

Zusammenfassung

Wissensstand Adaptive Evolution und ungerichtete Mutagenese sind nützliche Werkzeuge zur Erzeugung von genetisch veränderten Organismen. Hierbei wird die Mutationsrate über eine Behandlung mit Mutagenen erhöht und anschließend eine Selektion auf wünschenswerte Eigenschaften durchgeführt. Diese Methoden wurden bereits weitreichend zur Anpassung von Nutzpflanzen und -tieren eingesetzt, so dass heutzutage praktisch keine Wildtypen mehr kommerziell kultiviert werden. Trotz des erneuten Interesses an Cyanobakterien und Mikroalgen in den letzten Jahren, gibt es jedoch nur relativ wenige aktuelle Studien zum Einsatz dieser Methoden an Cyanobakterien.

Als Ziel dieser Arbeit wurde die Erhöhung der Temperaturtoleranz des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 gewählt, da diese ein wichtiger Aspekt für die Freiland-Kultivierung ist. Weiterhin ist es nicht offensichtlich, welche Gene modifiziert werden müssen, so dass der Einsatz gerichteter Methoden stark eingeschränkt ist.

Zur Analyse eines mittels Mutagenese erzeugten Gemischs an Stämmen, ist es von großem Vorteil Hochdurchsatz-Methoden zur Kultivierung und zum Screening einsetzen zu können. Solche Methoden wurden bisher jedoch nicht für phototrophe Mikroorganismen wie Cyanobakterien und Mikroalgen etabliert.

Ergebnisse Als eines der Hauptergebnisse dieser Arbeiten wurde eine Plattform für das Screening von phototrophen Mikroorganismen auf Basis eines Pipettierroboters neu entwickelt und folgend stetig verbessert. Die Kultivierung erfolgt hierbei in 2,2ml Deepwell-Mikrotiterplatten innerhalb einer speziell angefertigten Kultivierungskammer. Parameter wie Schüttelbedingungen, Beleuchtung, Temperatur und CO₂-Atmosphäre sind dabei vollständig einstellbar. Automatisierte Messungen des Wachstums, des Absorptionsspektrums, der Chlorophyllkonzentration, MALDI-TOF-MS sowie eines neu entwickelten Vitalitätsassays wurden etabliert und können

im Verlauf einer Kultivierung überwacht werden. Diese Wachstumsparameter können als Input für das System genutzt werden, so dass semi-kontinuierliche Kultivierungen mit automatisierten Verdünnungen von hunderten Kulturen gleichzeitig ermöglicht werden.

Bevor eine Mutagenese durchgeführt wurde, wurden die Letalität- und die nicht-letale Punktmutationsrate für zwei Mutagene (ultraviolette Strahlung und Methylmethansulfonat) für *Synechocystis* charakterisiert. *Synechocystis* wurde mit den so ermittelten optimalen Dosen (10–50 J/m² für UV und 0,1 / 1 v% für MMS) behandelt und anschließend einer *in vivo* Selektion unterzogen. Nach vier Runden Mutagenese (zwei je Mutagen) wurde dessen Temperaturtoleranz um bis zu 3°C erhöht.

Anschließend konnte die neu entwickelte Screeningplattform erfolgreich eingesetzt werden, um die thermotolerantesten monoklonalen Stämme zu identifizieren. Die erhöhte Thermotoleranz wurde daraufhin in 11 Photobioreaktoren validiert. Um die genetischen Veränderungen zu identifizieren, welche zu diesen Phänotypen führen, wurde das vollständige Genom der Stämme sequenziert und die Ergebnisse wurden mit dem Ausgangs-Wildtyp verglichen. Hierdurch wurden Mutationen in den Genen *clpC*, *pnp*, *pyk2*, *sigF*, *nlpD*, *pyrR*, *pilJ*, *cya1*, sowie *recG* und *cmpA* mit der Temperaturtoleranz von *Synechocystis* in Verbindung gebracht.

Schlussfolgerungen Die Methoden ungerichtete Mutagenese, *in vivo* Selektion, Hochdurchsatzscreening und Genomsequenzierung wurden erfolgreich eingesetzt, um die Temperaturtoleranz von *Synechocystis* zu erhöhen und um erstmals bestimmte Gene mit der Langzeittemperaturtoleranz in Verbindung zu bringen. Bei einigen dieser Gene ist es sehr unwahrscheinlich, dass sie mittels anderer Verfahren hätten identifiziert werden können. Über den Einsatz anderer Selektionsbedingungen in der *in vivo* Selektion sollten die beschriebenen Methoden auch zur Induktion einer Reihe anderer wünschenswerter Charakteristika geeignet sein.

Die hier dargestellte Screeningplattform für phototrophe Mikroorganismen sollte für viele Stämme einsetzbar bzw. anpassbar sein. Da solch ein System eine Neuentwicklung für Phototrophe ist, kann damit gerechnet werden, dass es in vielen weiteren Einsatzgebieten Anwendung finden wird (z.B. Naturstoffscreening, Ertragsscreening, systembiologische Untersuchungen, usw.). Eine Vielzahl von Analyseverfahren sind auf dem System schon etabliert und die Plattform ist sowohl qualitativ (weitere Messparameter) wie auch quantitativ (Anzahl parallel bearbeiteter Stämme) leicht erweiterbar.

Abstract

Background Adaptive evolution and random mutagenesis are useful tools to genetically modify organisms for various purposes. Here, increasing the mutation rate through mutagenic treatment is followed by a selection for desirable traits. These methods have been extensively used to modify the crop plants and farm animals we use today. Practically no commercial cultivation is performed with wildtype strains. However even with the renewed interest in cyanobacteria in the recent years, there is relatively limited current research available on the application of these methods for cyanobacteria.

Increased temperature tolerance for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 was selected as a target for this work, as it is an important aspect for commercial scale outdoor cultivation and it is not obvious which genes require modifications, thereby hindering targeted approaches.

To analyse a mixture of various strains typically obtained through random mutagenesis, a method allowing high-throughput miniaturized cultivation and screening, is of great advantage. Such methods however, have not been generally established for phototrophic microorganisms such as microalgae or cyanobacteria.

Results As one of the primary results, a novel high-throughput screening system suitable for phototrophic microorganisms was developed based on a pipetting robot and then constantly improved. The cultivation was performed in 2.2 ml deepwell microtiter plates within a cultivation chamber outfitted with programmable shaking conditions, variable illumination, variable temperature, and an adjustable CO₂ atmosphere. The automated measurement of various parameters such as growth, full absorption spectrum, chlorophyll concentration, MALDI-TOF-MS, as well as a novel vitality measurement protocol, were established and can be monitored during cultivation. Measurement of growth parameters can be used as inputs for the system to allow for periodic automatic dilutions and therefore a semi-continuous cultivation

of hundreds of cultures in parallel.

Before performing random mutagenesis, the lethality and rate of non-lethal point mutations for two mutagens (ultraviolet radiation and methyl methanesulphonate) were characterized for *Synechocystis*. The thus determined optimal dosages (10–50 J/m² for UV and either 0.1 or 1 v% for MMS) were applied to a *Synechocystis* wildtype culture followed by *in vivo* selection. After four distinct rounds of treatment (two with each mutagen) the temperature tolerance of the strain was effectively raised by up to 3°C.

Afterwards the newly developed screening platform for phototrophic microorganisms was used to identify the most thermotolerant monoclonal strains. The increased thermal tolerances of the isolated monoclonal strains were validated in larger photobioreactors. To identify the genetic modifications leading to these phenotypes, their whole genomes were sequenced and the results compared to the parental wild type. Among the affected genes identified are *clpC*, *pnp*, *pyk2*, *sigF*, *nlpD*, *pyrR*, *pilJ*, *cya1*, *recG* and *cmpA*.

Conclusions The established methods, random mutagenesis, *in vivo* selection, high-throughput screening, and whole genome sequencing were successfully applied to raise *Synechocystis* thermal tolerance and to identify various related genes and mutations, some of which are very unlikely to have been identified by other approaches. With a different *in vivo* selection, the described methods should also be applicable to induce a variety of other desirable characteristics in various strains.

The presented screening platform for phototrophic microorganisms should be usable for many phototrophic microorganisms as is, and be adaptable for even more. As such a system is novel for phototrophs, many further applications are expected (e.g. natural product screening, yield screening, systems biological studies...). A variety of analyses are already established and the platform can easily be expanded both in quality, i.e. with further parameters to screen for additional targets and in quantity, i.e. size or number of processed samples.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Vorwort	3
2 Wissensstand	4
2.1 Cyanobakterien	4
2.2 Einsatzgebiete von Cyanobakterien	6
2.2.1 Energetische und stoffliche Nutzung	6
2.2.2 Nutzung zur Wirkstoffsuche	8
2.2.3 Nutzung als Futter- und Nahrungsquelle	9
2.3 Modellorganismus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	10
2.3.1 Temperaturtoleranz in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	10
2.4 Adaptive Evolution	11
2.4.1 Einsatz von Mutagenen	12
2.5 Hochdurchsatz-Screening und Kultivierung	14
2.6 Next Generation Sequenzierung	16
3 Zielstellung	18
4 Material und Methoden	20
4.1 Material	20
4.1.1 Stämme	20
4.1.2 Chemikalien, Medien und Primer	20
4.1.3 Geräte	21
4.1.4 Screeningsysteme	21
4.1.5 Software	25
4.2 Methoden	28
4.2.1 Allgemeine Methoden	28

4.2.2	Kultivierungsbedingungen	32
4.2.3	Automatisierte Methoden	37
4.2.4	Kalkulationen	41
5	Ergebnisse	43
5.1	Entwicklung einer Hochdurchsatz Screeningplattform für phototrophe Mikroorganismen	43
5.1.1	Erste Iteration der Screeningplattform	43
5.1.2	Zweite Iteration der Screeningplattform	46
5.1.3	Dritte Iteration der Screeningplattform	50
5.1.4	Zusammenfassung	62
5.2	Adaptive Evolution zur Erhöhung der Temperaturtoleranz	63
5.2.1	Bestimmung der optimalen Mutagendosis	63
5.2.2	<i>In vivo</i> Selektion	65
5.2.3	Screening von monoklonalen Stämmen	68
5.2.4	Phänotypische und genotypische Charakterisierung	70
5.2.5	Zusammenfassung	77
6	Diskussion	78
6.1	Hochdurchsatz Screeningplattform für phototrophe Mikroorganismen	78
6.1.1	Analytische Methoden der Screeningplattform	78
6.1.2	Kultivierung in der Screeningplattform	82
6.1.3	Skalierbarkeit des Systems	85
6.1.4	Zusammenfassung	85
6.2	Adaptive Evolution zur Erhöhung der Temperaturtoleranz	87
6.2.1	Optimale Mutagendosen zur Induktion von Punktmutationen	87
6.2.2	<i>In Vivo</i> Screening für die adaptive Evolution	88
6.2.3	Temperaturtoleranzscreening monoklonaler Stämme	90
6.2.4	Genetische Veränderungen zur Induktion einer Thermotoleranz in <i>Synechocystis</i>	92
6.2.5	Zusammenfassung	99
7	Schlussfolgerung und Ausblick	100
	Danksagung	103
	Publikationsliste	104

Literatur	106
Selbständigkeitserklärung	120
Anhang	121
Tabelle 7.1: Punktmutationen des Referenz-Wt gegenüber dem Kazusa-Wt	123
Primersequenzen	123
Quellcode der Programmskripte	125

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abs	Absorption
AS	Aminosäuren
BG11	Medium für Blaualgen (engl. <i>blue-green-algae</i>) Nr. 11
BLAST	engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CCD	engl. <i>Charge-coupled Device</i>
CCM	engl. <i>Carbon concentrating mechanism</i>
DF	Freiheitsgrade (<i>degrees of freedom</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DWP	Deepwell-Mikrotiterplatte
EMS	Ethylmethansulfonat
Em	Emission
Ex	Anregung (engl. <i>Excitation</i>)
EU	Europäische Union
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
G	Guanin
GVO	Genetisch veränderte Organismen
h	Stunden (engl. <i>hours</i>)
HTS	Hochdurchsatz-Screening
Indel	Insertion oder Deletion
J /m ²	Joule pro Quadratmeter
KBE	Koloniebildende Einheit
lg	Logarithmus der Basis 10
LiHa	engl. <i>Liquid Handling Arm</i>
log	Logarithmus
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MGMT	O ⁶ -Methylguanine-DNA-Methyltransferase
MMS	Methylmethansulfonat

MS	Massenspektroskopie
MTP	Mikrotiterplatte
m/z	Masse durch Ladung (bei MALDI-TOF-MS)
NGS	Hochdurchsatzsequenzierung (engl. <i>Next Generation Sequencing</i>)
OD	Optische Dichte
PCC	engl. <i>Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria</i>
pH	pH-Wert (lat. <i>potentia hydrogenii</i>)
PV	Photovoltaik
R	Korrelationsfaktor
PID	Proportional-Integral-Differential
RoMa	engl. <i>Robotic Manipulator Arm</i>
rpm	engl. <i>Rotations per Minute</i>
RuBisCo	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
SNP	Punktmutationen (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
T	Thymin
TOF	Flugzeitanalysator (engl. <i>time of flight</i>)
uHTS	ultra Hochdurchsatz-Screening
UV	Ultraviolette Strahlung
VK	Variationskoeffizient
v%	Volumenprozent
wt	Wildtyp
λ	Wellenlänge

1 Vorwort

Cyanobakterien und Mikroalgen sind im letzten Jahrzehnt immer stärker in den Fokus der biotechnologischen Forschung gerückt. Angetrieben wird dies unter anderem durch eine erhöhte Nachfrage nach CO₂-neutralen Quellen von Biomasse für die energetische und stoffliche Nutzung. Aber auch als Produzenten von Naturstoffen für die pharmazeutische Forschung und als Futter- oder Nahrungsquelle rutschen Cyanobakterien zunehmend in den Fokus.

Es ist jedoch höchst unwahrscheinlich, dass bei jeglicher Produktion im industriellen Maßstab ein Wildtyp Stamm eingesetzt werden wird. Betrachtet man historische Entwicklungen so stellt man fest, dass praktisch alle heute angebauten Nutzpflanzen und Nutztiere weitgehend an unsere Bedürfnisse angepasst wurden. Dies geschah entweder durch jahrtausendelange Zucht, ungerichtete Mutagenese (Grüne Revolution in den 60er Jahren) oder in neuster Geschichte durch gerichtete Modifikation des Erbguts (moderne transgene Nutzpflanzen). Ungerichtete Mutagenese bietet mehrere Vorteile: Die regulatorischen Rahmenbedingungen sind deutlich leichter zu erfüllen, anders als bei gerichteten Modifikationen gibt es keine breite Ablehnung in der Bevölkerung und es werden nur wenige Kenntnisse über die zugrunde liegenden biologischen Mechanismen benötigt, um weitreichende Phänotyp-Veränderungen hervorzurufen.

Mittels Selektionsdruck nach einer Zufalls-Mutagenese können in einer sogenannten adaptiven Evolution gewünschte phänotypische Eigenschaften hervorgerufen werden. Durch eine nachgeschaltete Kopplung mit Selektionsmethoden im hohem Durchsatz können gezielt einzelne optimierte Stämme selektiert werden. Für heterotrophe Bakterien und Eukaryoten sind Plattformen für das Hochdurchsatzscreening gut etabliert und kommerziell erhältlich. Für phototrophe Mikroorganismen gibt es jedoch noch keine vergleichbaren Systeme.

Diese Arbeit befasst sich mit der Entwicklung einer Strategie zur Anpassung von Cyanobakterien an menschliche Bedürfnisse. Hierbei werden Mutagenese, adaptive Evolution und eine neu entwickelte Hochdurchsatzplattform genutzt. Als Optimierungsziel wurde die Temperaturtoleranz des Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 gewählt. Die Temperaturtoleranz von Cyanobakterien ist für bestimmte Anwendungen, wie zum Beispiel für die Produktion von Biotreibstoffen in großem Maßstab in der Wüste, von besonderem Interesse.

2 Wissensstand

2.1 Cyanobakterien

Cyanobakterien besiedeln seit mehr als 2,8 Milliarden Jahren die Erde und zählen zu den ältesten Lebensformen. Als die ersten oxygenen Phototrophen der Erde sind sie durch die massive Freisetzung von Sauerstoff für die Umwandlung der Erdatmosphäre und für die Bildung der schützenden Ozonschicht verantwortlich. Dieser radikale Wandel von einer reduzierenden zu einer oxidierenden Atmosphäre leitete die Entstehung komplexerer Organismen ein und ist letztendlich für die Explosion der Biodiversität in diesem Zeitalter verantwortlich. (Hoek et al., 1993; Sleep und Bird, 2008)

Cyanobakterien wurden ursprünglich den Algen zugeordnet, was auch die noch oft verwendete Bezeichnung „Blualgen“ erklärt. Erst durch molekularbiologische Untersuchungen konnte die eindeutige taxonomische Einordnung zu den gramnegativen Bakterien erfolgen. Nach der Endosymbiontentheorie haben sich Chloroplasten, die Organellen, welche in Algen und Pflanzen die Photosynthese durchführen, aus eingeschleusten Cyanobakterien entwickelt. Somit kann argumentiert werden, dass die Photosynthese im Grundsatz ein ausschließlich bakterieller Prozess ist (Bannwarth et al., 2007; Hoek et al., 1993; Lee, 1989).

Die grundlegende Zellstruktur von Cyanobakterien ist in Abb. 2.1 gezeigt. Cyanobakterien nutzen verschiedene Granula zur Speicherung von Kohlehydraten (als Glykogen und Polyglukan), Proteinen bzw. Kohlenstoff/Stickstoff (als Cyanophycingranaprotein; hauptsächlich in stationärer Phase) und Phosphaten (als Polyphosphate in den Volutingranula). Zusätzliche Zelleinschlüsse sind Vakuolen und Carboxysome. Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RuBisCo - das Schlüsselenzym der Photosynthese, welches die Kohlenstofffixierung katalysiert) ist in Cyanobakterien sowohl gelöst in der Zelle, wie aufkonzentriert innerhalb der Carboxysomen zu finden. Zur Absorption von Lichtstrahlung besitzen Cyanobakterien neben Chlorophyll a charakteristische Biliproteinpigmente, die Phycobiline, die als Hilfspigmente dienen. (Lee, 1989)

Cyanobakterien sind allgegenwärtig und man findet sie an praktisch jedem zumindest zeitweise belichteten Ort der Erde, von Ozeanen bis hin zu Wüsten. Die Phänotypen reichen von einfachen Einzellern bis hin zu langen Filamenten mit unterschiedlichsten Charakteristika wie z.B.:

- Produktion starker Toxine (z.B. *Microcystis*)
- Heterozysten zur Stickstofffixierung in aerober Umgebung (*Anabaena*, *Nostoc*)
- Gas-Vesikel, um die Tauchtiefe zu steuern (*Microcystis*, *Anabaena*)
- Eine schützende Schleimhülle (*Gomphosphaeria*, *Nostoc*)
- Sehr hoher Proteingehalt und von Mensch und Tier genießbar (*Spirulina*)
- Wachstum sowohl im Wasser, wie auf Land (*Cylindrospermum*)
- Filamente zur Bildung von Faszikulation-Bündeln (*Aphanizomenon*)
- Die Fähigkeit Photosynthese ohne Sauerstoffproduktion durchzuführen (*Oscillatoria limnetica*)
- Anhydrobiose (*Nostoc*)

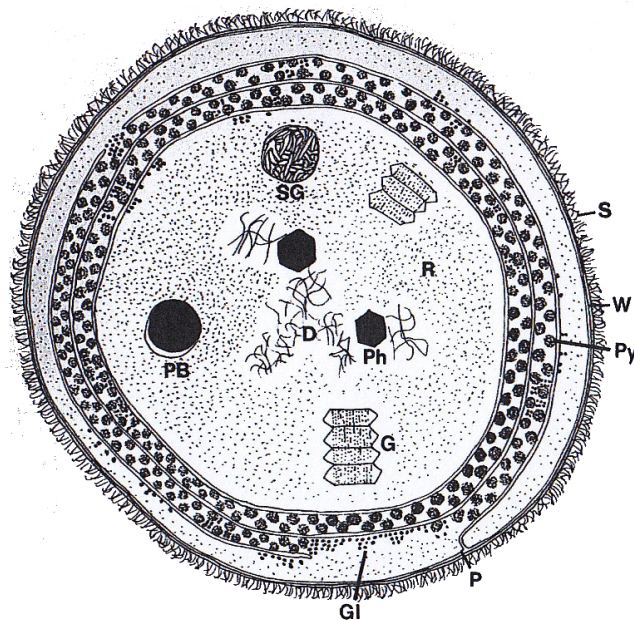


Abbildung 2.1: Grundlegende Zellstruktur einzelliger Cyanobakterien: (D) DNA; (G) Gas-Vesikel; (Gl) Glycogengranula; (P) Plasmalemma; (PB) Volutingranula; (Ph) Carboxysome; (Py) Phycobilisome; (R) Ribosome; (S) Zellhülle; (SG) Cyanophycingranaproteine; (W) Zellwand (Lee, 1989).

Unter geeigneten Bedingungen können die meisten Stämme eine explosive Wachstumsphase oder „Algenblüte“ durchgehen. Diese sind leicht an einer blau-grün Färbung der Gewässer und einer Ansammlung von Schleim an der Wasseroberfläche zu erkennen. Wenn Gewässer unter diesen Umständen einen hohen Anteil an Toxin produzierenden Cyanobakterien enthalten, so können diese bei direktem Kontakt eine Gefahr für Menschen und andere Tiere bilden (Canter-Lund, 1995; Lee, 1989).

Durch ihre Robustheit und die geringen Ansprüche an Nährstoffe bilden sie eine optimale Quelle für den Aufbau von Biomasse. Wegen Eingriffen des Menschen in die Umwelt ergeben sich aber auch oft weitreichende Probleme. So ist ihr Wachstum in nicht tropischen Regionen hauptsächlich durch die Phosphat- und teilweise die Nitratkonzentration im Wasser limitiert. Moderne Landwirtschaft und unzureichende Abwasserbehandlung haben jedoch zu deutlich erhöhten Phosphat- und Nitratkonzentrationen in Gewässern geführt. Heutige Nitratkonzentrationen sind 10 bis 15 fach höher als die vor 100 Jahren (Fields, 2004), so dass enorme Bereiche im Ozean häufig umkippen (Canter-Lund, 1995). Massive Algenblüten verhindern hierbei das Durchdringen von Licht in tiefere Gewässerschichten. Anschließend verbraucht der Abbau sterbender Cyanobakterien durch heterotrophe Bakterien den gesamten gelösten Sauerstoff. Es entstehen dunkle, anaerobe Bereiche, sogenannte „dead zones“, in denen aquatische Organismen kaum überleben können. Ein Beispiel hierfür ist die dead zone im Golf von Mexiko, welche durch die Mündung des nitratreichen Mississippi verursacht wird und in ihrer Größe zwischen 8.000 und 20.000 km^2 schwankt. Andere bekannte dead zones liegen in der Ostsee, dem Adriatischen Meer, dem Golf von Thailand, dem Gelben Meer und in Chesapeake Bay. (Canter-Lund, 1995; Fields, 2004)

2.2 Einsatzgebiete von Cyanobakterien

Cyanobakterien haben viele mögliche Einsatzgebiete von denen die wichtigsten folgend kurz dargestellt werden.

2.2.1 Energetische und stoffliche Nutzung

Die meisten Ansätze zur Erzeugung nachhaltiger Energiequellen beruhen darauf, die Energie der Sonne effizient zu nutzen bzw. zu speichern. Sonnenlicht trifft mit insgesamt 174.000 Terawatt Energie auf die Erde. Der globale Energieverbrauch beläuft sich jedoch lediglich auf 16.3 Terrawatt, also weniger als 0.1%. Die Herausforderung liegt vor allem darin, die Sonnenenergie kosteneffizient umzuwandeln (Szuromi et al., 2007).

Ein Teil der Antwort auf dieses Problem kann sicherlich die Photovoltaik (PV) werden. Die Nachhaltigkeit der Stromgewinnung mit Photovoltaik verbessert sich stetig, so gewinnt eine in Mitteleuropa eingesetzte PV-Zelle die Energie ihrer Produktion inzwischen bereits nach 2 bis 3,5 Jahren zurück. Das Hauptproblem liegt jedoch in der Speicherung der gewonnenen elektrischen Energie. Somit wäre selbst eine theoretische PV-Zelle mit 70% Ausbeute keine realistische Alternative für fossile Brennstoffe (Lewis, 2007). Außerdem sind die Emissionen über den gesamten Lebenszyklus betrachtet, weiterhin höher als die von Wind- oder Atom-Energie (Alsema und Fthenakis, 2006; Alsema et al., 2006; Peng et al., 2013).

Biotreibstoffe haben diese Limitierung nicht, da die Energie chemisch gebunden und somit bereits gespeichert ist. Grundsätzlich werden Biotreibstoffe in drei Generationen eingeteilt¹:

¹Teilweise wird auch eine vierte Generation hinzugefügt, um synthetische Organismen zur Treibstoffproduktion zusätzlich abzugrenzen.

- **Erste Generation:** Treibstoffe, die aus essbaren Teilen von Pflanzen hergestellt werden
- **Zweite Generation:** Treibstoffe, die aus ungenießbaren Biomasseabfällen landwirtschaftlicher Produktion hergestellt werden
- **Dritte Generation:** Treibstoffe, die aus speziell für diesen Zweck kultivierten Cyanobakterien, Algen, oder auch Gräsern hergestellt werden; diese benötigen keine traditionelle Ackerfläche.

Biotreibstoffe der ersten Generation sind die letzten Jahre vor allem wegen der Kopplung an Lebensmittel-Preise und -Produktion zu Recht sehr in die Kritik geraten. Biotreibstoffe der zweiten und besonders der dritten Generation weichen diesen Problemen größtenteils aus. Bei Biotreibstoffen der zweiten Generation ist jedoch zu beachten, dass nicht genug Rest-Biomasse in der Landwirtschaft anfällt, um den Bedarf an Treibstoff oder chemischen Rohstoffen zu decken. Ein weiteres Problem liegt in der prozesstechnisch komplexen Weiterverarbeitung der Biomasse für bestimmte Anwendungen, da der notwendige Zelluloseabbau durch das Lignin der Pflanzen gehemmt wird (Stephanopoulos, 2007; Zeng et al., 2014).

Bei Biotreibstoffen der dritten Generation wird meist zusätzlich über genetische Veränderungen der Anteil an wünschenswerten Stoffen (z.B. Zucker, Öle, Biomasse oder Wasserstoff) erhöht oder es werden gänzlich neue Synthesewege zur Produktion eingeführt; beispielsweise zur Produktion von Ethanol oder Benzinvorläufern.

Bei der „stofflichen Nutzung“ wird im Gegensatz zur energetischen Nutzung die Biomasse als Rohstoff für die Produktion von Gütern jeglicher Art, sowie für die direkte Verwendung in Produkten eingesetzt. Die stoffliche Nutzung erfolgt in vieler Hinsicht der energetischen Nutzung analog: Auch hier wird meist die endliche Ressource Erdöl durch eine biologisch Nachwachsende ersetzt und auch hier ist sowohl eine chemische Umsetzung der Biomasse als auch eine direkte Produktion in transgenen Organismen möglich. Typische Einsatzgebiete sind zum Beispiel die Kunststoff- oder Chemikalienproduktion.

Für beide Einsatzgebiete haben Cyanobakterien gegenüber üblichen Nutzpflanzen einige entscheidende Vorteile.

Wichtigster Unterschied ist, dass sie in landwirtschaftlich unbrauchbaren Flächen wie z.B. Wüsten angebaut werden können und somit nicht direkt mit Nahrungsmitteln in Konkurrenz treten (Parmar et al., 2011). Außerdem enthalten Cyanobakterien kein Lignin und sind somit prozesstechnisch deutlich leichter zu verarbeiten

Ein weiterer, nicht zu vernachlässigender Aspekt ist der erhöhte Verbrauch von Frischwasser durch die landwirtschaftliche Produktion für Biotreibstoffe und die stoffliche Nutzung (United-Nations, 2008). Cyanobakterien können hingegen oft in Salz- oder Brackwasser kultiviert werden und beanspruchen somit nicht die in vielen Regionen bereits übermäßig ausgebeuteten Aquifer (Custodio, 2002; Foster und Chilton, 2003).

Insgesamt benötigen Cyanobakterien neben Licht nur Phosphat und Nitrat, welche zu Genüge in Abwässern oder Tierhaltungsabfällen vorkommen. Einige Cyanobakterien sind sogar

in der Lage atmosphärischen Stickstoff selbständig zu fixieren. Ein weiterer, sehr wichtiger Vorteil von Cyanobakterien und Mikroalgen ist die potenziell deutlich höhere Produktivität (Chisti, 2008; Parmar et al., 2011).

2.2.2 Nutzung zur Wirkstoffsuche

Naturstoffe (bzw. Sekundärmetabolite) sind in der Vergangenheit die Hauptquelle für neue Medikamente oder Leitwirkstoffe gewesen. So waren bis 1990 ca. 80% der Medikamente entweder Naturstoffe oder deren Ableitungen. In den letzten Jahrzehnten hat die Suche nach Naturstoffen durch die pharmazeutische Industrie jedoch stark nachgelassen; der Schwerpunkt wurde stattdessen auf synthetische Wirkstoffbibliotheken gelegt. Hierfür gibt es verschiedene Gründe: Die erhöhte Komplexität im Screening und in der Identifizierung bei Naturstoffen, rechtliche Hürden beim geistigen Eigentum (Rio Konvention²) und ein erschwerter Bezug und Extraktion der Wirkstoffkandidaten. (Li und Vederas, 2009)

Zeitgleich gab es einen starken Einbruch an Neuzulassungen von Medikamenten (Li und Vederas, 2009; Sielaff et al., 2006; Singh et al., 2011), während ökonomisch sehr profitable Patente einiger Pharmakonzerne bald auslaufen (Li und Vederas, 2009). Die Hoffnung, welche in synthetische Wirkstoffbibliotheken über kombinatorische Chemie gesetzt wurde, hat sich nicht erfüllt, so dass das Interesse an Naturstoffen in den letzten Jahren wieder zugenommen hat (Wase und Wright, 2008).

Cyanobakterien produzieren eine große Menge an sehr diversen Naturstoffen, welche teilweise über nicht-ribosomale Peptidsynthese gebildet werden. Dieses hohe, größtenteils unausgeschöpfte Potential, ist hauptsächlich aufgrund von Problemen bei der Kultivierung von Cyanobakterien, lange vernachlässigt worden. So ist oft das Know-How nicht vorhanden, um axenische Kulturen zu erzeugen und auch das Hochskalieren gestaltet sich ohne entsprechende Expertise meist schwierig (Sielaff et al., 2006; Wase und Wright, 2008). Weiterhin gibt es keine etablierten Systeme für die automatisierte Kultivierung und ein Screening von Cyanobakterien im hohen Durchsatz (siehe 2.5).

Somit gibt es zur Zeit noch keine zugelassenen Medikamente von Cyanobakterien (Singh et al., 2011). Es gibt jedoch einige cyanobakterielle Naturstoffe an denen aktiv geforscht wird oder die sich zum Teil in verschiedenen klinischen Phasen befinden (Tabelle 2.1).

Diese Naturstoffe und Derivate sind nur ein kleiner Ausschnitt der bioaktiven Stoffe aus Cyanobakterien. Durch eine zusätzliche Vorauswahl der Stämme mittels systembiologischer Ansätze (Wase und Wright, 2008), sowie automatisierter Screeningpipelines ist damit zu rechnen, dass Naturstoffe aus Cyanobakterien in Zukunft einen zunehmenden Anteil in der pharmazeutischen Forschung ausmachen werden.

²In der Rio Konvention wurde das Nagoya-Protokoll festgelegt. Dieses soll „Biopiraterie“ eindämmen, indem Nationen einen gerechter Ausgleich der Vorteile zugestanden wird, die sich aus der Nutzung ihrer Ressourcen durch Dritte ergeben.

Tabelle 2.1: Zusammenfassung von bekannten potentiellen Pharmazeutika cyanobakteriellen Ursprungs

Name	Aktivität	Ursprungsspezies
Apratoxin A	Antitumor	<i>Lyngbya</i> sp.
Borophycin 11	Antitumor	<i>Nostoc linkia</i>
Cryptophycine	Antitumor	<i>Nostoc</i> sp. GSV224
C-Phycocyanin	Antitumor	Verschiedene
Curacin A	Antitumor	<i>Lyngbya majuscula</i>
Cyanovirin-N	Antitviral	<i>Nostoc ellipsosporum</i>
Dolastatin 10 & 15	Antitumor	<i>Symploca</i> sp.*
Ichthyopeptine A & B	Antitviral	<i>Microcystis ichthyoblabe</i>
Kempopeptin A und B	Antiprotozoen	<i>Lyngbya</i> sp.
Largazole	Antitumor	<i>Symploca</i> sp.
Noscomin 57	Antibakteriell	<i>Nostoc commune</i>
Protein-Extrakt	Antibakteriell	<i>Anabaena</i> sp.
Scytovirin	Antitviral	<i>Scytonema varium</i>
Spirulan & Ca-Spirulan	Antitviral	<i>Spirulina</i> sp.

* Ursprünglich fälschlicherweise der Breitfußschnecke *Dolabella auricularia* zugeordnet

Quellen: Singh et al. (2011) und Tan (2007, 2010)

2.2.3 Nutzung als Futter- und Nahrungsquelle

Wegen der hohen Produktivität und der potentiell sehr nachhaltigen Kultivierung werden Cyanobakterien auch als Futter und Nahrungsquellen zunehmend in Betracht gezogen. Gerade die Produktion an ungesättigten Fettsäuren ist hierbei von besonderem Interesse (Draaisma et al., 2013).

Fische zum Beispiel sind nicht in der Lage, die für den Menschen wichtigen Omega-3-Fettsäuren selber zu produzieren. Stattdessen werden diese aus Mikroalgen und Cyanobakterien in der Nahrungskette angereichert. Speisefisch aus Aquakultur wird heutzutage entweder mit Fischmehl gefüttert, welches das Problem der Überfischung nur verlagert und nicht unbedingt reduziert (Fisheries and Aquaculture Department - United Nations, 2012), oder er wird potentiell nachhaltig mit vegetarischem Futter angezogen, enthält dann aber nicht die vom Konsumenten gewünschten Fettsäuren. Phototrophe Mikroorganismen mit hohem Anteil an entsprechenden ungesättigten Fettsäuren könnten somit als Nahrungsergänzung für Fischfutter in Aquakulturen eingesetzt werden, um gesunden Fisch nachhaltig zu produzieren (Naylor et al., 2009). In ersten Screening-Versuchen wurden bereits einige geeignete Cyanobakterienstämme identifiziert (Guedes et al., 2011).

Weiterhin ist auch der direkte Verzehr von Cyanobakterien denkbar. So sind zum Beispiel in China, Japan und Java *Nostoc flagelliforme* und *commune* und in Tschad *Spirulina* traditionell als Lebensmittel begehrt. Neben den teilweise hohen Anteilen an Proteinen und

Kohlenhydraten (z.B. 70% und 15-20% bei *Spirulina platensis*) sind für bestimmte Stämme auch Cholesterinspiegel reduzierende, heilungsfördernde und Nahrungsallergie hemmende Wirkungen nachgewiesen worden, welche Cyanobakterien für den menschlichen Verzehr interessant machen. (Sharma et al., 2011)

2.3 Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803

Alle hier dargestellten Arbeiten wurden an *Synechocystis* sp. PCC 6803 (fortan *Synechocystis* genannt) durchgeführt, da es eines der meist eingesetzten Modelle für Cyanobakterien und Phototrophe im Allgemeinen ist. PCC steht hierbei für „Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria“ und 6803 ist die Identifikationsnummer (der Stamm wurde 1968 isoliert). Es ist einzellig und offiziell als Süßwasserstamm eingestuft, obwohl es sehr salztolerant ist und auch bei hohen Konzentrationen im Medium keine bzw. kaum Minderungen in der Wachstumsrate aufweist (Marin et al., 2002). *Synechocystis* ist fakultativ heterotroph, also auch in der Lage organischen Kohlenstoff zu verwerten, wenn dieser im Medium bereit steht. Der Stamm lässt sich relativ leicht kultivieren und ist über homologe Rekombination natürlich kompetent und somit leicht transformierbar. Das Genom von *Synechocystis* wurde bereits 1996, als erster phototropher Organismus, sequenziert (Kaneko et al., 1996). *Synechocystis* ist polyploid und hat zwischen 58 und 218 Genom-Kopien pro Zelle (Griese et al., 2011). Insgesamt ist *Synechocystis* das bei weitem bestuntersuchte Cyanobakterium mit einem gut annotierten Genom. Dies erleichtert es erheblich, von genetischen Veränderungen Rückschlüsse auf mögliche molekulare Mechanismen zu schließen.

2.3.1 Temperaturtoleranz in *Synechocystis* sp. PCC 6803

Inoue et al. (2001) haben das Wachstum von *Synechocystis* bei verschiedenen Temperaturen analysiert und gleichmäßige Wachstumsraten zwischen 25 bis 40 °C festgestellt. Über diese Temperatur hinaus fällt die Wachstumsrate steil ab und bei 45 °C ist kein Wachstum mehr feststellbar (Abb. 2.2)

In vielen Studien wird angenommen, dass der Zelltod bei höheren Temperaturen direkt durch die Inhibition der Photosynthese am temperatursensitiven PSII geschieht (Mamedov et al., 1993; Rowland et al., 2010). Inoue et al. (2001) hingegen haben geschlossen dass unter diesen Bedingungen andere Zellfunktionen, wie z.B. die von Komponenten der Plasmamembran, die limitierenden Faktoren für das Wachstum sind.

Gene wie *hrcA* (Lee et al., 1998; Nakamoto et al., 2003), *hik34* (Kaczmarzyk et al., 2014; Suzuki et al., 2005) *rre1* (Kaczmarzyk et al., 2014) und *sigB* (Kaczmarzyk et al., 2014; Tuominen et al., 2006) sind in *Synechocystis* bereits im Zusammenhang mit der Regulation der Hitzeschockantwort bekannt.

Die Hitzeschockantwort ist jedoch nicht mit einer langzeitigen Temperaturtoleranz gleichzusetzen. Versuche über gerichtete Methoden an den genannten Genen die Temperaturtoleranz zu erhöhen, zeigten nur sehr mäßigen Erfolg. Suzuki et al. (2005) haben beispielsweise über

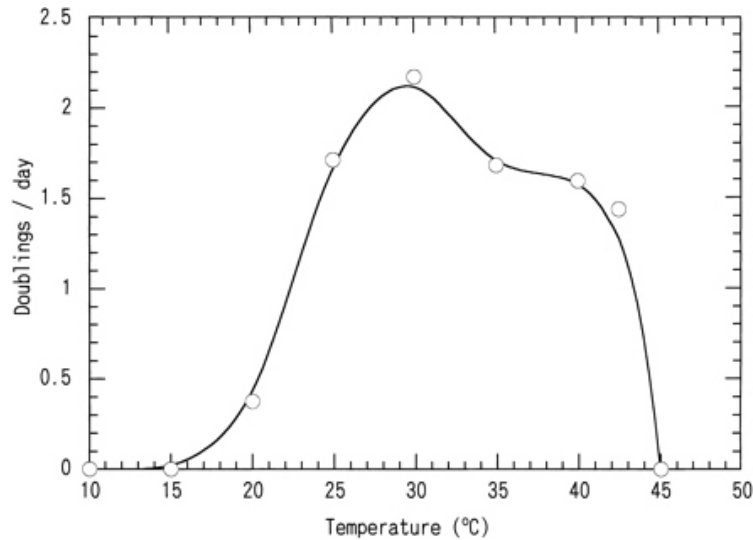


Abbildung 2.2: Teilungsraten von *Synechocystis* über die Kultivierungstemperatur. Aus Inoue et al. (2001).

einen Knockout von *hik34* in *Synechocystis* zwar die Expression der Hitzeschockproteine stark beeinflusst, die Überlebensdauer bei 47 °C aber nur von zwei auf drei Stunden erhöhen können. Kaczmarzyk et al. (2014) haben den Einfluss des Knockout/Knockdowns und die Überexpressionen mehrerer Histidinkinasen (*hik33*, *hik34*), Response Regulatoren (*rre1*, *rre26*, *rre31*) und von *sigB* untersucht. Hierbei hatten nur die Gene *hik34*, *SigB* und *rre1* einen nennenswerten Einfluss auf die Temperaturtoleranz. Durch Änderung Ihrer Expression konnte die Überlebensrate nach zweistündiger Kultivierung bei 47 °C von <1% beim Wildtyp auf ca. 20-40% erhöht werden.

Weiterhin sind mehrere Gene (wie Chaperone und Proteasen) bekannt, welche nach einer kurzzeitigen Akklimatisierung auf höhere Temperaturen differentiell exprimiert werden (Rowland et al., 2010; Singh et al., 2006; Suzuki et al., 2006). Es sind jedoch keine publizierten Daten darüber vorhanden, welche Gene für eine langzeitige Temperaturtoleranz in *Synechocystis* erforderlich sind.

2.4 Adaptive Evolution

Adaptive Evolution ist als das Durchsetzen von vorteilhaften Mutationen über positiven Selektionsdruck definiert. Gekoppelt mit ungerichteter Mutagenese ist es eine sehr nützliche Methode, um Stämme an menschliche Bedürfnisse (wie z.B. erhöhte Toleranzen) anzupassen. Eine genomweite ungerichtete Mutagenese wird hierbei genutzt, um die Mutationsrate zu steigern und somit den Prozess deutlich zu beschleunigen. Die positive Selektion kann *in vivo* durchgeführt werden, indem Stämme mit verschiedenen Mutationen in Konkurrenz unter selektiven Bedingungen wachsen, wobei die besser Angepassten überleben bzw. sich

schneller teilen und sich somit in dem Kulturgemisch anreichern.

Der Hauptvorteil gegenüber gerichteten Methoden besteht darin, dass nur wenig Wissen über die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen benötigt wird. Trotzdem können erhebliche Veränderungen im Phänotyp erreicht werden (Jia und Zhang, 2010). Es können auch Resultate erzielt werden, welche die simultane Veränderung mehrerer scheinbar zusammenhangloser Gene benötigen, so wie zum Beispiel für hohe Ethanoltoleranzen (Jia und Zhang, 2010). Ein anderer erwähnenswerter (aber logisch und ethisch etwas fraglicher) Vorteil der ungerichteten Mutagenese ist, dass so erzeugte Stämme nicht als gentechnisch veränderte Organismen (GVOs) eingestuft werden und somit in der EU deutlich weniger gesetzlichen Regularien unterliegen.

Um nach der Mutagenese und Selektion aus dem Gemisch wieder reine Stämme mit bekannten Eigenschaften zu erhalten, müssen diese zuerst vereinzelt und dann jeweils charakterisiert werden. Bei einer hohen Anzahl zu analysierender Stämme ist es von enormem Vorteil, diesen Schritt mit automatisierten Screening-Plattformen durchzuführen (siehe 2.5).

Der rasante Fortschritt und der damit verbundene Preisabfall in den Sequenzieretechnologien in den letzten Jahren (siehe 2.6) hat es zusätzlich ermöglicht, adaptive Evolution als ersten Schritt in einer mehrstufigen Strategie zu nutzen. Es ist mittlerweile finanziell sinnvoll, mehrere so erzeugte Stämme zu sequenzieren und diese anschließend mit dem Ausgangswildtyp zu vergleichen, um veränderte Gene zu identifizieren. Diese können für weitere Verbesserungen des Phänotyps anschließend mit gerichteten Methoden gezielt modifiziert werden.

2.4.1 Einsatz von Mutagenen

Die eigentliche Mutagenese wird meist durch hoch energetische Strahlung oder Chemikalien erzielt. Bei den meisten Studien sind hierfür ultraviolette (UV) Strahlung oder alkylierende Stoffe die Mittel der Wahl. Verschiedene Mutagene erzeugen jedoch mit bestimmten Wahrscheinlichkeiten unterschiedliche Arten von Mutationen.

Mutationen werden nach ihrem Typ und nach dem Entstehungsmechanismus eingeteilt. Es gibt drei Typen von Mutationen: Insertionen, Deletionen und Substitutionen. Substitutionen werden in Transitionen (Austausch einer Purinbase gegen eine andere Purinbase bzw. Pyrimidinbase gegen eine Pyrimidinbase) und Transversionen (Austausch einer Pyrimidinbase gegen eine Purinbase und umgekehrt) unterteilt.

Bei dem Entstehungsmechanismus wird zwischen direkten und indirekten Mutationen unterschieden. Direkte Mutationen entstehen unmittelbar durch Wirkung des Mutagens, wie zum Beispiel einer Fehlpaarung von O_6 -Methylguanin mit Thymin nach der Behandlung mit einem alkylierenden Mutagen. Im Gegensatz hierzu entstehen indirekte Mutationen durch fehleranfällige zelleigene Reparaturmechanismen wie der SOS-Antwort. Einzelsträngige DNA aktiviert hierbei das RecA-Protein, welches wiederum die Expression anderer SOS-Gene induziert. Die SOS-Antwort repariert beschädigte DNA schnell, aber relativ ungenau und fügt somit Mutationen ein (Michel, 2005).

Zum Einsatz von Mutagenen für die Erzeugung von Toleranzen in Mikroalgen liegen ver-

schiedene Studien vor. Meireles et al. (2003) setzten UV-Mutagenese ein, um die Ausbeute an bestimmten Metaboliten in der Mikroalge *Paolova lutheri* zu erhöhen. Die optimale Dosis wurde jedoch nicht zuvor bestimmt und die Bedingungen sind schwer zu reproduzieren, da die Dosis nur als Belichtungszeit angegeben wurde. Ong et al. (2010) haben ein alkylierendes Mutagen (EMS) eingesetzt, um Mikroalgen mit deutlich erhöhter Teilungsrate bei erhöhten Temperaturen zu erzeugen. Chaturvedi und Fujita (2006) haben ebenfalls mittels EMS temperaturtolerante Stämme erzeugt, obwohl die Experimente eigentlich darauf ausgerichtet waren, die Menge an Eicosapentaensäure in den Zellen zu erhöhen. Beide Studien zeigen, dass die Temperaturtoleranz von phototrophen Mikroorganismen grundsätzlich mittels ungerichteter Mutagenese erhöht werden kann.

