Neue Einblicke in die Funktionalität PHB-Granula-assoziierter Proteine in *Ralstonia eutropha* H16

Von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik (Fakultät 4) der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

> Vorgelegt von Stephanie Schulze, geborene Bresan aus Görlitz

Hauptberichter: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Jendrossek Mitberichter: Prof. Dr. rer. nat. Karl Forchhammer

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 2018

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart 2018

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation, abgesehen von ausdrücklich gekennzeichneten Ratschlägen oder Mitarbeiten, selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Stuttgart, den

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Bresan, S.*, Sznajder, A.*, Hauf, W.*, Forchhammer, K., Pfeiffer, D., and Jendrossek, D. (2016). Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids. Sci. Rep. *6*: 26612

Der eigene experimentelle Anteil umfasste die mikroskopischen Untersuchungen der *Magnetospirillum gryphiswaldense* und *Pseudomonas putida* Stämme, die PHB-Granulaisolierung und Mikroskopie sowie die Mikroskopie der Fusionsproteine sfGFP-LactC2 und mTurquoise2-LactC2 in *R. eutropha*. Alle Experimente wurden in enger Kooperation mit Prof. Jendrossek und Prof. Forchhammer durchgeführt.

Bresan, S., and Jendrossek, D. (2017). New Insights into PhaM-PhaC-Mediated Localization of Polyhydroxybutyrate Granules in *Ralstonia eutropha* H16. Appl. Environ. Microbiol. *83*, e00505-17

Alle experimentellen Arbeiten wurden eigenständig unter enger Absprache mit Prof. Jendrossek durchgeführt.

Juengert, J.*, Bresan, S.*, and Jendrossek, D. (2018). Determination of Polyhydroxybutyrate (PHB) Content in *Ralstonia eutropha* Using Gas Chromatography and Nile Red Staining. BIO-PROTOCOL *8*(5)

Der eigene Anteil umfasste 50 % der Arbeit, die in enger Zusammenarbeit mit Prof. Jendrossek angefertigt wurde.

* geteilte Erstautorschaft

i. Inhaltsverzeichnis

i.	Inł	nalt	sverzeichnis	III
ii.	Ab	kü	rzungsverzeichnisV	/111
iii.	Zu	sar	nmenfassung	XI
iv.	Ab	str	act	CIII
1	Th	eoi	retischer Hintergrund und Zielsetzung	. 1
	1.1	V	orkommen und Eigenschaften von PHB	. 1
	1.2	A	ufbau und Struktur der PHB-Granula	. 3
	1.2	2.1	PHB-Synthasen PhaC	. 4
	1.2	2.2	Phasine	. 6
	1.2	2.3	Multifunktionales Phasin-ähnliches Protein – PhaM	. 7
	1.3	Zi	ielsetzung	. 9
2	Ма	iter	ial und Methoden	11
	2.1	0	rganismen	11
	2.2	Ρ	lasmide	12
	2.3	Ρ	rimer	15
	2.4	Ν	ährmedien und Antibiotika	17
	2.4	l.1	Komplexmedien	17
	2.4	1.2	Mineralmedien	17
	2.4	1.3	Antibiotika	18
	2.5	Μ	likrobiologische Methoden	19
	2.5	5.1	Stammhaltung und Konservierung	19
	2.5	5.2	Zellkultivierung	19
	2.5	5.3	Wachstumskurven	21
	2.5	5.4	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	21
	2.5	5.5	Transformation von <i>E. coli</i>	21
	2.5	5.6	Konjugation	22
	2.5	5.7	Herstellung von Deletions- und Integrationsmutanten	23
	2.6	Μ	lolekularbiologische Methoden	24
	2.6	5.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
	2.6	6.2	Agarose-Gelelektrophorese	25
	2.6	6.3	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	26

	2.6.4	Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen	26
	2.6.5	Ligation von DNA-Fragmenten	26
	2.6.6	Gerichtete Mutagenese	27
	2.6.7	Plasmidisolation aus <i>E. coli</i>	27
	2.6.8	DNA-Sequenzierung	28
	2.6.9	Elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay (EMSA)	28
	2.6.10	Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)	30
2	.7 Bic	analytische Methoden	33
	2.7.1	Fluoreszenzmikroskopie	33
	2.7.2	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementierung (BiFC)	35
	2.7.3	Gaschromatographie	36
	2.7.4	HPLC	36
	2.7.5	Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC)	38
	2.7.6	CD-Spektroskopie	39
2	.8 Bic	ochemische Methoden	40
	2.8.1	Isolierung von nPHB-Granula aus R. eutropha H16	40
	2.8.2	Proteinaufreinigung mittels Nickel-NTA	41
	2.8.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
	2.8.4	Silberfärbung	44
	2.8.5	FPLC und Aufkonzentrieren der Proteine	45
	2.8.6	Proteinbestimmung mittels BCA	45
	2.8.7	Bestimmung von Enzymaktivitäten	46
	2.8.8	Limitierte Proteolyse	47
	2.8.9	Kolorimetrischer PhaM-Aktivitätsassay	48
	2.8.10	Detektion von freigesetztem Pi in nativen Polyacrylamidgelen	50
	2.8.11	Bakterielles Adenylatzyklase Two-Hybrid System	51
	2.8.12	Pull down-Experiment	55
	2.8.13	Proteomanalyse	56
	2.8.14	PHB-Synthase-Aktivitäts-Assay	56
	2.8.15	Crosslinking-Experiment	57

