

Analyse des Kohlenhydrattransfers in der Blaualgenflechte *Peltigera praetextata*

Diplomarbeit

vorgelegt von

Stefan Wic



**Abteilung Pflanzenphysiologie
Fachbereich Biologie
Technische Universität Kaiserslautern**

Kaiserslautern, im August 2006

[Aus dem Lateinischen]

„Was wird es Euch nutzen, die Dinge dieser Welt zu kennen, wenn diese Welt selbst vergangen sein wird? Beim jüngsten Gericht wird man Euch nicht fragen, was Ihr wusstet, sondern was Ihr tatet, und in der Hölle, auf die Ihr zueilt, wird es keine Wissenschaft mehr geben. Erspart Euch diese vergebliche Mühe.“

Johann Gerson, Rektor der Universität Paris, um 1500 n.Chr.

Für Rutger Sycamber

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Evolution, Symbiose und Verbreitung von Flechten	1
1.2	Wuchsformen, Thallusmorphologie und Fortpflanzung	3
1.3	Poikilohydrie, Kohlenhydrat- und Stickstoffmetabolismus	6
1.4	Hypothesen und Untersuchungen zum Kohlenhydrattransfer in Flechten	9
1.5	Erläuterungen zur Cyanobakterien-Gattung <i>Nostoc</i>	11
1.6	Zielsetzung der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Isolierung und Anzucht von <i>Nostoc spec.</i>	14
2.2	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	15
2.3	Plasmid-Vektoren und Oligonukleotidprimer	16
2.4	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	17
2.5	Hitzeschocktransformation von <i>E.coli</i>	18
2.6	Transformation von <i>Nostoc</i>	18
2.7	Plasmidisolierung	19
2.8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
2.9	DNA-Sequenzierung	21
2.10	DNA-Restriktion	21
2.11	DNA-Ligation	21
2.12	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	22
2.13	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	23
2.14	Bestimmung der DNA-Konzentrationen	23
2.15	Zellaufschluss von <i>Nostoc</i>	23
2.16	Chlorophyllquantifizierung	24
2.17	Proteinbestimmung	24
2.18	Bestimmung der Überlebensrate von <i>Nostoc</i>	24
2.19	Transportversuche an <i>Nostoc</i>	25
2.20	Photometrische Ermittlung der Saccharose-Konzentration	25
2.21	Chromatographie	27
2.22	Inhibitionsversuche	28
2.23	Elektronische Datenverarbeitung und computergestützte Analysen	28

3	Ergebnisse	29
3.1	Wahl der Flechte und Kultivierung des Photobionten	29
3.2	Identifizierung eines putativen Glucosetransporters in <i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133	30
3.3	Bioinformatische Analyse putativer Glucosetransporter	32
3.4	Herstellung von Glucosetransporter defizienten <i>Nostoc</i> -Mutanten	33
3.5	Untersuchungen zur Glucose-Aufnahme von kultivierten <i>Nostoc</i> -Zellen	36
3.6	Überprüfung der Zuckerfreisetzung durch <i>Nostoc</i> bei Trockenstress	37
3.7	Photometrische Bestimmung der abgegebenen Saccharose-Menge aus wiederbefeuchteten <i>Nostoc</i> -Zellen	38
3.8	Saccharose-Nachweis für <i>Nostoc</i> aus Bg11 ₀ -Kultur	39
3.9	Analyse des Kohlenhydrattransfers in <i>P. praetextata</i> in Anwesenheit verschiedener Zucker	41
3.10	Analyse des Kohlenhydrattransfers in Anwesenheit steigender Glucose-Konzentrationen	43
3.11	Analyse des Kohlenhydrattransfers in Anwesenheit steigender Fructose-Konzentrationen	44
3.12	Analyse des Glucosetransfers in Hell- und Dunkelphasen	45
3.13	Analyse des Kohlenhydrattransfers in Flechtenscheiben nach Inkubation in einer ¹⁴ C-Glucose-Lösung	46
3.14	Induktion der Glucose-Freisetzung aus dem kultivierten <i>Nostoc</i>	47
3.15	Charakterisierung des Glucose-Imports während der Flechten-Symbiose	48
4	Diskussion	49
4.1	Die untersuchte Flechte <i>P. praetextata</i> stellt wie andere Flechten ein Habitat für Mikroorganismen dar.	49
4.2	Eine symbiosespezifische Expression von Glucosetransport- proteinen scheint nicht stattzufinden.	50
4.3	Der untersuchte <i>Nostoc</i> -Stamm exprimiert wahrscheinlich freilebend und lichenisiert zwei Glucosetransportproteine.	50
4.4	Die Abgabe von Saccharose und Trehalose durch <i>Nostoc</i> ist ein Schutzmechanismus während der Austrocknung.	52
4.5	Der Glucosetransfer basiert wahrscheinlich nicht auf einer extrazellulären Hydrolyse von Disacchariden.	54

4.6	Die Fructose-Freisetzung aus <i>Nostoc</i> ist wahrscheinlich auf Saccharose zurückzuführen.	55
4.7	Glycogen oder Saccharose ist die Quelle für den Glucosetransfer.	57
4.8	Im lichenisierten <i>Nostoc</i> kann ein Überschuss von Kohlenhydraten erzeugt werden, der zur Freisetzung von Saccharose und Maltose führt.	59
4.9	Ein Überschuss von Kohlenhydraten führt im kultivierten <i>Nostoc</i> wahrscheinlich zu einem <i>futile cycle</i> .	60
4.10	Der Kohlenhydrattransfer in <i>P. praetextata</i> und anderen Blaualgenflechten könnte auf einem <i>futile cycle</i> basieren.	65
4.11	Ausblick	67
5	Zusammenfassung	70
6	Literatur	71
7	Anhang	80

1 Einleitung

1.1 Evolution, Symbiose und Verbreitung von Flechten

Etwa 20 % aller bekannter Pilze gehen als Mycobionten mit Cyanobakterien (Cyanobionten) oder Grünalgen (Phycobionten) als Photobionten Flechten-Symbiosen ein (RAI, 2002). Pilze, die Flechten bilden, sind in 98 % der Fälle Ascomyceten. Wesentlich seltener findet man Deuteromyceten (1,6 %) oder Basidiomyceten (0,4 %) als Mykobionten vor. Flechten werden nach dem Mycobionten benannt, der – mit Ausnahme von Gallertflechten (Abschnitt 1.2) – sowohl die Form und Struktur der Flechte bestimmt als auch deren Hauptmasse bildet. Nach der Bestimmung ribosomaler DNA-Sequenzen sind Flechten mindestens fünfmal unabhängig voneinander in der Evolution entstanden (NULTSCH, 2001).

Die Entwicklung des Thallus in Kultur genommener Mycobionten setzt erst bei Kontakt mit dem Photobionten ein. In freilebender Form wachsen die meisten Mycobionten langsam und sind wenig konkurrenzfähig; zudem werden sie durch Freißfeinde dezimiert (NASH, 1996). Das Eintreten in die Flechten-Symbiose (Lichenisierung) ist für sie daher ökologisch obligat. Für Vertreter der Ordnung *Peltigerales* ist die Lichenisierung sogar physiologisch obligat, weil ihre Sporen ohne Photobionten nach dem Auskeimen kein Mycelium bilden können und nach zwei Wochen absterben (AHMADJIAN, 1993). Für die Photobionten erscheint die Symbiose hingegen in den meisten Fällen nicht obligat. Zwar ist die Grünalge *Trebouxia*, die in 20 % aller Flechten auftritt, bisher selten im freilebenden Zustand gefunden worden, dagegen umfassen Cyanobakterien-Gattungen wie *Gleocapsa*, *Nostoc* und *Scytonema* sowie die Grünalgen-Gattung *Trentepohlia* gewöhnlich freilebende und symbiotische Vertreter. Die Vertreter einer Pilz-Ordnung sind in der Regel bei der Flechten-Symbiose auf eine Photobionten-Gattung beschränkt, während die Photobionten ein Wirtsspektrum zeigen, das sich über verwandtschaftlich weiter entfernte Pilzgruppen erstrecken kann. So gehören die Photobionten in den meisten Vertretern der *Peltigerales* sowie in manchen Vertretern der *Lichinales* und *Arctomiaceae* zur Cyanobakterien-Gattung *Nostoc*. *Nostoc*-Arten gehen zudem Symbiosen mit verschiedenen Pflanzen und dem nicht-lichenisierten Pilz *Geosiphon pyriforme* ein, in dem sie intrazellulär lokalisiert sind (NASH, 1996). Die aus Exemplaren der gleichen Flechtenart isolierten *Nostoc*-Stämme sind oft mit Stämmen aus anderen Flechtenarten oder mit freilebenden Stämmen näher verwandt als untereinander. Demnach scheint die Evolution von Flechten nur in geringem Maße eine Koevolution der Symbiosepartner darzustellen (O'BRIEN et al., 2005). In bipartiten Flechten sind die Cyanobakterien bzw. Grünalgen die einzigen Symbiosepartner des Pilzes (RAI, 2002). Hingegen treten Cyanobakterien in tripartiten Flechten wie z. B. *Peltigera aptosa* oder *Nephroma arcticum* (MASUCH, 1993) zusammen mit Grünalgen als Photobionten auf und befinden sich von diesen räumlich getrennt in

köpfchenartigen Strukturen, den Cephalodien, während die Grünalgen im Thallus eine Schicht bilden (Abbildung 1.4). Es gilt hier zu beachten, dass die Unterscheidung zwischen bi- und tripartiten Formen ebenso wie die Einteilung in verschiedene Wuchsformen (Abschnitt 1.2) keine Rückschlüsse auf Verwandtschaftsverhältnisse der Flechten zulässt.

Der Mycobiont bildet eine äußere Rindenschicht (Cortex), die eine für den Photobionten zu intensive Lichteinstrahlung verhindert und eine Barriere gegen eindringende Mikroorganismen darstellt. Öffnungen im Cortex und Hohlräume im darunter befindlichen lockeren Hyphengeflecht, das als Mark (Medulla) bezeichnet wird, stellen selbst bei vollständiger Thallushydratation den Gasaustausch beider Symbiosepartner sicher (HONEGGER, 1991). Im Gegenzug liefern Phycobionten dem heterotrophen Mycobionten als Assimilate artspezifische Zuckeralkohole. Cyanobionten geben stattdessen in bipartiten Flechten Glucose ab (HILL, 1972) und setzen darüber hinaus Ammoniak als Primärprodukt der N_2 -Fixierung durch die Nitrogenase frei. In tripartiten Flechten übernehmen die Cyanobionten fast nur die Funktion der Stickstoffversorgung (FEIGE, 1976). Die Photobionten wachsen im lichenisierten Zustand langsamer als in freilebender Form; andererseits können sie in einem Flechtenthallus wahrscheinlich besser um Licht und Wasser konkurrieren und somit zusätzliche ökologische Nischen besetzen (RAI, 2002). Bisher wurde nicht gezeigt, dass der Photobiont den Mycobionten als Reservoir von Nährstoffen oder Mineralien nutzen kann (NASH, 1996). Für Mykorrhiza-Pilze ist hingegen die Versorgung der Zucker liefernden Pflanze mit Nährstoffen wie Phosphat (KARANDASHOV et al., 2004), Nitrat (HILDEBRANDT et al., 2002) oder Sulfat (RENNENBERG, 1999) dokumentiert.

(Blau)algen und Pilze haben in Form von Flechten Lebensräume erschlossen, in denen sie getrennt nicht existieren könnten. Flechten sind in fast allen terrestrischen Habitaten zwischen Tropen und Polarregionen anzutreffen (NASH, 1996). Aufgrund ihres langsamen Wachstums, ihrer geringen Größe und des hohen Lichtbedarfs stehen sie in Konkurrenz mit Höheren Pflanzen und prägen daher Vegetationsformen an Standorten, die für letztere zu trocken, zu kalt oder zu nährstoffarm sind (SCHÖLLER, 1997).

1.2 Wuchsformen, Thallusmorphologie und Fortpflanzung

Die verschiedenen Flechtenarten können fünf Kategorien von Wuchsformen zugeordnet werden, zwischen denen es Übergänge gibt (ESSER, 1976):

- a) Bei Gallertflechten wie *Collema* spec. wachsen die Pilzhyphen in den Gallerthüllen von Cyanobakterien.
- b) Die Pilzhyphen der Haar- oder Fadenflechten wie *Ephebe* spec. umspinnen die fädigen Algen bzw. Cyanobakterien.
- c) Krustenflechten (Abb. 1.1) sind fest an das Substrat angewachsen und können somit u.a. vertikale Flächen von Felsen, Baumrinden oder Betonmauern besiedeln. Eine Differenzierung dieser Wuchsform in einzelne Thalluslappen (Loben) geschieht selten. Endolithische Krustenflechten wachsen innerhalb des Gesteins.
- d) Die Blatflechten (Abb. 1.2) haben meist kreisrunde, dorsiventrale Thalli mit blattartigen Loben. Mit den aus Pilzhyphen bestehenden Rhizoiden oder Rhizoidsträngen (Rhizinen) haften sie am Substrat.
- e) Die Thalli der Strauchflechten (Abb. 1.3) sind verzweigt und an der Unterlage mit Rhizoiden oder einem Zentralstrang befestigt.



Abb. 1.1: *Lecanora spec.* Diese Krustenflechte wächst hier auf einer Betonmauer (Teilstrich: 1 cm). Der 4-fach vergrößerte Ausschnitt zeigt die einzelnen Apothecien.

(Foto von Stefan Wic, aufgenommen auf dem Campus der TU Kaiserslautern, 2005)



Abb. 1.2: *Peltigera praetextata*. Die Blaualgenflechte *P. praetextata* verbreitet sich u. a. auf Wiesen in Konkurrenz mit Moosen und Gräsern. Zu erkennen sind hier auch die Rhizinen an der Unterseite der Flechten und die fleischfarbenen Apothecien an den Thallusrändern.

(Foto von Stefan Wic, aufgenommen auf dem Campus der TU Kaiserslautern, 2005)



Abb. 1.3: *Evernia prunastri*. Die Strauchflechte *E. prunastri*, auch Eichenmoos genannt, wächst hier auf den Zweigen von *Acer campestre*. Der 4-fach vergrößerte Ausschnitt zeigt Thallus-Aufbrüche (Sorale, siehe Text).

(Foto von Stefan Wic, aufgenommen auf dem Campus der TU Kaiserslautern, 2005)

Gallert- und Haarflechten haben wie manche einfachen Formen von Krustenflechten (z.B. *Lepraria spec.*) einen homöomeren Thallus, in dem die Algen zerstreut vorliegen. Dagegen befinden sich die Photobionten im heteromeren Thallus der Blatt-, Strauch- und der meisten Krustenflechten in einer bestimmten Zone unterhalb des oberen Cortex. Darunter erstreckt sich das locker gepackte Mark (Abschnitt 1.1). Ein unterer Cortex, der wie der obere aus dicht anliegenden Hyphen besteht, findet man in den meisten Blattflechten. In der Blattflechten-Gattung *Peltigera* fehlt dieser allerdings (Abb.1.4); stattdessen befinden sich auf der Unterseite

des Lagers Rhizinen, die mikroskopisch betrachtet Bündel von verlängerten Markhyphen darstellen und durch Kapillarwirkung Wasser in die Flechte transportieren können. Bei anderen Blattflechten wie *Parmelia spec.* sind die Rhizinen wasserabweisende Fortsetzungen der unteren Rindenschicht. Strauchflechten zeigen eine zylindrische Anordnung von Cortex, Algenschicht und einem zentralen Mark (SCHÖLLER, 1996).

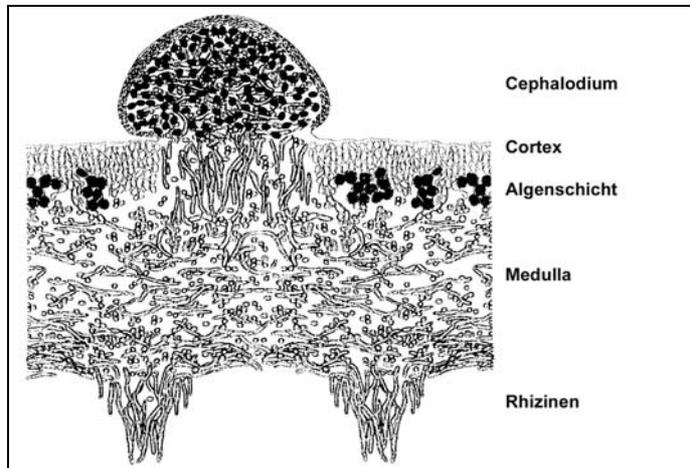


Abb.1.4: Schematischer Querschnitt durch den Thallus einer *Peltigera*-Art mit Cephalodien (RAI, 2002). In den köpfchenartigen Cephalodien einer solchen tripartiten Flechte befinden sich Cyanobakterien, während Grünalgen eine Schicht unter dem Cortex bilden.

Artabhängig treten die Symbiosepartner der heteromeren Grünalgenflechten in Form von Wand-an-Wand-Anlagerungen in Kontakt oder die Pilzhyphen entwickeln interparietale Haustorien, die die Photobionten-Zellen eindrücken, ohne in diese einzudringen. Die Pilzhyphen morphologisch komplexerer Blaualgenflechten wachsen in die Gallerte der Cyanobakterien, wobei sich die Zellwände von Mycobiont und Photobiont aneinander lagern können oder getrennt bleiben. Die Mycobionten vieler Grünalgen- und Blaualgenflechten bilden Haustorien, mit denen sie die Zellwand der Photobionten durchbohren (SCHÖLLER, 1996).

Flechten können sich mittels Thallusbruchstücken, Soredien oder Isidien ungeschlechtlich fortpflanzen. Soredien sind Portionen von Algenzellen, die von Pilzhyphen umspinnen sind. Sie entstehen durch Wucherungen in der Algenschicht und werden bei Trockenheit nach Aufbrechen der Rindenschicht mit dem Wind verbreitet. Sorale sind die Aufbruchstellen des Thallus, an denen die Soredien produziert werden (Abb. 1.3). Isidien entstehen als Ausstülpungen der Rinde, denen Teile der Algenschicht anhaften. Sie lösen sich ebenfalls bei Trockenheit vom Thallus ab und werden mit dem Wind verbreitet (ESSER, 1976). In der Symbiose ist nur der Mycobiont zur sexuellen Fortpflanzung fähig; er unterdrückt die sexuelle Fortpflanzung des Photobionten und lässt ausschließlich die vegetative Vermehrung zu. Die seltenen lichenisierten Basidiomyceten bilden als Fruchtkörper Basidiocarpien, die sich von denjenigen im freilebenden Zustand kaum unterscheiden. Dagegen sind die Fruchtkörper der Ascomyceten-Flechten, die Ascocarpien, unmittelbarer Bestandteil des Flechten-Thallus. Sie können degeneriert sein oder fehlen, so dass die Vermehrung ausschließlich vegetativ erfolgt (SCHÖLLER, 1996).

1.3 Poikilohydrie, Kohlenhydrat- und Stickstoffmetabolismus

Eine Voraussetzung für die dauerhafte Besiedlung von Standorten, die für Höhere Pflanzen zu trocken sind, bildet die poikile Lebensweise der Flechten; wie Moose und Luftalgen treten Flechten beim Austrocknen in einen anabiotischen Zustand mit minimaler Stoffwechselaktivität über, um bei erneuter Feuchtigkeitszufuhr reaktiviert zu werden. Im Gegensatz hierzu sind Höhere Pflanzen homoiohydrisch: Sie halten ihren Wassergehalt konstant, indem sie über die Wurzel Wasser aufnehmen und mit den verschließbaren Stomata sowie mit der wachsartigen Cuticula einem unkontrollierten Wasserverlust entgegenwirken.

Der größte Wasseranteil befindet sich bei Flechten in den stark quellbaren Zellwänden der Pilzhyphen, wohingegen bei Moosen und Gefäßpflanzen das Wasser hauptsächlich intrazellulär lokalisiert ist (SCHÖLLER, 1996). Für die Kultivierung einiger Flechten wurde gezeigt, dass abwechselnde Phasen von Trockenheit und Feuchtigkeit notwendig sind. Aquatische Flechten und solche, die unter extrem humiden Bedingungen wachsen, sind hingegen trockenheitsempfindlich (NASH, 1996).

Zwei bis vier Minuten nach Befeuchtung einer Flechte ist die respiratorische CO₂-Freisetzung messbar. Die Photosynthese vieler Grünalgenflechten kann bereits durch die Feuchtigkeit bei Nebel oder Taubildung aktiviert werden; Blaualgenflechten benötigen hierfür flüssiges Wasser (RAI, 2002). In *Peltigera leucophlebia* und *Collema auriculatum* beginnt die Photosynthese 30 bis 40 Minuten nach der Befeuchtung, was den längsten bisher gemessenen Aktivierungszeiten entspricht (LANGE et al., 1986).

Der Photosyntheseapparat der gram-negativen Cyanobakterien ähnelt in Funktion und Aufbau demjenigen der eukaryontischen Grünalgen und Landpflanzen. So setzen beide Organismengruppen aus der Oxidation von Wasser Sauerstoff frei und die gleichartig aufgebauten Photosysteme I und II befinden sich in den Thylakoidmembranen. Während jedoch die Thylakoide der Cyanobakterien frei und ungestapelt in gleichen Abständen im Cytoplasma vorliegen, befinden sich die Thylakoide der Grünalgen und Landpflanzen gestapelt und untereinander verbunden in den Chloroplasten. Neben den Carotinoiden, die nicht nur in den Thylakoidmembranen, sondern auch in der Plasmamembran und in der Zellwand lokalisiert sind, enthalten Cyanobakterien als weitere akzessorische Pigmente Phycobiliproteine. Diese sind in kugel- oder scheibenförmigen Assoziationen, den Phycobilisomen, an den Thylakoidmembranen verankert. Zu den Phycobiliproteinen gehören die blauen Phycocyanine und Allophycocyanine sowie die roten Phycoerythrine. Deren Chromophore, die Phycobiline, geben den Cyanobakterien je nach anteilmäßiger Zusammensetzung, die artabhängig und

umweltbedingt ist, eine grüne, blaugrüne, violette oder rötliche Färbung. Das grüne Chlorophyll a kann hierbei maskiert werden; Chlorophyll b und c fehlen. Die Atmung und Photosynthese der eukaryontischen Algen und Landpflanzen finden räumlich getrennt in den Mitochondrien beziehungsweise Chloroplasten statt. In Cyanobakterien fehlen diese Organellen ebenso wie Kernhülle oder Endoplasmatisches Retikulum. Ihre Thylakoide sind gleichzeitig der Ort der Photosynthese und der Atmung, die auch an der Plasmamembran stattfindet (VAN DEN HOEK, 1993).

Flechten zeigen für das Erreichen der maximalen Photosyntheserate einen artspezifischen optimalen Wassergehalt. Wird dieser überschritten, kommt die geringe CO_2 -Diffusionsrate im Wasser zum Tragen, die in der Luft 10 000-fach höher ist (GREEN et al., 1985). Für die Cyanobionten *Nostoc* und *Calothrix* sowie für die Phycobionten aus der Gattung *Trebouxia* konnten CO_2 -Konzentrierungsmechanismen (CCMs) nachgewiesen werden, die eine herabgesetzte CO_2 -Diffusion und die geringe CO_2 -Affinität der RUBISCO teilweise kompensieren (RAI, 2002). Der CCM der Cyanobakterien (Abb. 1.5) basiert auf HCO_3^- -Transportern in der Plasmamembran, die artabhängig primär- oder sekundäraktiv sind, und auf NAD(P)H-Dehydrogenasen in der Thylakoidmembran, die CO_2 zu HCO_3^- reduzieren. Im Gegensatz zu CO_2 kann das geladene HCO_3^- nicht durch Membranen diffundieren. An polyedrischen Proteinkörpern des Cytosols, den Carboxysomen, wird HCO_3^- schließlich durch die Aktivität von Carboanhydrasen verstärkt in CO_2 umgesetzt, das durch die RUBISCO direkt fixiert und in den Calvin-Cyclus eingeschleust werden kann, so dass nur wenig CO_2 in die Umwelt zurück diffundieren kann. Die CCMs eukaryontischer Algen umfassen den aktiven Transport von HCO_3^- und CO_2 an der Plasmamembran und inneren Chloroplastenmembran. (GIORDANO et al., 2005).

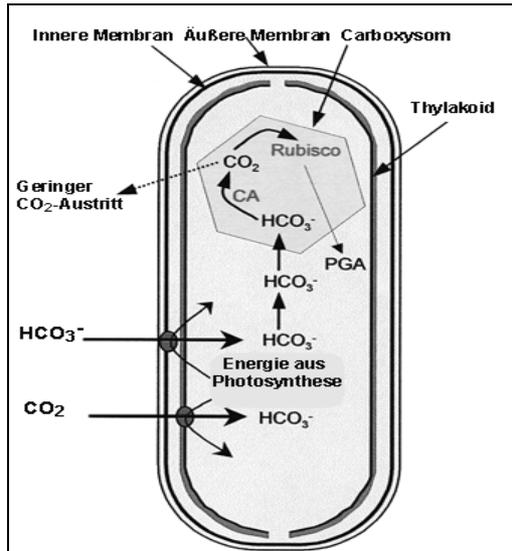


Abb. 1.5: Schema zum CO₂-Konzentrierungsmechanismus von Cyanobakterien (modifiziert nach BADGER & PRICE, 2003).

CA = Carboanhydrase; PGA = Phosphoglycerat

Die vom Photobionten ausgeschiedenen Kohlenhydrate werden vom Mycobionten aufgenommen und in Mannitol umgewandelt. Mannitol ist als osmotisch aktive Substanz für den Turgordruck notwendig, der das Hyphenwachstum ermöglicht. Zudem könnte Mannitol während längerer Dunkelheit ein Substrat für die Atmung darstellen und an der Austrocknungstoleranz des Pilzes mitwirken, weil es bei Wassermangel Proteine und Membranen stabilisieren kann (RAI, 2002).

Cyanobionten setzen in tripartiten Flechten keine oder sehr wenig Glucose (FEIGE, 1976), aber sowohl in bi- als auch tripartiten Formen stets Ammoniak frei (Abschnitt 1.1), das vom Mycobionten aufgenommen und über die Glutamatdehydrogenase mit α -Ketoglutarat in Glutamat fixiert und somit für die Aminosäure- und Proteinsynthese verfügbar wird. Die Ausscheidung des durch die Nitrogenase fixierten Stickstoffs ist darauf zurückzuführen, dass die Expression der cyanobakteriellen Glutaminsynthetase (GS) während der Symbiose stark herabgesetzt ist und überschüssiges Ammoniak freigesetzt wird (RAI, 2002). Die herabgesetzte Expression der GS ist wahrscheinlich auf eine endogene Regulation des Photobionten zurückzuführen. So könnte eine Ursache die Immobilisierung der Photobionten im Thallus sein, denn nach DUAN et al. (1994) führt eine auf Polyurethan erfolgte Immobilisierung von *Anabaena* zur verringerten Synthese der GS. Ein anderer oder weiterer Faktor zur Reduktion der GS-Expression könnte die microaerobe Umwelt im Thallus darstellen, der zum Großteil aus dem Sauerstoff verbrauchenden Mycobionten besteht. Einen Hinweis darauf liefert die verminderte GS-Expression von Rhizobien durch die microaeroben Bedingungen während der Symbiose mit Leguminosen (QUISPEL, 1992).