Bei Cyanobakterien wurde die ungerichtete Mutagenese vorrangig mit dem Ziel eingesetzt, stark abgeänderte Stämme für physiologische Untersuchungen über den Einsatz von hohen Dosen an Mutagen zu erzeugen (Currier et al., 1977; Floriano et al., 1992; Wolk et al., 1988). Zur Induzierung von Toleranzen sind jedoch Bedingungen von Vorteil, welche die Anzahl an Punktmutationen maximieren ohne ganze Stoffwechselwege zu zerstören. Lambert et al. (1980) haben eine weitreichende Studie über die Auswirkung verschiedener Mutagene auf das einzellige Cyanobakterium *Gloeocapsa alpicola* durchgeführt. Verschieden stark behandelte Zellen wurden jeweils auf normalen Agarplatten ausgestrichen, um die Letalität zu bestimmen und auf Streptomycin-Platten ausgestrichen, um die relative Punktmutationsrate zu bestimmen. Streptomycin verhindert die Teilung von Zellen, indem es die Proteinbiosynthese durch Interaktion mit der kleinen ribosomalen Untereinheit hemmt (Carter et al., 2000). Eine Resistenz gegen Streptomycin kann durch verschiedene Punktmutationen, sowohl in der kleinen wie auch der großen Untereinheit, erlangt werden (Agarwal et al., 2011; Carter et al., 2000; Springer et al., 2001). Wird eine Streptomycin-Resistenz als Marker zur Bestimmung der relativen Punktmutationsrate eingesetzt, ist der genaue Wirkungsmechanismus der Resistenz jedoch nicht entscheidend. Lambert et al. (1980) haben mit der zuvor beschriebenen Methode ultraviolettes Licht (UV) und Methylmethansulfonat (MMS) als die effizientesten Mutagene für das untersuchte Cyanobakterium identifiziert.

Ultraviolettes Licht

UV-Licht induziert die Bildung von Pyrimidindimeren (hauptsächlich Thymindimere) in der DNA. Diese können zur Bildung aller Mutationen (Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen) führen, jedoch vorwiegend Transitionen von Guanin/Cytosin zu Adenosin/Thymin. Deletionen finden hauptsächlich in A/T reichen Regionen statt (Miller, 1985). Weiterhin können Fehler während der Nukleotid-Exzisionsreparatur als (Teil der SOS-Antwort) zu jeder anderen Mutation führen (Foster, 1991; Miller, 1985; Witkin, 1976). Um die Effizienz von Mutagenen zu erhöhen, ist es wichtig, die Zellantwort mit spezifischen Reparaturmechanismen für das eingesetzte Mutagen abzuschalten oder zu minimieren. Zum Schutz vor DNA-Schäden durch UV-Strahlen ist die Photoreaktivierung zuständig. Die hierbei eingesetzten Enzyme (Photolyasen) sind in der Lage, durch UV erzeugte Schäden sehr

effizient wieder zu entfernen. Die Aktivität von Photolyasen wird über blaues und violettes Licht gesteuert ($\lambda < 500\text{nm}$), welches unter natürlichen Lichtverhältnissen der Intensität von UV Licht proportional ist. Die Photoreaktivierung kann somit nach dem Bestrahlen mit UV-Licht durch den Einsatz entsprechender Filter reduziert werden. Wird die Photoreaktivierung nicht unterdrückt, kann durch UV Strahlung nur ein sehr begrenzter mutagener Effekt erreicht werden. (Lambert et al., 1980; Levine und Thiel, 1987; Lucas-Lledó und Lynch, 2009; Witkin, 1976)

Methylmethansulfonat

Methylmethansulfonat wird häufig als Mutagen eingesetzt, da es jede Art von Basenaustausch induziert (Transition und Transversion) (Foster, 1991; Todd und Monti-Bragadin, 1979). MMS alkyliert die DNA indem es seine Methylgruppe auf O⁶-Guanin, O⁴-Thymin, N⁷-Guanin, N³-Adenin, N¹-Adenin, N⁷-Adenin oder N³-Guanin überträgt. Die letzten beiden bilden jeweils O⁶-Methylguanin bzw. O⁴-Methylthymin, welche nicht mehr an ihre komplementäre Base binden und somit GC zu TA oder TA zu GC Transversionen verursachen. Diese Basenaustausche sind direkte Mutationen und nicht abhängig von der SOS-Antwort (Shevell und Friedman, 1990; Swann, 1990; Todd und Monti-Bragadin, 1979). Diese und alle weiteren zuvor erwähnten Alkylierungen sind auch in der Lage, die SOS-Antwort zu induzieren und indirekte Mutationen zu verursachen (Foster, 1991; Shevell und Friedman, 1990).

Auch bei der Mutagenese mittels MMS ist es wichtig, die Aktivität spezifischer Reparaturmechanismen zu minimieren. Alkylierungen an O⁶ oder O⁴ werden durch das Enzym O⁶-Methylguanine-DNA-Methyltransferase (MGMT) gezielt repariert. MGMT nimmt die Methylgruppe auf und bringt somit die DNA zurück in ihre Ausgangsform. Hierbei wird MGMT irreversibel inaktiviert, dient aber in der neuen Konfiguration als Transkriptionsfaktor zur Expression weiterer MGMT Proteine (Dempfle et al., 1985; Lindahl et al., 1988; Shevell und Friedman, 1990). Shevell und Friedman (1990) haben außerdem gezeigt, dass bei Organismen, welche zuvor geringen Dosen von alkylieren Substanzen ausgesetzt waren, zukünftige Behandlungen wegen erhöhter Konzentrationen an MGMT weniger effizient waren. Die Effekte von MGMT können somit minimiert werden, indem kurze Behandlungszeiten gewählt werden und vermieden wird, Behandlungen kurz nacheinander durchzuführen.

2.5 Hochdurchsatz-Screening und Kultivierung

Das Hochdurchsatz-Screening (HTS) wird seit Anfang der 90er Jahre vorrangig in Pharma- und Biotechnologie-Unternehmen eingesetzt. Besonders im Bereich der modernen Wirkstoffsuche stellt es die Basistechnologie für die Grundlagen- und angewandte Forschung dar. Hier werden im sogenannten „Compound Screening“ enorme Chemikalienbibliotheken durchsucht um geeignete Kandidaten als Leitstrukturen für potentielle Medikamente zu identifizieren (Drews, 2000; Fox et al., 1999). Ohne die massive parallele Bearbeitung von Proben, die

durch das Hochdurchsatz-Screening ermöglicht wird, wären die schnellen Fortschritte in diesen Gebieten kaum denkbar.

Hochdurchsatz-Kultivierung und -Screening sind nur mit einer Miniaturisierung der Reaktionsräume und einer Parallelisierung der Prozesse über den Einsatz von Mikrotiterplatten (MTPs) möglich (Fernandes und Cabral, 2006; Mayr und Fuerst, 2008). Hierbei handelt es sich um Kunststoffplatten standardisierter Größe mit mehreren Kavitäten („Wells“), welche als getrennte Reaktionsräume dienen. Mikrotiterplatten haben verschiedene Formate mit unterschiedlicher Anzahl (und Volumina) der Wells. Das mit dem HTS eingeführte 96-Well-Format wird stetig durch neuere Formate für einen höheren Durchsatz ersetzt. Moderne ultra HTS Systeme (uHTS) arbeiten heute bereits mit bis zu 3456 Wells pro Platte, Assay-Volumina im Picoliterbereich und einem Durchsatz von mehr als 100.000 Messungen pro Tag (Wölcke und Ullmann, 2001).

HTS-Systeme sind häufig in Pipettierroboter („Liquid Handling Systems“) integriert. Diese erlauben es, Arbeitsschritte zu automatisieren, welche sonst durch einen speziell ausgebildeten Laboranten durchgeführt werden müssten (Burbaum, 1998; Carroll et al., 2004; Fox et al., 1999; Mayr und Fuerst, 2008). Weitere technische Entwicklungen wie Multipipetten, Plattenlesegeräte, Autosampler, Zentrifugen usw. stehen heutzutage zur Integration in Pipettierrobotern zur Verfügung (Duetz, 2007).

Die Hochdurchsatz-Kultivierung wird ebenfalls in Mikrotiterplatten durchgeführt und wurde bereits zwischen 1980 und 1990 erstmals für Untersuchungen zum Wachstum mikrobieller Kulturen eingesetzt. Besonders Deepwell-Mikrotiterplatten (DWPs) mit Volumina bis zu 5 ml finden in der Kultivierung Anwendung (Kumar et al., 2004).

Fertige Hochdurchsatz-Kultivierungssysteme in Mikrotiterplatten für heterotrophe Zellen (z.B. *E. coli*) sind kommerziell erhältlich und werden routinemäßig im Screeningpipelines integriert (Huber et al., 2010). Solche Systeme werden heute weitgehend in biotechnologischen und pharmazeutischen Unternehmen eingesetzt. Kultivierungsparameter und Methoden wie Begasung, Wachstum, Lagerung und Replikation sind somit gut etabliert (Duetz et al., 2000; Duetz, 2007). Huber et al. (2009, 2011) haben die Möglichkeiten für solche integrierte Systeme gut demonstriert, indem ein kommerzielles Kultivierungssystem (BioLector) in einen Pipettierroboter integriert wurde, um das Wachstum und die Proteinexpression von *E. coli* Kulturen parallel zu analysieren.

Hochdurchsatz-Kultivierungsverfahren für phototrophe Mikroorganismen sind jedoch bis heute kaum etabliert. Doan und Obbard (2012) und Pereira et al. (2011) haben zwar effiziente und simple FACS-basierte Screeningsysteme für Mikroalgen demonstriert, aber diese Systeme sind in ihrer Anwendung deutlich eingeschränkter und weniger flexibel als Hochdurchsatz-Kultivierungen. Solche FACS-Systeme sortieren Zellen mit gewünschten Charakteristika (z.B. hohe Fluoreszenz) aus einem Pool an Kandidaten aus und übertragen sie auf Agar- oder Mikrotiterplatten. Dieser Ansatz ist somit nur dann einsetzbar, wenn eine Selektion durch ein FACS möglich ist, was die möglichen Auswahlparameter stark einschränkt. Für viele wünschenswerte Eigenschaften (z.B. hohe Expression/Aktivität bestimmter Proteine) sind FACS basierte Methoden oft nicht einsetzbar. Weiterhin ist diese Methode darauf limitiert,

einzelne Zellen unter künstlichen Bedingungen im FACS zu untersuchen, obwohl sich Zellen in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen oft sehr unterschiedlich verhalten. Somit ist ein Screening-System sinnvoll, welches die späteren Produktionsbedingungen nachstellen kann. Weiterhin benötigen einige Screening-Ziele eine parallele Überwachung mehrerer Parameter über einen verlängerten Zeitraum (z.B. gutes Wachstum bei konstanter und hoher Sekretion eines Zielmoleküls). Für solche Fragestellung werden unbedingt automatisierte Hochdurchsatz-Kultivierungssysteme benötigt, welche in flexible Analytik- und Screening-Plattformen integriert werden können.

2.6 Next Generation Sequenzierung

Unter dem Ausdruck „Next Generation Sequencing“ (NGS) werden verschiedene moderne Sequenzieretechniken zusammengefasst, welche in den letzten Jahren mittels massiv paralleler Sequenzierung kurzer DNA-Abschnitte die Kosten der Sequenzierung stark gemindert haben. Während das Humangenomprojekt noch geschätzte 3 Milliarden Dollar gekostet hat, wird es bald möglich sein, ein menschliches Genom für 1000 Dollar zu sequenzieren (Illumina, Inc., 2014).

Derzeitig sind verschiedene NGS-Plattformen verschiedener Hersteller erhältlich; die bekanntesten sind hierbei 454 (Roche), Ion Torrent (Life Technologies) und MySeq bzw. HySeq (Illumina). Alle drei Plattformen sind auch als Benchtop-Geräte verfügbar, welche trotz verhältnismäßig geringer Anschaffungskosten genug Durchsatz für die Sequenzierung bakterieller Genome aufweisen. Hier ist anzumerken, dass die Weiterentwicklung der 454 Plattform durch Roche bereits eingestellt wurde und der Support nur noch bis 2016 fortgeführt wird (Nature News, 2013). Dies demonstriert die aktuell rasante Entwicklungsgeschwindigkeit und Schnellebigkeit dieser Technologien gut.

Obwohl alle Plattformen nach einem ähnlichen Prinzip arbeiten, unterscheiden sich die technischen Implementierungen teils deutlich. Stark vereinfacht kann gesagt werden, dass bei 454 und Ion Torrent zuvor erzeugte DNA-Fragmente an Beads gekoppelt, amplifiziert, in einem Well vereinzelt und anschließend zu Einzelsträngen denaturiert werden. Die eigentliche Sequenzierung erfolgt dann über die Synthese des komplementären Stranges. Jedem Fragment werden in einem Well der Reihe nach die vier möglichen Basen angeboten; ist eine Base für die nächste freie Position komplementär, wird sie eingebaut und ein Signal wird detektiert. Die Detektion bei Roches 454 Technologie basiert auf einer sogenannten Pyrosequenzierung. Wenn eine Base eingebaut wird, führt eine enzymatische Kettenreaktion zu einem Lichtblitz, welcher von einem CCD-Chip registriert wird (Loman et al., 2012; Margulies et al., 2005; Metzker, 2009).

Ion Torrent hingegen basiert auf Halbleitertechnologie. Das detektierte Signal ist die minimale pH-Änderung, die der Einbau einer Base durch die Freisetzung eines Wasserstoffatoms mit sich führt. Ionenfeldeffekttransistoren innerhalb jedes Wells messen diese Änderung (Loman et al., 2012; Merriman et al., 2012; Rothberg et al., 2011).

Bei beiden Technologien führt der Einbau von mehr als einer gleichen Base direkt nacheinander zu einem stärkeren Signal. Dieses ist jedoch nicht vollständig proportional zur eingebauten Anzahl an Basen. Darum ist es bei beiden Plattformen problematisch, in homopolymeren Bereichen der DNA-Stränge (z.B. AAAAA) die Anzahl an Basen korrekt zu quantifizieren. Die Hauptfehlerquelle sind somit falsch erkannte Indels (Insertionen / Deletionen) in diesen Bereichen (Glenn, 2011; Loman et al., 2012).

Bei der Illumina Technologie werden die Fragmente an die Oberfläche einer Durchflusszelle gebunden. Diese werden dann mittels Brückensynthese isothermal amplifiziert und die erzeugten Cluster dann fluoreszent markiert. Den Clustern werden nun alle vier (markierten) Basen gleichzeitig angeboten; mittels eines Lasers wird detektiert, welche eingebaut wurde (Bentley et al., 2008; Loman et al., 2012; Metzker, 2009). Im Gegensatz zu Ion Torrent und 454 wird immer nur eine Base gleichzeitig eingebaut. Somit ist die Lesegenauigkeit in Homopolymerbereichen nicht deutlich eingeschränkt, was dazu führt, dass die durchschnittliche Fehlerrate geringer ist als bei den beiden Konkurrenten (Glenn, 2011; Loman et al., 2012). Die Hauptfehlerquelle bei Illumina sind jedoch Substitutionen (anstatt Indels). Somit haben Ion Torrent und 454 bei gleicher Abdeckung eine höhere Genauigkeit, wenn Substitutionen detektiert werden sollen (Jünemann et al., 2013; Suzuki et al., 2011). Man sollte jedoch beachten, dass obwohl die Rate an korrekt erkannten Punktmutationen mit Ion Torrent höher ist als mit Illuminas MySeq, die Rate an falsch-positiven Detektionen ebenfalls höher ist (Quail et al., 2012).

Sowohl die Ion Torrent als auch die MySeq Plattformen werden im allgemein für die Nach-Sequenzierung von bakteriellen Stämmen empfohlen (Loman et al., 2012).

3 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Strategie zur Anpassung von Cyanobakterien an biotechnologische und industrielle Erfordernisse mittels adaptiver Evolution zu entwickeln. Als Beispielanwendung wurde die Erhöhung der Temperaturtoleranz in *Synechocystis* gewählt. *Synechocystis* wurde verwendet, da es ein weit verbreitetes, sequenziertes und gut annotiertes Modell für Cyanobakterien und phototrophe Organismen im Allgemeinen ist.

Die Temperaturtoleranz ist von hohem industriellem Interesse, da diese in bestimmten Produktionsgebieten (z.B. in Wüstenregionen) entscheidende Vorteile bietet. Zudem sind zugrunde liegende Mechanismen zur Erhöhung der Temperaturtoleranz in *Synechocystis* kaum aufgeklärt, was die Anwendung gerichteter Methoden stark einschränkt. Bisherige Versuche über Expressionsänderungen bei Genen der Hitzeschockantwort eine Steigerung der Temperaturtoleranz zu induzieren, haben nicht die gewünschten Erfolge gezeigt. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit ungerichtete Mutagenese und adaptive Evolution zum Einsatz kommen.

Um eine adaptive Evolution durchführen zu können, wurden zunächst Mutagene ausgewählt und deren jeweils optimale Dosis bestimmt. Zur Charakterisierung der einzelnen erzeugten Stämme wurde ein Screening im höheren Durchsatz benötigt. Hierfür wurde ein Hochdurchsatz Kultivierungs- und Screening-System für phototrophe Mikroorganismen neu entwickelt und technisch implementiert. Dieses sollte flexibel genug gestaltet werden, um auch bei alternativen Anwendungen und Fragestellungen (z.B. Wirkstoffsuche, systembiologische Validierungen, usw.) einsetzbar zu sein.

Nach der Identifizierung der besten Stämme sollten deren erhöhte Temperaturtoleranzen im größeren Maßstab validiert werden. Um für die Temperaturtoleranz relevante Mutationen und Genen zu bestimmen, sollten diese Stämme anschließend sequenziert werden.

Die Entwicklung einer Screeningplattform für phototrophe Mikroorganismen und die Identifizierung von Temperaturtoleranz assoziierten Genen stellten die Hauptziele dieser Arbeit dar.

In Abb. 3.1 ist ein schematisches Flussdiagramm der gesamten Vorgehensweise und der in der Arbeit erzeugten Ergebnisse dargestellt.

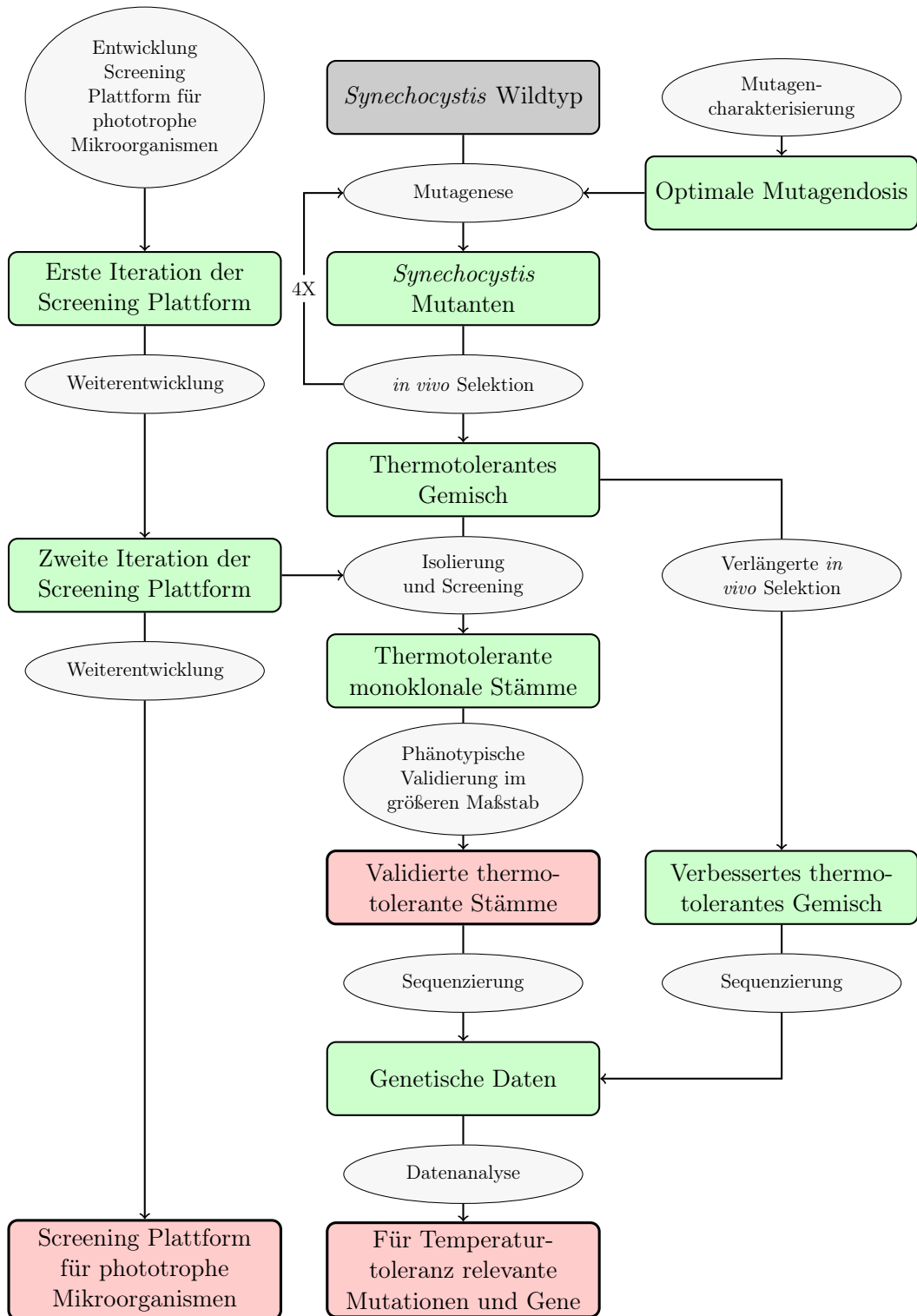


Abbildung 3.1: Flussdiagramm des Ablaufs der Arbeit: Methoden sind in Ellipsen (grau), konkrete Ergebnisse in grünen Rechtecken und Endergebnisse in roten Rechtecken dargestellt

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Stämme

- **WT:** An Salz-Medium angepasster *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyp; von der Cyano Biofuels GmbH (bzw. Algenol Biofuels) zur Verfügung gestellt.
- **MutIV-1:** Thermotolerantes Mutanten-Gemisch von *Synechocystis* sp. PCC 6803; durch Mutagenese und Selektion erzeugt.
- **MutIV-2:** Thermotolerantes Mutanten-Gemisch von *Synechocystis* sp. PCC 6803; durch verlängerte Selektion von MutIV-1 erzeugt.
- **C5K; A1; A6; H2 & H12:** Monoklonale thermotolerante Stämme von *Synechocystis* sp. PCC 6803; aus MutIV-1 isoliert.

4.1.2 Chemikalien, Medien und Primer

Chemikalien: Wenn nicht anders angegeben, hatten alle eingesetzten Chemikalien p.A. Qualität und wurden von Roth, Merck oder Sigma bezogen.

Medien: Alle Stämme wurden in sterilem marinem BG11 Medium (abgeändert nach Ripplka et al. (1979)) kultiviert: 30 - 63g/l Instant Ocean®, 17,65mM NaNO₃, 0,18mM K₂HPO₄, 0,03mM Citronensäure, 0,003mM EDTA, 0,19mM Na₂CO₃, 0,03mM Ammoniumeisen(III)-citrat und Spurenelemente (2,86 mg/l H₃BO₃; 1,81 mg/l MnCl₂·4H₂O; 0,22 mg/l ZnSO₄·7H₂O; 0,390 mg/l Na₂MoO₄·2H₂O; 0,08 mg/l CuSO₄·5H₂O; 0,05 mg/l Co(NO₃)₂·6H₂O).

Primer: Alle Primer wurden von Thermo Fisher Scientific synthetisiert und waren RP-HPLC aufgereinigt. Die Sequenzen finden sich im Anhang.

4.1.3 Geräte

Die Screeningsysteme und dessen Komponenten sind getrennt unter 4.1.4 aufgeführt. Alle weiteren Geräte, welche nicht zur Standardausstattung eines molekularbiologischen Labors gehören, sind folgend aufgelistet:

1l-Photobioreaktoren	Algenol Deutschland, DE
mit C-MAG-HS-7 Magnetheizrührer	IKA, US
und ETS-D5 Messfühler & Steuereinheit	IKA, US
AXIMA Confidence MALDI-TOF-MS	Shimadzu, JP
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, DE
BZ 9000 Inversmikroskop	Keyence, JP
GS Junior 454 Sequenzer	Roche, CH
IonTorrent PGM	Life Technologies, US
Minitron Inkubationsschüttler	Infors, CH
mit 15W GRO-LUX T8-Lampen	Sylvania, US
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	Peq-Lab, DE
Qpix Koloniepicker	Genetics, UK
TC 255S Thermostatschrank	Aqualytic, DE
UV-1800 Photometer	Shimadzu, JP
UVC 500 Crosslinker	Hoefer, US
mit 8W UV-Lampe G8T5	Sankyo-Denki,JP

4.1.4 Screeningsysteme

Erste Iteration des Screeningsystems: Die erste Iteration des Screeningsystems wurde auf Basis eines Pipettierroboters mit folgender Ausstattung erstellt:

Tecan Genesis RSP 150	Tecan, CH
RoMa (Robotic Manipulator Arm)	Tecan, CH
LiHa (Liquid Handling Arm)	Tecan, CH
mit 1ml Dilutoren	Tecan, CH
Genios Plus Plattenlesegerät	Tecan, CH
Carrier für Abwurfspitzen	Tecan, CH
Carrier für MTPs	Tecan, CH
Carrier für 1.5ml Reaktionsgefäße.	Tecan, CH
Temperierte MTP Carrier*	Tecan, CH
Temperierte* Carrier für 1.5ml Gefäße	Tecan, CH
Temperierte* Carrier für 100ml Trüge	Tecan, CH
* mittels Thermostat DC30-K20	Haake, US

In dem Roboter wurde eine eigens entwickelte Kultivierungskammer (Abb. 4.1(a) auf Seite 24) mit folgenden Bestandteilen integriert:

Kammerwände aus Polycarbonat	TH Wildau, DE
Variomag Teleshake Mikrotiterplattenschüttler	Thermo Scientific,US
SCENTY GDZ 401 Gassteuereinheit	HTK Hamburg, DE
CO ₂ Sensor	HTK Hamburg, DE
CO ₂ Druckminderer	Druva, DE
Magnetventil 21A2KV25	Stasto, AT
Lampen (24W FHO Plant Grow)	Aquamedic, DE
Lampen Dimmer	Ehmann, DE

Zweite Iteration des Screeningsystems: Der Aufbau der zweiten Iteration des Systems entspricht größtenteils dem des Ersten. Neu hinzugekommen ist eine Temperierung in der Kultivierungskammer. Weiterhin wird die Gaszufuhr nun vor dem Einlass in die Kammer über einen Gasdiffusor durch eine Wassersäule geblubbert und anschließend steril filtriert (0,22µm PVDF-Filter; Carl Roth).

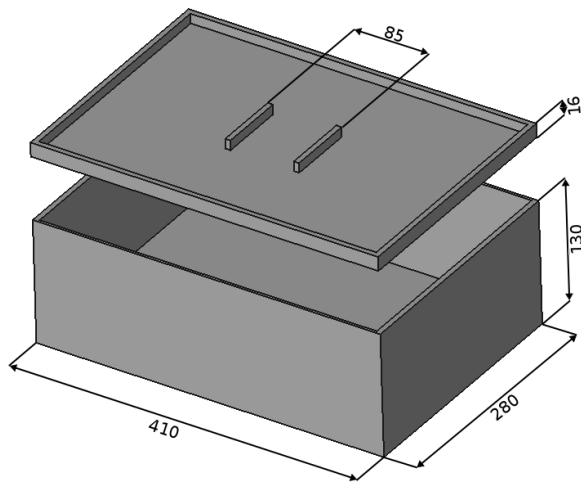
Die Temperierung besteht aus folgenden Komponenten:

Heizung:	
Heizfolie (Sonderanfertigung)	Freek, DE
Integrierter PT1000 Sensor	Freek, DE
Externer PT100 Sensor	Freek, DE
Gefräste Aluminium-Plattenhalterungen	TH Wildau
Imago 500 Steuerung	Jumo, DE
Kühlung:	
Double Power 80mm Kühlkörper	Magicool, CN
2X F8 - 80mm Ventilatoren	Artic, CH
Plattengitter (Eigenbau)	TH Wildau
180mm Kühlkörper	Magicool, CN
BFF-SPro 200mm Ventilatoren	BitFenix, CN
DDC-1T Pumpe	Laing, US
Silikon-Schläuche	Carl Roth, DE

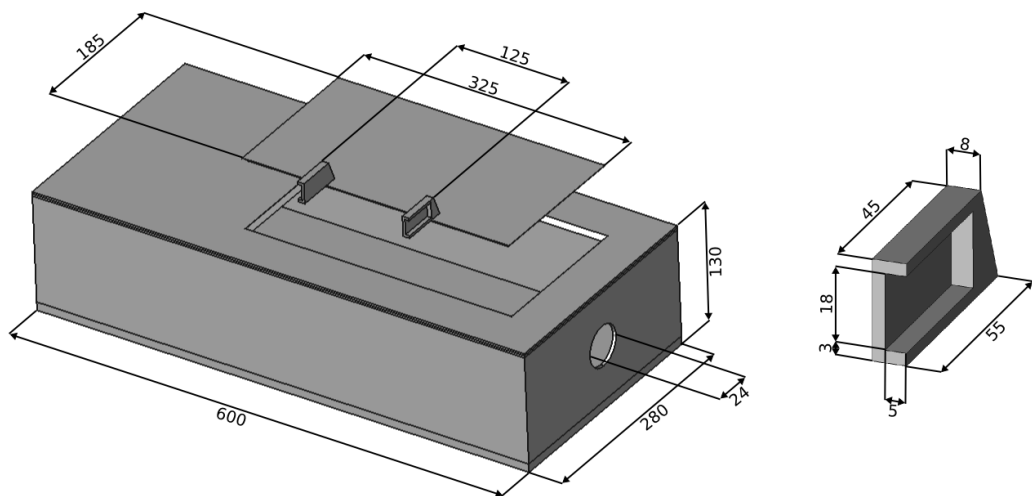
Dritte Iteration des Screeningsystems: Für die dritte Iteration des Screeningsystems wurde dieses auf einen moderneren und größeren Pipettierroboter mit folgender Ausstattung übertragen:

Tecan Freedom Evo 200	Tecan, CH
RoMa (Robotic Manipulator Arm)	Tecan, CH
LiHa (Liquid Handling Arm)	Tecan, CH
mit 1ml Dilutoren	Tecan, CH
Infinite M200 Pro Plattenlesegerät	Tecan, CH
Carrier für Abwurfspitzen	Tecan, CH
Carrier für MTPs	Tecan, CH
Carrier für 1.5ml Reaktionsgefäße.	Tecan, CH
Temperierte* MTP Carrier	Tecan, CH
Temperierte* Carrier für 1.5ml Gefäße	Tecan, CH
Temperierte* Carrier für 100ml Trüge	Tecan, CH
* mittels Thermostat DC30-K20	Haake, US
Te-Shake temperierter MTP Shaker	Tecan, CH
Rotana 460 RSC Zentrifuge	Hettich, CH
Hydroflex Washstation	Tecan, CH
Roboter Abdeckhaube (Spezialanfertigung)	Fränzel, DE

Die Kultivierungskammer wurde ebenfalls überarbeitet (Abb. 4.1(b) auf Seite 24), beinhaltet jedoch weiterhin die gleichen Komponenten wie die zweite Iteration. Die Kammer wurde im Auftrag von der Firma Fränzel GmbH hergestellt.



(a) Erste Kultivierungskammer und Deckel mit Greifleisten für RoMa (1. und 2. Iteration des Screeningsystems)



(b) Zweite Kultivierungskammer (3. Iteration des Screeningsystems): Kammer mit Bohrung für CO₂-Messeinheit und Inlay-Deckel (links); Detailansicht des Greifers (rechts)

Abbildung 4.1: CAD Maßzeichnung beider Varianten der Kultivierungskammer. Alle Maße sind in mm angegeben.

4.1.5 Software

Tecan *Gemini*: Die Steuerung des Pipettierroboters Tecan Genesis RSP 150 (erste und zweite Iteration des Screeningsystems) erfolgte über die Software *Gemini* Version 4.2.17.304.
<http://www.tecan.com/gemini>

Tecan *Magellan*: Der in den Tecan Genesis RSP 150 integrierte Plattenreader Tecan Genios Plus (erste und zweite Iteration des Screeningsystems) wurde über die Software *Magellan* Version 03/5.0.3.5 angesteuert.
<http://www.tecan.com/magellan>

***JUMO Imago 500*:** Die Programmierung des Temperatur-Reglers und die Konfiguration der Temperatursensoren erfolgte über die Steuer- und Regelungssoftware *JUMO Imago 500*. Gleichzeitig wurden mittels dieser Software die Kennlinien der Temperatursensoren aufgezeichnet.

Tecan *Freedom EVOware*: Die Steuerung des Pipettierroboters Tecan Freedom Evo 200 (dritte Iteration des Screeningsystems) erfolgte über die Software Tecan Freedom EVOware Version 2.5 SP3.
<http://www.tecan.com/evoware>

Tecan *iControl*: Der in den Tecan Freedom Evo 200 integrierte Plattenreader Tecan Infinite M200 Pro (dritte Iteration des Screeningsystems) wurde über die Software *iControl* Version 3.4.2 angesteuert.
<http://www.tecan.com/icontrol>

***ImageJ*:** *ImageJ* ist eine freie Software zur Bildbearbeitung und Bildverarbeitung. Sie findet breite Anwendung in der Wissenschaft und die Funktionalität des Programms kann durch hunderte von Plugins erweitert werden. (Rasband, 1997-2014)

***ImageJ-Plugin CountCyanoPlates.jar*:** Ein *ImageJ*-Plugin zur automatischen Zählung von *Synechocystis*-Kolonien auf Agar. Eine genaue Beschreibung ist in "The Optimal Mutagen Dosage to Induce Point-Mutations in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and Its Application to Promote Temperature Tolerance" Tillich et al. (2012b) zu finden. Der Quellcode ist im Anhang und unter folgender Url verfügbar:
<https://github.com/KatjaSchulze/CyanoColonyCounter>

***PerlPrimer*:** *PerlPrimer* ist eine freie Software für das Primerdesign. *PerlPrimer* wurde für das Design aller während dieser Arbeit eingesetzten Primer genutzt.
<http://perlprimer.sourceforge.net/>

gsMapper: Mapping Software Tool von Roche zur Verarbeitung von NGS (speziell 454) Daten. <http://www.454.com/products/analysis-software/>

snpEff: *SnpEff* ist ein Programm zur automatischen Identifizierung der direkten Auswirkungen von SNPs (Cingolani et al., 2012).

Tablet Genome Viewer: *Tablet* ist ein Programm zur grafischen Darstellung von NGS-Ergebnissen (Milne et al., 2010).

FinchTV: *FinchTV* ist ein Programm zur grafischen Darstellung von Sanger- Sequenzierungs-Ergebnissen.

<http://www.geospiza.com>

Bash Skript, *Extract_454HCDiffs.sh*: Ein selbst geschriebenes Bash-Skript, welches relevante Zeilen aus dem Output von *gsMapper* entnimmt und die Chromosomen und Plasmide für die Weiterverarbeitung umbenennt. Der Quellcode ist im Anhang und unter https://github.com/utillich/NGS_Scripts verfügbar.

Perl Skript, *454HC_to_vcf.pl*: Ein selbst geschriebenes Perl-Skript, welches den Output von *Extract_454HCDiffs.sh* in eine VCF Datei umwandelt, damit es als Input für *snpEff* eingesetzt werden kann. Der Quellcode ist im Anhang und unter https://github.com/utillich/NGS_Scripts verfügbar.

Perl Skript, *vcf_subtract.pl*: Ein selbst geschriebenes Perl-Skript, welches den Output einer VCF Datei von einer anderen subtrahiert. Der Quellcode ist im Anhang und unter https://github.com/utillich/NGS_Scripts verfügbar.

Perl Skript, *vcf_Syn6803_identify.pl*: Ein selbst geschriebenes Perl-Skript, welches den Output von *snpEFF* einliest und weitere Informationen (Gen-Funktion, Kategorie, Cyanobaseeintrag) hinzufügt. Zusätzliche Daten werden aus dem Flatfile aus <http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/Synechocystis/genes/category.txt> entnommen. Der Quellcode ist im Anhang und unter https://github.com/utillich/NGS_Scripts verfügbar.

Cyanobase: Die Einträge von *Synechocystis* Genen in *Cyanobase* wurden genutzt, um Annotierungen und relevante Literatur zu identifizieren.

<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/Synechocystis>

blastp: *blastp* steht für "Basic Local Alignment Search Tool for Protein-Protein searches". Es wurde eingesetzt, um bei hypothetischen Genen ein Alignment gegen alle NCBI Einträge zu erhalten.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Proteins>

NCBI Conserved Domain Database (CDD) und Pfam Database Diese Datenbanken wurden genutzt, um die Auswirkungen identifizierter Mutationen besser abschätzen zu können. Es wurde geprüft, ob Mutationen innerhalb bekannter Proteindomänen auftreten.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>
<http://pfam.sanger.ac.uk>

R: *R* ist eine freie Programmiersprache für statistisches Rechnen und statistische Grafiken. *R* wurde zur Auswertung und Darstellung aller Graphen eingesetzt.
<http://www.r-project.org/>

Libreoffice Calc: Das freie Tabellenkalkulationsprogramm *Calc* wurde für die erste Visualisierung der Daten und für simple Kalkulationen oder Tabellensortierungen eingesetzt.
<http://www.libreoffice.org/calc>

L^AT_EX: L^AT_EX ist eine freie Software für die Benutzung des Textsatzsystems T_EX. Dieses Dokument wurde mit Texlive (v.2013) erstellt.
<https://www.tug.org/texlive/>

4.2 Methoden

In diesem Abschnitt sind sämtliche Methoden der Arbeit erläutert. Diese sind unterteilt in allgemeine Methoden (4.2.1), Kultivierungsbedingungen (4.2.2), automatisierte Methoden (4.2.3) und Kalkulationen (4.2.4).

4.2.1 Allgemeine Methoden

Folgend sind alle molekularbiologischen, bioinformatischen und mikrobiologischen Methoden erläutert, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und nicht in den Screeningsystemen automatisiert wurden.

Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte bei 750 nm (OD_{750}) wird häufig bei Cyanobakterien und Mikroalgen zur Bestimmung der Zelldichte verwendet. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die Zellen das Licht nur minimal, demnach ist die gemessene Lichtabnahme durch die Streuung der Zellen in der Suspension (gegen Nährmedium als Blindwert) der Zellzahl proportional.

Die OD_{750} wurde in einem Shimadzu UV-1800 Photometer gemessen. Falls nötig wurden die Kulturproben verdünnt, um Werte unter $OD=0,8$ zu erhalten. Die Messwerte wurden anschließend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

Kontrolle auf Kontaminanten

Zur Identifizierung von möglichen Kontaminationen in den Kulturen mit heterotrophen Bakterien wurden diese regelmäßig mikroskopisch überprüft (Keyence BZ-9000; 400-600X; Phasenkontrast).

UV Mutagenese

Eine *Synechocystis*-Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase mit $5 * 10^7$ Zellen/ml wurde auf eine Petrischale gebracht (entweder 1ml in einer 40mm \varnothing Schale, oder 35ml in einer 230mm x 230mm Schale) und homogen verteilt. Die Schalen wurden in einem UVC 500 Crosslinker (Hofer) und mit $10-300 J/m^2$ UV-Licht der Wellenlänge ~ 254 nm bestrahlt. Um die Behandlung genauer dosieren zu können, wurde nur eine UV-Röhre (Sankyo Denki G8T5; 8W) eingesetzt. Die Belichtungszeit wurde über einen im Crosslinker integrierten Sensor bestimmt.

Nach der Behandlung wurden die Zellen entweder zur Charakterisierung des Mutagens oder zur Temperatureselektion eingesetzt. Hierbei wurde große Sorgfalt geübt, diese keinem Licht <520 nm auszusetzen (mittels Asmetec SFG10 Filterfolie), um die Photoreaktivierung zu unterbinden.

MMS Mutagenese

Eine *Synechocystis*-Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase mit $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml wurde für eine Minute mit 0,001 - 5 v% MMS (99% Reinheit, Sigma) inkubiert. Die Inkubation wurde entweder in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß oder einem 500 ml Zentrifugenbecher durchgeführt. Unmittelbar nach der Inkubation wurden die Zellen eine Minute bei 3.500g zentrifugiert, sofort der Überstand entfernt und in mBG11 resuspendiert. Nach einem wiederholten Waschschrift wurde die Zellsuspension verdünnt und anschließend, entweder zur Charakterisierung des Mutagens oder zur Temperaturselektion, weitergeführt.

Bestimmung der Letalität der Mutagene

Zur Bestimmung der Letalität der Mutagene wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen direkt nach der mutagenen Behandlung auf BG11-Agarplatten ausgestrichen. Diese wurden bei einem Photonenfluss von $2,2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ mit Wellenlängen >520 nm (unter der SFG10 Filterfolie) ca. zwei Wochen kultiviert, bevor sie ausgezählt wurden.

Für MMS Dosen von 1% und höher wurden zusätzlich $5 \cdot 10^5$ Zellen plattiert, um die Sensitivität zur Bestimmung der Überlebensrate zu erhöhen.

Bestimmung der relativen Punktmutationsrate der Mutagene

Zur Bestimmung der relativen Punktmutationsrate der Mutagene wurden die Zellen unmittelbar nach der Kultivierung 1:100 verdünnt und in 100 ml mBG11 für drei Wochen kultiviert (Bedingungen separat unter 4.2.2 beschrieben). Anschließend wurden je Dosis $5 \cdot 10^5$ Zellen auf Selektionsplatten (BG11, $2\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin) ausgestrichen und ca. zwei Wochen bei einem Photonenfluss von $5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (ohne SFG10 Filterfolie) kultiviert. Daraufhin wurden die Platten ausgezählt, um Zellen zu identifizieren, welche eine ribosomale Punktmutation enthalten und hierdurch auf den Selektionsplatten wachsen können.

Zellzählung

Die koloniebildenden Einheiten (KBEs) auf Agarplatten wurden entweder manuell mit einem Stereomikroskop (SteREO Discovery V12; Zeiss) oder mit einer automatisierten Methode auf Basis der Phycocyanin-Fluoreszenz im Keyence BZ9000 Mikroskop ermittelt.

Für die automatisierte Methode wurden spezielle Filter (Anregung: 600/37 nm; Beamsplitter: 625 nm; Emission: 655/40 nm) eingesetzt. Mit Hilfe des „automated scanning module“ der Keyence Software wurden Bilder auf einer Fläche von 25 cm^2 aufgenommen. Die KBEs wurden anschließend mit dem ImageJ Plugin „CountCyanoPlates_.jar“ (siehe Software) ausgezählt.

4.2.1.1 Viabilitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Viabilität von *Synechocystis*-Kulturen im flüssigen Medium wurde die mikroskopische Analyse nach Schulze et al. (2011) eingesetzt.

DNA Extraktion

Die Isolierung der DNA erfolgte mit einem neu etablierten Zwei-Schritt-Verfahren zur Reduzierung von Fremd-DNA auf Basis des Protokolls von Franche und Damerval (1988).

Vorab wurden die Proben drei mal bei geringer Geschwindigkeit (500g) je 10 Minuten zentrifugiert, um potentielle Kontaminanten abzureichern. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und durch steriles Medium ersetzt.

Anschließend wurde ein Milliliter der Probe bei 13.000g für 10min zentrifugiert, das entstandene Pellet wurde zweimal in TE Puffer (10mM TRIS, 1mM EDTA, pH 8) gewaschen und dann für einen osmotischen Schock in 500 μ l TES Puffer (50mM Tris, 100mM EDTA, 25% Saccharose, pH 8) 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 500 μ g Lysozym hinzugegeben und weitere 240min bei 37°C inkubiert um die möglicherweise vorhandene heterotrophe Kontaminanten zu lysieren. Die Probe wurde erneut bei 13000g für 10 min zentrifugiert und das Pellet einmal mit Tris-Puffer gewaschen und anschließend in Tris mit zwei Units DNase I weitere 30min bei 37°C inkubiert. Hierbei wurde die DNA der Kontaminaten verdaut. Anschließend wurde die Probe erneut zentrifugiert und in TE-Puffer resuspendiert.

Hierauf folgte eine zweite, deutlich stringenter Lyse, um die DNA von *Synechocystis* zu extrahieren. Die Schritte zuvor bis einschließlich der Lysozym Zugabe wurden wiederholt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden 30% SDS und 8.4 μ l ProteaseK (600 mAU/ml) hinzu gegeben und über Nacht (12-16h) inkubiert.

Anschließend wurde durch Zugabe eines äquivalenten Volumens einer 1:1 Chloroform/Phenol-Lösung die DNA gewonnen. Die obere wässrige Phase wurde mit Hilfe von PhaseLockGel-Tubes nach einer 10 minütigen Zentrifugation (13.000g, 4°C) abgezogen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Verbliebene Phenolreste in der wässrigen Phase wurden durch einen Waschschrift mit einer Chloroform-/ Isoamylalkohol- Lösung (24:1) im Verhältnis 1:1 und einer erneuten Zentrifugation mit gleichen Parametern entfernt. Die DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert (Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur; Zentrifugation wie zuvor). Das erhaltene Pellet wurde zweimal mit 700 μ l 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Für den enzymatischen Verdau der RNA wurde das Pellet in 30 μ l H₂O gelöst, 1 μ l RNase (10.000 U/ml) hinzugegeben und für 30min bei 37°C inkubiert. Bis zu weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der DNA bei -20°C.

Next-Generation-Sequencing

Als Referenz wurde der Ausgangs-Wildtyp (ohne Selektionsdruck oder Mutagenese) mit dem Roche 454 Junior sequenziert. Es wurden zwei Sequenzierläufe nach dem Herstellerprotokoll

durchgeführt (Rapid Library Preparation Method Manual rev. March 2011; emPCR Amplification Method Manual – Lib-L re. April 2011; Sequencing Method Manual rev. Juni 2010). Die DNA Fragmentierung erfolgte über eine Stickstoff-Nebulisation, die Qualitätsprüfung der Bibliothek mittels Kapillargelelektrophorese (Agilent Bioanalyzer; DNA High Sensitivity Kit) und die Quantifizierung über das TBS 380 Fluorometer.

