unter diazotrophen Bedingungen, Unterschiede detektiert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich ableiten, dass es sich bei den Paralogen um differenzierte Genkopien handelt und die Duplikate nicht aufgrund eines *Dosage* Effekts im Genom konserviert sind. Des Weiteren geben die getestete Fähigkeit zur Chaperonin-Assemblierung und die Chaperonin-Aktivität erste Hinweise auf die Funktion der divergierten Paraloge. In den folgenden Abschnitten wird genauer auf die Unterschiede in der transkriptionellen Regulierung, der Expressionslokalisierung sowie der Chaperon-Aktivität der Paraloge eingegangen.

## 5.1 Differentielle Transkription und Expressionslokalisierung der Paraloge

Der Differenzierungsprozess von durch Genduplikation entstandenen Genen kann verschiedene Auswirkungen haben. Durch Akkumulation von deletierenden Mutationen in einem Paralog wird dieses nonfunktional (Ohno 1970). Bei einer Sub- oder Neofunktionalisierung werden eine oder mehrere Genkopien durch Mutation in der Gen kodierenden Sequenz oder in den regulatorischen Elementen so verändert, dass eine geänderte Funktion des ursprünglichen Gens vorliegt (Force 1999). Subfunktionale Paraloge übernehmen grundsätzlich dieselbe Funktion wie das ursprüngliche Gen, weisen aber durch erlangte Mutationen eine Spezialisierung dieser Funktion auf. Die beschriebene Spezifikation kann sich unter anderem in einem differentiellen Expressionsmuster der Paraloge zeigen. Diese differentielle Expression wirkt sich beispielsweise auf eine diverse Induktion der Genkopien zu verschiedenen Stressbedingungen oder Entwicklungsstadien aus. In höheren Organismen zeigen sich auch Gewebe-Spezifitäten der Expression der Genkopien (Force 1999).

Eine *in silico* Sequenzanalyse der *upstream*-Bereiche der drei *groEL* Gene von *C. fritschii* PCC 6912 gibt bereits erste Hinweise auf eine differentielle Regulation der Paraloge. Die Analyse zeigt in einigen Bereichen die Präsenz von verschiedenen regulatorischen Elementen, wie z. B. das palindromische CIRCE-Element (Zuber 1994) sowie eine K-Box, die maßgeblich an der Transkription von cyanobakteriellem *groESL* beteiligt sind (Kojima and Nakamoto 2007). Während das CIRCE/hrcA System eine negative Regulation steuert, wird die Expression der Gene durch die K-Box positiv beeinflusst (Zuber 1994). Analysen der *groEL* Paraloge in verschiedenen cyanobakteriellen Spezies wie *Synechocystis* (Kojima and Nakamoto 2007) und *Anabaena* (Rajaram et al. 2014) haben gezeigt, dass das CIRCE-Element und die K-Box besonders an der Hitze- und Licht-Stress bedingten Induktion der *groESL* Expression beteiligt sind.

Die hier durchgeführte Analyse zeigt Unterschiede in der Präsenz dieser Elemente in *C. fritschii* PCC 6912 (Abbildung 39). Der *upstream*-Bereich von *groEL1* weist die kodierenden Sequenzen für ein CIRCE-Element sowie eine K-Box auf, während für das *groEL2* Paralog keine dieser Sequenzen detektiert wurde. Im Gegensatz zu Untersuchungen in *S. elongatus* und *T. elongatus* (Sato et al. 2008) weist der Sequenzabschnitt *upstream* der monocistronischen Genkopie jedoch ein CIRCE-Element, nicht aber eine K-Box auf. Auch in anderen, der zur Gattung *Nostocales* und *Stigonematales* zugehörigen Spezies, wurde das

beschriebene Präsenzmuster (Konserviertes CIRCE-Element und K-Box bei *groESL1*; fehlende Elemente bei *groESL2* und fehlende K-Box im monocistronischen *groEL3*) der regulatorischen Elemente aufgezeigt). Einzige Ausnahme ist hierbei das Cyanobakterium *Clorogloeopsis* PCC 7702, indem auch im *upstream*-Bereich von *groEL3* keines der genannten regulatorischen Elemente vorliegt. Jedoch ist zu bemerken, dass dort alle drei *groEL* Paraloge in einer operalen Einheit mit *groES* vorliegen.

Die *in silico* Analyse des CIRCE-Elements und der K-Box gibt zwar erste Hinweise auf die Expression der *groEL* Gene, jedoch haben Studien in *Synechocystis* PCC 6803 eine deutlich komplexere Regulation der Expression verschiedener Chaperone gezeigt (Singh et al. 2006). Um diese genauer zu untersuchen wurden deshalb transgene *C. fritschii* PCC 6912 Stämme erzeugt, in denen eine *in vivo* Analyse der transkriptionellen Regulation durch GFP-Fluoreszenz möglich war. Sowohl unter Normal- als auch Stressbedingungen zeigten sich unterschiedliche Transkriptionslevel und subzelluläre Lokalisation der *groEL* Expression.

Die Abbildungen 18-20 zeigen signifikante Unterschiede in der basalen Expression der *groEL* Paraloge. Das höchste Fluoreszenzsignal, und somit die höchste regulatorische Aktivität, zeigt sich bei *groEL1* gefolgt von *groEL3*. Das Paralog *groEL2* weist eine geringe basale Expression auf. Ein möglicher Grund hierfür stellt der bereits erwähnte Mangel der regulatorischen Elemente CIRCE und K-Box dar.

In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen unter Hitzestress wird in den einzelnen Genkopien ein unterschiedlich starker Expressionsanstieg aller Paraloge sichtbar. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen zur Transkriptionslevel-Änderung von *groEL* Paralogen in anderen cyanobakteriellen Spezies (Lehel et al. 1992; Lehel et al. 1993; Kovács et al. 2001). Besonders das Chaperonin Paralog *groESL1* zeigt einen schnellen Transkriptlevel-Anstieg bei Temperaturerhöhung (Abbildung 18).

Für das in Cyanobakterien ubiquitär vorkommende monocistronische *groEL* Paralog wurde durch Analysen in *Synechocystis* gezeigt, dass ein Expressionsanstieg durch Starklicht induziert wird (Asadulghani et al. 2003). Affirmativ konnte auch in *C. fritschii* PCC 6912 ein differentielles Expressionslevel der *groEL* Genkopien unter Starklicht beobachtet werden. Im Vergleich zu den anderen Paralogen zeigt *groEL3* eine besonders stark ausgeprägte Erhöhung des Expressionslevels. Es kann deshalb postuliert werden, dass die Funktion, des durch diese Genkopie kodierten Proteins, in Zusammenhang mit der Photolithotrophie-Fähigkeit des Cyanobakteriums steht. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, dass der Licht-induzierte Expressionsanstieg dieses Paralogs in *Synechocystis* durch die Zugabe des PSII-Elektronenfluss inhibierenden Phenylharnstoff-Derivats (DCMU) reduziert wird (Asadulghani et al. 2003).

Die Dynamik der *groEL* Expression unter Stickstoffmangel ist in zweierlei Hinsicht von großer Bedeutung: Zum einen gibt sie Hinweise auf einen Einfluss der Chaperonin Paraloge auf die Adaption der Zellen an diese Bedingung und zum anderen kann ein Zusammenhang auf den Differenzierungsprozess der Zellen hergestellt werden. In dieser Arbeit sollte mittels GFP-Expression gezeigt werden, dass das üblicherweise zytosolisch vorliegende *groEL1* unter stickstofffixierenden Bedingungen in spezifischen Kompartimenten akkumuliert (Abbildung 20). Aufgrund der limitierenden Bedingungen dieser Inkubationsmethode kann nicht eindeutig gezeigt werden, ob es sich bei dem Locus der Expression tatsächlich um ausdifferenzierte Heterocysten handelt. Im Kontext mit dem gezeigten Expressionsanstieg von *groEL1* im Anfangsstadium der Zelldifferenzierung (Abschnitt 2.4.1) kann jedoch angenommen werden, dass es sich hierbei um das Kompartiment handelt, das weiter zu einer Heterocyste ausdifferenziert.

Der durch die qRT-PCR nachgewiesene Anstieg des *groEL2* Transkriptionslevels während diazotrophen Bedingungen (Abschnitt 2.4.1) konnte durch die Detektion der transkriptionellen Promotoraktivität hier nicht bestätigt werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte die geringe basale Expression der *groEL2* Genkopie sein. Die Transkriptmenge von *groEL2* ist im Verhältnis zu *groEL1* unter Normalbedingungen mehr als 1000-fach verringert (Abbildung A10). Dadurch, dass die Fluoreszenzmikroskopie deutlich weniger sensitiv als die qRT-PCR Analyse ist, wird eine starke regulatorische Aktivität von *groEL2* vorausgesetzt, um diesen Versuch unter vergleichbaren Bedingungen wie bei *groEL1* durchzuführen.

## 5.2 Chaperonin-Assemblierung und -Aktivität

Die differentielle Expression und die Expressionslokalisierung zu den verschiedenen Kultivierungsbedingungen zeigen erste Hinweise auf eine Differenzierung der drei *groEL* Paraloge. In den folgenden Abschnitten wird, zusätzlich zu der gezeigten transkriptionellen Divergenz der Paraloge, die Studie einer funktionellen Divergenz auf Protein-Ebene beschrieben. Hierfür wurden verschiedene Analysen zur Chaperonin-Assemblierung und Chaperonin-Aktivität *in vivo* durchgeführt.

Die Proteine GroEL und GroES liegen in einem Multimer-Komplex aus 14 GroEL und 7 GroES Proteinen vor (Hartl 2011). Durch die Anzahl der Paraloge in *C. fritschii* PCC 6912 ergibt sich jedoch eine Variation in der Kombinatorik zur Ausbildung der Multimer-Komplexe. In einer Protein-Protein-Interaktionsanalyse wurden deshalb mögliche Unterschiede in der Protein-Interaktion der kombinatorisch wirkenden Paraloge ausgetestet. Die Binfähigkeit der Paraloge untereinander gibt Information über eine strukturelle Divergenz und Aktivität der Paraloge.

Durch die hier durchgeführte Interaktionsanalyse der Chaperon-Untereinheiten können jedoch keine Rückschlüsse auf die konkrete Ausbildung der typischen Tetradecamer-Struktur gezogen werden. Mit dieser Methode ist lediglich der Nachweis einzelner Protein-Protein-Interaktionen möglich. Um eine Oligomerisierung der Proteine genau untersuchen zu können, müssten alternative Analysen verwendet werden. Mögliche *in vitro* Methoden sind beispielsweise die *Dynamik Light Scattering* (DLS) Methode (Goldburg 1999) oder die Detektion von Polymeren aufgrund von Fluoreszenz (Camberg et al. 2009).

Die Chaperonin-Aktivität, und somit die Ausbildung einer Tetradecamer-Struktur, der verschiedenen Paralog-Kombinationen konnte allerdings durch anschließende Komplementierungstests in einen *groESL* defizienten *E. coli* Stamm überprüft werden.

Um erste Hinweise über die strukturelle Divergenz der Chaperonin bildenden Proteine zu erlangen wurden die Sekundärstrukturen der GroES und GroEL Proteine *in silico* prognostiziert. Sowohl die vorhergesagten Sekundärstrukturen der drei GroEL Paraloge, als auch die der beiden GroES Paraloge sind zum größten Teil identisch. Dies war aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Gensequenzen zu erwarten und deutet auf eine Konservierung der Chaperonin-Funktion der Proteine hin. Durch die Protein-Protein-Interaktionstests wurde jedoch eindeutig gezeigt, dass die Bindungsfähigkeit der paralogen GroEL Proteine nicht identisch ist und somit für eine strukturelle Differenzierung der Paraloge spricht.

Das Ergebnis des Protein-Protein-Interaktionstests zwischen den beiden bicistronischen GroEL Paralogen (GroEL1 und GroEL2) zeigt keine heterogene Interaktion. Außerdem ergeben sich hier Unterschiede hinsichtlich der Ko-Chaperonin Bindung. GroEL1 zeigt keine spezifische Präferenz für eines der beiden Ko-Chaperonine und bindet folglich sowohl an GroES1 als auch an GroES2. Da die beiden Ko-Chaperone auch untereinander interagieren, ist es somit weiter möglich, dass der GroEL1 Chaperon-Komplex an eine heteromere GroES-Deckelstruktur bindet. Diese GroES-Heteromere treten jedoch, aufgrund differentieller Regulation der Transkription, *in vivo* mutmaßlich eher selten auf.

Durch Komplementierungstests und Faltungsaktivitätsanalysen mit verschiedenen GroEL Substraten wurde gezeigt, dass das GroEL1 Protein aus *Anabaena* auch unabhängig von dem Ko-Chaperonin GroES Aktivität aufweist (Potnis et al. 2016). Dies ist für das GroEL1 Paralog aus *C. fritschii* jedoch nicht der Fall. Durch den Komplementierungstest kann gezeigt werden, dass nur der native Chaperonin-Komplex bestehend aus GroEL1 und GroES1 zusammengesetzten Oligomeren eine Chaperonin-Aktivität aufweist. Es konnte keine Komplementierung durch Expression des GroEL1 Proteins ohne das Ko-Chaperonin GroES1 gezeigt werden. Auch in Kombination mit GroES2 fand keine funktionale Komplementierung statt. Dies steht im Widerspruch zu der gezeigten Bindung zwischen GroEL1 und GroES2. Da keine Aktivität des heteromeren Chaperon-Komplexes aus GroEL1 und GroES2 nachgewiesen werden konnte, kann deshalb angenommen werden, dass dieses Ko-Chaperonin nicht funktional ist. Dafür spricht auch die Tatsache, dass GroEL2 ausschließlich mit dem Ko-Chaperonin GroES1 interagiert. Sowohl in der Analyse der Chaperonin-Assemblierung, als auch in der Analyse der Chaperonin-Aktivität wird eindeutig eine Abhängigkeit zu diesem Paralog deutlich.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine dysfunktionale operonale Einheit von *groESL2* vermutet. Diese Vermutung konnte interessanterweise durch eine qRT-PCR Expressionsanalyse nicht bestätigt werden (Abschnitt 4.4). Sowohl unter Normal- als auch unter diazotrophen Bedingungen weisen die beiden Gene *groES2* und *groEL2* annähernd gleiche Transkriptionslevel auf. Die leichten Unterschiede (Ration 0,91) sind auf die bereits bekannte Varianz der Expressionsstärke bzw. Transkriptstabilität von im Operon regulierten Genen zurückzuführen (Selinger et al. 2011). Durch die gezeigte Expression von *groES2* wird deshalb von einem post-transkriptionellen Abbau oder Inaktivierung dieses Paralogs ausgegangen. Die Translation in ein funktionelles Protein wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Aufgrund der identischen Größe zwischen den beiden GroES Paralogen (10 kDa) kann die Expression von GroES2 in *C. fritschii* PCC 6912 auch nicht über eine SDS-Page der Protein-Isolate nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist jedoch, dass eine

---

heterologe Überexpression dieses Paralogs in verschiedenen *E. coli* Stämmen nicht erfolgreich war. Während, im Gegensatz dazu, eine heterologe Überexpression für die anderen paralogen Chaperonin-Untereinheiten (GroES1, GroEL1, GroEL2 und GroEL3) möglich war.

Für das paraloge Protein GroEL3 wird eine starke differentielle Entwicklung gezeigt, da zusätzlich zur fehlenden Bindefähigkeit mit den beiden anderen Paralogen, auch keine Bindung von GroEL3 Proteinen untereinander stattfindet. Diese Tatsache zeigt, dass GroEL3, zumindest unter den getesteten Bedingungen, nur als Monomer vorliegt und keine Chaperonin-Assemblierung stattfindet. Dies wird ebenfalls durch eine mangelnde Interaktion zu den Ko-Chaperonin Paralogen GroES1 und GroES2 bestätigt.