Ort der Stickstofffixierung in mehrzelligen Cyanobakterien aus den Ordnungen *Nostocales* und *Stigonematales* sind die Heterocysten, durch deren verstärkte Zellwand gerade soviel Sauerstoff aus der Umwelt diffundiert, dass er in der Atmung verbraucht wird, ohne die

sauerstoffempfindliche Nitrogenase schädigen zu können. Das Sauerstoff produzierende Photosystem II fehlt hier, während das Photosystem I ATP und NADPH bildet (VAN DEN HOEK, 1993). Heterocysten geben den fixierten Stickstoff in Form von Glutamin an benachbarte vegetative Zellen ab und nehmen von ihnen fixierten Kohlenstoff wahrscheinlich in Form von Saccharose auf (CURATTI et al., 2002). Ammoniak und Nitrat hemmen die Entwicklung von Heterocysten (MEEKS, 2002).

1.4 Hypothesen und Untersuchungen zum Kohlenhydrattransfer in Flechten

Die Ursache und Art des Kohlenhydrattransfers in Flechten sind Gegenstand einer seit Jahrzehnten andauernden Diskussion. DREW und SMITH (1967) führten zur Identifizierung der transferierten Zucker Inhibitionsversuche ein. Diese basieren darauf, dass Flechtenscheiben, die bei Zugabe von $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ in einem flüssigen Medium inkubieren, den radioaktiv markierten Zucker, der gewöhnlich vom Mycobionten aufgenommen wird, in das Medium freisetzen, wenn derselbe Zucker in nicht-markierter Form als konkurrierendes Substrat für die Transportproteine des Pilzes dem Medium zugeführt wird. So konnte gezeigt werden, dass Cyanobionten Glucose und Phycobionten einen artspezifischen Zuckeralkohol freisetzen (HILL, 1972).

Zu den Mechanismen, die hinter der Kohlenhydrat-Freisetzung stehen, wurden verschiedene Modelle entworfen. HILL (1972) spekulierte, dass der Mycobiont in Grünalgen- und Blaualgenflechten Zuckeralkohole bzw. Glucose aufnimmt, die er enzymatisch aus der Zellwand des Photobionten freisetzt. Das für die Cyanobionten als Glucosequelle postulierte Glucan wurde später durch Autoradiographie von Ultradünnschnitten ausschließlich intrazellulär lokalisiert (PEVELING & HILL, 1974), was für eine direkte Freisetzung der Glucose aus der Zelle spricht. Das Vorliegen eines intrazellulären Glucans in Form von Glycogen-Partikeln als Reservestoff hat sich für Cyanobakterien als charakteristisch herausgestellt (VAN DEN HOEK, 1993). Dennoch wurde HILLS Hypothese, dass der Mycobiont der Blaualgenflechten die extrazellulären Polysaccharide des Photobionten als Glucosequelle nutzt, später ohne Einwände oder Belege wiederholt (HONEGGER, 1991; RAI, 2002).

Noch bevor das intrazelluläre Vorkommen des Glucans gezeigt wurde, stellten HILL & AHMADJIAN (1972) die Hypothese auf, dass der Phycobiont bzw. Cyanobiont wegen Nährstoff-Limitationen langsamer wächst und deshalb überschüssige Kohlenhydrate bildet, die er freisetzt. Es wurde von ihnen festgestellt, dass in vielen Flechten wenige Nährstoffe verfügbar sind. Eine nährstoffreiche Umgebung sollte dazu führen, dass der photosynthetisch fixierte Kohlenstoff mehr für das Wachstum des Photobionten und weniger für die Kohlenhydrat-Freisetzung genutzt wird. Diese Annahme wurde mit der Beobachtung begründet, dass in

stickstoffreicher Flüssigkeit der Photobiont *Nostoc spec.* aus den Thalli von *Peltigera praetextata* herauswachsen konnte. Für den Fall von Stickstoffmangel wurde dieser Zusammenbruch der Symbiose nicht beobachtet (SCOTT, 1960). So wie ein Überschuss an Nährstoffen ein Ende der Symbiose zu verursachen scheint, ist ein Nährstoffmangel nach AHMADJIAN (1967 a) Voraussetzung dafür, dass Photobiont und Mycobiont in Resynthese-Experimenten eine Flechte bilden. Demnach könnten Nährstoff-Limitationen am Wuchsort nicht nur als Konkurrenzvorteil von Flechten gegenüber Höheren Pflanzen, sondern zugleich als physiologische Grundlage der Flechtenontogenese verstanden werden.

Nach CHAMBERS et al. (1976) sind für den Glucosetransfer in Blaualgenflechten vier Erklärungsansätze möglich:

(1) Der Pilz verändert die Umwelt des Cyanobakteriums und beeinflusst dadurch indirekt den Kohlenstoff-Metabolismus, so dass Glucose akkumuliert und über erleichterte Diffusion freigesetzt wird. Ausgeschiedene Stoffwechselprodukte des Pilzes scheinen hierbei keine manipulierende Funktion einzunehmen, da die Glucoseausscheidung des Photobionten auch dann erfolgt, wenn die Transportprozesse des Pilzes inklusive Glucose-Aufnahme durch Behandlung mit Digitonin inhibiert werden.

Anmerkung: Die vorgestellte Hypothese von HILL & AHMADJIAN (1972), dass die Glucose-Abgabe durch die oligotrophe Umwelt des Photobionten induziert wird, kann als eine konkrete Ausformulierung dieses Erklärungsansatzes betrachtet werden.

(2) Der Photobiont exprimiert in der Flechte ein symbiosespezifisches Transportprotein für den Glucose-Export.

Diese Vorstellung wurde später von WASTLHUBER (1996) aufgegriffen.

(3) Durch den Kontakt des Photobionten mit der geladenen Zellwand des Pilzes werden die Glucosetransporter des Photobionten bezüglich Konformation, Transportrate, Transportrichtung oder Affinität verändert.

(4) Der Pilz hemmt an den Kontaktstellen des Photobionten unbekannte Kontrollmechanismen, die normalerweise einen Metaboliten-Ausfluss aus den Zellen verhindern.

WASTLHUBER (1996) favorisierte für die von ihm untersuchte Blaualgenflechte *Peltigera polydactyla* den zweiten Erklärungsansatz, indem er ein symbiosespezifisch exprimiertes Transportprotein für den Glucose-Export und ein außerhalb der Symbiose exprimiertes Transportprotein für den Glucose-Import postulierte. Diese Annahme war die Schlussfolgerung aus mehreren Versuchsergebnissen: Der Photobiont *Nostoc spec.* setzte innerhalb der ersten

Stunde nach der Isolation mit sinkender Rate Glucose frei. Für diese Zeitspanne wurden eine unverändert hohe intrazelluläre Konzentration von Glucose, Glucose-6-phosphat und unverändert große Mengen Glycogen festgestellt. Auch die Aktivität der Glycogen abbauenden Disproportionierenden Transglykosylase (D-Enzym) blieb wie die Rate des Glucose-Imports bis zum Ende der Glucose-Freisetzung konstant. Weil für die schnell sinkende Glucose-Abgabe weder Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel noch ein erhöhter Glucose-Import verantwortlich gemacht werden konnten, wurde davon ausgegangen, dass über die Expression von Transportproteinen die Abgabe und Aufnahme von Glucose kontrolliert werden. Schließlich wurden Teilsequenzen von putativen Glucosetransportern identifiziert, die nach Untersuchungen mittels Reverse-Transkriptase-PCR während bzw. außerhalb der Symbiose vom Photobionten exprimiert werden sollten.

Schwer vereinbar mit dem hier vorgestellten Modell einer symbiosespezifischen Glucosetransporter-Expression sind Beobachtungen von MEINDL & LOOS (1990), die zeigten, dass auch kultivierte Photobionten, wenn auch in sehr geringem Maße, Glucose freisetzen. Die Glucose-Freisetzung aus dem kultivierten *Nostoc spec. aus Peltigera horizontalis* konnte im Dunkeln durch Zugabe von FCCP oder NaN_3 um ein Vielfaches erhöht werden. Der Grund hierfür könnte nach MEINDL & LOOS (1990) eine erhöhte Abbaurate des Glycogens sein. Auch ein freilebender Stamm von *Nostoc punctiforme* zeigte bei Behandlung mit FCCP im Dunkeln eine erhöhte Glucose-Abgabe.

1.5 Erläuterungen zur Cyanobakterien-Gattung *Nostoc*

Die Cyanobakterien-Gattung *Nostoc* umfasst mehr als 100 überwiegend im Süßwasser lebende Arten. Einige dieser kettenförmig und unverzweigt wachsenden Blaualgen können mit Pilzen oder Pflanzen Symbiosen eingehen (Abschnitt 1.1 und 1.3). Die gebogenen Ketten, auch Trichome genannt, sind gruppenweise von einer gemeinsamen extrazellulären Polysaccharidschicht (EPS) umgeben, in der sie ungerichtet wachsen. Für die Ordnung *Nostocales* mit den Gattungen *Nostoc*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Scytonema* und *Rivularia* ist die Bildung von Heterocysten zur Stickstofffixierung ebenso charakteristisch wie die Entwicklung von Akineten. Diese ebenfalls großen dickwandigen Zellen enthalten Reservestoffe und fungieren als Überdauerungsstadien bei Trockenheit, Kälte oder Nährstoffmangel. Die Vermehrung der *Nostocales* erfolgt über Hormogonien, die abgestoßene motile Fadenstücke darstellen (VAN DEN HOEK, 1993).

Eine neue Grundlage zur Erforschung der Gattung *Nostoc* und cyanobakterieller Symbiosen stellt das sequenzierte etwa 10 Mb große Genom des *Nostoc punctiforme* - Stamms ATCC 29133 (PCC 73102) dar (MEEKS et al., 2001). Dieser Stamm wurde aus der Wurzel der Cycade *Macrozamia* spec. isoliert. Er konnte mit weiteren Pflanzen, dem Bryophyten *Anthoceros punctatus* und der Angiosperme *Gunnera* spp., Symbiosen eingehen, bei denen er fixierten Stickstoff als Ammoniak freisetzt und gleichzeitig Glucose aufnimmt. *N. punctiforme* kann zudem als intrazellulärer Symbiont in *Geosiphon pyriforme* vorkommen und an diesen Pilz (nicht identifizierte) Produkte der Photosynthese und Stickstofffixierung abgeben (MARTIN, 2005). Für das heterotrophe Wachstum in Kultur oder in Symbiose mit Pflanzen können ausschließlich Glucose, Fructose und Saccharose genutzt werden. Gene für eine putative Invertase und Saccharose-Synthase sind konsistent mit der Kapazität von *N. punctiforme*, Saccharose zu synthetisieren und abzubauen. 262 Gene codieren putative Transportproteine für kleine organische oder anorganische Moleküle. Entsprechend den Genomanalysen existieren insbesondere Transportproteine für Ribosen und Hexosen, jedoch finden sich keine Hinweise auf ein Phosphotransferasesystem wie in *Escherichia coli* oder anderen Enterobakterien (MEEKS et al., 2001).

Nach SUMMERS et al. (1995) können zum Energiestoffwechsel folgende Aussagen getroffen werden: Wie andere Cyanobakterien generiert *N. punctiforme* durch die photosynthetischen Lichtreaktionen ATP und NADPH für die Kohlenstofffixierung im Calvin-Cyclus und synthetisiert währenddessen Glycogen als Speicherkohlenhydrat, das nachts abgebaut wird. Der OPP generiert NADPH für die N₂-Fixierung und Respiration in Heterocysten; zudem ermöglicht er das Wachstum vegetativer Zellen im Dunkeln. Das Endprodukt des OPPs, Ribulose-5-phosphat, wird in Glycerinaldehyd-3-phosphat und Fructose-6-phosphat umgewandelt. Beide Metabolite werden im Verlauf der Glycolyse zu Pyruvat umgesetzt.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Mit der vorliegenden Diplomarbeit wurde der Versuch unternommen, einen genaueren Einblick in den Kohlenhydrattransfer vom Cyanobionten zum Mycobionten in einer bipartiten Blattflechten-Art der Gattung *Peltigera* zu erlangen. Die im Mittelpunkt stehenden Fragen lauten:

1. Kann neben der Freisetzung von Glucose auch die Freisetzung anderer Zucker durch den lichenisierten oder kultivierten Photobionten induziert werden?
2. Welche Faktoren inhibieren oder verstärken den Kohlenhydrattransfer in der Flechte?
3. Durch welchen Transportmechanismus wird Glucose importiert?
4. Welche Bedeutung hat der Glucose-Import während der Symbiose?
5. Können die gewonnenen Daten mit einem Modell zum Kohlenhydrattransfer erklärt werden?

Grundlagen zur Klärung dieser Fragen waren die Wahl einer für die Forschung zugänglichen *Peltigera*-Art, Kultivierung ihres Photobionten *Nostoc spec.*, Datenbankanalysen, Inhibitionsversuche in Anlehnung an DREW und SMITH (1967) (Abschnitt 1.4), Dünnschichtchromatographien, Aufnahmeversuche mit ^{14}C -Glucose und molekularbiologische Arbeiten zur Herstellung einer Glucosetransporter defizienten Mutante von *Nostoc*.

2 Material und Methoden

2.1 Isolierung und Anzucht von *Nostoc spec.*

Die gewaschenen Thalli von *Peltigera praetextata* wurden mit einer Rasierklinge in feine Streifen geschnitten und in flüssigem Bg11-Medium inkubiert. Herauswachsende Algenaggregate wurden in Bg11₀-Medium überführt, um mit der einhergehenden Stickstofflimitation das Wachstum der N₂-fixierenden Photobionten gegenüber nicht N₂-fixierenden Organismen zu begünstigen. Die Isolierung und Kultivierung von *Nostoc* erfolgte bei 30°C und einer Lichtintensität von 40 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Flüssigkulturen inkubierten bei 130 rpm in Erlenmeyer-Kolben verschiedener Größen. Das Bg11-Medium und Bg11₀-Medium (CASTENHOLZ, 1988) wurden mit vier Stocklösungen folgender Zusammensetzung zubereitet:

Stocklösung 1

Na ₂ Mg EDTA	0,1 g/l
Eisenammoniumcitrat	0,6 g/l
Zitronensäure • 1 H ₂ O	0,6 g/l
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	3,6 g/l

Stocklösung 2

MgSO ₄ • 7 H ₂ O	7,5 g/l
--	---------

Stocklösung 3

K ₂ HPO ₄ • 3 H ₂ O	4,0 g/l
--	---------

Stocklösung 4

H ₃ BO ₃	2,86 g/l
MnCl ₂ • 4 H ₂ O	1,81 g/l
ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	0,22 g/l
CuSO ₄ • 5 H ₂ O	0,08 g/l
COCl ₂ • 6 H ₂ O	0,05 g/l
NaMoO ₄ • 2 H ₂ O	0,39 g/l

Die autoklavierten Stocklösungen wurden zusammengegeben und für beide Medien mit Natriumcarbonat versetzt. Dem Bg11-Medium wurde zusätzlich Natriumnitrat zugefügt (Tab. 2.1).

Tab.2.1: Zusammensetzung des Bg11- und Bg11₀-Mediums

Stocklösung bzw. Substanz	pro Liter Medium
Stocklösung 1	10 ml
Stocklösung 2	10 ml
Stocklösung 3	10 ml
Stocklösung 4	1,0 ml
Na ₂ CO ₃	0,02 g
NaNO ₃	1,5 g (nur für Bg11)

Der pH-Wert wurde auf 7,5 (HCl) eingestellt. Nach dem Autoklavieren sank der pH-Wert auf etwa 7,1. Für feste Medien wurde 1 % Pflanzenagar hinzugefügt.

2.2 Anzucht von *Escherichia coli* (*E. coli*)

Für die Vermehrung von Plasmidvektoren wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* XL1-Blue verwendet (BULOCK et al., 1987). *E. coli* wurde über Nacht unter aeroben Bedingungen bei 37°C in YT-Medium (SAMBROOK et al., 2001) angezüchtet bzw. zur Regeneration nach einer Transformation (Kap. 2.5) in ΨB-Medium inkubiert (HANAHAN, 1983).

YT-Medium

0,8 % (w/v) Pepton

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt

0,25 % (w/v) NaCl

pH 7,0 (NaOH)

1,5 % (w/v) Agar

ΨB-Medium

2 % (w/v) Pepton

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt

0,4 % (w/v) MgSO₄

10 mM KCl

pH 7,6 (KOH)

Die Medien wurden für 20 Minuten bei 120°C autoklaviert. Zur Herstellung von Selektionsmedien wurden die entsprechenden Antibiotika (Tab 2.2) den auf ca. 60°C abgekühlten Medien hinzugefügt.

Tab. 2.2: Konzentrationen der Antibiotika in den Selektionsmedien für *E. coli*

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	200 µg/ml
Tetracyclin (Tet)	10 µg/ml
Kanamycin (Kan)	25 µg/ml

2.3 Plasmid-Vektoren und Oligonukleotidprimer

Für Klonierungszwecke wurde der eine Ampicillin-Resistenz codierende Plasmidvektor Blueskript SK (pBSK, 2958 bp) der Firma Stratagene (Heidelberg) verwendet. Ein weiterer Plasmidvektor, pET42a (Merck, Darmstadt) diente als Template zur Amplifikation einer Sequenz für die Kanamycin-Resistenz, mit welcher Mutanten von *Nostoc* selektiert werden sollten. Im Rahmen der molekularbiologischen Arbeiten wurden ferner Oligonucleotid-Primer für die PCR-Reaktionen (Kap 2.8) eingesetzt (Tab. 2.3). Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Für die Amplifikation der Teilsequenz des putativen Glucosetransporters aus *Nostoc* wurden die Primer glucdown2 und glucup2 konstruiert. Die Amplifikation der Sequenz für die Kanamycinresistenz auf pET42a erfolgte mit Kan42alldown und Kan42allup. Die Primer t3 und t7 flankieren beim Binden die *multiple cloning site* (MCS) des pBSK-Vektors. Sie wurden für die Sequenzierung der Teilsequenz des putativen Glucosetransporters aus *Nostoc* herangezogen.

Tab. 2.3: Verwendete Oligonucleotid-Primer

Primername	Basensequenz
glucdown2	5'-GC[C,T]1) TGG CG[T,C] TGG ATG TT[C,T] TGG-3'
glucup2	5'-CCC A[A,G]C AAG CAC CCA AAC [T,A]AT [G,C]GG CC-3'
Kan42alldown	5'-TTT CAG GTG GCC ATT TTC GGG GAA ATG TGC G-3'
Kan42allup	5'-AGC TCT TGA TCT GGC CAA CAA ACC ACC GCT G-3'
T3	5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA-3'
T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG-3'

1) Anmerkung: Die eckigen Klammern weisen auf degenerierte Bereiche in den Primern hin. So bedeutet z.B. [C,T], dass in 50 % der Primer ein Cytosin durch ein Thymin ersetzt ist.

2.4 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Hitzeschocktransformationen (Kap. 2.5) wurden kompetente *E. coli*-Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode (HANAHAN, 1983) hergestellt. Kompetente Zellen zeigen gegenüber unbehandelten Zellen eine erhöhte Aufnahmebereitschaft für DNA und somit eine erhöhte Transformationsrate. Zunächst erfolgte über Nacht die Anzucht einer Vorkultur bei 37°C unter aeroben Bedingungen. Die Vorkultur wurde in 100 ml ΨB-Medium 1:100 verdünnt und bis zu einer optischen Dichte von 0,5 weiter angezogen. Hierbei wurde die optische Dichte in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Die Zellen wurden für 10 Minuten auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (5 000 g, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde anschließend in 40 ml TFB1-Medium resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 10 Minuten und nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 4 ml TFB2-Medium aufgenommen. Die somit gewonnenen kompetenten Zellen wurden umgehend in Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C. Während dieser Arbeitsschritte wurden die Ansätze, Medien und die verwendeten Glaspipetten fortwährend gekühlt.

TFB1-Medium

30 mM Kaliumacetat
50 mM MnCl₂
100 mM RbCl
10 mM CaCl₂
15 % (v/v) Glycerin
pH 5,8 (Essigsäure)

TFB2-Medium

10 mM Na-MOPS (pH 7)
75 mM CaCl₂
10 mM RbCl
15 % (v/v) Glycerin

2.5 Hitzeschocktransformation von *E. coli*

Um die nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellten kompetenten Zellen (Kap. 2.4) zu transformieren wurde jeweils ein Aliquot auf Eis aufgetaut. Nach Hinzufügen der einzubringenden DNA inkubierten die Zellen für 30 Minuten auf Eis. Danach erfolgte ein Hitzeschock in einem Wasserbad bei 42°C für 60 s. Die Zellen wurden danach für 5 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend unter aeroben Bedingungen bei 37°C für ein bis zwei Stunden in ΨB-Medium zur Regeneration inkubiert. Zur Selektion wurden die Bakterien auf YT-Agarplatten, die die entsprechenden Antibiotika enthielten, ausplattiert, so dass aerob bei 37°C über Nacht Kolonien der transformierten Bakterien heranwachsen konnten.

2.6 Transformation von *Nostoc*

Um die *Nostoc*-Zellen zu transformieren, wurde die Methode der Elektroporation in Anlehnung an MEEKS (<http://microbiology.ucdavis.edu/meekslab/xpro4.htm>) angewandt. Dabei entstehen durch elektrische Pulse kurzzeitig Poren in der Plasmamembran, durch die DNA in die Zellen gelangen kann. Diese Technik wird für Zellen angewendet, die mit anderen Methoden nur unzureichend transformiert werden können (LOTTSPREICH & ZORBAS, 1998).

20 ml *Nostoc*-Kultur wurden zur Vereinzelung der Zellen am Branson Sonifer 250 sonicator (Branson Ultrasonics Corp.) mit Ultraschall behandelt (20 Schallstöße, 50 % dutycycle, Output: 0,1). Die Zellen wurden pelletiert und zur Regeneration für 6 Stunden in Bg11-Medium inkubiert. Vor der Elektroporation wurden die Zellen viermal mit 10 ml H₂O bei Raumtemperatur gewaschen. Nach dem Zentrifugieren wurde das Pellet in 1 ml H₂O aufgenommen und mit 5 bis 10 µg DNA versehen. Die DNA-Lösung und die Küvetten wurden vor ihrer Verwendung auf Eis abgekühlt. Die Elektroporation erfolgte am E.coli Pulser (BIO-RAD, München) mit 1,6 kEV. Direkt danach wurden die Zellen in einem Regenerationsmedium aufgenommen und über Nacht bei 30°C inkubiert.

Regenerationsmedium

Bg11₀-Medium mit
2,5 mM NH₄Cl
5 mM MOPS
20 mM MgCl₂

Die Zellen wurden schließlich zur Selektion auf Bg11₀-Platten mit einer Kanamycin-Konzentration von 5, 10 und 20 µg/ml ausplattiert.

2.7 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* für DNA-Sequenzierungen, Restriktionsanalysen oder Ligationen basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (BIRNBOIM & DOLY, 1979) und den unterschiedlichen Präzipitationseigenschaften von Plasmid-DNA, chromosomaler DNA, Proteinen und RNA (SAMBROOK et al., 2001). Für die Mini-Plasmid-Isolierung wurden je 1,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl ribonucleasehaltigem Puffer 1 resuspendiert. Durch das Zufügen von 200 µl Puffer 2 wurde die Lyse der Zellen mit Natriumdodecylsulfat (SDS) eingeleitet. Freigesetzte chromosomale DNA und Proteine wurden durch die in Puffer 2 enthaltene Natronlauge denaturiert. Mit 200 µl Puffer 3 wurde das Bakterienlysat neutralisiert. Gleichzeitig wurden hierbei Proteine und DNA als Salz-Detergens-Komplexe ausgefällt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 20 000 g und 4°C, so dass nur die Plasmide im Überstand blieben. Die Plasmide wurden mit 0,7 Volumen 2-Propanol bei erneuter Zentrifugation (10 min, 20 000 g, 4°C) gefällt. Anschließend wurde das Pellet mit 300 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einer vierten Zentrifugation (5 min, 20 000 g, 4°C) wurde das Pellet unter der Sterilbank getrocknet und in 40 µl H₂O aufgenommen.

Puffer 1

50 mM Tris, pH 8 (HCl)

10 mM EDTA

0,1 mg/ml Ribonuclease

Puffer 2

0,5 M NaOH

1 % (w/v) SDS

Puffer 3

3 M Kaliumacetat, pH 5,8

2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) ermöglicht die Amplifikation geringster Mengen an DNA (SAIKI et al., 1987). Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

- 1) Denaturierung der DNA bei erhöhter Temperatur (94 - 95°C)
- 2) Hybridisierung der Oligonucleotidprimer mit der komplementären DNA bei erniedrigter Temperatur (40 - 65°C).
- 3) Synthese der komplementären Stränge (Elongation) mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase wie pfu oder taq im Temperaturoptimum des Enzyms (72°C). Als Substrate dienen die vier Desoxyribonucleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP.

Ein PCR-Ansatz enthielt standardmäßig folgende Komponenten:

Template-DNA (5-100 ng/µl)		x µl
Primer, forward (20 pmol)	1,0 µl	
Primer, reverse (20 pmol)	1,0 µl	
dNTP-Mix (10 mM)		1,0 µl
Reaktionspuffer (10-fach)	5,0 µl	
taq- bzw. pfu-DNA-Polymerase	0,5 µl	
H ₂ O		ad 50,0 µl

Im Rahmen einer Kolonie-PCR wurde ein Teil einer Bakterien-Kolonie statt einer DNA-Lösung für den Reaktionsansatz verwendet. Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem Thermoblock der Firma Biometra (Göttingen).

2.9 DNA-Sequenzierung

Die klonierte Teilsequenz des putativen Glucosetransporters aus *Nostoc* wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode (SANGER et al., 1977) im Nano-Bio-Zentrum der Technischen Universität Kaiserslautern sequenziert.