Zur Identifizierung der Mutationen zur Induzierung der Thermotoleranz, wurden die fünf aus dem Screening selektierten monoklonalen Stämme, die Wildtyp-Kontrolle (nach dem Screening) und das Gemisch MutIV-2 mittels Ionen Halbleitersequenzierung (Ion Torrent), sequenziert. Die Erstellung der Library und die Templatepräparation erfolgten unter Verwendung des „Ion Plus Fragment Kit“ nach den Herstellerprotokollen (User Guide Ion Xpress Plus gDNA Fragment Library Preparation - Rev. E; Quick Reference Ion OneTouch System - Rev. B). Die Fragmentierung der DNA erfolgte hier über den Bioruptor, die Qualitätskontrolle neben Kapillargelelektrophorese auch mit dem Qubit 2.0 Fluorometer und die Quantifizierung über einen Roche LightCycler 480 mit den „Ion Library Quantitation Kit“. Für die fünf monoklonalen Stämme und den wt wurden je ein 314 Chip und für MutIV-2 ein 316 Chip mit mehr Durchsatz eingesetzt. Die Sequenzierung (Quick Reference Ion PGM 200/300 Sequencing Kit - Rev. C und G) erfolgte unter Nutzung des „Ion PGM 200 Sequencing Kit“ bzw. „Ion PGM 300 Sequencing Kit“.

Auswertung der NGS Daten

Daten der NGS-Läufe (im SFF Format) wurden mit *gsMapper* gegen das bekannte *Synechocystis* Genom¹ gemappt. So entstandene Ergebnisse wurden mit *snpEff* (Cingolani et al., 2012), sowie verschiedenen selbst geschriebenen Programm-Skripten (bash oder Perl) weiter verarbeitet. Alle Skripte befinden sich im Anhang sowie unter https://github.com/uttillich/NGS_Scripts.

Zuerst wurden aus der Output-Datei „454HCDiffs.txt“ mit *Extract_454HCDiffs.sh* alle relevanten Zeilen entnommen und die Chromosom- und Plasmid-Namen angepasst. Die so erzeugte Datei wurde anschließend mit dem Skript *454HC_to_vcf.pl* in eine VCF-Datei umgewandelt, welche von *snpEff* als Input akzeptiert wird. Für alle thermotoleranten Stämme wurde mit dem Skript *vcf_subtract.pl* die VCF-Datei mit der des Ausgangs-Wildtypen verglichen und alle bereits bekannten Mutationen entfernt. *SnpEff* konnte anschließend eingesetzt werden, um die Mutationen mit dem in der Datenbank von *snpEff* hinterlegtem Genom² zu vergleichen. So konnten die Auswirkungen der Mutationen automatisch identifiziert werden. Das Perl-Skript *vcf_Syn6803_identify.pl* konnte daraufhin genutzt werden, um den Output von *snpEff* zu erweitern. Es wurden die Funktion, Gruppe, Untergruppe sowie ein Link zum Cyanobase-Eintrag hinzugefügt. Der Output von *vcf_Syn6803_identify.pl* kann in einem Tabellenkalkulationsprogramm geöffnet werden. Abschließend konnten die so

¹GenBank: NC_000911.1; NC_005229.1; NC_005232.1; NC_005230.1; NC_005231.1; CP003272.1; CP003270.1; L25424.1

²snpEff: *Synechocystis_PCC_6803_uid57659*

identifizierten Mutationen mit dem *Tablet Genome Viewer* (Milne et al., 2010) manuell in den gemappten Daten (BAM-Dateien) überprüft werden.

Validierung der NGS Ergebnisse

Zur Validierung aller mittels NGS identifizierten Mutationen, wurden diese erneut mit Sanger sequenziert. Hiervon ausgeschlossen sind solche Mutationen, bei denen es sich um offensichtliche Falsch-Positive handelt, zum Beispiel Deletionen in Homopolymer-Bereichen. Hier wurden lediglich die vier Mutationen mit den meisten Reads mit Sanger überprüft.

Die Regionen wurden zuerst mit PCR spezifisch amplifiziert (30s Denaturierung bei 95°C; 30s Annealing bei 56°C; 30s Extension bei 72°C; 30 Zyklen), aufgereinigt (PCRapace Kit; Stratec GmbH) und anschließend als externer Auftrag von der Starseq GmbH sequenziert. Zur Visualisierung und manuellen Überprüfung der Ergebnisse wurde *finchtv* eingesetzt. Um besser über die Effekte und Mechanismen der identifizierten Mutationen spekulieren zu können, wurde mit der „NCBI Conserved Domain Database“ überprüft, ob die Änderungen in den Aminosäuresequenzen bekannte Domänen betreffen.

Primer Design

Alle Primer wurden mit der freien Software *PerlPrimer* designt. Der Forward-Primer wurde 100-150 bp vor und der Reverse-Primer 350-400 bp hinter die (erste abgedeckte) Mutationsstelle gelegt. Hierbei wurde eine Schmelztemperatur von 58-62°C mit maximal 2°C Unterschied zwischen den Primern eines Paares gewählt. Die so erstellten Primersequenzen wurden über *blast* mit allen NCBI-Einträgen verglichen, um die Spezifität zu validieren.

4.2.2 Kultivierungsbedingungen

Folgend sind die Kultivierungsbedingungen für die verschiedenen Experimente beschrieben.

Zellvereinzlung

Zur Vereinzlung wurden 500 Zellen auf 1%-BG11-Agar Platten ausgestrichen. Nach ca. zwei Wochen auf Raumtemperatur wurden einzelne Kolonien entweder automatisch mit einem Genetix QPix Pickingroboter (Einstellungen: „inverted threshold mask“ und „center frame“=60-95) oder per Hand mit einer sterilen Impföse in 1,5 ml mBG11 in 96-DWPs überimpft.

Temperaturtolerante Stämme wurden bei 40°C inkubiert, um den Selektionsdruck zu erhalten.

Beispielkultivierung in der ersten Iteration des Screeningsystems

Nach einer Überimpfung der vereinzten *Synechocystis*-Kulturen erfolgte eine Kultivierung in mBG11 (42 g/l Instant Ocean). Die Kulturen wurden über ein Schüttelprotokoll von je fünf

Bewegungen Nord-Süd und fünf Bewegungen Ost-West bei 800 rpm, sowie täglichen Auf- und Abpipettieren in Suspension gehalten. Die Atmosphäre in der Kammer war konstant auf 2% CO₂ eingestellt. Die Belichtung wurde der Dichte der Kultur angepasst. Sie betrug zu Anfang der Kultivierung einen Photonenfluss von $3 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, ab dem siebten Tag 27 und ab dem 13. Tag $55 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Im Verlauf der Kultivierung wurden die Kulturen zweimal 1:2 verdünnt, indem 900 μl jedes Wells in eine neue Platte mit 900 μl vorgelegtem Medium übertragen wurden.

Als Kontrolle für Kreuzkontamination zwischen benachbarten Wells wurden zehn zufällig verteilte Wells lediglich mit Nährmedium befüllt, aber nicht mit gepickten Kolonien inokuliert.

Beispielkultivierung in der dritten Iteration des Screeningsystems

Synechocystis wurde in 96-Well DWPs in der neuen Kultivierungskammer (siehe Abb. 4.1(b)) kultiviert. Auch hier dienten zehn Wells als Kreuzkontaminations-Kontrollen und wurden nicht inokuliert. Jedes Well enthielt zwei Glasbeads (1 mm \varnothing) und die Kulturen wurden bei 750rpm orbital geschüttelt, um Sedimentierung und Zellaggregation zu vermeiden. Die Atmosphäre wurde auf 2% CO₂ und die Temperatur auf konstante 28°C eingestellt. Volumenverluste über Evaporation wurden täglich mit sterilem Deionat aufgefüllt (150-250 μl).

Für die fed-batch Kultivierung wurde die Belichtung an die Kulturdichte angepasst ($3 \mu\text{mol}$ Photonen $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ für die ersten zwei Kultivierungstage; bis maximal $72 \mu\text{mol}$ Photonen $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Für die semi-kontinuierliche Kultivierung wurden nach einer Akklimatisierungsphase von fünf Tagen, die Kulturen jeweils drei Tage bei vier verschiedenen Lichtintensitäten kultiviert (15, 32, 50 und $72 \mu\text{mol}$ Photonen $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Die Kulturen wurden täglich automatisiert zurück auf die Soll-OD von 0,4 verdünnt. Für stärkere Verdünnungen bei höheren Belichtungen wurde die Soll-OD auf 0,39 (Tage 5-9) bzw. 0,35 (Tage 13-19) eingestellt, um eine Verdünnung näher an die Ziel-OD zu ermöglichen.

Kultivierungen für die Bestimmung der Mutagenendosis

Für die Experimente zur Bestimmung der optimalen Mutagenendosis wurden die Kulturen nach der Mutagenese in 100 ml mBG11 in T75 (75cm^2) Zellkulturflaschen bei 30°C in einem Schüttelinkubator (Infors Minitron) gehalten. Die Kulturen wurden mit einem Photonenfluss von $14 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ mit Wellenlängen $>520\text{nm}$ (mittels Asmetec SFG10 Filterfolie) bestrahlt.

Adaptive Evolution zur Erhöhung der Temperaturtoleranz

Zur Erhöhung der Mutationsrate wurden die Kulturen, wie zuvor beschrieben, mit Mutagenen behandelt. Die Dosen betragen hierbei $50\text{J}/\text{m}^2$ für UV bzw. 0,1v% und 1v% (je die

Hälfte der Kultur) für MMS. Jede Mutageneserunde kann hierbei in drei Phasen eingeteilt werden: Behandlung/Selektion, Erholung und Bestimmung der neuen maximalen Toleranz. Für jede Mutageneserunde wurden drei Kulturen parallel geführt: Die Backup-Kultur (beste Kultur der letzten Runde³; stringente aber nicht selektive Bedingungen), die mutagenisierte Kultur (Kultur mit neuer mutagener Behandlung; selektive Bedingungen) und die Kontroll-Kultur (beste Kultur der letzten Runde; identische selektive Bedingungen wie mutagenisierte Kultur).

Die mutagenisierte Kultur und die Kontroll-Kultur wurden nach der Mutagenese unter stark stringenten Bedingungen gehalten, bis bei der mutagenisierten Kultur ein scharfer Abfall in der OD, dem Spektrum oder der Zellviabilität beobachtet wurde (Selektions-Phase). Beide Kulturen wurden anschließend auf nicht-selektiven Bedingungen gehalten, um überlebenden Zellen eine Erholung zu ermöglichen (Erholungs-Phase). Abschließend wurde die Temperatur wieder schrittweise angehoben bis die neue Maximaltemperatur für stabiles Wachstum der mutagenisierten Kultur bestimmt werden konnte. Stabiles Wachstum wurde hierbei erst angenommen, wenn die Kultur über zwei Wochen diese Temperatur ohne Vitalitätsabfälle tolerieren konnte.

Für die *in vivo* Selektion auf Temperaturtoleranz wurden die *Synechocystis*-Kulturen in 1l Photobioreaktoren mit pH-kontrollierter Begasung (10% CO₂/Luft-Gemisch) kultiviert (Abb. 4.2). In der 12-stündigen Belichtungsphase wurde der pH-Wert auf $7,3 \pm 0,05$ geregelt und die Kulturen wurden aktiv beheizt (42-45°C). Die Belichtungsintensität betrug $125 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (170 von einer Seite und $80 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ von der Anderen). Für Kultivierungen nach einer UV Mutagenese wurde das in die Reaktoren eintretende Licht eine Woche lang mit SFG10 Filterfolie auf Wellenlängen $>520\text{nm}$ limitiert. In der Dunkelphase wurde die Kultur mit 10 ml/min Luft begast und die Temperatur wurde auf RT (23-26°C) gekühlt. Kulturproben wurden mittels steriler Spritzen entnommen. Die Kulturen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten, indem diese mit mBG11 Medium verdünnt wurden, so dass die OD₇₅₀ immer zwischen eins und zwei (gemessen am Shimadzu UV-1800 Photometer) betrug.

Verlängerte *in vivo* Selektion

Das nach den vier Mutageneserunden erhaltene Stamm-Gemisch (MutIV-1) wurde ein Jahr im 1l Photobioreaktor weiter kultiviert. Hierbei wurde der Selektionsdruck stetig maximiert, indem jedes mal, wenn ein stabiles Wachstum erreicht wurde, die Kultivierungstemperatur um $0,1^\circ\text{C}$ erhöht wurde. War kein stabiles Wachstum auf der neuen Temperatur möglich, so wurde diese wieder gesenkt, um eine Erholung zu erlauben. Über den gesamten Zeitraum erfolgte so eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 45°C auf $45,8^\circ\text{C}$.

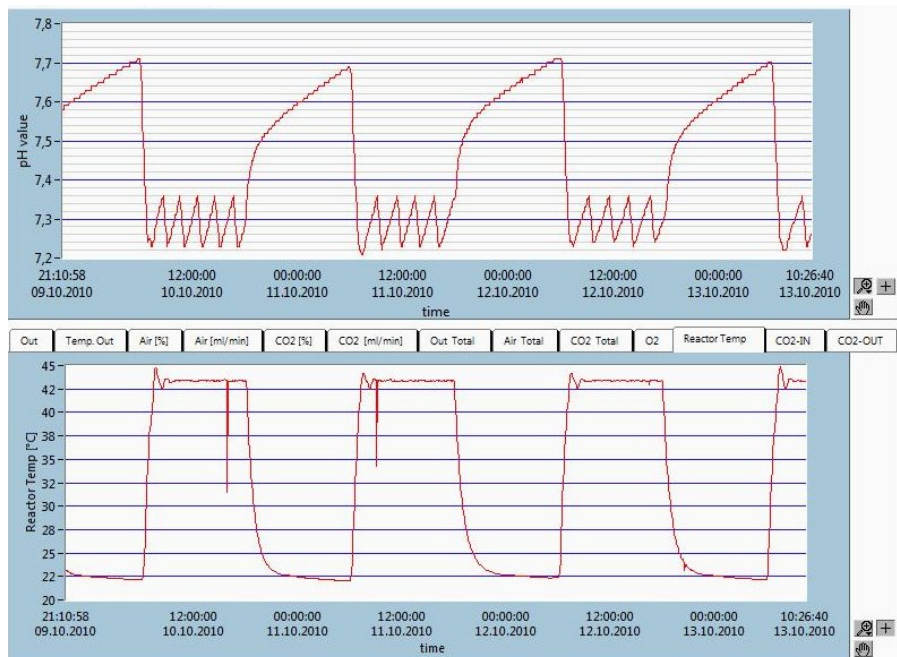
³Zur ersten Runde war die Backup-Kultur ein temperaturadaptierter WT



(a) Photobioreaktor



(b) Kontrolleinheiten



(c) Messkurven für pH (oben) und Temperatur (unten) in der Steuerungssoftware

Abbildung 4.2: Photobioreaktoren im Ein-Liter-Maßstab für die Selektion auf Temperaturtoleranz Die Temperaturkontrolle in den Photobioreaktoren (a) wurde über einem PID geregelt und beheizten Magnetrührer mit externen Messfühler nachgerüstet. Die Kontrolleinheiten für pH-Messung und Begasung (b) wurden über die Software des Reaktors gesteuert. Neben pH konnten auch viele andere Parameter wie z.B. die Temperatur gemessen und aufgezeichnet werden (c).

Screening temperaturtoleranter Stämme im Roboter

81 vereinzelte, monoklonale Stämme aus dem Gemisch MutIV-1 wurden in der zweiten Iteration des Screeningsystems auf ihre Temperaturtoleranz untersucht. Die restlichen Wells der DWP wurden als Wildtyp-Negativkontrollen (sechs Wells), MutIV-1 Positivkontrollen (vier Wells), Medium-Kreuzkontaminationskontrollen (vier Wells) oder als Referenzwell zur genauen Temperaturmessung (ein Well) verwendet.

Die Stämme wurden in 12h Tag/Nacht-Zyklen kultiviert. Die Nacht-Temperatur betrug hierbei 26°C . Die Tag-Temperatur und Belichtung wurden schrittweise von 30°C und einen Photonenfluss von $3 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (ersten drei Tage nach der Inokulation) bis auf 47°C und $72 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ angehoben. Bis 35°C (in etwa die optimale Temperatur des WT) wurde die Tag-Temperatur in 0.5°C Schritten angehoben. Anschließend wurde die Temperatur in Abhängigkeit des Wachstums der Positivkontrolle maximal um $0,2$ oder $0,1^{\circ}\text{C}$ pro Tag erhöht. Für jede Temperatur, für die eine Wachstumsrate bestimmt wurde, wurden mindestens drei OD-Werte aufgenommen (drei bis sieben Tage).

Screening temperaturtoleranter Stämme im Schüttelinkubator

Parallel zur roboterintegrierten Kultivierung erfolgte die Anzucht von Einzelklonen in 10ml mBG11 innerhalb von T25 (25cm^2) Zellkulturflaschen in einem Inkubationsschüttler mit Photosynthese-Wachstumslampen, CO_2 -Begasung (0,5%) und Temperatursteuerung (Infors Minitron). Es wurden zwei Wildtyp Negativkontrollen und zwei MutIV-1 Positivkontrollen mitgeführt. Es erfolgte eine Tag/Nacht-Kultivierung mit einem Photonenfluss von $19 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ und einem orbitalem Schütteln von 55rpm in der Tag- und 25rpm in der Dunkelphase. Die Temperatur der Tag-Phase wurde analog zu der Vorgehensweise im Roboterscreening schrittweise von 28°C bis auf 47°C erhöht. Die Nacht-Temperatur betrug konstant 25°C .

Um die Ist-Temperatur im Medium besser einstellen zu können und um den Temperaturverlauf aufzuzeichnen, wurde in einer zusätzlichen Kultivierungsflasche ein Temperatursensor mit Datenlogger integriert.

Die Messung der optischen Dichte erfolgte analog zur Messung des automatisierten Screenings mittels MTP im Plattenlesegerät (Tecan Genios Plus). Die OD_{750} der Kulturen wurde hierbei zwischen 0,5 und 1 gehalten, um die Wachstumsraten besser untereinander vergleichen zu können.

Validierung der Temperaturtoleranz

Die fünf Stämme, die im Screening als die temperaturtolerantesten identifiziert wurden, wurden zur Validierung ihrer Temperaturtoleranz erneut im Bioreaktor kultiviert. Die Bedingungen entsprachen hierbei den zuvor unter „Adaptive Evolution zur Erhöhung der Temperaturtoleranz“ beschriebenen Bedingungen.

4.2.3 Automatisierte Methoden

Nachfolgend sind die Methoden erklärt, welche mit den Laborrobotern automatisiert wurden. Diese betreffen im weiteren Sinne die Etablierung und den Einsatz der vorgestellten Screeningsysteme. In der ersten Iteration des Systems ist hierbei nur die Messung der optischen Dichte und die halb-automatisierte Chlorophyllextraktion eingesetzt worden. Für die zweite Iteration ist die automatische Volumenangleichung hinzugekommen. Alle weiteren Methoden wurden in der dritten Iteration des Systems eingesetzt und beziehen sich somit auf dessen Hardware.

Messung der optischen Dichte

Nach einer Resuspension durch Auf- und Abpipettieren wurden 80 μl je Well in eine transparente Mikrotiterplatte mit 384 Wells übertragen. Hierbei wurde jeweils eine Spalte sowie eine Reihe zwischen den Proben nicht belegt. Die Messung erfolgte im Tecan Genios Plus mit einem 750 ± 10 nm Filter (erste und zweite Iteration der Screeningsystems) oder dem Tecan Infinite M200 Pro (dritte Iteration des Screeningsystems).

Chlorophyllbestimmung

Für die Bestimmung des Gesamtchlorophyllgehaltes in den Zellen wurde ein Protokoll auf Basis von Marsac (1977) genutzt: Je Messung und Well wurden 300 μl Probenvolumen in eine Rundboden-96-Well MTP übertragen. Die Zellen wurden bei 3.500 g und 4 °C für 10 Minuten mit Hilfe einer Plattenzentrifuge⁴ vom Nährmedium getrennt.

Zur Entfernung von 270 μl Überstand wurde am Rand der Platte mit einem Abstand von 1 mm zum Boden pipettiert. Danach erfolgte die Resuspension in den verbleibenden 30 μl mittels zehnfachem Auf- und Abpipettieren. Durch die Zugabe von 270 μl Methanol (100%) wurden durch weiteres fünfmaliges Auf- und Abpipettieren die Proben gemischt. Die Proben wurde anschließend mit einem für Licht undurchlässigen Deckel abgedeckt und eine Stunde auf 4 °C inkubiert. Die Proben wurden daraufhin erneut für 10 min bei 3.500g und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurden 80 μl je Well in eine 384-Well-Platte übertragen und im Plattenlesegerät (Tecan Genios Plus und 650 ± 10 nm Filter bzw. Tecan Infinite M200 Pro) die Absorption bei 650 nm gemessen.

Der Chlorophyllgehalt ergibt sich durch folgende Formel:

$$\text{Chlorophyll}[\mu\text{g}/\text{ml}] = \frac{\text{Abs}_{650} * \text{Extinktionsfaktor}}{0,3\text{ml}}$$

Der Extinktionsfaktor wurde anhand von Proben mit bekannter Chlorophyllkonzentration empirisch ermittelt und beträgt 14,3.

⁴Bei den ersten beiden Iterationen des Screeningsystems erfolgt dieser Schritt noch durch manuelles Übertragen. In der dritten Iteration ist dieser Schritt über die integrierte Zentrifuge ebenfalls voll automatisiert

Für die in den Ergebnissen dargestellte Verdünnungsreihe (dritte Iteration des Screening-systems) wurden 300, 225, 150 und 75 μl Kultur ($\text{OD}=1,2$), sowie 300 μl Medium (Blank) in eine 96-Well-MTP pipettiert und der Chlorophyllgehalt wie zuvor beschrieben bestimmt. Um die technische Streuung zu ermitteln, wurden je Verdünnung 16 Replikate (je einer MTP Reihe) erzeugt.

Evaporationsausgleich

Der Füllstand innerhalb jedes Wells wurde mit leitfähigen Einweg-Pipettenspitzen gemessen. Die Differenz zum Soll-Volumen wurde anschließend berechnet und mit sterilem und entionisiertem Wasser nachgefüllt. Dies wurde täglich vor allen anderen Messungen durchgeführt, um Verfälschungen über eine Aufkonzentrierung zu vermeiden.

Bestimmung der Zellzahl

Um ausgehend von der OD_{750} die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten, ist eine Kalibrierung erforderlich. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe mit 11 Konzentrationen, ausgehend von einer log-Phase *Synechocystis* Kultur in 3:2 Schritten, erzeugt. Für jede Verdünnung wurde die Zellzahl manuell mit einer Neubauerzählkammer bestimmt und die OD_{750} in achtfacher Bestimmung im Plattenlesegerät gemessen.

Somit wurde folgender linearer Zusammenhang bestimmt, welcher für alle Zellzahlberechnungen eingesetzt wurde:

$$\text{Zellzahl}[\text{Zellen/ml}] = \frac{\text{OD}_{750} - 0,0305174}{8,701916 * 10^{-9}}$$

OD Normalisierung

Um die ODs der verschiedenen Wells einer DWP auf einen Wert zu normalisieren, wurde zuerst die aktuelle OD gemessen und anschließend mit folgenden Formeln die erforderlichen Volumina berechnet:

$$\text{Volumen}_{\text{Kultur}} = \frac{\text{OD}_{\text{Soll}}}{\text{OD}_{\text{Ist}}} * \text{Volumen}_{\text{Soll}}$$

$$\text{Volumen}_{\text{Medium}} = \text{Volumen}_{\text{Soll}} - \text{Volumen}_{\text{Kultur}}$$

Das Medium und Kulturvolumen wurde anschließend in eine sterile DWP (mit 1 mm \varnothing Glasbeads bestückt) übertragen.

Die neue DWP mit normalisierter OD wurde anschließend für alle anderen Messungen (neue OD Messung, Vitalität, Absorptionsspektrum, Chlorophyllkonzentration und MALDI-Messung) eingesetzt.

Aufnahme von Absorptionsspektren

Im dem Bereich von 400 bis 800 nm wurden in 5 nm Schritten und zwei Blitzen im Infinite M200 Pro Plattenlesegerät Absorptionsspektren aufgenommen. Zur Normalisierung wurde jeder Wert durch die Absorption (bzw. OD) bei 750 nm dividiert:

$$\text{Normalisierte } Abs_x = \frac{Abs_x}{Abs_{750}}$$

Vitalitätsmessung

Um schnell die durchschnittliche Vitalität der *Synechocystis* Kulturen abschätzen zu können, wurde eine neue Methode, basierend auf der Viabilitätsanalyse von Schulze et al. (2011), etabliert. Zur Bestimmung der optimalen Parameter, wurden Emissionsspektren von 400-800 nm (Kulturdichte OD=0,2; 2 nm Schritte, 2 Blitze; Gain auf 100; 20 μ s Integrationszeit) für Anregungen bei 380, 390, 400, 410, 420, 430 und 440 nm aufgenommen. Eine log-Phase-Kultur mit 100% viablen (und vitalen) Zellen und eine mit 0% viablen Zellen (3 Tage Inkubation bei 50°C) wurden in verschiedenen Verhältnissen gemischt, um Kulturen mit 0, 25, 50, 75 und 100 % viablen Zellen zu erhalten. Der Anteil an viablen Zellen wurde mikroskopisch nach Schulze et al. (2011) validiert.

Optimale Parameter wurden bei einer Anregung von 390 nm und einer Messung der Emissionen bei 460 nm und 650 nm identifiziert. Ein numerischer Vitalitätswert in Prozent kann mit diesen Werten über folgende Gleichung berechnet werden (siehe 5.1.3):

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\log_{10}\left(\frac{Em_{460}}{Em_{650}}\right) + 1,074}{0,0143}$$

MALDI-TOF-MS

Um Massenspektren von *Synechocystis*-Kulturextrakten aufzunehmen, wurden 80 μ l Kultursuspension mit OD \approx 0,4 bei 3.200g für 10 Minuten zentrifugiert. Hierbei wurde dieselbe MTP verwendet, welche bereits für alle anderen Messungen nach der OD Angleichung (OD, Vitalität, Absorptionsspektrum) eingesetzt wurde. 75 μ l Überstand wurden anschließend entfernt und das Pellet in 40 μ l Matrix (25 μ g/ml Sinapinsäure; 50% Acetonitril; 0.5% Trifluoressigsäure) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 30 Minuten wurden 3 μ l des Extraktes auf eine MALDI-TOF-MS Target-Platte pipettiert, welche zuvor mit Sinapinsäure gesättigt und im Roboter platziert wurde. Zur Beladung mit gegebener Roboterausstattung (200 μ l DITIs (Spitzen) und 1 ml Dilutoren) wurde ein sehr geringer Abstand zum Target, sowie eine speziell angelegte „liquid class“ in der Software benötigt.

Die Abgabegeschwindigkeit wurde auf $10 \mu\text{l}/\text{s}$ reduziert und das „conditioning“⁵ und „excess“⁶ Volumen auf jeweils 3 und $5 \mu\text{l}$ erhöht. Das beladene Target wurde per Hand in das MALDI-TOF-MS überführt.

Agar-Konservierung

96-Well-MTP-Agarplatten wurden erzeugt, indem $100 \mu\text{l}$ flüssiges 1% BG11 Agar (im temperierten Carrier bei 60°C gehalten) mit vorgewärmten Spitzen in die Wells mit dem LiHa übertragen wurden. Die Platten wurden anschließend versiegelt und auf Raumtemperatur abgekühlt, bis der Agar ausgehärtet war.

Zur Inokulation wurden je Well der DWP $10 \mu\text{l}$ Kultur ($\text{OD} \approx 0,4$) in drei Agar-MTP automatisch übertragen. Die Platte wurde anschließend mit einer für Gas permeablen Folie (Greiner Breathseal) abgedichtet und bei geringer Beleuchtung (Photonenfluß von $2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) bei Raumtemperatur gelagert.

Für den Rückübertrag in Flüssigmedium wurden $150 \mu\text{l}$ Medium vom Roboter auf den Agar pipettiert. Die Platte wurde im Anschluss in die Kultivierungskammer übertragen und über Nacht bei 750rpm und $15 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ kultiviert. Anschließend konnten die in Suspension übergetretenen Zellen in eine DWP mit $850 \mu\text{l}$ Medium überimpft werden. Die Kulturen wurden wie zuvor beschrieben kultiviert. Nach ca. zwei Tagen erreichten sie ein logarithmisches Wachstum und das Volumen konnte auf $1,8 \text{ ml}$ erhöht werden.

Cryo-Konservierung

Zur Langzeitlagerung der Kulturen wurde ein modifiziertes Protokoll nach Day (2007) eingesetzt. $150 \mu\text{l}$ Kultur wurden automatisiert aus jedem DPW Well entnommen und in eine 96-Well-MTP übertragen. Die MTP wurde im temperierten Carrier auf 4°C gekühlt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurden $150 \mu\text{l}$ 14% DMSO hinzugegeben und sofort durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Platte wurde anschließend per Hand versiegelt und bei -80°C zur Lagerung eingefroren. Zur erneuten Inokulation der Kulturen wurden diese manuell auf BG11-Agar-Petrischalen ausgestrichen.

⁵Überschüssiges aufgenommenes Volumen, welches nach der Aufnahme direkt zurück in das Ursprungsgefäß zurückgegeben wird

⁶Überschüssig aufgenommenes Volumen, welches nach der Abgabe in der Pipette zurückbleibt und verworfen wird

4.2.4 Kalkulationen

Nachfolgend sind mathematische Berechnungen aufgelistet, welche zur Auswertung der erhaltenen Daten genutzt wurden.

Wachstumsrate

Die spezifische Wachstumsrate μ bezeichnet die Wachstumsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt t für einen definierten Organismus unter bestimmten Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, Nährmedium, usw.). Die Ermittlung erfolgte unter der Verwendung der Gleichung:

$$\mu = \frac{\ln(X_t) - \ln(X_0)}{\Delta t}$$

mit Δt (Änderung der Zeit in Tagen), X_t (Optische Dichte zum Zeitpunkt t) und X_0 (Optische Dichte zum Zeitpunkt $t = 0$).

Variationskoeffizient

Der Variationskoeffizient (VK) ist ein Maß für die relative Standardabweichung und wurde folgendermaßen berechnet:

$$VK_X = \frac{\sigma_x}{\bar{X}} * 100\%$$

mit \bar{X} (Mittelwert von X) und σ_x (Standardabweichung von X).

Statistische Signifikanz

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Gruppen (z.B. Wells am Rand einer DWP im Vergleich zu denen in der Mitte) wurde ein Zweistichproben-t-Test eingesetzt. Zuerst wurde mit Welch's t-Test (Welch, 1947) der t -Wert bestimmt:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

mit \bar{X}_i (Mittelwert von X_i), s_i (Varianz von X_i) und n_i (Stichprobengröße von X_i).

Anschließend wurde die Welch-Satterthwaite-Gleichung (Satterthwaite, 1946) genutzt, um die Freiheitsgrade abzuschätzen:

$$DF \approx \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{s_1^4}{n_1^2 * \nu_1} + \frac{s_2^4}{n_2^2 * \nu_2}}$$

mit

$$\nu_i = n_i - 1$$

Mit diesen beiden Parametern konnte abschließend der p -Wert in einer t -Tabelle nachgeschlagen werden.

Mathematische Modellierung der Temperatur-Screening-Daten

Um eine bessere Visualisierung der Daten zu ermöglichen und um schneller die temperaturliberalsten Stämme zu identifizieren, wurde die Wachstumsrate über der Temperatur mittels einer modifizierten Ratkowsky-Gleichung (Ratkowsky et al., 1982; Zwietering et al., 1991) dargestellt:

$$\mu = (b * (T - T_{min}))^2 * (1 - e^{c*(T - T_{max})})$$

mit T_{min} (Minimale Wachstumstemperatur), T_{max} (Maximale Wachstumstemperatur), b (Ratkowsky Parameter b) und c (Ratkowsky Parameter c).

Die Ratkowsky Parameter b und c wurden nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$b = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum(x_i - \bar{x})^2}$$

$$c(T - T_{Max}) = \log 1 - \frac{\sqrt{\mu}}{b * (T - T_{max})}$$

mit x_i (Wachstumsrate) und y_i (Temperatur).

Die minimale Wachstumstemperatur wurde mit der folgenden Gleichung bestimmt:

$$\sqrt{\mu} = b * (T - T_{max})$$

Hierfür wurde nur der lineare Bereich unterhalb der optimalen Wachstumstemperatur eingesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 Entwicklung einer Hochdurchsatz Screeningplattform für phototrophe Mikroorganismen

Screeningplattformen für phototrophe Mikroorganismen für den mittleren oder hohen Durchsatz sind kommerziell nicht erhältlich. Zur effizienten Selektion der leistungsstärksten Stämme aus einem Pool an Mutanten nach einer adaptiven Evolution ist solch eine Plattform jedoch von großem Vorteil. Somit wurde solch ein System auf Basis eines Pipettierroboters, parallel zur Durchführung der eigentlichen adaptiven Evolution, neu entwickelt. Folgend werden die drei Iterationen dieses Screeningsystems dargestellt.

5.1.1 Erste Iteration der Screeningplattform

Der erste Prototyp basierte auf einen Tecan Genesis RPS 150 Pipettierroboter. Methoden zum Arbeiten mit Cyanobakterien in der Plattform wie Inokulation, optimales Schüttelmuster, Resuspendieren der Zellen, Messung der optischen Dichte, Verdünnung und halbautomatisierte Chlorophyllmessung wurden entwickelt, etabliert und werden anhand der folgenden Ergebnisse für eine Kultivierungsreihe beispielhaft demonstriert. Teile der Ergebnisse aus diesem Kapitel wurden unter dem Titel "Etablierung von Hochdurchsatz-Kultivierung und -Screening Methoden für phototrophe Einzeller" publiziert (Tillich et al., 2012a).

Aufbau der Screeningplattform

Die erste Iteration der Screeningplattform basierte auf den Tecan Genesis RSP 150 Pipettierroboter (Abb. 5.1).

Der Roboter verfügt über einen „Liquid Handling Arm“ (LiHa) zum Pipettieren von Flüssigkeiten mit hoher Reproduzierbarkeit und über einen „Robotic Manipulator Arm“ (RoMa) zum Bewegen von Mikrotiterplatten oder Ähnlichem innerhalb des Robotersystems. Sowohl Mikrotiterplatten als auch Reagenzien können durch temperierte Ablagestellen („Carrier“) auf bis zu 0 °C gekühlt werden.

Zur automatisierten Kultivierung von Cyanobakterien wurde eine Kultivierungskammer, welche speziell für die Anforderungen von phototrophen Mikroorganismen entwickelt und

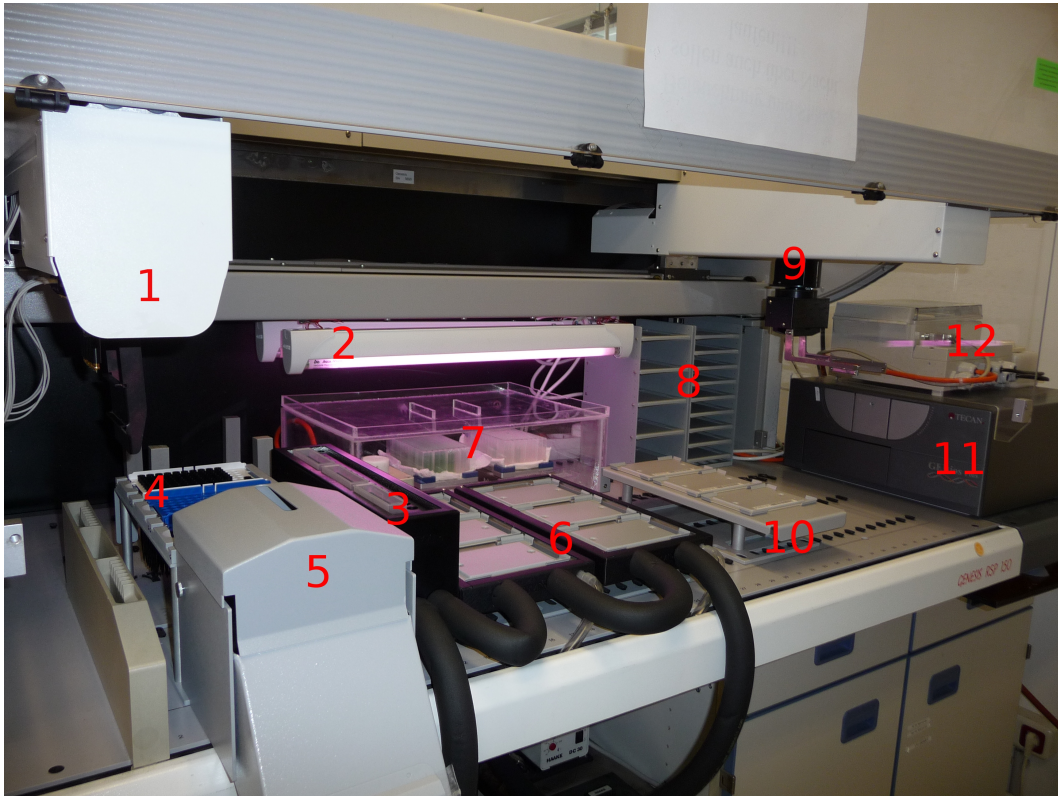


Abbildung 5.1: Aufbau der ersten Iteration der Screeningplattform:

1. Liquid Handling Arm (LiHa)
2. Stufenlos steuerbare Lichtquelle (Photonenfluss von $3,53 - 72 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
3. Temperierbare Carrier für Reagenzien
4. Halterung für Pipettenspitzen
5. Abwurfbehälter für Pipettenspitzen
6. Temperierbare Carrier für Mikrotiterplatten
7. Kultivierungskammer für phototrophe Mikroorganismen
8. Hotel (zur Lagerung von Mikrotiterplatten)
9. Robotic Manipulator Arm (RoMa)
10. Carrier für Mikrotiterplatten
11. Plattenlesegerät (Tecan GENios Plus)
12. Steuereinheiten für die Kultivierungskammer (CO_2 und Lichtintensität)

Abgeändert aus Tillich et al. (2012a).

konstruiert wurde, in den Roboter integriert. Die eigentliche Kultivierung geschieht hierbei in Deepwell-Mikrotiterplatten (DWPs). Sie ermöglicht eine vollständige automatisierte Kultivierung innerhalb des Roboters bei geringer Kontaminationsgefahr. Eine völlig sterile Kultivierung ist zwar nicht ohne weitere technische Ausstattung möglich, jedoch können sowohl die Kammer wie auch die Roboterflächen chemisch sterilisiert werden. Die Kultivierungskammer ist komplett über den RoMa ansteuerbar. Der Roboterarm ist in der Lage, den Deckel zu entfernen und die Kultivierungsplatten auf Carrier zu überführen, wo sie anschließend von dem LiHa-Arm erreicht werden können. In der Kammer stehen zwei computergesteuerte Schüttlerplätze für die Kultivierung in Mikrotiterplatten (Variomag Teleshake) zur Verfügung. Die Einstellungen der beiden Schüttler sind individuell vom PC aus konfigurierbar, so dass auch komplexere Bewegungen programmiert werden können. Die Kultivierungskammer verfügt außerdem über eine CO₂-Versorgung, welche eine Regelung der Atmosphäre in der Kammer von 0 bis 10% CO₂ ermöglicht. Bei Unterschreiten des Sollwertes (gemessen durch einen in die Kultivierungskammer integrierten Sensor) wird über eine Steuereinheit ein Magnetventil geöffnet und ein 10%- CO₂ -Gas-Gemisch (mit 0.2 bar) hinzu dosiert, bis der Sollwert wieder erreicht wird. Mit zwei über der Kammer angebrachten Pflanzenwachstums-Lampen und einer entsprechenden Steuereinheit ist eine stufenlosen Regelung der Lichtintensität (Photonenfluss von $1,5 - 73 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) möglich. Durch das in das Robotersystem integrierte Plattenlesegerät Tecan GENios Plus werden automatisierte Absorptions- und Fluoreszenzmessungen ermöglicht. Neben direkten optischen Parametern, wie der Lichtstreuung bei 750nm zur Zellzahlbestimmung oder der Absorption bei 650nm für extrahierte Chlorophyllpigmente, können durch das Einsetzen von entsprechenden Assays eine Vielzahl von verschiedenen Analyten detektiert werden.

Kultivierungsbeispiel

Mit den in ersten Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) etablierten Parametern und Methoden wurde ein vollständiger Kultivierungslauf (Tag/Nacht - Kultivierung) mit *Synechocystis* durchgeführt.

Da in dem System mit monoklonalen Stämmen gearbeitet werden soll, ist eine Vereinzelung der Kulturen erforderlich. Das Übertragen einzelner Kolonien eines Verdünnungsausstrichs auf Agarplatten in die DWPs wurde sowohl manuell mit Impfösen, als auch automatisiert mittels eines Pickingroboters erfolgreich etabliert.

Während der Kultivierung zeigte sich, dass ein Resuspendieren der Kultur durch Auf- und Ab-Pipettieren notwendig war, da selbst mit dem zuvor als bestmöglichen identifizierten Schüttelmuster von 5 Bewegungen Nord-Süd und 5 Bewegungen Ost-West bei 800 rpm eine leichte Sedimentierung erfolgte.

Über die tägliche Messung der optischen Dichte bei 750 nm (OD_{750}) wurde das Wachstum der Kulturen in den einzelnen Wells erfasst (Abb. 5.2). Hierbei handelt es sich um einen leicht messbaren Parameter, der für einzellige Cyanobakterien (wie *Synechocystis*) und Mikroalgen mit der Anzahl an Zellen in Suspension korreliert. Nach einer 5 tägigen lag-Phase konnte

nach der ersten Verdünnung ein gutes Wachstum beobachtet werden. Hier zeigten sich jedoch relativ große Schwankungen zwischen den einzelnen Wells. Für die Kontroll-Wells, in denen nur Medium enthalten war, wurde kein Wachstum festgestellt. Vorherige Kultivierungen (Daten nicht gezeigt) haben ähnliche Wachstumsverläufe gezeigt.

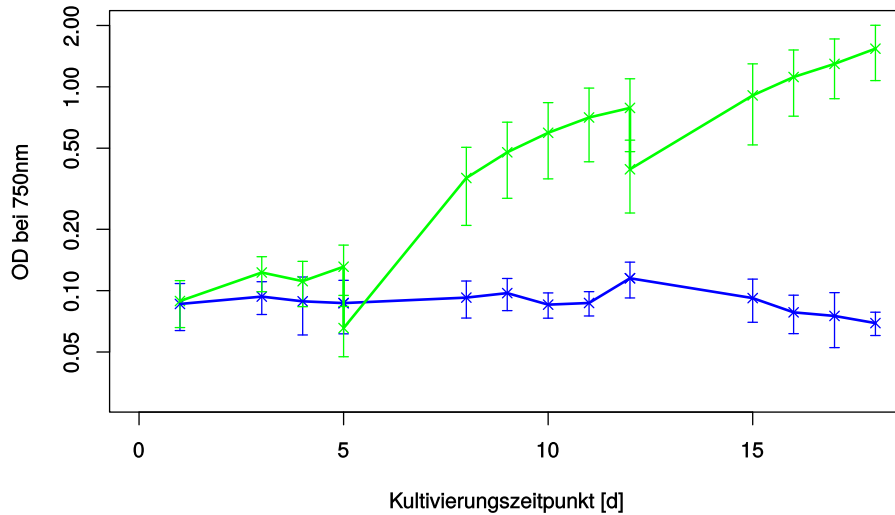


Abbildung 5.2: Kultivierungsverlauf in der Prototyp-Screeningplattform: Angeimpfte Wells (grün) im Vergleich mit Kontroll-Wells (blau). An den Tagen 5 und 12 wurde 1:2 mit Medium verdünnt. Abgeändert aus Tillich et al. (2012a)

Es ist jedoch auch zu erkennen, dass die OD-Zunahme bzw. Wachstumsraten bei höheren Zelldichten abfallen. Bei exponentiellem Wachstum und logarithmischer Darstellung sollte die OD-Zunahme linear sein. Bei höheren ODs (z.B. Tag 10-12) ist jedoch ein Plateau erkennbar.

Am Tag 18 wurde für alle Wells der Chlorophyllgehalt bestimmt. Im Durchschnitt ergab sich für die angeimpften Wells ein Wert von $6,7 \pm 4,6 \mu\text{g/ml}$.

5.1.2 Zweite Iteration der Screeningplattform

Die in 5.1.1 dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass eine automatisierte Kultivierung in dem Prototyp-Screeningsystem möglich ist. Für den Einsatz zur Selektion von thermotoleranten Stämmen ist jedoch zusätzlich eine exakte Temperaturkontrolle notwendig. Weiterhin wurden weitere Ansätze zum Verhindern der Sedimentierung der Kulturen in dem Screening-system untersucht.

Temperierung der Kulturen

Keine der kommerziell erhältlichen und temperierbaren Plattenschüttler wiesen die nötigen Leistungsmerkmale (exakte Profiltemperierung bei geringer Bauhöhe) auf. Somit wurde eine Temperierung für die vorhandenen Schüttler entwickelt.

Das Heizsystem besteht aus einer Heizfolie mit integriertem Temperatursensor, welche an eine gefräste Stahlplatte angebracht ist, auf der die DWPs einrasten können (Abb. 5.3(a) und 5.3(b)). Beim Einbau wurde diese zusätzlich über eine Gipsplatte von den Schüttlern thermisch getrennt.

Die Verteilung der Temperaturen innerhalb der Wells der Platte ist sehr gleichmäßig. Die maximale Abweichung zum Sollwert beträgt $0,2^{\circ}\text{C}$, während die maximale Abweichung zweier Wells $0,3^{\circ}\text{C}$ nicht übersteigt (Abb. 5.3(d)).

Nach einer Optimierung der PID-Steuerungsparameter (nicht gezeigt) ermöglichte das System eine exakte Temperierung der DWPs. Komplexe Temperaturprofile ermöglichen es, die Bedingungen anderer Systeme (z.B. größeren Bioreaktoren) nachzustellen.