3	Erge	bnisse
	3.1 N	Veue PGAPs
	3.1.1	A2001 – hypothetisches Protein im Operon mit PhaB2 und PhaC2 59
	3.1.2	A0225 – eine Patatin-ähnliche Phospholipase63
	3.2 l	Intersuchungen zur <i>in vivo</i> Lokalisation von Phospholipiden
	3.2.1	C2-Domäne des Lactadherins (LactC2) in <i>R. eutropha</i> H16 68
	3.2.2	Expression des Fusionsproteins DsRed2 _{EC} -LactC2 in <i>R. eutropha</i> H16
		Phasinmutanten71
	3.2.3	Expression weiterer Fusionsproteine mit LactC273
	3.2.4	Mikroskopie isolierter PHB-Granula aus <i>R. eutropha</i> WT H16 DsRed2 _{EC} -
		LactC274
	3.2.5	Lokalisation von DsRed2 _{EC} -LactC2 in α -Proteobakterien
	3.2.6	Lokalisation von DsRed2 _{EC} -LactC2 in γ -Proteobakterien
	3.2.7	Expression der RNase E aus <i>E. coli</i> in <i>R. eutropha</i> H16
	3.2.8	Lokalisation der Phosphatidylserin-Decarboxylase in <i>R. eutropha</i> H16. 80
	3.3 F	PhaM – PAKKA-Motiv
	3.3.1	Wechselwirkung eines C-terminalen verkürzten PhaM mit der DNA 85
	3.3.2	Einfluss der C-terminalen PhaM-Lysinreste auf die DNA-PhaM-
		Interaktion
	3.3.3	Einfluss der C-terminalen PhaM-Prolinreste auf die DNA-PhaM-
		Interaktion
	3.3.4	In vitro Untersuchungen zur PhaM-DNA-Interaktion mittels EMSA 93
	3.3.5	Einfluss der PhaM-Mutationen auf den PHB-Gehalt der Zellen
	3.3.6	<i>In vitro</i> PHB-Aktivitätstest in Gegenwart von PhaM ^{WT} bzw. PhaM ^{∆C} 98
	3.3.7	<i>Crosslinking</i> -Verhalten von PhaM und PhaC1
	3.3.8	Untersuchung spezifischer DNA-Bindungsstellen mittels ChIP 101
	3.4 F	PhaM – physiologische Interaktionspartner103
	3.4.1	Mittels Proteomanalyse identifizierte Interaktionspartner von PhaM 103
	3.4.2	Two-Hybrid Experimente mit putativen PhaM-Interaktionspartnern 108
	3.5 F	PhaC1 – PhaM vermittelter PHB-Initiationskomplex 112
	3.5.1	Heterogenität der PHB-Granula in R. eutropha H16 mit genomisch
		integriertem phaM-eyfp112

	3.5.2	In vivo Lokalisationsverhalten von genomisch integriertem phaC1-	
		evfp	114
	3.5.3	In vivo Lokalisation von genomisch integriertem phaC1-eyfp in	
		<i>R.</i> eutropha H16 Δ phaM	115
	3.5.4	Einfluss von PhaP1 auf die Lokalisation von PhaM-eYFP und PhaC1-	
		eYFP	117
	3.5.5	Rolle der PHB-Synthase bei der Bindung von PhaM an PHB-Granula	120
	3.5.6	Oligomerisierung der inaktiven PHB-Synthase PhaC1 ^{C319A}	122
	3.5.7	Untersuchungen der Lokalisation von PhaM und PhaC1 ^{C319A} mittels	
		BiFC	124
3	3.6 Ph	aM – Einfluss von <i>in vivo</i> Phosphorylierungen	126
	3.6.1	Identifikation von in silico Phosphorylierungsstellen in PhaM	126
	3.6.2	Nachweis der Phosphorylierungen mittels Proteomanalyse	127
	3.6.3	Mutagenese der Phosphorylierungsstellen und Mikroskopie	128
3	3.7 Ph	aM – SRPα-Motiv	130
	3.7.1	Malachitgrün-basierter kolorimetrischer PhaM-Aktivitätsassay	131
	3.7.2	Rolle der PhaM-Hitzestabilität auf die Aktivität von PhaM	135
	3.7.3	Aktivität des C-terminal verkürzten PhaM (Pha $M^{\Delta C}$)	136
	3.7.4	Einfluss chromosomaler DNA auf die PhaM-Aktivität	137
	3.7.5	Nachweis der PhaM-Aktivität mittels HPLC	138
	3.7.6	Rolle von Kofaktoren in Bezug auf die PhaM-Aktivität	140
	3.7.7	Detektion des freigesetzten Phosphats in nativen Polyacrylamidgelen	142
	3.7.8	Limitierte Proteolyse von PhaM mit Proteinase K und Trypsin	144
	3.7.9	Crosslinking von PhaM in Anwesenheit von GTP oder ATP	145
	3.7.10	Einfluss von GTP auf die Konformation von PhaM	147
	3.7.11	PHB in vitro Synthase-Assay in Anwesenheit von GTP bzw. GDP	148
	3.7.12	Untersuchungen zur Interaktion von PhaM und Nukleotiden mittels	
		isothermischer Titrationskalorimetrie	149
	3.7.13	Phosphorylierungsanalyse von PhaM in Gegenwart von ATP	152