2.10 DNA-Restriktion

Restriktion bedeutet hier das gezielte Schneiden doppelsträngiger DNA mit Restriktionsenzymen. Diese erkennen spezifische DNA-Abschnitte und spalten hier Phosphodiesterbindungen. DNA-Restriktionen waren im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Identifizierung von Konstrukten und für die Ligation (Kap. 2.11) notwendig. Die Restriktionsenzyme wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

2.11 DNA-Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten mit einem kompatiblen Plasmid-Vektor müssen Insert und Vektor so geschnitten werden, daß die Enden der entstehenden Schnittstellen durch eine DNA-Ligase kovalent verbunden werden können. Erfahrungsgemäß ist ein Vektor-Insert-Verhältnis von 1:6 im Reaktionsansatz optimal. Für die Klonierungsarbeiten wurden alle Ligationen mit der T4-DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.12 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können mittels der Agarose-Gelelektrophorese der Größe entsprechend aufgetrennt werden. Elektrophorese ist die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Die durch die Phosphatgruppen negativ geladenen Nucleinsäuren bewegen sich Richtung Anode, wobei die kleineren Fragmente schneller laufen als die größeren. Desweiteren bestimmen die Agarosekonzentration, die angelegte Spannung und die Art des Laufpuffers die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle (LOTTSPREICH & ZORBAS, 1998). Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wurden Tris-Acetat-Gele (TAE-Gele) mit 1 % Agarose verwendet. Hierzu wurde 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (1-fach) aufgekocht und unter Rühren mit Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid ist ein organischer Farbstoff mit UV-Licht induzierbarer Fluoreszenz, der in die doppelsträngige DNA interkaliert und für die spätere Visualisierung der Fragmente bei UV-Bestrahlung (= 320 nm) notwendig ist. Die Gele wurden zum Aushärten in Gelkammern mit Taschenformer gegeben. Mit 10-fachem TAE-Ladepuffer wurden die zu analysierenden Proben in die Geltaschen injiziert. Die Elektrophorese erfolgte in 1-fachem TAE-Puffer bei einer Spannung von 120 Volt. Die Fragmentgrößen konnten unter UV-Licht mit Hilfe PstI-verdauter λ -DNA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) als Marker bestimmt werden.

TAE-Puffer (50-fach)

2 M Tris, pH 8,0 (HCl)

2 M Essigsäure

0,1 M EDTA

Ladepuffer (10-fach)

30 % (v/v) Glycerin

0,25 % (v/v) Bromphenolblau

in 10-fachem TAE-Puffer

Agarosegel

1 % (w/v) Agarose in 1-fachem TAE-Puffer

0,5 μ g/ml Ethidiumbromid

2.13 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Aufgetrennte DNA-Fragmente konnten für Klonierzwecke aus dem Agarosegel (Kap. 2.12) unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem „NucleoSpin® Extract II“-System (Machery-Nagel, Düren) extrahiert werden. Die Extraktion basiert auf der selektiven Adsorption von DNA an eine Silika-Membran bei hohen Salzkonzentrationen. Agarose, Ethidiumbromid, Proteine und Salze werden während des Verfahrens durch mehrere Waschschrte entfernt. Die DNA wurde mit H₂O eluiert. Danach konnte ihre Konzentration photometrisch ermittelt werden (Kap. 2.14).

2.14 Bestimmung der DNA-Konzentrationen

Die DNA-Konzentrationen wurden am NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware) photometrisch durch die Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, wobei eine Absorptionseinheit einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml entspricht (SAMBROOK et al., 2001).

2.15 Zellaufschluss von *Nostoc*

Um z.B. den Chlorophyllgehalt (Kap. 2.16) von *Nostoc* zu bestimmen, erfolgte zunächst ein mechanischer Aufschluss der Zellen in 80 % Ethanol mit Metallkugeln (Durchmesser: 2 mm) in der Schwingmühle Retsch Typ MM301 (Retsch GMBH, Haan) bei 30 Schwingungen pro Sekunde. Nach Entfernung der Metallkugeln wurde die Zell-Lösung für den vollständigen Aufschluss für 10 Minuten bei 98°C auf einem Thermoblock erhitzt. Der Überstand nach einer Zentrifugation (11 000 g, 5 min, 4°C) konnte anschließend den weiteren Analysen unterzogen werden. Für die Proteinbestimmung (Kap. 2.17) erfolgte der mechanische Zellaufschluss am Branson Sonifer 250 sonicator (Branson Ultrasonics Corp.) bei Inkubation auf Eis.

2.16 Chlorophyllquantifizierung

Für die Chlorophyllbestimmung in Anlehnung an die Methode von ARNON (1949) wurde die Extinktion des klaren Überstands nach dem Zellaufschluss (Kap. 2.15) bei 652 nm im Spektralphotometer (U 2000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) gemessen. Als Referenz diente je 1 ml 80 % Ethanol. Die Chlorophyll-Konzentration errechnete sich nach der Formel:

$$c \text{ (Chlorophyll)} = (\text{Absorptionswert} : 34,2) \cdot \text{Verdünnungsfaktor [mg/ml]}$$

2.17 Proteinbestimmung

Nach der Methode von BRADFORD (1976) wurde der Proteingehalt von wässrigen Lösungen bestimmt. Die zu bestimmende Proteinlösung (max. 20 µl) wurde zu einer Mischung von H₂O und Bradford-Reagenz (500 µl H₂O, 500 µl Bradford) gegeben. Nach einer Inkubation von 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Proteingehalt gegen einen Leerwert bei einer Wellenlänge von 595 nm im Spektralphotometer (Biophotometer; Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Rinderserumalbumin (BSA) wurde als Referenzprotein zur Erstellung einer Eichgerade verwendet.

Bradford-Farbreagenz

Coomassie-Brilliant Blue G250
ortho-Phosphorsäure (85 %)

50 mg in 10 ml Ethanol p.a. gelöst
175 ml ad 825 ml H₂O

2.18 Bestimmung der Überlebensrate von *Nostoc*

Um tote *Nostoc*-Zellen zu identifizieren und Überlebensraten zu bestimmen, kann man den in Wasser gelösten Farbstoff Phenosafranin verwenden. Phenosafranin gelangt nur in tote Zellen und färbt diese rot an. Die Methode wurde zunächst von WIDHOLM (1972) für pflanzliche Zellen entwickelt und später von WASTLHUBER (1996) auf *Nostoc* angewandt. Zur Bestimmung der Überlebensrate von *Nostoc* nach Trockenstress wurde ein kleines Fragment eines getrockneten Zellpellets in 16 µl Wasser resuspendiert und auf einem Objektträger mit 4 µl 0,1 % (w/v) Phenosafranin vermischt. Bei 1000-facher Vergrößerung konnte der Anteil toter rotgefärbter Zellen unter dem Mikroskop ermittelt werden, wozu jeweils 300 Zellen ausgezählt wurden.

2.19 Transportversuche an *Nostoc*

Die Aufnahmeversuche mit dem kultivierten *Nostoc* zur Untersuchung des ^{14}C -Glucose-Imports wurden bei 30°C in einem Eppendorf-Thermoblock durchgeführt und nach festgelegten Zeitpunkten durch Filtration der Zellen auf einer Filter-Absaugbank beendet. Die darauf befindlichen Membranfilter (GN6 Membran Filter; Porengröße $0,45\ \mu\text{m}$; Durchmesser $25\ \text{mm}$; VWR, Mannheim) waren mit dem Transportmedium Bg11₀ befeuchtet. An der Unterseite der Filter wurde ein Vakuum angelegt, so dass nur die Zellen auf den Membranfiltern zurückblieben, während das Transportmedium mit nicht aufgenommener ^{14}C -Glucose abgesaugt wurde. Die auf den Filtern verbliebenen Zellen wurden dreimal mit $4\ \text{ml}$ Bg11₀ gewaschen. Zur Messung der aufgenommenen Radioaktivität wurden die Filter in Zählröhrchen gegeben, mit $4\ \text{ml}$ Szintillationsflüssigkeit versetzt und nach einer Inkubation von mindestens 12 Stunden in einem Tricarb 2500 Beta-Szintillationszähler (Packard, Darmstadt) quantifiziert.

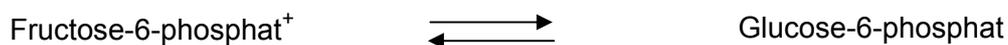
2.20 Photometrische Ermittlung der Saccharose-Konzentration

Zur Ermittlung der Saccharose-Konzentrationen im Bg11₀-Überstand über wiederbefeuchteten *Nostoc*-Pellets wurde ein gekoppelter Enzymtest mit folgenden Reaktionen durchgeführt (NEUHAUS, 1990):

1.) Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase:



2.) Phosphoglucoisomerase:



3.) Hexokinase:



4.) Invertase:



Mit den drei ersten Enzymen wurden zunächst die eventuell bereits in der Lösung enthaltenen Zucker(phosphate) Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Glucose und Fructose in 6-Phosphogluconolacton umgewandelt. Dabei entstehendes NADPH konnte photometrisch durch Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von 334 nm detektiert werden. Bei konstantem Signal wurde die Invertase in den Reaktionsansatz gegeben, die bei Anwesenheit von Saccharose unter Mitwirkung der anderen Enzyme erneut zur Bildung von 6-Phosphogluconolacton und NADPH mit einer entsprechenden Erhöhung der Extinktion bei 334 nm führte.

Anhand dieser Extinktionsänderung konnte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Saccharose-Konzentration in den Bg11₀-Überständen berechnet werden:

$$E = c \cdot d \cdot \varepsilon \quad \rightleftharpoons \quad c = E : (d \cdot \varepsilon)$$

Mit

E = Extinktionsänderung (dimensionslos)

c = Konzentration [mmol · cm⁻³]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

ε = millimolarer Extinktionskoeffizient [6,18 cm³ · μmol⁻¹ · cm⁻¹]

Testansätze für die Bestimmung der Saccharose-Konzentration wurden folgendermaßen angesetzt:

50 mM	Hepes-KOH (pH 7,8)
5 mM	MgCl ₂
4 mM	ATP
1 mM	NADP ⁺
100 μl	Probe (hier: Bg11 ₀ -Überstand über zuvor getrocknetem <i>Nostoc</i> -Pellet)
1 U	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
1 U	Hexokinase
35,5 U	Invertase

Die photometrischen Messungen erfolgten am JASCO V-550 UV/VIS Spectrophotometer (JASCO, Groß-Umstadt).

2.21 Chromatographie

Die chromatographische Auftrennung der zu untersuchenden Zucker Fructose, Glucose, Maltose, Saccharose und Trehalose erfolgte auf Kieselgel-DC-Alufolien (Merck, Darmstadt) in abgedeckten Glaskammern.

Laufmittel (STAHL, 1969)

n-Butanol (40 %)

Aceton (50 %)

Phosphat-Puffer, pH 5

Zur Visualisierung nicht-radioaktiver Zucker wurden die DC-Alufolien mit einem Sprühreagenz behandelt und bei 150°C für 5 Minuten erhitzt (STAHL, 1969).

Sprühreagenz-Ansatz

Essigsäure (50 ml)

p-Anisaldehyd (0,5 ml)

Schwefelsäure (1,0 ml)

Um radioaktive Zucker zu detektieren, wurden die DC-Alufolien jeweils mit einem Packard MP Storage Phosphor Screen (Packard, Darmstadt) in einer lichtundurchlässigen Expositionskassette (Amersham Biosciences, Freiburg) für 12 bis 48 Stunden exponiert. Am CycloneTM-Storage Phosphor System Scanner (Packard, Darmstadt) erfolgte die anschließende Analyse.

Zur Identifizierung der Signale wurden auf derselben DC-Alufolie unmarkierte Zucker als Marker aufgetragen. Für die radioaktiven Chromatographien wurde zum selben Zweck auch radioaktive Glucose aufgetragen, so dass ein Vergleich der Signale unmittelbar möglich war.

2.22 Inhibitionsversuche

Der Kohlenhydrattransfer in der Flechte wurde in Anlehnung an DREW und SMITH (1967) untersucht. Die Versuche basieren auf dem Prinzip, dass die vom Photobionten in Anwesenheit von $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ gebildeten radioaktiven Zucker im Versuchsansatz akkumulieren und chromatographisch nachweisbar sind, wenn derselbe Zucker in unmarkierter Form im Inkubationsmedium enthalten ist, weil die radioaktive und die unmarkierte Form des Zuckers um den Import durch den Mycobionten konkurrieren.

Diese Inhibitionsversuche wurden mit je zwei gestanzten Flechtenscheiben (Durchmesser: 0,7 cm) in 100 μl Bg11₀ durchgeführt. Das Medium enthielt jeweils Fructose, Glucose, Maltose, Saccharose bzw. Trehalose in nicht-radioaktiver Form mit variierenden Konzentrationen. Die Inkubation erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit 1 μl $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ in rollenden 1,5-ml-Reaktionsgefäßen auf dem Denley Mixer 10 (Denley, Sussex) bei einer Belichtungsintensität von 20 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben von je 1 μl für die chromatographische Analyse (Kap. 2.21) entnommen.

2.23 Elektronische Datenverarbeitung und computergestützte Analysen

Die Diagramme zur Darstellung der ermittelten Aufnahmewerte und der Klonierungsstrategie wurden mit dem Programm Microsoft® Excel2000 erstellt. Die Datenbank-Analysen für die verwendeten Gensequenzen erfolgten auf der Homepage des National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov). Für die Sequenzanalysen zwecks Klonierung kam das Programm Clonemanager (Version 5.03; Scientific & Educational Software) zum Einsatz. Sequenzvergleiche von Proteinen wurden mit CLUSTALW (www.ebi.ac.uk/clustalw) durchgeführt und mit GeneDoc (Version 2.5.) nachbearbeitet.

3 Ergebnisse

Im Mittelpunkt der vorliegenden Diplomarbeit standen Untersuchungen zum Zuckertransport des Photobionten *Nostoc spec.* aus *Peltigera spec.* Zunächst werden die Wahl der Flechte und die Kultivierung ihres Photobionten dargestellt. Nachfolgende Ergebnisse dokumentieren Datenbankrecherchen zum Aufsuchen und Überprüfen putativer Glucosetransporter sowie die Klonierung einer entsprechenden DNA-Sequenz zwecks Herstellung von Mutanten, die das Protein nicht mehr funktionell exprimieren können. Es wird zudem gezeigt, wodurch eine Zucker-Freisetzung im kultivierten Photobionten induzierbar war, welche Faktoren den Kohlenhydrattransfer in der untersuchten Flechte beeinflussten und wie der Glucosetransport während bzw. außerhalb der Symbiose charakterisiert werden konnte.

3.1 Wahl der Flechte und Kultivierung des Photobionten

Zu Beginn der Diplomarbeit stand noch nicht fest, welche *Peltigera*-Art für die Untersuchungen herangezogen werden sollte. Standorte potentieller Untersuchungsobjekte waren unbekannt. Die beiden Kriterien zur Auswahl der Flechte waren, dass sie in einer größeren Population vorkommt und einer *Nostoc* enthaltenden *Peltigera*-Art zuzuordnen ist. In der Nähe des Pflanzenphysiologie-Labors der TU Kaiserslautern, in dem die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit erfolgten, wurde eine größere Population von Blaualgenflechten gefunden, die sich schnell der artenreichen Gattung *Peltigera* zuordnen ließen. Die Flechten wurden nach WIRTH (1995) der Art *Peltigera praetextata* (Flörke ex Sommerf.) Zopf zugeordnet (Abb.3.1). Von dieser Art ist bekannt, dass ihr Photobiont zur Gattung *Nostoc* gehört (Wirth, V., 1995). Deshalb wurde ein Teil der Flechtenpopulation für die Laborarbeiten verwendet.



Abb. 3.1: *Peltigera praetextata*. Eine Population der Blaualgenflechte *P. praetextata* wächst auf einem Wiesenstück an der TU Kaiserslautern.

(Foto von Stefan Wic, 2005)

Ein gewaschener und in kleine Streifen geschnittener Flechtenthallus wurde in Bg11-Medium aufgenommen. Nach einer Woche konnten in dem Kulturmedium außer *Nostoc* spec. weitere Vertreter verschiedener Cyanobakterien-Gattungen identifiziert werden. Dabei handelte es sich um *Oscillatoria* spec. (Ordnung *Oscillatoriales*), *Calothrix* spec. (Ordnung *Nostocales*) und *Cyanocystis* spec. (Ordnung *Chroococcales*). Die Cyanobakterien wurden von Prof. Dr. Burkhard Büdel identifiziert. Durch abwechselndes Ausstreichen der Cyanobakterien auf Bg11₀-Platten und Überimpfung in Bg11₀-Flüssigmedium konnte eine Reinkultur von *Nostoc* angelegt werden (Abb. 3.2).



Abb. 3.2: Mikroskopische Aufnahme von *Nostoc*. Die Trichome, die Akineten und Heterocysten enthalten, stammen aus einer Bg11₀-Flüssigkultur (Teilstrich: 10 µm).

3.2 Identifizierung eines putativen Glucosetransporters in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133

Mittels Homologievergleiche sollte im sequenzierten Genom von *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 eine Gensequenz identifiziert werden, die für einen putativen Glucosetransporter codiert. Diese sollte als Grundlage für die Konstruktion von Oligonucleotidprimern dienen, um eine homologe Teilsequenz von *Nostoc* spec. aus *Peltigera praetextata* zu amplifizieren und für die Erzeugung von *Nostoc*-Mutanten einzusetzen, die den entsprechenden Transporter nicht mehr funktionell exprimieren können. Für *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 konnte eine Sequenz ermittelt werden, welche mit 71 % Identität und 84 % Ähnlichkeit auf Aminosäure-Ebene stark homolog zum sekundär-aktiven Glucosetransporter von *Synechocystis* sp. PCC 6803 (SCHMETTERER, 1990) ist (Abb.3.3).

```

*           20           *           40           *           60           *           80
Syn. : MNPSSSPSQSTANVKEVLLISGVAAALGGFLFGFDTAVINGAVAAALOKHFOTDSLLTGLSVSLALLGSALGAFAGGPTADRRCRIKTMIL : 89
Nos. : --MSSTFVRRKSNFTFYVILIAQAAALGGFLFGFDTAVINGAVLSLAKAENTSSWVTGLAVSLALLGSAVGAFBAGQLADRVGRVRAMVV : 87
      SS3      N 5V6LI G AALGGFLFGFDTAVINGAV L K F T S 6TGL VSLALLGSA6GAF AG IADR GR6K M66

*           100          *           120          *           140          *           160          *           180
Syn. : AAFLFTLSSIGSGLPFTIWFDFIWRVLLGGIGVCAASVIAPAYIAEVSPPAHLRGRGLGSLQQLAIVSGIFIALLSNWFIALMAGGSAQNPW : 178
Nos. : ASVLFITSAIGSGMAFTIWFDFIWRVLLGGIGVCAASVIAPAYIAECSPTHLRGRGLGSLQQLAIVVGFIVALLSDYFIATSAG-SADSPF : 175
      A VLFT6S IGSG6 FTIWFDFIWRVLLGGIG6G ASVIAPAYIAE SP HLRGRGLGSLQQLAIV GIF6ALLS15FIA AG SA P5

*           200          *           220          *           240          *           260
Syn. : LFGAAAWRWMFWTEIIPALLYGVCAFIIPESPRYLVAQGGKAAALWKVEGGDVPSRIEETIQTIVSLDHKPRFSDLLSRGGLLPV : 267
Nos. : LFGVAWRWMFWTAVPPAVFYGMVALTIIPESPRYLVAKGRESEAVNVLTKILGGDVLKIEEIROTVLRERQPKFSDLLSRGGLLPV : 264
      LFG AAWRWMFWT 6 PA6 YG6 A IPESPRYLVA G A 6L K6 GGDV 4IEETI TV P4FSDLLSR GGLLPV

*           280          *           300          *           320          *           340
Syn. : WIGMGLSALQQFVGINVIFYSSVLWRSVGFTEKSLITVITGFINILTTLVAFVDFKFRKPLLMLGMSIGMTITLGLISVVFGGAT : 356
Nos. : WIGIGLSVLLQQFVGINVIFYSSVLWRVAVGFSEKDSLITVITGAVNIITTLIAIAFVDFKFRKPLLIIIGSIGMTTLTGLMAYIFGNAP : 353
      WIG6GLS LQQFVGINVIFYSSVLWR VGF3E SL ITVITG 6NI6TTL6AIAFVDFKFRKPLL66GSIGMT6TLG 6 6FG A

*           360          *           380          *           400          *           420          *           440
Syn. : V-VNGQPTLFGAACHIALVTANLYVFSFGFSWGPVWVLLGEMFNKIRAAALSVAAGVQWIANFLISTFPPLLDVTGLGFPAYGLYAT : 444
Nos. : LDAAGNPSLAGSAGTVALTAANLYVFCFGFSWGPVWVLLGEMFNKIRAAALSVAAGVQWVANFLISTFPPLLQYFGLGSAAYGLYTI : 442
      6 G P3L G AG 6AL6 ANLYVF FGFSWGPVWVLLGEMFNKIRAAALSVAAG 6QW6ANF6ISTFPP6L GLG AYGLY

*           460
Syn. : SAAISTFFIFVFKETKCTLEQDM : 468
Nos. : AAATSFFFIFVFKETKCTLEQDM : 466
      AA S FFI FF6KETK LE M

```

Abb.3.3: Alignment der Proteinsequenzen des verifizierten Glucosetransporters aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Syn.) und der homologen Sequenz aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (Nos.) . Die schwarze Markierung weist auf die Ähnlichkeit bzw. Identität der Aminosäuren im Alignment-Bereich hin.

Die Proteinsequenz von *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist in der Datenbank von NCBI wie folgt gekennzeichnet:

LOCUS NP_442047 468 aa linear BCT 15-JUN-2006
 DEFINITION: glucose transport protein [*Synechocystis* sp. PCC 6803]
 ACCESSION : NP_442047

Die hierzu homologe Proteinsequenz von *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 ist mit dieser Kennzeichnung überschrieben:

LOCUS ZP_00106753 466 aa linear BCT 01-OCT-2004
 DEFINITION: COG0477 Permeases of the major facilitator superfamily
 [*Nostoc punctiforme* PCC 73102]
 ACCESSION: ZP_00106753

Im Genom von *N. punctiforme* wurden keine weiteren Sequenzen gefunden, die mit anderen Glucosetransportern (siehe Anhang, Kap. 7.1) beim Vollängen-Alignment mindestens 30 % Identität auf Aminosäureebene aufweisen.

3.3 Bioinformatische Analyse putativer Glucosetransporter

WASTLHUBER (1996) ermittelte im Rahmen seiner Arbeiten an *Nostoc spec.* aus *Peltigera horizontalis* zwei DNA-Teilsequenzen (siehe Anhang, Kap. 7.2) für putative Glucosetransporter. Eine Sequenz, *Fragment 2*, soll ein Transportprotein für die Glucose-Aufnahme codieren, das außerhalb der Flechten-Symbiose exprimiert wird. Für die zweite Sequenz, *Fragment 3*, wurde ein symbiosespezifisch exprimierter Glucosetransporter für den Export der Glucose angenommen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob die Sequenzen tatsächlich aus dem Cyanobionten stammen und ihnen die genannten Funktionen zugeordnet werden können. Nach Homologievergleichen (Tab. 3.1) weist *Fragment 2* die höchste Homologie zu einem hypothetischen Protein von *Gibberella zeae PH-1* auf. *Fragment 3* zeigt höchste Homologie zu einem Xylose-H⁺-Symporter aus *Bacteroides fragilis*. Die Homologie der beiden Teilsequenzen ist zum putativen Glucosetransporter von *N. punctiforme* ATCC 29133 jeweils deutlich geringer. *Fragment 2* und *Fragment 3* scheinen demnach nicht cyanobakteriellen Ursprungs zu sein.

Tab.3.1: Homologievergleiche der Teilsequenzen *Fragment 2* und *Fragment 3* zur Überprüfung der cyanobakteriellen Herkunft

	<i>Fragment 2</i>	<i>Fragment 3</i>
Protein mit höchster Homologie	hypothetisches Protein von <i>Gibberella zeae PH-1</i>	Xylose-H ⁺ -Symporter aus <i>Bacteroides fragilis</i>
Identität auf AS-Ebene bzgl. Protein mit höchster Homologie	71 %	62 %
Länge des Alignment-Bereichs	185 AS	178 AS
Identität auf AS-Ebene bzgl. put. Glucosetransporter von <i>N. punctiforme</i>	29 %	35 %
Länge des Alignment-Bereichs	187 AS	187 AS

3.4 Herstellung von Glucosetransporter defizienten *Nostoc*-Mutanten

Es sollte eine ausreichend große Teilsequenz eines putativen Glucosetransporters aus *Nostoc spec.* von *Peltigera praetextata* zur Herstellung einer Mutante kloniert werden, die das entsprechende Protein in funktioneller Form nicht mehr bilden kann. Als Grundlage für die Konstruktion der hierzu notwendigen Primer (glucdown2 und glucup2) wurden zwei Bereiche in der DNA-Sequenz des putativen Glucosetransporters aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 ausgewählt, die mit der DNA-Sequenz des verifizierten Glucosetransporters aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 stark übereinstimmen. Es konnte nach einer Kolonie-PCR ein 650 bp großes Fragment amplifiziert und mit dem Vektor pBSK ligiert werden. Nach der Vervielfältigung in *E. coli* wurde das Fragment sequenziert (Abb. 3.4).

```
5'GCTTGGCGTTGGATGTTTTGGACAGCAGTCCCACCAGCAGTATTCTACGGGATGGTAGCTTTAACAA
ATTCTGAATCTCCCCGTTATTTGGTTGCCAAAGGACGAGAATCAGAAGCTGCTAACGTTCTGACCA
AGATTTTAGGGGGTGACGTACTGCCAAAATCGAAGAAATTCGGCAGACAGTGCTTCGCGAACGCC
AACCCAGGTTTTCTGACCTCTTAAGCAGAAGTGGCGGACCCATTGTTTGGATAGGAATAGGCTTATC
TGTATTACAGCAATTTGTTGGGATTAATGTAATTTTCTACTACAGCAGCGTTTTGTGGCGGGCTGTTG
GGTTCTCAGAAAAGATTCTTTGTCAATCACGGTGATTACAGGAGCCGTCAACATTATTACAACACTG
ATTGCGATCGCCTTTGTAGATAGATTTGGTCGCAAGCCATTACTGATAATCGGGTCAATCGGCATGA
CCTTGACCTTGGGGACGATGGCTTATCTTTTTGGCCATGCTCCCCTCGATGCTGCTGGGAACCCCAA
TCTTACCGGAAGCGCCGGGACTATAGCTCTGATTGCAGCCNACCTTTATGTATTTTGCTTCGGTTTCT
NCTGGGGGCCGATAGTTTGGGTGCTNGCTGGG'3
```

Abb. 3.4: DNA-Teilsequenz eines putativen Glucosetransporters von *Nostoc spec.* aus *P. praetextata*. Die grau dargestellten Nucleotidsequenzen entsprechen den Primer-Bindungsstellen für glucdown2 und glucup2.