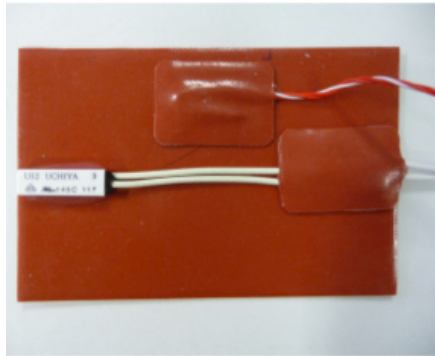
Jedoch führten die Heizelemente zu einem Hitzestau innerhalb der Kammer und die Kulturen kühlten in der Nachtphase nicht wie beabsichtigt ab. Somit wurde zusätzlich ein aktives Kühlsystem installiert. Da sich eine einfache Luftkühlung als unzureichend herausstellte (Daten nicht gezeigt), wurde eine Wasserkühlung entwickelt (Abb. 5.4). Hiermit konnten Kulturen innerhalb des Kultivierungssystems auch auf höhere Temperaturen am Tag aufgeheizt und in der Nacht-Phase trotzdem wie benötigt abgekühlt werden (Abb. 5.5). Hierbei arbeiten die Heizelemente dynamisch gegen die konstante Kühlleistung an.

Weiterhin hat sich gezeigt, dass die Temperierung der Kulturen zu einer deutlich erhöhten Evaporation innerhalb der Kultivierungskammer geführt hat. Um diese so weit wie möglich zu minimieren, wurde die Gaszufuhr vor dem Einlass in die Kammer über einen Gasdiffusor durch eine Wassersäule geblubbert. Vor dem Eintritt in die Kammer wird das Luft- CO_2 -Gemisch steril filtriert.

Sedimentationseigenschaften der Kulturen

Auch bei einem Schüttelmuster von 800 rpm 5X Nord-Süd und 5X Ost-West war eine leichte Sedimentation der Kulturen zu beobachten. Um diese ganz zu vermeiden und um perspektivisch auch preisgünstigere Orbitalschüttler nutzen zu können, wurde der Einsatz von Glasbeads zum Halten in Suspension untersucht.

Hierzu wurden der Einfluss verschiedener Zahlen Beads (2-6) und Bead-Durchmesser (0,5 bis 1,5 mm) untersucht. Mit mindestens zwei Beads bei 750 rpm orbitalem Schütteln war keine Sedimentation mehr zu beobachten, während die verschiedenen Durchmesser keinen Einfluss zu haben schienen (Daten nicht gezeigt). Für alle Folgeexperimente wurden in jedem Well zwei Glasbeads mit 1 mm Durchmesser vorgelegt.



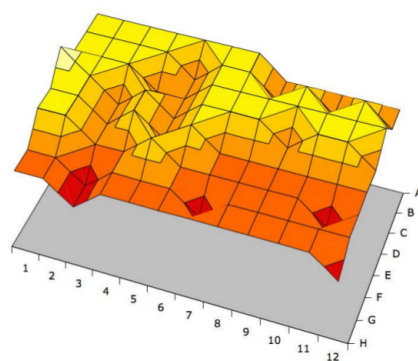
(a) Heizfolie (Rückseite)



(b) Heizplatte (Frontseite)

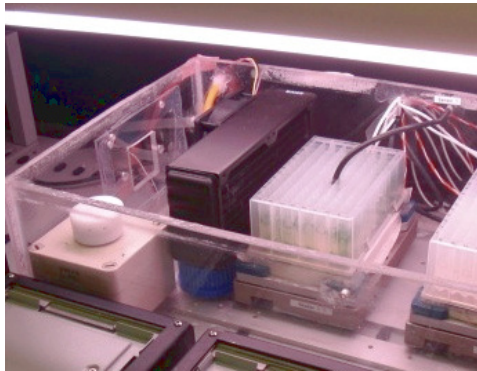


(c) Temperatursteuerung

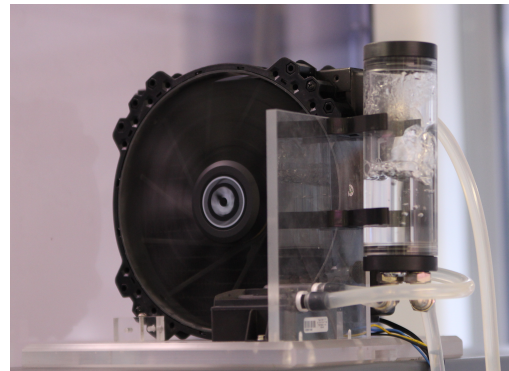


(d) Temperaturverteilung

Abbildung 5.3: Temperierungssystem der DPWs in der Kultivierungskammer: Eine Heizfolie mit integriertem Temperatursensor (a) ist an eine Stahlplatte (b) angebracht, auf welcher DWP's einrasten können. An der externen Steuerungseinheit (c) können Temperaturen und Profile gewählt werden. Individuelle Messungen der Temperaturen in den jeweiligen Wells der DWP (d) reichen bei einem Sollwert von 28°C von 27,8°C (rot) bis 28,1°C (hellgelb).



(a) Interner Radiator



(b) Externer Radiator

Abbildung 5.4: Aktive Wasserkühlung der Kultivierungskammer: Wärme wird von dem internen Radiator (a) auf Wasser übertragen, über eine Pumpe und ein Silikon-Schlauchsystem zu dem größeren externen Radiator (b) geleitet und dort abgeführt.

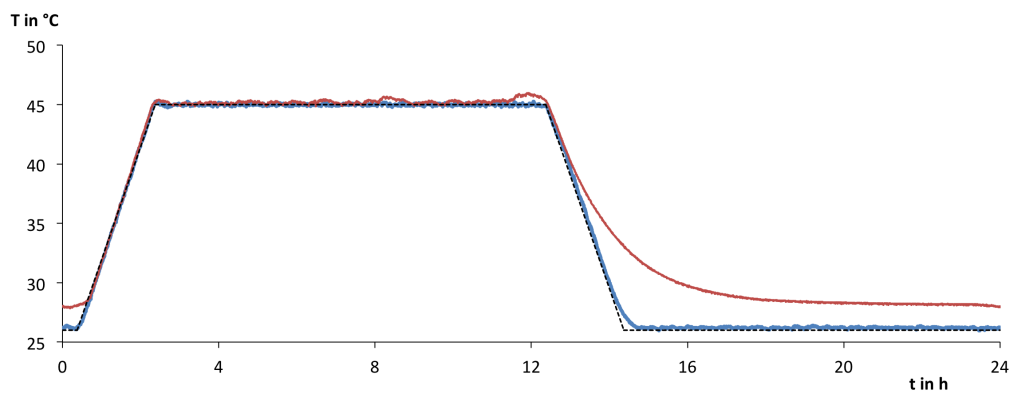


Abbildung 5.5: Temperaturverläufe in der Kultivierungskammer. Sollwertvorgabe der Temperatursteuerung (schwarz), Temperatur in den Wells mit aktiver Kühlung (blau) und ohne Kühlung (rot).

5.1.3 Dritte Iteration der Screeningplattform

Die in 5.1.2 beschriebene zweite Iteration des Screeningsystems wurde erfolgreich eingesetzt, um mittels adaptiver Evolution erzeugte Stämme auf ihre Temperaturtoleranz zu screenen (siehe 5.2.3).

Dennoch wurden sowohl die eingesetzte Hardware, wie auch das Methodenspektrum für die Screeningplattform stetig weiterentwickelt und optimiert. Hierbei wurde die Kultivierungskammer für phototrophe Mikroorganismen vollständig überarbeitet und das gesamte System auf den moderneren und größeren Pipettierroboter Tecan Freedom Evo 200 übertragen, welcher aufgrund seiner verbesserten Software und der zusätzlich integrierten technischen Ausstattung die automatisierte Durchführung neuer Methoden ermöglicht. Der Aufbau der neuesten Iteration des Screeningsystems ist folgend detailliert beschrieben. Weiterhin sind die Ergebnisse der auf der erweiterten Screeningplattform etablierten Methoden sowie einer Beispielkultivierung dargestellt.

Teile der Ergebnisse aus diesem Kapitel wurden unter dem Titel “High-throughput cultivation and screening platform for unicellular phototrophs” publiziert (Tillich et al., 2014b).

Aktueller Aufbau des Screeningsystems

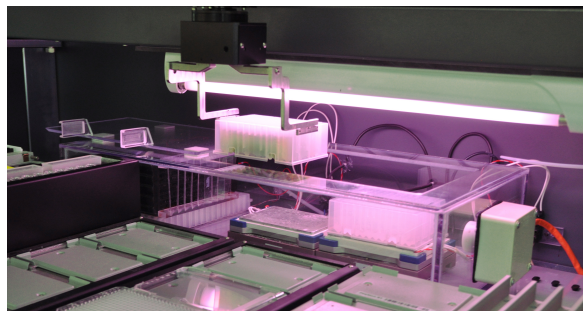
Die dritte Iteration des Screeningsystems basiert auf einem Tecan Freedom Evo 200 Pipettierroboter (Abb. 5.6(a)). Dieser ist mit einer selbst entworfenen Abdeckhaube ausgestattet, welche die potentielle Kontaminationsgefahr weiter reduziert. Außerdem wurden zusätzliche Geräte, wie ein externer Schüttler, eine Zentrifuge und eine Waschstation in die Plattform integriert. Ein verlängerter RoMa sowie eine Öffnung in der Arbeitsfläche ermöglichen es, die integrierte Zentrifuge automatisiert zu beladen. Weiterhin wurde das Filter-Plattenlesegerät durch ein Spektral-Plattenlesegerät ersetzt.

Die überarbeitete Kultivierungskammer für phototrophe Mikroorganismen wurde bereits bei dem ersten Entwurf für die Integration der aktiven Kühlung ausgelegt (Abb. 5.6(b)). Ein Schlitzgitter vor dem Radiator verhindert hierbei einen direkten Luftstrom auf die Platten und ermöglicht eine gleichmäßige Temperierung. Die Kammer besteht aus Polycarbonat und wurde für eine höhere Stabilität mit einem Inlay-Deckel angefertigt. Dieser ist zur einfacheren Platzierung mit schräg gefrästen Kanten ausgestattet. Die Ausläufer zum Greifen des Deckels sind jetzt so platziert, dass ein Einfluss auf die Belichtung ausgeschlossen werden kann. Zusätzlich sind die Plattenschüttler längs unter den Lampen platziert, um eine noch gleichmäßigere Beleuchtung zu ermöglichen.

Die Spannungskontrolle und Steuerung des Heizsystems wurden zusammen mit den Steuerungselementen für die Begasung und Belichtung in einer externen Steuertafel zusammengefasst (Abb. 5.6(c)). Die gesamte Verkabelung der Kammer ist über steckbare Lüsterklemmen zusammengefügt. Somit ist es leicht möglich, sie abzukoppeln und für eine Sterilisation aus dem Roboter zu entfernen. Der CO₂-Sensor ist über ein Gewinde in die Wand der Kammer integriert, somit reicht nur die Messeinheit des Sensors in den Innenraum der Kammer.



(a) Tecan Freedom Evo 200 mit Sterilhauben und weiteren integrierten Geräten



(b) Neue Kultivierungskammer



(c) Steuertafel

Abbildung 5.6: Zweite Iteration des Screeningsystems: Das System besteht aus dem Roboter mit integrierten Geräten (a), der überarbeiteten Kultivierungskammer (b) und einer externen Steuertafel für die Funktionen der Kammer (c).

Methodenetablierung

Optische Dichte und Zellzahlbestimmung Die OD_{750} ist auch bei dem erweiterten System ein zentraler Messwert. Da die neuere Software des Pipettierroboters es zusätzlich erlaubt, Messwerte als Variablen einzulesen, ist es jetzt möglich nach einer OD-Messung auch die Verdünnung zurück zu einer Soll-OD automatisiert zu berechnen und durchzuführen (siehe 5.1.3).

Der Vergleich von OD_{750} und Zellzahl zeigte für verschiedene Verdünnungen eine sehr gute Korrelation (Regressionskoeffizient $R=0,996$) (Abb. 5.7). Die erhaltene Ausgleichsgerade wurde zur Umrechnung des OD_{750} Wertes in die Zellzahl für alle weiteren Versuche genutzt. Die untere Nachweisgrenze lag bei ca. 10^7 Zellen pro Milliliter. Für geringere Zelldichten ist kein Unterschied zu reinem Medium messbar.

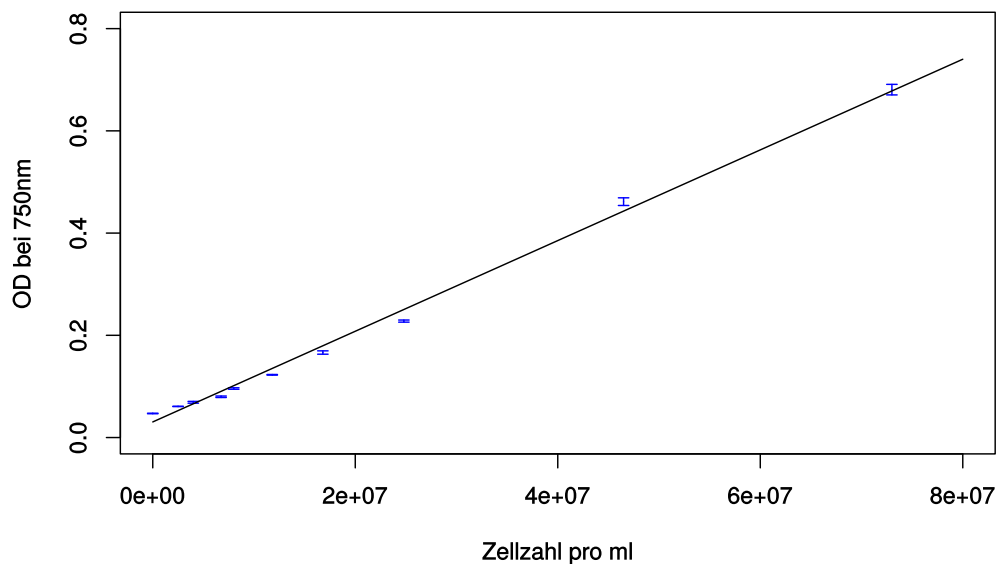


Abbildung 5.7: Optische Dichte bei 750 nm über der Zellzahl pro ml: $80 \mu l$ in 384-Well Platten gemessen; Zellzahl pro ml manuell ausgezählt. Abgeändert aus Tillich et al. (2014b)

Absorptionsspektrum Die Aufnahme eines Absorptionsspektrums ermöglicht viele Aussagen über den Zustand einer Kultur. Abbildung 5.8 zeigt die durchschnittliche automatisch aufgenommene Absorption mehrerer *Synechocystis*-Kulturen nach einer Woche Kultivierungsdauer mit einer täglichen automatisierten Verdünnung. Der mittlere Variationskoeffizient (VK) über alle Kulturen (bzw. Wells) und Wellenlängen betrug hierbei 2,79%. Bei einer Normalisierung der jeweiligen Absorptionswerte über den Wert bei 750nm fiel der durchschnittliche Variationskoeffizient weiter bis auf 0,5% ab (Daten nicht gezeigt).

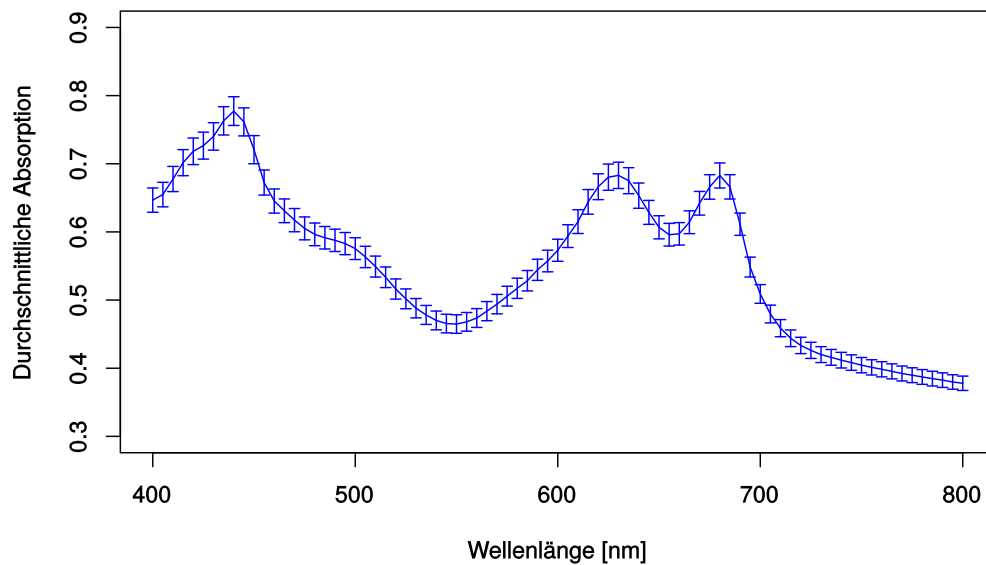


Abbildung 5.8: Durchschnittliches Absorptionsspektrum für 86 unabhängige *Synechocystis*-Kulturen nach einer Woche im Screeningsystem. Die OD_{750} wurde zuvor auf ca. 0,4 angepasst. Die Y-Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung bei der jeweiligen Wellenlänge. 10 Wells wurden nicht angeimpft und dienten als Negativkontrolle. Abgeändert aus Tillich et al. (2014b)

Chlorophyllkonzentration Die Extraktion und Messung von Chlorophyll wurde ebenfalls innerhalb der Screeningplattform automatisiert durchgeführt. Die durchschnittlichen Chlorophyllkonzentrationen für die Verdünnungsreihe einer *Synechocystis*-Kultur ergaben zwischen den technischen Replikaten einen durchschnittlichen Variationskoeffizienten von 9,2% (Abb. 5.9). Trotz der nennenswerten Standardabweichung (bzw. des Variationskoeffizienten) zeigt eine lineare Regression der Chlorophyllkonzentration über den eingesetzten Kulturvolumina eine sehr gute Korrelation ($R=0.99$).

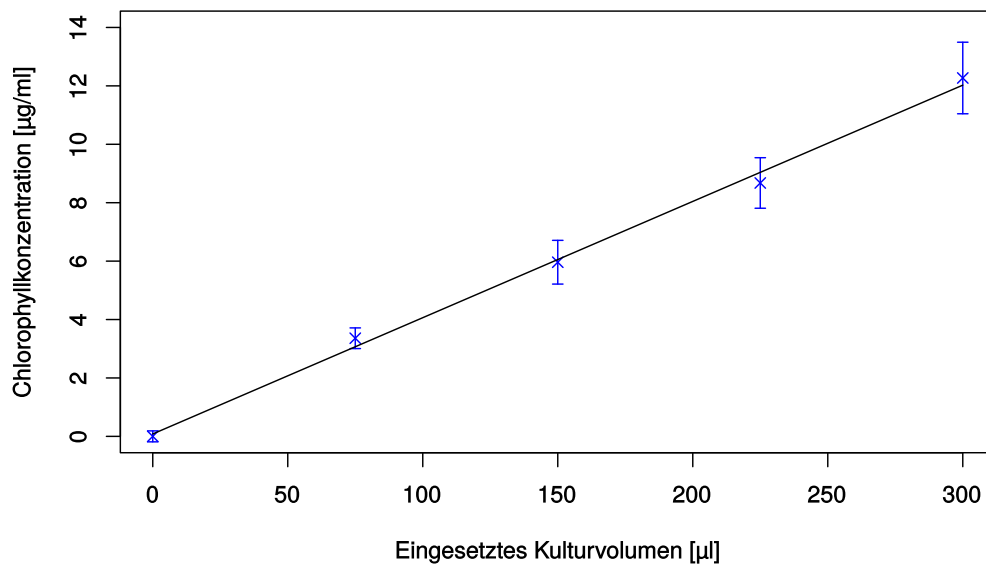


Abbildung 5.9: Chlorophyllkonzentration für verschiedene *Synechocystis*-Verdünnungen. Die Y-Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung zwischen den 16 technischen Replikaten bei jeder Konzentration. Abgeändert aus Tillich et al. (2014b)

Um den Variationskoeffizient bei biologischen Replikaten zu bestimmen, wurde die Chlorophyllkonzentration von 86 Kulturen nach 11 Tagen Kultivierung in dem Screeningsystem gemessen. Der erhaltene Wert von 15,1% zeigt eine erhöhte Streuung gegenüber den technischen Replikaten.

Vitalitätsmessung Zur Bestimmung der Vitalität der Kulturen wurde eine Fluoreszenzbasierte Methode neu angepasst. Bei der ursprünglichen Methode werden mikroskopische Bilder aufgenommen und mittels Chlorophyllfluoreszenz und einer unspezifische Eigenfluoreszenz der Viabilitäts-Status jeder einzelnen Zelle bestimmt (Schulze et al., 2011). Diese Methode wurde für die Anwendung in einem Plattenlesegerät weiterentwickelt, um den durchschnittlichen Vitalitätswert einer gesamten Kultur zu messen.

Es wurde eine Mischreihe an Kulturen mit unterschiedlichen Anteilen an viablen Zellen erzeugt. Um die optimalen Wellenlängen für die Messung zu identifizieren, wurde für Anregungswellenlängen von 380-440 nm (in 10 nm Schritten) die Spektren der Fluoreszenzemission von 400-800 nm aufgenommen. Das Spektrum bei einer Anregung von 390 nm (Abb. 5.10) zeigte hierbei die beste Unterscheidung der Kulturen anhand ihrer durchschnittlichen Vitalität, da die Emissionspeaks bei 460 nm und 650 nm ihre Intensität in Abhängigkeit der Vitalität am stärksten veränderten.

Der Emissionspeak bei 460 nm steigt bei einem sinkendem Anteil an viablen Zellen klar an, während die Emission bei 650 nm stetig abfällt. Zwischen dem Logarithmus zur Basis 10 für den Quotienten der Emissionen bei 650 und 460 nm und dem Anteil an viablen Zellen zeigte sich eine gute Korrelation mit einem Korrelationsfaktor von $R=0,984$ (Abb. 5.11).

Somit kann anhand der Emissionen dieser beiden Wellenlängen und der Geradengleichung direkt ein Vitalitätswert (0 bis 100%) berechnet werden. Ein Wert von 100% beschreibt hierbei eine vollständig vitale Kultur:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\log_{10}\left(\frac{Em_{460}}{Em_{650}}\right) + 1,074}{0,0143}$$

MALDI-TOF-MS Messung Das direkte Beladen von MALDI-TOF-MS-Targets ist ebenfalls mit der Screeningplattform möglich. Die besten Ergebnisse für ein intaktes Protein-Profil wurden nach einer Inkubation in Sinapinsäure für mindestens 30 Minuten erreicht. Hierbei wurden nur ein geringes Kulturvolumen (80 μl) und eine verhältnismäßig einfache Probenvorbereitung benötigt.

So konnte in einem *proof-of-concept* über eine automatisierte Beladung und eine anschließende MALDI-Messung ein Beispielspektrum für eine Kultur nach 9 Tagen Inkubation im Screeningsystem erstellt werden (Abb. 5.12).

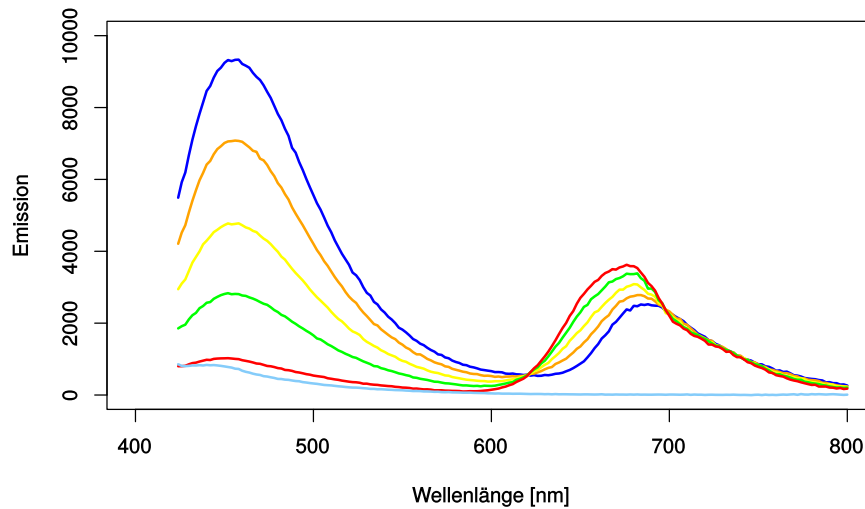


Abbildung 5.10: Emissionsspektren für verschiedene Kulturgemische mit unterschiedlichen Anteilen an viablen und nicht-viablen *Synechocystis*. Nach einer Anregung bei 390 nm wurde die Emission von 420-800 nm aufgenommen. Die Mischungen enthalten unterschiedliche Anteile viabler Zellen: 0% dunkelblau, 25% orange, 50% gelb, 75% grün, 100% rot. Die Medium-Kontrolle ist in hellblau dargestellt. Abgeändert aus Tillich et al. (2014b)

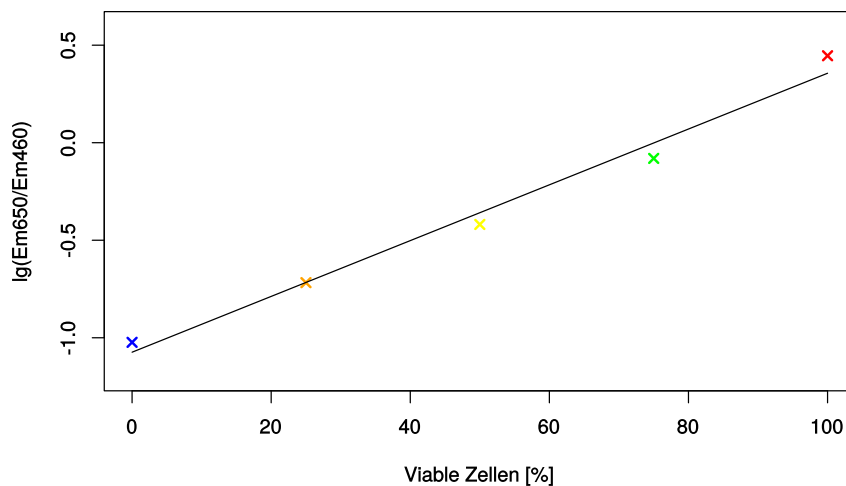


Abbildung 5.11: Logarithmus der Basis 10 des Em650/Em460 Quotienten über dem Anteil an viablen Zellen aufgetragen. Die Farben der Werte entsprechen denen aus Abb. 5.10. Eine lineare Regression ist in schwarz dargestellt. Abgeändert aus Tillich et al. (2014b).

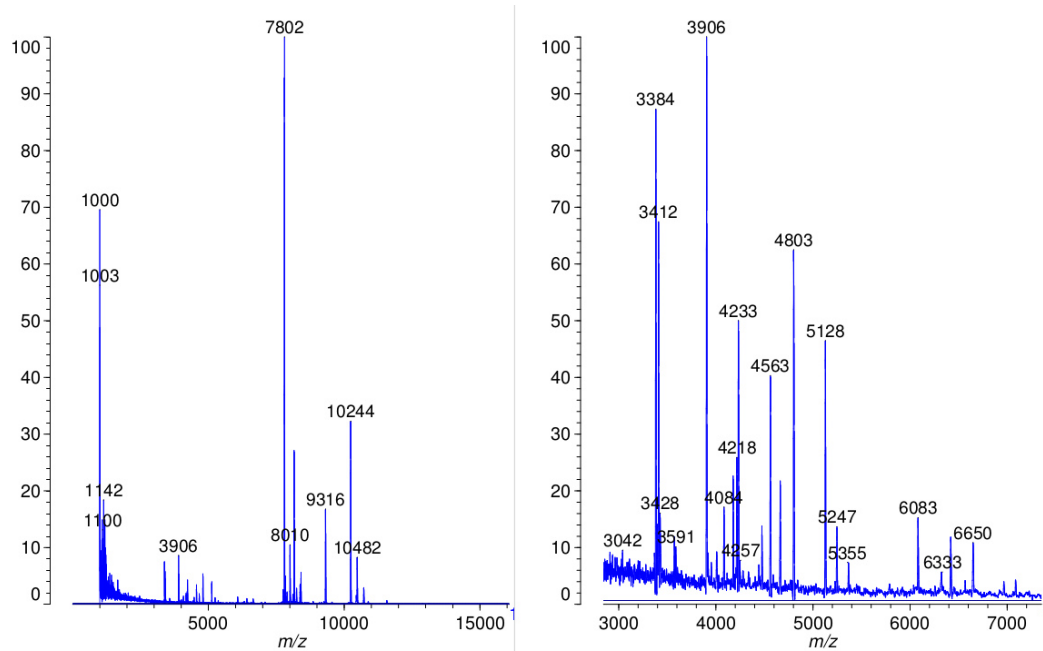


Abbildung 5.12: Intaktes Protein-Profil einer *Synechocystis*-Kultur aus dem Screeningsystem mittels MALDI-TOF-MS Messung. Die relative Signalintensität (in %) ist jeweils über die Masse pro Ladung abgebildet. Linke Seite: volles Spektrum bis 16.000 m/z; Rechte Seite: Ausschnitt der Region im Bereich von 3.000 - 7.000 m/z. Die Messungen wurden mit einem Shimadzu Axima (Konfidenz im linearen Modus; Integration von 24 Profilen) durchgeführt. Abgeändert aus Tillich et al. (2014b)

Weitere analytische Methoden Neben den zuvor beschriebenen analytischen Methoden können viele weitere Verfahren auf dem System etabliert werden. So können mit dem Plattenlesegerät unter anderem beliebige optisch-enzymatische Tests durchgeführt werden. Ein bereits etabliertes Beispiel ist die Bestimmung der Ethanolkonzentrationen in transgenen *Synechocystis*-Kulturen zur Ermittlung von Produktionsraten (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin können auch spezielle MTPs (z.B. Oxoplates oder HydroPlates der Firma Presense GmbH zur Sauerstoff- bzw. pH-Detektion) zum Einsatz kommen. Die Messung der Sauerstoffevolution von *Synechocystis* mit Oxoplates wurde ebenfalls als *proof-of-principle* getestet (Daten nicht gezeigt).

Zudem wurde das System unter Einsatz der integrierten Wasch-Station (Tecan Hydroflex) zur Präparation von Luminex Assays genutzt (Daten nicht gezeigt). Mit einer Luminex Messung können bis zu 100 Analyten (z.B. Proteine) gleichzeitig in einem Multiplexverfahren gemessen werden.

Kulturkonservierung Für die automatisierte Vorbereitung der Konservierung von Kultur wurden zwei Methoden entwickelt:

Für kurz- oder mittelfristige Lagerung können Kulturen automatisiert auf 96-Well MTPs mit BG11 Agar übertragen werden. Abhängig von Luftfeuchtigkeit, Temperatur und Belichtung können diese so bis zu mehreren Wochen gelagert werden (wie Kulturausstriche auf Agar allgemein). Kulturen können anschließend im Roboter automatisiert resuspendiert werden und auf neue Agarplatten oder direkt zum Inokulieren neuer DWPs eingesetzt werden. Untersuchungen zeigten hier, dass nach zwei Tagen wieder ein exponentielles Wachstum messbar ist (Daten nicht gezeigt). Alle getesteten Kulturen haben sich so gut lagern und wieder inokulieren lassen.

Für Langzeitlagerungen können Kulturen automatisiert auf 4 °C abgekühlt und mit DMSO in einer MTP gemischt werden, bevor diese per Hand in -80° C übertragen werden. Lagerzeiten von bis zu 6 Monaten wurden bereits bestätigt, wobei diese vermutlich quasi beliebig verlängerbar sind, insbesondere wenn noch tiefere Temperaturen gewählt werden. Zur Wiederherstellung der Kulturen müssen diese per Hand ausplattiert werden. Auch hier hat das Lagerungsprotokoll bei allen Kulturen erfolgreich funktioniert.

Kultivierungsbeispiel

Die zweite Iteration der Screeningplattform und der integrierten Kultivierungskammer erlaubt analog zu dem ersten Prototypen (5.1.1) die automatisierte Kultivierung von phototrophen Mikroorganismen. Auch hier wurden für alle Kultivierungen einige Wells nicht angeimpft und dienten als Kreuzkontaminationskontrollen.

Eine Fed-Batch-Kultivierung mit periodischen Verdünnungen (wie bei dem Versuch im Prototyp-System in Abb. 5.2) hat ähnliche Wachstumsverläufe gezeigt; es konnte erneut beobachtet werden, dass die Wachstumsraten bei höheren ODs abflachen (Daten nicht gezeigt).

Eine alternative Methode ist die semi-kontinuierliche Kultivierung. Diese ist in dem erweiterten Screeningsystem möglich, da die neuere Software des Pipettierroboters erlaubt, Messwerte als Variablen einzulesen. Somit kann nach einer OD-Messung die Verdünnung zurück zu einer festgelegten Soll-OD für jedes Well automatisch berechnet und durchgeführt werden. Durch tägliche (oder falls gewollt, häufigere) automatisierte Verdünnung ist dann eine Kultivierung möglich, bei der sich der OD-Wert nur in einem engen Bereich verändert. Wachstumsraten können jeweils aus den OD-Werten nach einer und vor der nächsten Verdünnungen berechnet werden.

Die semi-kontinuierliche Kultivierung konnte mit täglichen Verdünnungen und bei vier verschiedenen Lichtintensitäten in einem Kultivierungsexperiment über 13 Tage gut angewendet werden (Abb. 5.13). Alle anderen Kultivierungsparameter wurden konstant gehalten. Der Kultivierungsverlauf zeigt bei gleichbleibenden Bedingungen gut reproduzierbare Ergebnisse.

Deutlich erkennbar war jedoch ein unterschiedliches Wachstum für Wells am Rand der DWP gegenüber denen in der Mitte (Abb. 5.13 und Abb. 5.14). Welchs t-Test wurde eingesetzt, um die statistische Signifikanz dieser Randeffekte zu bestimmen. Beim Vergleich aller Wachstumsraten dieser zwei Gruppen ergab sich ein t-Wert von 7,02. Bei zwei Freiheitsgraden entspricht dies einem p-Wert von 0,0197. Somit besteht eine klare statistische Signifikanz zwischen den Wachstumsraten und der Position auf der Platte (Mitte vs. Rand). Der Variationskoeffizient der Wachstumsrate zwischen den Wells in der Mitte der Platte lag hingegen bei nur ca. 5% (blaue Fehlerbalken in Abb. 5.13).

Die Vitalität der Kulturen wurde täglich gemessen und betrug im Durchschnitt für alle Kulturen über den Versuchslauf 96,9%, bei einem mittlerem Variationskoeffizient von 2,16%. Die Position in der Platte hatte keine statistische Signifikanz für die Vitalität ($p=0,4952$). Das hier präsentierte Experiment zum Einfluss der Lichtintensität auf die Wachstumsrate wurde als Beispiel gewählt, um die Fähigkeiten des Screeningsystems zu demonstrieren. Die verschiedenen Kultivierungstage unter gleichen Bedingungen haben reproduzierbare Ergebnisse gezeigt und erlauben es somit, diese als Replikate zu betrachten. Die Wachstumsraten bei den verschiedenen Lichtintensitäten zeigten wie erwartet einen Anstieg mit steigender Lichtintensität (Abb. 5.14).

Ein Absorptionsspektrum im sichtbaren Bereich wurde ebenfalls täglich gemessen (Abb. 5.15). Die Spektren waren hierbei bei den verschiedenen Kultivierungstagen mit gleichen Belichtungsbedingungen konstant. Der durchschnittliche Variationskoeffizient zwischen den Kulturen betrug bei einem Photonenfluss von $15 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ nur 0,6% und für die weiteren Intensitäten 0,5%. Zwischen den unterschiedlichen Bedingungen sind jedoch Veränderungen im Spektrum wahrzunehmen, so ist die Pigmentierung der Kulturen bei einem Photonenfluss von $72 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ nennenswert reduziert. Die Position in der Platte hatte keine statistische Signifikanz auf die Absorptionsspektren der einzelnen Kulturen ($p=0,6858$).

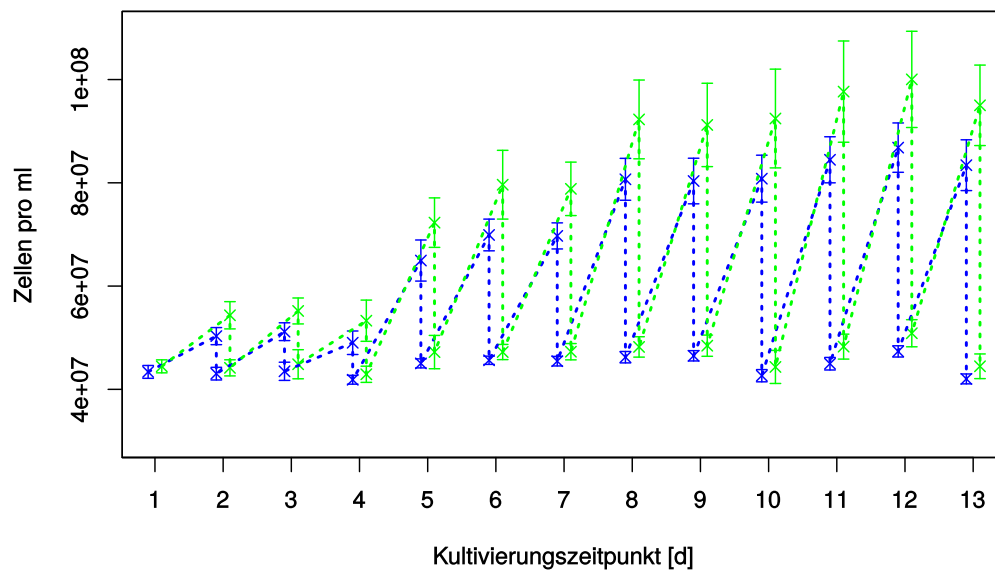


Abbildung 5.13: Semi-kontinuierliche Kultivierung über 13 Tage im weiterentwickelten Screeningsystem. Die Kulturen wurden täglich automatisiert auf $OD=0,4$ verdünnt. Die Zellzahl der verschiedenen Wells (Plattenrand (grün) & Mitte der Platte (blau)) ist über die Kultivierungsdauer aufgetragen. Die Lichtintensität (bzw. der Photonenfluss) wurde während der Kultivierung variiert [$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]: Tag 1-3: 15 ; Tag 4-7: 32 ; Tag 8-10: 51 ; Tag 11-13: 72. Abgeändert aus Tillich et al. (2014b)

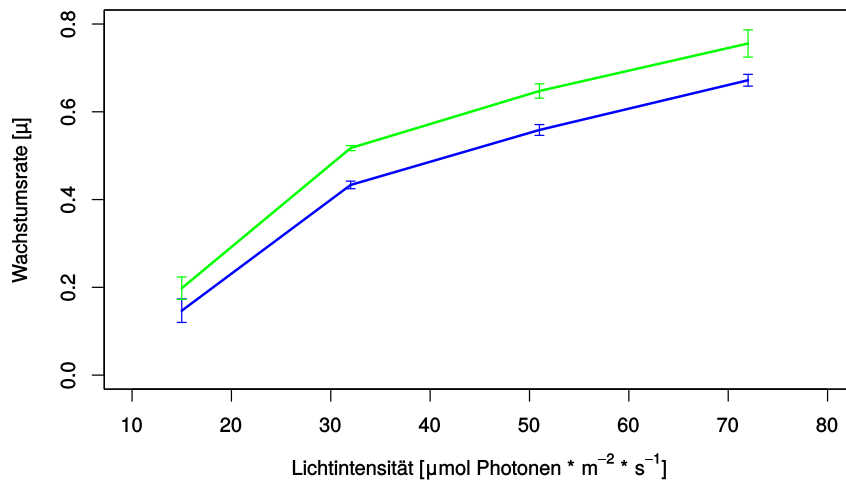


Abbildung 5.14: Durchschnittliche Wachstumsraten der Kulturen im Screeningsystem für verschiedene Belichtungsintensitäten der semi-kontinuierlichen Kultivierung. Die Wells am Plattenrand sind in grün und in der Mitte der Platte in blau dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen den Unterschieden zwischen den drei Tagen bei gleicher Belichtungsintensität. Abgeändert aus Tillich et al. (2014b)

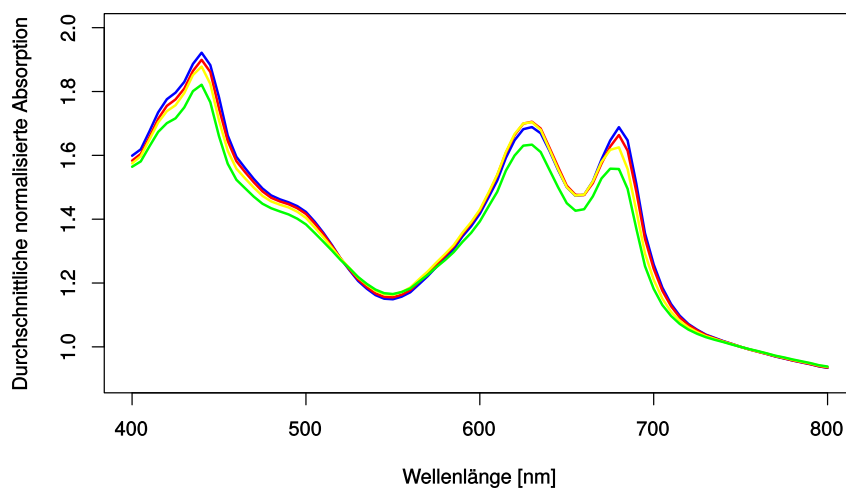


Abbildung 5.15: Durchschnittliche normalisierte Absorptionsspektren für die verschiedenen Belichtungsintensitäten im Screeningsystem. Die Kurven entsprechen jeweils dem letzten Tag bei gegebener Lichtintensität (Angaben als Photonfluss in $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$): 15 (blau); 32 (rot); 51 (gelb); 72 (grün). Abgeändert aus Tillich et al. (2014b)

5.1.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Screeningplattform für phototrophe Mikroorganismen erfolgreich entwickelt werden konnte. Das System ermöglicht eine miniaturisierte, automatisierte und parallele Kultivierung von bis zu 192 Kulturen in Deepwell-Mikrotiterplatten.

Die erste Iteration des Systems basierte auf ein Tecan Genesis RPS 150 Pipettierroboter und war bereits in der Lage die optische Dichte zu bestimmen und eine halb-automatisierte Chlorophyll-Messung durchzuführen. Beide Methoden wurden anhand einer Beispielkultivierung dargestellt.

Die zweite Iteration wurde um eine exakte Temperatursteuerung sowie einer verbesserten Methode zur Unterbindung der Kulturensedimentation erweitert. Dieses System wurde als Teil der in 5.2 beschriebenen Strategie zur Erhöhung der Temperaturtoleranz in *Synechocystis* eingesetzt.

Trotz bereits erfolgreichem Einsatz wurde das System stetig weiterentwickelt. Eine dritte Iteration basiert auf dem moderneren Pipettierroboter Tecan Freedom Evo 200; das Design der Kultivierungskammer wurde neu entworfen und das Methodenspektrum deutlich erweitert. Automatische Verdünnungen, Aufnahme von Absorptionspektren, Vitalitätsmessung und MALDI-TOF-MS-Messungen konnten hier etabliert werden. Über tägliche automatische Verdünnungen war eine semi-kontinuierliche Kultivierung möglich, anhand dessen Beispiel alle etablierten Methoden demonstriert wurden.

5.2 Adaptive Evolution zur Erhöhung der Temperaturtoleranz

Zur Erhöhung der Temperaturtoleranz in *Synechocystis* wurde eine Strategie mittels adaptiver Evolution verfolgt. Der Arbeitsablauf bestehend aus Mutagenese, *in vivo* Selektion, Screening, Validierung und Sequenzierung wird in diesem Abschnitt beschrieben. Für das Screening wurde unter anderem die in 5.1.2 beschriebene zweite Iteration der Screeningplattform für phototrophe Mikroorganismen eingesetzt.

5.2.1 Bestimmung der optimalen Mutagendosis

Bevor die Mutagenese von *Synechocystis* durchgeführt werden konnte, musste die optimale Dosis für die einzusetzenden Mutagene (UV und MMS) ermittelt werden. Hierfür wurden Kulturen unterschiedlichen Dosen an Mutagen ausgesetzt und anschließend die Überlebensrate und die relative Punktmutationsrate bestimmt. Behandelte Zellen wurden hierfür einmal auf normalen BG11-Agar-Platten (Überlebensrate) und auf Streptomycin-BG11-Agar-Platten (rel. Mutationsrate) ausgestrichen.

Teile der Ergebnisse aus diesem Kapitel wurden unter dem Titel “The Optimal Mutagen Dosage to Induce Point-Mutations in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and Its Application to Promote Temperature Tolerance” publiziert (Tillich et al., 2012b).

Ultraviolettes Licht

Die Charakterisierung von UV als Mutagen für *Synechocystis* zeigte einen exponentiellen Abfall der Kolonienzahl auf BG11-Platten mit zunehmender Dosis (Abb. 5.16). Bei 0 J/m^2 , waren es noch 100% viable Zellen, während bei 50 J/m^2 nur noch etwa 10% beobachtet wurden. Bei 100 J/m^2 waren fast keine Kolonien mehr sichtbar. Die Anzahl an Kolonien auf den Selektionsplatten, welche der relativen Menge an nicht-letalen Punktmutationen entspricht, zeigte hingegen einen klaren Peak bei 10–50 J/m^2 und fiel dann stetig mit weiter erhöhter Dosis wieder ab.

Methylmethansulfonat

Synechocystis zeigte bei der Behandlung mit MMS bei steigender Dosis einen ähnlichen exponentiellen Abfall in der Überlebensrate wie bei der Behandlung mit UV (Abb. 5.17). Bei 1 v% MMS überlebten nur noch 10% der Zellen und bei 3,5 v% waren fast keine Kolonien mehr sichtbar. Die Anzahl an überlebenden Kolonien auf Selektionsplatten zeigte unerwartet zwei konkrete Maxima: Eines bei 0,1 v% und ein Zweites bei 1 v%, mit einem beträchtlichen Abfall dazwischen. Bei Dosen über 1v% fiel die Anzahl an Kolonien wie erwartet stetig ab. Eine Wiederholung des Experiments (Daten nicht gezeigt) bestätigte die ermittelte Dosisabhängigkeit.