Die fehlende Chaperonin-Assemblierung deutet auf eine durch Non-oder Neofunktionalisierung bedingte Chaperonin-Inaktivität dieses Paralogs hin. Diese wurde durch den Komplementierungstest in *E. coli* bestätigt. GroEL3 weist, weder in Kombination mit dem Ko-Chaperonin GroES1 noch mit GroES2, Chaperonin-Aktivität auf (Abschnitt 4.3). Ein möglicher Grund hierfür ist eine beim Aminosäuresequenz-Vergleich gezeigte spezifische Abweichung in GroEL3. In dem C-terminalen Bereich dieses Paralogs wurden repetitive Glycin- und Methionin-Sequenzen detektiert (Abbildung A8). Dieses sogenannte GGM-Motiv (Zuber 1994) wurde bereits in anderen cyanobakteriellen monocistronischen GroEL Paralogen beobachtet und gibt Hinweise auf eine mögliche funktionelle Spezifizierung dieses Proteins. Durch Analysen in *E. coli* wurde eine erhöhte Faltungskapazität und Erhöhung des zentralen Hohlraums des Chaperon-Komplexes bestehend aus GroEL Paralogen mit GGM-Motiv vermutet (Tang 2006; England 2008). Aufgrund der mangelnden Assemblierung und Chaperonin-Inaktivität von GroEL3 ist diese Annahme für das cyanobakterielle Paralog jedoch unwahrscheinlich. Es wurde deshalb bei der *in silico* Analyse der Aminosäuresequenz besonderes Augenmerk auf die von Brocchieri und Karlin vorhergesagte Domäne gelegt, welche zuständig für Oligomerisierung sowie die Bildung und Hydrolyse von ATP ist (Brocchieri 2000). Interessanterweise wurde jedoch keine radikale Mutation in diesem Bereich detektiert.

### 5.3 Redundanz der Chaperonin Paraloge

Um abschließend, zusätzlich zur Chaperonin-Aktivität, weitere Erkenntnisse über die Funktion der einzelnen *groEL* Paraloge *in vivo* zu erlangen, sollten cyanobakterielle *groEL* Deletionsmutanten erstellt werden. Durch die Studie dieser *C. fritschii* PCC 6912 Stämme können detaillierte Informationen bezüglich der Redundanz der Paraloge gewonnen werden. Die Erzeugung von Deletionsmutanten in einem Organismus kann mit verschiedenen Mechanismen, wie beispielsweise homologe Rekombination (Mansour et al. 1988), RNA-Interferenz (RNAi) (Fire et al. 1998), *Transcription Activator-Like Effector Nuclease* (TALEN) (Moscou and Bogdanove 2009; Miller et al. 2010) oder *Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISP/Cas) (Jinek et al. 2012) durchgeführt werden. Während die gerichtete genetische Modifizierung durch CRISP/Cas erst kürzlich etabliert wurde, ist die Deletion von Genen durch homologe Rekombination bereits seit den späten Achtzigern eine häufig verwendete Methode zur Erzeugung von Gen-*Knockouts*.

In der hier durchgeführten Methode sollten die *groEL* Paraloge durch eine Antibiotika-Resistenz-Kassette im Genom von *C. fritschii* PCC 6912 ausgetauscht werden. Die hierfür erzeugten Deletionskonstrukte wiesen je 1,5 kB lange *groEL* flankierende Sequenzen *up*- und *downstream* der Sp/Sm-Resistenzkassette auf. Durch die *triparental mating* Methode wurden cyanobakterielle Transformanten erzeugt, welche nach erfolgter Insertion eine Streptomycin-Resistenz aufwiesen. Zusätzlich zur Selektion durch die Vitalität im Selektionsmedium, bestätigte auch die Amplifikation der Resistenzkassette die erfolgreiche Integration der Resistenz-Kassette im Genom von *C. fritschii* PCC 6912.

Bisher ist die Erzeugung von cyanobakteriellen Deletionsstämmen hauptsächlich in wenigen Modellorganismen wie *Synechocystis* PCC 6803, *S. elongatus* (Kumar 1962; Bazin 1968) oder *Nostoc punctiforme* PCC 73102 etabliert (Griese et al. 2011). Bis dato gibt es keine Information zur Erzeugung von Deletionsmutanten in stigonematalen Cyanobakterien.

Auch im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich eine *groEL* Deletionsmutante zu erzeugen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass das Genom des hier verwendeten Cyanobakteriums *C. fritschii* PCC 6912 erst kürzlich sequenziert wurde (Dagan et al. 2013) und es bis dato kein weiteres Wissen über die Anzahl der vorhandenen Genomkopien in einer Zelle des Organismus gibt. Eine mögliche Ploidie in diesem Cyanobakterium könnte die Erzeugung von genetisch modifizierten Stämmen beeinflussen. Es kann also hypothetisch angenommen werden, dass zwar eine Deletion von *groEL* durch die Integration der Resistenzkassette im entsprechenden Locus erfolgt ist, sich diese jedoch nicht in allen Genomkopien ausprägt.

Generell weisen Cyanobakterien eine hohe Varianz der Ploidie auf. Einige Cyanobakterien, wie beispielsweise *Synechococcus* WH8101 sind monoploid (Armbrust et al. 1989), während andere mit einer Kopienzahl von 3-4 Genomen pro Zelle eine schwache Polyploidie aufweisen. Die hohe Varianz der Ploidie in Cyanobakterien zeigt sich u.A. auch in dem Sektion I zugehörigen Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, das hoch polyploid ist. In verschiedenen Organismen wurde gezeigt, dass die Genomkopienzahl pro Zelle ebenfalls stark von der Wachstumsphase abhängig ist (Hansen 1978). So variiert diese z.B. bei *Synechocystis* sp. PCC 6803, je nach Wachstumsphase, zwischen 58 und 218 Kopien pro Zelle (Griese et al. 2011). Auch können keine Rückschlüsse bezüglich des Genus oder der Genomgröße auf die Ploidie eines Organismus geschlossen werden (Griese et al. 2011).

Da die Erzeugung von Deletionsmutanten durch homologe Rekombination durch eine Ploidie beeinflusst sein könnte (Stucken et al. 2013), war es in diesem Rahmen nicht möglich, die Effizienz des Verfahrens zur Erzeugung von Deletionsmutanten in *C. fritschii* PCC 6912 zu verbessern.

## 5.4 Evolutionäre Entwicklung der Paraloge

Die vorhergehenden Abschnitte haben eine unterschiedlich ausgeprägte Divergenz der Chaperonin Paraloge aus *C. fritschii* PCC 6912, sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene, gezeigt. Um diese Differenzen im Kontext der evolutionären Entwicklung der Paraloge zu verstehen, wird in den folgenden Abschnitten zusammenfassend auf eine jeweilige zugeordnete Funktion der Paraloge *in vivo* eingegangen.

### 5.4.1 Housekeeping-Funktion von *groESL1*

Erste Hinweise auf eine *Housekeeping*-Funktion des Paralogs *groESL1* in dem Cyanobakterium *C. fritschii* PCC 6912 ergaben sich bereits durch vorherige Studien, durch die anhand von qRT-PCR ermittelten Transkriptionsmengen der Genkopien. Mit einer absoluten Transkriptmenge von durchschnittlich  $2,2 \times 10^6$  pro ng RNA, weist dieses Paralog die höchste gemessene Transkriptmenge unter idealen Wachstumsbedingungen auf und zeigt somit im Mittel gegenüber *groESL2* die 110-fache und gegenüber *groEL3* die 15-fache Transkriptmenge (Abbildung A10). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Unterschiede der differentiellen Expression der Paraloge. In der Analyse der transkriptionellen Aktivität der *groEL* Promotoren durch GFP-Fusion zeigten sich spezifische Expressionsmuster unter den zu testenden Bedingungen. Im Gegensatz zu *groEL2* zeigte *groEL1* nicht nur bei einem Temperaturanstieg, sondern auch bei den anderen getesteten Stressbedingungen (Starklicht und Stickstoffmangel) eine erhöhte Transkription. Ein rapider Anstieg des Transkriptpegels von *groEL1* ließ sich bereits nach 10 Minuten Hitzeinkubation beobachten (Abschnitt 18). Auch bei Starklicht-Bedingungen war ein rapider Anstieg der *groEL1* Expression zu beobachten, der jedoch im weiteren Zeitraum geringer wurde, während die transkriptionelle Regulation von *groEL3* in diesem Zeitraum anstieg.

In verschiedenen Spezies mit GroEL Paralogen wie Actinobakterien (Qamra et al. 2004), Proteobakterien (Lin 2009) und Cyanobakterien (Huq et al. 2010) wurden diverse Proteincluster nachgewiesen, die von der üblichen Tetradecamerstruktur des Chaperons abweichen. Um jedoch das volle Funktionsspektrums und somit die *Housekeeping*-Funktion des Chaperons übernehmen zu können, ist die Ausbildung eines Tetradecamers essentiell. Durch Tang et al. wurde gezeigt, dass das Volumen der Käfigstruktur des GroEL-Komplexes die Geschwindigkeit der Faltungsaktivität beeinflusst. Weiter wurde ein Zusammenhang mit dem Volumen und dem Substrat-Set des Chaperonins gezeigt (Tang 2006). Durch die Analysen der Protein-Protein-Interaktion der verschiedenen Chaperonin kodierenden *groEL*

---

Paraloge konnten Rückschlüsse auf die Oligomerisierung der Proteine gezogen werden. In dieser Untersuchung zeigten nur die Proteine des nativen Chaperonin Komplexes GroESL1 eine Bindung untereinander. Im Gegensatz zu dem GroESL2 Paralog wurde eine Interaktion der beiden in einem Operon kodierten Proteine (GroES1 und GroEL1) sowie eine homomere Interaktion der Proteine gezeigt.

Die essentielle Faltungsaktivität des durch *groESL1* kodierten Protein-Komplexes aus *C. fritschii* PCC 6912 wurde außerdem durch die funktionale Komplementierung von MGM100 bestätigt. Im Gegensatz dazu war *GroESL2* nicht in der Lage die Vitalität des Organismus aufrecht zu erhalten. Bestätigend haben Studien in dem gram-negativen Proteobakterium *Sinorhizobium meliloti*, welches wie *C. fritschii* PCC 6912 zur Stickstofffixierung fähig ist, gezeigt, dass auch hier nur *groESL1* für die essentielle *Housekeeping*-Funktion kodiert, während die weiteren Paraloge hauptsächlich als generelle Stressantwort des Bakteriums fungieren. Die Tatsache, dass alle in *S. meliloti* kodierten *groEL* Paraloge inaktiviert werden können (Bittner et al. 2007), jedoch keine Doppelmutante von *groEL1* und *groEL2* erzeugt werden kann (Ogawa and Long 1995), spricht für eine Hilfestellung von *groEL2* in diesem Organismus (Bittner et al. 2007). Diese Hypothese konnte für *C. fritschii* PCC 6912 im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet werden, da eine Erzeugung von Deletionsmutanten nicht möglich war. Nichtsdestotrotz konnte anhand der verschiedenen Untersuchungen und besonders des Komplementierungstest in *E. coli* eindeutig gezeigt, dass *groESL1* die essentielle *Housekeeping*-Funktion in *C. fritschii* PCC 6912 übernimmt.

Da *groESL2* in Zusammenhang mit *groES1* ebenfalls die Vitalität des *groESL* defizienten *E. coli* Stamms aufrecht erhalten kann, wird von einer Subfunktionalisierung dieses Paralogs ausgegangen, worauf im folgenden Abschnitt genauer eingegangen wird.

## 5.4.2 Subfunktionalisierung von *groESL2*

Die Subfunktionalisierung bezeichnet die Aufteilung der Funktion des Vorläufergens auf die paralogen Genkopien (Force 1999). Diese kann sich z. B. in der räumlichen Disposition der Genexpression (Bsp. *engrailed1a* und *engrailed1b* im Zebrafisch; (Force 1999)) oder in der Spezifikation des translatierten Proteins (Bsp. RNASE1 und RNASE1B von leaf-eating monkey; (Zhang et al. 2002)) spiegeln.

Es liegen verschiedene Studien bezüglich der *groEL* Diversifikation in Cyanobakterien vor (Kovács et al. 2010; Rajaram and Apte 2008). Nur wenige davon befassen sich mit den morphologisch komplexeren Cyanobakterien der Sektion IV und V. Cyanobakterien dieser Sektionen zeichnen sich unter anderem durch ihre Fähigkeit zur Ausbildung von Heterozysten unter Diazotrophie aus (Stanier 1977; Rippka 1978). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass alle Vertreter dieser Sektionen eine zweite bicistronische Genkopie von *groESL* kodieren (Dagan et al. 2013). Aufgrund fehlender Studien gibt es jedoch bis dato keine Informationen über dieses, in stigonematalen Cyanobakterien ubiquitär vorkommende, Paralog.

Die Tatsache, dass mindestens eine zweite bicistronische *groESL* Genkopie im Genom dieser Sektionen kodiert ist, während einfach organisierte Cyanobakterien der Klassen I bis III in der Regel nur für ein bi- und ein monocistronisches Paralog kodieren, legt einen Zusammenhang dieses Paralogs mit der Fähigkeit zur Ausbildung von Heterozysten unter diazotrophen Bedingungen nahe. Wie bereits in den vorherigen Abschnitten beschrieben liegen bei *C. fritschii* PCC 6912 unter diesen Bedingungen Unterschiede in der transkriptionellen Regulation vor. In einer vorhergegangenen qRT-PCR wurde eine signifikante Erhöhung des Transkriptionslevels von *groESL2* gezeigt. Das Transkriptionslevel von *groEL2* steigt über einen Testzeitraum von 24 h kontinuierlich an und ist im Gegensatz zu den Transkriptlevel-Änderungen der beiden anderen Paraloge zu allen getesteten Zeitpunkten signifikant erhöht. Es ist jedoch zu bemerken, dass die Gesamt-Transkriptmenge von *groEL2*, aufgrund der geringen basalen Expression, jedoch immer noch geringer ist als die des Paralogs *groEL1*. Auch in anderen cyanobakteriellen Spezies ist die Transkriptionsinduktion einiger *groEL* Paraloge unter diazotrophen Bedingungen signifikant erhöht (Rajaram and Apte 2008). Dies spricht für eine Subfunktionalisierung im Zuge einer Spezifikation auf eine bestimmte Stress-Bedingung. In dem stickstofffixierenden Bakterium *Sinorhizobium meliloti* wurde weiter gezeigt, dass nur eines der *groEL* Paraloge essentiell mit der Expression, der für die Nodulation benötigten Gene, in Zusammenhang steht (Ogawa and Long 1995).

Die Ergebnisse, des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Protein-Protein-Interaktionstests (Abschnitt 4.2), weisen ebenfalls auf eine Subfunktionalisierung von *groESL2* hin. Die mangelnde Proteinbindung der im Operon regulierten Chaperonin-Untereinheiten GroES2 und GroEL2 zeigt eine strukturelle Diversifikation der beiden bicistronischen GroESL Paraloge. GroEL2 zeigt eine eindeutige Ko-Chaperonin Spezifität (zu GroES1) die für GroEL1 nicht gezeigt wurde. Die Funktionalität dieses Chaperonin Komplexes, gebildet aus GroEL2 und GroES1, wurde durch positive Komplementierung von MGM100 gezeigt (Abschnitt 4.3). Somit konnte eine in *Anabaena* gezeigte GroES-Unabhängigkeit der Faltungsaktivität von GroEL (Potnis et al. 2016) bei GroEL2 aus *C. fritschii* PCC 6912 ausgeschlossen werden.

Die nachgewiesene fehlende Interaktion von GroES2 und GroEL2, und die damit einhergehende Dysfunktion des nativen GroESL2 Protein-Komplexes, zeigen eindeutig eine Differenzierung dieser Genkopien. Über eine Protein-Aktivität von GroES2 kann hier keine Aussage getroffen werden. Es kann nicht gezeigt werden ob dieses Protein eine differentielle (Ko-Chaperonin abweichende) Funktion *in vivo* übernimmt. Eine weitere Möglichkeit ist die bereits erwähnte post-transkriptionelle Inhibierung, die aufgrund der verschiedenen Analysen vermutet werden kann. Auch eine Fixierung dieses Paralogs im Genom von *C. fritschii* PCC 6912 aufgrund eines *Dosage* Effekts ist denkbar.

Das fehlende CIRCE-Element *upstream* von *groESL2* lässt auf eine regulatorische Differenzierung dieses Paralogs schließen. Die Ergebnisse des Protein-Protein-Interaktionstests und der Komplementierungsanalysen weisen weiter auf ein dysfunktionales *groESL2* Operon hin. Durch transkriptionelle Analysen der im Operon enthaltenen Gene wurde jedoch gezeigt, dass die Expressionslevel sich konform zu denen des nativen Operons verhalten. Die Dysfunktion des *groESL2* Komplexes muss sich somit auf Protein-Ebene abspielen. Durch weitere Untersuchungen konnte eine Faltungsaktivität von GroEL2 und ein diverses, reguliertes Expressionsmuster unter Stressbedingungen gezeigt werden. Somit kann eindeutig von einer Subfunktionalisierung dieses Paralogs ausgegangen werden. Da alle multizellulären Cyanobakterien mit Fähigkeit zur Zelldifferenzierung, im Gegensatz zur Mehrheit der anderen Sektion, eine zweite bicistronische *groEL* Kopie im Genom tragen, ist es wahrscheinlich, dass diese in Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Ausbildung von Heterocysten steht. Dafür spricht auch, dass *groEL2* in den qRT-PCR-Analysen eine erhöhte Expression unter diazotrophen Bedingungen gezeigt hat. Auch ein Zusammenhang zwischen der Funktion von GroEL2 und der Temperaturtoleranz des termophilen *Clorogloeopsis fritschii* ist nahe liegend.