Im Alignment-Bereich zeigt die entsprechende Proteinsequenz höchste Homologie zum putativen Glucosetransporter aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (Abb. 3.5) mit 93 % Identität und 96 % Ähnlichkeit auf Aminosäure-Ebene. In Bezug auf den verifizierten Glucosetransporter von *Synechocystis* sp. PCC 6803 liegen die Werte bei 66 % bzw. 81 %. (Anmerkung: Für die Übersetzung der klonierten Teilsequenz in die Aminosäuresequenz wurden die Primer-Bindungsstellen nicht miteinbezogen.)

```

*          20          *          40          *          60          *          80
Nos.PCC : MSSTVRRKSNTFYVILIAGAAALGGFLFGFDTAVINGAVLSLAKAFNTSSWVTGLAVSLALLGSVGAFFAGQIADRYGRVKAMV : 86
Nos.Pp  : -----: -

*          100         *          120         *          140         *          160         *
Nos.PCC : VASVLFITISAIGSGMAFTIWDFFIWRVLLGGIGIGVASVIAPYIAECSPHLRGRGLGSLQLLAIIVVGIFVALLSDYFIATSAGSAD : 172
Nos.Pp  : -----: -

180          *          200          *          220          *          240          *          2
Nos.PCC : SPFLFGVAARWRFWTAVPPAVFYGMVALTIPESPRYLVAKGRESEAVNVLTKILGGDVLPKIEEIRQTVLRERQPKFSDLLSRSG : 258
Nos.Pp  : -----TAVPPAVFYGMVALTIPESPRYLVAKGRESEAVNVLTKILGGDVLPKIEEIRQTVLRERQPKFSDLLSRSG : 71
          TAVPPAVFYGMVALTIPESPRYLVAKGRESEAVNVLTKILGGDVLPKIEEIRQTVLRERQPKFSDLLSRSG

60          *          280          *          300          *          320          *          340
Nos.PCC : GLLPIVWIGIGLSVLQQFVGINVIFYYSVLRVAVGFSEKDSLITVITGAVNIITTLIAIAFVDRFGRKPLLIIGSIGMTLLTGT : 344
Nos.Pp  : G--PIVWIGIGLSVLQQFVGINVIFYYSVLRVAVGFSEKDSLITVITGAVNIITTLIAIAFVDRFGRKPLLIIGSIGMTLLTGT : 155
          G PIVWIGIGLSVLQQFVGINVIFYYSVLRVAVGFSEKDSLITVITGAVNIITTLIAIAFVD4FGRKPLLIIGSIGMTLLTGT

*          360          *          380          *          400          *          420          *
Nos.PCC : MAYIFGNAPLDAAGNPLTGSAGTVALIAANLYVFCFGFSWGPVIVVLLGEMFNKIRAAALSVAIAIQVAVANFLISTTFPPILQY : 430
Nos.Pp  : MAYLFGHAPLDAAGNPLTGSAGTIALIAANLYVFCFGFXW-----: 196
          MAY6FG APLDAAGNP L GSAGT6ALIAA LYVFCFGF W

440          *          460
Nos.PCC : FGLGSAYGLYTIAAATSFFFILFFIKETKGILEDM : 466
Nos.Pp  : -----: -

```

Abb.3.5: Alignment der Proteinsequenzen der putativen Glucosetransporter von *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (Nos. PCC) und *Nostoc spec. aus Peltigera praetextata* (Nos.Pp). Die schwarze Markierung weist auf die Ähnlichkeit bzw. Identität der Aminosäuren im Alignment-Bereich hin.

Die Teilsequenz des Gens für den putativen Glucosetransporter von *Nostoc* aus *P. praetextata* wurde mit dem glatten Enden produzierenden Restriktionsenzym NruI geschnitten und mit einer Sequenz für Kanamycin-Resistenz ligiert. Die komplette Klonierungsstrategie ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

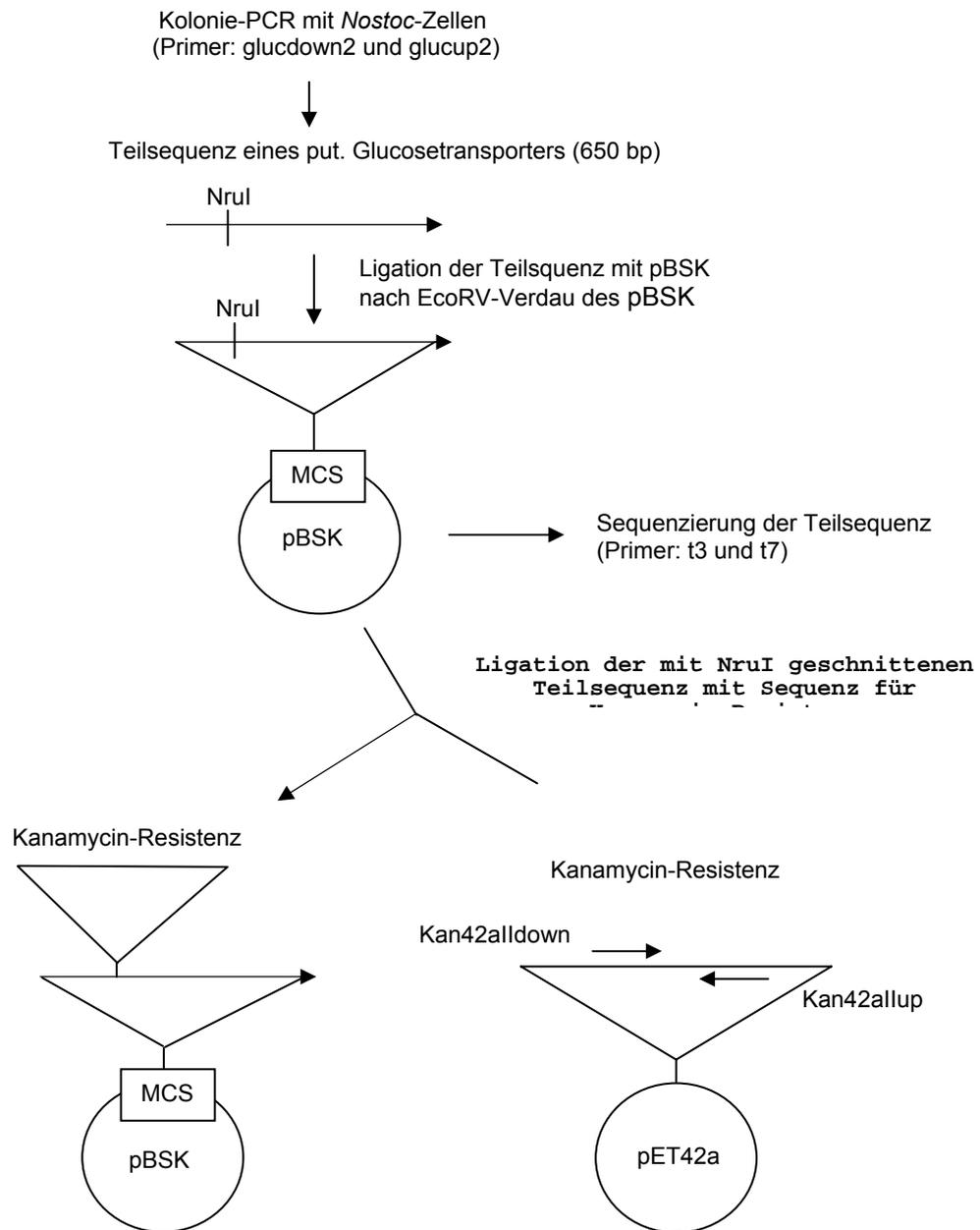


Abb. 3.6: Klonierungsschema zur Herstellung von Insertionsmutanten. Von *Nostoc* sollten Mutanten erzeugt werden, deren Gen für einen putativen Glucosetransporter durch die Insertion eines Gens für Kanamycin-Resistenz nicht mehr intakt ist. MCS = multiple cloning site

Mit dem hergestellten Konstrukt wurden *Nostoc*-Zellen Elektroporationen unterzogen. Für die Selektion potentieller Mutanten wurden die Zellen auf festem Bg11₀-Medium mit Kanamycin ausplattiert. Bei Kanamycin-Konzentrationen von 5 und 10 µg/ml war die Selektion zu schwach, so dass sich auf den entsprechenden Platten nach zwei Wochen dichte Cyanobakterien-Rasen bildeten. Bei einer Kanamycin-Konzentration von 20 µg/ml wuchsen nur wenige Kolonien heran. Diese wurden in eine Flüssigkultur mit der gleichen Konzentration des Antibiotikums überführt. Mit acht überführten Kolonien konnten bei der anhaltenden Selektion nur zwei – sehr langsam wachsende - Flüssigkulturen angezogen werden. Eine erste PCR zur Überprüfung der putativen Insertionsmutanten schlug fehl und Glucose-Aufnahmeversuche konnten wegen der geringen Zellzahl noch nicht durchgeführt werden. Im Rahmen der Diplomarbeit war eine weitere Untersuchung aus Zeitgründen nicht möglich.

3.5 Untersuchungen zur Glucose-Aufnahme von kultivierten *Nostoc*-Zellen

Zur Quantifizierung der Glucose-Aufnahme wurde *Nostoc* aus einer Bg11₀-Kultur bei 30°C in 2 mM Glucose-Lösung mit ¹⁴C-Glucose inkubiert. Nach 30 Minuten wurde noch keine Sättigungsphase erreicht (Abb. 3.7).

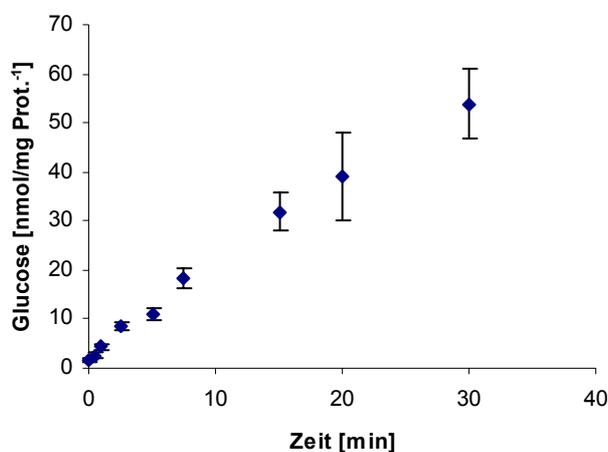


Abb.3.7 : Glucose-Aufnahme ohne Inhibitoren. Angegeben sind Mittelwerte von Triplikaten. Die Fehlerbalken entsprechen der jeweiligen Standardabweichung. Für jeden Versuchsansatz wurden *Nostoc*-Zellen in 200 µl Bg11₀ mit 2mM Glucose aufgenommen und bei 30°C inkubiert.

Phlorizin (1mM), das u. a. ein reversibler Inhibitor für den Na⁺-Glucose-Symport darstellt (DIEDRICH, 1965) darstellt, und CCCP (250 µM), das als Ionophor den pH-Gradienten an Membranen abbaut (SIMONI & POSTMA, 1975), senkten die Glucose-Aufnahme auf 22 % bzw. 20 % und wirkten somit stark inhibierend (Abb.3.8). Die durch CCCP bedingte Inhibition der Glucose-Aufnahme ist ein Hinweis auf eine Abhängigkeit des Transports von einem

Protonengradienten. Bei Anwesenheit von 10 mM Fructose wurde die Glucose-Aufnahme mit Reduktion auf 79 % in deutlich geringerem Maße inhibiert.

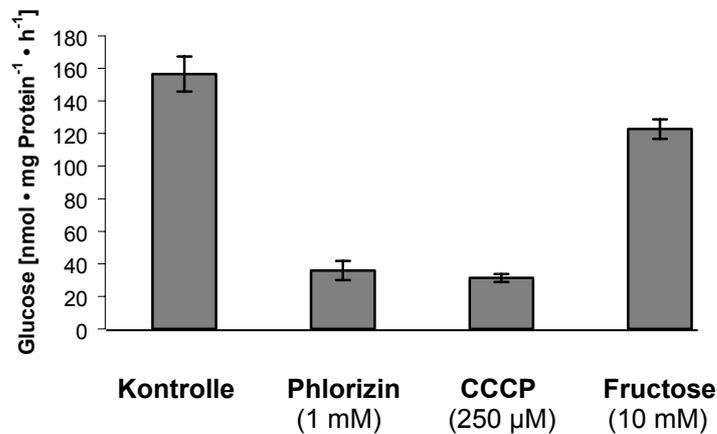


Abb. 3.8: Glucose-Aufnahme mit und ohne Inhibitoren. Die vier Aufnahmeraten wurden für jeweils 10 min gemessen und sind auf Triplikate zurückzuführen. Die Fehlerbalken entsprechen der jeweiligen Standardabweichung. Für jeden Versuchsansatz wurden *Nostoc*-Zellen in 200 µl Bg11₀ mit 2 mM Glucose aufgenommen und bei 30°C inkubiert.

3.6 Überprüfung der Zucker-Freisetzung durch *Nostoc* bei Trockenstress

Um zu überprüfen, ob kultivierte *Nostoc*-Zellen bei Trockenstress Zucker abgeben, wurde ein *Nostoc*-Pellet für drei Tage bei 30°C und einer Lichtstärke von 40 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ in einem 50-ml-Greinerrohrchen getrocknet. Danach wurde 1 ml Bg11₀ dazugegeben. Das Medium wurde für 10 s über dem Pellet leicht geschwenkt, in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt, eingedampft und in 30 µl Wasser aufgenommen. Der eingedampfte Zellinhalt des Pellets wurde im gleichen Wasservolumen aufgenommen. Von den hergestellten wässrigen Lösungen des Pelletüberstands und -aufschlusses wurden je 5 mal 3 µl mit Saccharose, Trehalose, Maltose, Fructose und Glucose als Marker auf eine DC-Alufolie aufgetragen. Die Chromatographie (Abb.3.9) zeigte Folgendes: Im Überstand waren Saccharose und in geringerem Maße Trehalose nachweisbar. In den Zellen waren beide Disaccharide in größeren Mengen vorhanden. (Anmerkung: Das Signal oberhalb des Saccharose-Signals in Abb.3.9, Spur 2 ist wahrscheinlich auf Chlorophyll a zurückzuführen. Vor der Behandlung mit dem Sprühreagenz war das Signal grün.)

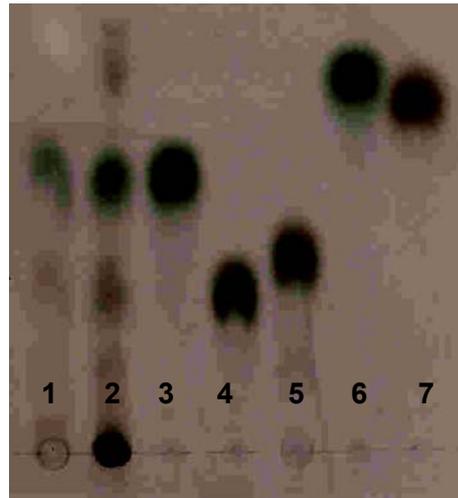


Abb. 3.9: Chromatographie zur Überprüfung der Zucker-Abgabe durch kultivierte *Nostoc*-Zellen nach Wiederbefeuchtung. Ein *Nostoc*-Pellet wurde für drei Tage bei 30°C und einer Lichtstärke von 40 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in einem 50-ml-Greiner-Röhrchen getrocknet. Es wurde 1 ml Bg11₀ dazugegeben und über dem Pellet für 10 s geschwenkt. Bg11₀-Überstand (Spur 1) und Zellaufschluss (Spur 2) wurden eingedampft und in je 30 μl Wasser aufgenommen. Je fünfmal 3 μl wurden mit 38 μg Marker-Zucker aufgetragen: Saccharose (Spur 3), Trehalose (Spur 4), Maltose (Spur 5), Fructose (Spur 6) und Glucose (Spur 7).

3.7 Photometrische Bestimmung der abgegebenen Saccharose-Menge aus wiederbefeuchteten *Nostoc*-Zellen

Die nach Trockenstress beobachtete Abgabe von Saccharose aus *Nostoc* konnte photometrisch verifiziert und quantifiziert werden. Auf zwei für drei Tage lang getrocknete *Nostoc*-Pellets wurde je 1 ml Bg11₀ gegeben. Unmittelbar nach der Befeuchtung war Saccharose im Überstand nachzuweisen. Die mittlere Saccharose-Freisetzung betrug $1,34 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ Chlorophyll. Nach 30 und 60 Minuten wurden höhere Saccharose-Konzentrationen im Medium nachgewiesen. Nach 3 Stunden war die Konzentration deutlich gesunken und entsprach ca. 36 % des 60-Minuten-Werts (Abb.3.10).

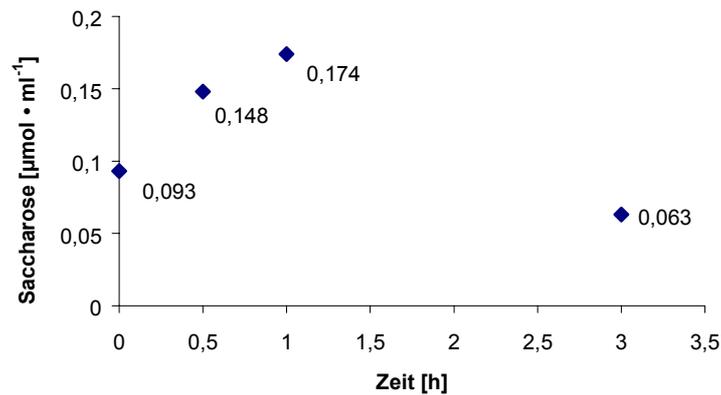


Abb. 3.10: Saccharose-Konzentration nach Befeuchtung eines getrockneten *Nostoc*-Pellets im Bg11₀-Überstand. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte zweier Messungen. Je 50 ml *Nostoc*-Zellen wurden zeitgleich aus derselben Kultur entnommen und zentrifugiert. Die Pellets wurden bei 30°C und einer Lichtstärke von 40 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für drei Tage in einem 50-ml-Greinerrohrchen getrocknet. Ihr mittlerer Chlorophyllgehalt betrug 0,069 g.

Vor dem Trocknen der Zellen und nach der Ermittlung der Saccharose-Konzentration wurde von einem der beiden Pellets jeweils ein vernachlässigbar geringer Teil zur Überprüfung der Überlebensrate durch Behandlung mit Phenosafranin entnommen. Von jeweils 300 ausgezählten Zellen zeigten 5 bzw. 7 Zellen eine Rotfärbung und wurden somit als tote Zellen identifiziert. Die Überlebensrate der Zellen lag daher bei über 99 %. Es konnten keine Kontaminationen durch andere Bakterien oder Pilze festgestellt werden. Unter der Prämisse, dass die abgegebene Saccharosemenge mindestens 25 % der intrazellulären Saccharosemenge entspricht (Kap. 3.6, Abb. 3.9), kann auf eine Saccharose-Freisetzung aus hauptsächlich lebenden Zellen geschlossen werden.

3.8 Saccharose-Nachweis für *Nostoc* aus Bg11₀-Kultur

Saccharose wurde für in Bg11₀ angezogenen *Nostoc* aus *P. praetextata* auch ohne vorher erfolgten Trockenstress nachgewiesen. Hierzu wurden je 200 μl *Nostoc* einmal im Hellen (Ansatz A) und einmal im Dunkeln (Ansatz B) mit 1 μl $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ für 90 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden aufgeschlossen und der Zellinhalt in 50 μl Invertase-Puffer aufgenommen. Jeweils 1 μl wurde direkt auf eine DC-Alufolie aufgetragen. Danach wurde in die Ansätze Invertase gegeben, um putative Saccharose-Signale durch Bildung von Glucose und Fructose zu verifizieren. Nach weiteren 90 Minuten Inkubation wurde erneut jeweils 1 μl der chromatographischen Analyse unterzogen. Für Ansatz A war zunächst ausschließlich ein Saccharose-Signal nachweisbar (Abb. 3.11, Spur 1), während für Ansatz B keine radioaktiven Kohlenhydrate detektierbar (Abb. 3.11, Spuren 2 und 4) waren, so dass eine im Dunkeln

stattfindende CO_2 -Fixierung ausgeschlossen werden kann. Die enzymatische Behandlung des Ansatzes A führte zu einem Signal auf einer Höhe, die der Laufweite von Fructose entsprach (Abb. 3.11, Spur 3). Die sich überschneidenden Signale von Glucose und Fructose unterscheiden sich in der Höhe ihrer Lauffronten (Kap. 3.6, Abb. 3.9); durch eine Schweifbildung des Fructose-Signals kann das Glucose-Signal überdeckt werden. Daher scheint der kultivierte Photobiont auch ohne Trockenstress Saccharose als Produkt der Photosynthese zu bilden. Dass *Nostoc* auch in der Symbiose Saccharose bilden kann, wurde mit einer induzierten Exkretion des Disaccharids nachgewiesen (Kap. 3.13).

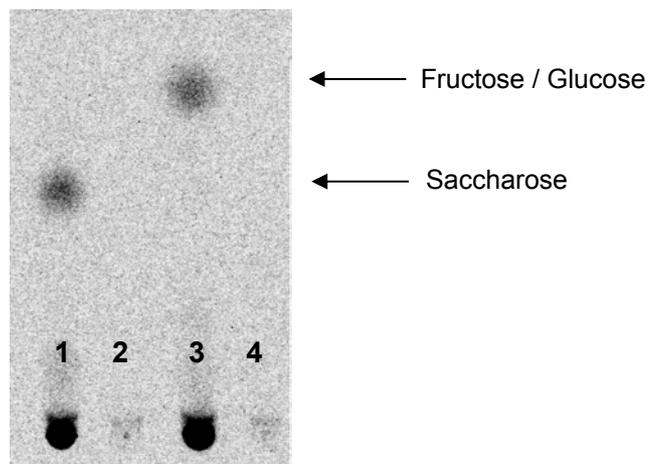


Abb. 3.11: Verifizierung der Saccharose aus dem kultivierten Photobionten (radioaktive Chromatographie). Je 200 μl *Nostoc* wurden mit 1 μl $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ im Hellen (Ansatz A) und im Dunkeln (Ansatz B) für 90 min inkubiert und aufgeschlossen. Die Zellinhalte von Ansatz A und B wurden in 50 μl Invertase-Puffer (50 mM HEPES-KOH + 5 mM MgCl_2 , pH 7,8) aufgenommen und mit 30 U Invertase für weitere 90 min inkubiert. Für die chromatographische Analyse wurde aus dem Ansatz A vor und nach der Invertase-Behandlung je 1 μl Medium entnommen (Spuren 1 und 3). Ebenso erfolgte die Medienentnahme für Ansatz B (Spuren 2 und 4).

3.9 Analyse des Kohlenhydrattransfers in *P. praetextata* in Anwesenheit verschiedener Zucker

Mit Inhibitionsversuchen in Anlehnung an DREW und SMITH (1967) wurde der Kohlenhydrattransfer in Flechtenscheiben analysiert. Es wurde überprüft, welchen Effekt verschiedene Zucker auf den Kohlenhydrattransfer haben und ob Glucose tatsächlich den einzigen transferierten Zucker darstellt. Je 2 Flechtenscheiben wurden in 100 μl Bg11₀-Medium mit 1 μl $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ aufgenommen. In Ansatz A war kein unmarkierter Zucker im Überschuss. In den Ansätzen B, C, D und E waren Glucose, Fructose, Saccharose bzw. Trehalose in unmarkierter Form mit einer Konzentration von 150 mM enthalten. Nach 0, 1, 2 und 4 Stunden wurde aus jedem Ansatz jeweils 1 μl für die chromatographische Analyse entnommen.

Bei Abwesenheit von nicht-markierten Zuckern im Medium (Ansatz A) war kein Transfer radioaktiver Zucker nachweisbar (Abb.3.12, Spuren 1-4). In Anwesenheit unmarkierter Glucose (Ansatz B) akkumulierte radioaktive Glucose und konnte als der hauptsächlich transferierte Zucker identifiziert werden (Abb. 3.12, Spuren 5-8). Auch steigende Konzentrationen radioaktiver Fructose konnten in Anwesenheit unmarkierter Fructose (Ansatz C), wenn auch in sehr geringer Intensität, nachgewiesen werden (Abb. 3.12, Spuren 9-12). Im Saccharose enthaltenden Ansatz D war kein radioaktiver Zucker nachzuweisen (Abb. 3.12, Spuren 13-16). In Ansatz E bedingte Trehalose die Akkumulation radioaktiver Glucose (Abb. 3.12, Spuren 17-20).

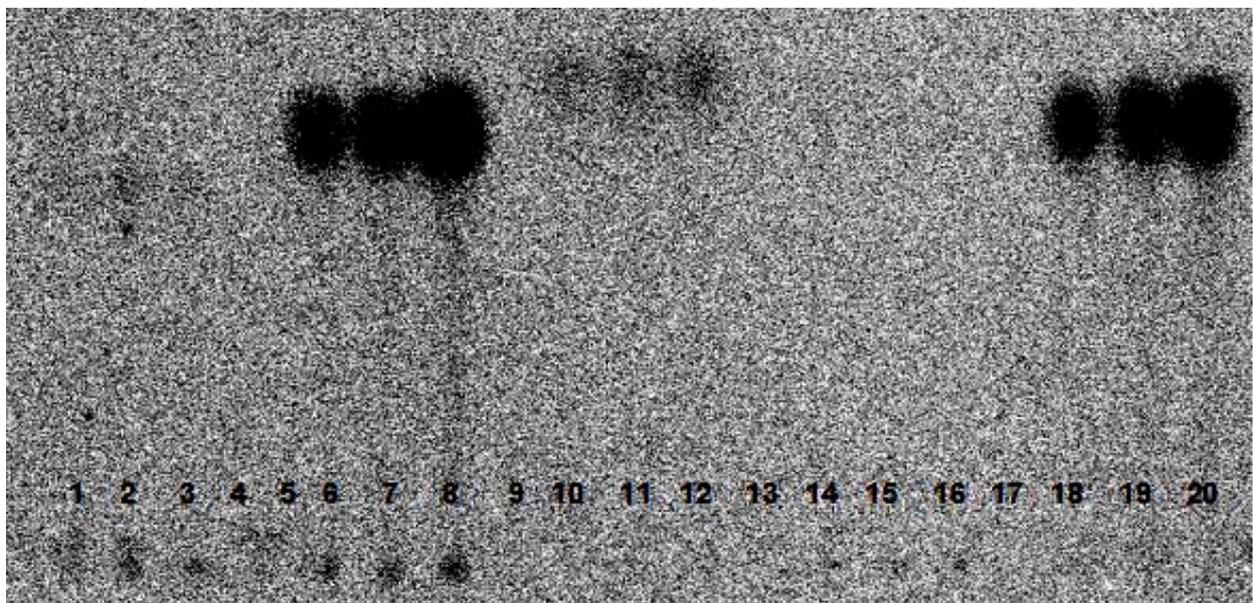


Abb.3.12: Kohlenhydrattransfer in Flechtenscheiben in Anwesenheit verschiedener unmarkierter Zucker (radioaktive Chromatographie). Die Inkubation der Flechtenscheiben erfolgte in Bg11₀-Medium ohne Zucker (Spuren 1-4) bzw. in Anwesenheit von 150 mM Glucose (Spuren 5-8), Fructose (Spuren 9-12), Saccharose (Spuren 13-16) und Trehalose (Spuren 17-20). Jeder Ansatz enthielt 2 Scheiben in 100 μl Bg11₀ mit 1 μl $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$. Die Medienentnahme für die chromatographische Analyse erfolgte nach 0 h (Spuren 1, 5, 9, 13, 17), 1h (Spuren 2, 6, 10, 14, 18), 2h (3, 7, 11, 15, 19) und 4 h (4, 8, 12, 16, 20).