4 Dis	kussion	154		
4.1	Phospholipide binden artifiziell an PHB-Granula	154		
4.2	PAKKA-Motive vermitteln die DNA-Bindung von PhaM	158		
4.3	Physiologische Rolle der PhaM-DNA-Bindung	160		
4.4	Proteomanalyse zur Identifizierung von PhaM-Interaktionspartnern			
	und Phosphorylierungen von PhaM	163		
4.5	PhaM besitzt in vitro NTPase-Aktivität	166		
4.6	Auftretende Heterogenität der PHB-Granula	170		
4.7	Schlussfolgerungen und Ausblick	174		
5 Lite	eraturverzeichnis	178		
6 Anl	hang	195		
Lebens	LebenslaufXV			
Danksa	DanksagungXVI			

ii. Abkürzungsverzeichnis

Δ	Delta (Gendeletion)
3-HB	3-Hydroxybutyrat
ADP	Adenosindiphosphat
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BACTH	Bakterielles Adenylatzyklase Two-Hybrid System
BCA	Bicinchoninsäure
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementierung
BLAST	engl. Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	engl. bovine serum albumin
cAMP	cyclisches Adenosin-3'-5'-Monophosphat
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
CD	Zirkulardichroismus
CF	Konversionsfaktor
Cm ^r	Chloramphenicol-Resistenz
CoA	Coenzym A
C-terminal	Carboxy-Terminus eines Proteins
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIC	Differentieller Interferenzkontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. deoxyribonucleic acid
dPHB	denaturiertes Poly(3-Hydroxybutyrat)
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, Ellmans Reagenz
DUF	engl. domain of unknown function
dUTP	2'-Deoxyuridin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
egfp	grün-fluoreszierendes Protein, engl. enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMSA	Elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay, engl. electrophoretic mobility shift assay
EPR	Elektronenspinresonanz, engl. electron paramagnetic resonance
et al	und andere, <i>lat.et alii</i>

eyfp	.gelb-fluoreszierendes Protein, engl. enhanced yellow fluorescent protein
FPLC	.engl. fast protein liquid chromatography
GC	Gaschromatographie
GC-Gehalt	.Guanin-Cytosin-Gehalt
GDA	. Glutardialdehyd
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	.grün-fluoreszierendes Protein
GMP	.Guanosinmonophosphat
GMP-PNP	.Guanosin-5'-[β,γ-imido]triphosphat
GTP	.Guanosintriphosphat
His ₆ -Tag	.Hexa-Histidin-Tag
HPLC	.engl. high performance liquid chromatography
HR	.homologe Region
IPTG	.Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITC	. Isothermische Titrationskalorimetrie
Kan ^r	.Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen
kDa	.Kilodalton
KEGG	engl. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KPP	.Kaliumphosphat-Puffer
LactC2	.C2-Domäne des Lactadherins
LB	Lysogeny Broth
LUT	.Lookup-Tabellen, <i>engl. look-up table</i>
MamC	Magnetosomenprotein aus Magnetospirillum gryphiswaldense
MCL	.engl. medium chain length
MM	. Mineralmedium
MW	Molekulargewicht, engl molecular weight
NaOAc	Natriumacetat
NaPP	.Natriumphosphat-Puffer
NB	Nutrient Broth
NMR	Kernspinresonanz, engl. nuclear magnetic resonance
nPHB	.natives Poly(3-Hydroxybutyrat)
NTB	Nitrothiobenzoat
N-terminal	Amino-Terminus eines Proteins
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	.optische Dichte
ONPG	. <i>o</i> -Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEBP	.Phosphatidylethanolamin-Bindeprotein

PGAP	.PHB-Granula-assoziiertes Protein
PHA	. Polyhydroxyalkanoat
PhaA	.β-Ketothiolase
PhaB	.Acetoacetyl-CoA-Reduktase
PhaC	.PHA-Synthase
phaCAB	. Operon der PHB-Biosynthese
PhaM	.Granula-Segregationsfaktor
PhaP	.Phasin
PhaR	.Regulator der Phasinexpression
PhaZ	.PHB-Depolymerase
PHB	.Poly(3-Hydroxybutyrat)
PHO	.Poly(3-Hydroxyoktanoat)
PIC	. engl. protease inhibitor cocktail
P _i	. anorganisches Phosphat
PL	. Phospholipide
PMSF	. Phenylmethylsulfonylfluorid
psd	Phosphatidylserin-Decarboxylase
Psi	. engl. pound-force per square inch
PS	. Phosphatidylserin
rne	RNase E
rpm	engl. rounds per minute
sacB	.Gen aus Bacillus subtilis, kodiert die Levansaccharase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sfgfp	. engl. superfolder green fluorescent protein
SK	. Stammkultur-Nummer
SRP	. Signalerkennungspartikel, engl. signal recognition particle
TAE	. Tris-Acetat-EDTA
TBAHS	. Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
TCA	. Trichloressigsäure
Tc ^r	. Tetracyclin-Resistenz
TEM	. Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	.N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	. engl. transformation and storage solution
v/v	. Volumenanteil, <i>engl. volume per volume</i>
w/v	.Gewicht pro Volumen, engl. weight per volume
w/w	.Massenprozent, engl. weight per weight
WT	. Wildtyp
X-Gal	.5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
Zip	.Leucin-Zipper-Motiv