Besonders bemerkenswert ist hierbei die Tatsache, dass die Assemblierung von dem Chaperon-Komplex bestehend auf GroEL1 Proteinen nur bei herabgesetzten Temperaturen (25°C) möglich war. Im Gegensatz dazu konnte eine Interaktion zwischen den GroEL2 Proteinen bei normalen Test-Bedingungen (30°C) gezeigt. Auch die Faltungsaktivität dieses Paralogs konnte, zumindest in Kombination mit dem Ko-Chaperonin GroES1, bei "normaler" Temperatur durch den Komplementierungstest gezeigt werden. Die gezeigte Subfunktionalisierung kann sich somit beispielsweise in einer Substrat-Spezifität des Chaperons niederschlagen, die besonders zu verschiedenen Bedingungen wie Diazotrophie oder Temperaturschwankungen in der Umgebung des Bakteriums aktiv ist. Eine solche Substrat-Spezifität wurde beispielsweise in GroEL Paralogen in *Myxococcus xanthus* gezeigt (Wang et al. 2013).

### 5.4.3 Putative Neofunktionalisierung von *groEL3*

Eine Neofunktionalisierung einer Gen-Kopie definiert den Erwerb einer Funktion, welche von der des duplizierten Gens abweicht (Ohno 1970). Der Prozess der Neofunktionalisierung von duplizierten Genen ist evolutionär von großer Bedeutung und ein wichtiger Mechanismus zur Erlangung neuer Funktionen und somit zur Adaption an verschiedene Umwelteinflüsse. Rastogi und Liberles (2005) gehen davon aus, dass die Subfunktionalisierung ein wichtiger Zwischenschritt im Laufe der Evolution hin zur Neofunktionalisierung eines Paralogs ist. Die Anzahl der Aminosäure-Substitutionen zwischen dem duplizierten Gen und der Gen-Kopie mit neuer Funktion kann stark variieren. Im Aminosäuresequenz-Vergleich von GroEL3 mit den anderen GroEL Paralogen ist mit einer Identität von ca 65,4% die höchste sequenzielle Abweichung zwischen den Paralogen vorhanden, was bereits auf eine Divergenz dieses Paralogs hinweisen könnte.

Auch in den *in silico* Studien der regulatorischen Elemente zeigen sich deutliche Unterschiede, besonders zwischen *groEL2* und *groEL3* (Abbildung A9). Diese Differenzen spiegeln sich auch in der regulatorischen Aktivität *in vivo* wieder. Sowohl in den qRT-PCR-Analysen (Abschnitt 2.4.1), als auch in den regulatorischen Transkriptionsanalysen durch GFP-Fusion (Abschnitt 4.3) wurde ein Anstieg des Transkriptionslevels von *groEL3* bei Starklicht-Inkubation nachgewiesen. Im Verhältnis zu beiden operonalen *groEL* Paralogen zeigt der Promotor von *groEL3* eine signifikant erhöhte regulatorische Aktivität in dieser Bedingung. Bereits nach 10-minütiger Hitze-Inkubation konnte eine stark erhöhte transkriptionelle Aktivität beobachtet werden. Diese stieg im Vergleich zu *groEL2* über den Zeitraum weiter an. Diese signifikante Korrelation der monocistronischen GroEL3 Genkopie zeigt sich nicht nur gegenüber der Behandlung mit Lichtstress. Auch bei Hitzestress ist das

Transkriptionslevel von *groEL3*, wie bei den anderen *groEL* Genkopien, signifikant erhöht. Jedoch ist der Anstieg des monocistronischen Paralogs, gegenüber der Transkriptionslevel-Änderung der anderen *groEL* Paraloge, bei selbiger Stressbedingung geringer. Damit steht das Expressionsmuster des monocistronischen *groEL* Paralogs aus *C. fritschii* PCC 6912 im Einklang mit Expressionsstudien von *groEL* Paralogen in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Lehel et al. 1993; Kovács et al. 2001; Kuchanny-Ardigo 2003). Auch hier wurde bei Hitze-Inkubation eine Induktion der Expression der *groEL* Paraloge gezeigt, die sich jedoch weniger stark in der monocistronischen Genkopie auswirkte.

Weitere Unterschiede der drei GroEL Paraloge aus *C. fritschii* PCC 6912 zeigen sich in der ausgebildeten Protein-Struktur. Anders als in dem Sektion I zugehörigen Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Huq et al. 2010) konnte bei dem monocistronischen GroEL aus *C. fritschii* PCC 6912 weder hetero- noch homomere Protein-Protein-Interaktion nachgewiesen werden. In den Komplementierungstests wurde die mangelnde Fähigkeit zur Ausbildung eines funktionalen Chaperon Komplexes weiter bestätigt.

Trotz der fehlenden Fähigkeit zur Ausbildung der Chaperonin-typischen Tetradekamerstruktur wird jedoch nicht von einer Nonfunktionalisierung, sondern vielmehr von einer Neofunktionalisierung von *groEL3* ausgegangen. Die spezifische Expressionslevel-Erhöhung unter Starklicht-Bedingungen, sowie der hohe Konservierungsgrad des monocistronischen *groEL* Paralogs innerhalb des Cyanobakterien-Phylums weisen auf eine spezifische Funktion von *groEL3* hin. Die Aminosäuren-Analyse zeigt am C-Terminus der Proteinsequenz der monocistronischen GroEL Kopie ein spezifisches GGM-Motiv, welches ebenfalls auf eine spezifische Funktion dieses Paralogs hinweist.

Wie bereits erwähnt, weist die gezeigte Erhöhung des *groEL3* Transkriptionslevels durch Starklicht-Bedingungen auf einen Zusammenhang mit der photosynthetischen Aktivität der Cyanobakterien hin. Ein weiterer Bereich der Neofunktionalisierung dieses *groEL* Paralogs könnte mit der Temperatur-Toleranz des thermophilen *C. fritschii* PCC 6912 zusammenhängen. Im Aminosäuresequenz-Vergleich der drei GroEL Paraloge wurde nur in der monocistronischen Genkopie das GGM-Motiv im C-terminalen Bereich gefunden. Dieses Motiv wurde in verschiedenen Organismen der Phyla Actinobakterien, Chlamydien oder Cyanobakterien gefunden (Brocchieri 2000; Lund 2009; Karlin and Brocchieri 2000). Interessanterweise tragen häufig nur die monocistronischen GroEL Paraloge diese repetitiven Glycin und Methionin Sequenzen, dessen Funktion nicht eindeutig geklärt ist. In aktuellen Studien in dem hyperthermophilen *Thermococcus kodakarensis*, in dem ebenfalls nur eines der beiden vorkommenden Chaperonin Paraloge (CkpA) das GGM-Motiv trägt, wurde ein

---

Zusammenhang zwischen der Temperatur-Adaption des Archaeons und der Chaperonin Kopie gezeigt, welche das GGM-Motiv trägt. Durch Modifizierung dieses Motivs wurde die Kälte-Toleranz des Organismus herabgesetzt (Gao et al. 2015).

Anhand der hier durchgeführten Analysen kann über die Auswirkung der putativen Neofunktionalisierung dieses Paralogs nur spekuliert werden. Aufgrund der fehlenden Ausbildung der Tetradecamer-Struktur von GroEL3 ist eine Faltungsaktivität dieses Paralogs jedoch auszuschließen. Huq et al. beobachteten eine Erhöhung der ATPase-Aktivität der im Operon regulierten Paraloge durch das monocistronische *groEL* (Huq et al. 2010). Diese Funktion ist für GroEL3 aus *C. fritschii* PCC 6912 jedoch unwahrscheinlich, da diese Aktivität mit einer Oligomerisierung des Paralogs verbunden ist. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass die Funktion von GroEL3 von der üblichen Faltungsaktivität abweicht und sich möglicherweise in einer sogenannten *holdase* Funktion ausprägt. Diese Funktion beschreibt die Verhinderung von Aggregaten von Substratproteinen durch Bindung ohne direkte Faltungsaktivität und wurde bereits für andere Chaperone wie DnaJ und Hsp33 gezeigt (Hoffmann et al. 2003). Bezugnehmend auf Studien in anderen Spezies wird ausserdem, zum einen ein Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Phototrophie der Cyanobakterien (Asadulghani et al. 2003), und zum anderen mit der Fähigkeit zur Adaption an verschiedene Temperaturbedingungen (Gao et al. 2015) postuliert.

## 5.5 Fazit

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben eine differentielle Entwicklung der *groESL* Paraloge in dem Cyanobakterium *C. fritschii* PCC 6912 gezeigt, die sich sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene auswirkt. Aufgrund von Genomanalysen von anderen zelldifferenzierenden Cyanobakterien kann durch die Konservierung der Paraloge außerdem ein Einfluss dieser auf die Fähigkeit zur Heterocysten-Formation, sowie die Adaption an verschiedene Temperatur-Optima vermutet werden.

Die differentielle Expression der Genkopien zu Normal- und Stress-Bedingungen zeigt eine Spezifikation der Paraloge, wie es im Fall einer Subfunktionalisierung üblich ist. Die unterschiedliche Fähigkeit zur Chaperon Assemblierung sowie die mangelnde Chaperon-Aktivität von GroEL3 zeigen eine weitere Spezialisierung dieses Paralogs. Eine Neofunktionalisierung kann angenommen werden, auch wenn die Funktion nicht geklärt ist. Um diese Hypothesen weiter zu bestätigen wären Folgeversuche zur Funktion des Paralogs von Bedeutung. Da die Redundanz der Paraloge nur in dem Komplementierungstest von *E. coli* untersucht werden konnte, konnten hier keine weiteren Funktionen als die Faltungsaktivität analysiert werden. Durch die Erzeugung von cyanobakteriellen *groEL* Deletionsmutanten kann die Funktion der einzelnen Genkopien in Bezug auf die Adaption an Stressbedingungen, Einfluss auf Wachstumsrate und Zelldifferenzierung besser studiert werden. Mögliche Methoden zur Etablierung solcher *C. fritschii* PCC 6912 Stämme wurden bereits in Abschnitt 5.3 aufgeführt.

Durch die Tatsache, dass die grundsätzliche Chaperonin-Aktivität von *groEL2* in *C. fritschii* PCC 6912 konserviert ist, es aber Unterschiede in der Expression und Chaperonin-Assemblierung vorliegen, wird eine Subfunktionalisierung dieses Paralog gezeigt. Aufgrund der Abwesenheit des CIRCE-Elements und der K-Box im *upstream*-Bereich dieser Genkopie wird hier von einer regulatorischen Subfunktionalisierung ausgegangen. Um die differentielle Regulierung dieses Paralogs genauer zu studieren, kann beispielsweise eine Analyse durch das sogenannte 5-Prime-RACE (Zhang and Frohman 1997) durchgeführt werden. Durch diese Methode ist es möglich regulatorische RNA zu identifizieren. Auch in Hinblick auf den *in silico* vorhergesagten alternativen TSS von *groEL2* wäre diese Untersuchung besonders unter nativen und Stress-Bedingungen aufschlussreich.

---

Aufgrund verschiedener Tatsachen sind ergänzend Untersuchungen zur Analyse einer posttranskriptionalen Regulation oder Abbau von GroES1 interessant. Ein Punkt hierbei ist, dass angenommen wird, dass gewöhnlich *groEL* in fortlaufenden Duplikationen beibehalten wird, während häufiger der Verlust von *groES* vorliegt. Ein weiterer Aspekt ist außerdem die hier gezeigte Dysfunktion von GroES2.

Eine Identifikation von Substrat-Proteinen der aktiven Chaperonin Komplexe gibt Aufschluss über einen möglichen Unterschied zwischen den Interaktionspartnern von GroEL1 und GroEL2. Da nur in Cyanobakterien mit der Fähigkeit zur Heterocysten-Formation die zweite operonale Genkopie kodiert ist, ist besonders die Identifikation der Substrate unter diazotrophen Bedingungen interessant. Zur Isolation der Substrate eignet sich beispielsweise die Co-Immunopräzipitation. Die Chaperon-Komplexe können über terminale Histidin-Markierung (Kerner et al. 2005) oder spezifische Antikörper an einer Matrix gebunden werden und die interagierenden Substrate durch ATP-Depletion fixiert werden. Anschließend kann eine Identifikation der Protein-Isolate durch Massenspektrometrie erfolgen.

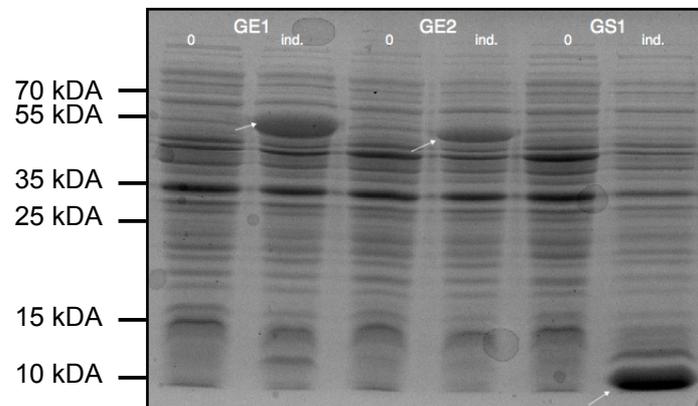
Die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse geben Einblicke in die Entwicklung der, durch Genduplikation entstandenen, Chaperonin Paraloge in dem Cyanobakterium *C. fritschii* PCC 6912. Anhand der oben beschriebenen Analysen können weitere Aussagen über die genaue Funktion und Spezifikation der einzelnen Paraloge getroffen werden.

## 6 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Anhyd	Anhydrotetracyclin
Ara	Arabinose
bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
ca	circa
Cam	Chloramphenicol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Erythromycin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
Glu	Glukose
kDA	Kilo-Dalton
Km	Kanamycin
LB	<i>lysogeny broth</i> (Bakterienkulturmedium)
min	Minute
mm	Milliliter
mM	Millimolar
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCC	<i>Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Sm	Streptomycin
Sp	Spectinomycin
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethyldiamin
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

## 7 Anhang

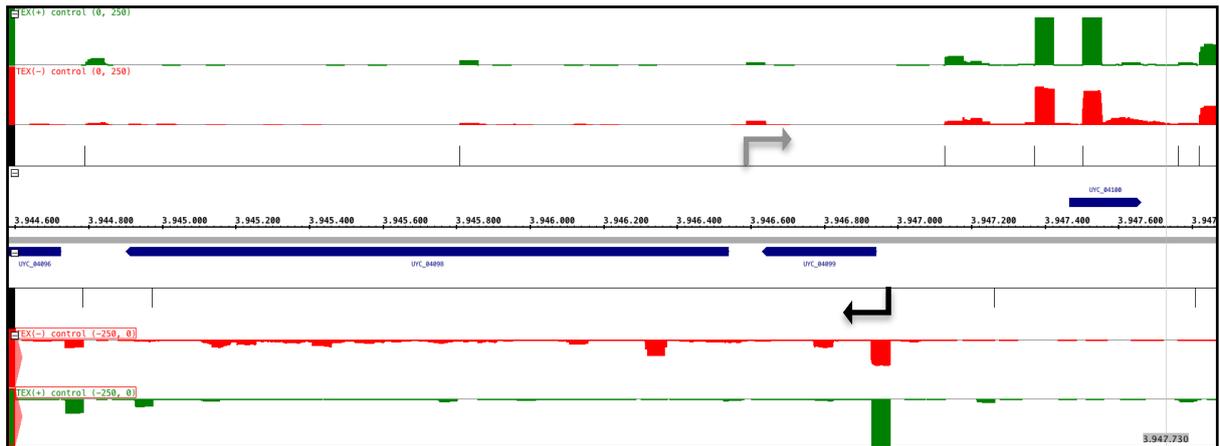
### 7.1 Abbildungen



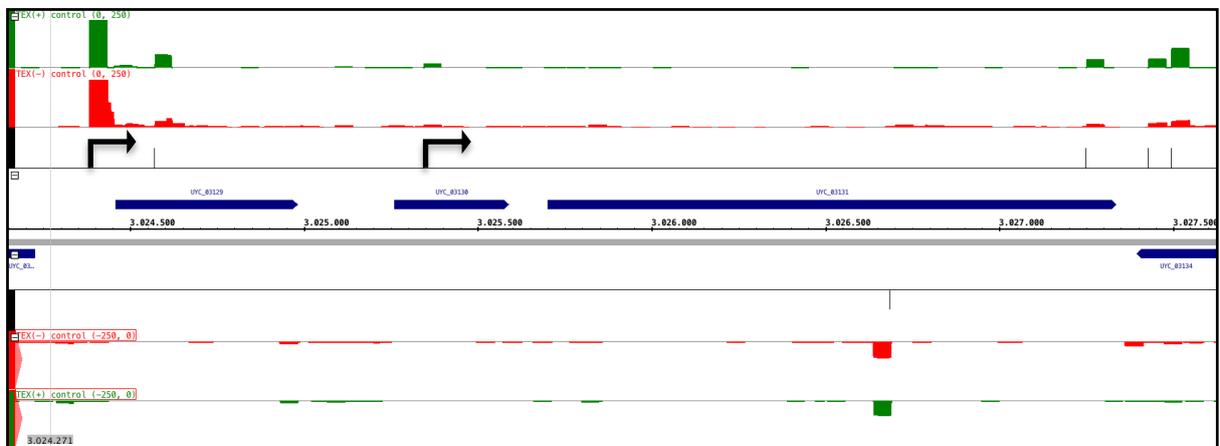
**Abb. A1:** Coomassie Gel zur Kontrolle der Expression der GroEL Paraloge (pASK-IBA3)

Zur Größen-Auftrennung der Proteine aus den transgenen XL1 blue Stämmen wurde ein 14% iges SDS-Gel und ein Größenstandart mit definiertem Bandenmuster verwendet. Pro Probe wurden 40µl Gesamt-Proteinextrakt aufgetragen.