Für einen weiteren Inhibitionsversuch wurden je 2 Flechtenscheiben in 100 µl Bg11₀-Medium mit 150 bzw. 75 mM Maltose aufgenommen und mit 1 µl NaH¹⁴CO₃ versetzt. In einem Kontrollansatz war Glucose mit einer Konzentration von 150 mM enthalten. Die Inkubation dauerte 90 Minuten. Die anschließende Chromatographie zeigte, dass unmarkierte Maltose eine äußerst schwache Akkumulation radioaktiver Glucose verursachte (Abb. 3.13, Spuren 1 und 2).

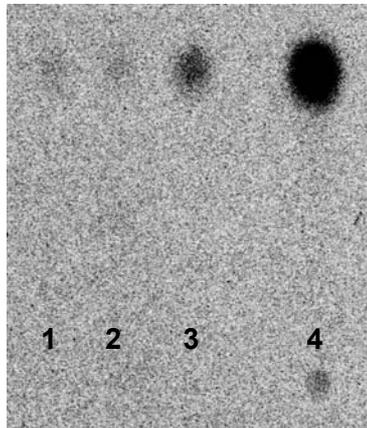


Abb. 3.13: Überprüfung des Einflusses von Maltose auf den Kohlenhydrattransfer in Flechtenscheiben (radioaktive Chromatographie). Je 2 Flechtenscheiben wurden in 100 µl Bg11₀ mit 1 µl NaH¹⁴CO₃ für 90 min inkubiert. Die Ansätze enthielten 150 mM Maltose (Spur 1), 75 mM Maltose (Spur 2) bzw. 150 mM Glucose (Spur 3). Als Marker wurde 1 µl radioaktive Glucose aufgetragen (Spur 4).

3.10 Analyse des Kohlenhydrattransfers in Anwesenheit steigender Glucose-Konzentrationen

Zur Ermittlung derjenigen Konzentration unmarkierter Glucose, bei welcher die Inhibition des Kohlenhydrattransfers am stärksten ist, wurden je 2 Flechtenscheiben mit 1 μl $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ in 100 μl Bg11₀ bei steigenden Glucose-Konzentrationen für 3 h inkubiert. 1 mM unmarkierte Glucose bewirkte hier noch keine Inhibition (Abb.3.14). Die nächsthöhere Konzentration von 10 mM zeigte bereits den stärksten Effekt. Höhere Glucose-Konzentrationen führten zur abnehmenden Inhibition des Kohlenhydrattransfers.

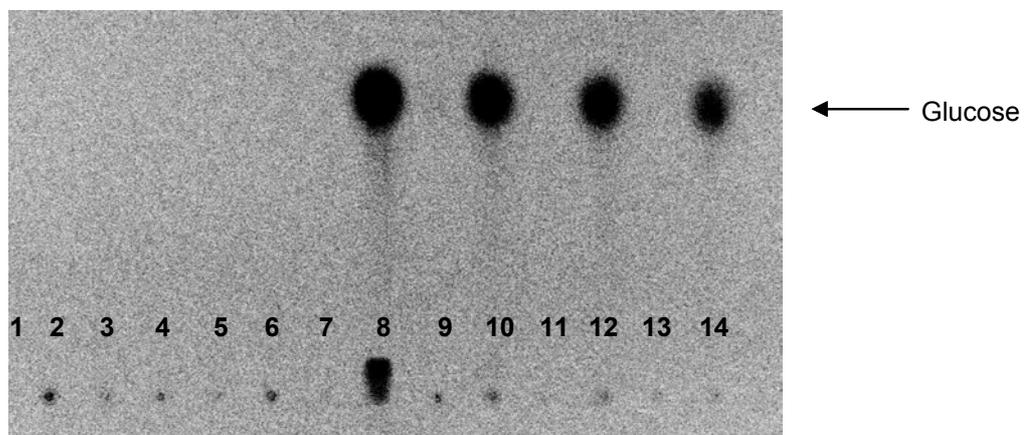


Abb. 3.14 : Kohlenhydrattransfer in Flechtenscheiben bei steigender Konzentration unmarkierter Glucose im Medium (radioaktive Chromatographie). Je 2 Flechtenscheiben wurden in 100 μl Bg11₀ mit 1 μl $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ für 3 h inkubiert. Die Ansätze enthielten Glucose in steigender Konzentration: 0 mM (Spuren 1 und 2), 0,1 mM (Spuren 3 und 4), 1,0 mM (Spuren 5 und 6), 10 mM (Spuren 7 und 8), 100 mM (Spuren 9 und 10), 150 mM (Spuren 11 und 12) und 250 mM (Spuren 13 und 14). Die Medienentnahme erfolgte nach 0 h (Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13) und 3h (Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14).

3.11 Analyse des Kohlenhydrattransfers in Anwesenheit steigender Fructose-Konzentrationen

Um zu erkennen, wie sich steigende Konzentrationen von Fructose auf den Kohlenhydrattransfer auswirken, wurden je 2 Flechtenscheiben in 100 μl Bg11₀ mit 1 μl $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ bei zunehmenden Fructose-Konzentrationen für 3 h inkubiert. Erst bei der höchsten Konzentration von 250 mM wurde ein deutliches Signal radioaktiver Fructose chromatographisch detektiert (Abb.3.15, Spur 6).

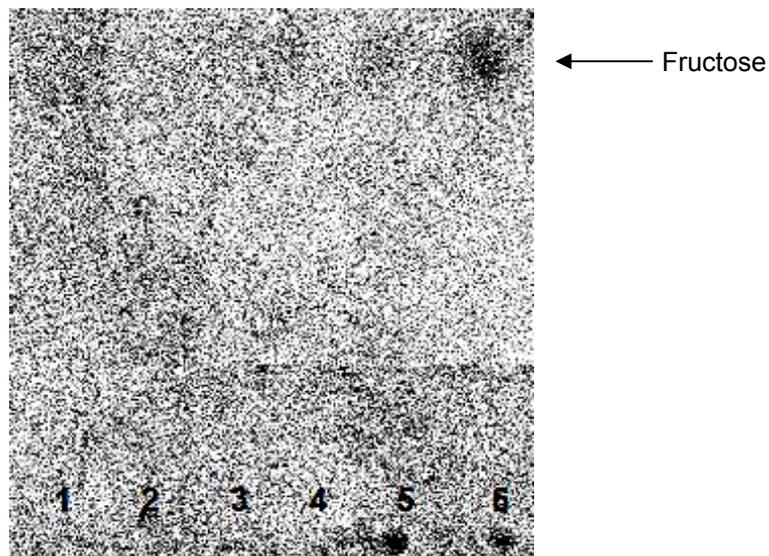


Abb. 3.15: Kohlenhydrattransfer in Flechtenscheiben bei steigender Konzentration unmarkierter Fructose im Medium (radioaktive Chromatographie). Je 2 Flechtenscheiben wurden in 100 μl Bg11₀ mit 1 μl $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ inkubiert. Die Ansätze enthielten Fructose in steigender Konzentration: 0 mM (Spur 1), 1 mM (Spur 2), 10 mM (Spur 3), 50 mM (Spur 4), 150 mM (Spur 5) und 250 mM (Spur 6). Die Medienentnahme erfolgte nach 3h.

3.12 Analyse des Glucosetransfers in Hell- und Dunkelphasen

Zur Beantwortung der Frage, ob der Glucosetransfer nur bei Belichtung oder auch während Dunkelphasen stattfindet, wurden je 2 Flechtenscheiben für 3 Tage in 100 μl Bg11₀ mit 1 μl $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ inkubiert und nach dem Waschen für 120 Minuten in 100 μl Bg11₀ mit 10 mM Glucose (ohne Radioaktivität) aufgenommen. Für Ansatz A erfolgte die zweistündige Inkubation im Hellen; Ansatz B wurde mit Silberfolie abgedunkelt. In einem Kontrollansatz wurden gleichalte unmarkierte Flechtenscheiben bei Helligkeit in 10 mM Glucose-Lösung mit 1 μl $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ inkubiert. Nach 30 und 120 Minuten wurde je 1 μl der drei Ansätze für die Chromatographie verwendet. Nur für den Kontrollansatz waren deutliche Glucose-Signale erkennbar (Abb.3.16). Ansatz A zeigte nach 2 h Inkubation ein sehr schwaches Glucose-Signal. Für Ansatz B waren ebenfalls sehr schwache Signale detektierbar, die aber keinem Zucker zugeordnet werden konnten.

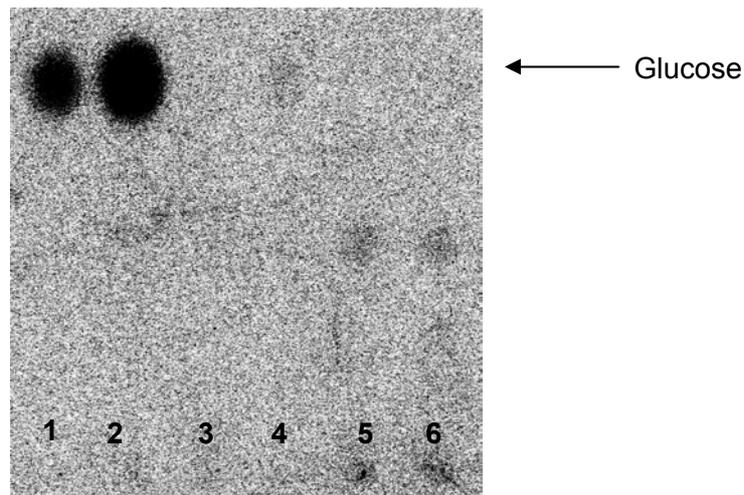


Abb.3.16: Vergleich des Kohlenhydrattransfers in Hell- und Dunkelphasen (radioaktive Chromatographie). Die Inkubation der Flechtenscheiben erfolgte in 100 μl Bg11₀ mit 10 mM Glucose. Als Kontrollansatz (Spuren 1 und 2) wurden 2 unmarkierte Flechtenscheiben zusätzlich mit 1 μl $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ inkubiert. Für Ansatz A (Spuren 3 und 4) und Ansatz B (Spuren 5 und 6) erfolgte die Inkubation der radioaktiv markierten Scheiben im Hellen bzw. Dunkeln (durch Verhüllung mit Silberfolie) ohne $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$. Die Scheiben der Ansätze A und B wurden vor dem Inhibitionsversuch für 3 Tage in 100 μl Bg11₀ mit 1 μl $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ inkubiert. Nach 30 min (Spuren 1, 3 und 5) und 120 min (Spuren 2, 4 und 6) wurde je 1 μl Medium für die chromatographische Analyse entnommen.

3.13 Analyse des Kohlenhydrattransfers in Flechtenscheiben nach Inkubation in einer ^{14}C -Glucose-Lösung

Um zu überprüfen, ob *Nostoc* auch während der Flechten-Symbiose Glucose aufnehmen kann und dies den Kohlenhydrattransfer beeinflusst, wurden je 2 Flechtenscheiben über Nacht in 100 μl Bg11₀ mit 2 μl ^{14}C -Glucose inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Scheiben nochmals in 100 μl Bg11₀ aufgenommen. In Ansatz A war keine Glucose vorhanden, während Ansatz B 10 mM Glucose enthielt. Die Medienentnahme aus beiden Ansätzen erfolgte nach 0, 20 und 40 Minuten. Die Chromatographie zeigte Folgendes: Bei Abwesenheit von Glucose (Ansatz A) wurden Saccharose und Maltose freigesetzt, die nur cyanobakteriellen Ursprungs sein können. Die entsprechenden Signale waren schwach und nach 40 Minuten nicht mehr zu sehen (Abb. 3.17, Spuren 1-3). Bei Anwesenheit unmarkierter Glucose (Ansatz B) wurden die Signale verstärkt; nach 20 Minuten war darüber hinaus ein Glucose-Signal zu erkennen, das nach 40 Minuten stärker hervortrat (Abb. 3.17, Spuren 4-6). Demnach nimmt *Nostoc* während der Symbiose Glucose auf und setzt anschließend die Disaccharide Maltose und Saccharose frei.

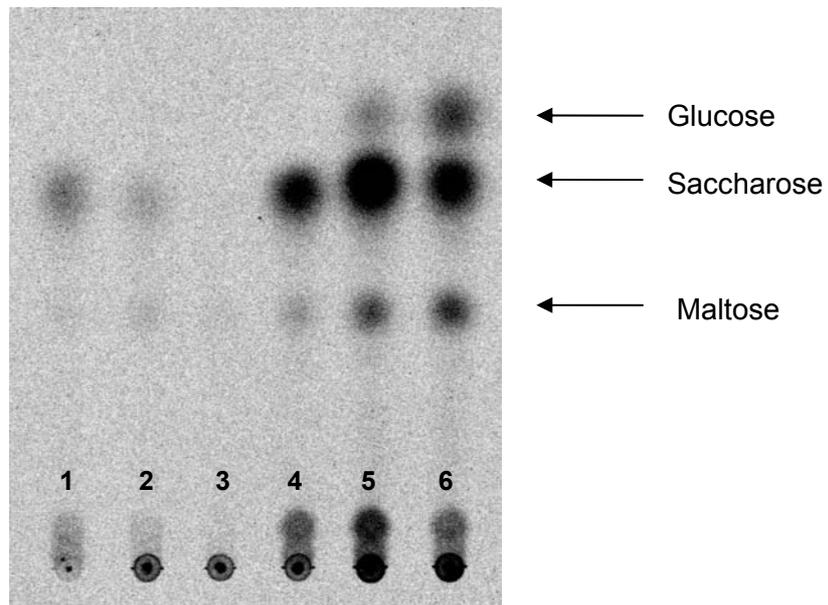


Abb. 3.17: Kohlenhydrattransfer nach Vorinkubation in einer ^{14}C -Glucose-Lösung (radioaktive Chromatographie). Je 2 Flechtenscheiben wurden über Nacht in 100 μl Bg11₀ mit 2 μl ^{14}C -Glucose bei einer Belichtungsintensität von 20 μmol Photonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Scheiben in 100 μl Bg11₀ aufgenommen. Ansatz A (Spuren 1-3) enthielt keine Glucose. Ansatz B (Spuren 4-6) enthielt 10 mM Glucose. Die Medienentnahme für die chromatographische Analyse erfolgte nach 0 min (Spuren 1 und 4), 20 min (Spuren 2 und 5) und 40 min (Spuren 3 und 6).

3.14 Induktion der Glucose-Freisetzung aus dem kultivierten *Nostoc*

Wenn *Nostoc* in der Symbiose nach Glucose-Aufnahme Kohlenhydrate freisetzen kann (Kap.3.13), ist solches auch für die kultivierte Form denkbar. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde folgendermaßen vorgegangen: Je 200 μl *Nostoc* wurden über Nacht mit 2 μl ^{14}C -Glucose (Ansätze A und B) bzw. ohne ^{14}C -Glucose (Ansätze C und D) bei Anwesenheit von 1 μl $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (in allen vier Ansätzen) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen aus Ansatz A in 200 μl Bg11₀ ohne Glucose und die Zellen aus Ansatz B in 200 μl Bg11₀ mit 10 mM Glucose überführt. Die Ansätze C und D wurden ebenso behandelt, so dass die Zellen aus Ansatz C ohne Glucose und die Zellen aus Ansatz D mit Glucose inkubierten. Die Medienentnahme erfolgte nach 0 und 30 Minuten. Nur Ansatz B zeigte nach 30 Minuten ein Glucose-Signal (Abb. 3.18, Spur 4). Das heißt, nur in Anwesenheit unmarkierter Glucose im Inkubationsmedium war nach einer vorher erfolgten Glucose-Aufnahme eine Glucose-Freisetzung nachzuweisen. Demnach setzt *Nostoc* aufgenommene ^{14}C -Glucose frei und nimmt diese wieder auf; bei Konkurrenz mit der unmarkierten Form um den Import akkumuliert die radioaktive Form im Medium.

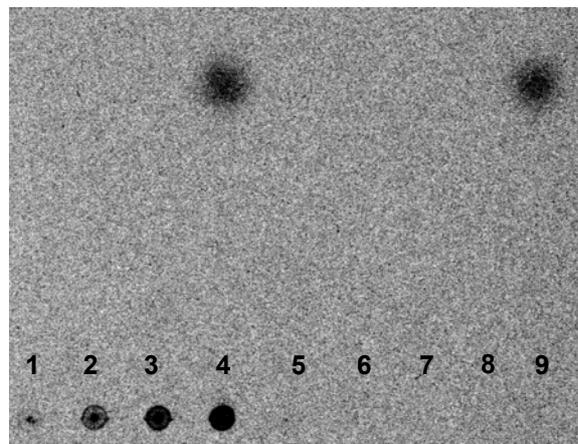


Abb. 3.18: Glucose-Freisetzung aus dem kultivierten *Nostoc* (radioaktive Chromatographie). Für Ansatz A (Spuren 1 und 2) und Ansatz B (Spuren 3 und 4) wurden je 200 μl *Nostoc* über Nacht mit 2 μl ^{14}C -Glucose bei einer Belichtungsintensität von 20 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ vorinkubiert. Für Ansatz C (Spuren 5 und 6) und Ansatz D (Spuren 7 und 8) erfolgte die Vorinkubation ohne ^{14}C -Glucose bei gleicher Lichtintensität. In allen Ansätzen war während der Vorinkubation 1 μl $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ enthalten. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen aus den Ansätzen A und C in 200 μl Bg11₀ ohne Glucose und die Zellen aus den Ansätzen B und D in 200 μl Bg11₀ mit 10 mM Glucose überführt. Je 1 μl Medium wurde nach 0 min (Spuren 1, 3, 5 und 7) und 30 min (Spuren 2, 4, 6 und 8) für die chromatographische Analyse entnommen. Radioaktive Glucose wurde als Marker verwendet (Spur 9).

3.15 Charakterisierung des Glucose-Imports von *Nostoc* während der Flechten-Symbiose

Um die Frage zu klären, ob ein protonenabhängiger Glucose-Import wie für den freilebenden Zustand (Kap. 3.5) angenommen werden kann, wurden in zwei Ansätzen je 2 Flechtenscheiben in 100 μl Bg11₀ mit 2 μl ¹⁴C-Glucose für 3 h bei Dunkelheit inkubiert. Ansatz A enthielt 1 μl DMSO, das Lösungsmittel von CCCP. In Ansatz B war 1 μl 50 mM CCCP (Endkonzentration 500 μM) enthalten. Die Flechtenscheiben wurden anschließend dreimal gewaschen und mit Ethanol aufgeschlossen. Die eingedampften Extrakte wurden in jeweils 40 μl Wasser für die anschließende chromatographische Analyse aufgenommen. Als nicht-radioaktiver Marker wurde neben den drei Disacchariden auch Mannitol (Umwandlungsprodukt von Glucose im Mycobionten) aufgetragen. Obwohl die hier angewandte Kieselguhr-DC nicht für die Identifizierung von Mannitol etabliert ist, zeigte Mannitol eine Laufweite, die zwischen derjenigen von Saccharose und Glucose liegt. Die Reaktion mit dem Sprühreagenz war äußerst schwach, genügte jedoch zur Lokalisierung dieses Signals. Die radioaktive Chromatographie (Abb. 3.19) zeigte für Ansatz A (ohne CCCP) ein wesentlich stärkeres Mannitol-Signal als für Ansatz B und weist daher auf einen protonenabhängigen Glucose-Import durch den Mycobionten hin. Nur für Ansatz A war ein deutliches Maltose-Signal nachzuweisen, das ausschließlich cyanobakteriellen Ursprungs sein kann. Dies ist ein erster Hinweis, dass ein Glucose-H⁺-Symport in *Nostoc* während der Flechten-Symbiose stattfindet.

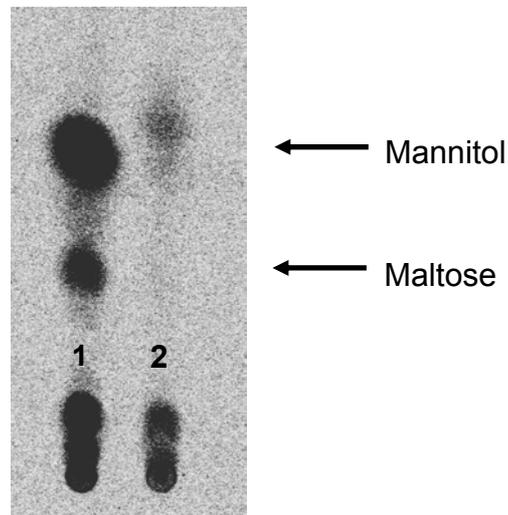


Abb. 3.19: Überprüfung eines protonenabhängigen Glucose-Imports durch *Nostoc* während der Symbiose (radioaktive Chromatographie). Je 2 Flechtenscheiben wurden in 100 μl Bg11₀ mit 2 μl ¹⁴C-Glucose für 3 h bei Dunkelheit inkubiert. Ansatz A (Spur1) enthielt 1 μl DMSO (Lösungsmittel von CCCP). Ansatz B enthielt 1 μl 50 mM CCCP (Endkonzentration 500 μM). Die dreimal gewaschenen Flechtenscheiben wurden mit Ethanol aufgeschlossen. Die eingedampften Extrakte wurden in jeweils 40 μl Wasser für die anschließende chromatographische Analyse aufgenommen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Diplomarbeit wurde schwerpunktmäßig die Zucker-Abgabe und -Aufnahme des lichenisierten und kultivierten Photobionten *Nostoc spec.* aus der Flechte *Peltigera praetextata* analysiert, wofür neben molekularbiologischen, biochemischen und bioinformatischen Methoden Inhibitionsversuche nach DREW und SMITH (1967) in Verbindung mit Dünnschichtchromatographien zum Einsatz kamen. Im Folgenden sollen die eigenen Untersuchungsergebnisse im Zusammenhang mit Daten verschiedener Autoren erörtert werden. Zu den Themen, die hier behandelt werden, gehören u. a. die Bedeutung von Saccharose und Trehalose bei Trockenstress und die mögliche Funktion von Saccharose für den Kohlenhydrattransfer in *P. praetextata*. Vor allem soll ein Modell zum Kohlenhydrattransfer in Blaualgenflechten entwickelt werden, das die Daten aus dieser Diplomarbeit und anderen Untersuchungen erklären kann.

4.1 Die untersuchte Flechte *P. praetextata* stellt wie andere Flechten ein Habitat für Mikroorganismen dar.

Zu Beginn der Isolierung von *Nostoc* aus *P. praetextata* wurden bei der mikroskopischen Inspektion neben *Nostoc* Vertreter weiterer Cyanobakterien-Ordnungen identifiziert: *Oscillatoria spec.* (Ordnung *Oscillatoriales*), *Calothrix spec.* (Ordnung *Nostocales*) und *Cyanocystis spec.* (Ordnung *Chroococcales*).

Große Blaualgenflechten werden oft von epiphytischen Diatomeen, Grünalgen oder Cyanobakterien besiedelt, wobei Diatomeen in trockenen Habitaten überwiegen, während Cyanobakterien und Grünalgen feuchte Habitate bevorzugen (ROUND, 1984; BÜDEL et al., 1994). Die Gründe für die Besiedlung von Blaualgenflechten durch diese Epiphyten sind nicht bekannt. Womöglich können einige von ihnen den Cyanobionten als Quelle von Glucose und Ammoniak nutzen. Oft sind auch heterotrophe Bakterien in der EPS freilebender oder lichenisierter Cyanobakterien zu finden (AHMADJIAN, 1989).

4.2 Eine symbiosespezifische Expression von Glucosetransportproteinen scheint nicht stattzufinden.

Es kann nach eigenen Untersuchungen und nach Ergebnissen von MEINDL & LOOS (1990) nicht postuliert werden, dass Cyanobionten wie *Nostoc spec.* aus *P. praetextata* symbiosespezifische Glucosetransportproteine exprimieren:

Zum Einen wurde dargestellt, dass die von WASTLHUBER (1996) identifizierten DNA-Teilsequenzen wahrscheinlich nicht cyanobakteriellen Ursprungs sind (Kap.3.3). Sie könnten auf Kontaminationen durch Bakterien oder Pilze zurückgeführt werden. Eine unmittelbar kontaminationsfreie Isolierung des Photobionten aus der Flechte ist schwierig. Zeitnahe Expressionsanalysen, die als Beleg für eine symbiosespezifische Proteinsynthese herangezogen werden, können durch weitere Organismen in der Flechte (Kap. 4.1) empfindlich gestört werden. Kontrollmöglichkeiten für isolierte Sequenzen sind mit Hilfe von Datenbanken für DNA- und Proteinsequenzen erst seit wenigen Jahren zunehmend verfügbar.

Insbesondere spricht gegen das Postulat eines ausschließlich in der Symbiose exprimierten Transportproteins für den Glucose-Export, dass die Freisetzung von Glucose aus kultivierten *Nostoc*-Stämmen erfolgen kann, die aus einer Flechten-Symbiose isoliert wurden. So wurde eine Glucose-Freisetzung aus dem kultivierten *Nostoc spec.* von *P. polydactyla* detektiert, die durch FCCP um ein Vielfaches gesteigert wurde (MEINDL & LOOS, 1990). Zudem wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Glucose-Freisetzung aus dem kultivierten *Nostoc spec.* von *P. praetextata* nach Inkubation in einer ^{14}C -Glucose-Lösung (Kap. 3.14, Abb. 3.18) nachgewiesen.

4.3 Der untersuchte *Nostoc*-Stamm exprimiert wahrscheinlich freilebend und lichenisiert zwei Glucosetransportproteine.

MEINDL & LOOS (1990) beobachteten eine Glucose-Freisetzung aus einem freilebenden Stamm von *Nostoc punctiforme* und aus *Nostoc spec.* von *P. horizontalis*, die auf eine erleichterte Diffusion zurückgeführt wurde. Daher kann auch für *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 ein Transportprotein für die erleichterte Diffusion von Glucose postuliert werden. Im Genom von *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 wurde nur ein Homolog zu einem charakterisierten Glucosetransporter, und zwar zu demjenigen von *Synechocystis sp.* PCC 6803, identifiziert (Kap. 3.2, Abb. 3.3). Der Glucosetransporter von *Synechocystis sp.* PCC 6803 katalysiert einen Glucose- H^+ -Symport, für welchen das Homolog in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 ebenfalls verantwortlich sein könnte. Ist dies der Fall, dann käme für eine

erleichterte Diffusion der Glucose ein zweiter Glucosetransporter in Frage, dessen Aminosäuresequenz von den Aminosäuresequenzen bereits charakterisierter Glucosetransporter stärker abweichen würde.