iii. Zusammenfassung

Bei Poly(3-Hydroxybuttersäure) (PHB) handelt es sich um komplexe, organellartige Granula, die eine wichtige Rolle als Kohlenstoff- und Energiespeicher in zahlreichen Das Mikroorganismen einnehmen. β-Proteobakterium Ralstonia eutropha (R. eutropha) dient dabei als Modellorganismus der PHB-Forschung. Während der letzten Jahrzehnte konnten viele Proteine auf der Oberfläche dieser hydrophoben PHB-Granula identifiziert werden, darunter Enzyme für den Aufbau (PHB-Synthase, PhaC) und Abbau (PHB-Depolymerase, PhaZ) oder Proteine, die bei der Regulation des Oberfläche/Volumenverhältnisses der Granula oder der Granulasegregation wichtig sind (Phasine, PhaP). Die genaue Oberflächenzusammensetzung dieser Granula, vor allem das Vorhandensein von Phospholipidmembranen, wird allerdings in der Literatur kontrovers diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein kürzlich neu identifiziertes Protein der PHB-Granulaoberfläche (A0225), das in Zusammenhang mit einer möglichen Phospholipidsynthese stehen könnte, hinsichtlich der Funktion als Phospholipase untersucht. Im Zuge dieser Experimente konnte allerdings keine in vitro Lipaseaktivität nachgewiesen werden. Weiterhin konnte bei der Deletionsmutante AH16 A0225 kein in vivo Effekt auf den PHB-Gehalt festgestellt werden, womit die Rolle des Proteins A0225 im PHB-Stoffwechsel bislang ungeklärt bleibt. Gleichzeitig wurde die Funktion eines weiteren neuen PHB-Granula-assoziierten Proteins untersucht: des hypothetischen Proteins A2001 als Teil des H16 A2001-phaB2(H16 A2002)-phaC2(H16 A2003)-Operons. Allerdings konnte auch hier kein in vivo Effekt der Deletionsmutanten AH16_A2001 sowie △H16 A2001-A2003 auf den PHB-Gehalt detektiert werden.

Um dennoch die offene Frage des möglichen Vorhandenseins von Phospholipiden auf der PHB-Granulaoberfläche zu klären, wurden *in vivo* Lokalisationsexperimente mit Phospholipidbindeproteinen durchgeführt. Grundlage dafür bildete die C2-Domäne des Lactadherins (LactC2), die spezifisch Phospholipide bindet. Die Lokalisation des Fusionsproteins DsRed2_{EC}-LactC2 zeigte in *R. eutropha* eine Membranbindung, aber keine Kolokalisation mit PHB-Granula. Selbiges konnte in dem γ -Proteobakterium *Pseudomonas putida* (*P. putida*) und dem α -Proteobakterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* (*M. gryphiswaldense*) nachgewiesen werden. Bei letzterem Organismus konnte zudem eine Bindung an Membran-umschlossene

ΧI

Magnetosomen detektiert werden, was die Anwendbarkeit von LactC2 als Phospholipidbindeprotein zusätzlich bestätigte. Mit Hilfe von zwei weiteren Phospholipidmembran-interagierenden Proteinen (RNase E sowie Phosphatidylserin-Decarboxylase) konnten die bisherigen Ergebnisse der Abwesenheit von Phospholipiden auf der PHB-Granulaoberfläche reproduziert werden.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit die physiologische Rolle des PhaM Proteins genauer untersucht, von dem bereits nachgewiesen wurde, dass es die Lokalisation sowie das Oberfläche/Volumen-Verhältnis der PHB-Granula und die Aktivität der PHB-Synthase reguliert. Auch eine Interaktion von PhaM mit der PHB-Synthase PhaC1 sowie mit dem Nukleoid konnte gezeigt werden. Teil dieser Arbeit waren gerichtete Mutagenesen zweier C-terminal lokalisierter PAKKA-Motive von PhaM, wobei jene Motive als DNA-Bindemotive von PhaM identifiziert werden konnten. Die Lysinreste vermittelten dabei die DNA-Bindung. In weiteren Experimenten konnten genomische Integrationen von *phaM-eyfp* sowie *phaC1-eyfp* eine Reifung der PHB-Granula mit zunehmender Zeit aufzeigen, was sich durch ein Ablösen von PhaM und PhaC1 vom PHB-Granulum charakterisieren ließ. Das gefundene Signalerkennungspartikel (SRP)-Motiv von PhaM konnte außerdem mit einer Magnesium-abhängigen NTPase-Aktivität in Verbindung gebracht werden, die einen Anhaltspunkt für die Aufklärung des molekularen Mechanismus der Granula-Reifung und -Segregation bietet.

iv. Abstract

Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) are carbon and energy storage compounds that form complex, organelle-like granules in many microorganisms. The β-proteobacterium Ralstonia eutropha (R. eutropha) represents the model organism of PHB research. Research of the last decades had led to the identification of many proteins that are localised on the surface of the hydrophobic granules, for example enzymes for the synthesis (PHB synthase, PhaC) and the degradation (PHB depolymerase, PhaZ) or proteins that determine the size/volume ratio or regulate granule segregation (phasins, PhaP). However, the exact molecular composition of the PHB granule surface is controversially discussed in the literature. Therefore, a recently identified PHB granule-associated protein (A0225) that could play a role in a putative phospholipid synthesis was investigated concerning its function as phospholipase. However, no lipase activity could be detected in vitro. Furthermore, the deletion mutant Δ H16_A0225 showed no *in vivo* effect on the intracellular PHB content. So, the role of A0225 within the PHB metabolism remains unclear. The function of the second recently identified PHB granule associated protein A2001 that is annotated hypothetical protein and part of the H16 A2001-phaB2(H16 A2002)as phaC2(H16 A2003) operon was also investigated. But the deletion mutants ΔH16 A2001 as well as ΔH16 A2001-A2003 showed no in vivo effect on the PHB content.