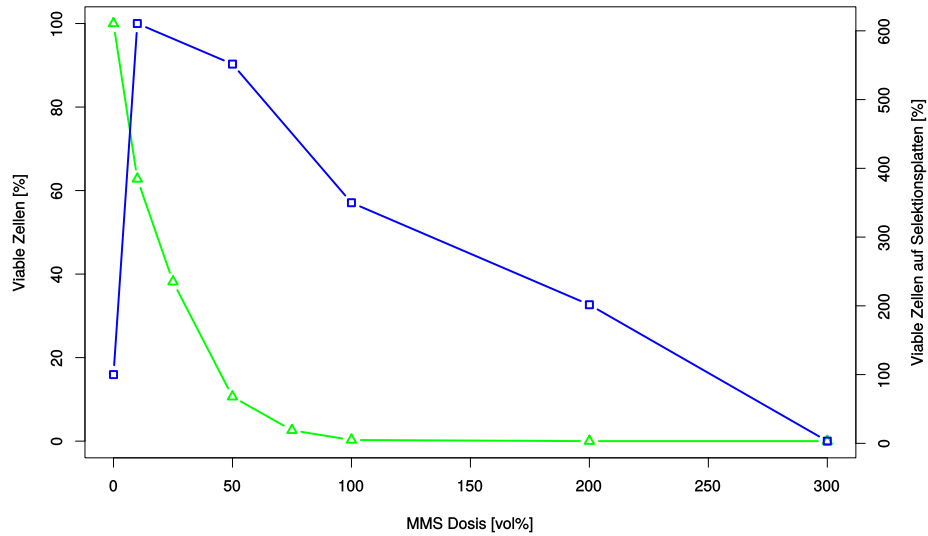


Abbildung 5.16: Charakterisierung der mutagenen Wirkung von UV. Die Überlebensrate (grün; Dreieck) und die relative Punktmutationsrate (blau; Quadrat) sind über die eingesetzte Dosis aufgetragen. Die Anzahl an Kolonien wurde für beide Kurven auf 100% für die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Abgeändert aus Tillich et al. (2012b)

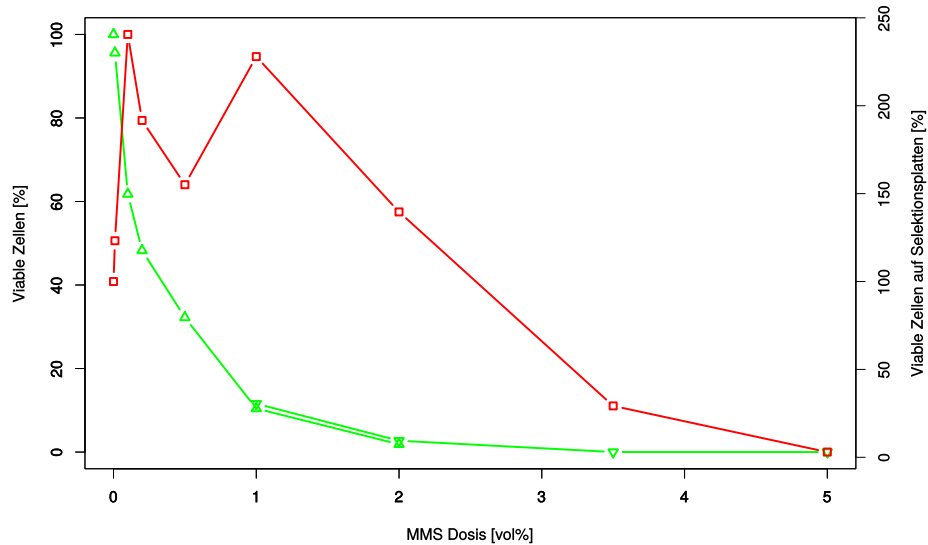


Abbildung 5.17: Charakterisierung der mutagenen Wirkung von MMS. Die Überlebensrate (grün; Dreieck aufwärts: $5 \cdot 10^4$ Zellen ausgestrichen | Dreieck abwärts: $5 \cdot 10^5$ Zellen ausgestrichen, gezählte Anzahl durch 10 dividiert) und die relative Punktmutationsrate (rot; Quadrat) sind über die eingesetzte Dosis aufgetragen. Die Anzahl an Kolonien wurde für beide Kurven auf 100% für die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Abgeändert aus Tillich et al. (2012b)

5.2.2 *In vivo* Selektion

Anhand der Ergebnisse aus 5.2.1 konnten $50\text{J}/\text{m}^2$ bzw. 0,1 und 1 v% als optimale Dosen für die Erzeugung von Punktmutationen mit den jeweiligen Mutagenen bestimmt werden (detailliert diskutiert in 6.2.1). Somit konnten die Mutagene für eine adaptive Evolution zur Erhöhung der Temperaturtoleranz in *Synechocystis* eingesetzt werden. Im Grunde besteht das Verfahren aus der Behandlung der Kultur mit dem Mutagen zur Erzeugung eines Pools an Mutanten, gefolgt von einer *in vivo* Selektion innerhalb dieses Gemisches.

Teile der Ergebnisse aus diesem Kapitel wurden unter dem Titel “The Optimal Mutagen Dosage to Induce Point-Mutations in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and Its Application to Promote Temperature Tolerance” publiziert (Tillich et al., 2012b).

Angewendete Mutagenese

Die Mutagenese wurde in vier diskreten „Runden“ durchgeführt. Eine Runde Mutagenese ist für den Zweck dieser Arbeit als der Zeitraum von der eigentlichen mutagenen Behandlung bis zur Bestimmung der neuen stabilen Maximaltemperatur des Gemischs definiert.

Jede Runde folgte dem gleichen Prozedere und kann in drei Phasen eingeteilt werden. Nach der Mutagenese begann eine stringente Selektion auf eine erhöhte Kultivierungstemperatur, in der ein Großteil der Zellen starb. Anschließend erfolgte eine Erholungsphase bei tieferer Temperatur, damit sich die restlichen Zellen erholen konnten. Als die überlebenden Zellen anfangen sich wieder zu teilen, wurde die Temperatur schrittweise erhöht, bis die neue maximal tolerierte Temperatur bestimmt werden konnte. Die Kulturen wurden hierbei verdünnt sobald sie einen OD-Wert von zwei erreichten, so dass sie ein exponentielles, auch wenn durch die stringenten Selektionsbedingungen etwas eingeschränktes, Wachstum aufzeigten. Es erfolgten üblicherweise ca. zwei Verdünnungen pro Woche. Der genaue Verlauf ist in Abschnitt 5.2.2 anhand der zweiten Mutagenese-Runde geschildert.

Die ersten beiden Mutagenese-Runden erfolgten mit UV Strahlung und die Folgenden mit MMS. Nach jeder Runde wurde die maximal tolerierte Temperatur (und somit auch die Kultivierungstemperatur) der mutagenisierten Kultur erhöht. Die Kontroll-Kultur, welche unter gleichen Bedingungen gehalten wurde, war nicht in der Lage die Selektionsbedingungen zu überleben. Tabelle 5.1 zeigt eine Zusammenfassung der erreichten maximalen Temperaturtoleranzen nach jeder Runde. Insgesamt wurde eine Verbesserung von über 2°C erreicht.

Die nach vier Runden Mutagenese erzeugte Mischkultur (MutIV) ist in der Lage bei 45°C und $23 - 26^\circ\text{C}$ in einem 12 h Tag/Nacht-Zyklus stabil zu wachsen, während der Start-wt bereits 43°C in der Tag-Phase nicht überlebte. MutIV zeigt neben der erhöhten Temperaturtoleranz keine phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp und ein Großteil der Zellen ist auch auf Agarplatten kultivierbar.

Die Population von MuvIV wurde ohne zusätzliche Mutagenese weiter *in vivo* selektiert (siehe 5.2.2) und vereinzelt, um monoklonale Stämme auf ihrer Temperaturtoleranz in der neu entwickelten Screeningplattform zu untersuchen (siehe 5.2.3).

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Selektionsbedingungen und der erreichten maximalen Temperaturtoleranzen

Mutageneserunde	Eingesetztes Mutagen	Selektionstemperatur	Erholungstemperatur	Maximale tolerierte Temperatur (Tag)
0 (wt)	keins			<43
1	UV	44	41	43.3
2	UV	44.5	42	43.8
3*	MMS	45	40	44
4	MMS	45	43	45

* Bei der dritten Runde ist es zu einem technischen Problem mit der Temperierung gekommen, so dass die Kulturen auch Nachts beheizt wurden. Nach dieser stringenteren Selektion wurde eine tiefere Erholungstemperatur gewählt, um eine Regeneration der überlebenden Zellen zu ermöglichen.

Überwachung der Zellviabilität

Während der zweiten Mutageneserunde wurde die Anzahl an viablen Zellen innerhalb der Kulturen vom Zeitpunkt der Mutagenese bis zum Ende der Erholungsphase überwacht (Abb. 5.18). Die Vorgehensweise und die Ergebnisse sind dabei repräsentativ für die zweite und vierte Mutageneserunde. Die Viabilität wurde mikroskopisch auf Zell-Ebene nach Schulze et al. (2011) ermittelt. Es wurden drei Kulturen überwacht: Eine Backup-Kultur (Ergebnis der ersten Runde; zuvor tolerierte Bedingungen), eine mutagenisierte Kultur (mit Mutagen behandelt; selektive Bedingungen) und eine Kontroll-Kultur (Ergebnis der ersten Runde; selektive Bedingungen).

Wie bei jeder Mutageneserunde wurden alle drei Kulturen aus dem gleichen Ausgangsgemisch mit ca. 90% viablen Zellen angeimpft. Bei der anfänglichen Selektionsphase fiel dieser Wert für die mutagenisierte Kultur und die Kontroll-Kultur jedoch schnell ab. Während der Erholungsphase bei tieferer Temperatur (42 °C) konnte sich die mutagenisierte Kultur nach ca. fünf Tagen erholen, während die Kontrolle bei ca. 0% blieb. Anschließend wurde die Temperatur schrittweise auf 43,5 °C angehoben, wobei für die mutagenisierte Kultur der Anteil an viablen Zellen quasi stetig zunahm. Nachdem ein stabiles Wachstum über 10 Tage bei 43,5 °C demonstriert werden konnte, wurde die Temperatur weiter schrittweise erhöht, bis ein neues Maximum für ein stabiles Wachstum bei 43,8 °C erreicht wurde und die nächste Mutageneserunde gestartet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Backup-Kultur hingegen wurde konstant bei 43,1 °C gehalten und zeigte stets einen Anteil an viablen Zellen zwischen 80 und 100% (Daten nicht gezeigt).

Verlängerte *in vivo* Selektion

Aus dem nach vier Mutageneserunden erhaltenen Gemisch (MutIV) wurden monoklonale Stämme isoliert und charakterisiert (siehe Abschnitt 5.2.3). Parallel hierzu wurde das Gemisch auch einer verlängerten *in vivo* Selektion unterzogen. Hier wurde, ohne weitere

Mutagenese, die Kultivierungstemperatur jedes Mal geringfügig erhöht, sobald ein stabiles Wachstum erreicht werden konnte. Nach etwa einem Jahr war das neue Gemisch (MutIV-2) in der Lage bei einer Maximaltemperatur von 45.8°C stabil zu wachsen.

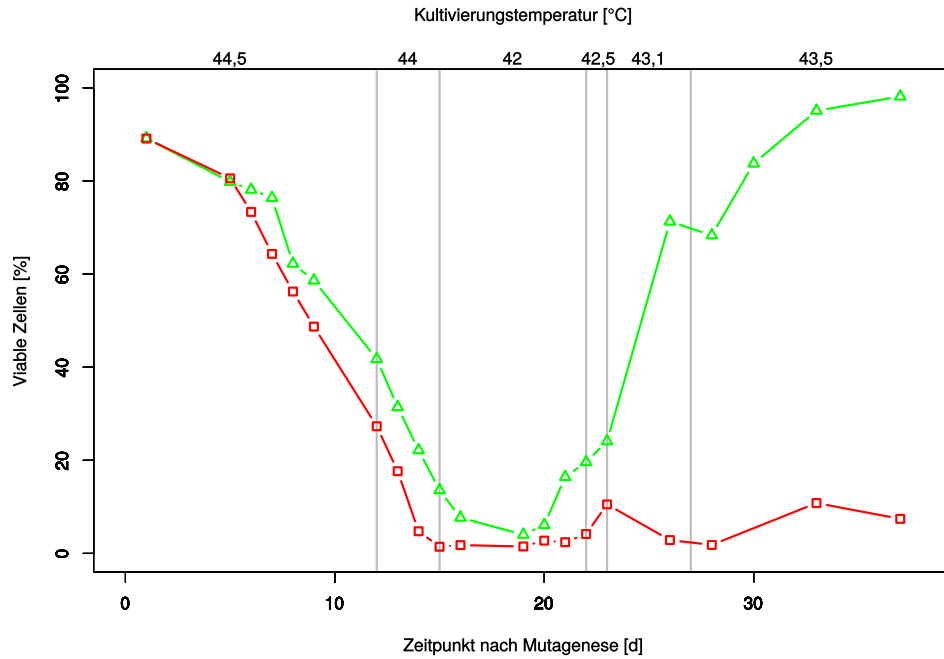


Abbildung 5.18: Kulturmonitoring während der zweiten Mutageneserunde. Der Prozentsatz an viablen Zellen sowie die Kultivierungstemperatur sind für die mutagenisierte Kultur (grün; Dreieck) und die Kontroll-Kultur (rot; Quadrat) über die Kultivierungsdauer aufgetragen. Die mutagenisierte Kultur wurde periodisch verdünnt, um diese zwischen OD=1 und 2 zu halten. Die erste Verdünnung erfolgte an Tag 23. (Tillich et al., 2012b)

5.2.3 Screening von monoklonalen Stämmen

Erste Versuche, vereinzelte monoklonale Stämme aus dem MutIV-Gemisch ohne ein Screening-Verfahren zu isolieren, führten nur zu einer Auswahl von Stämmen ohne signifikant erhöhte Temperaturtoleranz (Daten nicht gezeigt). Somit wurden zwei verschiedene Screening-Verfahren entwickelt und eingesetzt, um optimale monoklonale Stämme zu identifizieren. Teile der Ergebnisse aus diesem Kapitel wurden unter dem Titel “Screening and genetic characterization of thermo-tolerant *Synechocystis* sp. PCC 6803 strains created by adaptive evolution” publiziert (Tillich et al., 2014a).

Das erste Screening-Verfahren basiert auf der Kultivierung der monoklonalen Stämme in Zellkulturflaschen innerhalb eines konventionellen Inkubatorschranks (Inkubatorscreening). Über dieses Screeningverfahren wurden von 27 untersuchten Stämmen sechs mit einer gegenüber der Wildtyp-Kontrolle höheren Temperaturtoleranz identifiziert.

Im zweiten Ansatz wurde die zweite Iteration, der im Rahmen dieser Arbeit neu etablierten Screening-Plattform (siehe 5.1.2) mit integrierter Temperaturkontrolle eingesetzt (Roboter-screening). Hier haben 8 der 81 untersuchten Stämme eine signifikant höhere Temperaturtoleranz gezeigt. Keines der Kontrollwells zeigte eine Kreuzkontamination.

In beiden Systemen wurde das Wachstum der Kulturen bei verschiedenen Temperaturen analysiert. Jede Kultivierungstemperatur wurde hierbei mehrere Tage gehalten und täglich die optische Dichte gemessen. Die somit bestimmten Wachstumsraten wurden mittels einer modifizierten Ratkowsky-Gleichung (siehe 4.2.4) dargestellt. Über das Inkubator-Screening wurde der Stamm C5K als der mit der höchsten Temperaturtoleranz identifiziert (Abb. 5.19) und somit für eine Validierung der Temperaturtoleranz in einem 1l-Bioreaktor und zur Sequenzierung des Genoms gewählt. Über das Hochdurchsatzscreening wurden die besten vier Stämme (A1, A6, H2, und H12) identifiziert (Abb. 5.20). Auch hier erfolgte eine Validierung der Temperaturtoleranz und eine anschließende Sequenzierung (siehe 5.2.4).

Ziel des Screenings war die Identifizierung von monoklonalen Stämmen mit deutlich erhöhter Temperaturtoleranz gegenüber dem Wildtyp. Dies wurde in beiden Screeningsystemem mit einzelnen Stämmen erreicht, der Wildtyp zeigte jedoch eine bessere Temperaturtoleranz als zumindest ein Teil der mutierten Stämme (Daten nicht gezeigt). Das Gemisch aus allen Klonen (MutIV) hat hingegen durchweg die höchste Temperaturtoleranz gezeigt. MutIV demonstrierte weiterhin ein robusteres Wachstum über verschiedene Temperaturen, während die monoklonalen Stämme schärfere Optimaltemperaturen aufwiesen. Dieser Effekt war besonders im Hochdurchsatzscreening zu beobachten (Abb. 5.20).

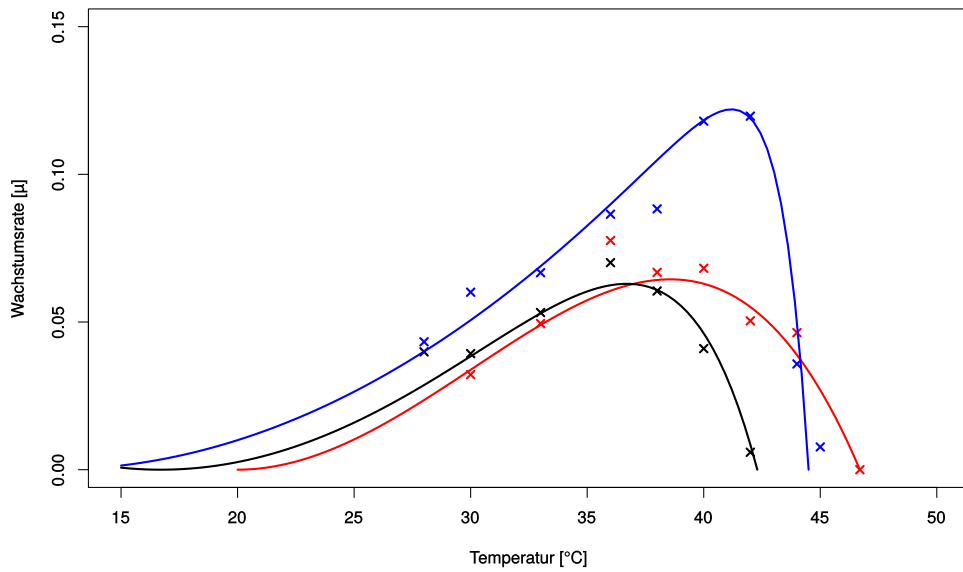


Abbildung 5.19: Wachstumsraten verschiedener monoklonaler Stämme über der Kultivierungstemperatur im Inkubator-Screening: Wt (schwarz), MutIV-Gemisch (rot) und C5K (blau). Abgeändert aus Tillich et al. (2014a)

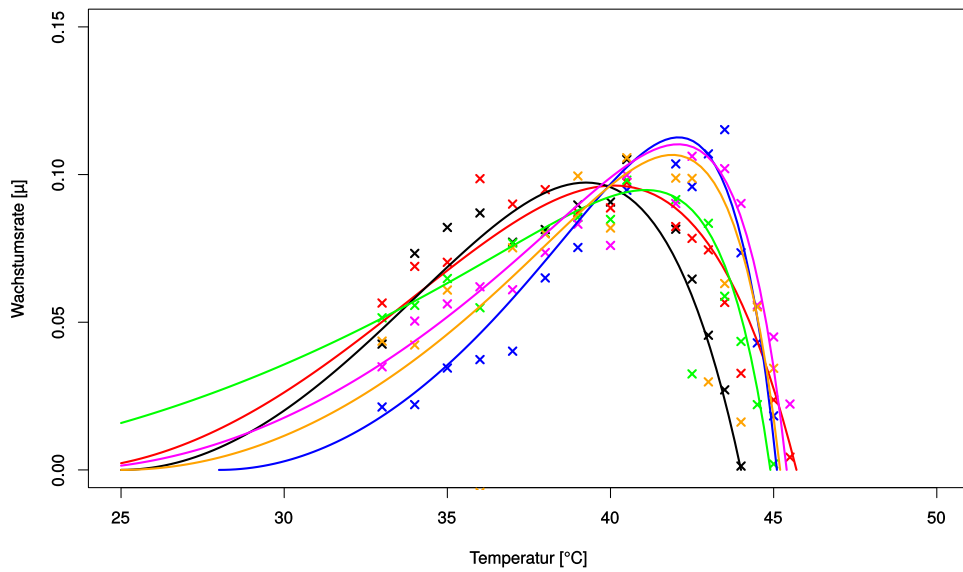


Abbildung 5.20: Wachstumsraten verschiedener monoklonaler Stämme über der Kultivierungstemperatur im Hochdurchsatzscreening: Wt (schwarz), MutIV-Gemisch (rot), A1 (grün), A6 (blau), H2 (magenta) und H12 (orange). Abgeändert aus Tillich et al. (2014a)

5.2.4 Phänotypische und genotypische Charakterisierung

Die Temperaturtoleranz der zuvor identifizierten Stämme wurde durch Kultivierung in größerem Maßstab (11 Photobioreaktoren) validiert. Die Kultivierungstemperatur wurde hierzu langsam und schrittweise (nahe des Maximums in $0,1^{\circ}\text{C}$ Schritten) erhöht, bis die Temperatur identifiziert wurde, bei welcher ein Stamm nicht mehr in der Lage war, mindestens zwei Wochen stabil zu wachsen.

Anschließend wurden diese monoklonalen Stämme, sowie das Gemisch an Stämmen mit verlängerter Selektion (MutIV-2, siehe 5.2.2), mit NGS und Sanger sequenziert. Verschiedene Mutationen wurden identifiziert, welche die erhöhte Toleranz vermitteln.

Teile der Ergebnisse aus diesem Kapitel wurden unter dem Titel “Screening and genetic characterization of thermo-tolerant *Synechocystis* sp. PCC 6803 strains created by adaptive evolution” publiziert (Tillich et al., 2014a).

Validierung der Temperaturtoleranz

Die Validierung der verschiedenen monoklonalen Stämme aus dem Screening im 1l-Photobioreaktor ergab Temperaturtoleranzen zwischen 44.9 und 45.1°C . Diese liegen den 45°C , welche als maximal tolerierte Temperatur des Ausgangsgemisches (MutIV) zum Zeitpunkt der Isolierung bestimmt wurde, sehr nahe. Das nach einem zusätzlichem Jahr selektiver Kultivierung erhaltene Gemisch (MutIV-2) erreichte mit 45.8°C eine nochmals deutlich höhere Temperaturtoleranz.

Die Ergebnisse der maximal tolerierten Temperaturen für alle Stämme und Gemische sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

Tabelle 5.2: Identifizierte Temperaturtoleranzen der verschiedenen Stämme in den jeweiligen Kultivierungssystemen. Abgeändert aus Tillich et al. (2014a)

Stamm	Maximaltemperatur im Screening	Maximaltemperatur im Bioreaktor
wt	$44.0^{\circ}\text{C}/42.3^{\circ}\text{C}^*$	43.0°C
C5K	44.5°C^*	44.9°C
A1	44.9°C	45.0°C
A6	45.1°C	45.0°C
H2	45.4°C	45.2°C
H12	45.2°C	45.0°C
MutIV-Gemisch	$45.7^{\circ}\text{C}/48^{\circ}\text{C}^*$	45.0°C
MutIV-2-Gemisch		45.8°C

* Screening in T75 Flasche; alle anderen in der automatisierten Screening-Plattform

Sequenzierung

Wildtyp-Referenz Um nur Mutationen zu identifizieren, welche durch die Mutagenese und adaptive Evolution neu entstanden sind, wurde zunächst der Ausgangs-Wildtyp als Vergleich für weitere Analysen sequenziert.

Die zusammengelegte Sequenziertiefe beider 454 GS Junior Sequenzierungen lag bei 19X mit einer durchschnittlichen Sequenziergenauigkeit für individuelle Basen in einem Read von 99.57% und einer Median-Readlänge von 534bp. Es wurden einige Veränderungen gegenüber dem publizierten Kazusa-Wildtyp Genom, welcher als Mapping-Referenz verwendet wurde, gefunden:

Es haben vier große Deletionen stattgefunden, drei davon auf dem Chromosom (Positionen 1.200.305 - 1.201.486; 2.048.411 - 2.049.595 und 3.400.331 - 3.401.515) und eine auf dem Plasmid pSYSM (Positionen 117.276 - 118.460). Weiterhin wurden einige Punktmutationen identifiziert (siehe Tab. 7.1 im Anhang auf Seite 122), welche auch in den folgenden Sequenzierungen der temperaturtoleranten Stämme bestätigt wurden. Die Plasmide pCC5.2 und pCB2.4 konnten hingegen überhaupt nicht identifiziert werden; kein einziger Read wurde vom Mapping-Algorithmus auf sie zugeordnet. Auch separate Blast-Alignments aller ungemappten Reads ergaben keinen Hit auf diese Plasmide.

Monoklonale temperaturtolerante Stämme Die DNA der fünf ausgewählten monoklonalen Stämme, sowie der Wildtyp-Kontrolle wurden ebenfalls mit NGS Technologie (Ion Torrent PGM) sequenziert.

Für die monoklonalen Stämme wurden hierbei Sequenziertiefen von 18.4X bis 41X (Wt-Kontrolle: 41x, C5K: 28.3x, A1: 24.2x, A6: 20.3x, H2: 18.4x, H12: 32.3x) erreicht, welche für eine Identifizierung von Punktmutationen ausreichend sind. Die durchschnittliche Sequenziergenauigkeit für individuelle Basen in den jeweiligen Reads lag bei einer Median-Readlänge zwischen 141bp und 226bp (Wt-Kontrolle: 203bp, C5K: 218bp, A1: 216bp, A6: 141bp, H2: 226bp, H12: 221bp) immer über 99% (Wt-Kontrolle: 99.2%, C5K: 99.5%, A1: 99.4%, A6: 99.2%, H2: 99.3%, H12: 99.4%).

Wie erwartet wurden in der Wildtyp-Kontrolle keine neuen Mutationen gegenüber dem Ausgangs-WT identifiziert, obwohl dieser während der Screeningprozedur ebenfalls einem Selektionsdruck ausgesetzt wurde.

Bei den monoklonalen Stämmen wurden hingegen verschiedene Mutationen identifiziert. Um Falsch-Positive auszuschließen, welche möglicherweise durch die Sequenzierertechnologie oder den Mapping-Algorithmus eingeführt worden waren, wurden die Ergebnisse mit Sanger Sequenzierung validiert. Tabelle 5.3 zeigt eine Matrix der richtig-positiven Mutationen in den einzelnen Stämmen. Wie erwartet stellten sich alle geprüften Indel-Mutationen in homopolymeren Bereichen als falsch-positiv heraus und sind nicht in der Tabelle enthalten.

Stamm-Gemisch nach verlängerter Selektion Zur Validierung der bereits identifizierten Mutationen und um die durch die verlängerte Selektion hervorgerufenen Genotyp-Veränderungen zu bestimmen, wurde MutIV-2 ebenfalls sequenziert. Um für MutIV-2 quantitative Aussagen über die Mutationsverteilung treffen zu können und auch Mutationen zu identifizieren, welche nur in einem Teil der Stämme in dem Gemisch vorkommen, wurde hier eine durchschnittliche Sequenziertiefe von 123.5X erreicht. Die durchschnittliche Sequenziergenauigkeit und Median-Readlänge lag hierbei jeweils bei 99% und 188bp. Die Ergebnisse bestätigten viele der zuvor identifizierten Mutationen bzw. Gene (Tabelle 5.4); andere Mutationen wurden hingegen gänzlich neu identifiziert (Tabelle 5.5).

Tabelle 5.3: Matrix von richtig-positiven Mutationen in den sequenzierten monoklonalen Stämmen.
Vorhandene Mutationen sind mit einem X gekennzeichnet. Abgeändert aus Tillich et al. (2014a)

Position	Mutationstyp	Gen	WT	Mutante	C5K	A1	A6	H2	H12
96437	AS-Austausch	pnp	gAg	gGg	X*				
98129	AS-Austausch	pnp	aTg	aCg	X*	X			X*
195523	AS-Austausch	slr1098	gGc	gTc	X*				
494155	AS-Austausch	PilJ	Cgg	Tgg		X	X*	X*	X*
1103495	AS-Austausch	pyk2	ttC	ttA				X*	
1103586	AS-Austausch	pyk2	gGa	gAa	X	X			X*
1133812	Intergenisch		G	T	X	X			
1436521	Rastermutation	cya1	-	GCAA		X			
2260225	Intergenisch		-	A	X	X			X*
2466798	AS-Austausch	clpC	gTg	gCg	X*				X*
2466808	AS-Austausch	clpC	Cgt	Tgt	X*	X			
2467723	AS-Austausch	clpC	Gac	Tac	X*				
2468031	AS-Austausch	clpC	gTt	gCt	X*				
2579829	AS-Austausch	slr0064	Ttg	Atg	X*				X*
2717197	Rastermutation	pyrR	-	TAATTAACTCCAC	X	X			
3371838	AS-Austausch	SigF	Cgt	Tgt		X	X	X*	X

* Mutation mit gemischten Signalen (NGS und Sanger); wt-Variante noch messbar.

Tabelle 5.4: Mutationshäufigkeiten in MutIV-2 von Genen, welche bereits in den monoklonalen Stämmen identifiziert wurden (Tabelle 5.3). Abgeändert aus Tillich et al. (2014a).

Position	Mutationstyp	Gen	WT	MutIV-2	Prozent
98129*	AS-Austausch	pnp	aTg	aCg	100
194955	Rastermutation	slr1098	-	T	12
195111	AS-Austausch	slr1098	Agt	Ggt	24
1103495*	AS-Austausch	pyk2	ttC	ttA	1
1103586*	AS-Austausch	pyk2	gGa	gAa	94
1133812*	Intergenisch		G	T	52
1435867	Rastermutation	cya1	ATGGTCGACG	-	41
2260225*	Intergenisch		-	A	100
2466798*	AS-Austausch	clpC	gTg	gCg	46
2466808*	AS-Austausch	clpC	Cgt	Tgt	8
2466882	AS-Austausch	clpC	gTa	gCa	10
2467723*	AS-Austausch	clpC	Gac	Tac	5
2468031*	AS-Austausch	clpC	gTt	gCt	21
2579430	Rastermutation	sl0064	-	CCCTG	61
2717183	Rastermutation	pyrR	AAGGTAA	GTGGCTTAA...	11
2717187	Rastermutation	pyrR	-	TTAACTCCACTAA	70

* Identische Mutation wurden auch in mindestens einem der monoklonalen Stämme identifiziert

Tabelle 5.5: Mutationshäufigkeiten in MutIV-2 von Genen, welche nicht zuvor in den monoklonalen Stämmen identifiziert worden sind. Abgeändert aus Tillich et al. (2014a).

Position	Mutationstyp	Gen	WT	MutIV-2	Prozent
57479	AS-Austausch	glgA	gCc	gTc	22
853615	AS-Austausch	rpoC2	cGg	cTg	38
2499596	AS-Austausch	recG	gCg	gTg	70
2850065	AS-Austausch	hemH	Gat	Tat	22
3169828	AS-Austausch	cmpA	Ggt	Agt	54
3553027	Intergenisch		A	G	16

Temperaturtoleranz assoziierte Gene

Eines der interessantesten Gene mit identifizierten Mutationen ist *clpC*, eine ATP-abhängige Clp-Protease-ATPase-Untereinheit. Insgesamt wurden hier fünf diskrete Mutationen identifiziert, vier davon in den monoklonalen Stämmen und eine zusätzliche in dem MutIV-2 Gemisch. Keiner der monoklonalen Stämme enthielt jedoch alle Mutationen. C5K hat mit drei die meisten, wovon A1 eine teilt, während H12 eine weitere enthält. Vier der identifizierten Mutationen (Positionen 2466798, 2466808, 2466882 und 2467723 - jeweils in H12/MutIV-2, A1/C5K/MutIV-2, MutIV-2 und C5K/MutIV-2) befinden sich zwischen den bekannten Domänen des Proteins. Die Mutation an Position 2466798 ist hierbei mit 45% aller Reads mit Abstand die häufigste in dem Gemisch MutIV-2. Die letzte Mutation (Position 2468031 - in C5K/MutIV-2) sitzt in der ATPase (ATP bindenden) Domäne und ist mit 20,5% die zweithäufigste in MutIV-2.

Ein weiteres Gen, welches mehr als eine Mutation aufweist ist *pnp*, eine Polyribonukleotid - Nukleotidyltransferase. *Pnp* ist Teil des Degradosoms, welches zur Verarbeitung von ribosomaler RNA beiträgt und Messenger-RNA abbaut. Es wurden zwei Aminosäureaustausche (Position 96437 und 98129) identifiziert, wobei beide Mutationen meist nicht in allen Reads detektierbar waren. Die erste Mutation (Position 96437; C5K) befindet sich innerhalb der S1-Superfamilie-Region, welche die RNA-Binde-Domäne enthält, während die Zweite (Position 98129; C5K, A1, H12 und MutIV-2) in der RNase Domäne ist. In der Sequenzierung von MutIV-2 ist die zweite Mutation in allen Reads identifiziert worden, während die Erste nicht mehr detektierbar war.

Sowohl in A1 wie in C5K wurde eine Insertion in *pyrR*, einer Uracil - Phosphoribosyltransferase identifiziert. In MutIV-2 waren zwei zusätzliche Rastermutationen in *pyrR* detektierbar, eine Insertion an Position 2717183 (in 10,9% der Reads) oder eine weitere an Position 271787 (in 70,4% der Reads). *PyrR* katalysiert den Abbau von Uracil zurück zu Uridinmonophosphat für die Synthese neuer RNA Moleküle. Die Mutation in A1 und C5K fügt eine Repeat-Sequenz mit Stopp-Codon am Ende des Gens ein und ändert die letzten Aminosäuren somit von VELIKG zu WS. Das 178 Aminosäuren lange Protein wird hierbei um vier AS gekürzt. Die in MutIV-2 detektierten Mutationen verändern ebenfalls das Ende des Proteins. Die Häufigere an Position 2717187 verlängert es nur geringfügig von KG zu NSTN. Die Mutation an Position 2717183 hingegen entfernt den Stop-Codon, was zu einer Veränderung der letzten 13 Aminosäuren und einer Verlängerung um weitere 40 führt (LQST-QNAEFFCHWFWSILSAAFVLCVDFWRLSDPTGGAGIPLFRPGHRGDRLLKKTG). Keine der Mutationen betrifft direkt die aktive PyrR-Multi-Domäne.

Eine andere sehr interessante Mutation ist der Basenaustausch in *sigF* (in A6, H12 und H2), einem RNA-Polymerase Sigmafaktor. Die identifizierte Mutation liegt in der Region-4 Domäne, welche in Sigma-70 Proteinen die DNA-Bindestelle ausmacht.

Die gleichen drei Stämme (A6, H12 und H2) welche eine Mutation in *SigF* aufwiesen, zeigten auch einen Aminosäuretausch in *pilJ*. Die hier identifizierte Mutation befindet sich in dem Rezeptorbereich des Gens. *PilJ* und *SigF* sind die einzigen in den monoklonalen Stämmen

identifizierten Gene, welche in dem MutIV-2 Gemisch weder mit bekannten, noch mit neuen Mutationen bestätigt werden konnten.

Das letzte Gen, in welchem mehr als eine Mutation (Positionen 1103495 und 1103586) identifiziert werden konnte, ist *pyk2*. Außer A6 haben alle monoklonalen Stämme eine Mutation in *pyk2*, jedoch kein Stamm beide. In MutIV-2 ist die erste Mutation kaum detektierbar, während die Zweite in fast allen Reads (94.4%) detektiert wurde. Beide Mutationen befinden sich innerhalb der konservierten Regionen des Proteins.

In den Stämmen C5K, A1 und H12 wurde eine intergenische Mutation an der Position **2260225** identifiziert. Diese liegt strangaufwärts von dem Gen *nlpD*, einer mutmaßlichen Peptidase.

In *cya1*, der wichtigsten Klasse III Adenylylcyclase in *Synechocystis*, wurden zwei verschiedene Mutationen identifiziert, welche einen vorzeitigen Stopp-Codon einfügen: Eine Insertion in dem Stamm A1 und eine Deletion in 41.3% der Reads von MutIV-2. Die in A6 detektierte Mutation reduziert die Länge des 337 AS langen Proteins um 37 AS und ändert die letzten Acht zu SNCSAAHH. Die Mutation in MutIV-2 reduziert hingegen die Länge um 262 Aminosäuren und tauscht die Letzte aus.

Das Gen *slu0064*, welches für ein Periplasmaprotein und vermeintlichen AS - Transporter codiert, hat ebenfalls zwei nicht voll segregierte Mutationen aufgezeigt. Eine an Position 2579829 in C5K/H12 und eine weitere an Position 2579430 in 61% der Reads von MutIV-2. Die Mutation in den monoklonalen Stämmen führt zu einem Aminosäureaustausch in der aktiven Domäne. Die Mutation in MutIV-2 führt zu einer Verkürzung des Proteins um 28 AS und einem Austausch der letzten 10 AS, befindet sich jedoch außerhalb der aktiven Domäne oder der Gelenkregion.

In dem Gen für das hypothetische Protein *slr1098* wurden drei unterschiedliche Mutationen identifiziert: Zwei Substitutionen (C5K bzw. 11.7% von MutIV-2) und eine Insertion (23.7% von MutIV-2). Die in MutIV-2 identifizierte Rastermutation führt ein Stop-Codon ein und kürzt das Protein von 252 auf nur 38 Aminosäuren und ändert die letzten fünf Aminosäuren. Weiterhin wurde eine intergenische Mutation an Position **1133812**, sowohl in dem monoklonalen Stamm A1 wie auch in 51.9% der Reads von MutIV-2 identifiziert. Diese Mutation befindet sich strangaufwärts von den hypothetischen Proteinen *slu0875* und *slr0876*.

In MutIV-2 wurden Mutationen in den Genen *glgA*, *rpoC2*, *recG*, *hemH* und *cmpA*, sowie eine intergenische Mutation an der Position **3553027** (strangaufwärts von *fur* und *slr0596*) identifiziert welche in keinem der monoklonalen Stämme vorhanden waren. Die häufigsten Mutationen sind hierbei in *recG* mit 70% und in *cmpA* mit 54% der Reads identifiziert worden.

RecG ist in die DNA Reparatur über die homologe Rekombination involviert. Die Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch in der Nukleotidbinderegion der HELICc-Domäne. *CmpA* ist Teil des Kohlenstoffanreicherungsapparats in Cyanobakterien (CCM; „Carbon concentrating mechanism“). Die Mutation führt auch hier zu einem Aminosäureaustausch in der aktiven Domäne (NMT1_2; TauA Multidomäne).

5.2.5 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse zur Erhöhung der Temperaturtoleranz in *Synechocystis* mittels adaptiver Evolution beschrieben.

Als erstes wurden die optimalen Dosen für die Induktion nicht-letaler Punktmutationen für die Mutagene UV und MMS identifiziert. Nach einer mutagenen Behandlung wurde eine *in vivo* Selektion durchgeführt, um Stämme mit erhöhter Temperaturtoleranz anzureichern. Dieser Prozess konnte anhand einer neu entwickelten Methode zur Bestimmung der Zellviabilität in *Synechocystis* überwacht werden. Nach vier diskreten Behandlungen mit Mutagen und anschließender Selektion wurde die maximale Temperaturtoleranz des Gemischs auf bis zu 45°C erhöht, bevor ein Screening mit hieraus isolierten monoklonalen Stämme durchgeführt wurde.

Hierbei wurden die in 5.1 beschriebene Screeningplattform und ein konventionelles System eingesetzt, um die monoklonalen Stämme einzeln zu charakterisieren und die temperaturtolerantesten zu identifizieren. Diese Ergebnisse wurden über die anschließende Kultivierung in 1l-Photobioreaktoren validiert.

Parallel wurde die *in vivo* Selektion des Gemisches weitergeführt und so die maximale Temperaturtoleranz auf insgesamt 45,8°C erhöht.

Das Genom dieses Gemisches sowie die identifizierten monoklonalen Stämme C5K, A1, A6, H2 und H12 wurden daraufhin sequenziert. In den monoklonalen Stämmen konnten gegenüber der Wildtyp-Referenz Mutationen in den Genen *clpC*, *pnp*, *pyrR*, *sigF*, *pilJ*, *pyk2*, *cya1*, *sll0064*, *slr1098*, sowie strangaufwärts von *nlpD*, *sll0875* und *slr0876* identifiziert werden. Diese wurden durch die Ergebnisse der Sequenzierung des Gemisches größtenteils validiert. Zusätzlich wurden hier weitere Mutationen mit einem hohen Konfidenzniveaus in den Genen *recG* und *cmpA* erkannt.

6 Diskussion

6.1 Hochdurchsatz Screeningplattform für phototrophe Mikroorganismen

Eine Hochdurchsatz Kultivierungs- und Screeningplattform für phototrophe Mikroorganismen konnte erfolgreich etabliert werden.

Bereits die Ergebnisse des Kultivierungslaufs mit der ersten Iteration des Systems haben gezeigt, dass der Aufbau der Hochdurchsatzplattform für Anwendungen mit *Synechocystis* gut geeignet ist. Eine parallele Kultivierung der Cyanobakterien in Mikrotiterplatten innerhalb der Kultivierungskammer konnte erfolgreich durchgeführt werden und die neu etablierten Methoden zeigten konsistente und reproduzierbare Daten.

Nach der Erweiterung der Kultivierungskammer um ein Temperierungssystem, konnte die zweite Iteration des Screeningsystems erfolgreich für die Selektion temperaturtoleranter monoklonaler Stämme eingesetzt werden. Das Screening auf Temperaturtoleranz wird in 6.2.3 diskutiert.

Die Plattform wurde dennoch stetig weiterentwickelt und verbessert. Die dritte Iteration umfasst neben neuer Hardware ein deutlich ausgeweitetes Methodenspektrum und wird in diesem Kapitel vorrangig diskutiert.

6.1.1 Analytische Methoden der Screeningplattform

Folgend werden die etablierten Methoden und anschließend die Beispielkultivierungen in der ersten und dritten Iteration des Screeningsystems diskutiert.

Inokulation Das Inokulieren von Kulturen konnte sowohl per Hand mit Impfösen, wie vollautomatisch mit einem Pickingroboter erfolgreich demonstriert werden. Hierbei wachsen die Kulturen direkt in den DWP's innerhalb des Roboters an.

Meist dauerte die lag-Phase nach dem Inokulieren ca. eine Woche bevor ein deutliches Wachstum messbar war (z.B. 5 Tage in Abb. 5.2 auf Seite 46). In der lag-Phase müssen sich die Kulturen erst an die Umgebung in der Flüssigkultur anpassen und dann häufig genug teilen, bis die Zellzahl die untere Nachweisgrenze von ca. 10^7 Zellen pro Milliliter überschreitet.

Eine effiziente Vereinzelung ist entscheidend, um monoklonale Stämme analysieren zu können. Besonders das automatisierte Picking ist für Hochdurchsatzapplikationen von Interesse, da hier mit wenig personellem Aufwand tausende Klone reproduzierbar in kurzer Zeit überführt werden können. Die Geräte-Software erlaubt weiterhin eine Vorselektion (z.B. auf die Größe der Kolonien oder mit entsprechender Nachrüstung auf Fluoreszenzintensität).

Auch eine Vereinzelung mit einem FACS sollte gut umsetzbar sein. Viele Modelle erlauben ein direktes Einsortieren von einzelnen Zellen in Mikrotiterplatten. Somit könnten die Stärken des hier präsentierten Systems mit den zuvor publizierten FACS basierten Screeningsystemen (Doan und Obbard, 2012; Pereira et al., 2011) leicht kombiniert werden.

Kultivierung im Screeningsystem Kultivierungen innerhalb aller Varianten der Roboterintegrierten Kultivierungskammer haben gezeigt, dass mit den ermittelten Parametern gute Wachstumsraten erreicht werden können.

Die zur zweiten Iteration des Systems eingeführte Zugabe von Beads in die DWPs hat es ermöglicht, selbst bei orbitalem Schütteln, die Kultursedimentation vollständig zu unterbinden. Somit können perspektivisch, bei weiterem Hochskalieren der Kultivierungsplätze innerhalb des Screeningsystems, günstige Orbital-Schüttler verbaut werden.

Die bei jedem Experiment mitgeführten Medium-Kontrollen haben nie Wachstum (über die OD₇₅₀ gemessen) gezeigt. Bereits das Übertreten weniger Zellen aus einem angeimpften Well hätte jedoch zu einer Zunahme der OD geführt. Somit können Kreuzkontamination zwischen den Wells durch das Schütteln oder die Probenentnahme ausgeschlossen werden. Jedes Well kann also als ein eigenständiger miniaturisierter Bioreaktor betrachtet werden.

Die ebenfalls zur zweiten Iteration eingeführte Temperierung erlaubt eine sehr genaue Temperatursteuerung. Sie konnte selbst bei komplexeren Profilen erfolgreich eingesetzt werden, um die Temperaturtoleranz vieler einzelner Stämme zu vergleichen (siehe 6.2.3).

Das System hat auch eine gute Sterilität demonstriert. So waren heterotrophe Kontaminanten bei verlängerter Kultivierung zwar nachweisbar, haben aber das Wachstum der Kulturen nicht beeinträchtigt. Sollte eine vollständig axenische Kultivierung erforderlich sein, kann die gesamte Screeningplattform in eine sterile Arbeitszelle integriert werden, was jedoch eine beträchtliche zusätzliche Investition bedeuten würde.

Optische Dichte und Zellzahlbestimmung Die optische Dichte konnte mit dem Einsatz von nur 80 μ l Kulturvolumen gut bestimmt werden und hat sich auch in dem Screeningsystem als geeigneter Parameter zur Wachstumsmessung herausgestellt.

Für die dritte Iteration des Systems wurde eine direkte Umrechnung zur Zellzahl eingeführt. Solch eine Umrechnung ist wichtig, da eine Messung der optischen Dichte selbst bei gleicher Breite der Flüssigkeitssäule immer vom Messinstrument abhängt (Abstand der Probe zum Sensor). OD-Messungen verschiedener Geräte sollten also nicht direkt verglichen werden, sondern erst in die Zellzahl umgerechnet werden.

Die Zellzahl hat sehr gut mit der optischen Dichte bei 750 nm korreliert. Somit konnte mit einer einfachen Messung schnell die entsprechende Zellzahl berechnet werden.