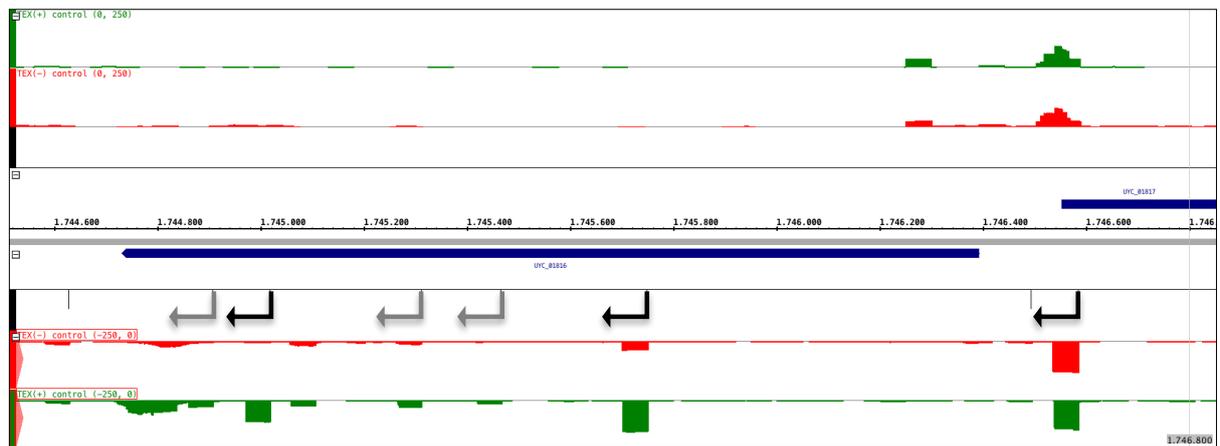
Zur Verifizierung der heterologen Protein-Expression der *groESL* Paraloge GroESL1, GroESL2 und GroES1 wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page) durchgeführt. Hierfür wurden Proteine der Plasmid tragenden *E. coli* Stämme isoliert. Die Expression der cyanobakteriellen *groESL* Paraloge in *E. coli* erfolgte durch den durch Anhydrotetracyclin induzierbaren *ptet* Promotor. Hierfür wurde je pBSK-IBA-Expressionskonstrukt eine 5 ml Über-Nacht-Kultur angelegt, in welcher am nächsten Tag durch die Zugabe von 2% Anhydrotetracyclin die GroEL-Expression induziert wurde. Nach dreistündiger Schüttel-Inkubation (180 rpm, 37°) wurde die OD 600 der Kulturen bestimmt und 1 ml Kultur pelletiert (13.000 x g, 2 min). Entsprechend der optischen Dichte der Kulturen wurde das Pellet in dem spezifischen Volumen H<sub>2</sub>O resuspendiert (Bsp: OD 600 = 1,23 --> Pellet wurde in 123 µl H<sub>2</sub>O gelöst). Die Proben wurden mit Lämmli-Puffer versetzt und nach der Hitze-Inkubation (95 °C, 10 min) wurden je Probe 40 µl Zellsuspensat und ein Größenstandard (PageRuler™Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas) für die SDS-Page verwendet.



A



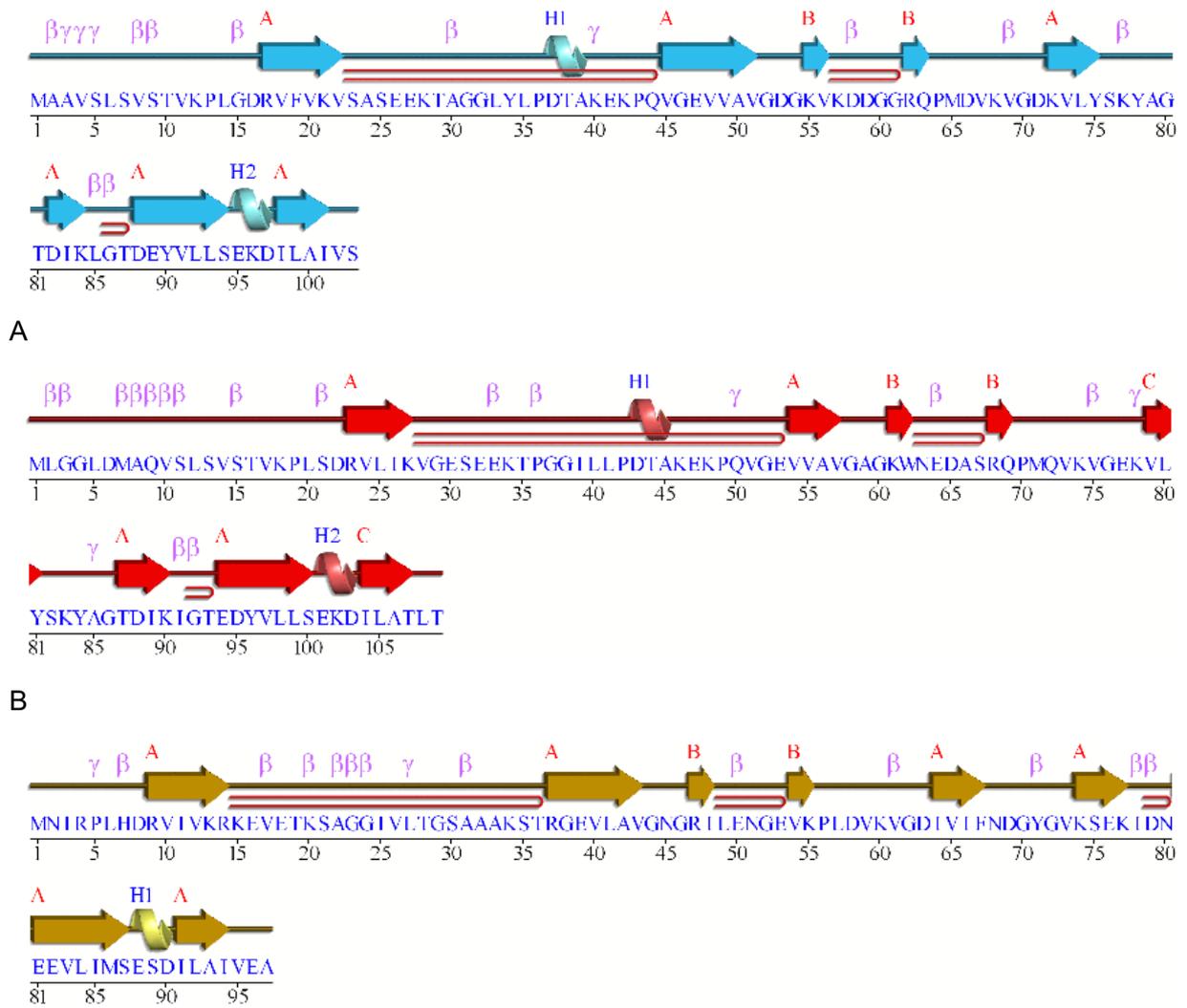
B



C

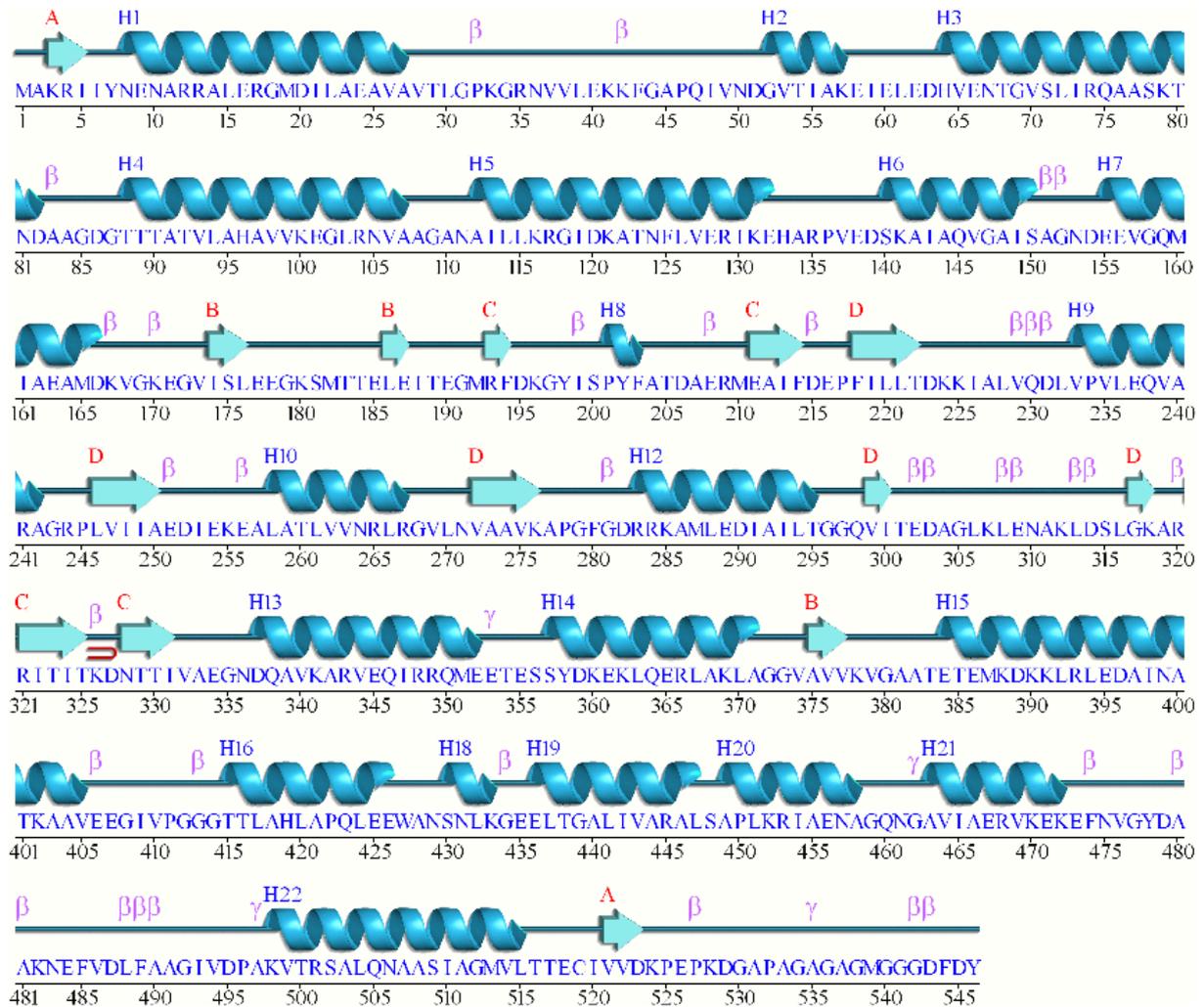
**Abb. A2:** Vorhergesagte Transkriptionsstartpunkte (TSS) der drei *groEL* Paraloge in *C. fritschii* PCC 6912

Die Vorhersage der TSS beruht auf dem Programm TSSpreditor und die *in silico* Analysen wurden von Robin Koch im Rahmen seiner Dissertation (Bioinformatische Analysen der transkriptionellen Regulation morphologischer Variationen in Cyanobakterien der Ordnung Stigonematales) durchgeführt.



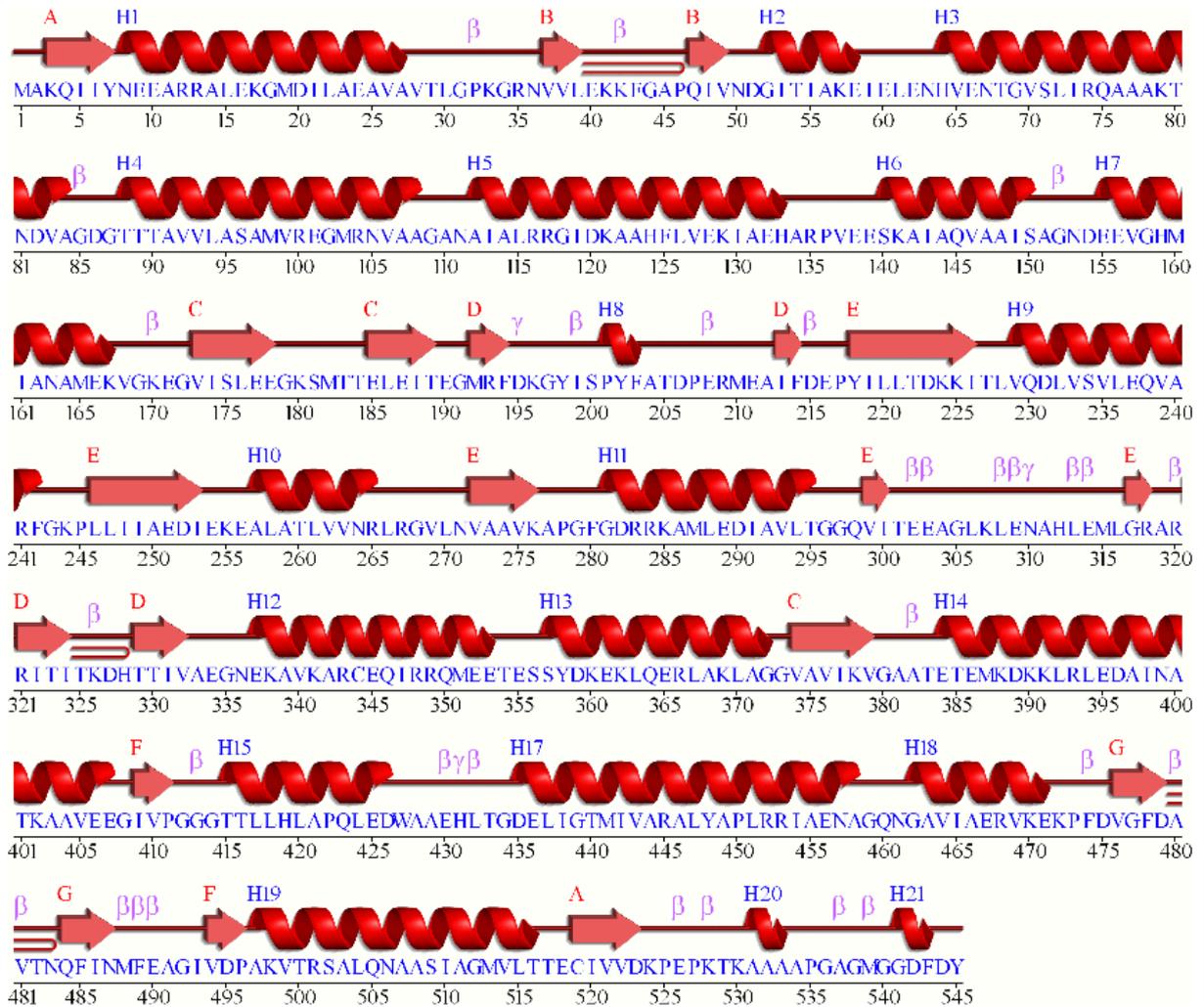
**Abb. A3:** Sekundärstruktur der GroES Paraloge