To answer the open question if there are phospholipid membranes on the PHB granule surface *in vivo* localization studies based on phospholipid binding proteins were performed. Therefore, the C2 domain of lactadherin (LactC2) was used because it specifically binds to phospholipids. The fusion protein DsRed2_{EC}-LactC2 was bound to the cytoplasmic membrane of *R. eutropha* but no co-localization with PHB granules could be detected. The results were verified in both the γ -proteobacterium *Pseudomonas putida* (*P. putida*) and the α -proteobacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* (*M. gryphiswaldense*). An additional binding of the fusion protein to membrane-surrounded magnetosomes was observed in *M. gryphiswaldense*, confirming the usage of LactC2 as phospholipid binding protein. Two further phospholipid binding proteins, namely RNase E and phosphatidylserine

XIII

decarboxylase, provided independent evidence for the absence of phospholipids on the surface of PHB granules.

Another part of this work gave more insights into the physiological role of the PhaM protein. Previous studies had already shown that PhaM regulates the surface/volume ratio and the segregation of PHB granules. An interaction of PhaM with the key enzyme of PHB synthesis as well as the nucleoid was also reported. Site-directed mutagenesis of two C-terminal located PAKKA motifs revealed that these motifs are the DNA binding motifs of PhaM and that the lysine residues mediated this interaction. Further experiments of genomic integrations of *phaM-eyfp* and *phaC1-eyfp* showed a maturation of PHB granules with increasing time characterized by the dissociation of PhaM and PhaC1 from the PHB granules. The identified Mg-dependent NTPase activity of PhaM was associated with the found signal recognition particle (SRP) motif of PhaM giving hints for the molecular mechanism of granule maturation and segregation.

1 Theoretischer Hintergrund und Zielsetzung

1.1 Vorkommen und Eigenschaften von PHB

Viele Prokaryoten bilden komplexe subzelluläre Strukturen aus, wie beispielsweise intrazelluläre Membranen oder generell beschriebene Inklusionen. Untersuchungen vieler dieser Strukturen brachten einen hohen Grad an intrazellulärer Differenzierung und Assoziation mit verschiedenen Proteinen hervor. Dazu zählen zum Beispiel Cyanophycin, Chlorosomen, Gasvesikel, Carboxysomen, Acidocalcisomen, Magnetosomen und Polyhydroxyalkanoat-Granula (Anderson und Dawes, 1990; Blakemore, 1975; Bryant *et al.*, 2002; Cannon *et al.*, 2001; Offner *et al.*, 1998; Sallam *et al.*, 2009; Seufferheld *et al.*, 2003).

Polyhydroxyalkanoate (PHA), zu denen Poly(3-Hydroxybuttersäure) (PHB) oder Poly(3-Hydroxyoktanoat) (PHO) gehören, repräsentieren eine wichtige Gruppe solcher natürlich vorkommender, intrazellulärer Einschlusskörper bei Prokaryoten (Madison und Huisman, 1999). Das wasserunlösliche Polymer PHA dient den Mikroorganismen als Reservestoff für Energie und Kohlenstoff und wird unter nicht ausbalancierten Wachstumsbedingungen gebildet (Anderson und Dawes, 1990). Ausschlaggebend dafür ist ein Mangel an Stickstoff (Schlegel *et al.*, 1961; Timm und Steinbüchel, 1990), aber auch die Limitierung anderer wichtiger Makroelemente, wie Sauerstoff, Sulfat, Phosphat oder Eisen können die PHA-Synthese auslösen (Kaltwasser, 1962; Repaske und Repaske, 1976; Schuster und Schlegel, 1967).

Die Familie der PHA besitzt ein breites Spektrum an physikalischen Eigenschaften und besonderen Funktionalitäten, was sich aufgrund der Monomerzusammensetzung des Polymers erklären lässt. Infolge der Fülle an verschiedenen Materialeigenschaften existieren eine Reihe von Möglichkeiten für die industrielle Anwendung von PHA, von erneuerbaren Kunststoffen bis hin zu Biomaterialien für Tissue Engineering (Parlane et al., 2017). PHA können in kurzkettige Monomere mit 3 bis 5 Kohlenstoffatomen, welche als PHA_{SCL} (short-chain-length) bezeichnet werden, und in langkettige PHA (C₆ bis C₁₆), sogenannte PHA_{MCL} (medium-chainlength), eingeteilt werden. Über 150 verschiedene Hydroxyalkanoate konnten bislang als Monomerbestandteile identifiziert werden (Steinbüchel und Valentin, 1995).

1

Neben der am weitesten verbreiteten Einheit (*R*)-3-Hydroxybuttersäure ((*R*)-3-HB) existieren auch Kopolymere, die beispielsweise 3-Hydroxyvalerat (P(3HB-*co*-3HV)), 3-Hydroxyalkanoat (P(3HB-*co*-3HA)) oder 4-Hydroxybutyrat (P(3HB-*co*-4HB)) enthalten. Produkte, die daraus hergestellt werden, weisen verbesserte Materialeigenschaften auf (Choi, Yoon, und Lenz, 1999; Madison und Huisman, 1999; Ramsay *et al.*, 1990).