Es wurde nicht untersucht, wie nahe *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 und der hier isolierte Photobiont *Nostoc* spec. aus *P. praetextata* verwandt sind und inwiefern die Genome Unterschiede aufweisen. Trotz dieser Unsicherheiten war das Genom des sequenzierten *N. punctiforme*-Stamms Grundlage dafür, dass eine Teilsequenz eines putativen Glucosetransporters im untersuchten Photobionten identifiziert werden konnte. Aufgrund der Homologie zum verifizierten Glucosetransporter aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kap. 3.4) wurde ein sekundär-aktiver Glucose-Import postuliert. Nach Aufnahmeversuchen kann dieser Transport-Mechanismus (Glucose-H⁺-Symport) für die kultivierte (Kap. 3.5, Abb.3.7) und lichenisierte Form (Kap. 3.15, Abb. 3.19) angenommen werden. Das Monosaccharid wird von *Nostoc* auch exportiert, und zwar sowohl während der Symbiose (Kap. 3.9, Abb. 3.12 und Kap. 3.10, Abb. 3.14) als auch freilebend (Kap. 3.14, Abb. 3.18). Für den Export könnte eine erleichterte Diffusion verantwortlich sein, wie sie von MEINDL & LOOS (1990) bereits für andere *Nostoc*-Stämme postuliert wurde.

Hinweise auf eine erleichterte Diffusion der Glucose liegen für das lichenisierte *Nostoc* aus *P. praetextata* nach einem Inhibitionsversuch (Kap. 3.10, Abb. 3.14) vor: Konzentrationen unmarkierter Glucose von über 10 mM führten zum Rückgang der radioaktiven Form im Transfermedium. Wahrscheinlich liegt die intrazelluläre Glucose-Konzentration des Photobionten weit unter 10 mM, so dass die Freisetzung radioaktiver Glucose im Falle einer erleichterten Diffusion bei dieser Konzentration im Medium bereits vermindert ist. Gleichzeitig wird aber auch der Import radioaktiver Glucose durch zunehmende Konkurrenz mit unmarkierter Glucose inhibiert. Dass bei einer Glucose-Konzentration unter 10 mM keine transferierte Glucose detektierbar war, kann auf einen ungesättigten Glucose-Import durch den Mycobionten und womöglich durch den Cyanobionten selbst zurückgeführt werden. Mit steigender Konzentration unmarkierter Glucose im Medium wird die Freisetzung radioaktiver Glucose ins Medium vermindert, gleichzeitig wird aber auch der Import der radioaktiven Glucose durch den Mycobionten (und Photobionten) gehemmt. Deshalb bestimmen bei zunehmender Konzentration unmarkierter Glucose im Medium zwei gegensätzliche Tendenzen die Akkumulation der radioaktiven Glucose aus dem Photobionten. Bei einer 10 mM Konzentration unmarkierter Glucose im Medium ist demnach der Import radioaktiver Glucose relativ zu deren Export am stärksten inhibiert.

Eine erleichterte Diffusion als Glucose-Transportmechanismus wurde auch für heterotrophe Bakterien wie *Lactobacillus sanfrancisco* (NEUBAUER et al., 1994) *Streptococcus bovis* (RUSSELL, 1990), *Thermoanaerobacter thermosulfuricus* (COOK, 1993) und *Zymomonas mobilis* (DI MARCO & ROMANO, 1985) nachgewiesen.

Unter der Prämisse, dass ein aktiver Glucose-Import und ein passiver Glucose-Export nicht über das gleiche Protein vermittelt werden, können für den lichenisierten und kultivierten Photobionten zwei gleichzeitig exprimierte Glucosetransporter postuliert werden. Für diesen Fall müßte eine unter ATP-Hydrolyse stattfindende transmembrane Zuckerzirkulation angenommen werden. Solche energieverbrauchenden, scheinbar unproduktiven Stoffwechselwege, sogenannte *futile cycles*, werden in Kapitel 4.9 ausführlicher dargestellt.

4.4 Die Abgabe von Saccharose und Trehalose durch *Nostoc* ist ein Schutzmechanismus während der Austrocknung.

Nach Befeuchtung getrockneter *Nostoc*-Pellets waren im Bg11₀-Überstand unmittelbar Saccharose und – in geringeren Mengen- Trehalose chromatographisch nachzuweisen (Kap.3.6, Abb. 3.9). Photometrisch ließ sich zeigen, dass die Saccharose-Konzentration im Überstand zumindest innerhalb der ersten Stunde anstieg und nach 3 Stunden stark abgefallen war (Kap.3.7, Abb. 3.10). Aufgrund der direkten Nachweisbarkeit und des relativ geringen Konzentrationsanstiegs im Medium sollten Saccharose und Trehalose bereits vor der Wiederbefeuchtung, das heißt während des kontinuierlichen Wasserverlusts, von den Zellen exportiert worden sein. Eine Freisetzung durch tote Zellen konnte dem Phenosafranin-Test zufolge, wenn überhaupt, nur in geringem Maße stattfinden (Kap.3.7). Der anfängliche Anstieg der Saccharose-Konzentration im Medium ist womöglich darauf zurückzuführen, dass die Saccharose im Pellet nicht unmittelbar vollständig in Lösung gegangen war. Der Rückgang der Saccharose-Konzentration weist – bei gleichzeitiger Abwesenheit anderer Mikroorganismen - auf den Reimport des Disaccharids hin. Offenbar kann der während der beginnenden Trockenphase abgegebene Zucker nach Wiederbefeuchtung metabolisiert werden. Diese Annahme ist konsistent mit der Feststellung, dass *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 für das heterotrophe Wachstum neben Glucose und Fructose auch Saccharose nutzen kann (MEEKS et al., 2001).

Unter den Cyanobakterien gibt es Vertreter, die Trockenperioden von mindestens 25 Jahren überleben (TRAINOR, 1985). *Nostoc commune* soll sogar nach über 100 Jahren Trockenheit das Wachstum fortsetzen können, und zwar ohne vorhergehende Differenzierung in Akineten (TAMARU et al., 2005). Eine physiologische Reaktion auf den Wasserentzug stellt hierbei die

erhöhte Konzentration von Zuckern dar. Diese sind im Falle von *N. commune* – wie bei dem hier untersuchten *Nostoc*-Stamm - Saccharose und Trehalose, während für andere *Nostoc*-Arten entweder nur eine Trehalose- oder Saccharose-Akkumulation dokumentiert ist (REED et al., 1984).

Es wird angenommen, dass bei Trockenstress und osmotischem Stress (aufgrund erhöhter Salzkonzentration im Wachstumsmedium) die gleichen Zucker akkumulieren (HERSHKOVITZ et al., 1991). Den beiden Stress-Situationen ist der Wasserentzug aus den Zellen gemein. Osmotischer Stress führt aber zu zusätzlichem Ioneneinstrom. Die in beiden Fällen erhöhte intrazelluläre Salzkonzentration soll die Syntheserate derjenigen Zucker steigern, die für Trockenresistenz verantwortlich sind. Für nicht-trockenresistente Cyanobakterien wie *Plectonema boryanum* und *Synechococcus sp.* PCC 7942 ist keine Zuckerakkumulation nachweisbar (HERSHKOVITZ et al., 1991). Saccharose und Trehalose stellen wie L-Prolin, Sorbitol, Mannitol, Glucosylglycerin oder Glycinbetain kompatible Solute dar. Diese organischen Verbindungen stören auch in hohen Konzentrationen nicht den Metabolismus. Ihre primäre Funktion ist es, das Wasserpotential von Zellen zu senken, um somit einem Wasserentzug bei Salz- bzw. Trockenstress entgegenzuwirken (BUCHANAN, 2000).

Saccharose und Trehalose können darüber hinaus wie Wassermoleküle Wasserstoffbrücken-Bindungen mit den polaren Phospholipid-Köpfen von Membranen eingehen und daher bei Wasserentzug die Wassermoleküle ersetzen. So verhindern sie die Fusion von Membranen beim Eintrocknen und halten sie in einem flüssig-kristallinen Zustand. In Abwesenheit der Disaccharide gehen eintrocknende Membranen in einen festeren Zustand über. Eine Wiederbefeuchtung führt dann zum erneuten Übergang in die flüssig-kristalline Phase, der mit schädigenden Strukturveränderungen und Metabolitenausfluss verbunden ist (CROWE et al., 2002). Saccharose und Trehalose stabilisieren zudem Proteine während der De- und Rehydratation (CARPENTER & CHANG, 1996). Die Effekte und Funktionen dieser Zucker tragen somit dazu bei, das Überleben von Zellen während des Wasserverlusts und bei der Wiederbefeuchtung zu ermöglichen. Weitere Mechanismen und Schutzmaßnahmen, die der Anhydrobiose zugrunde liegen, werden diskutiert (CROWE et al., 1998; POTTS et al., 2005).

Saccharose und Trehalose müssen bei zunehmendem Wassermangel aus den Zellen exportiert werden, um die Wassermoleküle an der Außenseite der Plasmamembran und an beiden Seiten der äußeren Membran zu ersetzen. HERSHKOVITZ (1991) konnte dennoch keine extrazelluläre Lokalisation der Disaccharide für die untersuchten trockenresistenten Cyanobakterien nachweisen. Es wurden keine Berichte gefunden, die einen Export von Saccharose oder Trehalose als Reaktion auf Trockenstress dokumentieren. Für *E. coli* wurde jedoch der Export von Trehalose bei osmotischem Stress festgestellt. Weil die Trehalose

gleichzeitig im periplasmatischen Raum durch eine Trehalase zu Glucose abgebaut und diese importiert wird, wurden die Transportvorgänge als ein *futile cycle* beschrieben, der die intrazelluläre Trehalose-Konzentration bei osmotischem Stress regulieren soll (STYRVOLD & STRØM, 1991). Für Trockenstress kann ein vergleichbarer Vorgang postuliert werden. Hierbei erschiene die Zirkulation der Zucker als eine effektive Anpassung, denn das Disaccharid würde, solange genügend Wasser für die Trehalase-Aktivität und für den Glucose-Import vorhanden ist, als Energiequelle genutzt werden und erst dann außerhalb der Zelle akkumulieren und seine Schutzfunktion für die Zellmembranen ausüben, wenn zuwenig Wasser für den enzymatischen Abbau und Glucose-Import zur Verfügung steht. Diese Spekulation bietet auch eine Erklärungsmöglichkeit für die Trockenstress-Induktion eines Operons von *Anabaena* sp. PCC 7120, das zwei Enzyme für die Produktion von Trehalose aus Glykogen und eine Trehalase codiert. Ob die Trehalase im periplasmatischen Raum oder intrazellulär lokalisiert ist, müsste noch untersucht werden. Die gleiche Gruppierung homologer Gene wurde in den Genomen von *A. variabilis* und *Nostoc punctiforme* identifiziert (HIGO et al., 2006). Deshalb kann angenommen werden, dass Trockenstress zumindest bei *Nostoc spec.* aus *P. praetextata*, *Anabaena* sp. PCC 7120 und *E. coli* eine transmembrane Zucker-Zirkulation und gleichzeitige Verwertung von Trehalose bewirkt, bis der Import von Glucose oder evtl. Trehalose durch Wassermangel nicht mehr möglich ist und außen akkumulierte Trehalose die Membran schützt. Ein vergleichbares Szenario erscheint auch für Saccharose plausibel. Weil die beiden Disaccharide direkt nach Wiederbefeuchtung getrockneter *Nostoc*-Pellets im Medium nachweisbar waren (Kap. 3.6, Abb. 3.9), erhält die vorgestellte Annahme eine erste experimentelle Unterstützung.

4.5 Der Glucosetransfer in *P. praetextata* basiert wahrscheinlich nicht auf einer extrazellulären Hydrolyse von Disacchariden.

Es kann zwar angenommen werden, dass der untersuchte *Nostoc*-Stamm auch in lichenisierter Form Saccharose und Trehalose während einer beginnenden Trockenphase freisetzt, aber gemäß Kap. 3.9 (Abb. 3.12) basiert der Kohlenhydrattransfer zum größten Teil nicht auf Trockenstress, weil die transferierte Glucose und Fructose bei ständiger Befeuchtung (in Bg11₀) gebildet wurden. Saccharose, Trehalose (Kap. 3.9, Abb. 3.12) und Maltose (Kap. 3.9, Abb. 3.13) waren nicht als Transferzucker nachweisbar. Eine extrazelluläre Hydrolyse dieser Disaccharide als Grundlage für den Kohlenhydrattransfer in *P. praetextata* kann demnach nicht angenommen werden.

Dennoch ist es denkbar, dass der Mycobiont nach Trockenphasen zusätzlich Saccharose und Trehalose vom Cyanobionten metabolisieren kann: Die Beobachtung, dass Trehalose eine Akkumulation radioaktiver Glucose im Rahmen eines Inhibitionsversuchs verursachte (Kap. 3.9, Abb. 3.12), ist ein Hinweis auf eine extrazelluläre Trehalase des Cyanobionten oder Mycobionten. Diese könnte die (eventuell) während der Trockenphase abgegebene Trehalose spalten und eine nachfolgende Glucose-Aufnahme durch einen oder durch beide Symbiosepartner ermöglichen. Zumindest kann man feststellen, dass Trehalose ein Substrat für den Cyanobionten und / oder Mycobionten darstellt. Eine Akkumulation der radioaktiven Glucose während des Inhibitionsversuchs aufgrund einer Konkurrenz zwischen dem Monosaccharid Glucose und dem Disaccharid Saccharose um ein gleiches Transportprotein wird hier für unwahrscheinlich gehalten. Saccharose führte zu keiner Glucose-Akkumulation (Kap. 3.9, Abb. 3.12). Dies widerlegt nicht die Bedeutung von Saccharose während der Trockenphase oder eine mögliche Funktion als Substrat, denn der Zucker könnte direkt von den Symbiosepartnern importiert werden. Es liegen lediglich keine Hinweise auf eine extrazelluläre Hydrolyse durch Invertase-Aktivität vor.

Nach Inkubation von Flechtenscheiben in einer ^{14}C -Glucose-Lösung waren Maltose und Saccharose im Medium nachzuweisen (Kap. 3.13, Abb. 3.17). Die beiden Disaccharide könnten daher unter Bedingungen einer erhöhten Kohlenhydrat-Konzentration in den Photobionten-Zellen von diesen freigesetzt und vom Mycobionten aufgenommen werden. Auf die Abgabe der Disaccharide wird in Kapitel 4.8 näher eingegangen.

4.6 Die Fructose-Freisetzung aus *Nostoc* ist wahrscheinlich auf Saccharose zurückzuführen.

Es wurde nachgewiesen, dass der untersuchte Cyanobiont aus *P. praetextata* neben Glucose auch sehr geringe Mengen an Fructose freisetzt (Kap. 3.9, Abb. 3.12; Kap. 3.11, Abb. 3.15). Unter der Prämisse, dass der Cyanobiont Fructose intrazellulär produziert, kann als einzige Quelle nur Saccharose postuliert werden. Für die intrazelluläre Fructose-Produktion spricht, dass eine enzymatische Freisetzung von Fructose als Zuckermonomer der EPS unwahrscheinlich ist, weil Fructose – im Gegensatz zu Glucose - bisher nicht als EPS-Monomer von Cyanobakterien nachgewiesen worden ist. Die genaue Monomerzusammensetzung der EPS ist zumindest an folgenden Cyanobakterien bestimmt worden: *Anabaena inaequalis*, *A. lutea*, *Nostoc commune*, *N. insulare* (FISCHER et al., 1997) und *Cyanothece* spec. (DE PHILIPPIS et al., 1998). Die verschiedenen Zucker-monomere einer EPS sind in vielen Fällen neutrale Zucker wie Rhamnose, Fucose, Arabinose und Glucose sowie Uronsäuren. Falls Glucose und Fructose aus der EPS des Cyanobionten enzymatisch freigesetzt würden, dann

müsste eine stetige Produktion der EPS als Quelle für die transferierten Zucker stattfinden. Dafür gibt es jedoch keine Hinweise.

Saccharose wurde für den in Bg11₀ angezogenen Cyanobionten auch ohne vorhergehende Trockenphase nachgewiesen (Kap.3.8, Abb. 3.11). Dieses Disaccharid ist in Pflanzen neben Stärke ein dominierendes Endprodukt der Photosynthese und in vielen Fällen die Transportform des fixierten Kohlenstoffs. Für Cyanobakterien wird die Synthese von Saccharose meist im unmittelbaren Zusammenhang mit Trockenstress und osmotischem Stress diskutiert. Es wurden keine Publikationen gefunden, die die Bildung oder Funktion von Saccharose in Cyanobionten ansprechen. Nach CURATTI et al. (2002) ist Saccharose wahrscheinlich ein Metabolit von N₂-fixierenden *Anabaena*-Trichomen, der von den vegetativen Zellen in die Heterocysten transportiert und durch die Invertase gespalten wird, so dass Glucose und Fructose für den oxidativen Pentosephosphatweg verfügbar werden. Auch für vegetative Zellen wurden Invertase-Aktivitäten nachgewiesen. Zudem enthalten die vegetativen Zellen die Saccharose-Synthase für die Umwandlung von Saccharose in Fructose und UDP-Glucose. Saccharose konnte zwar für unter Stickstofflimitation wachsende und daher Heterocysten bildende *Anabaena*-Kulturen nicht detektiert werden. Es wurde für diese jedoch eine höhere Invertase-Aktivität als für mit Nitrat oder Ammoniak angezogenen Kulturen festgestellt, die Saccharose in nachzuweisenden Mengen bildeten. Daher wurde für die N₂-fixierenden *Anabaena*-Trichome ein hoher Saccharose-Turnover postuliert, bei dem die Abbaurate so hoch ist, dass die Saccharose nicht in nachweisbaren Mengen akkumulieren kann (CURATTI et al., 2002). In Anbetracht dessen war der direkte Saccharose-Nachweis für die in Bg11₀ kultivierten *Nostoc*-Trichome nicht selbstverständlich (Kap.3.8, Abb. 3.11). *Nostoc* ist auch in lichenisierter Form einer Stickstofflimitation ausgesetzt, die durch die geringe Glutaminsynthetase-Aktivität mit der einhergehenden Ammoniak-Freisetzung verschärft wird. Es kann deshalb angenommen werden, dass *Nostoc* während der Flechten-Symbiose tagsüber nicht nur Glykogen bildet, sondern auch in einem hohen Turnover Saccharose.

Im Rahmen der Inhibitionsversuche war radioaktive Fructose erst bei hohen Konzentrationen der unmarkierten Form von mindestens 150 mM im Transfermedium nachweisbar (Kap.3.9, Abb. 3.12; Kap. 3.11, Abb. 3.15), so dass der Transport wahrscheinlich gegen einen Konzentrationsgradienten erfolgt. Demnach müsste ein aktiver Transportmechanismus vorliegen. Scheinbar führen erst hohe Fructose-Konzentrationen dazu, dass der Import durch den Mycobionten gesättigt ist und nachfolgend radioaktive Fructose im Medium akkumuliert. Fructose kann im Mycobionten wie Glucose durch Umwandlung in Fructose-6-phosphat für die Mannitol-Synthese genutzt werden (BUCHANAN et al., 2000).

4.7 Glycogen oder Saccharose ist die Quelle für den Glucosetransfer.

Im Folgenden soll dargelegt werden, dass manche Versuchsergebnisse und Beobachtungen für Glycogen bzw. Saccharose als Quelle für den Glucosetransfer in *P. praetextata* und anderen Blaualgenflechten sprechen:

1) Für Cyanobionten wurde bisher davon ausgegangen, dass sie Glycogen für den Glucosetransfer tagsüber abbauen (PEVELING & HILL, 1974; CHAMBERS et al., 1976; WASTLHUBER, 1996). Dies setzt einen hohen Glycogen-Turnover während des Tages voraus, der für Cyanobionten bisher nicht gezeigt wurde. Dieser erscheint jedoch möglich, weil für das Cyanobakterium *Anacystis nidulans* ein am Tag stattfindender Glycogen-Turnover nachgewiesen wurde (LEHMANN & WÖBER, 1976).

2) Für einen hohen Saccharose-Turnover und somit für eine Funktion von Saccharose als Quelle für den Glucosetransfer spricht, dass der Cyanobiont *Nostoc* wie *Anabaena variabilis* (Kap. 4.6) in den vegetativen Zellen Saccharose für den Metabolismus in den Heterocysten bilden muss und der Abbau wahrscheinlich bereits in den vegetativen Zellen stattfinden kann.

3) Nach Kap. 3.12 (Abb. 3.16) war für die Flechtenscheiben kein Glucosetransfer in Dunkelphasen festzustellen. Diese Beobachtung stimmt mit einer Publikation von RAI & BERGMAN (2002) überein, nach welcher der Glucosetransfer in Blaualgenflechten hauptsächlich tagsüber erfolgt. Allerdings war der Glucosetransfer auch während der Belichtungsphasen kaum nachzuweisen, wenn die Behandlung der Flechtenscheiben vor dem Inhibitionsversuch mit $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ - und nicht währenddessen - erfolgte. Wenn hierbei das Glycogen des Cyanobionten ausreichend markiert war, kann dieses nicht als Quelle für den Glucosetransfer angenommen werden. Die Beobachtungen wären konsistent mit der Annahme, dass Saccharose statt Glycogen die Quelle für die transferierte Glucose darstellt. Eine Unsicherheit der Untersuchung (Kap. 3.12) ist jedoch, dass nicht überprüft wurde, inwiefern das Glycogen des Cyanobionten während der Vorinkubation der Flechtenscheiben mit $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ radioaktiv markiert wurde. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass während des Inhibitionsversuchs das Glycogen unzureichend markiert war. Daraus freigesetzte Glucoseeinheiten wären beim Transfer womöglich nicht zu detektieren gewesen. Es liegen keine Informationen darüber vor, ob auch der Mycobiont Glycogen enthält. Stattdessen wird Mannitol als dessen dominierendes Kohlenhydrat dargestellt (NASH, 1996; RAI, 2002). Falls der Mycobiont Glycogen bildet, wäre es kaum möglich, die Markierung des cyanobakteriellen Glycogens in den Flechtenscheiben gesondert zu überprüfen.

4) Saccharose ist sehr wahrscheinlich für die Fructose-Freisetzung aus dem Cyanobionten verantwortlich (Kap. 4.6). Da durch die Saccharose-Hydrolyse mittels Invertase auch Glucose entsteht, könnte die freigesetzte Glucose auf diese Reaktion zurückgeführt werden. Die Tatsache, dass Glucose in viel größeren Mengen als Fructose transferiert wird (Kap. 3.9, Abb. 3.12), obwohl aus der Saccharose-Hydrolyse gleiche Mengen der beiden Monosaccharide hervorgehen, könnte damit erklärt werden, dass Fructose womöglich schneller metabolisiert wird als Glucose und / oder der Fructose-Transport langsamer als der Glucose-Transport erfolgt.

5) WASTLHUBER (1996) stellte fest, dass während des starken Abfalls der Glucose-Freisetzung durch *Nostoc spec.* nach der Isolierung aus *Peltigera polydactyla* der Glycogengehalt, die Konzentrationen verschiedener Zucker und die Aktivitäten verschiedener Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels konstant blieben. Insbesondere die Aktivität des am Glycogen-Abbau beteiligten D-Enzyms änderte sich währenddessen nicht signifikant. Die Konzentration und der Turnover der Saccharose wurden nicht untersucht. Weil der Abfall der Glucose-Freisetzung nicht mit einer Erschöpfung intrazellulärer Reserven und nicht mit einem gesteigerten Glucose-Import erklärt werden konnte, wurde eine verminderte Expression eines Glucosetransporters postuliert. Diese Annahme konnte gemäß Kapitel 4.2 nicht weiter vertreten werden. Ein konstanter Glycogengehalt und eine gleichbleibende Aktivität eines Glycogen abbauenden Enzyms während einer zurückgehenden Glucose-Freisetzung wären konsistent mit der Annahme, dass der Kohlenhydrattransfer auf der Hydrolyse von Saccharose und nicht auf dem Glycogen-katabolismus basiert.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Bedeutung von Saccharose und Glycogen für den Kohlenhydrattransfer herauszuarbeiten. Es ist nicht auszuschließen, dass beides die Quelle für den Glucose-Export darstellt.

4.8 Im lichenisierten *Nostoc* kann ein Überschuss von Kohlenhydraten erzeugt werden, der zur Freisetzung von Saccharose und Maltose führt.

Nach Inkubation von Flechtenscheiben in einer ^{14}C -Glucoselösung war eine unmittelbare Freisetzung von Saccharose und Maltose nachzuweisen (Kap. 3.13, Abb. 3.17). Die entsprechenden Signale waren nach 40 Minuten nicht mehr detektierbar, wenn keine Glucose im Medium enthalten war. Bei Anwesenheit von 10 mM Glucose wurden die Signale verstärkt und nach 20 Minuten war zusätzlich radioaktive Glucose nachweisbar. Es gibt keine Hinweise darauf, dass der Mycobiont Saccharose oder Maltose produzieren kann. Die von ihm aufgenommene Glucose wird in Mannitol umgewandelt, das u. a. als Speicherkohlenhydrat dient (RAI, 2002; Kap. 1.3). Deshalb ist davon auszugehen, dass die detektierten Zucker ausschließlich cyanobakteriellen Ursprungs sind. Eine Freisetzung von Saccharose und Maltose durch ein lichenisiertes Cyanobakterium ist bisher nicht beobachtet worden und hier erst durch die Vorinkubation in einer ^{14}C -Glucoselösung induziert worden.

WASTLHUBER (1996) stellte für den lichenisierten *Nostoc*-Stamm von *P. horizontalis* fest, dass dieser deutlich mehr Kohlenhydrate enthält als die kultivierte Form. Eine hohe Konzentration intrazellulärer Kohlenhydrate kann auch für den hier untersuchten Cyanobionten *Nostoc spec.* angenommen werden. Da der Cyanobiont in dieser Untersuchung (Kap. 3.13) offenbar ^{14}C -Glucose aufnahm, wurde der Kohlenhydratgehalt zusätzlich erhöht. *Nostoc* importiert demnach während der Symbiose ^{14}C -Glucose und bildet Saccharose sowie Maltose in so hoher Konzentration, dass diese Disaccharide teilweise als überschüssige Kohlenhydrate freigesetzt werden und später reimportiert werden können. Die Freisetzung überschüssiger Kohlenhydrate durch ein nicht-lichenisiertes Cyanobakterium wurde bereits dokumentiert: BERGMAN (1986) stellte fest, dass die Aufnahme von Glyoxylat durch *Anabaena cylindrica* unter Stickstofflimitation zur Exkretion von (nicht genauer identifizierten) Kohlenhydraten ins Medium führte und gleichzeitig vermehrt Glycogen gebildet wurde.