Die Abbildung zeigt die durch PDBsum simulierte Sekundärstruktur von GroES Paraloge, basierend auf der durch I Tasser (Roy 2010) vorhergesagten pdb-Datei. (A) GroES1 aus *C. fritschii* PCC 6912 (B) GroES2 aus *C. fritschii* PCC6912 (C) GroES aus *E. coli* K12



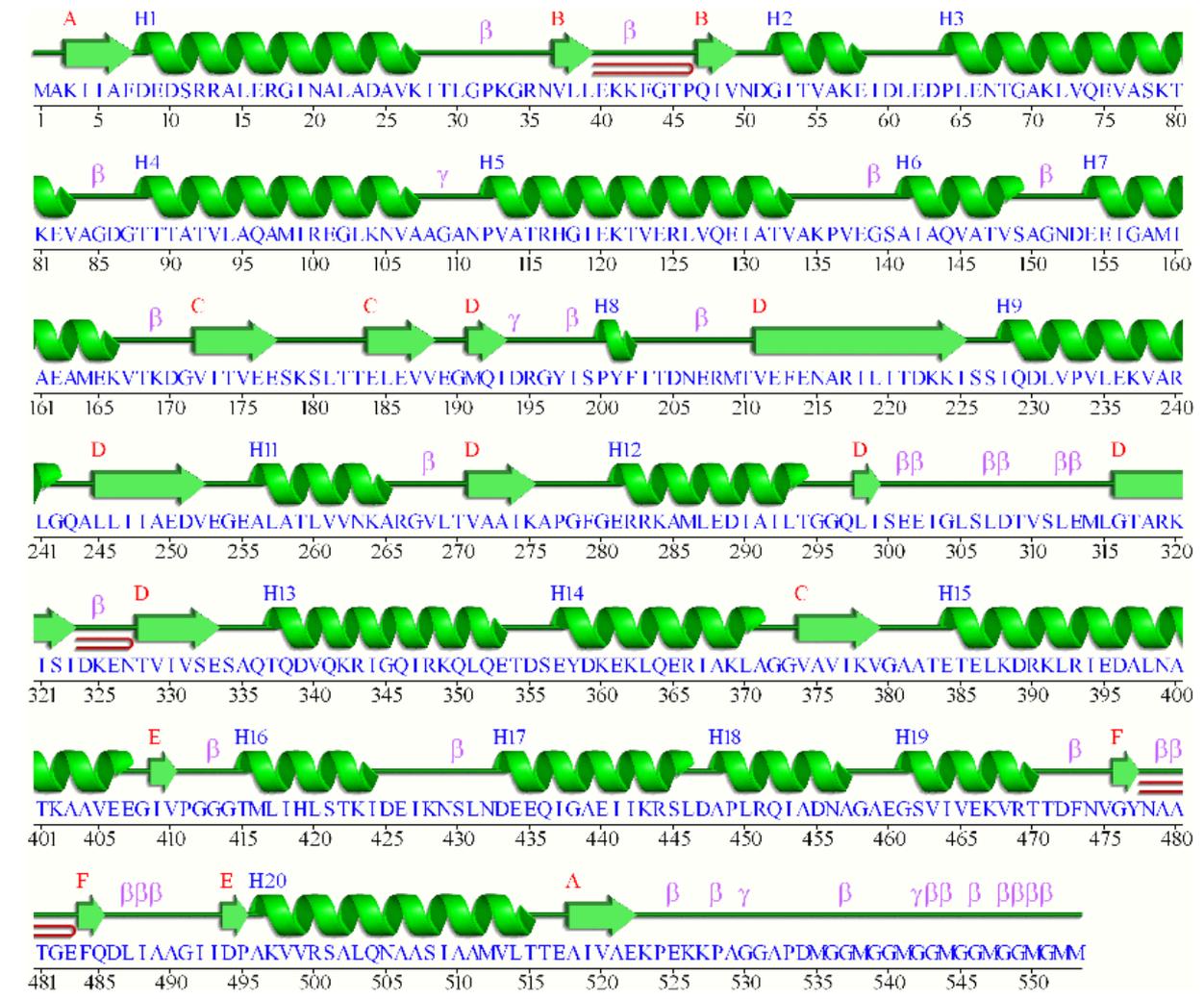
**Abb. A4:** Sekundärstruktur des GroEL1 Paralogs aus *C. fritschii* PCC 6912

Die Abbildung zeigt die durch PDBsum simulierte Sekundärstruktur von GroEL1, basierend auf der durch I Tasser (Roy 2010) vorhergesagten pdb-Datei.



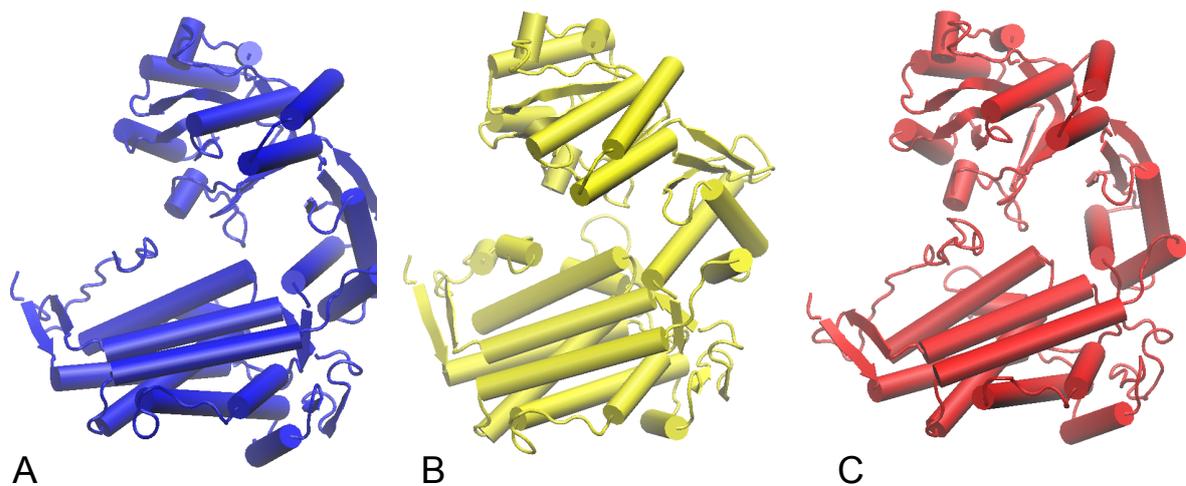
**Abb. A5:** Sekundärstruktur des GroEL2 Paralogs aus *C. fritschii* PCC 6912

Die Abbildung zeigt die durch PDBsum simulierte Sekundärstruktur von GroEL2, basierend auf der durch I Tasser (Roy 2010) vorhergesagten pdb-Datei.



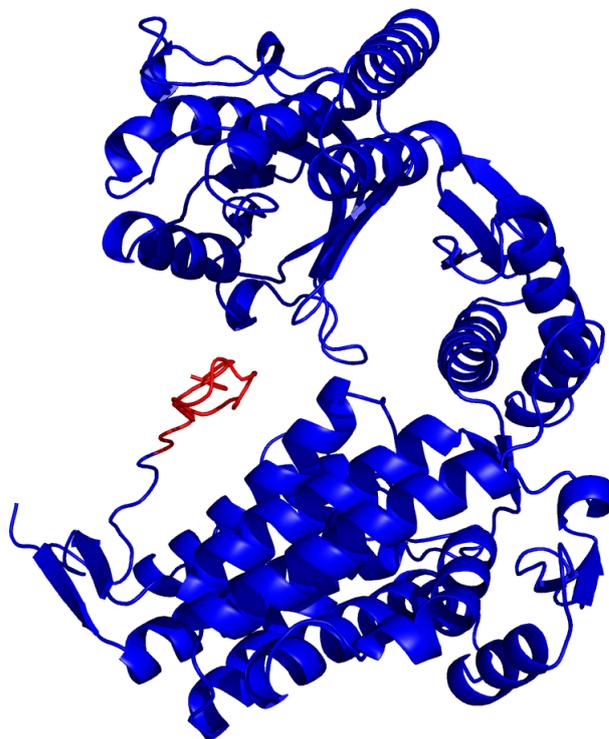
**Abb. A6:** Sekundärstruktur des GroEL3 Paralogs aus *C. fritschii* PCC 6912

Die Abbildung zeigt die durch PDBsum simulierte Sekundärstruktur von GroEL3, basierend auf der durch I Tasser (Roy 2010) vorhergesagten pdb-Datei.



**Abb. A7:** Tertiärstruktur der GroEL Paraloge aus *C. fritschii* PCC 6912 (J. Ilhan)

Die in der Abbildung dargestellte Modellierung der Tertiärstruktur der drei GroEL Paraloge aus *C. fritschii* PCC 6912 wurde über I-Tasser (Roy 2010) vorgenommen.



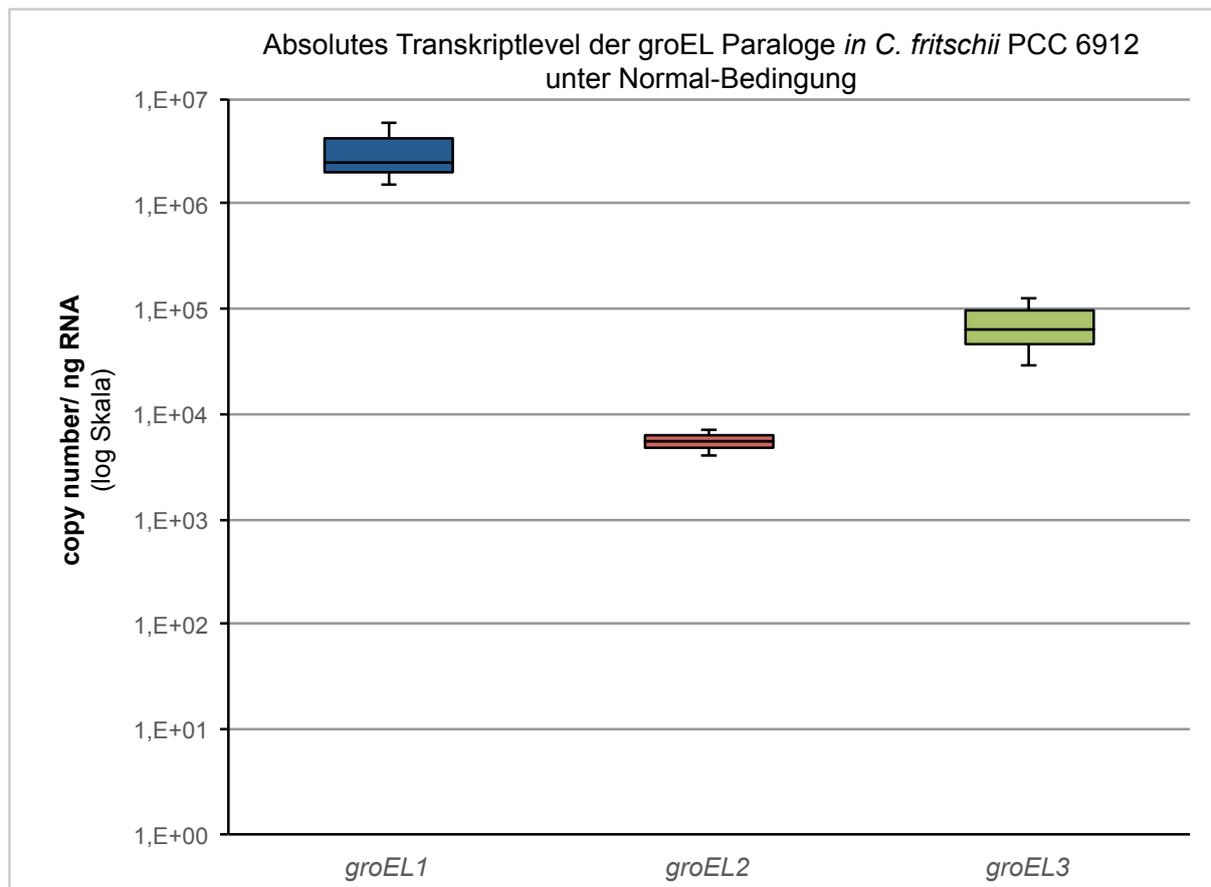
**Abb. A8:** Tertiärstruktur von GroEL3 aus *C. fritschii* PCC 6912

Die in der Abbildung dargestellte Modellierung der Tertiärstruktur von GroEL3 aus *C. fritschii* PCC 6912 wurde über I-Tasser (Roy 2010) vorgenommen. Der rot dargestellte Bereich markiert das GGM-Motiv im C-terminalen Bereich des monocistronischen GroEL Paralogs.



Die Abbildung zeigt die identifizierten cis-regulatorischen Elemente der *groEL* Paraloge in *C. fritschii* PCC 6912. Gezeigt werden die Regionen 100 Basenpaare *upstream* des Startcodons des jeweiligen *groESL* Paralogs. Das palindromische CIRCE-Element und die K-Box wurden, soweit vorhanden, farblich dargestellt. Weitere, bereits bekannte cis-regulatorische Elemente für die *groEL* Gene in Cyanobakterien (z.B. M-Box oder L-Box), wurden nicht detektiert.

**Abb. A9:** Regulatorische Elemente der *groEL* Paraloge in *C. fritschii* PCC 6912



**Abb. A10:** Absolute Transkriptmenge der *groEL* Paraloge in *C. fritschii* PCC 6912

Die absoluten Transkriptpegel der *groEL* Paraloge wurden unter idealen Wachstumsbedingungen über qRT-PCR erfasst. Gezeigt sind die Verteilungen der absoluten Transkriptlevel in logarithmischer Auftragung. Jedes der Boxplot-Diagramme repräsentiert den Median der Wertegruppe sowie die Quartile und Ausreißer ( $n \geq 6$ ).

## 7.2 Tabellen

Tab. A1: Verwendete *Escherichia coli* Stämme

Name	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> XL1 blue	endA1 gyrA96(nal <sup>R</sup> ) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )	Stratagene
<i>E. coli</i> HB101	F <sup>-</sup> mcrB mrr hsdS20(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(Sm <sup>R</sup> ) glnV44 λ <sup>-</sup>	Boyer, H.W. and Roulland-Dussoix, D. (1969) J. Mol. Biol. 41, 459.
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), λ <sup>-</sup>	Meselson M. and Yuan R. (1968) Nature 217:1110
<i>E. coli</i> BL21	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) [malB <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> )	Stratagene
<i>E. coli</i> BHT101	F <sup>-</sup> , cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (Str r), hsdR2, mcrA1, mcrB1	Palyi, I., Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 1993;63(4):263-9.
<i>E. coli</i> MGM100	λ <sup>-</sup> , rph-1, araBADp-groE, zje-2335::kan	McLennan N, Masters M. Nature. 1998;392:139.