Da Polyhydroxyalkanoate aus nachwachsenden Rohstoffen entstehen, biologisch abbaubar sind und thermoplastische Eigenschaften aufweisen, die vergleichbar mit denen von synthetisierten Erdöl-basierten Kunststoffen sind, haben PHA große Aufmerksamkeit sowohl in der Forschung als auch in der Industrie erlangt (Steinbüchel und Valentin, 1995). Dem Modellorganismus des PHB-Metabolismus R. eutropha kommt dabei eine große Bedeutung zu. Das Gram-negative, stäbchenförmige Bakterium gehört zur Klasse der β-Proteobakterien. Als fakultativ chemolithoautotrophes Bakterium assimiliert R. eutropha unter autotrophen Wachstumsbedingungen CO₂ über den Calvin-Benson-Zyklus (CBB), ist aber ebenso in der Lage, unter Verwendung von beispielsweise Fruktose oder Glukonat heterotroph zu wachsen (Bowien und Schlegel, 1981). Die Eigenschaft molekularen Wasserstoff (H₂) und Kohlenstoffdioxid (CO₂) als einzige Energieund Kohlenstoffquelle zu nutzen, brachte den Namen Hydrogenomonas eutropha oder umgangssprachlich "Knallgasbakterium" hervor (Schlegel et al., 1961). Weitere weniger akzeptierte Namensgebungen sind Alcaligenes eutrophus (Yabuuchi et al., 1995), Wautersia eutropha (Vaneechoutte et al., 2004) und Cupriavidus necator (Vandamme und Coenye, 2004). R. eutropha ist in der Lage, während aller Ernährungsweisen PHB zu bilden. Der Anteil des gebildeten PHB kann dabei bis zu 90 % (w/v) des Zelltrockengewichts ausmachen. Die PHB-Synthese kann in drei Schritte unterteilt werden. Ausgehend von zwei Molekülen Acetyl-CoA erfolgt die katalysiert wird. Die NADPH-abhängige Acetoacetyl-CoA Reduktase PhaB reduziert im nächsten Schritt Acetoacetyl-CoA zu (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA (Oeding und 1973). Letztere (*R*)-3-Hydroxybutyryl-CoA Einheiten werden Schlegel, im abschließenden Syntheseschritt unter Abspaltung von CoA durch die PHB-Synthase PhaC zu PHB polymerisiert (Anderson und Dawes, 1990). Die drei Gene für die Syntheseenzyme sind in dem Operon phaCAB organisiert, welches konstitutiv exprimiert wird (Peplinski et al,. 2010).

2

1.2 Aufbau und Struktur der PHB-Granula

Intrazellulär gebildetes, natives PHB (nPHB) liegt in einer amorphen Konformation vor. Der hydrophobe Polymerkern, der sich aus linearen Ketten einzelner 3HB-Einheiten zusammensetzt, ist von zahlreichen Proteinen umgeben, die an die Oberfläche von PHB binden. Aufgrund der komplexen supramolekularen, organellartigen Eigenschaften der PHB-Granula werden diese auch als Carbonosomen bezeichnet (Jendrossek, 2009). Der Durchmesser der PHB-Granula liegt zwischen 200 und 500 nm (Anderson und Dawes, 1990). Physikalische oder chemische Einwirkungen, die zum Beispiel während der PHB-Granulaisolierung auftreten können, bewirken den Übergang des amorphen Zustands in eine denaturierte, parakristalline Form, welche als denaturiertes PHB (dPHB) bezeichnet wird (Scandola *et al.*,1998; Merrick und Doudoroff, 1964).

Zahlreiche Untersuchungen in den letzten zwei Jahrzehnten führten zur Identifizierung einer zunehmenden Anzahl an PHB-Granula-assoziierten Proteinen (PGAPs) (Gerngross et al., 1993; Pfeiffer et al., 2011; Pötter et al., 2004; Pötter et al., 2002; Sznajder et al., 2015; Wieczorek et al., 1995; York et al., 2003). Während das in vivo Vorkommen von Proteinen auf der PHB-Granulaoberfläche mehrfach unabhängig voneinander bestätigt werden konnte, wird die Präsenz von Phospholipiden kontrovers diskutiert (Handrick et al., 2000; Pfeiffer et al., 2011; Pötter und Steinbüchel, 2006; Steinbüchel et al., 1995). Erste Hinweise für das Vorkommen von Lipiden und Proteinen auf der PHB-Granulaoberfläche in Bacillus Spezies wurden von Williamson und Wilkinson, 1958 und Griebel et al., 1968 geliefert. Die Arbeitsgruppe um Merrick identifizierte in Bacillus megaterium einen Hauptanteil von PHB mit 97,7 % (w/w), gefolgt von Proteinen mit 1,87 % (w/w) und 0,46 % (w/w) Lipide, wobei sich innerhalb der Lipidfraktion Phosphatidsäure und eine Aceton-lösliche Komponente unbekannter Struktur befanden (Griebel et al., 1968). Knapp 30 Jahre später, im Jahr 1994, analysierten Horowitz und Sanders Lipidextrakte R. eutropha mit Hilfe einer zweidimensionalen von Dünnschichtchromatographie und fanden Phosphatidylglycerin, Phosphatidylethanolamin, Diphosphatidylglycerin und eine vierte, nicht identifizierte Komponente (Horowitz und Sanders, 1994). Elektronenmikroskopische Aufnahmen dünner Schnitte durch PHB-akkumulierende Bakterien (z.B. Rhodospirillum rubrum, R. eutropha) legten nahe, dass PHB-Granula von einer Oberflächenschicht umgeben

sind, die einer Monolayer entsprechen könnte (Boatman, 1964; Mayer und Hoppert, 1997). Boatman publizierte das Vorhandensein einer Membran mit einer Dicke von 4 nm, was von Mayer und Hoppert bestätigt werden konnte. Sie bestimmten eine Membrandicke der PHB-Granula von rund 3.8 nm, wohingegen die Zytoplasmamembran eine Dicke von 7,23 nm aufwies. Beeby et al. zeigten hingegen mit Hilfe der Kryoelektronentomographie hochauflösende Bilder von PHB-Granula in R. eutropha, deren Oberfläche mit Proteinen, allerdings nicht mit Phospholipiden bedeckt war. Dennoch konnte die Anwesenheit oder Abwesenheit einer Lipidschicht bislang nicht eindeutig geklärt werden – während einige Veröffentlichungen mikroskopischer Analysen auf das Vorliegen einer Membran hinweisen (Jensen und Sicko, 1971; Lundgren et al., 1964; Boatman, 1964), können andere Arbeiten das Vorhandensein der Phospholipide innerhalb der PHB-Granulaoberfläche nicht eindeutig bestätigen (Chapman, 1956, Beeby et al., 2012).