Absorptionsspektrum Die Aufnahme eines Absorptionsspektrums, welche durch die Integration eines modernen Plattenphotometers in die dritte Iteration des Screeningsystem ermöglicht wurde, erlaubt es, schnell eine Messung der Zellpigmentierung zu erhalten. Mit ihr wiederum, kann ein Eindruck über den Gesamtzustand der Kulturen gewonnen werden, da die Phycobiliproteine stressbedingt abgebaut werden (Grossman et al., 1993).

Bei einigen Anwendungen und Stämmen könnte es relevant sein, den Einfluss von Umweltbedingungen (bzw. Kultivierungsparametern) oder von genetischen Veränderungen auf die Pigmentierung zu beobachten. Beispielsweise könnte dies von besonderem Interesse sein, wenn ein Screening auf optimale Stämme (oder Bedingungen) für die Carotinoid-Produktion durchgeführt wird.

Chlorophyllkonzentration Die Chlorophyllkonzentration wird in Cyanobakterien- und Mikroalgen-Kultivierungen häufig als Wachstumsparameter gemessen. Vor allem bei filamentösen Organismen, bei denen eine Bestimmung des OD-Werts nicht möglich bzw. sinnvoll ist, wird über den Chlorophyllgehalt die Zellzahl approximiert. Dies ist natürlich nur möglich, wenn eine repräsentative Probe aus der Kultur entnommen werden kann, also die Zellen nicht zu stark aggregieren.

Die Gesamtkonzentration an Chlorophyll hängt jedoch nicht allein von der Zellzahl, sondern auch von der Pigmentierung der jeweiligen Zelle ab. Diese ist wiederum von verschiedenen Faktoren wie Vitalität, Nahrungsangebot und Belichtungsbedingungen beeinflusst (Marsac, 1977). Sofern sowohl die Chlorophyllkonzentration wie auch die OD gemessen werden können, kann das Verhältnis dieser Werte genutzt werden, um auf die Pigmentierung pro Zelle rückzuschließen.

Insgesamt scheint die automatisierte Bestimmung der Chlorophyllkonzentration jedoch nicht so genau wie andere Methoden durchführbar zu sein. Hierfür könnte es mehrere Gründe geben. Auch die manuelle Bestimmung der Chlorophyllkonzentration zeigt eine verhältnismäßig hohe Standardabweichung, weshalb dies üblicherweise zumindest in Doppelbestimmung durchgeführt wird. Dies könnte auf eine nicht vollständige Extraktion oder auf die Photolabilität der Proben nach der Extraktion zurückzuführen sein. Bei der automatisierten Bestimmung kommt noch hinzu, dass trotz der eingesetzten Rundbodenplatten und dem einprogrammierten Abstand zum Boden der Roboter möglicherweise bei einigen Proben das Pellet anteilig mit aufgenommen hat und somit die Messung beeinflusst wurde. Die Standardabweichung der Messung könnte somit möglicherweise durch eine weitere Optimierung des entsprechenden Roboterskripts reduziert werden.

Außerdem benötigt eine voll-automatisierte Umsetzung eine roboterintegrierte Zentrifuge, was eine beträchtliche Investition bedeutet. Die Messung auch dieses Parameters ist trotz des aufwendigen Extraktionsprotokolls umsetzbar, was die Flexibilität des Systems demonstriert.

Vitalitätsmessung Die von Schulze et al. (2011) zuvor etablierte Viabilitätsmessung wurde im Rahmen dieser Arbeit als automatisierte Mikrotiterplatten-Messung für die durch-

schnittliche Vitalität von Kulturen neu etabliert.

Die Methode ermöglicht es, mit der sehr schnellen und einfachen Messung von zwei Fluoreszenzen das Gesamtbefinden (Vitalität) einer Kultur zu bestimmen und als einen einfach interpretierbaren Prozentwert anzugeben.

Der bei 460 nm gemessene Peak ist auf die Chlorophyll-Autofluoreszenz zurückzuführen. Da Cyanobakterien bei Stress oder eingeschränkter Vitalität ihre Chlorophyllkonzentration verringern (Marsac, 1977) bzw. dieses nach dem Tod der Zelle schnell abgebaut wird (Hörtensteiner, 2006) nimmt dieser Peak bei erhöhtem Anteil an nicht-viablen Zellen ab. Der bei 650 nm beobachtete Autofluoreszenz-Peak ist hingegen auf eine unspezifische Fluoreszenz, dessen Ursprung in Cyanobakterien nicht völlig aufgeklärt ist, zurückzuführen und nimmt bei erhöhtem Anteil an nicht-viablen Zellen zu (Tang und Dobbs, 2007).

Die Vitalität ist ein wichtiger Parameter bei dem Vergleich vieler Kulturen im hohen Durchsatz und die leicht interpretierbaren Ergebnisse ermöglichen eine automatische Auswertung. Beispielweise könnte der Roboter darauf programmiert werden, nur Kulturen mit einem bestimmten minimalen Vitalitätswert weiterzuführen. So könnten bei einem Screening auf Toleranzen unerwünschte Kulturen schnell entfernt werden, um auf die vielversprechenden Kulturen zu fokussieren.

Es ist wichtig anzumerken, dass die neue Methode es nicht erlaubt, den Zustand einzelner Zellen zu bestimmen. Das heißt, es kann z.B. nicht unterschieden werden, ob alle Zellen in einem Well mäßig vital sind oder ob ein Anteil nicht-viabel und andere vollständig vital sind. Wird eine Aussage auf Zellebene benötigt, wird somit weiterhin die von Schulze et al. (2011) beschriebene mikroskopische Variante der Methode empfohlen.

MALDI-TOF-MS Messung Auch die Probenvorbereitung und direkte Beladung von MALDI-TOF-MS-Targets konnte erfolgreich demonstriert werden. Diese ermöglicht es, MALDI-TOF-MS in die Screening Pipeline zu integrieren. Die Messung könnte beispielsweise eingesetzt werden, um automatisiert nach interessanten Sekundärmetaboliten bei einer großen Gruppe von Stämmen und/oder Kultivierungsbedingungen zu screenen.

Weiterhin könnten Protein-Masse-Fingerprints genutzt werden, um Stämme zu identifizieren (Barbuddhe et al., 2008; Marklein et al., 2009), oder auch um Kulturstress oder andere Parameter zu messen, sofern entsprechende Referenzspektren vorhanden sind (Caruso et al., 2008). Das Extraktionsprotokoll und die eingesetzte Matrix müssen jedoch je nach Anwendung und Stamm möglicherweise angepasst werden.

Weitere analytische Methoden Das System konnte weiterhin auch zur optisch enzymatischen Bestimmung der Ethanolkonzentration, zur Messung der Sauerstoffevolution und zur Präparation von Luminex-Assays eingesetzt werden. Diese Methoden sind lediglich Beispiele für die vielfältigen Erweiterungsmöglichkeiten der Screeningplattform. Praktisch jede Messung, welche in MTP-Format arbeitet, kann für das automatisierte System angepasst werden; somit lässt sich fast jeder beliebige Analyt von Interesse detektieren. Beispiele sind biochemische oder enzymatische Assays, qPCR, ddPCR oder HPLC-Messungen.

Kulturkonservierung Für die Lagerung von Kulturen wurden zwei getrennte Methoden etabliert. Bei beiden Methoden war es mit allen getesteten Kulturen möglich, diese nach der Konservierung erfolgreich zur Inokulation neuer Kultivierungen einzusetzen.

Für kürzere Lagerungsperioden wurde eine Konservierung auf Agar in MTPs etabliert. Diese hat den Vorteil, dass sowohl eine vollautomatisierte Erstellung der Rückstellproben, wie auch eine Überführung in DWPs möglich ist. Weiterhin erreichen mit dieser Methode wiederhergestellte Kulturen schnell wieder ihr exponentielles Wachstum. Somit erlaubt es diese Methode, ein vollständiges Experiment zur Validierung mit den gleichen Kulturen, schnell zu wiederholen oder spezifische Kulturen von Interesse nach einem Screening wieder aufzugreifen.

Für Langzeitlagerung wurde eine, ebenfalls voll automatisierte, Konservierung in DMSO etabliert. Für das spätere Inokulieren von einzelnen Kulturen aus den DMSO-Rückstellproben wird hingegen ein manuelles Ausplattieren benötigt. Der Prozess ist somit deutlich arbeits- und zeitintensiver als die Inokulation ausgehend von Agar -Rückstellproben. DMSO Kulturkonserven erlauben es aber, Kulturen aus vorherigen Experimenten auch noch Jahre später verfügbar zu haben.

Die wichtigsten Einsatzszenarien für die Kulturkonservierung (Wiederholung/Validierung und Archivierung) sind somit abgedeckt. Wenn sinnvoll und je nach experimentellem Design, sollten bei einem Screening am besten beide Methoden zum Einsatz kommen.

6.1.2 Kultivierung in der Screeningplattform

In den Ergebnissen sind zwei Kultivierungsläufe beispielhaft gezeigt. Die Erste ist eine Fed-Batch Kultivierung, ausgehend von gepickten Klonen, in der ersten Iteration der Screeningplattform für phototrophe Mikroorganismen (siehe 5.1.1); die Zweite zeigt eine semi-kontinuierliche Kultivierung in der dritten Iteration des Screeningsystems (siehe 5.1.3). Folgend werden die Ergebnisse dieser beiden Kultivierungen diskutiert:

Erste Iteration des Screeningsystems Die Kultur hat die ersten fünf Tage eine lag-Phase aufgezeigt, welche auf die Inokulation ausgehend von Kolonien auf Agar zurückzuführen ist. Wie zuvor diskutiert, müssen sich die Zellen erst ihrer neuen Umgebung anpassen. Anschließend ist eine starke, fast exponentielle, Wachstumszunahme durch die OD zu erkennen (log-Phase). Die Medium-Kontroll-Wells haben keine OD Zunahme gezeigt und lassen Kreuzkontaminationen in dem System ausschließen.

Die OD Werte zwischen den Wells zeigten in der log-Phase eine große Standardabweichung (bzw. einen großen Variationskoeffizient). Dies ist jedoch nicht auf stark unterschiedliche Wachstumsraten zurückzuführen, sondern darauf, dass die Kulturen in den einzelnen Wells mit unterschiedlichen Start-ODs in die log-Phase übergangen, aber trotzdem ähnlich schnell gewachsen sind. Dieser Effekt hätte durch ein automatisches Angleichen der ODs stark minimiert werden können, diese Methode stand jedoch in der ersten Iteration des Systems noch nicht zur Verfügung.

Der Kultivierungsprozess zeigt, dass die im Roboter erzeugten Bedingungen gut für die Kultivierung von *Synechocystis* geeignet sind. Die gemessenen Chlorophyllkonzentrationen von $6,741 \pm 4,6 \mu\text{g/ml}$ deuten außerdem auf eine gute Pigmentierung der Zellen hin, was für eine hohe Vitalität spricht. Bei höheren ODs zeigen die Wachstumsverläufe jedoch ein Abflachen der Wachstumsraten. Dieses Verhalten ist vermutlich auf eine Energie- oder Nährstofflimitierung, zum Beispiel durch Licht oder CO_2 , zurückzuführen. Solche Limitierungen können eingeschränkt werden, wenn die Kultivierungsparameter stetig der Kulturdichte angepasst werden. Für einige Parameter wie zum Beispiel Durchmischung und CO_2 -Konzentration sind die optimalen Werte jedoch schwer vorherzusagen und hängen von weiteren Faktoren (z.B. dem kultivierten Stamm) ab. Somit werden diese Parameter meist empirisch ermittelt, was es sehr arbeitsaufwändig macht, alle optimalen Parameter für sämtliche Kulturstadien im Voraus zu bestimmen.

Dritte Iteration des Screeningsystems Fed-Batch Kultivierungen in der dritten Iteration des Screeningsystems haben ähnliche Ergebnisse wie die zuvor diskutierte Kultivierung in der ersten Iteration gezeigt; auch hier flachen die Wachstumsraten bei höheren ODs ab. Die nun ermöglichte automatische Verdünnung mit einer OD-Normalisierung ermöglicht es jedoch, eine semi-kontinuierliche Kultivierung durchzuführen, welche die zuvor diskutierten Probleme größtenteils vermeidet. Hierbei werden die Kulturen in den verschiedenen Wells täglich auf eine Soll-OD zurück verdünnt. Wachstumslimitierungen durch nicht optimale Parameter können somit deutlich besser ausgeschlossen werden, da die Zelldichten relativ konstant gehalten werden können. Diese Form der Kultivierung ermöglicht es weiterhin, längere Kultivierungsläufe mit reproduzierbaren Bedingungen durchzuführen, um somit Langzeiteffekte zu untersuchen. Der Hauptnachteil der semi-kontinuierlichen Kultivierung liegt darin, dass diese einen höheren Bedarf an Verbrauchsmaterialien und Arbeitszeit für den Roboter mit sich bringt.

Insgesamt hat die dritte Iteration des Screeningsystems mit der semi-kontinuierlichen Kultivierung sehr gute Ergebnisse ermöglicht. Es war keine Kreuzkontamination zu beobachten und die gemessenen Vitalitäten der einzelnen Kulturen waren sehr hoch, mit einer statistisch nicht signifikanten Streuung zwischen den Wells. Die normalisierten Absorptionsspektren zeigten ebenfalls einen sehr geringen Variationskoeffizienten (max. 0.6%), was einer praktisch identischen Pigmentierung zwischen den Kulturen in den jeweiligen Wells entspricht. Diese Ergebnisse validieren, dass bei allen Kulturen in dem Screeningsystem, unabhängig davon in welchem Well sie kultiviert wurden, quasi keine Fitness- oder Vitalitätsunterschiede vorhanden sind.

Als Beispiel für die Fähigkeiten der semi-kontinuierlichen Kultivierung in dem erweiterten Screeningsystem wurden verschiedene Belichtungsintensitäten für jeweils drei Tage getestet. Die Ergebnisse haben (wie erwartet) eine ansteigende Wachstumsgeschwindigkeit bei steigender Belichtung, mit hoher Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen Tagen, gezeigt. Die bei $72 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ erreichten durchschnittlichen Wachstumsraten von $0.672 \pm 0.013 \text{ d}^{-1}$ in der Mitte und $0,756 \pm 0,031 \text{ d}^{-1}$ am Rand der Platte demonstrieren ein sehr gu-

tes Wachstum der Kulturen und sind mit denen anderer etablierter Kultivierungsmethoden (z.B. in Bioreaktoren) vergleichbar. Selbst bei einem Photonenfluss von $72 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (maximale Belichtung mit dem derzeitigen Aufbau der Kultivierungskammer) scheinen die Kulturen jedoch noch nicht Licht-gesättigt zu sein; zumindest nicht über den gesamten Zeitraum bis zur nächsten Verdünnung. Bei einem Photonenfluss von $72 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ war allerdings bereits ein leichter Abfall für die Werte des Absorptionsspektrums bzw. in der Pigmentierung messbar. *Synechocystis* und andere phototrophe Mikroorganismen reduzieren ihre Pigmentierung bei hohen Belichtungen, um eine Photoinhibierung zu vermeiden (Anderson et al., 1995). Somit zeigen diese Ergebnisse, dass eine Lichtsättigung fast erreicht wurde. Nichtsdestotrotz sollte für Experimente, welche sich mit maximalen Wachstumsraten oder Lichtinhibierung befassen, entweder eine stärkere Lichtquelle, eine tiefere Soll-OD oder eine häufigere Verdünnung eingesetzt werden.

In der demonstrierten Kultivierung waren klare Randeffekte zu beobachten, so dass für die Kulturen am Rand der Platte ein statistisch signifikant höheres Wachstum zu verzeichnen war. Dies lässt sich durch zusätzliches Licht, welches von der Seite in die semitransparente DWP eintritt, erklären. Kulturen in der Mitte werden von benachbarten Kulturen so abgeschattet, dass nur Licht von oben eintreten kann.

Diese vermeintliche Ursache für die Randeffekte (unterschiedliche Lichtverfügbarkeit) könnte methodisch oder technisch gelöst werden. Bereits eine Kultivierung bei Lichtsättigung, aber unterhalb der Lichtinhibierung, sollte die Randeffekte unterdrücken. Hier sollten geringe Unterschiede in der Belichtung kaum einen Einfluss auf die Wachstumsrate haben. Weiterhin könnten die Kultivierungskammer oder die DWPs so modifiziert werden, dass Licht nur von oben eintreten kann. Eine Lösung wäre voraussichtlich der Einsatz von schwarzen, lichtundurchlässigen DWPs. Schwarze 2,2 ml DWPs sind allerdings kein handelsübliches Format und müssten speziell angefertigt werden. Alternativ könnten die Seitenwände herkömmlicher DWPs abgedunkelt werden, um den zusätzlichen Lichteintritt in diese Wells zu limitieren. Weiterhin könnte die Kultivierungskammer so angepasst werden, dass die Belichtung direkt unter den Wells erfolgt. Ein entsprechender Umbau ist bereits in Planung (siehe 7).

Die Vitalität und die Absorptionsspektren zeigten hingegen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Kulturen am Rand und in der Mitte der Platte. Die Randeffekte sind somit nur relevant, wenn die geringen Unterschiede in der Wachstumsrate tatsächlich einen Einfluss auf das Screening-Ziel haben. Für solche Analysen sollten beim jetzigen Aufbau die Wells am Rand ausgeschlossen oder als getrennte Gruppe behandelt werden. Allgemein ist es für robuste Ergebnisse empfehlenswert, mehrere Replikate zufällig über die Platte zu verteilen.

Für viele Analysen, wie zum Beispiel ein Screening auf Naturstoffproduktion, ist jedoch nicht damit zu rechnen, dass die geringen Wachstumsunterschiede einen Einfluss haben.

6.1.3 Skalierbarkeit des Systems

Die aktuelle Iteration der Screeningplattform kann zwei 96-Well-Platten, also bis zu 192 Kulturen unterbringen. Es ist geplant, dieses System deutlich hoch zu skalieren. Hierbei soll ein modulares System mit mehreren kleineren Kultivierungskammern für je eine DWP erstellt werden. Jede Kammer hat so individuell einstellbare Umweltbedingungen für eine maximale Flexibilität in der Anwendung.

Wenn die in der Kammer integrierten Schüttler quer verbaut und CO₂-Sensor und Temperaturelemente nach hinten verlegt werden, könnte die Breite jedes Kammer-Moduls auf unter 12 cm verringert werden. Somit könnten bis zu zehn Kammern in dem Pipettierroboter Platz finden; bei Entfernung oder Umlagerung des externen Schüttlers und der Waschstation sogar 14. Dies entspricht 960 bzw. 1344 Kultivierungspositionen.

Bei solch einem Durchsatz könnte sich allerdings die Analytik zu einem Flaschenhals für das System entwickeln. Momentan benötigt eine vollständige Messung (OD, Vitalität, Absorptionsspektrum) und automatische Verdünnung einer DWP ca. 100 Minuten. Bei 10 DWPs ergibt sich somit eine Gesamtmesszeit von 16 Stunden und 40 Minuten. Eine tägliche Messung jeder Platte wäre also möglich, jedoch logistisch schwer umzusetzen. Momentan sind die Roboter-Skripte allerdings nicht auf ihre Geschwindigkeit optimiert, so könnten beispielsweise Aufnahme- und Abgabe-Geschwindigkeiten erhöht werden. Außerdem bestehen fast 40 Minuten der Laufzeit aus Misch- oder Transfer-Schritten mit fixen Volumina. Durch Nachrüsten des Roboters mit einem zusätzlichen 96-Kopf-Arm könnten diese Schritte auf wenige Minuten reduziert werden. Weiterhin benötigt die Messung des Absorptionsspektrums ca. 15 Minuten, während OD und Vitalität zusammen bei unter fünf Minuten liegen. Für die meisten Fragestellungen könnte der Messbereich des Absorptionsspektrums auf relevante Wellenlängen reduziert werden, zum Beispiel auf die Peaks für Chlorophyll und Phycocyanin.

Insgesamt könnte somit die Messzeit mindestens um die Hälfte reduziert werden, was auch die tägliche Messung von 10 Platten praktikabel macht.

6.1.4 Zusammenfassung

Das neu entwickelte Kultivierungs- und Screeningsystem für phototrophe Mikroorganismen ermöglicht eine miniaturisierte, automatisierte und parallele Kultivierung mit bis zu 192 individuellen Positionen (Wells). Es wurden keine Kreuzkontaminationen zwischen den Wells detektiert. Somit kann jede Kultivierungsposition als ein eigenständiger Bioreaktor betrachtet werden. Für die jeweiligen Wells wurden reproduzierbare Ergebnisse erzielt und es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zueinander. Einzige Ausnahme waren leicht erhöhte Wachstumsraten an den Plattenrändern, welche jedoch für viele Anwendungen vernachlässigbar sind. Eine technische Lösung für dieses Problem ist bereits in Planung.

Automatische Verdünnungen, Aufnahme von Absorptionsspektren, sowie MALDI-TOF-MS-Messungen konnten etabliert werden. Zusätzlich wurde eine Vitalitätsmessung neu entwi-

ckelt, welche es anhand von zwei Fluoreszenzmessungen und ohne Probenvorbereitung erlaubt, die Vitalität von *Synechocystis*-Kulturen zu ermitteln und als leicht interpretierbaren Prozentwert auszugeben. Über die integrierte Analytik und entsprechende Assays ist das System leicht auf weitere Parameter oder Analyten erweiterbar.

Neben qualitativen Erweiterungen um weitere Messparameter, ist die Plattform auch im Durchsatz leicht erweiterbar. Eine Skalierung auf bis zu 960 Kulturen ist bereits in Planung. Da das System eine Neuentwicklung für Phototrophe darstellt, kann damit gerechnet werden, dass es in vielen weiteren Einsatzgebieten Anwendung finden wird.

6.2 Adaptive Evolution zur Erhöhung der Temperaturtoleranz

Die Temperaturtoleranz in *Synechocystis* wurde mittels adaptiver Evolution erfolgreich erhöht. Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Schritte dieser Strategie im Detail diskutiert. Über die Sequenzierung der erzeugten thermotoleranten Stämme wurden mehrere Gene und Mutationen mit der Temperaturtoleranz in *Synechocystis* in Verbindung gebracht. Mögliche Mechanismen, wie diese eine Temperaturtoleranz induzieren könnten, werden ebenfalls betrachtet.

6.2.1 Optimale Mutagendosen zur Induktion von Punktmutationen

Um die Wirkung der Mutagene MMS und UV auf *Synechocystis* zu charakterisieren, wurden Zellen mit verschiedenen Dosen behandelt und auf regulären Agarplatten und Streptomycin-Selektionsplatten ausgestrichen, um jeweils die Überlebensrate und die relative Mutationsrate zu bestimmen.

Wie schon von Lambert et al. (1980) in *Gloeocapsa alpicola* beschrieben, ist auch in *Synechocystis* die Überlebensrate bei beiden Mutagenen mit zunehmender Dosis exponentiell abfallend (siehe Abb. 5.16 und 5.17 auf Seite 64). Bei steigender Dosis nimmt der zytotoxische Effekt durch DNA-Schäden und anderen chemischen Reaktionen zu, was die erhöhte Letalität erklärt.

Ebenfalls wie erwartet, hat der Einsatz beider Mutagene bei den meisten Dosen die Rate an nicht letalen Punktmutationen signifikant erhöht. Bei höheren Dosen fiel dieser Wert jedoch wieder ab; bei sehr hohen Dosen sogar unter den Wert der nicht mutagenisierten Kontrolle. Auf den Selektionsplatten fand eine Auswahl auf Zellen statt, die eine ribosomale Mutation tragen, welche eine Streptomycin-Resistenz vermittelt. Eine Resistenz gegen Streptomycin kann durch verschiedene Punktmutationen, sowohl in der kleinen wie auch der großen ribosomalen Untereinheit, erlangt werden (Agarwal et al., 2011; Carter et al., 2000; Springer et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wird die Streptomycin-Resistenz jedoch lediglich als Marker zur Bestimmung der relativen Punktmutationsrate eingesetzt. Somit ist der genaue Wirkmechanismus der Resistenz nicht entscheidend.

Die Wahrscheinlichkeit solch einer Mutation steigt mit zunehmender Dosis. Bei sehr hohen Dosen wird dieser Effekt jedoch immer mehr durch die Ansammlung von nachteiligen Mutationen, welche das Wachstum auf Platte nicht mehr erlauben, überlagert.

Bei der UV Mutagenese zeigt die Rate an Punktmutationen ein klares Maximum bei Dosen zwischen $10\text{-}50\text{ J/m}^2$, bevor die Anzahl an Kolonien auf den Selektionsplatten wieder sinkt (Abb. 5.16). Die Anzahl an Zellen, welche auf den Selektionsplatten überleben können, fällt erst bei Dosen zwischen $200\text{-}300\text{ J/m}^2$ unter die der nicht mutagenisierten Kontrolle, wobei hier auch die Überlebensrate schon deutlich unter 1% liegt.

Bei MMS hat die Anzahl an Kolonien auf den Selektionsplatten zwei Maxima erreicht: Ei-

nes bei 0,1 v% und ein Weiteres bei 1v% (Abb. 5.17). Der Verlauf der Kurve deutet hierbei zwei überlagerte Prozesse an. Durch MMS induzierte Alkylierungen werden durch das Enzym O⁶-Methylguanine-DNA-Methyltransferase (MGMT) gezielt repariert (Demple et al., 1985; Lindahl et al., 1988; Shevell und Friedman, 1990). Um die Aktivität von MGMT zu minimieren, wurden bewusst kurze Inkubationszeiten von einer Minute gewählt. Dosen bis 0,1 v% sind vermutlich nicht hoch genug, um bei dieser Inkubationszeit eine starke Antwort dieses spezifischen Zellreparaturprozesses hervorzurufen. Bei Dosen in diesem Bereich bleibt die Expression von MGMT somit gering und induzierte Schäden der DNA werden nicht spezifisch repariert, was eine effektive Mutagenese ermöglicht. Bei Dosen ab 0,2 v% scheint hingegen die Aktivität von MGMT signifikant beeinflusst zu sein, die Mutationsrate wird somit reduziert. Bei 1 v% überschreitet die Menge an aklylierten Basen die Fähigkeit von MGMT, diese spezifisch zu reparieren und ein zweites lokales Maximum wird erreicht. Über 1 v% hinaus fällt die Anzahl an Kolonien wieder ab, da sich nachteilige Mutationen anreichern.

Die Kurve für UV zeigt hingegen keinen analogen Verlauf. UV-Schädigung der DNA wird über einen spezifische Reparaturprozess mittels Photolyasen repariert (Levine und Thiel, 1987; Lucas-Lledó und Lynch, 2009; Witkin, 1976). Dieses Enzym konnte über Einsatz einer Filterfolie jedoch gänzlich inaktiviert werden, so dass dieser Prozess vollkommen unterdrückt wurde. Ohne Ausschluss der Photoreaktivierung hätte durch den Einsatz von UV Strahlung nur ein sehr begrenzter mutagener Effekt erreicht werden können (Lambert et al., 1980; Levine und Thiel, 1987).

Zur Induzierung von nicht-letalen Punktmutationen wurde somit für UV eine optimale Dosis von 10-50 J/m^2 und für MMS von 0,1 oder 1 v% identifiziert und für Folgeexperimente eingesetzt. Diese Dosen erhöhen die Wahrscheinlichkeit der Entstehung nicht-letalere Punktmutationen weit über die natürliche Mutationsrate hinaus, ohne einen Verlust der Fähigkeit für das Wachstum auf Platte oder andere starke Abweichungen vom Wildtypen zu erzeugen. Diese Dosen sollten somit ideal für die Indizierung von Toleranzen auf veränderte Umweltbedingungen, wie z.B. erhöhter Temperaturtoleranz, durch eine adaptive Evolution sein.

6.2.2 *In Vivo* Screening für die adaptive Evolution

Nachdem die optimalen Mutagendosen bestimmt waren, konnte die eigentliche Mutagenese und adaptive Evolution an *Synechocystis* durchgeführt werden. Als erstes Ziel wurde die Erhöhung der Temperaturtoleranz gewählt. Diese ist ein attraktives Ziel, da gerichtete Methoden bisher nur sehr mäßigen Erfolg hatten (Kaczmarzyk et al., 2014; Suzuki et al., 2005), es von kommerziellem Interesse ist und eine *in vivo* Selektion sich leicht umsetzen lässt. Das angewendete Verfahren sollte auch problemlos für andere Ziele (z.B. eine Erhöhung der Ethanoltoleranz) anwendbar sein.

In vier Runden Mutagenese wurde die Temperaturtoleranz des *Synechocystis*-Wildtyps von unter 43°C auf 45°C bzw. 45,8°C in den Gemischen MutIV und MutIV-2 gesteigert. Die Kulturen wurden hierbei so verdünnt, dass ihre OD immer zwischen eins und zwei lag.

Somit wurde ein exponentielles Wachstum ermöglicht und zusätzlicher Stress durch starke Verdünnungen vermieden. Das exponentielle Wachstum und die schrittweise Steigerung der Temperatur stellten sicher, dass ausreichend Selektion stattfinden konnte. Zellen mit schnelleren Wachstumsgeschwindigkeiten bei erhöhten Temperaturen konnten sich in dem Gemisch anreichern, die Anteile benachteiligter Zellen wurden über die häufigen Verdünnungen hingegen reduziert.

Die Kontroll-Kulturen, welche ohne (weitere) Mutagenese ebenfalls dem Selektionsdruck ausgesetzt wurden, zeigten keine ähnlichen Anstiege. Somit ist dieser schnelle Anstieg der Toleranz klar auf die Wirkung der Mutagene zurückzuführen.

Die erreichten Temperaturtoleranzen übertreffen alle zuvor in *Synechocystis* erzeugten Toleranzen (siehe 2.3.1). Kaczmarzyk et al. (2014) haben beispielsweise durch einen Knockout von *hik34* die Überlebensrate von *Synechocystis* bei 46°C nach 2 Stunden lediglich auf ca. 40% erhöhen können, während MutIV-2 bei dieser Temperatur mehrere Tage und bei 45,8°C auf Dauer stabil wachsen kann.

Wie zuvor erwähnt, können die eingesetzten Mutagene zwar jeweils alle Arten von Mutationen induzieren, haben aber unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten für bestimmte Mutationstypen. UV-Strahlung induziert bevorzugt Transitionen von G/C zu A/T und Deletionen in A/T reichen Regionen (Foster, 1991; Miller, 1985; Witkin, 1976), während die Behandlung mit MMS hauptsächlich zu Basenaustauschen führt (Foster, 1991; Todd und Montibragadin, 1979). Durch den Einsatz von Mutagenen mit unterschiedlichen Mechanismen konnte der Einfluss des jeweiligen Bias erfolgreich reduziert werden. Spätere Sequenzierungen des Stammgemisches MutIV-2 und einzelner Stämme haben gezeigt, dass alle Arten von Mutationen (Transitionen, Transversionen und Insertionen/Deletionen) stattgefunden haben.

Eine mikroskopische Viabilitätsanalyse der Kulturen während der zweiten Mutagenese-Runde hat deutlich gezeigt, dass aus einem Ausgangspool mit gleich vielen viablen Zellen in der nicht mutagenisierten Kultur unter den selektiven Bedingungen mehr Zellen schneller gestorben sind (siehe Abb. 5.18 auf Seite 67). Dies ist besonders relevant, wenn man bedenkt, dass UV ohne selektive Bedingungen bei der eingesetzten Dosis bereits eine Letalität von ca. 90%¹ aufweist. Nichtsdestotrotz haben sich die mutagenisierten Zellen schneller von den selektiven Bedingungen erholt als die Kontrolle. Dies zeigt, dass der positive Effekt der induzierten Mutationen gegenüber den negativen Effekten (Letalität und nachteilige Mutationen) überwiegt. Der geringste Anteil an viablen Zellen in der mutagenisierten Kultur wurde mit 4% am Tag 19 nach der Behandlung erreicht. Bei der eingesetzten Dosis sollten nur ca. 10% der Zellen die mutagene Behandlung überlebt haben. Von diesen haben wiederum vermutlich nur sehr wenige eine Mutation, welche zu einem Selektionsvorteil bei erhöhten Temperaturen führt. Diese Zellen hatten bis zum Tag 19 nach der Mutagenese jedoch genug Zeit, um sich zu vermehren, um den Hauptanteil der Viablen 4% der Kultur auszumachen.

Das nach vier Runden Mutagenese erzeugte Gemisch demonstrierte eine deutlich erhöhte

¹Die Bestimmung der Letalität des Mutagens erfolgte durch Plattieren, nicht in flüssigem Medium und könnte somit unter gegebenen Bedingungen etwas tiefer sein.

Temperaturtoleranz, ohne ansonsten einen merkbar abgeänderten Phänotyp aufzuweisen. Die gewählte Methode der adaptiven Evolution mit *in vivo* Selektion hat im Gegensatz zu Methoden, bei denen direkt nach der Mutagenese und vor der Charakterisierung, eine Vereinzlung durchgeführt wird (z.B. Chaturvedi und Fujita (2006) und Ong et al. (2010)) den Nachteil, dass im ersten Schritt ein Gemisch erzeugt wird, welches aus mehreren Stämmen besteht. Der Hauptvorteil liegt jedoch darin, dass so mit nur geringen Kosten und technischen Aufwand eine enorme Menge (in diesem Fall je Runde $5 * 10^9 - 5 * 10^{10}$) Kandidatenstämme parallel selektiert werden können, was die Wahrscheinlichkeit leistungsstarke Stämme zu erzeugen, deutlich erhöht. Hätte man direkt nach der Mutagenese vereinzelt, wäre die Anzahl an Kandidaten durch die begrenzte Menge an getrennten Kultivierungsplätzen um mehrere Größenordnungen reduziert, selbst beim Einsatz von automatisierten Hochdurchsatzsystemen. Auf Agarplatten lassen sich theoretisch mit hohem Arbeitsaufwand auch sehr große Stamm-Zahlen selektiv kultivieren. Der entscheidende Vorteil einer *in vivo* Selektion in Photobioreaktoren besteht jedoch darin, dass die Zellen auf die Ziel-Attribute (erhöhte Temperaturtoleranz) exakt unter den gewünschten Bedingungen (Flüssigmedium mit hoher Salzkonzentration, bei Tag/Nacht-Profilen und geregelterm pH) selektiert werden können. Somit kann sichergestellt werden, dass die identifizierte Leistung auch unter Produktionsbedingungen erbracht werden kann. Weiterhin wird verhindert, dass wünschenswerte Fähigkeiten des Organismus verloren gehen, nur weil sie während der Selektion keinen Vorteil bringen.

Einzelne Stämme aus dem temperaturtoleranten Gemisch MutIV wurden anschließend einem Hochdurchsatzscreening unterzogen, um die optimalen Stämme zu isolieren (folgend in 6.2.3 diskutiert), während das Gemisch weiter *in vivo* selektiert wurde.

Die verlängerte *in vivo* Selektion von MutIV im Bioreaktor führte zu einer zusätzlichen Erhöhung der Temperaturtoleranz um 0.8°C (MutIV-2). Wegen der verhältnismäßig kurzen Selektionszeit von ca. einem Jahr ohne neue Mutagenbehandlung, kann davon ausgegangen werden, dass keine neuen Mutationen eingeführt wurden. Stattdessen ist die erhöhte Toleranz in MutIV-2 auf eine weitere Selektion zwischen den bereits in dem Gemisch vorhandenen Stämmen zurückzuführen. Weiterhin konnte wahrscheinlich eine Selektion innerhalb der Genome der einzelnen Stämme stattfinden, indem sich bereits vorhandene, vorteilhafte Mutationen durchsetzen (höhere Segregationen erreichen) und somit zu einer besseren Wirkung beitragen. Die Ergebnisse der Sequenzierungen werden detailliert in 6.2.4 diskutiert.

6.2.3 Temperaturtoleranzscreening monoklonaler Stämme

Aus dem Gemisch MutIV-1, welches ein stabiles Wachstum bis 45°C aufwies, wurden monoklonale Stämme isoliert. Mit zwei verschiedenen Screeningmethoden konnten mehrere Stämme mit verbesserter Temperaturtoleranz gegenüber dem Wildtyp identifiziert werden.

Das für die Darstellung der Ergebnisse (siehe Abbildung 5.19 und 5.20 auf Seite 69) eingesetzte mathematische Modell erlaubte eine gute Visualisierung der Daten. Das Daten-fitting dient hierbei einer besseren Verbildlichung und einer schnelleren Identifizierung der tem-

peraturlerantesten Stämme; nicht zur Bestimmung der Parameter (z.B. der maximalen Temperaturtoleranz).

Die in dem Screening bestimmten Maximaltoleranzen wichen teilweise von den im 1l Photobioreaktor bestimmten Werten ab (siehe Tabelle 5.2 auf Seite 70). Eine gewisse Schwankung der Temperaturtoleranzen zwischen verschiedenen Kultivierungssystemen ist hierbei zu erwarten, da diese von Bedingungen wie Licht-Intensität, -Spektrum, Kultivierungsgefäßform und Begasung beeinflusst werden. Jedoch ist vor allem beim Screening im Schüttelinkubator die Abweichung zu den Ergebnissen in der Bioreaktorvalidierung hoch. Im Inkubator wurde beispielsweise für den Stamm C5K eine maximale Toleranz von $44,5^{\circ}\text{C}$ bestimmt, welche nennenswert unter ($-0,4^{\circ}\text{C}$) dem im Bioreaktor ermittelten Wert lag. Bei der mitgeführten Positivkontrolle MutIV-1 wurde hingegen im Inkubator-Screening eine um $0,7^{\circ}\text{C}$ höhere Toleranz als bei der Validierung identifiziert. Insgesamt weichen die mit dem automatisiertem Screening-System bestimmten Werte deutlich weniger von den im 1l-Bioreaktor bestimmten Werten ab. Das automatisierte System ist somit nicht nur im Durchsatz, sondern auch in der Qualität der erzeugten Daten, dem Inkubator-Screening überlegen.

MutIV-1 demonstrierte (vor allem im Hochdurchsatzscreening) weiterhin ein robusteres Wachstum bei verschiedenen Temperaturen, während die monoklonalen Stämme schärfere Optimaltemperaturen aufwiesen. Dieser Effekt lässt sich dadurch erklären, dass die Messwerte, welche in der Kurve für MutIV-1 abgebildet sind, sich aus dem Mittelwerten mehrerer Stämme bilden. Eine Durchschnittskurve aller monoklonalen Stämme zeigt einen ähnlichen Verlauf wie MutIV-1 (nicht dargestellt).

Die Temperaturtoleranzen aller ausgewählten monoklonalen Stämme war im Photobioreaktor sehr nahe ($-0,1$ bis $+0,2^{\circ}\text{C}$) an der des Gemisches zum Zeitpunkt der Isolierung. Wie jedoch die verlängerte *in vivo* Selektion von MutIV gezeigt hat, besaß das Gemisch ein höheres Potential. Ein Teil der Verbesserung ist vermutlich auf eine höhere Segregation von vorteilhaften Mutationen zurückzuführen. Es ist aber auch möglich, dass zum Zeitpunkt der Vereinzelung im Gemisch bereits Stämme mit noch höherer Toleranz vorhanden waren als jene, die mit dem Screening identifiziert wurden. Dass diese Stämme nicht erfasst werden konnten, lässt sich durch den immer noch recht geringen Durchsatz des Screenings erklären. Im Inkubator konnten nur 27 und im Robotersystem lediglich 81 Kandidaten-Stämme parallel getestet werden. Im Gegensatz zu dem Inkubatorscreening ist das automatisierte Screening-System jedoch leicht skalierbar. Es wäre technisch unproblematisch, einen Pipettierroboter mit mehreren Kultivierungskammern und somit deutlich mehr Schüttelplätzen auszustatten um so tausende phototrophe Mikroorganismen gleichzeitig zu untersuchen.

Es ist weiterhin bemerkenswert, dass nur ein Teil der geprüften Stämme im Screening überhaupt höhere Toleranzen als die Wildtypkontrolle aufgewiesen hat. Eigentlich wäre zu erwarten gewesen, dass alle monoklonalen Stämme aus dem Gemisch mindestens bei der Temperatur, bei der dieses zuvor kultiviert wurden, gut wachsen können. Ansonsten hätte man erwartet, dass sie sterben oder zumindest von fitteren Stämmen überwachsen würden. Es gibt einige mögliche Erklärungen für die beobachteten Ergebnisse. Es könnte sein, dass viele der Stämme in dem Gemisch (vielleicht sogar die temperaturlerantesten) andere Nachteile

angereichert haben. So ist es zum Beispiel möglich, dass manche Stämme nach der adaptiven Evolution für ein schnelles Wachstum auf die spezifischen Kultivierungsbedingungen im Bioreaktor wie genaue pH-Kontrolle, starke Durchmischung oder hohe Zelldichten (wo andere Zellen für periodische Abschattung sorgen) angewiesen sind. Zudem besteht die Möglichkeit, dass bestimmte Stämme mittlerweile auf Synergien in der Mischkultur angewiesen sind. So könnte es z.B. sein, dass ein Stamm einige Vitamine nicht mehr selber produzieren kann und diese aus dem Medium der Mischkultur aufnimmt. Für die meisten Zielstellungen (z.B. Identifikation von Stämmen für die industrielle Produktion) sind solche Stämme nicht erwünscht und es ist vom Vorteil, dass sie im Screening benachteiligt sind.

6.2.4 Genetische Veränderungen zur Induktion einer Thermotoleranz in *Synechocystis*

Die thermotolerantesten monoklonalen Stämme, die Wildtyp-Kontrolle (nach dem Screening) und das Gemisch MutIV-2 wurden mit NGS Technologie sequenziert und diese Ergebnisse teils mit Sanger-Sequenzierung validiert. Als Referenz wurde der nicht mutagenisierte Ausgangswildtyp (vor dem Screening) ebenfalls sequenziert.

Zu berücksichtigen ist, dass durch Vereinzeln der Zellen vor dem Screening zwar per Definition monoklonale Stämme mit einer einzigen Zelle als gemeinsamen Vorfahren erhalten werden, diese wegen der polyploiden Eigenschaft von *Synechocystis* aber möglicherweise mehrere unterschiedliche Genome enthalten können.

Referenz Wildtyp

Der Referenz Wildtyp hat, gegenüber dem von Kaneko et al. (1996) publiziertem Genom, einige Mutationen angesammelt. Größtenteils handelt es sich hierbei um Punktmutationen. Diese können, müssen aber nicht, den Phänotyp verändert haben. Die größeren Genomveränderungen (Deletionen) scheinen durch die Verschiebung mobiler Transposonelemente hervorgerufen zu sein (jeweils ISY203b, ISY203e, ISY203g und ISY203j an den verschiedenen Positionen). Die Plasmide pCC5.2 und pCB2.4 konnten nicht mittels NGS-Sequenzierung detektiert werden, dies wurde bereits zuvor von Trautmann et al. (2012) beschrieben und scheint ein Artefakt der NGS-Technologien zu sein, da beide Plasmide trotzdem mit PCR nachweisbar sind.

Der genetische Drift des Ausgangswildtyps liegt jedoch nicht im Fokus dieser Arbeit und wird nicht im Detail diskutiert. Ergebnisse der NGS-Sequenzierung des Ausgangswildtyps wurden auch nicht mit einer Sanger-Sequenzierung validiert. Eine weitere Sequenzierung des Wildtyps nach dem Screening, sowie Sequenzierungen der temperaturtoleranten Stämme bestätigen jedoch die identifizierten Variationen.

Die Tatsache, dass keine neuen Mutationen nach dem Screening identifiziert werden konnten, zeigt weiterhin die relative Stabilität des Genoms von *Synechocystis* und somit die

Notwendigkeit Mutagene einzusetzen, um in einem akzeptablen Zeitraum Ergebnisse mittels adaptiver Evolution zu ermöglichen.

Temperaturtoleranz assoziierte Gene

In den monoklonalen thermotoleranten Stämmen konnten mehrere, aber trotzdem überraschend wenige, Mutationen identifiziert werden (siehe Tabelle 5.3 auf Seite 73).

Nach mehreren Mutagenese-Behandlungen wird gewöhnlich davon ausgegangen, dass sehr viel mehr Mutationen detektiert werden. Zwar reduziert die stringente Selektion die Anzahl an Mutationen, da Stämme mit vorteilhaften Mutationen sich durchsetzen, während Stämme mit nachteiligen Mutationen wieder den Genpool verlassen. Jedoch würde man üblicherweise auch eine Vielzahl an stillen oder neutralen Mutationen erwarten (Farrell et al., 2014).

Aufgrund des polyploiden Charakters von *Synechocystis* ist hier jedoch nicht davon auszugehen, dass sich stille oder neutrale Mutationen in der Vielzahl an Genomkopien pro Zelle durchsetzen. Dies ist vorrangig auf den nicht vorhandenen Selektionsvorteil zurückzuführen. Somit gehen diese Mutationen nach wenigen Generationen vollkommen verloren oder sind zumindest nur in wenigen Genom-Kopien je Zelle vorhanden. Diese starke Reduktion von Mutationen in Abhängigkeit der Genkopien bei polyploiden Organismen ist bereits bei den Anfängen der mutagenen Behandlungen von Pflanzen auffällig gewesen (Stadler, 1929). Mit üblichen Sequenzierungstechnologien können sehr seltene Mutationen jedoch nicht zuverlässig detektiert werden, da sich diese von Sequenzierfehlern nicht unterscheiden lassen (Druley et al., 2009). Bei vorteilhaften Mutationen ist hingegen davon auszugehen, dass sich diese über einen Selektionsprozess zwischen den verschiedenen Genomkopien innerhalb jeder *Synechocystis*-Zelle durchsetzen. Somit sollten sich diese von neutralen oder negativen Mutationen, welche zeitgleich entstanden sind, trennen. Im Zusammenspiel mit der relativ niedrigen eingesetzten Mutagenendosis, welche spezifisch für optimale Punktmutationsraten gewählt wurde, erklärt dieser Selektionsmechanismus die geringe Gesamtanzahl detektierter Mutationen. Die bestätigten Mutationen sind jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit für die gesteigerte Fitness bei erhöhten Temperaturen verantwortlich. In der folgenden Diskussion wird entsprechend davon ausgegangen, dass alle identifizierten Mutationen zur Temperaturtoleranz der Stämme beigetragen haben.

Falsch erkannte Indels in homopolymeren Bereichen sind die Hauptfehlerquelle bei der Ion-Torrent Technologie (Glenn, 2011; Loman et al., 2012). Wie erwartet, wurden die mit NGS identifizierten Rastermutationen in den homopolymeren Bereichen über Sanger-Sequenzierungen als Falsch-Positive Ergebnisse validiert und für die weitere Analyse ausgeschlossen.