Tab. A2: Verwendete Antibiotika

Name	Abkürzung	Konzentration
Ampicilin	Amp	100 µg/ml
Chloramphenicol	Cam	25 µg/ml
Kanamycin	Km	15 µg/ml und 50 µg/ml
Spectinomycin	Sp	25 µg/ml und 50 µg/ml
Streptomycin	Sm	2,5 µg/ml und 10 µg/ml

Tab. A3: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Name	Zusammensetzung
BG11-Medium	17,65 mM NaNO <sub>3</sub> , 0,18 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O, 0,30 mM MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0,25 mM CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 0,03 mM C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> , 0,003mM EDTA, 0,38 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 0,03 mM C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeNyO <sub>7</sub>
BG11 <sub>0</sub> -Medium	BG11-Medium ohne NaNO <sub>3</sub>
LB-Medium	1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Trypton, 0,5%(w/v) Hefe Extrakt
Coomassie	7,5% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) Methanol, 1 Tablette Phast Gel BlueR-350
DNA-Ladepuffer	0,4% (w/v) Bromphenolblau, 0,4%(w/v) Xylencyanol, 1mM EDTA (pH8,0), 20% (v/v) Ficoll
50x TAE-Puffer	2M Tris, 1M Essigsäure, 50mM EDTA (pH 8,5)
5x Tris-Gyclin-Laufpuffer	125 mM Tris, 960 mM Glycilm, 0,5% (w/v) SDS
Läemmlipuffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-Mecaptoethanol, 10% (v/v) Glycerin, 0,005% (w/v) Bromphenolblau
RNA-Ladepuffer	Bromphenolblau 0,16 % (w/v), EDTA 4mM(pH 8,0), Glycerin, 20% (v/v), Formaldehyd 37 % (v/v) 7,2%, Formamid 30,1 % (v/v), 4x MOPS, H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>
10 x MOPS	MOPS 200 mM (pH 7,0), NaAc 50 mM (pH 6,5), EDTA 10 mM (pH 8,0)

Tab. A4: Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Resistenz	Quelle
pRL25c	cargo plasmid	Km/Nm	(Wolk et al. 1988)
pRL25c_GFP	cargo plasmid with gfp	Km/Nm	Diese Arbeit
pRL25c_pGroEL1:GFP	C-terminal pGroEL1:GFP fusion	Km/Nm	Diese Arbeit
pRL25c_pGroEL2:GFP	C-terminal pGroEL2:GFP fusion	Km/Nm	Diese Arbeit
pRL25c_pGroEL3:GFP	C-terminal pGroEL3:GFP fusion	Km/Nm	Diese Arbeit
pASK-IBA3 plus	expression plasmid	Ampicilin	BioTAGnology
pASK-IBA3_sp	expression plasmid	Sp/Sm	Diese Arbeit
pASK-IBA3 plus_GroESL1	expression of GroESL1	Ampicilin	Diese Arbeit
pASK-IBA3 plus_GroESL2	expression of GroESL2	Ampicilin	Diese Arbeit
pASK-IBA3_sp_GroES1	expression of GroES1	Sp/Sm	Diese Arbeit
pKNT25	expression of N-terminal T25 fusion	Kanamycin	Euromedex
pKT25	expression of C-terminal T25 fusion	Kanamycin	Euromedex
pUT18	expression of N-terminal T18 fusion	Ampicilin	Euromedex
pUT18C	expression of C-terminal T18 fusion	Ampicilin	Euromedex
pKNT25_GroEL1	N-terminal GroEL1:T25 fusion	Kanamycin	Diese Arbeit
pKNT25_GroEL2	N-terminal GroEL2:T25 fusion	Kanamycin	Diese Arbeit
pKNT25_GroEL3	N-terminal GroEL3:T25 fusion	Kanamycin	Diese Arbeit
pKNT25_GroES1	N-terminal GroES1:T25 fusion	Kanamycin	Diese Arbeit
pKNT25_GroES2	N-terminal GroES2:T25 fusion	Kanamycin	Diese Arbeit
pKT25_GroEL1	C-terminal GroEL1:T25 fusion	Kanamycin	Diese Arbeit
pKT25_GroEL2	C-terminal GroEL2:T25 fusion	Kanamycin	Diese Arbeit
pKT25_GroEL3	C-terminal GroEL3:T25 fusion	Kanamycin	Diese Arbeit
pKT25_GroES1	C-terminal GroES1:T25 fusion	Kanamycin	Diese Arbeit
pKT25_GroES2	C-terminal GroES2:T25 fusion	Kanamycin	Diese Arbeit
pUT18_GroEL1	N-terminal GroEL1:T18 fusion	Ampicilin	Diese Arbeit
pUT18_GroEL2	N-terminal GroEL2:T18 fusion	Ampicilin	Diese Arbeit
pUT18_GroEL3	N-terminal GroEL3:T18 fusion	Ampicilin	Diese Arbeit
pUT18_GroES1	N-terminal GroES1:T18 fusion	Ampicilin	Diese Arbeit
pUT18_GroES2	N-terminal GroES2:T18 fusion	Ampicilin	Diese Arbeit
pUT18C_GroEL1	C-terminal GroEL1:T18 fusion	Ampicilin	Diese Arbeit
pUT18C_GroEL2	C-terminal GroEL2:T18 fusion	Ampicilin	Diese Arbeit
pUT18C_GroEL3	C-terminal GroEL3:T18 fusion	Ampicilin	Diese Arbeit
pUT18C_GroES1	C-terminal GroES1:T18 fusion	Ampicilin	Diese Arbeit
pUT18C_GroES2	C-terminal GroES2:T18 fusion	Ampicilin	Diese Arbeit
pBSK(+)	clonig plasmid	Ampicilin	Stratagene
pBSK(+)_6912GroEL1KO	clonig plasmid	Amp/Sp/Sm	Diese Arbeit
pBSK(+)_6912GroEL2KO	clonig plasmid	Amp/Sp/Sm	Diese Arbeit
pBSK(+)_6912GroEL3KO	clonig plasmid	Amp/Sp/Sm	Diese Arbeit
pRL271	cargo plasmid	Km/Em/Sp/Sm	(Wolk et al. 1988)
pRL271_6912GroEL1KO	KO plasmid	Km/Em/Sp/Sm	Diese Arbeit
pRL271_6912GroEL2KO	KO plasmid	Km/Em/Sp/Sm	Diese Arbeit
pRL271_6912GroEL3KO	KO plasmid	Km/Em/Sp/Sm	Diese Arbeit
pRL623	methylation plasmid	Chloramphenicol	(Wolk et al. 1988)
pRL443	conjugal plasmid	Km/Tetracyclin	(Wolk et al. 1988)

Tab. A5: Gemessene Enzymaktivität im Beta-Galactosidase-Test (BACTH)

Protein-Protein- Interaktion	#1	#2	#3	Mittelwert	StabW
	U/mg	U/mg	U/mg		
GS1/GL1	1,34E+03	2,43E+03	2,19E+02	1,89E+03	7,73E+02
GS1/GL2	1,11E+03	5,66E+03	4,11E+03	3,63E+03	2,32E+03
GS1/GL3	3,16E+01	5,89E+01	3,78E+01	4,28E+01	1,43E+01
GS1/GS1	3,54E+03	2,31E+03	1,09E+03	2,31E+03	1,22E+03
GS1/GS2	3,46E+03	3,70E+03	3,11E+03	3,43E+03	2,96E+02
GS2/GL2	3,83E+01	5,99E+01	3,62E+01	4,48E+01	1,31E+01
GS2/GL1	4,05E+03	6,52E+03	3,75E+03	4,77E+03	1,52E+03
GS2/GL3	3,34E+01	7,33E+01	3,93E+01	4,87E+01	2,15E+01
GS2/GS2	1,85E+03	4,49E+03	2,95E+03	3,09E+03	1,32E+03
GL1/GL1	7,24E+01	1,10E+02	5,43E+01	7,90E+01	2,87E+01
GL1/GL2	3,45E+01	5,98E+01	2,91E+01	4,11E+01	1,64E+01
GL1/GL3	2,72E+01	5,67E+01	2,05E+01	3,48E+01	1,93E+01
GL2/GL2	5,77E+02	1,31E+03	1,22E+03	1,04E+03	4,00E+02
GL2/GL3	2,69E+01	5,21E+01	3,07E+01	3,66E+01	1,36E+01
GL3/GL3	1,36E+01	5,37E+01	2,90E+01	3,21E+01	2,02E+01
Negativ-Kontrolle					
zu:					
GS1/GL1	4,33E+01	5,43E+01	2,80E+01	4,19E+01	1,32E+01
GS1/GL2	5,38E+01	6,01E+01	3,74E+01	5,04E+01	1,17E+01
GS1/GL3	2,38E+01	6,25E+01	6,21E+01	4,94E+01	2,22E+01
GS1/GS1	1,93E+01	6,45E+01	6,31E+01	4,90E+01	2,57E+01
GS1/GS2	2,79E+01	6,17E+01	5,59E+01	4,85E+01	1,81E+01
GS2/GS2	2,19E+01	5,87E+01	6,24E+01	4,77E+01	2,24E+01
GS2/GL2	1,67E+01	7,24E+01	5,17E+01	4,69E+01	2,82E+01
GS2/GL1	2,46E+01	5,27E+01	4,95E+01	4,23E+01	1,53E+01
GS2/GL3	1,83E+01	5,02E+01	4,98E+01	3,94E+01	1,83E+01
GL1/GL1	2,98E+01	6,01E+01	5,97E+01	4,99E+01	1,73E+01
GL1/GL2	2,62E+01	7,82E+01	5,38E+01	5,27E+01	2,60E+01
GL1/GL3	5,96E+00	5,38E+01	6,31E+01	4,09E+01	3,07E+01
GL2/GL2	2,54E+01	6,23E+01	5,36E+01	4,71E+01	1,93E+01
GL2/GL3	2,05E+01	5,46E+01	4,64E+01	4,05E+01	1,78E+01
GL3/GL3	3,83E+01	5,25E+01	5,15E+01	4,74E+01	7,90E+00

**Tab. A6:** Absolute Transkriptpegel der *groEL* Paraloge in den *C. fritschii* PCC 6912 Deletionsstämmen

<u>Copy number/ng RNA</u>				
Replikant	WT	$\Delta groEL1\_1$	$\Delta groEL1\_2$	$\Delta groEL1\_3$
1	5,961E+06	6,475E+05	1,087E+06	8,987E+05
2	2,481E+06	6,065E+05	1,143E+06	8,677E+05
3	1,530E+06	6,233E+05	1,074E+06	8,793E+05

	WT	$\Delta groEL2\_1$	$\Delta groEL2\_2$	$\Delta groEL2\_3$
1	7,067E+03	2,831E+03	3,080E+03	7,899E+03
2	4,040E+03	2,715E+03	9,030E+03	7,793E+03
3	5,531E+03	4,651E+03	1,816E+04	7,873E+03

	WT	$\Delta groEL3\_1$	$\Delta groEL3\_2$	$\Delta groEL3\_3$
1	1,302E+05	2,031E+04	3,561E+04	1,908E+04
2	6,408E+04	1,831E+04	3,833E+04	2,819E+04
3	2,862E+04	1,643E+04	3,317E+04	2,876E+04

**Tab. A7:** Absolute Transkriptpegel der *groESL* Paraloge in den *C. fritschii* PCC 6912 unter diazotrophen Bedingungen

<u>Copy number/ng RNA (Diazotrophie)</u>				
Replikant	<i>groESL1</i>		<i>groESL2</i>	
	T0	T24	T0	T24
1	4,55E+06	3,06E+04	8,28E+03	8,31E+06
2	1,76E+06	1,45E+04	3,77E+03	1,63E+06
3	1,37E+06	1,49E+04	7,51E+03	1,32E+06
4	1,60E+06	1,19E+04	4,76E+03	2,85E+06
5	3,11E+06	3,48E+03	6,91E+03	5,67E+05

## 7.3 Sequenzen

### 7.3.1 Nukleotid-Sequenzen

>groES1

```
ATGGCAGCTGTATCTCTAAGCGTTTCTACCGTTAAACCTCTAGGCGATCGCGTTTTTGTGAAAGT
GAGCGCCTCTGAAGAAAAAACCGCAGGTGGTCTGTATTTGCCCGATACTGCAAAGAGAAGCCT
CAAGTAGGCCGAAGTAGTTGCAGTTGGTGTATGGCAAAGTTAAAGACGATGGTGGTCGTCAGCCAA
TGGATGTAAAGGTAGGAGATAAAGTTCTTTACTCCAAGTACGCTGGTACCGATATCAAGCTGGGT
ACCGACGAATATGTACTACTTTTCAGAAAAAGACATTTTGCCGATCGTTAGCTAA
```

>groEL1

```
ATGGCAAAGCGCATTATTTACAACGAAAATGCCCGTCGCGCCTTGAAAGAGGCATGGATATCCT
AGCTGAGGCTGTAGCTGTTACCCTCGGTCCCAAAGGTCGTAACGTAGTACTAGAAAAGAAGTTTG
GTGCACCACAAATCGTTAACGATGGTGTAAACCATTGCTAAAGAAATTGAATTAGAAGACCACGTT
GAAAACACTGGCGTTTTCTTTGATTTCGTCAGCTGCTTCCAAGACAAACGATGCTGCTGGTGATGG
TACTACCACCGCTACTGTTTTGGCGCACGCAGTGGTTAAGGAAGGCTTGCCTAACGTTGCAGCT
GGTGCAAACGCGATTCTGCTCAAGCGTGGTATTGATAAAGCTACTAATTTCTCGTAGAAAAGAATT
AAAGAACACGCCCGTCCCGTTGAAGATTCCAAAGCTATTGCTCAAGTAGGTGCCATCTCTGCTGG
TAACGACGAAGAAGTCGGGCAAATGATTGCCGAAGCAATGGACAAGGTGGGCAAAGAAGGTGTA
ATTTCCCTGGAAGAAGGGAAATCCATGACCACCGAATTGAAATCACCGAAGGGATGCGCTTTGA
CAAAGGCTATATCTCTCCCTACTTCGCCACCGACGCAGAGCGGATGGAAGCTATTTTCGATGAGC
CTTTCATACTGCTAACCGATAAGAAAATTGCCCTGGTACAAGACCTCGTACCCGTGCTGGAGCAA
GTAGCTCGCGCTGGTCGTCCTTTGGTAATTATCGCCGAAGATATTGAGAAAGAAGCTTTGGCAAC
TTTGGTAGTCAACCGCTTGGCGTGGCGTCTCAACGTTGCTGCGGTGAAGGCTCCTGGTTTTGGC
GATCGCCGCAAAGCAATGCTCGAAGACATCGCTATTCTTACTGGCGGTCAAGTCATCACCGAAGA
TGCTGGACTGAAGCTAGAAAACGCCAAGCTAGATTCTTTGGGTAAAGCTCGCCGCATCACTATTA
CCAAAGACAACACCACCATTGTTGCGGAAGGTAACGATCAAGCTGTGAAGGCTCGCGTCGAGCA
AATTCGCCGTCAAATGGAAGAAACAGAATCTTCTACGACAAAGAGAAACTGCAAGAGCGTCTGG
CTAAATTAGCTGGTGGTGTAGCTGTGCTCAAGGTTGGTGTGCTACTGAAACCGAAATGAAAGAT
AAGAAGCTGCGCCTAGAAGACGCCATTAACGCTACCAAAGCTGCGGTAGAAGAAGGCATCGTTC
CTGGTGGTGGTACAACCTCTCGCTCACCTCGCTCCTCAACTGGAAGAGTGGGCAAACAGCAACCT
CAAGGGCGAAGAATTGACTGGTGCCTAATCGTCGCTCGCGCTCTGTCTGCTCCCCTCAAGCGC
ATTGCTGAAAACGCCGGTCAAATGGTGCTGTGATCGCCGAGCGCGTCAAAGAGAAGGAGTTCA
ACGTTGGTTACGACGCTGCTAAGAACGAGTTTGTGACTTGTGCTGCTGGTATCGTCGATCCT
GCGAAAGTGACTCGTTCTGCTCTGCAAACGCAGCTTCCATCGCTGGTATGGTGTGACAACCTGA
GTGTATCGTTGTTGACAAGCCTGAGCCTAAAGATGGTGCTCCTGCTGGTGCTGGTGCTGGTATG
GGCGGCGGCGACTTCGATTACTAA
```

>groES2

```
ATGCTTGGAGGATTAGATATGGCGCAGGTATCTCTGAGCGTTTCTACTGTCAAACCACTAAGCGA
TCGCGTCTTAATTAAGTAGGTGAATCAGAGGAGAAGACTCCAGGTGGAATTCTTCTCCGGATA
CTGCCAAAGAAAAACCTCAAGTAGGAGAAGTAGTGGCTGTTGGTGTGCTGGCAAGTGAATGAAGA
CGCTTCACGCCAGCCAATGCAAGTAAAGGTAGGGGAAAAAGTTCTCTATTCAAATACGCTGGAA
CTGACATCAAATCGGTACGGAAGATTACGTACTTTTATCAGAAAAAGACATCCTTGCGACACTGA
CATAG
```