Zahlreiche Studien zur Struktur der bakteriellen PHA-Granula führten zur Identifizierung von fünf verschiedenen Klassen Granula-assoziierter Proteine: (i) PHB-Synthasen (PhaC), (ii) PHA-Depolymerasen und 3HB-Oligomerhydroxylasen, (iii) Phasine (PhaP), (iv) ein Regulatorprotein der Phasinexpression (PhaR) sowie (v) ein Phasin-ähnliches Protein, das bei der PHB-Granulaverteilung während der Zellteilung eine Rolle spielt (PhaM) (Pfeiffer *et al.*, 2011; Pötter *et al.*, 2005; Sznajder *et al.*, 2015). Auf die PHA-Synthasen, die Phasine und PhaM soll in den nächsten Abschnitten näher eingegangen werden.

1.2.1 PHB-Synthasen PhaC

Das Schlüsselenzym der PHB-Synthese stellt die PHB-Synthase PhaC dar, die unter Abspaltung von Coenzym A die Polymerisierung der Acylgruppen des 3-Hydroxybutyryl-CoA zu PHB katalysiert. Basierend auf der Substratspezifität, Sequenzhomologien und der Komposition der Untereinheiten erfolgte eine Einteilung der PHA-Synthasen in vier Klassen (Pötter und Steinbüchel, 2005; Rehm, 2003). PHA-Synthasen der Klasse I (z.B. in *Ralstonia eutropha*), der Klasse III (z.B. in *Allochromatium vinosum*) und der Klasse IV (z.B. in *Bacillus megaterium*) bevorzugen die Inkooperation kurzkettiger Substrate (3 – 5 C-Atome), während PHA-Synthasen der Klasse II (z.B. in *Pseudomonas putida*) eine Substratspezifität für CoA-aktivierte (*R*)-3-Hydroxycarbonsäuren mit 6 – 14 C-Atomen aufweisen (Amara und Rehm, 2003). PHA-Synthasen der Klasse I und II bestehen aus einer Untereinheit mit einem Molekulargewicht zwischen 61 kDa und 73 kDa, wohingegen PHA-Synthasen der Klasse III aus zwei verschiedenen Untereinheiten, PhaE und PhaC, mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa aufgebaut sind (Liebergesell et al., 1992; Rehm und Qi, 2001; Yuan et al., 2001). Obwohl die Klasse IV der PHAunterschiedlichen Synthasen mit ebenfalls zwei Untereinheiten aroße Sequenzhomologien zu PhaC der Klasse III aufweist, wird anstelle von PhaE ein etwa 20 kDa großer Aktivator der PHA-Synthaseaktivität benötigt, welcher als PhaR bezeichnet wird (McCool und Cannon, 2001). Vergleiche der Aminosäuresequenzen der PHA-Synthasen zeigten, dass diese eine konservierte katalytische Triade, bestehend aus konservierten Cystein-, Aspartat- und Histidinresten, teilen. Bei PhaC1 aus R. eutropha handelt es sich um die konservierten Reste C319, D480 sowie H508 (Rehm, 2003). Studien belegten, dass die wachsende PHA-Kette kovalent mit dem Cysteinrest des aktiven Zentrums verbunden ist, wohingegen der Aspartatrest D480 eine wichtige Rolle während der Kettenverlängerung einnimmt (Tian, Sinskey, & Stubbe, 2005). Kürzlich konnten die Kristallstrukturen von PhaC aus Chromobacterium sp. USM2 (Chek et al., 2017) sowie der katalytischen Domäne von PhaC aus R. eutropha identifiziert werden (Kim et al., 2017; Wittenborn et al., 2016), die die Grundlage für weitere biochemische und strukturelle Charakterisierungen von PhaC darstellen.

Zahlreiche Studien konnten mit Hilfe verschiedenster Methoden eine klare Assoziation der PHB-Synthase mit der Oberfläche nativer PHB-Granula in *R. eutropha* zeigen. Beispielsweise deuteten Immunogoldmarkierungen mit anschließender Elektronenmikroskopie auf die deutliche Anwesenheit der PHA-Synthase-Komplexe auf der Oberfläche der PHA-Granula hin (Gerngross *et al.*, 1993; Liebergesell *et al.*, 1994; Mayer *et al.*, 1996). Auch enzymatische *in vitro* Tests konnten nachweisen, dass eine PhaC-Aktivität nur in Gegenwart isolierter nativer PHB-Granula auftritt (Griebel und Merrick, 1971). *In vivo* Lokalisationsexperimente mit PhaC-Gfp-Fusionsproteinen bestätigen ebenfalls eine Kolokalisation der Synthase mit PHB-Granula (Jendrossek, 2009; McCool und Cannon, 1999; Peters und Rehm, 2005; Peters *et al.*, 2007). Bei Abwesenheit von PHB konnte hingegen gezeigt werden, dass die Synthase in löslicher Form im Zytoplasma vorliegt (Haywood *et al.*, 1989).