4.9 Ein Überschuss von Kohlenhydraten führt im kultivierten *Nostoc* wahrscheinlich zu einem *futile cycle*.

Es wurde gezeigt, dass die kultivierte Form von *Nostoc* aus *P. praetextata* nach Aufnahme von ^{14}C -Glucose diese abgeben und gleichzeitig reimportieren kann (Kap. 3.14, Abb. 3.18). Gemäß Kap. 4.3 könnte die Aufnahme gleichzeitig über erleichterte Diffusion und über einen protonenabhängigen Transport erfolgen, während für die Abgabe ausschließlich die erleichterte Diffusion postuliert werden kann. Da abgegebene Glucose an sich schon einen energetischen Verlust für die Zelle darstellt und die Aufnahme von Glucose wahrscheinlich protonenabhängig ist (Kap.3.5) und demnach letztlich unter ATP-Verbrauch stattfinden muss, deuten die Untersuchungen auf einen *futile cycle* als einen scheinbar „energieverschwendenden“ Prozess (Abb. 4.1, A). Ein solche transmembrane Zucker-Zirkulation wäre auch eine Erklärungsmöglichkeit für Untersuchungsergebnisse von CHAMBERS et al. (1976) und von MEINDL & LOOS (1990):

Untersuchungen von CHAMBERS et al. (1976) zeigten, dass *Nostoc spec.* aus *P. polydactyla* während der Flechten-Symbiose in Anwesenheit von Digitonin und direkt nach der Isolierung (in Abwesenheit von Digitonin) bei steigendem pH-Wert (von 4 bis 10) eine erhöhte Photosyntheserate aufwies und gleichzeitig einen größeren Anteil der gebildeten Assimilate in Form von Glucose freisetzte. Der Grund für die Erhöhung der Photosyntheserate ist unbekannt. Der steigende Assimilat-Anteil, der freigesetzt wird, könnte jedoch mit dem postulierten *futile cycle* erklärt werden: Wenn Glucose über erleichterte Diffusion exportiert und gleichzeitig sowohl über erleichterte Diffusion als auch protonenabhängig importiert wird, dann wird bei einer erhöhten OH^- -Konzentration im Medium der Protonengradient reduziert und somit der protonenabhängige Importmechanismus beeinträchtigt, was netto zu einem erhöhten Glucose-Export führt. Weil dieser pH-Einfluss auf die Glucose-Freisetzung für den isolierten und lichenisierten Photobionten beschrieben wurde, ergibt sich hiermit gleichzeitig ein erster Hinweis, dass der anzunehmende *futile cycle* auch während der Symbiose stattfinden könnte, was in Kapitel 4.10 genauer ausgeführt werden soll.

MEINDL & LOOS (1990) stellten fest, dass FCCP und NaN_3 im Dunkeln die Glucose-Freisetzung aus den von ihnen untersuchten *Nostoc*-Stämmen nicht inhibieren; daher schlossen sie einen aktiven Glucosetransport aus (Kap. 1.4). Dass die Glucose-Freisetzung sogar gesteigert wurde, führte zur Spekulation, dass unter den Versuchsbedingungen vielleicht vermehrt Glycogen als Quelle der Glucose abgebaut wurde. Für die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wurde gezeigt, dass FCCP bei Nacht die Rate des Stärkeabbaus verdoppelt. Hierbei wird die ATP-Produktion wahrscheinlich von der Glycolyse übernommen, während die Atmungskette inhibiert wird (GFELLER & GIBBS, 1983). Diese Beobachtung spricht für die

Annahme von MEINDL & LOOS (1990). Wenn der Glucose-Export von *Nostoc* Teil des hier vorgestellten *futile cycles* ist, könnte die erhöhte Glucose-Freisetzung zusätzlich darauf basieren, dass der sekundär-aktive Glucose-Import durch die Protonengradienten reduzierende Wirkung von FCCP und NaN_3 gehemmt wird.

In der Regel werden Mechanismen beschrieben, die *futile cycles* verhindern. Es gibt allerdings Beispiele für „energieverschwendende“ Prozesse, die unter physiologischen Bedingungen stattfinden. Ein bekannter *futile cycle* aus dem zoologischen Bereich dient der Wärmebildung im braunen Fettgewebe von Säuglingen. Dabei aktivieren die Hormone Noradrenalin und Adrenalin einen H^+ -Uniport-Carrier in den Mitochondrien, so dass der Protonengradient über die innere Membran reduziert und somit die wärmeproduzierende Atmungskette von der ATP-Produktion entkoppelt wird (KLINKE et al., 2001).

Es sollen hier weitere Beispiele verdeutlichen, dass *futile cycles* und die Freisetzung überschüssiger Kohlenhydrate bei Bakterien regelmäßig zu beobachten sind:

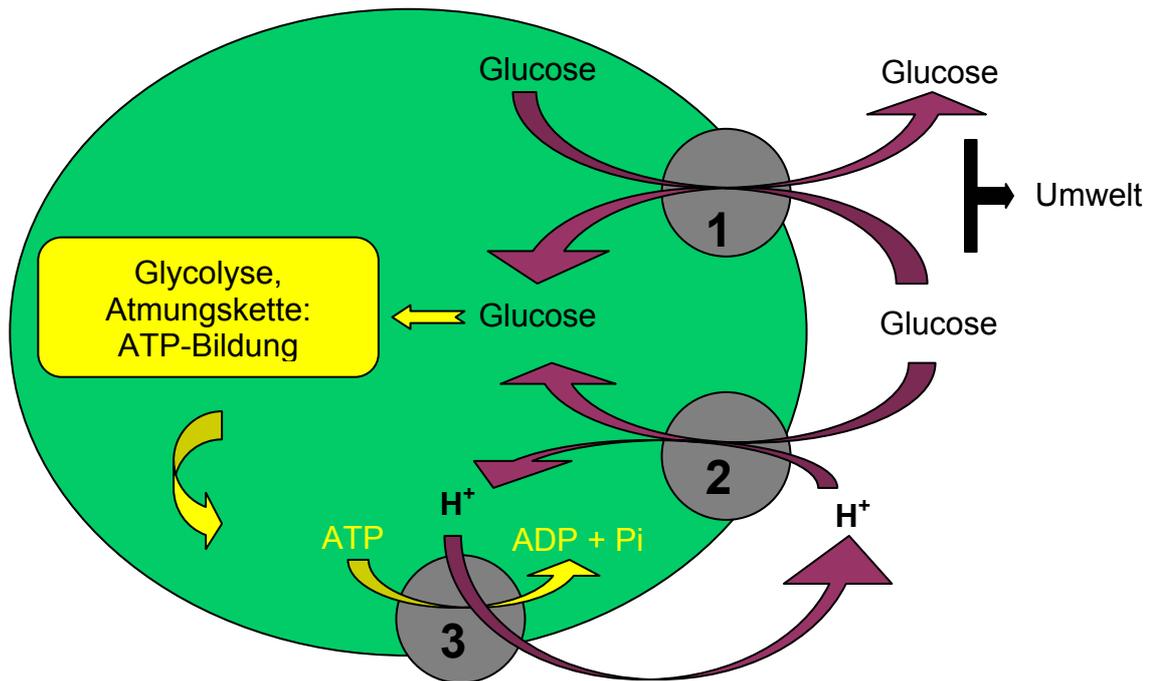
A) RUSSELL (1998) stellte fest, dass das aus Rinder-Pansen isolierte Bakterium *Streptococcus bovis* bei einem Überangebot von Glucose verstärkt Protonen über ATPasen exportiert und gleichzeitig über spannungsabhängige Kanäle reimportiert.

B) Wenn das ebenfalls aus Rinder-Pansen isolierte Bakterium *Fibrobacter succinogenes* bei Stickstoffmangel (geringe NH_4^+ -Konzentration) mit dem Stärkeabbau-Produkt Cellobiose (Disaccharid aus zwei β -1,4-glycosidisch verbundenen Glucoseeinheiten) inkubiert, wird ein Großteil dieses Substrats nicht fermentiert, sondern als Glucose und Cellotriose ins Medium freigesetzt (RUSSELL, 1998).

C) NEUBAUER (1994) zeigte, dass *Lactobacillus sanfrancisco* Maltose über einen Protonensymport importiert und dass Glucose über erleichterte Diffusion exportiert wird, wenn deren intrazelluläre Bildung aus Maltose schneller als die Phosphorylierung zu Glucose-6-phosphat erfolgt.

D) Gemäß RUSSELL und COOK (1995) verwenden Bakterien oft 2-Desoxyglucose (2-DG), um überschüssiges ATP abzubauen. Hierfür wurde folgender *futile cycle* beschrieben: 2-DG wird über das Glucose-Phosphotransferasesystem (PTS) bei gleichzeitiger Phosphorylierung importiert. 2-DG-6-phosphat akkumuliert und wird durch die Hexose-6-Phosphatase dephosphoryliert. 2-DG wird nachfolgend aus der Zelle freigesetzt. Die wiederholte Phosphorylierung und Dephosphorylierung führt dazu, dass Phosphoenolpyruvat (PEP) als Donor der Phosphatgruppe unter ATP-Verbrauch regeneriert werden muss (Abb 4.1, B).

A)



B)

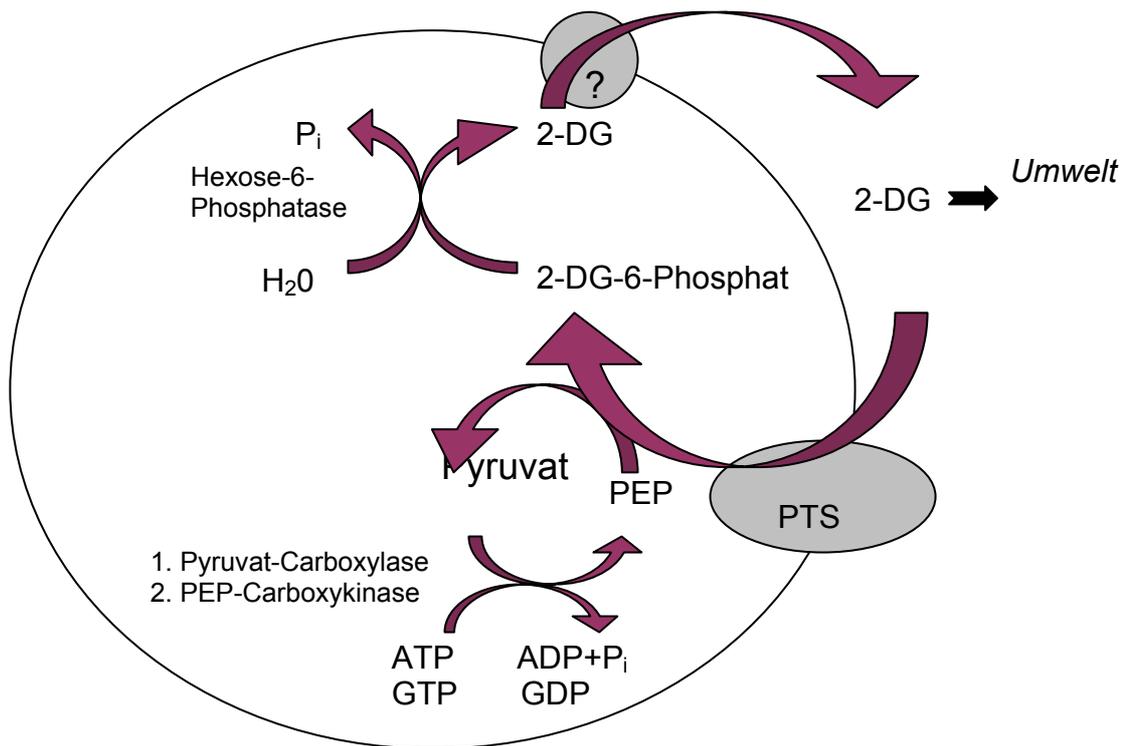


Abb 4.1: **A)** Modell zum putativen *futile cycle* für *Nostoc spec.* aus *P. praetextata*. Der Reimport der Glucose ist sekundär-aktiv und findet daher indirekt unter ATP-Verbrauch statt. 1 = Erleichterte Diffusion; 2 = Glucose-H⁺-Symport; 3 = ATPase. Trotz der Darstellung einer einzelnen Zelle ist *Nostoc* ist in der Regel mehrzellig. **B)** Modell zum *futile cycle* bei Bakterien unter Verwendung von 2-DG nach RUSSELL und COOK (1995). Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung des zirkulierenden 2-DG erfolgen unter ATP-Hydrolyse. Wie die Freisetzung von 2-DG erfolgt, ist unbekannt. Für **A)** und **B)** sind Verlustströme in die Umwelt anzunehmen.

Welche physiologischen Funktionen haben *futile cycles* und Kohlenhydrat-Freisetzungen als „energieverschwendende“ Prozesse?

RUSSELL und COOK (1995) diskutieren für *futile cycles* drei Funktionen:

- 1) Bezüglich der Protonen-Zirkulation bei *S. bovis* (Beispiel A) wird spekuliert, dass spannungsgesteuerte Protonenkanäle bei erhöhtem Metabolismus die Entstehung einer zu hohen Spannung an der Plasmamembran und somit das Auftreten dielektrischer Effekte verhindern, die die Membranstruktur negativ beeinflussen könnten.
- 2) *Futile cycles* ermöglichen Bakterien in der stationären Phase wahrscheinlich einen schnellen Neubeginn des Wachstums durch die Bereitstellung kritischer Precursor-Metabolite.
- 3) Es gibt Hinweise darauf, dass *futile cycles* der Bildung des cytotoxischen Methylglyoxals entgegenwirken, welches sich u. a. von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) ableitet.

Nach RUSSELL (1998) könnte die Freisetzung von Kohlenhydraten durch Pansen-Bakterien ebenfalls die Bildung von Methylglyoxal verhindern. NEUBAUER (1994) interpretierte die Glucose-Freisetzung durch *Lactobacillus sanfrancisco* als Maßnahme gegen eine zu hohe intrazelluläre Glucose-Konzentration. Auf die Konsequenzen einer zu hohen Glucose-Konzentration wurde nicht eingegangen. Es ist aber vorstellbar, dass auch *L. sanfrancisco* durch die Vermeidung hoher Glucose-Konzentrationen der Synthese von Methylglyoxal entgegenwirkt.

Methylglyoxal interagiert als Elektrophil mit Nukleinsäuren und Proteinen, wodurch es den Metabolismus an vielen Stellen stören und somit den Zelltod herbeiführen kann. Es kann u. a. als Seitenreaktion der Triosephosphatisomerase (TPI) aus DHAP hervorgehen. Für *E. coli* wurde ein Enzym, die Methylglyoxalsynthase (MGS), nachgewiesen, das diese Reaktion sogar katalysiert (FERGUSON et al., 1998). Homologe zur MGS sind in den Genomen vieler anderer Bakterien, darunter auch im Genom von *N. punctiforme* ATCC 29133, aufzufinden. Angesichts dessen muss Methylglyoxal trotz seiner Toxizität eine physiologische Funktion ausüben. Für *E. coli* und andere heterotrophe Bakterien wird nach TÖTEMEYER et al. (1998) angenommen, dass die Umwandlung von DHAP in Methylglyoxal der Phosphat-Freisetzung unter Phosphat-Limitation dient, so dass die phosphatabhängige Glycolyse ohne Verlangsamung ablaufen kann und genügend ATP für Substratphosphorylierung sowie PEP für den Import von PTS-Substraten gebildet werden (Abb. 4.2). Konsistent mit diesem Postulat erfolgt die Regulation der MGS mit der allosterischen Inhibition durch Phosphat und mit der homotropen Aktivierung durch DHAP (TÖTEMEYER et al., 1998).

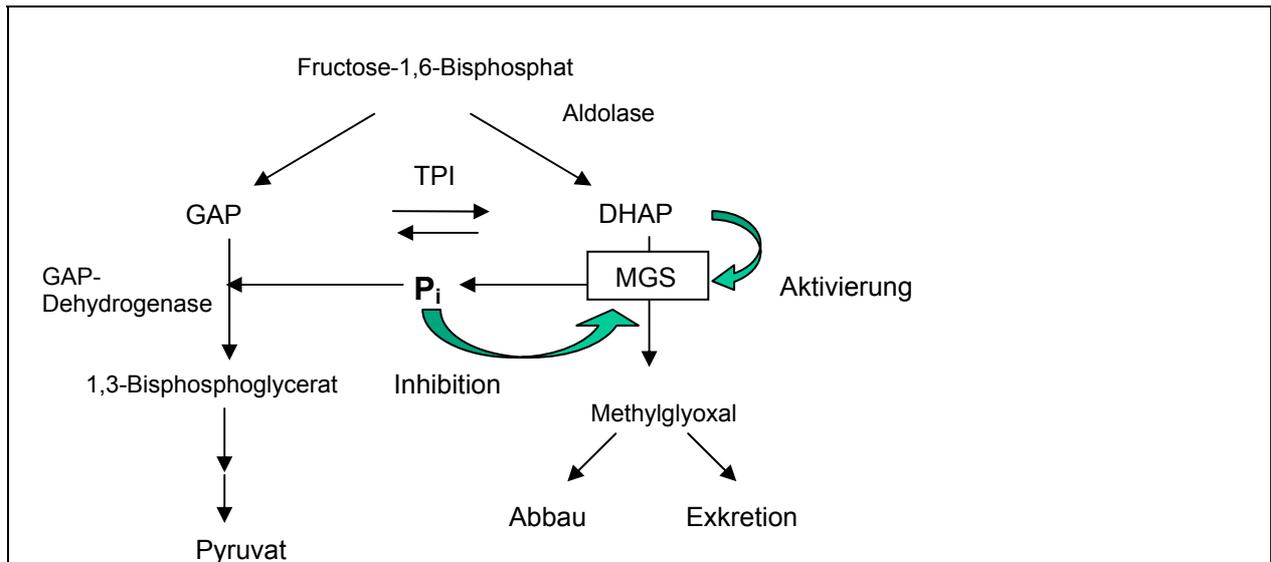


Abb.4.2: Einbindung der Methylglyoxalsynthase in die Glycolyse (nach TÖTEMEYER et al., 1998). Die regulatorische Funktion von DHAP bzw. P_i soll durch geschwungene Pfeile verdeutlicht werden. Dabei wirkt P_i inhibitorisch und damit konträr zu DHAP auf die Enzymaktivität der MGS. Daneben gilt nach wie vor die bekannte regulatorische Funktion diverser Stoffwechselintermediate auf die Schlüsselenzyme der Glycolyse. DHAP=Dihydroxyacetonphosphat; GAP=Glycerinaldehyd-3-phosphat; MGS=Methylglyoxalsynthase; TPI= Triosephosphatisomerase

Futile cycles sollten aufgrund der erhöhten Rate der ATP-Hydrolyse zu einer erhöhten P_i -Konzentration führen, die auf die MGS und somit auf die Bildung von Methylglyoxal inhibitorisch wirkt. Gleichzeitig müsste die Glycolyse ohne Inhibition weiterlaufen, weil P_i statt durch die MGS-Aktivität durch die *futile cycles* bereitgestellt wird. Einen ersten Beleg für die reziproke Beziehung zwischen *futile cycles* und Methylglyoxal-Synthese liefert die Beobachtung, dass *E. coli* bei Behandlung mit Methylglyoxal einen erhöhten ATP-Turnover aufweist (RUSSELL & COOK, 1995).

Im Folgenden soll deutlich werden, dass *futile cycles* und die Bildung von Methylglyoxal als verschiedene physiologische Strategien interpretiert werden können, mit denen Zellen einer toxischen Konzentration von Triosephosphaten entgegenwirken können. Gemäß Untersuchungen von BENOVA et al. (2003) können DHAP und GAP mit Sauerstoff Autoxidationen eingehen, die zur Bildung von Wasserstoffperoxid und Diketonen führen. Beide Produkte reagieren u. a. mit Proteinen und Nukleinsäuren, was zum Zelltod führen kann.

Die Methylglyoxalsynthase wirkt einer Akkumulation von Triosephosphaten durch den Abbau von DHAP unmittelbar entgegen; *futile cycles* führen über eine erhöhte Rate der ATP-Hydrolyse zu einem erhöhten Kohlenhydratverbrauch und somit ebenfalls zur Reduktion der Triosephosphat-Konzentration. Dieselbe Konsequenz ergibt sich aus der Freisetzung von Kohlenhydraten ohne nachfolgenden Reimport. Unter diesen Aspekten scheinen

„energieverschwendende“ Prozesse und die Bildung eines toxischen Metaboliten zwei Möglichkeiten darzustellen, oxidativen Stress zu vermeiden.

Dass die Kohlenhydrat-Konzentrationen in Cyanobakterien unter bestimmten Bedingungen relativ hoch sind, zeigte WASTLHUBER (1996) für den von ihm untersuchten *Nostoc*-Stamm im lichenisierten Zustand und BERGMAN (1986) für *Anabaena cylindrica* nach Glyoxylat-Aufnahme. Für kultivierte *Nostoc*-Trichome ist nach Glucose-Aufnahme eine ähnliche Situation anzunehmen. Weil der beschriebene *futile cycle* nur nach Inkubation von *Nostoc* in einer Glucose-Lösung stattzufinden schien, sollte diese postulierte Form der „Energieverschwendung“ durch erhöhte Kohlenhydrat-Konzentrationen induziert werden. Triosephosphate sind in Cyanobakterien, Algen und Pflanzen Metabolite der Glycolyse und des Calvin-Cyclus. Wenn Cyanobakterien belichtet werden, können diese Metabolite daher prinzipiell auf zwei Wegen entstehen. Gleichzeitig findet am Photosystem II die O₂-Produktion statt. Um den dadurch begünstigten Autoxidationen der Triosephosphate entgegenzuwirken, kann die O₂- und Kohlenhydrate verbrauchende Respiration durch *futile cycles* gesteigert werden. Manche *futile cycles* können demnach indirekt produktiv sein, indem einer Vergiftung der Zellen entgegengewirkt wird.

4.10 Der Kohlenhydrattransfer in *P. praetextata* und anderen Blaualgenflechten könnte auf einem *futile cycle* basieren.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass der für den kultivierten Photobionten *Nostoc* aus *P. praetextata* postulierte *futile cycle* in Übereinstimmung mit Beobachtungen von CHAMBERS (1976) auch für die Symbiose angenommen werden kann (Kap. 4.9). Konsistent hiermit scheint der für den *futile cycle* mitverantwortliche sekundär-aktive Glucose-Import durch *Nostoc* in Kultur und Symbiose stattzufinden (Kap. 4.3). Gemäß WASTLHUBER (1996) sind die Kohlenhydrat-Konzentrationen im lichenisierten *Nostoc* viel höher als im freilebenden Zustand, womit eine weitere Voraussetzung für einen *futile cycle* gegeben sein könnte.

Langsames Wachstum und eingeschränkte EPS-Produktion kommen als Ursachen für eine erhöhte Kohlenhydrat-Konzentration in Frage: Das langsame Wachstum des lichenisierten Photobionten kann nach HILL & AHMADJIAN (1972) auf limitierte Nährstoffe, insbesondere Stickstoffmangel, zurückgeführt werden. Dies führt gemäß den Autoren bereits zur Freisetzung überschüssiger Kohlenhydrate, die im freilebenden Zustand für das energieabhängige Wachstum metabolisiert würden (Kap. 1.4).

Wenn die Cyanobionten in Kultur genommen werden, setzt ein beschleunigtes Wachstum ein. Deshalb steht in Übereinstimmung mit dem abnehmenden Kohlenhydratgehalt in *Nostoc* nach Isolierung aus der Flechten-Symbiose die Beobachtung von ERNST et al. (1984), dass der zelluläre Glycogengehalt von *Anabaena variabilis* bei der Inokulation am größten war und während der exponentiellen Wachstumsphase abnahm.

Wie das Wachstum findet wahrscheinlich auch die Produktion der EPS während der Symbiose in geringerem Maße statt. Es finden sich keine Anhaltspunkte für einen Turnover der EPS (bedingt durch Synthese und gleichzeitigen Abbau). Die EPS-Produktion von *Nostoc* ermöglicht gemäß OTERO & VINCENZINI (2004) die Reduktion der intrazellulären Kohlenhydrat-Konzentration unter Stickstofflimitation und wird als ein *overflow metabolism* bezeichnet, der überschüssige Energie abbauen soll. Daher können für die EPS-Produktion die gleichen Funktionen wie für *futile cycles* oder für die Freisetzung löslicher Kohlenhydrate angenommen werden (Kap. 4.9) und es überrascht daher nicht, dass manche Cyanobakterien-Arten ihre EPS ins Medium freisetzen. Die Beibehaltung der EPS hat jedoch Vorteile: Zum Beispiel hält sie bei beginnender Trockenheit Wasser länger zurück, bietet Schutz vor dem Verzehr durch Protozoen und ermöglicht das Festhaften an Substraten zur Besiedlung und Biofilmbildung (OTERO & VINCENZINI, 2004).

Aus diesen Gründen wird für *Peltigera praetextata* und andere Blaualgenflechten postuliert, dass der Kohlenhydrattransfer auf einem *futile cycle* basiert, wie er für den kultivierten Photobionten beschrieben wurde (Kap. 4.9, Abb.4.1 A). Die Parallelen zum Modell von HILL & AHMADJIAN (1972) sind nicht zu übersehen (Kap. 1.4). Die Annahme, dass der Glucose- oder Fructosetransfer vor allem eine Freisetzung überschüssiger Kohlenhydrate darstellt, ist mit der Beobachtung konsistent, dass *Nostoc* in Cephalodien keine oder sehr wenig Glucose freisetzt (Kap. 1.3). Interne und externe Cephalodien sind von einer dichten Hyphenschicht umgeben, so dass ein microaerober Raum für eine effiziente N₂-Fixierung durch die sauerstoffempfindliche Nitrogenase entsteht (NASH, 1996). Insbesondere eine Lokalisation von Cephalodien im Inneren des Thallus oder an der Thallus-Unterseite verdeutlicht, dass hier die Funktion der N₂-Fixierung der Photosynthese übergeordnet ist (RAI, 2002). Daher herrschen in Cephalodien wahrscheinlich keine Bedingungen für eine Überproduktion von Kohlenhydraten als Grundlage eines *futile cycles*. Auch der Kohlenhydrattransfer in Grünalgenflechten ist womöglich darauf zurückzuführen, dass der Photobiont mehr Kohlenhydrate synthetisiert, als er selbst metabolisieren kann.

4.11 Ausblick

An dieser Stelle folgen skizzenartig Vorschläge und Hinweise für weitergehende Untersuchungen zum behandelten Themengebiet:

1.) Wenn Saccharose statt Glycogen die Quelle für den Glucosetransfer in Blaualgenflechten darstellt, sollte gezeigt werden können, dass während der abnehmenden Glucose-Freisetzung durch den Cyanobionten nach der Isolierung der Saccharose-Turnover bei konstantem zellulären Glycogengehalt sinkt.

2.) Da beschränktes Wachstum wahrscheinlich die Kohlenhydrat-Freisetzung begünstigt, sollten für *Nostoc futile cycles* und EPS-Produktion nach der exponentiellen Wachstumsphase in erhöhtem Maße nachweisbar sein.

3.) Cyanobionten und Chloroplasten sind in einer vergleichbaren Situation: Sie bilden offensichtlich mehr Kohlenhydrate, als sie für den eigenen Stoffwechsel verbrauchen. Der Vorläufer der Chloroplasten könnte nach Aufnahme in die Wirtszelle durch gehemmtes Wachstum unmittelbar mit einer Kohlenhydrat-Freisetzung reagiert haben, was eine Grundlage für eine stabile symbiotische Beziehung wäre.