>groEL2

ATGGCTAAACAAATAATTTATAACGAAGAGGCTCGTCGTGCCCTAGAAAAAGGTATGGACATTTTG  
GCTGAAGCAGTAGCCGTCCTCTGGGGCCAAAAGGTCGTAACGTAGTTTTAGAGAAAAAGTTTG  
GCGCTCCCAAATTGTCAATGATGGTATCACTATCGCCAAAGAAATCGAATTAGAAAACACGTA  
GAAAACACTGGTGTATCTCTAATTCGTCAGGCGGCGGCTAAAACATAATGATGTTGCTGGTGATGG  
AACAAACAACGGCGGTTGTTCTAGCTAGTGCCATGTTAGAGAAGGAATGCGCAATGTAGCAGCA  
GGTGCAAACGCTATTGCCTTGAGGCGAGGAATTGATAAAGCAGCCCACTTCTTGGTAGAGAAAAT  
TGCCGAACACGCCCGCCAGTGGAAGAGTCTAAAGCGATCGCCCAAGTTGCGGCAATTTCCGCC  
GGAAACGACGAAGAAGTCGGACATATGATCGCCAATGCAATGGAAAAGGTAGGCAAGGAAGGCG  
TGATTTCCCTAGAAGAAGGGAAGTCAATGACTACCGAGTTGAAAATTACCGAAGGGATGCGCTTT  
GACAAAGGCTACATTTCTCCTTACTTTGCTACCGATCCAGAGCGGATGGAGGCAATTTTTGATGA  
GCCTTACATTCTGCTGACTGATAAAAAAATCACTTTAGTACAAGATTTGGTATCAGTACTTGAGCA  
AGTAGCTCGTTTTGGCAAGCCTTTGCTAATTATTGCTGAGGATATCGAGAAAGAAGCTTTAGCAAC  
CTTGGTAGTCAACCGTCTACGGGGTGTGTTTGAATGTCGCTGCCGTCAAGGCTCCTGGATTTGGC  
GATCGCCGCAAAGCCATGTTAGAAGACATTGCTGTTCTGACGGGAGGGCAAGTAATTAAGG  
AGGCTGGCTTGAAGTTGGAAAATGCCCACTTAGAGATGTTGGGCAGAGCAAGACGGATCACCAT  
TACAAAAGACCACACTACAATTGTCGCAGAAGGCAACGAAAAGCTGTGAAAGCTCGTTGCGAAC  
AAATTCGCCGTCAGATGGAAGAACTGAGTCTTCTACGACAAAAGAAAACACTGCAAGAGCGCTTG  
GCTAAATTAGCTGGTGGTGTAGCAGTGATTAAGTGGGCGCTGCTACCGAAACGAAATGAAGG  
ACAAAAAACTCCGCCTAGAAGACGCGATCAACGCAACCAAGGCAGCAGTAGAAGAAGGTATTGT  
TCCCGGTGGTGGTACTACCCTGTTACATCTGGCTCCCAACTGGAAGATTGGGCAGCAGAACAC  
CTAACTGGTGTGAATCATCGGTACGATGATTGTTGCCCGTGCCCTTTATGCTCCTCTGCGGCG  
AATTGCTGAAAATGCCGACAAAATGGCGCTGTAATTGCTGAACGAGTGAAGGAAAAACCATTTG  
ATGTTGGCTTTGATGCAGTAACCAATCAATTCATCAATATGTTTGAAGCTGGTATCGTCGATCCAG  
CTAAAGTGAAGTCTGTTCTGCTTTGCAAAACGCGGCTTCTATTGCAGGTATGGTATTAACACCGAGT  
GCATTGTGGTTGATAAACCAGAACCCAAGACTAAAGCTGCTGCTGCTCCTGGTGGTGGCATGGG  
TGCCGATTTTGATTACTAA

>groEL3

ATGGCAAAAATTATTGCATTTGACGAAGATTGCGCGCGGGCTTTAGAAAAGAGGTATTAACGCCCT  
TGCTGATGCAGTGAATAATTACCTTAGGGCCAAAAGGTCGTAACGTCTTTTTAGAGAAAAAATTTG  
GTACACCTCAGATTGTTAATGATGGTATCACCGTTGCCAAAGAAATTGATCTAGAAGATCCCTAG  
AAAACACTGGTGCCAACTTGTCCAAGAAGTTGCTTCCAAAACCAAAGAAGTAGCTGGCGATGGT  
ACAACCACGGCGACAGTGCTAGCACAGGCGATGATTGCGGAAGGTTTGA AAAACGTAGCTGCTG  
GAGCAAATCCAGTCGCGACACGGCACGGAATTGAAAAACCGTTGAAAGGCTAGTACAGGAAAT  
TGCAACTGTAGCCAAGCCAGTTGAAGGTAGCGCGATCGCTCAAGTGGCGACGGTTTTCTGCTGGC  
AACGATGAAGAAATCGGGGCTATGATTGCCGAAGCAATGGAAAAAGTCACCAAGACGGTGTAAAT  
TACCGTAGAAGAATCTAAGTCTCTGACAACCGAATTGGAAGTGGTTGAGGGGATGCAAATTGATC  
GGGGTTACATTTGCCCTACTTCATCACCGACAACGAGCGGATGACAGTAGAATTTGAAAACGCC  
CGCATTTTAATTACTGATAAGAAAATCAGCAGCATTGAGGACTTAGTGCCTGTATTGGAAAAAGTA  
GCCCCGTTTGGGTCAAGCTCTGCTAATTATCGCTGAAGATGTAGAAGGTGAAGCTTTAGCAACTTT  
GGTGGTTAATAAAGCGCGGGGTGTGTTGACAGTCGCCGCTATCAAAGCACCTGGTTTTGGCGAA  
CGCCGCAAAGCGATGTTAGAAGACATTGCTATTCTCACCGCGGACAGCTGATTTCTGAAGAAAT  
TGGCTTAAGCTTGGATACAGTTTTCTTGGAGATGCTGGGAACTGCCCGGAAAATTTCTATTGATAA  
AGAAAACACCGTCATCGTCTCTGAATCTGCACAGACACAAGATGTGCAAAGCGCATTGGCCAAA  
TTCGCAAGCAACTACAAGAAACCGATTCCGAATACGATAAAGAAAAACTGCAAGAACGGATTGCC  
AAGCTAGCTGGTGGTGTAGCCGTAATTAAGTGGGTGCAGCCACAGAAACCGAACTTAAAGACC  
GCAAATTGCGGATTGAGGATGCTCTTAATGCCACTAAAGCCGCTGTAGAAGAAGGAATCGTGCCT  
GGTGGCGGGACGATGTTAATTCACCTGTCTACAAAAATCGACGAAATTA AAAATAGCCTCAACGA  
CGAAGAGCAAATTGGCGCTGAGATTATTAAGCGATCGCTAGATGCTCCGTTGCGCCAAATCGCA  
GATAATGCTGGTGTGAAGTTCTGTGATCGTTGAGAAAAGTGGTACCACAGACTTTAACGTCCG  
TTACAACGCTGCAACTGGAGAATTC AAGACTTAATTGCTGCGGGTATTATCGATCCTGCTAAAGT  
CGTGCGTTACGCCTTACAAAATGCTGCTTCCATTGCGGCTATGGTGTGCTAACCACAGAAGCGATCG  
TCGCTGAAAAGCCTGAGAAGAAACCCGAGGTGGCGCTCCTGACATGGGCGGTATGGGCGGTA  
TGGTGGTATGGGCGGCATGGGCGGCATGGGTATGATGTAG

### 7.3.2 Aminosäure-Sequenzen

>GroES1

MAAVSSVSTVKGDRVVKVSASKTAGGYDTAKKVGVVAVGDGKVKDDGGRMDVKVGDKVYSKYAGT  
DKGTDYVSKDAVS

>GroEL1

MAKRYNNARRARGMDAAVAVTGKGRNVVKKGAVNDGVTAKDHSVNTGVSRAASKTNDAAAGDGTTTA  
TVAHAVVKGRNVAAGANAKRGDKATNVRKHARVDSKAAV GASAGNDVGMAAMDKVGKGVSGKSM  
TTTGMRDKGY SYATDARMADTDKKAVDVVVARAGRVADKAATVVNRRGVNVAAVKAGGDRRKAMD  
ATGGVTDAGKNAKDSGKARRTTKDNTTVAGNDAVKARVRRMTSSYDKKRAKAGGVAVVKVGAATT  
MKDKKRDANATKAAVGVGGGTTAHAWANSNKGTGAVARASAKRANAGNGAVARVKKNVGYDAAK  
NVDAAGVDAKVTRSANAASAGMVTTCCVVDKDKGAAGAGAGMGGDDY

>GroES2

MGGDMAVSSVSTVKS DRVKVGSKTGGDTAKKVGVVAVGAGKWNDA SRMVKVGKVYSKYAGTDKG  
TDYVSKDATT

>GroEL2

AKYNARRAKGMDAAVAVTGKGRNVVKKGAVNDGTAKNHVNTGVSRAAAKTNDVAGDGTTTAVVAS  
AMVRGMRNVAAGANAARRGDKAAHVKAHARVSKAAVAASAGNDVGHMANAMKVGKGVSGKSM  
TTTGMRDKGY SYATDRMADYTDKKTVDVSVVARGKADKAATVVNRRGVNVAAVKAGGDRRKAMDAVT  
GGVTAGKNAHMGRARRTTKDHTTVAGNKAVKARCRRMTSSYDKKRAKAGGVAVVKVGAATTKDKK  
RDANATKAAVGVGGGTTHADWAAHTGDGTMVARAYARRANAGNGAVARVKKDVGDAVTNNMAGV  
DAKVTRSANAASAGMVTTCCVVDKKTAAAAGAGMGGDDY

>GroEL3

MAKADDSRRARGNAADAVKTGKGRNVKKTGTVNDGTVAKDDNTGAKVVASKTKVAGDGTTTATVAA  
MRGKNVAAGANVATRHGKTVRVATVAKVGSAAVATVSAGNDGAMAAMKVTKDGVTVSKSTTVVGM  
DRGYSYTDNRMTVNARTDKKSSDVVKVARGAADVGAATVVNKARGVTVAAGAGGRRKAMDATGGS  
GSDTVSMGTARKSDKNTVSSATDVKRGRKTD SYDKKRAKAGGVAVVKVGAATTKDRKRDANATKAA  
VGVGGGTMHSTKDKNSNDGAKRSDARADNAGAGSVVKVRTTDDNVGYNAATGDAAGDAKVVR SAN  
AASAAMVTTAVAKKAGGADMGGMGGMGGMGGMGGMGGM

## 8 Literaturverzeichnis

- Altschul SF. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410.
- Andersson DI, Jerlström-Hultqvist J, Näsvall J. 2015. Evolution of new functions de novo and from preexisting genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:1–18.
- Anfinsen CB. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181:223–230.
- Apte SK. 2001. Coping with salinity/water stress: cyanobacteria show the way. *Proc Indian Nat Sci Acad.* 5:285–310.
- Armbrust EV, Bowen JD, Olson RJ, Chisholm SW. 1989. Effect of light on the cell cycle of a marine *Synechococcus* strain. *Appl Environ Microbiol* 55:425–432.
- Asadulghani, Nitta K, Kaneko Y, Kojima K, Fukuzawa H, Kosaka H, Nakamoto H. 2004. Comparative analysis of the *hspA* mutant and wild-type *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 under salt stress: evaluation of the role of *hspA* in salt-stress management. *Arch Microbiol* 182:487–497.
- Asadulghani, Suzuki Y, Nakamoto H. 2003. Light plays a key role in the modulation of heat shock response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem Biophys Res Commun* 306:872–879.
- Battesti A, Bouveret E. 2012. The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods* 58:325–334.
- Bergthorsson U, Andersson DI. 2007. Ohno's dilemma: evolution of new genes under continuous selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17004–17009.
- Bhagwat A, Apte SK. 1989. Comparative Analysis of proteins induced by heat shock, salinity and osmotic stress in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain L-31. *J Bacteriol* 171:5187–5189.
- Bimboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7:1513–1523.
- Bittner AN, Foltz A, Oke V. 2007. Only one of five *groEL* genes is required for viability and successful symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 189:1884–1889.
- Blankenship RE. 1998. The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *Trends Biochem Sci* 23:94–97.
- Bogumil D, Dagan T. 2010. Chaperonin-dependent accelerated substitution rates in prokaryotes. *Genome Biol Evol* 2:602–608.
- Brocchieri L. 2000. Conservation among HSP60 sequences in relation to structure, function, and evolution. *Protein Sci* 9:476–486.
- Buchberger A. 1996. Substrate shuttling between the DnaK and GroEL systems indicates a chaperone network promoting protein folding. *J Mol Biol* 261:328–333.

- Bukau B, Horwich AL. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92:351–366.
- Camberg JL, Hoskins JR, Wickner S. 2009. ClpXP protease degrades the cytoskeletal protein, FtsZ, and modulates FtsZ polymer dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:10614–10619.
- Castenholz RW. 2001. Phylum BX. Cyanobacteria. In: Boone DR, Castenholz RW, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York: Springer Verlag. p. 473-600.
- Castielli O, la Cerda De B, Navarro JA, Hervás M, la Rosa De MA. 2009. Proteomic analyses of the response of cyanobacteria to different stress conditions. *FEBS Lett* 583:1753–1758.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802–805.
- Chaurasia AK, Apte SK. 2009. Overexpression of the *groESL* operon enhances the heat and salinity stress tolerance of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Appl Environ Microbiol* 75:6008–6012.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159.
- Dagan T, Roettger M, Stucken K, Landan G, Koch R, Major P, Gould SB, Goremykin VV, Rippka R, Tandeau de Marsac N, et al. 2013. Genomes of stigonematalean cyanobacteria (subsection V) and the evolution of oxygenic photosynthesis from prokaryotes to plastids. *Genome Biol Evol* 5:31–44.
- Deusch O, Landan G, Roettger M, Gruenheit N, Kowallik KV, Allen JF, Martin W, Dagan T. 2008. Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor. *Mol Biol Evol* 25:748–761.
- Douglas AE. 2003. Genomes at the interface between bacteria and organelles. *Phil Trans R Soc B* 358:5–18.
- Drummond DA. 2005. Why highly expressed proteins evolve slowly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14338–14343.
- Eichler EE, Sankoff D. 2003. Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. *Science* 301:793–797
- Ehira S. 2003. Genome-wide expression analysis of the responses to nitrogen deprivation in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Research* 10:97–113.
- Elhai J, Wolk CP. 1988. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol* 167:747–754
- Ellis J. 1987. Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328:378–379.
- Ellis J. 1990. Molecular chaperones: the plant connection. *Science* 250:954–959.
- England J. 2008. Rattling the cage: computational models of chaperonin-mediated protein folding. *Curr Opin Struc Biol* 18:163–169.

- Eriksson MJ, Clarke AK. 1996. The heat shock protein ClpB mediates the development of thermotolerance in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* 178:4839–4846.
- Espinosa-Cantú A, Ascencio D, Barona-Gómez F, DeLuna A. 2015. Gene duplication and the evolution of moonlighting proteins. *Front Genet* 6:1–7.
- Fan M, Rao T, Zacco E, Ahmed MT, Shukla A, Ojha A, Freeke J, Robinson CV, Benesch JL, Lund PA. 2012. The unusual mycobacterial chaperonins: evidence for *in vivo* oligomerization and specialization of function. *Mol Microbiol* 85:934–944.
- Fares MA. 2002. Endosymbiotic bacteria: GroEL buffers against deleterious mutations. *Nature* 417:398.
- Farr GW. 2003. Folding with and without encapsulation by *cis*- and *trans*-only GroEL-GroES complexes. *EMBO J* 22:3220–3230.
- Fayet O, Ziegelhoffer T, Georgopoulos C. 1989. The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol* 171:1379–1385.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811.
- Force A. 1999. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151:1531–1545.
- Frydman J. 2001. Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 70:603–647.
- Fryxell KJ. 1996. The coevolution of gene family trees. *Trends Genetics* 12:364–369.
- Furuki M. 1996. Cloning, characterization and functional analysis of *groEL*-like gene from thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which does not form an operon with *groES*. *Biochem Biophys Acta* 1294:106–110.
- Gao L, Imanaka T, Fujiwara S. 2015. A mutant chaperonin that is functional at lower temperatures enables hyperthermophilic Archaea to grow under cold-stress conditions. *J Bacteriol* 197:2642–2652.
- Glatz A, Vass I, Los DA, Vigh L. 1999. The *Synechocystis* model of stress: from molecular chaperones to membranes. *Plant Physiol Bioch* 37:1–12.
- Glatz A. 1997. Chaperonin genes of the *Synechocystis* PCC 6803 are differentially regulated under light-dark transition during heat stress. *Biochem Biophys Res Co* 239:291–297.
- Goldburg WI. 1999. Dynamic light scattering. *Am J Phys* 67:1152–1160.
- Gould PS. 2007. Homologous *cpn60* genes in *Rhizobium leguminosarum* are not functionally equivalent. *Cell Stress and Chaperones* 12:123–131.
- Goyal K, Qamra R, Mande SC. 2006. Multiple gene duplication and rapid evolution in the *groEL* gene: functional implications. *J Mol Evol* 63:781–787.