Insgesamt lässt sich die Verteilung der Mutationen in den monoklonalen Stämmen (Tab. 5.3) nicht durch eine lineare Abstammung erklären. Auf den ersten Blick scheint die Mutationsverteilung zwei diskrete Abstammungsgruppen anzudeuten, eine mit den Stämmen C5K und A1 und eine weitere mit den Stämmen A6, H2 und H12, (möglicherweise mit A6 als gemeinsamen Vorfahren). Diese vermeintlichen Stamm-Gruppen haben auch jeweils im

Screening sehr ähnliche Wachstumsraten über der Temperatur gezeigt (Abb. 5.20, Seite 69). Jedoch teilen die Stämme teilweise Mutationen über diese Gruppen hinaus. So treten zum Beispiel spezifische Mutationen in den Genen *pyk2* und *pnp* in den Stämmen C5K, A1 und H12 auf und eine weitere in dem Gen *slr0064* ist sowohl in dem Stamm C5K wie in H12 vorhanden. Dies zeigt, dass zumindest ein Teil der Mutationen unabhängig voneinander an der gleichen Stelle entstanden sein müssen. Weiterhin bestätigt dies die Bedeutung dieser spezifischen Mutationen für die Temperaturtoleranz in *Synechocystis*.

Die spätere Sequenzierung des Stamm-Gemisches MutIV-2, welches ein zusätzliches Jahr auf stetig erhöhter Temperatur kultiviert wurde, dient hierbei als Validierung der zuvor in den monoklonalen Stämmen identifizierten Mutationen. Wie bereits in 6.2.2 diskutiert, ist die zusätzlich erhöhte Temperaturtoleranz hierbei in aller Wahrscheinlichkeit auf die Selektion in dem bereits vorhandenen Pool an Mutationen zurückzuführen. Mit zwei Ausnahmen, wurden auch alle in den monoklonalen Stämmen identifizierten Gene, bzw. Mutationen in der Sequenzierung des Gemischs bestätigt (siehe Tabelle 5.4 auf Seite 74). Hierbei wurden teilweise in bereits zuvor identifizierten Genen andere spezifische Mutationen gefunden (Tab. 5.3 und 5.4). Die Sequenzierung des Gemisches nach der verlängerten Selektion hat weiterhin interessante Erkenntnisse über die Relevanz der einzelnen Mutationen ermöglicht, da für die Temperaturtoleranz wichtige Mutationen in dem Gemisch häufiger vertreten sein sollten. Für die sechs Mutationen, welche nur in dem Gemisch (Tabelle 5.5 auf Seite 74) vorhanden waren, ist eine Aussage schwieriger, da diese nicht validiert werden konnten und auch mögliche Synergien mit anderen Mutationen nicht herleitbar sind.

Weiterhin ist auffällig, dass keines der mit Mutationen identifizierten Gene zu denen zählt, welche zuvor Ziele von gerichteten Methoden waren. Gerichtete Ansätze zur Erhöhung der Temperaturtoleranz in *Synechocystis* haben bisher immer nur geringe Verbesserungen herbei führen können (Kaczmarzyk et al., 2014; Suzuki et al., 2005). Somit ist wahrscheinlich, dass die zuvor gewählten Gene (z.B. *hrcA*, *sigB*, *hik34* oder *rre1*) nicht die richtigen Ziele für eine langzeitige Temperaturtoleranz in *Synechocystis* sind. Die im Rahmen diese Arbeit neu identifizierten und mit Temperaturtoleranz assoziierte Gene sollten hingegen auch Erfolge mit gerichteten Methoden erlauben.

Es wird davon ausgegangen, dass alle identifizierten Mutationen einen Effekt auf die Temperaturtoleranzen der Stämme haben. Folgend werden die jeweils möglichen Mechanismen im Detail diskutiert:

ClpC *ClpC* ist eine Untereinheit (Chaperonpartner) des Clp-Protease-Komplexes und regelt die Aktivität der proteolytisch aktiven Peptidase (*ClpP*). Proteasen sind für den Verdau falsch gefalteter Proteine zuständig und sind üblicherweise als Teil der Hitzeschockantwort hochreguliert. In *Synechocystis* ist *clpC* bereits mit verschiedenen Stressantworten in Verbindung gebracht worden. Es wurde gezeigt, dass es nach einem Hitzeschock (Suzuki et al., 2006), einer Akklimatisierung an hohe Salzkonzentrationen (Marin et al., 2004) und bei UV- oder Hochlicht-Stress (Huang und McCluskey, 2002) stärker exprimiert wird.

In *clpC* wurden fünf unterschiedliche Mutationen identifiziert. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die identifizierten Mutationen die Aktivität des Proteins beeinflussen, indem sie entweder die Aktivität erhöhen, um dem verstärkten Bedarf an einer Proteaseaktivität bei höheren Temperaturen nachzukommen oder indem sie eine normale Funktion unter diesen Bedingungen gewährleisten.

Die Verteilung der Mutationen ist ebenfalls interessant. Für den monoklonalen Stamm mit mehr als einer Mutation (C5K) haben alle identifizierten Mutationen ein gemischtes Signal erzeugt. Die Ergebnisse von MutIV-2 zeigen ebenfalls eine Verteilung an Mutationen in den verschiedenen Stämmen des Gemisches und die wt-Variante des Gens scheint auch immer noch vorhanden zu sein. Dies deutet an, dass die Mutationen nicht in allen Genomen vollständig segregiert sind. Hierbei weisen die Ergebnisse darauf hin, dass verschiedene Kopien des Gens jeweils verschiedene Mutationen enthalten, welche sich gegenseitig ausschließen. Bei den ersten drei Mutationen, welche einen Abstand unter 100bp haben und von einem Sequenzier-Read abgedeckt werden können, hat kein Read jemals mehr als eine der Mutationen gleichzeitig enthalten. Dies spricht dafür, dass die verschiedenen Mutationen in *clpC* sich nicht ergänzen, sondern das gleiche phänotypische Resultat durch unterschiedliche Mutationen erreichen.

Es kann angenommen werden, dass die häufigste Mutation in MutIV-2 (Position 2466798) wahrscheinlich den größten Fitnessvorteil bei höheren Temperaturen mit sich bringt, jedoch scheint der Unterschied nicht groß genug zu sein, damit sich eine einzelne Mutation gegenüber den anderen vollständig durchsetzt.

Pnp *Pnp* ist Teil des Degradosoms; es trägt zur Verarbeitung von ribosomaler RNA bei und baut Messenger-RNA ab. Eine erhöhte Expression von *pnp* in *Synechocystis* wurde zuvor bei Säure- (Kurian et al., 2006) und Kälte-Stress (Rowland et al., 2011) beobachtet. Beide in *pnp* identifizierte Mutationen könnten die Aktivität des Enzyms bei hohen Temperaturen steigern. Die Position der ersten Mutation innerhalb der RNA-Binde-Domäne deutet weiterhin eine Änderung der Spezifität gegenüber gewissen RNAs an und könnte somit die Expression anderer Proteine beeinflussen.

In MutIV-2 war nur die zweite Mutation an der Position 98129 aufzufinden, dies zeigt, dass diese Mutation der anderen überlegen ist und sich somit nach der verlängerten *in vivo* Selektion vollständig durchsetzen konnte. Diese Mutation ist zusammen mit der intergenischen Mutation an Position 2260225 die Einzige, welche ausnahmslos in allen Reads von MutIV-2 identifiziert werden konnte. Somit scheint diese Mutation sehr vorteilhaft bei erhöhten Temperaturen zu sein. Ein weites Verbreiten der Mutation durch eine frühe Entstehung kann ausgeschlossen werden, da die Stämme A6 und H2 (welche 1 Jahr vorher aus MutIV-1 isoliert wurden) diese nicht aufwiesen.

PyrR *PyrR* katalysiert den Abbau von Uracil zurück zu Uridinmonophosphat für die Synthese neuer RNA Moleküle. Obwohl keine der Mutationen in *pyrR* innerhalb der konservierten Domänen lagen, könnten diese die Aktivität des Proteins beeinflussen. Besonders im

Zusammenspiel mit der zuvor besprochenen Mutation in *pnp* deutet dies einen erhöhten Turnover der mRNA an. In MutIV-2 haben insgesamt 81,3% der Reads eine der sich gegenseitig ausschließenden Mutationen in *pyrR* aufgewiesen. Dieser hohe Anteil zeigt, dass es sich (zusammen mit *pnp* in 100% der Reads) um eine wichtige Mutation für die Temperaturtoleranz handelt.

SigF *SigF* ist ein RNA-Polymerase Sigmafaktor und beeinflusst viele Prozesse in *Synechocystis*: Es ist notwendig für hohe Salz- und Licht-Toleranzen (Huckauf et al., 2000), für die Expression dicker Pili (Barker et al., 2006; Bhaya et al., 1999) und der damit verbundenen Motilität (Asayama und Imamura, 2008; Bhaya et al., 1999; Huckauf et al., 2000).

In *sigF* wurde in drei der monoklonalen Stämme eine Mutation innerhalb der DNA-Bindestelle identifiziert. Diese Mutation könnte die Bindungsspezifität von *SigF* beeinflussen und somit weitreichende, jedoch unvorhersehbare, Auswirkung auf die Expression vieler verschiedener Proteine haben. Diese Eigenschaft von Mutationen in Sigmafaktoren wurde bereits von Alper et al. (2005) mit der „global transcription machinery engineering“-Methode (gTME) ausgenutzt, um die Ethanoltoleranz in Hefe zu erhöhen. Hierbei wurde eine Bibliothek an zufällig mutagenisierten Sigmafaktoren auf ihre phänotypischen Auswirkungen gescreent.

Zwei der drei monoklonalen Stämme, welche diese Mutation tragen (A6 und H2) haben nur eine oder zwei weitere Mutationen (beide eine in *pilJ*, H2 Zusätzlich eine in *pyk2*). Diese Stämme haben trotzdem im Screening und der Validierung eine vergleichbare Temperaturtoleranz zu anderen Stämmen mit deutlich mehr Mutationen gezeigt (siehe Tabelle 5.2 auf Seite 70). Dies zeigt eine starke phänotypische Auswirkung dieser einzelnen Mutation.

SigF war eines der einzigen beiden Gene (zusammen mit *pilJ*), welches zwar in den monoklonalen Stämmen eine Mutation aufwies, in dem Gemisch MutIV-2 mit nochmals erhöhter Temperaturtoleranz aber nicht mehr detektierbar war. Dieses Ergebnis deutet an, dass die Mutation in *SigF* nicht in der Lage ist, deutlich höhere Temperaturtoleranzen, wie die in A6 und H2 erreichten, zu vermitteln. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass die Mutation durch Deregulierung der Proteinexpression neben der erhöhten Temperaturtoleranz auch zu entscheidenden Nachteilen für die Zelle führt. In beiden Fällen erklärt dies, weshalb diese Mutation bei der verlängerten *in vivo* Selektion auf höheren Temperaturen benachteiligt war.

PilJ *PilJ* ist ein Chemotaxis-Protein, welches für die Bildung dicker Pili und die Motilität benötigt wird (Chung et al., 2001). Es wurde ein Aminosäureaustausch in dem Rezeptorbereich identifiziert. Dieser kann auf eine Auswirkung auf die Funktion des Proteins hinweisen. Die Mutation könnte einen synergetischen Effekt mit der Mutation in *sigF* haben, da diese Mutationen nur gemeinsam in den gleichen drei Stämmen detektiert wurden. In jedem Falls sind die Mutationen in *pilJ* und *sigF* zwar in den meisten monoklonalen Stämmen, jedoch nicht in MutIV-2 auffindbar. Dies zeigt, dass diese Mutationen nur zu einem lokalen Maximum an Temperaturtoleranz führen können.

Pyk2 Die Pyruvatkinase 2 (*pyk2*) ist für die Glykolyse und somit für das Überleben der Zelle essentiell (Knowles und Plaxton, 2003). In *pyk2* wurden zwei Mutationen in konservierten Regionen des Enzyms detektiert. Da *pyk2* essentiell ist, kann ein Knockout oder eine starke Inhibierung ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse deuten hingegen an, dass die Aktivität von *Pyk2* bei erhöhten Temperaturen eingeschränkt wird und somit ein Flaschenhals für das Wachstum von *Synechocystis* darstellt. Durch die Mutationen wird dieser Effekt hingegen reduziert oder evtl. sogar gänzlich entfernt. Die Verteilung in MutIV-2 zeigt weiterhin, dass die zweite Mutation vorteilhafter zu sein scheint, da die Erste quasi vollständig verdrängt wurde. Der sehr hohe Anteil (94,4% der Reads) dieser Mutation lässt wiederum auf einen großen Fitnessvorteil bei erhöhten Temperaturen schließen.

NlpD Die strangaufwärts von *nlpD* identifizierte Mutation (Position 2260225) könnte dessen Expression beeinflussen. In *E. coli* ist *nlpD* an dem Aufbau und Erhalt der Zellwand beteiligt (Lange und Hengge-Aronis, 1994). Uehara et al. (2009, 2010) haben weiterhin gezeigt, dass *nlpD* für den Peptidoglykanabbau während der Zellteilung benötigt wird.

Inoue et al. (2000, 2001) haben bereits gezeigt, dass in *Synechocystis* die Fluidität und Permeabilität der Zellmembran entscheidend für die Akklimatisierung an höhere Temperaturen ist. Die veränderte Aktivität von *nlpD* könnte die Zusammensetzung der Zellmembran beeinflussen, dessen Rigidität erhöhen und somit die Temperaturtoleranz der Zellen steigern. Zusammen mit der zuvor besprochenen Mutation in *pnp* ist diese die Einzige, welche in allen Reads der MutIV-2 Sequenzierung identifiziert wurde. Dies zeigt, dass alle (oder zumindest fast alle) Stämme in dem Gemisch diese Mutation tragen und diese den Zellen somit einen hohen Fitnessvorteil bei erhöhten Temperaturen verschaffen muss. Auch hier kann ein Verbreiten der Mutation in der Population durch eine frühe Entstehung ausgeschlossen werden, da diese nicht in allen monoklonalen Stämmen identifiziert wurde.

Cya1 Adenylylcyclasen regulieren über die Bildung des sekundär Messengers cAMP verschiedene Zellprozesse. In *Synechocystis* wurde bereits gezeigt, dass ein *cya1* Knockout zu verringerter Motilität führt (Bhaya et al., 2006; Terauchi und Ohmori, 1999). Die Effekte der Veränderungen in *cya1* könnten jedoch weitreichende (und schwer vorhersagbare) Auswirkungen, über die Motilität hinaus, haben.

Bereits die konservativere, in dem Stamm A6 identifizierte, Mutation entfernt einige der katalytisch aktiven Zentren in der konservierten CyaA Domäne von *cya1*. In MutIV-2 ist diese Mutation nicht mehr nachweisbar. Die stattdessen vorhandene Mutation ist jedoch deutlich weitreichender. Bei beiden Mutationen ist damit zu rechnen, dass diese zu einer Inaktivierung (Knockout) des Proteins führen. Eine Verbreitung in immerhin 41.3% der Reads von MutIV-2 deutet auf eine nicht zu vernachlässigende Bedeutung für die Temperaturtoleranz hin.

sll0064, slr1098, sll0875 und slr0876 Für die Mutationen in *sll0064*, *slr1098*, sowie der Mutation strangaufwärts von *sll0875* und *slr0876* ist es sehr schwer, über die Mechanismen und Auswirkungen zu spekulieren, da die genauen Funktionen dieser Gene in *Synechocystis* unbekannt sind.

sll0875 und *slr0876* sind hypothetische Gene mit Sequenzen, welche nur anderen hypothetischen Genen ohne bekannte Funktionen oder konservierten Domänen ähneln. Somit ist quasi nichts über ihre Funktion antizipierbar. *Sll0064* ist hingegen zumindest als ein möglicher Aminosäuretransporter klassifiziert. Weiterhin könnte die in *slr1098* vorhandene HEAT Domäne bedeuten, dass das Protein für einen intrazellulären Transport verantwortlich ist (Andrade und Bork, 1995; Groves et al., 1999). Das früh in *slr1098* eingeführte Stopp-Codon ist mit Sicherheit einem Knockout gleichzusetzen.

Die Verbreitung der Mutation in *sll0064* und strangaufwärts von *sll0875* und *slr0876* scheint sich nach der verlängerten Selektion erhöht zu haben (jeweils von 2/5 bzw. 1/5 der monoklonalen Stämme, auf 61% bzw. 51.9% der Reads in MutIV-2) was einen Selektionsvorteil bei erhöhten Temperaturen demonstriert. Die Mutation in *slr1098* scheint hingegen weniger entscheidend für die Temperaturtoleranz in *Synechocystis* zu sein, da nur bei einem der monoklonalen Stämme eine Mutation vorhanden war und in dem Gemisch nur 11.7% und 23.7% der Reads jeweils eine Mutation aufwiesen. Ganz ausschließen sollte man die Auswirkung des Gens jedoch nicht, schließlich scheinen sich drei unabhängige Mutationen durchgesetzt zu haben.

recG, cmpA, rpoC2, glgA, hemH, fur und slr0596

Mutationen in den Genen *recG*, *cmpA*, *rpoC2*, *glgA* und *hemH* sowie die intergenische Mutation an der Position 3553027 (strangaufwärts von *fur* und *slr0596*) wurden nur in dem Gemisch MutIV-2, aber in keinem der untersuchten monoklonalen Stämmen identifiziert.

Bei den Mutationen, welche nur in wenigen Reads vorhanden waren (*rpoC2*, *glgA*, *hemH*, *fur* und *slr0596*), ist es sehr schwer, eine Aussage zu treffen, ob diese tatsächlich selten in dem Gemisch vorkommen oder ob es sich um Sequenzierfehler handelt. Diese sind statistisch auch in einigen Positionen bei mehreren Reads gleichzeitig zu erwarten (Nielsen et al., 2011; Quail et al., 2012). Auch eine Validierung mit PCR und Sanger-Sequenzierung ist bei diesen Mutationen schwierig umzusetzen, da diese alle unter 40% der Reads ausmachen und sich in der kompetitiven Amplifikation die häufigere Wildtyp-Variante durchsetzen würde.

Bei den in *recG* und vor allem in *cmpA*, identifizierten Mutationen ist es aufgrund des hohen Anteils an Reads mit je 54% und 70% hingegen wahrscheinlicher, dass es sich um echte Mutationen handelt. Da nach der Vereinzelung der monoklonalen Stämme keine weitere Mutagenese durchgeführt wurde, ist es weiterhin wahrscheinlich, dass diese Mutationen bereits vor der verlängerten Selektion in dem Gemisch vorhanden, jedoch weniger häufig, d. h. in weniger Stämmen vertreten, waren.

RecG ist in die DNA Reparatur über die homologe Rekombination involviert (Domain et al., 2004). *CmpA* ist Teil des Kohlenstoffanreicherungsapparats in Cyanobakterien (CCM; „Carbon concentrating mechanism“) und bindet spezifisch an Hydrogenkarbonat (Koropatkin

et al., 2007). Die Mutationen in *recG* und *cmpA* befinden sich beide innerhalb der aktiven Domäne und könnten somit das Bindeverhalten (zu Nukleotiden bzw. Bikarbonat) beeinflussen. Die Mutation in *cmpA* ist von besonderem Interesse, da phototrophe Organismen zur Fixierung von CO₂ wegen der veränderten Löslichkeit von O₂ und CO₂ bei höheren Temperaturen typischerweise eine erhöhte Spezifität benötigen. Eukaryoten überwinden dies durch eine Veränderung der RuBisCo selber (Tcherkez et al., 2006); Cyanobakterien hingegen reichern CO₂ lokal in dem CCM an (Price et al., 1992). Somit könnte die Mutation in *cmpA* die Effektivität des CCM unter erhöhten Temperaturen steigern.

6.2.5 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wird die Strategie zur Erhöhung der Temperaturtoleranz in *Synechocystis* mittels adaptiver Evolution diskutiert.

Erstmals wurden optimale Dosen zur Induktion nicht-letaler Punktmutationen in *Synechocystis* bestimmt. Spezifische Reparaturmechanismen der Zellen konnten minimiert oder gänzlich umgangen werden. Über ungerichtete Mutagenese und *in vivo* Selektion konnten in *Synechocystis* höhere Temperaturtoleranzen, als zuvor in der wissenschaftlichen Literatur berichtet, erzeugt werden.

Ein Screening monoklonaler Stämme konnte sowohl in einem Schüttelinkubator als auch mit der in 5.1 und 6.1 präsentierten Screeningplattform erfolgreich durchgeführt werden. Ein Vergleich beider Systeme demonstriert die Überlegenheit des neu entwickelten Systems sowohl im Durchsatz als auch in der Qualität der erhaltenen Daten.

Die vollständigen Genome der Stämme wurde sequenziert und die Ergebnisse mit dem Ausgangs-Wildtyp verglichen. Es wurden keine der Gene identifiziert, welche zuvor Ziele von gerichteten Methoden zur Erhöhung der Temperaturtoleranz von *Synechocystis* waren. Stattdessen wurden Mutationen in verschiedenen anderen Gene erstmals mit der Temperaturtoleranz von *Synechocystis* in Verbindung gebracht. Durch die etablierte Vorgehensweise ist es sehr unwahrscheinlich, dass sich negative oder neutrale Mutationen in der Vielzahl an Genomkopien von *Synechocystis* durchsetzen können. Somit kann davon ausgegangen werden, dass alle Mutationen zur Temperaturtoleranz der Stämme beitragen. Für einige der neu identifizierten Mutationen bzw. Genen ist es sehr unwahrscheinlich, dass eine Identifikation mittels anderer Verfahren möglich gewesen wäre.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit, eine Strategie zur Anpassung von Cyanobakterien an biotechnologische und industrielle Erfordernisse mittels adaptiver Evolution zu entwickeln, konnte an Hand des Beispiels der Erhöhung der Temperaturtoleranz von *Synechocystis* erfolgreich demonstriert werden. Der gesamte Arbeitsablauf bestehend aus Mutagenese, *in vivo* Selektion, Screening, Validierung und Sequenzierung ist etabliert und könnte auch unproblematisch für andere Fragestellungen eingesetzt werden.

Es wurden optimale Dosen für die Induktion nicht-letaler Punktmutationen in *Synechocystis* für die Mutagene UV und MMS identifiziert. Diese Dosen und die zur Bestimmung eingesetzte Methodik können für andere Cyanobakterien-Stämme genutzt werden. Weiterhin kann die zur Bestimmung eingesetzte Methodik auch für andere Stämme angewendet werden.

Mit den optimalen Mutagendosen wurde eine adaptive Evolution durchgeführt, wodurch die Temperaturtoleranz von *Synechocystis* um ca. 3°C erhöht werden konnte. Über andere Selektionsbedingungen kann diese Methodik auch dazu genutzt werden, weitere wünschenswerte Charakteristika einzuführen. Dies ist besonders für Eigenschaften attraktiv, bei denen nicht offensichtlich ist, welche Gene diese beeinflussen, so dass gerichtete Methoden stark eingeschränkt sind. Naheliegende Beispiele sind z.B. die Erhöhung einer Ethanoltoleranz (für den Einsatz zur Biotreibstoffproduktion) oder die Anpassungen an Produktionsbedingungen (Salztoleranz, Druckbeständigkeit, usw.).

Als Teil der Strategie wurde ein Hochdurchsatzverfahren benötigt, um vorteilhaft mutagenisierte Organismen selektieren zu können.

Da solche Systeme nicht verfügbar waren, wurde ein Hochdurchsatz - Kultivierungs- und Screeningsystem für phototrophe Mikroorganismen, inklusive entsprechender Methodik, entwickelt und erfolgreich eingesetzt. Das System ermöglicht eine miniaturisierte, automatisierte und parallele Kultivierung von bis zu 192 Kulturen mit reproduzierbaren Bedingungen. Zudem wurden verschiedene analytische Methoden im System etabliert, die eine automatisierte Überwachung der Kulturen ermöglichen. In zukünftigen Entwicklungen könnte das System leicht auf weitere Parameter oder Analyten (z.B. biochemische oder enzymatische Assays, qPCR, ddPCR, HPLC, usw.) erweitert werden.

Die über das Screeningverfahren vereinzelt und charakterisierten Stämme, sowie ein Gemisch vieler Stämme, wurden sequenziert, um für die Temperaturtoleranz verantwortliche Gene in *Synechocystis* zu identifizieren. Hierbei konnten viele interessante Mutationen identi-

fiziert werden. Einige der betroffenen Gene (z.B. *pyk2* – welches die Pyruvatkinase 2 kodiert) sind keine offensichtlichen Kandidaten für die Temperaturtoleranz. Für diese ist es sehr unwahrscheinlich, dass die Identifikation über den Einsatz einer anderen Methodik überhaupt möglich gewesen wäre und unterstreicht somit die Vorteile des hier entwickelten Verfahrens. Für weitere Erkenntnisse wäre bei den erzeugten Stämmen auch eine Betrachtung von Genexpressionsprofilen auf mRNA- (qPCR, RNAseq) oder Protein-Ebene (LC-MS, Protein-Microarrays) von großem Interesse.

Da durch die Ergebnisse dieser Arbeit mehrere Gene und konkrete Mutationen identifiziert werden konnten, die eine Langzeit-Temperaturtoleranz in *Synechocystis* bewirken, sind nun auch gerichtete Methoden möglich, die zuvor nur sehr mäßige Erfolg ermöglichten.

Durch die gentechnische Kombination vieler der identifizierten Mutationen in einem Organismus könnte zudem die Etablierung eines Phänotyps mit noch höherer Temperaturtoleranz möglich sein.

Die Effekte einzelner Mutationen sollten in Zukunft auch isoliert analysiert werden, indem diese spezifisch in den Wildtyp eingeführt werden. Neben einer Analyse des Phänotyps wäre auch hier eine Analyse der Genexpression relevant. Eine isolierte Betrachtung ist für Mutationen, wie die im Sigma-Faktor *F*, welche die Expression vieler Gene beeinflussen können, von besonderem Interesse. *SigF* ist nun auch ein naheliegender Kandidat für gTME (global transcription machinery engineering); hierbei wird durch *error prone* PCR an Sigmafaktoren die globale Genexpression eines Organismus zufällig verändert. Weiterhin könnten die Einflüsse der Mutationen auf Proteinkinetiken untersucht werden; so könnte z.B. für *Pyk2* die Aktivität des mutierten Proteins mit der wt-Variante bei verschiedenen Temperaturen verglichen werden.

Die Screening-Plattform für phototrophe Mikroorganismen ist neben der Strategie zur Anpassung von Cyanobakterien ein eigenständiges Ergebnis der Arbeit und stellt eine signifikante Neuentwicklung mit weitreichenden Anwendungsfeldern dar.

Die Plattform ist bereits im vorliegenden Zustand für viele andere phototrophische Mikroorganismen, neben *Synechocystis*, einsetzbar und sollte für viele weitere anpassbar sein. Momentan ist das System noch auf die gleichzeitige Kultivierung von 192 Kulturen beschränkt, ist jedoch unproblematisch hochzuskalieren. Der Bau einer weiteren Iteration des Systems mit mehreren Kammern, jeweils mit geringerem Platzbedarf und individuell einstellbaren Bedingungen, ist in Planung. Für die individuelle Belichtung jeder Kammer soll ein LED-Array auf jedem Schüttler montiert werden. Hierdurch wird voraussichtlich auch der geringe Unterschied in den Wachstumsraten an den Plattenrändern entfernt oder minimiert werden. Zwischen LED-Beleuchtung und DWP soll eine Glaskammer montiert werden. Diese wird mit Wasser über einem externen Thermostat zur Temperierung der Platten genutzt werden. Die Plattform wird für zukünftige akademische und möglicherweise kommerzielle Vorhaben unter dem Namen „PhotoScreener“ weitergeführt werden.

Da vergleichbare Systeme zuvor nicht für phototrophe Mikroorganismen zur Verfügung standen, öffnet die Entwicklung von PhotoScreener die Tür zur Hochdurchsatzanalyse einer

bisher relativ wenig genutzten Organismengruppe mit sehr vielseitigen Anwendungsfeldern. Beispiele sind das Screening von existierenden Stammsammlungen hinsichtlich ihrer Produktivität oder ihrer Naturstoffgehalte, sowie das Screening der großen Zahl Stämme, die aus sog. Zufalls- oder Transposonmutagenesen im Rahmen von systembiologischen Forschungen resultieren.

Über diesen erhöhten Durchsatz wird auch das Screening ohne vorherige *in vivo* Selektion zur Anreicherung von wünschenswerten Mutanten möglich. Somit könnte auch auf Parameter gescreent werden, welche keine Wachstumsvorteile mit sich bringen. Naheliegende Anwendungen sind das Screening auf Stämme mit besonders hohem Anteil an bestimmten Fettsäuren oder erhöhten Produktionsraten von Biotreibstoffen.

Konkret geplant sind im Rahmen von verschiedenen beantragten Projekten die Anwendungen von PhotoScreener zur Identifikation von Stämmen auf potentielle tumortheraeutisch einsetzbaren Mikrocytine („CyanoScreen“ - zimKF), zur Untersuchung und Modellierung der Wachstumscharakteristika verschiedener mit Hilfe von Transposonmutagenese erzeugter *Synechocystis*-Stämme („CyanoPRO“ - e:Bio) und zur Hochdurchsatzkultivierung und Modellierung verschiedener Wildtyp-Stämme („CyPheno“ - FETopen).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Marcus Frohme für die Möglichkeit, die Promotionsarbeiten in seinen Laboren durchzuführen und für die offene und kollegiale Arbeitsatmosphäre. Seine Hilfestellungen haben zu dem Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Wolfgang Lockau, der einen Großteil dieser Arbeit betreut hat. Er bereicherte diese mit zahlreichen Diskussionen und Hinweisen.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Dr. Ralf Steuer, der sich kurzfristig dazu bereit erklärt hat, die Betreuung der Arbeit zu übernehmen. Er zeigte großes Interesse und wird über fortlaufende Zusammenarbeiten auch an der Weiterentwicklungen der hier präsentierten Ergebnisse maßgeblich beteiligt sein.

Ich danke weiterhin Prof. Dr. Martin Hagemann für die Erstellung eines zusätzlichen Gutachtens, sowie Prof. Dr. Andreas Möglich für die Übernahme des Vorsitzes und Prof. Dr. Rudolf Ehwald für die Teilnahme an der Promotionskommission.

Danken möchte ich auch der gesamten Arbeitsgruppe der Molekularen Biotechnologie und funktionellen Genomik an der TH Wildau für das sehr gute Arbeitsklima und die hilfreiche Zusammenarbeit und Unterstützung. Besonders hervorzuheben sind hier Nick Wolter und Steffi Grüber für die gemeinsame Weiterentwicklung des Screeningsystems, Philipp Franke für die vielfache Durchführung von ION Torrent Sequenzierungen, sowie Sandra Lehmann für ihre Arbeiten an der Bestimmung der optimalen Mutagenosis für *Synechocystis*.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern der Algenol Deutschland GmbH (früher Cyano Biofuels GmbH), im besonderen Dr. Dan Kramer und Dr. Ulf Dühning, für die gute Zusammenarbeit und die finanzielle Unterstützung.

Nicht zuletzt will ich meiner Familie und Freunden für die Unterstützung -und zahlreichen Rechtschreibkorrekturen- danken.

Publikationsliste

Primärpublikationen

Keil K., Radke L., **Tillich U. M.** und Frohme M. (2014). „Automatisierung des Bio-Plex Pro Analyseverfahrens“. *Wissenschaftliche Beiträge TH Wildau*, in Druck

Tillich U. M. , Wolter N., Schulze K., Kramer D., Brödel O. und Frohme M. (2014). „High-throughput cultivation and screening platform for unicellular phototrophs“. *BMC Microbiology*, 14.1, 239

Tillich U. M. , Wolter N., Franke P., Dühning U. und Frohme M. (2014). „Screening and genetic characterization of thermo-tolerant *Synechocystis* sp. PCC6803 strains created by adaptive evolution“. *BMC Biotechnology*, 14.1, 66

Schulze K., **Tillich U. M.**, Dandekar T. und Frohme M. (2013). „PlanktoVision - an automated analysis system for the identification of phytoplankton“, *BMC Bioinformatics*, 14.1, 115

Tillich U. M. , Grüber S. und Frohme M. (2012). „Etablierung von Hochdurchsatz-Kultivierung und -Screening Methoden für phototrophe Einzeller“. *Wissenschaftliche Beiträge TH Wildau*, S. 31–37

Tillich U. M., Lehmann S., Schulze K., Dühning U. und Frohme M. (2012) „The Optimal Mutagen Dosage to Induce Point-Mutations in *Synechocystis* sp. PCC6803 and Its Application to Promote Temperature Tolerance“, *PLoS ONE* 7.11, e49467.

Schulze K., López D. A., **Tillich U. M.** und Frohme M. (2011). „A Simple Live / Dead Analysis for unicellular Cyanobacteria using a new Autofluorescence Assay, automated Microscopy, and ImageJ“. *BMC Biotechnology* 11.1, 118

Konferenzbeiträge

Tillich U. M. (2014). „Automatisiertes Screening von Blaualgen im Hochdurchsatz - Biotechnologisches Neuland an der TH Wildau“. *Forschungskolloquium TH Wildau*; (Vortrag)

Tillich U. M. & Schulze K. (2014). „Wissenschaftliche Laufbahn an der TH Wildau“. *TH Connect*; (Vortrag)

Tillich U. M. (2014). „High-throughput cultivation and screening platform for phototrophic microorganisms“. *Humboldt Universität zu Berlin*; (Vortrag)

Schulze K., López D. A., **Tillich UM** und Frohme M (2013). „A simple viability analysis for unicellular cyanobacteria“. *8. Deutsches Biosensor Symposium, Wildau*; (Poster)

Schulze K., López D. A., **Tillich U. M.**, Gatomski G., Krüger P., Foitzik A., Mischke U. und Frohme M. (2013). „Characterization of microalgae and phytoplankton samples“. *Bio-HyTec Workshop: Bioanalytik und Biosystemtechnik*; (Vortrag)

Tillich U. M. (2011). „High-Throughput-Culturing and -Screening for Ethanol Producing Cyanobacteria“. *Workshop on Bioanalysis, Luckenwalde*; (Vortrag)

Tillich U. M., Dühning U. und Frohme M. (2010). „Identification and evaluation of new reference genes for quantitative real-time PCR in the cyanobacterial model organism *Synechocystis sp. PCC6803*“. *8th European Workshop Biotechnology of Microalgae*; (Poster)

Berlin, den

Ulrich M. Tillich

Literatur

- Agarwal, D., Gregory, S. T. und O'Connor, M. (2011). "Error-prone and error-restrictive mutations affecting ribosomal protein s12." *Journal of Molecular Biology* 410.1, S. 1–9.
- Alper, H., Fischer, C., Nevoigt, E. und Stephanopoulos, G. (2005). "Tuning genetic control through promoter engineering". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.36, S. 12678–12683.
- Alsema, E. und Fthenakis, V. (2006). "Photovoltaics Energy Payback Times, Greenhouse Gas Emissions and External Costs". *Progress in Photovoltaics: Research and Applications* 14, S. 275–280.
- Alsema, E., Wild-Scholten, M. und Fthenakis, V. (2006). "Environmental Impacts of PV Electricity Generation - A Critical Comparison of Energy Supply Options". *Presented at the 21st European Photovoltaic Solar Energy Conference*.
- Anderson, J. M., Chow, W. S. und Park, Y.-I. (1995). "The grand design of photosynthesis: Acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues". *Photosynthesis Research* 46.1-2, S. 129–139.
- Andrade, M. A. und Bork, P. (1995). "HEAT repeats in the Huntington's disease protein". *Nature Genetics* 11.2, S. 115–116.
- Asayama, M. und Imamura, S. (2008). "Stringent promoter recognition and auto-regulation by the group 3 sigma-factor SigF in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." *Nucleic Acids Research* 36.16, S. 5297–5305.
- Bannwarth, H., Kremer, B. P. und Schulz, A. (2007). *Basiswissen Physik, Chemie und Biochemie*. Springer Berlin Heidelberg.
- Barbuddhe, S. B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T. und Hain, T. (2008). "Rapid Identification and Typing of *Listeria* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry". *Applied and Environmental Microbiology* 74.17, S. 5402–5407.

- Barker, M., Vries, R. de, Nield, J., Komenda, J. und Nixon, P. J. (2006). "The deg proteases protect *Synechocystis* sp. PCC 6803 during heat and light stresses but are not essential for removal of damaged D1 protein during the photosystem two repair cycle." *The Journal of Biological Chemistry* 281.41, S. 30347–30355.
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., Hall, K. P., Evers, D. J., Barnes, C. L., Bignell, H. R., Boutell, J. M., Bryant, J., Carter, R. J., Keira Cheetham, R., Cox, A. J., Ellis, D. J., Flatbush, M. R., Gormley, N. A., Humphray, S. J., Irving, L. J., Karbelashvili, M. S., Kirk, S. M., Li, H., Liu, X., Maisinger, K. S., Murray, L. J., Obradovic, B., Ost, T., Parkinson, M. L., Pratt, M. R., Rasolonjatovo, I. M. J., Reed, M. T., Rigatti, R., Rodighiero, C., Ross, M. T., Sabot, A., Sankar, S. V., Scally, A., Schroth, G. P., Smith, M. E., Smith, V. P., Spiridou, A., Torrance, P. E., Tzonev, S. S., Vermaas, E. H., Walter, K., Wu, X., Zhang, L., Alam, M. D., Anastasi, C., Aniebo, I. C., Bailey, D. M. D., Bancarz, I. R., Banerjee, S., Barbour, S. G., Baybayan, P. A., Benoit, V. A., Benson, K. F., Bevis, C., Black, P. J., Boodhun, A., Brennan, J. S., Bridgham, J. A., Brown, R. C., Brown, A. A., Buermann, D. H., Bundu, A. A., Burrows, J. C., Carter, N. P., Castillo, N., Chiara E. Catenazzi, M., Chang, S., Neil Cooley, R., Crake, N. R., Dada, O. O., Diakoumakos, K. D., Dominguez-Fernandez, B., Earnshaw, D. J., Egbujor, U. C., Elmore, D. W., Etchin, S. S., Ewan, M. R., Fedurco, M., Fraser, L. J., Fuentes Fajardo, K. V., Scott Furey, W., George, D., Gietzen, K. J., Goddard, C. P., Golda, G. S., Granieri, P. A., Green, D. E., Gustafson, D. L., Hansen, N. F., Harnish, K., Haudenschild, C. D., Heyer, N. I., Hims, M. M., Ho, J. T., Horgan, A. M., Hoschler, K., Hurwitz, S., Ivanov, D. V., Johnson, M. Q., James, T., Huw Jones, T. A., Kang, G.-D., Kerelska, T. H., Kersey, A. D., Khrebtukova, I., Kindwall, A. P., Kingsbury, Z., Kokko-Gonzales, P. I., Kumar, A., Laurent, M. A., Lawley, C. T., Lee, S. E., Lee, X., Liao, A. K., Loch, J. A., Lok, M., Luo, S., Mammen, R. M., Martin, J. W., McCauley, P. G., McNitt, P., Mehta, P., Moon, K. W., Mullens, J. W., Newington, T., Ning, Z., Ling Ng, B., Novo, S. M., O'Neill, M. J., Osborne, M. A., Osnowski, A., Ostadan, O., Paraschos, L. L., Pickering, L., Pike, A. C., Pike, A. C., Chris Pinkard, D., Pliskin, D. P., Podhasky, J., Quijano, V. J., Raczy, C., Rae, V. H., Rawlings, S. R., Chiva Rodriguez, A., Roe, P. M., Rogers, J., Rogert Bacigalupo, M. C., Romanov, N., Romieu, A., Roth, R. K., Rourke, N. J., Ruediger, S. T., Rusman, E., Sanches-Kuiper, R. M., Schenker, M. R., Seoane, J. M., Shaw, R. J., Shiver, M. K., Short, S. W., Sizto, N. L., Sluis, J. P., Smith, M. A., Ernest Sohna Sohna, J., Spence, E. J., Stevens, K., Sutton, N., Szajkowski, L., Tregidgo, C. L., Turcatti, G.,

- vandeVondele, S., Verhovsky, Y., Virk, S. M., Wakelin, S., Walcott, G. C., Wang, J., Worsley, G. J., Yan, J., Yau, L., Zuerlein, M., Rogers, J., Mullikin, J. C., Hurles, M. E., McCooke, N. J., West, J. S., Oaks, F. L., Lundberg, P. L., Klenerman, D., Durbin, R. und Smith, A. J. (2008). "Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry". *Nature* 456.7218, S. 53–59.
- Bhaya, D., Watanabe, N., Ogawa, T. und Grossman, A. R. (1999). "The role of an alternative sigma factor in motility and pilus formation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96.6, S. 3188–3193.
- Bhaya, D., Nakasugi, K., Fazeli, F. und Burriesci, M. S. (2006). "Phototaxis and impaired motility in adenyl cyclase and cyclase receptor protein mutants of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." *Journal of Bacteriology* 188.20, S. 7306–7310.
- Burbaum, J. J. (1998). "Miniaturization technologies in HTS: how fast, how small, how soon?" *Drug Discovery Today* 3.7, S. 313–322.
- Canter-Lund, H. (1995). *Freshwater Algae: Their Microscopic World Explored*. Bio-press Ltd.
- Carroll, S. S., Inglese, J., Mao, S.-S. und Olsen, D. B. (2004). "Drug Screening: Assay Development Issues". In: *Molecular Cancer Therapeutics*, S. 119–140.
- Carter, a. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T. und Ramakrishnan, V. (2000). "Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics." *Nature* 407.6802, S. 340–348.
- Caruso, G., Cavaliere, C., Guarino, C., Gubbiotti, R., Foglia, P. und Laganà, A. (2008). "Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391.1, S. 381–390.
- Chaturvedi, R. und Fujita, Y. (2006). "Isolation of enhanced eicosapentaenoic acid producing mutants of *Nannochloropsis oculata* ST-6 using ethyl methane sulfonate induced mutagenesis techniques and their characterization at mRNA transcript level". *Phycological Research* 54.3, S. 208–219.
- Chisti, Y. (2008). "Response to Reijnders: Do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants?" *Trends in Biotechnology* 26.7, S. 351–352.
- Chung, Y. H., Cho, M. S., Moon, Y. J., Choi, J. S., Yoo, Y. C., Park, Y. I., Lee, K. M., Kang, K. W. und Park, Y. M. (2001). "ctr1, a gene involved in a signal transduction pathway of the gliding motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803". *FEBS Letters* 492.1-2, S. 33–38.

- Cingolani, P., Platts, A., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land, S., Lu, X. und Ruden, D. (2012). "A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3". *Fly* 6.2, S. 80–92.
- Currier, T., Haury, J. und Wolk, C. (1977). "Isolation and preliminary characterization of auxotrophs of a filamentous Cyanobacterium." *Journal of Bacteriology* 129.3, S. 1556–1562.
- Custodio, E. (2002). "Aquifer overexploitation: what does it mean?" *Hydrogeology Journal* 10.2, S. 254–277.
- Day, J. G. (2007). "Cryopreservation of Microalgae and Cyanobacteria". In: *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. 368, S. 141–151.
- Demple, B., Sedgwick, B., Robins, P., Totty, N., Waterfield, M. D. und Lindahl, T. (1985). "Active site and complete sequence of the suicidal methyltransferase that counters alkylation mutagenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82.9, S. 2688–2692.
- Doan, T. T. Y. und Obbard, J. P. (2012). "Enhanced intracellular lipid in *Nannochloropsis* sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting". *Algal Research* 1.1, S. 17–21.
- Domain, F., Houot, L., Chauvat, F. und Cassier-Chauvat, C. (2004). "Function and regulation of the cyanobacterial genes *lexA*, *recA* and *ruvB*: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation". *Molecular Microbiology* 53.1, S. 65–80.
- Draaisma, R. B., Wijffels, R. H., (Ellen) Slegers, P., Brentner, L. B., Roy, A. und Barbosa, M. J. (2013). "Food commodities from microalgae". *Current Opinion in Biotechnology* 24.2, S. 169–177.
- Drews, J. (2000). "Drug Discovery: A Historical Perspective". *Science* 287.5460, S. 1960–1964.
- Druley, T. E., Vallania, F. L., Wegner, D. J., Varley, K. E., Knowles, O. L., Bonds, J. A., Robison, S. W., Doniger, S. W., Hamvas, A., Cole, F. S., Fay, J. C. und Mitra, R. D. (2009). "Quantification of rare allelic variants from pooled genomic DNA". *Nature Methods* 6.4, S. 263–265.
- Duetz, W. a., Rüedi, L., Hermann, R., O'Connor, K., Büchs, J. und Witholt, B. (2000). "Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates." *Applied and Environmental Microbiology* 66.6, S. 2641–2646.

- Duetz, W. a. (2007). "Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods." *Trends in Microbiology* 15.10, S. 469–475.
- Farrell, A., Coleman, B. I., Benenati, B., Brown, K. M., Blader, I. J., Marth, G. T. und Gubbels, M.-J. (2014). "Whole genome profiling of spontaneous and chemically induced mutations in *Toxoplasma gondii*". *BMC Genomics* 15.1, S. 354.
- Fernandes, P. und Cabral, J. (2006). "Microlitre/millilitre shaken bioreactors in fermentative and biotransformation processes – a review". *Biocatalysis and Biotransformation* 24.4, S. 237–252.
- Fields, S. (2004). "Global Nitrogen: Cycling out of Control". *Environmental Health Perspectives* 112, S. 556–563.
- Fisheries and Aquaculture Department - United Nations (2012). *The state of world fisheries and aquaculture 2012*. Food und Agriculture Organization of the United Nations; Eurospan.
- Floriano, B., Herrero, a. und Flores, E. (1992). "Isolation of arginine auxotrophs, cloning by mutant complementation, and sequence analysis of the argC gene from the cyanobacterium *Anabaena* species PCC 7120." *Molecular Microbiology* 6.15, S. 2085–2094.
- Foster, P. L. (1991). "In vivo mutagenesis." *Methods in Enzymology* 204, S. 114–125.
- Foster, S. S. D. und Chilton, P. J. (2003). "Groundwater: the processes and global significance of aquifer degradation". *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 358.1440, S. 1957–1972.
- Fox, S., Farr-Jones, S. und Yund, M. A. (1999). "High Throughput Screening for Drug Discovery: Continually Transitioning into New Technology". *Journal of Biomolecular Screening* 4.4, S. 183–186.
- Franche, C. und Damerval, T. (1988). "Tests on nif probes and DNA hybridizations". In: *Methods in Enzymology*. Bd. Volume 167, S. 803–808.
- Glenn, T. C. (2011). "Field guide to next-generation DNA sequencers". *Molecular Ecology Resources* 11.5, S. 759–769.
- Griese, M., Lange, C. und Soppa, J. (2011). "Ploidy in cyanobacteria". *FEMS Microbiology Letters* 323.2, S. 124–131.
- Grossman, A. R., Schaefer, M. R., Chiang, G. G. und Collier, J. L. (1993). "The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions". *Microbiological Reviews* 57.3, S. 725–749.
- Groves, M. R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B. A. und Barford, D. (1999). "The Structure of the Protein Phosphatase 2A PR65/A Subunit Reveals the Conformation of Its 15 Tandemly Repeated HEAT Motifs". *Cell* 96.1, S. 99–110.