Chloroplasten, die sehr wahrscheinlich von Cyanobakterien abstammen (MARTIN & MÜLLER, 1998), exportieren Triosephosphate als unmittelbare Photoassimilate im Austausch gegen Phosphat (FLÜGGE et al., 1989) sowie Glucose und Maltose als Stärkeabbauprodukte über einen H⁺-Symport (SERVAITES & GEIGER, 2002). Da Triosephosphate nicht nur Energieträger darstellen, sondern in höherer Konzentration durch Bildung von Radikalen, Diketonen sowie Methylglyoxal cytotoxisch sein können (Kap.4.9), wäre es vorstellbar, dass Cyanobakterien im Falle überschüssiger Kohlenhydrate nicht nur Glucose, sondern auch Triosephosphate (im Austausch gegen Phosphat ?) freisetzen. Diesbezügliche Untersuchungen könnten zum Verständnis der Evolution von Algen und Pflanzen beitragen.

4.) Zur eingehenderen Überprüfung der Annahme, dass ein *futile cycle* beim kultivierten *Nostoc* aus *P. praetextata* induziert werden kann und dieser auch die Basis für den Glucosetransfer während der Flechten-Symbiose ist, könnten u. a. folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- a) Identifizierung und Charakterisierung der *Nostoc*-Mutanten, die das Homolog zum Glucosetransporter aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 nicht mehr in funktioneller Form exprimieren
- b) Identifizierung des postulierten Transportproteins für die erleichterte Diffusion der Glucose
- c) Expressionsanalysen der Glucosetransporter mittels Northernblot, Westernblot oder Realtime-PCR

Wenn auf diese Weise gezeigt würde, dass Transportproteine für den sekundär-aktiven Glucose-Import bzw. für die erleichterte Diffusion der Glucose gleichzeitig exprimiert werden, wäre die biochemische Grundlage für einen *futile cycle* nachgewiesen.

5.) Weitere molekularbiologische und biochemische Arbeiten sollten an dem hierfür bereits etablierten Stamm *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 erfolgen, der eine zunehmende Bedeutung als Modellorganismus für cyanobakterielle Symbiosen erfährt. Für *Peltigera praetextata* wurde berichtet, dass die Resynthese aus den Symbiosepartnern (STOCKER-WÖRGÖTTER & TÜRK, 1994) und die Kultivierung unter Laborbedingungen (YOSHIMURA & YAMAMOTO, 1991) gelungen sind. Allerdings dauert es etwa drei Jahre, bis sich Thalli mit einem Durchmesser von 1-2 cm entwickeln. Die Herbeiführung einer Flechten-Symbiose mit dem sequenzierten *Nostoc punctiforme*-Stamm ist vorstellbar, nachdem dieser bereits Symbiosen mit *Anthoceros punctatus* und *Gunnera* spp. eingehen konnte (MEEKS et al., 2001). Der Einsatz von *N. punctiforme* ATCC 29133 für Kultur- und Resyntheseexperimente könnte insbesondere bezüglich der Symbiosepartner-Erkennung und Regulation der Thallusbildung zu neuen Erkenntnissen führen.

6.) Die häufigsten Phycobionten gehören zur Gattung *Trebouxia* (NASH, 1996), deren Wachstum in Kultur durch Zugabe von Glucose beschleunigt wird. Deshalb sind sie – wie *Nostoc* - wahrscheinlich fakultativ heterotroph (AHMADJIAN, 1967 b). *Trebouxia* bildet in der Symbiose Ribitol als Transferzucker, dessen Synthese auch während der Kultivierung nachgewiesen wurde. Eine Freisetzung des Zuckeralkohols wurde jedoch nicht beobachtet (HILL & AHMADJIAN, 1972). Wenn eine solche Freisetzung durch Zugabe von Glucose (oder durch Ribitol selbst) während der stationären Phase induziert werden könnte, wäre dies ein Hinweis, dass die Polyol-Abgabe lichenisierter Grünalgen wie die Abgabe von Glucose (und Fructose) durch Cyanobionten womöglich auf überschüssigen Kohlenhydraten basiert.

5 Zusammenfassung

Aus der Blaualgenflechte *Peltigera praetextata*, die ein Habitat für verschiedene Cyanobakterien darstellt, wurde der Photobiont *Nostoc* spec. isoliert und kultiviert. Es wurde nachgewiesen, dass die kultivierte Form als Reaktion auf Trockenstress Saccharose und Trehalose nicht nur akkumuliert, sondern auch exportiert. Dennoch ist Trockenheit nicht die Basis des Kohlenhydrattransfers in Blaualgenflechten. Ebenso kann ein Modell einer symbiosespezifischen Expression von Glucosetransportern nach eigenen Untersuchungen nicht postuliert werden. Ein sequenziertes Genfragment mit Homologie zum verifizierten Glucosetransporter aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist konsistent mit einem protonen-abhängigen Glucose-Import, der während der Flechten-Symbiose und im freilebenden Zustand stattzufinden scheint. Erstmals wurden für einen Cyanobionten der Export von Fructose, Maltose und Saccharose nachgewiesen. Der untersuchte *Nostoc*-Stamm bildet auch freilebend ohne Trockenstress Saccharose, die nun als Quelle für den Glucose- und Fructosetransfer in Blaualgenflechten überprüft werden kann. Es gibt erste Hinweise, dass *Nostoc* innerhalb und außerhalb der Flechte Glucose exportiert und gleichzeitig importiert. Ein solcher *futile cycle* in Form einer transmembranen Zuckerzirkulation, die unter Energieverbrauch der Bildung von Methylglyoxal und oxidativem Stress entgegenwirken könnte, ist bisher nur für heterotrophe Bakterien bekannt. Konsistent mit Untersuchungsergebnissen verschiedener Autoren wird postuliert, dass der Kohlenhydrattransfer in Blaualgenflechten auf einem *futile cycle* basiert.

6 Literatur

- Ahmadjian, V.** (1967 a) The lichen symbiosis. Waltham-Toronto-London: Blaisdell
- Ahmadjian, V.** (1967 b) A guide to the algae occurring as lichen symbionts: isolation, culture, cultural physiology and identification. *Phycologia*, **6**: 127-160
- Ahmadjian, V.** (1989) Studies on the isolation and synthesis of bionts of the cyanolichen *Peltigera canina* (Peltigeraceae). *Plant systemat. Evol.* **165**: 29-38
- Ahmadjian, V.** (1993) The lichen symbiosis. Verlag John Wiley & Sons, INC. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapur
- Arnon, D.I.** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**: 1–15
- Badger, M.R. & Price, G.D.** (2003) CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J. Exp. Bot.* **54**: 609–22
- Benov, L., Beema, A.F. & Sequeira, F.** (2003) Triosephosphates are toxic to superoxide dismutase-deficient *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1622**(2): 128-132
- Bergman, B.** (1986) Glyoxylate induced changes in the carbon and nitrogen metabolism of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Plant Physiol.* **80**: 698-701
- Birnboim, H.C. & Doly, R.W.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523
- Black, K.G., Parsons, R. & Osborne, B.A.** (2002) Uptake and metabolism of glucose in the *Nostoc–Gunnera* symbiosis. *New Phytologist* **153**: 297-305
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L.** (Hrsg.) (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. ASPP

- Büdel, B., Lüttge, U., Stelzer, R., Huber, O. & Medina, E.** (1994) Cyanobacteria of rocks and soils of the Orinoco Lowlands and the Guayana Uplands, Venezuela. *Acta Botanica* **107**: 422-431
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M.** (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376-378
- Carpenter, J.F. and Chang, B.S.** (1996) Lyophilization of biopharmaceutical products. In *Biotechnology issues in Pharmaceutical process Engineering Vol. 2*" (Avis, K. and Wu, V. eds)
- Castenholz, R.W.** (1988) Culturing methods for cyanobacteria. *Methods Enzymol.* **167**:68-93
- Chambers, S., Morris, M. & Smith, D.C.** (1976) Lichen physiology. XV. The effect of digitonin and other treatments on biotrophic transport of glucose from alga to fungus in *Peltigera polydactyla*. *New Phytologist* **76**: 485-500
- Cook, G.M., Janssen, P.H. & Morgan, H.W.** (1993) Uncoupler-resistant glucose uptake by the thermophilic glycolytic anaerobe *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (*Clostridium thermohydrosulfuricum*). *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 2984-2990
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F. & Crowe, L.M.** (1998) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**: 73–103
- Crowe, J.H., Oliver, A.E. & Tablin, F.** (2002) Is there a single biochemical adaptation to anhydrobiosis? *Integr. And Comp. Biol.* **42** (3): 497-503
- Curatti, L., Flores, E. & Salerno, G.** (2002) Sucrose is involved in the diazotrophic metabolism of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. *Febs. Lett.* **513**: 175-178
- De Philippis, R., Margheri, M.C., Materassi, R. & Vincenzini, M.** (1998) Potential of unicellular cyanobacteria from saline environments as exopolysaccharide producers. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(3): 1130-1132
- Diedrich, D.F.** (1965) In vitro evaluation of relative inhibitory potency of phlorizin and its congeners. *Am J Physiol* **209**: 621-626

- DiMarco, A.A. & Romano, A.H.** (1985) D-Glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 151-157
- Drew, E.A. & Smith, D.C.** (1967) Studies in the physiology of lichens VIII. Movement of glucose from Alga to fungus during photosynthesis in the thallus of *Peltigera polydactyla*. *New Phytol.* **66**: 389-400
- Duan, X.Y., Shi, D.J., Wu, X.Q., Wu, Y.H. & Qiu, Z.S.** (1994) The effects of immobilization on the activity of glutamine synthetase and the expression of the *glnA* gene in *Anabaena* sp. Strain 2B, *Chinese J. Bot.* **6**: 102-106
- Ernst, A., Kirschenlohr, H., Diez, J. & Böger, P.** (1984) Glycogen content and nitrogenase activity in *Anabaena variabilis*. *Arch. Microbiol.* **140**: 120–125
- Esser, K.** (1976) Kryptogamen: Blaualgen, Algen, Pilze, Flechten. Praktikum und Lehrbuch. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Feige, B.** (1976) Untersuchungen der Physiologie der Cephalodien der Flechte *Peltigera aphthosa* (L.) Willd. II. Die photosynthetische ¹⁴C-Markierung und der Kohlenhydrattransfer zwischen Phycobiont und Mycobiont. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **63**: 211-213
- Ferguson, G.P., Töttemeyer, S., MacLean, M.J. & Booth, I.R.** (1998) Methylglyoxal production in bacteria: suicide or survival? *Arch. Microbiol.* **170**: 209-21
- Fischer, A, Meindl, D. & Loos, E.** (1989) Glucose excretion by the symbiotic *Chlorella* of *Spongilla fluviatilis*. *Planta* **179**: 251–256
- Fischer, D., Schlösser, U.G. & Pohl, P.** (1997) Exopolysaccharide production by cyanobacteria grown in closed photobioreactors and immobilized using white cotton towelling. *Journal of Applied Phycology* **9** (3): 205-213
- Flores, E. & Schmetterer, G.** (1986) Interaction of fructose with the glucose permease of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **166** (2): 693–696

- Flügge, U.I., Fischer, K., Gross, A., Sebald, W., Lottspeich, F. & Eckerskorn, C.** (1989) The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the *in vitro* synthesized precursor protein into chloroplasts. *EMBO J* **8**: 39-46
- Gargas, A., DePriest, P. T., Grube, M. & Tehler, A.** (1995) Multiple origins of lichen symbioses in Fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science* **268**: 1492-1495
- Gfeller, R.P. & Gibbs, M.** (1984) Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. 1. Analysis of fermentative products from starch in dark and light. *Plant Physiol.* **75**: 212–218
- Giordano, M., Beardall, J. & Raven, J.A.** (2005) CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 99-131
- Green, T.G.A., Snelgar, W.P. & Wilkins, A.L.** (1985) Photosynthesis, water relation and thallus structure of *Stictaceae*. In: Brown, D.H., (ed.) *Lichen physiology and cell biology*. New York, London: Plenum Press: 57-75
- Hanahan, D.** (1983) Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- HersHKovitz, N., Oren, A. & Cohen, Y.** (1991) Accumulation of trehalose and sucrose in cyanobacteria exposed to matric water stress. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 645–648
- Higo, A., Katoh, H., Ohmori, K., Ikeuchi, M. & Ohmori, M.** (2006) The role of a gene cluster for trehalose metabolism in dehydration tolerance of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology* **152**(4): 979–987
- Hildebrandt, U., Schmelzer, E. & Bothe, H.** (2002) Expression of nitrate transporter genes in tomato colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Physiol. Plantarum* **115**: 125-136
- Hill, D.J. & Ahmadjian, V.** (1972) Relationship between carbohydrate movement and the symbiosis in lichens with green algae. *Planta* **103**: 267-277
- Hill, D. J.** (1972) The movement of carbohydrate from the alga to the fungus in the lichen *Peltigera polydactyla*. *New Phytol.* **71**: 31-39

Honegger, R. (1991) Functional aspects of the lichen symbiosis. Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology **42**: 553-578

Karandashov, V., Nagy, R., Wegmuller, S., Amrhein, N. & Bucher, M. (2004) Evolutionary conservation of a phosphate transporter in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Proc Natl Acad Sci USA **101**: 6285–6290

Klinke, R. & Silbernagl, S. (1996) Lehrbuch der Physiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Lange, O.L., Kilian, E. & Ziegler, H. (1986) Water vapour uptake and photosynthesis of lichens: performance differences in species with green and blue-green algae as phycobionts. Oecologia **71**: 104-110

Lehmann, M. & Wöber, G. (1976) Accumulation, mobilization and turnover of glycogen in the blue-green bacterium *Anacystis nidulans*. Arch. Microbiol. **111**: 93-97

Lottspeich, F. & Zorbas, H. (1998) Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin

Martin, H. (2005) Dissertation an der TU Darmstadt: Isolierung symbiosespezifischer Gene aus *Geosiphon pyriformis* und funktionelle Charakterisierung des ersten Glomeromycota-Zuckertransporters

Martin, W. & Müller, M. (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. Nature **392**: 37-41

Masuch, F. (1993) Biologie der Flechten. Quelle & Meyer Verlag, Heidelberg, Wiesbaden

Matzke, B., Schwarzmeier, E. & Loos, E. (1990) Maltose excretion by the symbiotic *Chlorella* of the heliozoan *Acanthocystis turfacea*. Planta **181**: 593-598

Meeks, J.C., Elhai, J., Thiel, T., Potts, M., Larimer, F., Lamerdin, J., Predki, P. & Atlas, R. (2001) An overview of the genome of *Nostoc punctiforme*, a multicellular, symbiotic cyanobacterium. Photosynthesis research **70**: 85-106

Meeks, J.C., Campbell, E.L., Summers, M.L. & Wong F.C. (2002) Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. Archives of Microbiology **178**: 395–403

Meindl, D. & Loos, E. (1990) Release of glucose by *Nostoc* spec. isolated from the lichen *Peltigera horizontalis*. *Plant Science* **72**: 283-288

Nash, T.H. (1996) *Lichen biology*. Cambridge University Press

Neubauer, H., Glaasker, E., Hammes, W.P., Poolman, B. & Konings, W.N. (1994) Mechanism of maltose uptake and glucose excretion in *Lactobacillus sanfrancisco*. *J Bacteriol.* **176** (10): 3007-3012

Neuhaus, H.E. (1990) Dissertation an der Universität Bayreuth: Wechselwirkungen zwischen Chloroplast und Zytoplasma während der Photosynthese

Nultsch, W. (2001) *Allgemeine Botanik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

O'Brien, H.E., Miadlikowska, J. & Lutzoni, F. (2005) Assessing host specialization in symbiotic cyanobacteria associated with four closely related species of the lichen fungus *Peltigera*. *Eur. J. Phycol.* **40** : 363-378

Otero, A. & Vincenzini, M. (2004) *Nostoc* (cyanophyceae) goes nude : extracellular polysaccharides serve as a sink for reducing power under unbalanced C/N metabolism. *J. Phycol.* **40**: 74-81

Peveling, E. & Hill, D. J. (1974) The localization of an insoluble intermediate in glucose production in the lichen *Peltigera polydactyla*. *New Phytol.* **73**: 767

Potts, M., Slaughter, S.M., Hunneke, F.-U., Garst, J. F. & Helm, R. F. (2005) Desiccation Tolerance of Prokaryotes: Application of Principles to Human Cells. *Integr. Comp. Biol.* **45**: 800-809

Quispel, A. (1992) A search for signals in endophytic microorganisms. In D.P.S. Verma (ed.), *Molecular signals in Plant-Microbe-Communications*, CRC Press, Boca Raton, FL: 471-491

Rai, A.N. & Bergman, B. (2002) Cyanolichens. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy.* **102B** (1): 19-22

- Rai, A.N., Bergman, B. & Rasmussen, U.** (2002) Cyanobacteria in symbiosis. Kluwer Academic Publishers
- Reed, R.H., Richardson, D.L., Warr, S.R.C., & Stewart W.D.P.** (1984) Carbohydrate accumulation and osmotic stress in Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 1–4
- Rennenberg, H.** (1999) The significance of ectomycorrhizal fungi for sulfur nutrition of trees. *Plant Soil.* **215**(2): 115-122
- Round, F.E.** (1984) The ecology of algae. Cambridge University Press, Cambridge
- Russell, J.B. & Cook, G.M.** (1995) Energetics of bacterial growth: Balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.* **59**: 48–62
- Russell, J.B.** (1993) Low-affinity, high-capacity system of glucose transport in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*: evidence for a mechanism of facilitated diffusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3304 – 3307
- Russell, J.B.** (1998) Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *J. Anim. Sci.* **76**: 1955-1963
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, J., Higuichi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A.** (1987) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermo-stable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Sanger, F., Fritsch, E.F. & Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **74**: 5463-5467
- Schmetterer, G.R.** (1990) Sequence conservation among the glucose transporter from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and mammalian glucose transporters. *Plant Molecular Biology* **14**: 697-706
- Schöller, H.** (1997): Flechten. Geschichte, Biologie, Systematik, Ökologie, Naturschutz und kulturelle Bedeutung. Kleine Senckenberg-Reihe, Nr.27

- Scott, G.D.** (1960) Studies in lichen symbiosis. I. The relationship between nutrition and moisture in the maintenance of the symbiotic state. *New Phytol.* **59**: 376-391
- Servaites, J.C. & Geiger, D.R.** (2002) Kinetic characteristics of chloroplast glucose transport. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1581-1591
- Simoni, R.D. & Postma, P.W.** (1975) The energetics of bacterial active transport. *Annu. Rev. Biochem.* **44**: 523-550
- Stahl, E.** (1969) Thin-layer chromatography: a laboratory handbook. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Stocker-Wörgötter, E. & Türk, R.** (1994) Artificial resynthesis of the photosymbiodeme *P. leucophlebia* under laboratory conditions. *Cryptogamic Botany* **4**: 300-308
- Styvold, O.B. & Strøm, A.R.** (1991) Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli* K-12 strains: influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalase. *J. Bacteriol.* **173**: 1187-1192
- Summers, M.L., Wallis, J.G., Campbell, E.L. & Meeks, J.C.** (1995) Genetic evidence of a major role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in nitrogen fixation and dark growth of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain ATCC 29133. *Journal of Bacteriology* **177**: 6184-6194
- Tamaru, Y., Takani, Y., Yoshida, T. & Sakamoto, T.** (2005) Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl. Envir. Microbiol.* **71**(11): 7327 – 7333
- Töttemeyer, S., Booth, N.A., Nichols, W.W., Dunbar, B. & Booth, I.R.** (1998) From famine to feast: the role of methylglyoxal production in *Escherichia coli*. *Molecular Biology* **27** (3): 553-562
- Trainor, F.R.** (1985) Survival of algae in desiccated soil: a 25 year study. *Phycologia* **24**: 79-82
- Van den Hoek, C., Jahns, H. M. & Mann, D.G.** (1993) Algen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Wastlhuber, R. (1996) Untersuchungen zur symbiosespezifischen Glucoseausscheidung des Photobionten *Nostoc spec.* aus der Flechte *Peltigera horizontalis*, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie und Vorklinische Medizin – der Universität Regensburg

Widholm, J.M. (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology* **47**: 189-194

Wirth, V. (1995) Die Flechten Baden-Württembergs. Teil 2, 2. Auflage

Yoshimura, L. & Yamamoto, Y. (1991) Development of *Peltigera praetextata* lichen thalli in culture. *Symbiosis* **11**: 109-117

7 Anhang

7.1 Für Homologievergleiche verwendete Proteine

Zum Auffinden putativer Glucosetransporter im Genom von *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 wurden Proteinsequenzen verschiedener Organismen für verifizierte oder putative Glucosetransporter herangezogen (Tab.7.1).

Tab. 7.1: Angaben zu den verwendeten Proteinsequenzen. Die Informationen sind der Homepage von NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) entnommen.

Organismus	Accession	Definition
Bacillus licheniformis ATCC 14580	YP_079290	hexose transporter GlcU
Bacillus subtilis	AAC38133	glucose transporter
Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	CAB14418	YqgP ¹⁾
Bacillus thuringiensis serovar konkukian str. 97-27	YP_038763	glucose uptake protein
Corynebacterium ammoniagenes	AAC27701	glucose permease
Desulfovibrio desulfuricans G20	ABB40451	glucose transport system permease protein
Homo sapiens	NP_006507	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1
Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293	ZP_00063980	Putative glucose uptake permease
Listeria monocytogenes str. 4b F2365	YP_012797	glucose uptake protein
Neisseria gonorrhoeae FA 1090	YP_207312	putative sugar transporter
Polaromonas naphthalenivorans CJ2	ZP_01022019	glucose ABC transporter, permease protein, putative
Prochlorococcus marinus str. MIT 9313	NP_895329	Sodium:solute symporter family, possible glucose transporter
Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000	NP_791122	glucose ABC transporter, permease protein, putative
Rattus norvegicus	NP_037011	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2
Rhodobacter sphaeroides ATCC 17029	ZP_00918013	sugar ABC transporter, permease protein
Spinacia oleracea	AF215851	hexose transporter mRNA, complete cds; nuclear gene for chloroplast product
Staphylococcus aureus subsp. aureus MRSA252	CAG41322	glucose uptake protein
Synechococcus sp. CC9605	YP_382357	sodium:solute symporter family, possibly glucose transporter
Synechocystis sp. PCC 6803	NP_442047	glucose transport protein
Yersinia pseudotuberculosis IP 31758	ZP_00791546	Putative glucose uptake permease
Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4	YP_162101	glucose facilitated diffusion protein

¹⁾ Mesak, L.R., Mesak, F.M. & Dahl, M.K. (2004) Expression of a novel gene, *gluP*, is essential for normal *Bacillus subtilis* cell division and contributes to glucose export. BMC Microbiol. 4: 13-28

7.2 Proteinsequenzen von *Fragment 2* und *Fragment 3* (Wastlhuber, 1996)

Die Sequenzen *Fragment 2* und *Fragment 3* wurden mit anderen Proteinsequenzen verglichen, um eine cyanobakterielle Herkunft zu überprüfen.

Fragment2:

QQFVGINAFIYYAPTLFESLGQTSEMALIMSGVFNMLQLVAVSVCFLIIDR
VGRRPLSIFGGAGGAI SWGIMAILVALYSRNWNNHMDAGWGAVAMAF VF
ILIIYGVTYAPL GWALPTEVFPNALRAKGIALATSTN **WIC**NFIVAVVTPPML
ESWGFGTY L FYGA WCFLSMICAWFLV PETKGKTL

Fragment3:

QQFVGINVIFNYAQ EIFAGAGYEVS DTLFNIVITGVVNCFTLIALT
TVER WGRRRLLL VGSAALS AIYIAVGAGYVMGLQGWP LL FLVVV
AIAVYAMTLAPVTW VALSEIFPGEARGACM AIATT ALW AACFLL
TYTFPLL NAMAGTGGT F WIYGAICAAGFVFIYCMLPETKG KTL

7.3 Abkürzungen

In der Diplomarbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CCM	CO ₂ -Konzentrierungsmechanismus
CCCP	Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
cm	Zentimeter
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat

D-Enzym	Disproportionierende Transglykosylase
DC	Dünnschichtchromatographie
2-DG	2-Desoxyglucose
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
dNTPs	Desoxynukleotid-5'-triphosphate
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
EPS	extrazelluläre Polysaccharidschicht
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GS	Glutaminsynthetase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
KO-Mutante	Knock out-Mutante (Deletionsmutante)
λ(Lambda)	Wellenlänge
l	Liter
LiCl	Lithiumchlorid
μ	mikro
m	milli
M	molar
MCS	multiple cloning site
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGS	Methylglyoxalsynthase
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
ml	Mililiter
mol	Einheit für die Stoffmenge
mRNA	messenger-ribonucleic acid

NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-dinucleotid (reduzierend)
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
nm	Nanometer
OD	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OPP	oxidativer Pentosephosphatweg
p.a.	per analysis
PEP	Phosphoenolpyruvat
p	pico
P _i	anorganisches Phosphat
pBSK	pBluescript (SK), Klonierungsvektor
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pET	Expressionsvektor
PEP	Phosphoenolpyruvat
PTS	Phosphotransferasesystem
RUBISCO	Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
put.	putativ
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Tet	Tetrazyklin
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
UV	Licht ultraviolettes Licht
U	unit
V	Volt
v/v	Volumenprozente
w/v	Gewichtsprozente

Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin



Ich danke Herrn Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die spannende Themenstellung, bei der ich so viel Gestaltungsfreiheit hatte, und für sein Entgegenkommen bei Rückfragen.

Herrn Dr. Oliver Trentmann danke ich für die sehr gute Betreuung, insbesondere für die leidenschaftlichen Diskussionen und für die vielen Tricks im Laboralltag.

Ein großes Dankeschön gilt weiteren BiologInnen, die mich bei der Arbeit unterstützt haben:

Frau Dr. Ilka Haferkamp hat das ganze Flechten-Projekt mit entscheidenden Überlegungen gerettet, als wir dachten, mit unserer Molekularbiologie schon am Ende zu sein.

Herrn Dr. Torsten Möhlmann verdanke ich die Dissertation von Herrn Dr. Robert Wastlhuber, die eine wichtige Grundlage für meine Arbeit war.

Herr Prof. Dr. Burkhard Büdel nahm sich Zeit für meine zahllosen Fragen und hat mir bei einigem geholfen, etwa beim Aussuchen der Flechte und beim Kultivieren des „richtigen“ Photobionten.

Alle MitarbeiterInnen der AG Neuhaus haben sich mir gegenüber freundlich und hilfsbereit gezeigt, so dass mir die Laborarbeiten viel Spaß gemacht haben. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle die gute Zusammenarbeit mit meinem Kollegen Benjamin Jung erwähnen.

Herr Dr. Eckhard Loos und Frau Prof. Dr. Sieglinde Ott haben mir per eMail gute Auskunft gegeben.

Vor allem danke ich meinen Eltern, Bernd und Renate Wic, die mir das Biologie-Studium und vieles andere erst ermöglicht haben. Danke auch an Herrn Dipl. Ing. Felix Großmann für die Unterstützung und gemeinsamen Unternehmungen während des Studiums!



Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel verfasst und alle verwendeten Hilfsmittel aufgeführt habe.

Kaiserslautern, im August 2006

Stefan Wic