- Graur D, Li WH. 1999. Fundamentals of molecular evolution. Sunderland (MA): Sinauer Associates. p. 249–322.
- Griese M, Lange C, Soppa J. 2011. Ploidy in cyanobacteria. FEMS Microbiol Lett 323:124–131.
- Gu Z, Nicolae D, Lu HH-S, Li WH. 2002. Rapid divergence in expression between duplicate genes inferred from microarray data. Trends Genet 18:609–613.
- Haldane JBS. 1932. The causes of evolution. New York: Cornell University Press.
- Hansen MT. 1978. Multiplicity of genome equivalents in the radiation-resistant bacterium *Micrococcus radiodurans*. J Bacteriol 134:71–75.
- Harrison PM, Echols N, Gerstein MB. 2001. Digging for dead genes: an analysis of the characteristics of the pseudogene population in the *Caenorhabditis elegans* genome. Nucleic Acids Research 29:818–830.
- Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. Nature 475:324–332.
- Hartl FU. 2011. Chaperone-assisted protein folding: the path to discovery from a personal perspective. Nat Med 17:1206–1210.
- Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM, Tilly K, Dennis DT, Georgopoulos C, Hendrix RW, Ellis RJ. 1988. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. Nature 333:330–334.
- Henderson B, Fares MA, Lund PA. 2013. Chaperonin 60: a paradoxical, evolutionarily conserved protein family with multiple moonlighting functions. Biol Rev 88:955–987.
- Herrero A. 2001. Nitrogen control in cyanobacteria. J Bacteriol 183:411–425.
- Hittinger CT, Carroll SB. 2007. Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch. Nature 449:677–681.
- Hoffmann JH, Linke K, Graf PC, Lilie H, Jakob U. 2003. Identification of a redox-regulated chaperone network. EMBO J 23:160–168.
- Horwich AL. 1999. Chaperone rings in protein folding and degradation. Proc Natl Acad Sci U S A 96:11033–11040.
- Hughes AL. 2002. Adaptive evolution after gene duplication. Trends Genet 18:433–434.
- Hughes MK, Hughes AL. 1993. Evolution of duplicate genes in a tetraploid animal, *Xenopus laevis*. Mol Biol Evol 10:1360–1369.
- Huq S, Sueoka K, Narumi S, Arisaka F, Nakamoto H. 2010. Comparative biochemical characterization of two GroEL homologs from the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Biosci Biotechnol Biochem 74:2273–2280.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408:796–815.

- Ikemura, T. 1985. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol Biol Evol* 2:13–34
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23–28.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816–820.
- Johansson BG 1972. Agarose gel electrophoresis. *Scand J Clin Lab Invest* 29: 7–19.
- Kaneko T, Nakamura Y, Wolk CP, Kuritz T, Sasamoto S, Watanabe A, Iriguchi M, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, et al. 2001. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena sp.* strain PCC 7120. *DNA Research* 8:205–213.
- Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D. 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5752–5756.
- Karlin S, Brocchieri L. 2000. Heat shock protein 60 sequence comparisons: duplications, lateral transfer, and mitochondrial evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11348–11353.
- Kerner MJ, Naylor DJ, Ishihama Y, Maier T, Chang H-C, Stines AP, Georgopoulos C, Frishman D, Hayer-Hartl M, Mann M, et al. 2005. Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. *Cell* 122:209–220.
- Kimura M. 1989. The neutral theory of molecular evolution. *Genome* 31:24–31.
- Kojima K, Nakamoto H. 2007. A novel light- and heat-responsive regulation of the *groE* transcription in the absence of HrcA or CIRCE in cyanobacteria. *FEBS Lett* 581:1871–1880.
- Kovács E, Sun Z, Liu H, Scott DJ, Karsisiotis AI, Clarke AR, Burston SG, Lund PA. 2010. characterisation of a GroEL single-ring mutant that supports growth of *Escherichia coli* and has GroES-dependent ATPase activity. *J Mol Biol* 396:1271–1283.
- Kovács E, van der Vies SM, Glatz A, Török Z, Varvasovszki V, Víggh L. 2001. The chaperonins of *Synechocystis* PCC 6803 differ in heat inducibility and chaperone activity. *Biochem Biophys Res Commun* 289:908–915.
- Kuchanny-Ardigo D. 2003. Cloning and characterization of the *groE* heat-shock operon of the marine bacterium *Vibrio harveyi*. *Microbiology* 149:1483–1492.
- Kumar CMS, Mande SC. 2011. Protein chaperones and non-protein substrates: on substrate promiscuity of GroEL. *Curr Sci* 100:1646–1653.
- Langer T. 1992. Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accommodates the protein substrate within its central cavity. *EMBO J* 11:4757–4765.
- Laskey RA. 1978. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275:416–420.

- Lehel C, Los D, Wada H, Györgyei J, Horváth I, Kovács E, Murata N, Vigh L. 1993. A second *groEL*-like gene, organized in a *groESL* operon is present in the genome of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 268:1799–1804.
- Lehel C, Wada H, Kovács E, Török Z, Gombos Z, Horváth I, Murata N, Vigh L. 1992. Heat shock protein synthesis of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: purification of the GroEL-related chaperonin. *Plant Mol Biol* 18:327–336.
- Li L, Huang Y, Xia X, Sun Z. 2006. Preferential duplication in the sparse part of yeast protein interaction network. *Mol Biol Evol* 23:2467–2473.
- Lindquist S, Craig EA. 1988. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22:631–677.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25:402–408.
- Lund PA. 2009. Multiple chaperonins in bacteria -- why so many? *FEMS Microbiol Rev* 33:785–800.
- Lynch M, Force A. 2000. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154:459–473.
- Lynch M, O'Hely M, Walsh B, Force A. 2001. The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate. *Genetics* 159:1789–1804
- Maisnier-Patin S, Roth JR, Fredriksson Å, Nyström T, Berg OG, Andersson DI. 2005. Genomic buffering mitigates the effects of deleterious mutations in bacteria. *Nat Genet* 37:1376–1379.
- Mansour S, Thomas K, Capecchi M. 1988. Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336:348–352.
- Martin W, Herrmann RG. 1998. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiol Bioch* 118:9–17.
- Martin W. 2001. An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. *Biol Chem* 382:1521–1539.
- McLennan N, Masters M. 1998. GroE is vital for cell-wall synthesis. *Nature* 392:139.
- Miller JH. 1992. *A short course in bacterial genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, et al. 2010. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 29:143–148.
- Moscou MJ, Bogdanove AJ. 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL Effectors. *Science* 326:1501–1501.
- Nakamoto H, Suzuki M, Kojima K. 2003. Targeted inactivation of the *hrcA* repressor gene in cyanobacteria. *FEBS Lett* 549:57–62.

- Nei M, Rogozin IB, Piontkivska H. 2000. Purifying selection and birth-and-death evolution in the ubiquitin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10866–10871.
- Nei M. 1969. Gene duplication and nucleotide substitution in evolution. *Nature* 221:40–42.
- Nowak MA, Boerlijst MC, Cooke J, Smith JM. 1997. Evolution of genetic redundancy. *Nature* 388:167–171.
- Ogawa J, Long SR. 1995. The *Rhizobium meliloti groELc* locus is required for regulation of early *nod* genes by the transcription activator NodD. *Gen Dev* 9:714–729.
- Ohno S. 1970. Evolution by gene duplication. New York: Springer Verlag.
- Paul S, Singh C, Mishra S, Chaudhuri TK. 2007. The 69 kDa *Escherichia coli* maltodextrin glucosidase does not get encapsulated underneath GroES and folds through trans mechanism during GroEL/GroES-assisted folding. *FASEB J* 21:2874–2885.
- Potnis AA, Rajaram H, Apte SK. 2016. GroEL of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain L-31 exhibits GroES and ATP-independent refolding activity. *J Biochem* 159:295–304.
- Qamra R, Srinivas V, Mande SC. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* GroEL homologues unusually exist as lower oligomers and retain the ability to suppress aggregation of substrate proteins. *J Mol Biol* 342:605–617.
- Qian W, Zhang J. 2008. Gene dosage and gene duplicability. *Genetics* 179:2319–2324.
- Queitsch C. 2002. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* 417:618–624.
- Rajaram H, Apte SK. 2008. Nitrogen status and heat-stress-dependent differential expression of the *cpn60* chaperonin gene influences thermotolerance in the cyanobacterium *Anabaena*. *Microbiology* 154:317–325.
- Rajaram H, Apte SK. 2010. Differential regulation of *groESL* operon expression in response to heat and light in *Anabaena*. *Arch Microbiol* 192:729–738.
- Rajaram H, Chaurasia AK, Apte SK. 2014. Cyanobacterial heat-shock response: role and regulation of molecular chaperones. *Microbiology* 160:647–658.
- Ranford JC, Coates AR, Henderson B. 2000. Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Expert Rev Mol Med* 2:1–17.
- Rastogi S, Liberles DA. 2005. Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. *BMC Evol Biol* 5:28.
- Rippka R. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology* 111:1–61.
- Roy A. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5:725–738.
- 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 alpha-crystallin-related, small heat shock protein. *Eur J Biochem* 262:406–416.

- Rutherford SL. 1998. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396:336–342.
- Sabater-Munoz B, Prats-Escriche M, Montagud-Martinez R, Lopez-Cerdan A, Toft C, Aguilar-Rodriguez J, Wagner A, Fares MA. 2015. Fitness trade-offs determine the role of the molecular chaperonin GroEL in buffering mutations. *Mol Biol Evol* 32:2681–93.
- Saibil H. 2013. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:630–642.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez Baracaldo P. 2005. Morphological and habitat evolution in the cyanobacteria using a compartmentalization approach. *Geobiology* 3:145–165.
- Sato S, Ikeuchi M, Nakamoto H. 2008. Expression and function of a *groEL* paralog in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* under heat and cold stress. *FEBS Lett* 582:3389–3395.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Meth* 9:676–682.
- Sigler PB. 1998. Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Annu Rev Biochem* 67:581–608.
- Slabas AR, Suzuki I, Murata N, Simon WJ, Hall JJ. 2006. Proteomic analysis of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803 and a thermally tolerant knockout strain lacking the histidine kinase 34 gene. *Proteomics* 6:845–864.
- Stanier RY. 1977. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu Rev Microbiol* 31:225–274.
- Stucken K, Ilhan J, Roettger M, Dagan T, Martin WF. 2012. Transformation and conjugal transfer of foreign genes into the filamentous multicellular cyanobacteria (subsection V) *Fischerella* and *Chlorogloeopsis*. *Curr Microbiol* 65:552–560.
- Stucken K, Koch R, Dagan T. 2013. Cyanobacterial defense mechanisms against foreign DNA transfer and their impact on genetic engineering. *Biol Res* 46:373–382.
- Sun Z, Scott DJ, Lund PA. 2003. Isolation and characterisation of mutants of GroEL that are fully functional as single rings. *J Mol Biol* 332:715–728.
- Tanaka NN, Hiyama TT, Nakamoto HH. 1997. Cloning, characterization and functional analysis of *groESL* operon from thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Acta-Bioenerg* 1343:14.
- Tang Y-C, Chang H-C, Chakraborty K, Hartl FU, Hayer-Hartl M. 2008. Essential role of the chaperonin folding compartment *in vivo*. *EMBO J* 27:1458–1468.
- Tang Y-C. 2006. Structural features of the GroEL-GroES nano-cage required for rapid folding of encapsulated protein. *Cell* 125:903–914.
- Tokuriki N. 2009. Protein dynamism and evolvability. *Science* 324:203–207.

- Tomitani A. 2006. The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5442–5447.
- Tomitani A. 2004. Evolution of branching filamentous cyanobacteria: molecular-phylogenetic analyses of stigonematalean species. *IFREE Report* 2:1–5.
- Turner S. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryo. Microbio.* 46:327–338.
- Wagner A. 2000. Decoupled evolution of coding region and mRNA expression patterns after gene duplication: implications for the neutralist-selectionist debate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6579–6584.
- Wang Y, Zhang W-Y, Zhang Z, Li J, Li Z-F, Tan Z-G, Zhang T-T, Wu Z-H, Liu H, Li Y-Z. 2013. Mechanisms involved in the functional divergence of duplicated GroEL chaperonins in *Myxococcus xanthus* DK1622. *PLoS Genet* 9:1–11.
- Warnecke T. 2010. GroEL dependency affects codon usage-support for a critical role of misfolding in gene evolution. *Mol Syst Biol* 6:1–11.
- Wilks H, Hart K, Feeney R, Dunn C, Muirhead H, Chia W, Barstow D, Atkinson T, Clarke A, Holbrook J. 1988. A specific, highly active malate dehydrogenase by redesign of a lactate dehydrogenase framework. *Science* 242:1541–1544.
- Williams TA. 2010. The effect of chaperonin buffering on protein evolution. *Genome Biol Evol* 2:609–619.
- Wolk CP, Cai Y, Cardemil L, Flores E, Hohn B, Murry M, Schmetterer G, Schrautemeier B, Wilson R. 1988. Isolation and complementation of mutants of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 unable to grow aerobically on dinitrogen. *J Bacteriol* 170:1239–1244.
- Wolk CP, Ernst A, Elhai J. 1994. Heterocyst metabolism and development. In: Bryant DA. editors. *The molecular biology of cyanobacteria*. New York: Springer Verlag. p. 769-823
- Xu Z. 1997. The crystal structure of the asymmetric GroEL–GroES–(ADP)<sub>7</sub> chaperonin complex. *Nature* 388:741–750.
- Young JC. 2004. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:781–791.
- Yura T, Nagai H, Mori H. 1993. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 47:321–350.
- Zhang J, Baker ML, Schröder GF, Douglas NR, Reissmann S, Jakana J, Dougherty M, Fu CJ, Levitt M, Ludtke SJ, et al. 2010. Mechanism of folding chamber closure in a group II chaperonin. *Nature* 463:379–383.
- Zhang Y, Frohman M.A. 1997. Using rapid amplification of cDNA ends (RACE) to obtain full-length cDNAs. *Methods Mol Biol* 69:61–87.
- Zhang J, Zhang Y-P, Rosenberg HF. 2002. Adaptive evolution of a duplicated pancreatic ribonuclease gene in a leaf-eating monkey. *Nat Genet* 30:411–415.
- Zhang J. 2003. Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol Evol* 18:292–298.

Zhang S, Li J, Wang C-C. 2001. GroEL-assisted dehydrogenase folding mediated by coenzyme is ATP-independent. *Biochem Biophys Res Co* 285:277–282.

Zuber U. 1994. CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 176:1359–1363.

---

## Danksagung

In erster Linie möchte ich Prof Dr. Tal Dagan für die Möglichkeit dieser Arbeit, aber auch für ihre Unterstützung bereits seit Beginn meiner Diplomarbeit danken. Vielen Dank für ihr entgegengebrachtes Vertrauen in mich und diese Arbeit, sowie für ihre hilfreichen Anregungen.

Ich danke Prof. Dr. Scheidig für das Interesse an diesem Thema und die Übernahme des Korreferats.

Ein herzlicher Dank an alle Kollegen für die motivierende Arbeitsatmosphäre, die es mir ermöglicht hat nie den Spaß an der Arbeit zu verlieren. Besonders danke ich der "alten Truppe": Dr. Ovidiu Popa, Dr. David Bogumil, Dr. Karina Stucken, Judith Ilhan und Robin Koch. Judith danke ich auch besonders für das Korrekturlesen und die immer sehr hilfreichen Gespräche. Karina, Dr. Katrin Hammerschmidt und Dr. Nils Hülter danke ich für neue Denkanstöße und die Bereitschaft zu zahlreichen Diskussionen. Eine großes Dankeschön auch an Tanita Wein und Sophie Roy für ihre Motivation in der "heißen Phase". Danke für die schöne und lustige Zeit weit über die Arbeit hinaus.

Großer Dank an meine Freunde, besonders an Cordula, Lena und Alex, für die Motivation während des gesamten Studiums und der Zeit der Promotion.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Schwester Helen und meinen Eltern für etliche Unterstützung bedanken. Ohne ihren Zuspruch wäre diese Arbeit kaum möglich gewesen.