- Guedes, A. C., Amaro, H. M., Barbosa, C. R., Pereira, R. D. und Malcata, F. X. (2011). "Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α -linolenic acids for eventual dietary uses". *Food Research International* 44.9, S. 2721–2729.
- Hoek, C. van den, Jahns, H. M. und Mann, D. G. (1993). *Algen*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Hörtensteiner, S. (2006). "Chlorophyll Degradation During Senescence*". *Annual Review of Plant Biology* 57.1, S. 55–77.
- Huang, L. und McCluskey, M. (2002). "Global gene expression profiles of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 in response to irradiation with UV-B and white light". *Journal of Bacteriology* 184, S. 6845–6858.
- Huber, R., Palmen, T. G., Ryk, N., Hillmer, A.-K., Luft, K., Kensy, F. und Büchs, J. (2010). "Replication methods and tools in high-throughput cultivation processes - recognizing potential variations of growth and product formation by on-line monitoring". *BMC Biotechnology* 10.1, S. 22.
- Huber, R., Ritter, D., Hering, T., Hillmer, A.-K., Kensy, F., Müller, C., Wang, L. und Büchs, J. (2009). "Robo-Lector - a novel platform for automated high-throughput cultivations in microtiter plates with high information content." *Microbial Cell Factories* 8, S. 42.
- Huber, R., Roth, S., Rahmen, N. und Büchs, J. (2011). "Utilizing high-throughput experimentation to enhance specific productivity of an E.coli T7 expression system by phosphate limitation." *BMC Biotechnology* 11.1, S. 22.
- Huckauf, J., Nomura, C., Forchhammer, K. und Hagemann, M. (2000). "Stress responses of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 mutants impaired in genes encoding putative alternative sigma factors." *Microbiology* 146, S. 2877–2889.
- Illumina, Inc. (2014). *HiSeq X Ten for Population-Scale Sequencing*. URL: <http://www.illumina.com/systems/hiseq-x-sequencing-system/system.ilmn> (aufgerufen am 15.07.2014).
- Inoue, N., Emi, T., Yamane, Y., Kashino, Y., Koike, H. und Satoh, K. (2000). "Effects of high-temperature treatments on a thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*". *Plant and Cell Physiology* 41.4, S. 515–522.
- Inoue, N., Taira, Y., Emi, T., Yamane, Y., Kashino, Y., Koike, H. und Satoh, K. (2001). "Acclimation to the Growth Temperature and the High-Temperature Effects on Photosystem II and Plasma Membranes in a Mesophilic Cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC6803". *Plant and Cell Physiology* 42.10, S. 1140–1148.

- Jia, K. und Zhang, Y. (2010). "Systematic engineering of microorganisms to improve alcohol tolerance". *Engineering in Life Sciences* 10.5, S. 422–429.
- Jünemann, S., Sedlazeck, F. J., Prior, K., Albersmeier, A., John, U., Kalinowski, J., Mellmann, A., Goesmann, A., Haeseler, A. von und Stoye, J. (2013). "Updating benchtop sequencing performance comparison". *Nature Biotechnology* 31.4, S. 294–296.
- Kaczmarzyk, D., Anfelt, J., Särnegrim, A. und Hudson, E. P. (2014). "Overexpression of sigma factor SigB improves temperature and butanol tolerance of *Synechocystis* sp. PCC6803". *Journal of Biotechnology* 182–183, S. 54–60.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, a., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, a., Muraki, a., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, a., Yamada, M., Yasuda, M. und Tabata, S. (1996). "Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803." *DNA Research* 3.3, S. 185–209.
- Knowles, V. L. und Plaxton, W. C. (2003). "From Genome to Enzyme: Analysis of Key Glycolytic and Oxidative Pentose-Phosphate Pathway Enzymes in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803". *Plant and Cell Physiology* 44.7, S. 758–763.
- Koropatkin, N. M., Koppenaar, D. W., Pakrasi, H. B. und Smith, T. J. (2007). "The Structure of a Cyanobacterial Bicarbonate Transport Protein, CmpA". *Journal of Biological Chemistry* 282.4, S. 2606–2614.
- Kumar, S., Wittmann, C. und Heinzle, E. (2004). "Minibioreactors". *Biotechnology Letters* 26.1, S. 1–10.
- Kurian, D., Phadwal, K. und Mäenpää, P. (2006). "Proteomic characterization of acid stress response in *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Proteomics* 6.12, S. 3614–3624.
- Lambert, J. A. M., Williams, E., O'Brien, P. A. und Houghton, J. A. (1980). "Mutation Induction in the Cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola*". *Journal of General Microbiology* 121.1, S. 213–219.
- Lange, R. und Hengge-Aronis, R. (1994). "The nIpD gene is located in an operon with rpoS on the Escherichia coli chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation". *Molecular Microbiology* 13.4, S. 733–743.
- Lee, R. E. (1989). *Phycology*. Cambridge University Press.

- Lee, S., Prochaska, D. J., Fang, F. und Barnum, S. R. (1998). "A 16.6-kilodalton protein in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 plays a role in the heat shock response". *Current Microbiology* 37.6, S. 403–407.
- Levine, E. und Thiel, T. (1987). "UV-inducible DNA repair in the cyanobacteria *Anabaena* spp." *Journal of Bacteriology* 169.9, S. 3988–3993.
- Lewis, N. S. (2007). "Towards Cost-Effective Solar Energy Use". *Science* 315, S. 798–801.
- Li, J. W.-H. und Vederas, J. C. (2009). "Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier?" *Science* 325.5937, S. 161–165.
- Lindahl, T., Sedgwick, B., Sekiguchi, M. und Nakabeppu, Y. (1988). "Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents." *Annual Review of Biochemistry* 57, S. 133–157.
- Loman, N. J., Constantinidou, C., Chan, J. Z., Halachev, M., Sergeant, M., Penn, C. W., Robinson, E. R. und Pallen, M. J. (2012). "High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity". *Nature Reviews Microbiology* 10, S. 599–606.
- Lucas-Lledó, J. I. und Lynch, M. (2009). "Evolution of mutation rates: phylogenomic analysis of the photolyase/cryptochrome family." *Molecular Biology and Evolution* 26.5, S. 1143–1153.
- Mamedov, M., Hayashi, H. und Murata, N. (1993). "Effects of glycinebetaine and unsaturation of membrane lipids on heat stability of photosynthetic electron-transport and phosphorylation reactions in *Synechocystis* PCC6803". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1142.1–2, S. 1–5.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y.-J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., Jando, S. C., Alenquer, M. L. I., Jarvie, T. P., Jirage, K. B., Kim, J.-B., Knight, J. R., Lanza, J. R., Leamon, J. H., Lefkowitz, S. M., Lei, M., Li, J., Lohman, K. L., Lu, H., Makhijani, V. B., McDade, K. E., McKenna, M. P., Myers, E. W., Nickerson, E., Nobile, J. R., Plant, R., Puc, B. P., Ronan, M. T., Roth, G. T., Sarkis, G. J., Simons, J. F., Simpson, J. W., Srinivasan, M., Tartaro, K. R., Tomasz, A., Vogt, K. A., Volkmer, G. A., Wang, S. H., Wang, Y., Weiner, M. P., Yu, P., Begley, R. F. und Rothberg, J. M. (2005). "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors". *Nature* 437, S. 376–380.

- Marin, K., Huckauf, J. und Fulda, S. (2002). "Salt-dependent expression of glucosyl-glycerol-phosphate synthase, involved in osmolyte synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803". *Journal of Bacteriology* 184.11, S. 2870–2872.
- Marin, K., Kanasaki, Y., Los, D. und Murata, N. (2004). "Gene expression profiling reflects physiological processes in salt acclimation of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803". *Plant Physiology* 136.October, S. 3290–3300.
- Marklein, G., Josten, M., Klanke, U., Müller, E., Horré, R., Maier, T., Wenzel, T., Kostrzewa, M., Bierbaum, G., Hoerauf, A. und Sahl, H.-G. (2009). "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates". *Journal of Clinical Microbiology* 47.9, S. 2912–2917.
- Marsac, N. T. d. (1977). "Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria." *Journal of Bacteriology* 130.1, S. 82–91.
- Mayr, L. M. und Fuerst, P. (2008). "The Future of High-Throughput Screening". *Journal of Biomolecular Screening* 13.6, S. 443–448.
- Meireles, L. a., Guedes, a. C. und Malcata, F. X. (2003). "Increase of the yields of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by the microalga *Pavlova lutheri* following random mutagenesis." *Biotechnology and Bioengineering* 81.1, S. 50–55.
- Merriman, B., R&D Team, I. T. und Rothberg, J. M. (2012). "Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing: Nanoanalysis". *Electrophoresis* 33.23, S. 3397–3417.
- Metzker, M. L. (2009). "Sequencing technologies — the next generation". *Nature Reviews Genetics* 11.1, S. 31–46.
- Michel, B. (2005). "After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us." *PLoS Biology* 3.7, e255.
- Miller, J. (1985). "Mutagenic specificity of ultraviolet light". *Journal of Molecular Biology* 182.1, S. 45–65.
- Milne, I., Bayer, M., Cardle, L., Shaw, P., Stephen, G., Wright, F. und Marshall, D. (2010). "Tablet–next generation sequence assembly visualization". *Bioinformatics* 26.3, S. 401–402.
- Nakamoto, H., Suzuki, M. und Kojima, K. (2003). "Targeted inactivation of the *hrcA* repressor gene in cyanobacteria". *FEBS Letters* 549.1-3, S. 57–62.
- Nature News (2013). "Seven days: 18–24 October 2013". *Nature* 502.7472, S. 414–415.
- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Bureau, D. P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A. P., Forster, I., Gatlin, D. M., Goldberg, R. J., Hua, K. und Nichols, P. D. (2009).

- “Feeding aquaculture in an era of finite resources.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106.36, S. 15103–15110.
- Nielsen, R., Paul, J. S., Albrechtsen, A. und Song, Y. S. (2011). “Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data”. *Nature Reviews Genetics* 12.6, S. 443–451.
- Ong, S.-C., Kao, C.-Y., Chiu, S.-Y., Tsai, M.-T. und Lin, C.-S. (2010). “Characterization of the thermal-tolerant mutants of *Chlorella* sp. with high growth rate and application in outdoor photobioreactor cultivation.” *Bioresource Technology* 101.8, S. 2880–2883.
- Parmar, A., Singh, N. K., Pandey, A., Gnansounou, E. und Madamwar, D. (2011). “Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels”. *Bioresource Technology* 102.22, S. 10163–10172.
- Peng, J., Lu, L. und Yang, H. (2013). “Review on life cycle assessment of energy payback and greenhouse gas emission of solar photovoltaic systems”. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 19, S. 255–274.
- Pereira, H., Barreira, L., Mozes, A., Florindo, C., Polo, C., Duarte, C. V., Custódio, L. und Varela, J. (2011). “Microplate-based high throughput screening procedure for the isolation of lipid-rich marine microalgae.” *Biotechnology for Biofuels* 4.1, S. 61.
- Price, G. D., Coleman, J. R. und Badger, M. R. (1992). “Association of Carbonic Anhydrase Activity with Carboxysomes Isolated from the Cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 1”. *Plant Physiology* 100.2, S. 784–793.
- Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., Bertoni, A., Swerdlow, H. P. und Gu, Y. (2012). “A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers”. *BMC Genomics* 13.1, S. 341.
- Rasband, W. (1997-2014). *ImageJ*. URL: <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- Ratkowsky, D. A., Olley, J., McMeekin, T. A. und Ball, A. (1982). “Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures.” *Journal of Bacteriology* 149.1, S. 1–5.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. und Stanier, R. Y. (1979). “Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria”. *Journal of General Microbiology* 111.1, S. 1–61.
- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J. H., Johnson, K., Milgrew, M. J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J. F., Marran, D., Myers, J. W., Davidson, J. F., Branting, A., Nobile, J. R., Puc,

- B. P., Light, D., Clark, T. A., Huber, M., Branciforte, J. T., Stoner, I. B., Cawley, S. E., Lyons, M., Fu, Y., Homer, N., Sedova, M., Miao, X., Reed, B., Sabina, J., Feierstein, E., Schorn, M., Alanjary, M., Dimalanta, E., Dressman, D., Kasinskas, R., Sokolsky, T., Fidanza, J. A., Namsaraev, E., McKernan, K. J., Williams, A., Roth, G. T. und Bustillo, J. (2011). “An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing”. *Nature* 475.7356, S. 348–352.
- Rowland, J. G., Pang, X., Suzuki, I., Murata, N., Simon, W. J. und Slabas, A. R. (2010). “Identification of Components Associated with Thermal Acclimation of Photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC6803”. *PLoS ONE* 5.5, e10511.
- Rowland, J. G., Simon, W. J., Prakash, J. S. S. und Slabas, A. R. (2011). “Proteomics reveals a role for the RNA helicase crhR in the modulation of multiple metabolic pathways during cold acclimation of *Synechocystis* sp. PCC6803.” *Journal of Proteome Research* 10.8, S. 3674–3689.
- Satterthwaite, F. E. (1946). “An Approximate Distribution of Estimates of Variance Components”. *Biometrics Bulletin* 2.6, S. 110–114.
- Schulze, K., López, D. a., Tillich, U. M. und Frohme, M. (2011). “A simple viability analysis for unicellular cyanobacteria using a new autofluorescence assay, automated microscopy, and ImageJ.” *BMC Biotechnology* 11.1, S. 118.
- Sharma, N. K., Tiwari, S. P., Tripathi, K. und Rai, A. K. (2011). “Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges”. *Journal of Applied Phycology* 23.6, S. 1059–1081.
- Shevell, D. und Friedman, B. (1990). “Resistance to alkylation damage in *Escherichia coli*: role of the Ada protein in induction of the adaptive response.” *Mutation Research* 233, S. 53–72.
- Sielaff, H., Christiansen, G. und Schwecke, T. (2006). “Natural products from cyanobacteria: Exploiting a new source for drug discovery”. *IDrugs* 9.2, S. 119–127.
- Singh, A. K., Summerfield, T. C., Li, H. und Sherman, L. a. (2006). “The heat shock response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 and regulation of gene expression by HrcA and SigB.” *Archives of Microbiology* 186.4, S. 273–286.
- Singh, R. K., Tiwari, S. P., Rai, A. K. und Mohapatra, T. M. (2011). “Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery”. *The Journal of Antibiotics* 64.6, S. 401–412.
- Sleep, N. H. und Bird, D. K. (2008). “Evolutionary ecology during the rise of dioxygen in the Earth’s atmosphere”. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363.1504, S. 2651–2664.

- Springer, B., Kidan, Y. und Prammananan, T. (2001). "Mechanisms of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance". *Antimicrobial Agents* 45.10, S. 2877–2884.
- Stadler, L. J. (1929). "Chromosome number and the mutation rate in *Avena* and *Triticum*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 15.12, S. 876–881.
- Stephanopoulos, G. (2007). "Challenges in Engineering Microbes for Biofuel Production". *Science* 315, S. 801–804.
- Suzuki, I., Kanasaki, Y., Hayashi, H., Hall, J. J., Simon, W. J., Slabas, A. R. und Murata, N. (2005). "The histidine kinase Hik34 is involved in thermotolerance by regulating the expression of heat shock genes in *Synechocystis*." *Plant Physiology* 138.3, S. 1409–1421.
- Suzuki, I., Simon, W. J. und Slabas, A. R. (2006). "The heat shock response of *Synechocystis* sp. PCC 6803 analysed by transcriptomics and proteomics". *Journal of Experimental Botany* 57.7, S. 1573–1578.
- Suzuki, S., Ono, N., Furusawa, C., Ying, B.-W. und Yomo, T. (2011). "Comparison of Sequence Reads Obtained from Three Next-Generation Sequencing Platforms". *PLoS ONE* 6.5, e19534.
- Swann, P. F. (1990). "Why do O6-alkylguanine and O4-alkylthymine miscode? The relationship between the structure of DNA containing O6-alkylguanine and O4-alkylthymine and the mutagenic properties of these bases." *Mutation Research* 233.1-2, S. 81–94.
- Szuromi, P., Jasny, B., Clery, D., Austin, J. und Hanson, B. (2007). "Energy for the Long Haul". *Science* 315, S. 782–783.
- Tan, L. T. (2007). "Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery". *Phytochemistry* 68.7, S. 954–979.
- (2010). "Filamentous tropical marine cyanobacteria: a rich source of natural products for anticancer drug discovery". *Journal of Applied Phycology* 22.5, S. 659–676.
- Tang, Y. Z. und Dobbs, F. C. (2007). "Green Autofluorescence in Dinoflagellates, Diatoms, and Other Microalgae and Its Implications for Vital Staining and Morphological Studies". *Applied and Environmental Microbiology* 73.7, S. 2306–2313.
- Tcherkez, G. G. B., Farquhar, G. D. und Andrews, T. J. (2006). "Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose biphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.19, S. 7246–7251.

- Terauchi, K. und Ohmori, M. (1999). “An adenylate cyclase, Cya1, regulates cell motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803.” *Plant and Cell Physiology* 40.2, S. 248–251.
- Tillich, U. M., Grüber, S. und Frohme, M. (2012a). “Etablierung von Hochdurchsatz-Kultivierung und -Screening Methoden für phototrophe Einzeller”. *Wissenschaftliche Beiträge TH Wildau*, S. 31–37.
- Tillich, U. M., Lehmann, S., Schulze, K., Dühring, U. und Frohme, M. (2012b). “The Optimal Mutagen Dosage to Induce Point-Mutations in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and Its Application to Promote Temperature Tolerance”. *PLoS ONE* 7.11, e49467.
- Tillich, U. M., Wolter, N., Franke, P., Dühring, U. und Frohme, M. (2014a). “Screening and genetic characterization of thermo-tolerant *Synechocystis* sp. PCC 6803 strains created by adaptive evolution”. *BMC Biotechnology* 14.1, S. 66.
- Tillich, U. M., Wolter, N., Schulze, K., Kramer, D., Brödel, O. und Frohme, M. (2014b). “High-throughput cultivation and screening platform for unicellular phototrophs”. *BMC Microbiology* 14.1, S. 239.
- Todd, P. und Monti-Bragadin, C. (1979). “MMS mutagenesis in strains of *Escherichia coli* carrying the R46 mutagenic enhancing plasmid: phenotypic analysis of Arg+ revertants”. *Mechanisms of Mutagenesis* 62, S. 227–237.
- Trautmann, D., Voss, B., Wilde, A., Al-Babili, S. und Hess, W. R. (2012). “Microevolution in Cyanobacteria: Re-sequencing a Motile Substrain of *Synechocystis* sp. PCC 6803”. *DNA Research* 19.6, S. 435–448.
- Tuominen, I., Pollari, M., Tyystjärvi, E. und Tyystjärvi, T. (2006). “The SigB σ factor mediates high-temperature responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803”. *FEBS Letters* 580.1, S. 319–323.
- Uehara, T., Dinh, T. und Bernhardt, T. G. (2009). “LytM-Domain Factors Are Required for Daughter Cell Separation and Rapid Ampicillin-Induced Lysis in *Escherichia coli*”. *Journal of Bacteriology* 191.16, S. 5094–5107.
- Uehara, T., Parzych, K. R., Dinh, T. und Bernhardt, T. G. (2010). “Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis”. *The EMBO Journal* 29.8, S. 1412–1422.
- United-Nations (2008). “The State of Food and Agriculture; Biofuels: prospects, risks and opportunities”.
- Wase, N. V. und Wright, P. C. (2008). “Systems biology of cyanobacterial secondary metabolite production and its role in drug discovery”. *Expert Opinion on Drug Discovery* 3.8, S. 903–929.

- Welch, B. L. (1947). "The Generalization of 'student's' Problem When Several Different Population Variances Are Involved". *Biometrika* 34.1-2, S. 28–35.
- Witkin, E. M. (1976). "Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*." *Bacteriological Reviews* 40.4, S. 869–907.
- Wölcke, J. und Ullmann, D. (2001). "Miniaturized HTS technologies – uHTS". *Drug Discovery Today* 6.12, S. 637–646.
- Wolk, C. P., Cai, Y., Cardemil, L., Flores, E., Hohn, B., Murry, M., Schmetterer, G., Schrautemeier, B. und Wilson, R. (1988). "Isolation and complementation of mutants of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 unable to grow aerobically on dinitrogen." *Journal of Bacteriology* 170.3, S. 1239–1244.
- Zeng, Y., Zhao, S., Yang, S. und Ding, S.-Y. (2014). "Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels". *Current Opinion in Biotechnology* 27, S. 38–45.
- Zwietering, M. H., Koos, J. T. de, Hasenack, B. E., Witt, J. C. de und Riet, K. van't (1991). "Modeling of bacterial growth as a function of temperature." *Applied and Environmental Microbiology* 57.4, S. 1094–1101.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

Adaptive Evolution und Screening bei Cyanobakterien

Erzeugung und Untersuchung von Thermotoleranz in

Synechocystis sp. PCC 6803

selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Die dem Verfahren zugrundeliegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den

Ulrich M. Tillich

Anhang

Tabelle 7.1: Punktmutationen des Referenz-Wt gegenüber dem Kazusa-Wt

Ort	Position	Mutationstyp	Gen	Kazusa	WT
Chromosom	144507	Stille Mutation	bcp	gtA	gtG
Chromosom	489109	AS-Austausch	slr1609	tTa	tCa
Chromosom	731368	frameshift mutation	sll1574	T	-
Chromosom	831647	Intergenisch	Intergenisch	C	T
Chromosom	848078	AS-Austausch	argB	aGc	aAc
Chromosom	943495	AS-Austausch	psaA	Gtc	Atc
Chromosom	1012958	Intergenisch	Intergenisch	G	T
Chromosom	1070839	AS-Austausch	sll1359	aaT	aaA
Chromosom	1204616	AS-Austausch	slr1865	tGt	tAt
Chromosom	1364187	Stille Mutation	pyrF	Ttg	Ctg
Chromosom	1425469	frameshift mutation	sll1951	T	-
Chromosom	1726139	AS-Austausch	sll1256	aCa	aTa
Chromosom	1726196	AS-Austausch	sll1256	tAt	tGt
Chromosom	1812419	AS-Austausch	slr1983	gCg	gTg
Chromosom	1819782	Stille Mutation	psbA3	ctT	ctC
Chromosom	1819788	Stille Mutation	psbA3	tcT	tcC
Chromosom	2092571	Intergenisch	Intergenisch	A	T
Chromosom	2198893	Stille Mutation	sll0142	ttA	ttG
Chromosom	2301721	AS-Austausch	slr0168	Aag	Gag
Chromosom	2350285	Intergenisch	Intergenisch	-	A
Chromosom	2360246	Intergenisch	Intergenisch	-	C
Chromosom	2400722	Intergenisch	Intergenisch	C	A
Chromosom	2409244	frameshift mutation	sll0762	C	-
Chromosom	2419399	frameshift mutation	sll0752	T	-
Chromosom	2521013	AS-Austausch	slr0222	tTt	tCt
Chromosom	2544044	frameshift mutation	ssl0787	-	C
Chromosom	2602717	AS-Austausch	slr0468	caC	caA
Chromosom	2602734	AS-Austausch	slr0468	aTt	aAt
Chromosom	2748897	Intergenisch	Intergenisch	C	T
Chromosom	3014665	Stille Mutation	slr0302	acT	acC
Chromosom	3096187	AS-Austausch	ssr1175	aTa	aCa
Chromosom	3098707	AS-Austausch	ssr1176	Tgt	Cgt
Chromosom	3110189	Intergenisch	Intergenisch	G	A
Chromosom	3110343	AS-Austausch	sll0665	cCa	cAa
Chromosom	3142651	Stille Mutation	sps	ctT	ctC
Chromosom	3194023	frameshift mutation	slt	-	A
Chromosom	3371938	AS-Austausch	rpoF	aTg	aAg
Chromosom	3423372	AS-Austausch	slr0753	cCc	cTc
pSYSX	4184	Stille Mutation	slr6004	gcC	gcG
pSYSX	4241	AS-Austausch	slr6004	atC	atG
pSYSX	4253	Stille Mutation	slr6004	ccC	ccT
pSYSX	4295	Stille Mutation	slr6004	tcT	tcC
pSYSX	4304	Stille Mutation	slr6004	gcC	gcG
pSYSX	4337	Stille Mutation	slr6004	atC	atA
pSYSX	82299	AS-Austausch	ssr6089	Gga	Aga
pSYSX	82357	AS-Austausch	ssr6089	cCa	cTa
pSYSX	82358	Stille Mutation	ssr6089	ccA	ccG
pSYSX	82405	AS-Austausch	ssr6089	aAc	aGc
pCA2.4	1127	Intergenisch	Intergenisch	T	G

Primersequenzen:

Name		Sequenz (5'-3')
pnp-1	fw	CCCAAGATATCGAATCTTAGGG
	rv	AAAGCCATTATGCAAGCTCTC
pnp-2	fw	CCCTACTAAACCTACCCGCA
	rv	GAAGAAACGTCATAGCACATAAGG
slr1098	fw	AGATGTTATTGCCACCATTCC
	rv	GACAAATCAATTTGCCACCCT
mcpA	fw	AATCCATTGAACGGGTAGCAG
	rv	AGACACCTCAATAATATCCTCCAG
pyk2	fw	GCATATCCTTAATCGCTTCGT
	rv	GCCTTTGAACTGAACCAACC
intergenic1133812	fw	TGAGCAGGGAATTGTCCA
	rv	GACAAACCACCAGATATTCGT
glgX	fw	AGTCAAGGAACTGCATAAAGTAGG
	rv	GTAGCCTTTGGGCCATTTC
sll0853	fw	AGAATAGCCTGGGCCATATCC
	rv	CCAAATCCGATGTGACGGTG
slr2060	fw	GGGCAACTTGAACAATCGT
	rv	AAATAGGGACGTTGATTCCTCAG
cyaA	fw	GGGACCATCCTGACTACAC
	rv	GCACACCGATAATTACTAAGCC
pyrH	fw	CATGTGGTCCTTGAGTTCAG
	rv	ACTACATCGGTATGATTGCCA
intergenic2260225	fw	GGGCAAGGAAATTTGCCA
	rv	ATTACTCACCGCAACCAAGG
sll0765	fw	TTGCGGGTATCAATCACCAC
	rv	GCCCTTTGGTAACAAACCTC
clpC-1	fw	GCAAACACATCCCGTAGGAG
	rv	GAGGAAGCCATGATCCGT
clpC-2	fw	ATTGGGAATTAATCAACCGCAC
	rv	GGACATCGGTCTATTGGTGG
sll0064	fw	TAATGTTAAAGCCCTCCACACTG
	rv	CCTGAGCCTGGATAAACCCCT
pyrR	fw	CTGTAGGGTCAGAAAGCCG
	rv	CCCAGCAAATTGAAATGTTGGA
rpoF	fw	GCAGAATCGTGAAGTGGTGAG
	rv	GCAATCGTTTAATTCCTGGGC
sll5090	fw	GTAATCCATTGGGAAGCTATCAC
	rv	GACGTTGTACAACAACCTGGA
homo-sll1204	fw	TAATCTGCAGCCAATACTCGG
	rv	CTTGATTCTACCAATAGCATTCCG
homo3021443	fw	CTTAGATGCCCTCGATGCC

	rv	AATTGGGATGGAATCTGCGT
homo363537	fw	CCCTTCTACATCAAATTTCCACCA
	rv	AGGTGAGAGTTCTTCGCAG
homo3453473	fw	CCACATTGCCGAAACCCT
	rv	CCTTGGCCGAACAGTTGAC
homo747808	fw	GCTATTTATTGCCTGCCACC
	rv	CCCTTTGGTCAACAATCCC

Quellcode der Programmskripte

CountCyanoPlates_.jar (Java)

```
1 /**
2  CountCyanoPlate – Counts the colonies of plated cyanobacteria in microscopic
3     images based on the phycocyanin fluorescence.
4  Copyright (C) 2012 Katja Schulze (kschulze@th-wildau.de)
5
6  This program is free software: you can redistribute it and/or modify
7  it under the terms of the GNU General Public License as published by
8  the Free Software Foundation, either version 3 of the License, or
9  (at your option) any later version.
10
11 This program is distributed in the hope that it will be useful,
12 but WITHOUT ANY WARRANTY; without even the implied warranty of
13 MERCHANTABILITY or FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. See the
14 GNU General Public License for more details.
15
16 You should have received a copy of the GNU General Public License
17 along with this program. If not, see <http://www.gnu.org/licenses/>.
18 */
19
20
21 import ij.*;
22 import ij.process.*;
23 import ij.gui.*;
24 import ij.io.OpenDialog;
25
26 import java.io.File;
27 import java.io.FileFilter;
28
29 import ij.plugin.*;
30 import ij.plugin.frame.*;
31
32 public class CountCyanoPlate_ implements PlugIn {
33
34     public void run(String arg) {
35
36         FileFilter filter = new FileFilter()
37         {
38             public boolean accept(File dir, String name) {
39                 return name.toLowerCase().endsWith(".
40                     bmp") || name.toLowerCase().
41                     endsWith(".tif") || name.
42                     toLowerCase().endsWith(".tiff") ||
43                     name.toLowerCase().endsWith(".jpg")
44                     || name.toLowerCase().endsWith
45                     (".jpeg") ;
46             }
47         }
48     }
49 }
```

```

41
42     });
43
44     OpenFileDialog od = new OpenFileDialog("Open_first_image...", arg);
45     String directory = od.GetDirectory();
46     String fileName = od.GetFileName();
47
48     if (fileName==null) return;
49     String[] imageList = new File(directory).list(filter);
50     java.util.Arrays.sort(imageList);
51
52     int imagecount = 0;
53     int total = 0;
54
55     for (int k = 0; k<imageList.length; k++){
56         String path = directory+imageList[k];
57         ImagePlus imp = new ImagePlus(path);
58         imp.show();
59         RoiManager rm = RoiManager.getInstance();
60         if (rm==null) rm = new RoiManager();
61         rm.runCommand("reset");
62         IJ.run("Select_All", "");
63         IJ.run(imp, "Copy", "");
64         IJ.run("Internal_Clipboard", "");
65         ImagePlus imp2 = WindowManager.getImage("Clipboard");
66         WindowManager.getImage("Clipboard").hide();
67
68         // threshold brightness of hsb
69         ImagePlus hsb1 = this.makeHSBStack(imp2);
70         ImageProcessor ip = hsb1.getStack().getProcessor(3);
71         imp2.setProcessor(ip);
72
73         if(imp2.getProcessor().getStatistics().max < 25.0){
74             imp.changes = false;
75             imp2.changes = false;
76             imp.close();
77             continue;
78         }
79         else{imagecount++;}
80         AutoThresholder adjust = new AutoThresholder();
81         int globalThreshold = adjust.getThreshold("Minimum",
82             imp2.getProcessor().getHistogram());
83         imp2.getProcessor().threshold(globalThreshold);
84         imp2.getProcessor().invert();
85
86         IJ.run(imp2, "Analyze_Particles...", "size=10-Infinity
87             _circularity=0.00-1.00_exclude_add");
88         rm.runCommand("Show_All");
89         IJ.wait(1000);
90         int count = rm.getCount();
91         total = total +count;

```

```

90
91         imp.changes = false;
92         imp2.changes = false;
93         imp.close();
94
95
96     }
97     WindowManager.getFrame("ROI_Manager").dispose();
98     WindowManager.getFrame("Results").dispose();
99     IJ.log("Total_amount:_" + total);
100 }
101
102
103 public ImagePlus makeHSBStack(ImagePlus img) {
104     /*returns an HSBStack Image for further analysis
105     *input: RGB image
106     */
107     ColorProcessor cp = (ColorProcessor) img.getProcessor();
108
109     int width = cp.getWidth();
110     int height = cp.getHeight();
111
112     ImagePlus hsb = NewImage.createByteImage("HSB_Stack", width,
113         height, 3, 1);
114
115     hsb.setStack(cp.getHSBStack());
116
117     return hsb;
118 }
119
120
121 }

```


Extract_454HCDiffs.sh (Bash)

```
1 #!/bin/bash
2
3 if [ ! -f 454HCDiffs.txt ]; then echo "454HCDiffs.txt not found in working
    directory, aborting!"; exit 1; fi;
4
5
6
7 grep '>' 454HCDiffs.txt > 454HCDiffs_pre
8
9 sed -i 's/>gi|16329170|ref|NC_000911.1|/NC_000911/g' 454HCDiffs_pre
10 sed -i 's/>gi|38505535|ref|NC_005229.1|/NC_005229/g' 454HCDiffs_pre
11 sed -i 's/>gi|38505825|ref|NC_005232.1|/NC_005232/g' 454HCDiffs_pre
12 sed -i 's/>gi|38505668|ref|NC_005230.1|/NC_005230/g' 454HCDiffs_pre
13 sed -i 's/>gi|38505775|ref|NC_005231.1|/NC_005231/g' 454HCDiffs_pre
14 sed -i 's/>pCA2.4/pCA2.4/g' 454HCDiffs_pre
15 sed -i 's/>pCB2.4/pCB2.4/g' 454HCDiffs_pre
16
17 echo "done!"
```

454HC_to_vcf.pl (Perl)

```
1 #!/usr/bin/env perl
2
3
4 #open the main vcf file
5 open (DATA, "$ARGV[0]");
6
7
8
9 #parse the data line by line
10 while($line=<DATA>){
11     #insertions
12     if($line =~m/(+)\t(\d+)\t\d+\t-\t([ATGC]+)\t(\d+)\t.\n/){
13         $plasmid=$1;
14         $pos=$2;
15         $ref=".";
16         $new=$3;
17         $depth=$4;
18         print "$plasmid\t$pos\t.\t$ref\t$new\t$depth\t.\n";
19     }
20     #deletions
21     if($line =~m/(+)\t(\d+)\t\d+\t([ATGC]+)\t-\t(\d+)\t.\n/){
22         $plasmid=$1;
23         $pos=$2-1;
24         $ref=$3;
25         $depth=$4;
26         print "$plasmid\t$pos\t.\tN$ref\tN\t$depth\t.\n";
27     }
28     #all other lines
29     if($line =~m/(+)\t(\d+)\t\d+\t([ATGC]+)\t([ATGC]+)\t(\d+)\t.\n/){
30         $plasmid=$1;
31         $pos=$2;
32         $ref=$3;
33         $new=$4;
34         $depth=$5;
35         print "$plasmid\t$pos\t.\t$ref\t$new\t$depth\t.\n";
36     }
37 }
38 close DATA;
```

vcf_subtract.pl (Perl)

```
1 #!/usr/bin/env perl
2
3
4 #open the main vcf file
5 open (DATA, "$ARGV[0]");
6
7 #open reference vcf file
8 open (REFDATA, "$ARGV[1]");
9 while ($refline=<REFDATA>){push (@refdata, $refline);}
10 close REFDATA;
11
12 #open File logging Info
13 open (LOGFILE, '>SubtractPl.log');
14
15
16
17
18 #parse the data line by line
19 while ($line=<DATA>){
20     #identify lines containing position data
21     #NC_000911      98129      .      A      G      20      .
22     if ($line =~m/(.+)\t(\d+)\t\.\+ \t.\+ \t.\+ \t.\+ \n/){
23         $plasmid=$1;
24         $mainpos=$2;
25         $duplicate=0;
26         $i=0;
27         #search for same positions in reference file
28         foreach (@refdata){
29             $i++;
30             if ($_ =~m/(.+)\t(\d+)\t\.\+ \t.\+ \t.\+ \t.\+ \n/){
31                 if ($1 eq $plasmid & $2 eq $mainpos){
32                     $duplicate=1;
33                     #note which mutations were removed by
34                     the program
35                     push (@mutremoved, $i);
36                     print LOGFILE "REMOVED_line:␣". $i. "␣\t
37                                 ␣position:␣". $2. "\n";
38                 }
39             }
40         }
41         #if the same position was not found in the reference print the
42         line
43         if ($duplicate eq 0){print "$line"}
44     }
45 close DATA;
46
```

```

47
48
49 #add Info about lines NOT removed
50 $i=0;
51 $mutwasremoved=0;
52 foreach(@refdata){
53     $i++;
54     foreach(@mutremoved){
55         if($i eq $_) {$mutwasremoved=1;}
56     }
57     if($mutwasremoved eq 0){push (@notremoved, $i);}
58     $mutwasremoved=0;
59 }
60 print LOGFILE "\nThe following WT Mutation Lines were not removed: @notremoved
    \n";
61 close LOGFILE;

```

vcf_Syn6803_identify.pl (Perl)

```
1 #!/usr/bin/env perl
2
3 #open the flatfile exported from cynobase and copy all data into the array "
  @catdata ":
4 open (CATDATA, "category_e.tsv");
5 while ($catline=<<CATDATA>){
6 push (@catdata, $catline);
7 }
8 close CATDATA;
9
10
11 #print the header
12 print "location\tAbs-Position\tDepth\tRef_base\tnew_base\tmutation_type\tGene\t
  tRef_codon\tnew_codon\tRef_AS\tnew_AS\tAS_position\tgene_length\tfunction\t
  tcategory\tsubcategory\turl\n";
13
14
15 #open the submitted file with mutation positions
16 open (DATA, "@ARGV");
17 #parse the data line by line
18 while ($line=<<DATA>){
19
20     #identify lines containing mutation information and extract needed
      data
21     if ($line =~m/(+)\t(\d+)\t.\t(.*)\t(.\+)\t(.\+)\t.\t(.\+)\n/){
22         $location=$1;
23         $position=$2;
24         $ref=$3;
25         if ($ref eq ""){$ref="-";}
26         $alt=$4;
27         if ($alt eq "A,C,G,T"){ $alt="-"; $ref=substr($ref,1,length($ref)
          );}
28         $qual=$5;
29         $info=$6;
30         $foundsomething=0;
31
32         #
          #####
33         ##### search in $info to extract data added by snpEff
          #####
34         if ($info =~m/+.NON_SYNONYMOUS_CODING\((.+?)\|(.*)\|(.\+)\|(.\+)\|(\D)
          (\d+)\(\D)\|(\d+?)\|(.\+)\|.??\|.*?\|(.\+)\|\)/){
35             $severity=$1;
36             $type=$2;
37             $old_codon=$3;
38             $new_codon=$4;
39             $old_AS=$5;
40             $AS_position=$6;
```

```

41     $new_AS=$7;
42     $AS_length=$8;
43     $gene_name=$9;
44     $gene_id=$10;
45     print "$location\t$position\t$qual\t$ref\t$alt\t";
46     print "AS_change\t$gene_name\t$old_codon\t$new_codon\t$old_AS\t
         $new_AS\t$AS_position\t$AS_length\t";
47     &printcategory($gene_id);
48     $foundsomething++;
49     }
50 if ($info =~m/.\+\.SYNONYMOUS_CODING\(((.+?)\|(.*)\|(.+?)\|(.+?)\|(\D)(\
d+)\|(\d+)\|(.+?)\|.??\|.??\|(.+?)\|)\)/){
51     $severity=$1;
52     $type=$2;
53     $old_codon=$3;
54     $new_codon=$4;
55     $old_AS=$5;
56     $AS_position=$6;
57     $new_AS=$5;
58     $AS_length=$7;
59     $gene_name=$8;
60     $gene_id=$9;
61     print "$location\t$position\t$qual\t$ref\t$alt\t";
62     print "silent_mutation\t$gene_name\t$old_codon\t$new_codon\t
         $old_AS\t$new_AS\t$AS_position\t$AS_length\t";
63     &printcategory($gene_id);
64     $foundsomething++;
65     }
66 if ($info =~m/.\+\.FRAME_SHIFT\(((.+?)\|.*?\|(.+?)\|(.+?)\|(\d+)\|(.+?)
\|.*?\|.*?\|(.+?)\|.*?)\)/){
67     $severity=$1;
68     $direction=$2;
69     $AS_position=$3;
70     $AS_length=$4;
71     $gene_name=$5;
72     $gene_id=$6;
73     print "$location\t$position\t$qual\t$ref\t$alt\t";
74     print "frameshift_mutation\t$gene_name\t\t\t\t\t$AS_position\t
         $AS_length\t";
75     &printcategory($gene_id);
76     $foundsomething++;
77     }
78 if ($info =~m/.\+CODON_CHANGE_PLUS_CODON_INSERTION\(((.+?)\|(.*)\|(.+?)
\|(.+?)\|(\D)(\d+)\|(\D+)\|(\d+)\|(.+?)\|.??\|.??\|(.+?)\|.*?)\)/){
79     $severity=$1;
80     $type=$2;
81     $old_codon=$3;
82     $new_codon=$4;
83     $old_AS=$5;
84     $AS_position=$6;
85     $new_AS=$7;

```

```

86         $AS_length=$8;
87         $gene_name=$9;
88         $gene_id=$10;
89         print "$location\t$position\t$qual\t$ref\t$alt\t";
90         print "AS_change_and_AS_insertion\t$gene_name\t$old_codon\t
           t$new_codon\t$old_AS\t$new_AS\t$AS_position\t$AS_length\t"
           ;
91         &printcategory($gene_id);
92         $foundsomething++;
93     }
94     if ($info =~m/.+STOP_LOST\(((.+?)\|(.+?)\|(.+?)\|(.+?)\|(\D)(\d+?)\(\D)
           \|(\d+?)\|(.+?)\|.??\|.??\|(.+?)\|)\)/){
95         $severity=$1;
96         $type=$2;
97         $old_codon=$3;
98         $new_codon=$4;
99         $old_AS=$5;
100        $AS_position=$6;
101        $new_AS=$7;
102        $AS_length=$8;
103        $gene_name=$9;
104        $gene_id=$10;
105        print "$location\t$position\t$qual\t$ref\t$alt\t";
106        print "Stop_lost\t$gene_name\t$old_codon\t$new_codon\t$old_AS\t
           t$new_AS\t$AS_position\t$AS_length\t";
107        &printcategory($gene_id);
108        $foundsomething++;
109    }
110    if ($info =~m/.+CODON_CHANGE_PLUS_CODON_DELETION\(((.+?)\|.|.*?\|(.+?)
           \|/(.+?)\|(\D+)(\d+)(\D+)\|(\d+?)\|(.+?)\|.??\|.??\|(.+?)\|\d*?)\)/)
           {
111        $severity=$1;
112        $type="";
113        $old_codon=$2;
114        $new_codon=$3;
115        $old_AS=$4;
116        $AS_position=$5;
117        $new_AS=$6;
118        $AS_length=$7;
119        $gene_name=$8;
120        $gene_id=$9;
121        print "$location\t$position\t$qual\t$ref\t$alt\t";
122        print "Codon_Changed_and_Codon_deleted\t$gene_name\t$old_codon
           \t$new_codon\t$old_AS\t$new_AS\t$AS_position\t$AS_length\t"
           ";
123        &printcategory($gene_id);
124        $foundsomething++;
125    }
126
127
128     # no examples in data found so far

```

```

129 #         if ($info =~m/+.START_GAINED\(.+?\).+\/){ print "prev line: START_GAINED
- SOMETHING NEW FOUND!!! UPDATE code to extract data\n";}
130 #         if ($info =~m/+.START_LOST\(.+?\).+\/){ print "prev line: START_LOST-
SOMETHING NEW FOUND!!! UPDATE code to extract data\n";}
131 #         if ($info =~m/+.SYNONYMOUS_START\(.+?\).+\/){ print "prev line:
SYNONYMOUS_START.SOMETHING NEW FOUND!!! UPDATE code to extract data\n";}
132 #         if ($info =~m/+.CODON_CHANGE\(.+?\).+\/){ print "prev line:
CODON_CHANGE-SOMETHING NEW FOUND!!! UPDATE code to extract data\n";}
133 #         if ($info =~m/+.CODON_DELETION\(.+?\).+\/){ print "prev line:
CODON_DELETION-SOMETHING NEW FOUND!!! UPDATE code to extract data\n";}
134 #         if ($info =~m/+.CODON_INSERTION\(.+?\).+\/){ print "prev line:
CODON_INSERTION-SOMETHING NEW FOUND!!! UPDATE code to extract data\n";}
135 #         if ($info =~m/+.NON_SYNONYMOUS_START\(.+?\).+\/){ print "prev line:
NON_SYNONYMOUS_START-SOMETHING NEW FOUND!!! UPDATE code to extract data\n
";}
136 #         if ($info =~m/+.RARE_AMINO_ACID\(.+?\).+\/){ print "prev line:
RARE_AMINO_ACID-SOMETHING NEW FOUND!!! UPDATE code to extract data\n";}
137
138         #no relevant info found in snpEFF data
139         if ($foundsomething eq 0){
140             print "$location\t$position\t$qual\t$ref\t$salt\t";
141             print "intergenic\tintergenic\t\t\t\t\t\t\t";
142             print "\t\t\t\t\n";
143         }
144
145 #####
146 ##### subroutine to to determine and print the category & function #####
147 sub printcategory {
148     foreach (@catdata){
149         if ($_ =~m/"$_[0]"\t"(.+)"\t"(.+)"\t\n/){
150             $function=$1;
151             $category=$2;
152             $subcategory="none";
153         }
154         if ($_ =~m/"$_[0]"\t"(.+)"\t"(.+)"\t"(.+)"\n/){
155             $function=$1;
156             $category=$2;
157             $subcategory=$3;
158         }
159     }
160     print "$function\t$category\t$subcategory\thttp://genome.kazusa.or.jp/
cyanobase/Synechocystis/genes/$_[0]\n";
161 }
162 }
163 #####
164
165
166 }
167 close DATA;

```