5

1.2.2 Phasine

Phasine fungieren als PHA-Strukturproteine ohne bislang nachgewiesene katalytische Funktion und unterstützen die PHA-Biosynthese, wobei die Kopienzahl der Phasine dabei einen Einfluss auf die Größe der PHA-Granula hat (Wieczorek et al., 1995; York et al., 2001). Zwei Hauptaufgaben konnten Phasinen zugeordnet werden: einerseits verhindern sie die PHB-Granulaaggregation und zum anderen inhibieren sie ein unspezifisches Binden anderer Proteine an die PHB-Granulaoberfläche (Pieper-Fürst et al., 1994; Steinbüchel et al., 1995; Wieczorek et al., 1995). Neben der Rolle als Strukturproteine konnten für verschiedene Phasine zusätzliche Funktionen nachgewiesen werden. PhaP aus Azotobacter sp. FA8 zeigte zum Beispiel in vitro und in vivo Chaperonaktivitäten (Mezzina et al., 2014). Eine Aktivierung der *in vitro* PHA-Depolymerisation konnte hingegen für das Phasin ApdA aus Rhodospirillum rubrum detektiert werden (Handrick et al., 2004). Eine Abnahme der in vivo Aktivität der PHA-Synthase wurde mit dem Phasin PhaP aus Synechocystis sp. PCC 6803 in Verbindung gebracht (Hauf et al., 2015) und dem Phasin PhaF aus Pseudomonas putida wurde eine Beteiligung bei der PHA-Granulaverteilung nachgesagt (Maestro et al., 2013). Die Vielfältigkeit der Phasin-Eigenschaften suggerieren, dass Phasine eine aktive Rolle bei dem PHA-vermittelten Schutz vor Stress und bei der Verbesserung der Fitness spielen könnten (Mezzina und Pettinari, 2016). Eine Besonderheit der Phasine ist, dass sie mit einer hydrophoben Domäne, die mit der Oberfläche der PHB-Granula assoziiert ist, und einem hauptsächlich hydrophilen Teil, der in das Zytoplasma ragt, einen amphiphilen Charakter aufweisen (Pötter und Steinbüchel, 2005). Weitere charakteristische Eigenschaften dieser Proteine können wie folgt zusammengefasst werden: geringes Molekulargewicht zwischen 11 und 25 kDa, Hauptproteine der PHA-Granula, ubiguitäres Auftreten in PHA-akkumuliereden Bakterien sowie signifikanter Anteil am Gesamtzellproteinanteil (bis zu 5 %) (Steinbüchel et al., 1996). Phasine repräsentieren Analoge von Oleosinen, die an die Oberfläche von Oleosomen, sogenannten Ölkörpern, in Pflanzen binden, was zur Namensgebung der Phasine beitrug (Steinbüchel et al., 1995; Wieczorek et al., 1995). In R. eutropha konnten bislang sieben Phasine (PhaP1- PhaP7) identifiziert werden (Pfeiffer und Jendrossek, 2012; Pötter et al., 2004). PhaP1 repräsentiert dabei das Hauptphasin mit einem Gesamtzellproteinanteil von 3 bis 5 % und unterliegt der Regulation des

6

Repressorproteins PhaR. Die Deletionsmutante *△phaP1* besitzt einen spezifischen Phänotyp, der durch ein großes PHB-Granulum pro Zelle charakterisiert wird (Pötter *et al.*, 2004).

Neben diesen bereits charakterisierten PHB-Granula-assoziierten Proteinen wurden kürzlich mittels Proteomanalysen vier weitere Proteine am PHB-Granulum in *R. eutropha* H16 entdeckt. Dabei handelt es sich um drei putative α/β -Hydrolasen, von denen wiederum zwei (A0671 und B1632) eine PHB-Synthase/Depolymerase-Signatur aufweisen und das dritte Protein (A0225) als Patatin-ähnliche Phospholipase ausgewiesen ist. Für das vierte neu identifizierte Protein (A2001) konnte keine putative Funktion beschrieben werden, es wird allerdings mit den Genen mit der Acetoacetyl-CoA Reduktase (*phaB2*) und der PHB-Synthase (*phaC2*) kotranskribiert (Sznajder *et al.*, 2015).

1.2.3 Multifunktionales Phasin-ähnliches Protein – PhaM

Mittels Two-Hybdrid-Experimenten und einer Proteomanalyse konnte ein weiteres Protein identifiziert werden, welches an das PHB-Granulum in R. eutropha H16 bindet. Es handelt sich dabei um das 26,6 kDa Phasin-ähnliche Protein PhaM (Genlokus H16 A0141), welches ähnlich wie die PHB-Synthase konstitutiv in R. eutropha H16 exprimiert wird (Brigham et al., 2010, 2012; Lawrence et al., 2005), was Immunoblot-Experimente bestätigen (Pfeiffer und Jendrossek, 2013). In vivo Lokalisationsexperimente von PhaM mit Fusionen an eYFP unter Kontrolle des konstitutiven Promotors der PHB-Synthase (P_{phaC}) zeigten eine klare Assoziation des mit den PHB-Granula (Pfeiffer und Jendrossek, Proteins 2012). Auch elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten dies nachweisen. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass es bei der Überexpression von PhaM zu einer erhöhten PHB-Granulaanzahl kam, allerdings blieb die Größe dieser Granula weit unter der des Wildtyps (Pfeiffer et al., 2011). Auch die Deletion von phaM führte zu signifikanten Veränderungen bezüglich der Anzahl und Größe der gebildeten PHB-Granula, was damit in Verbindung gebracht wurde, dass PhaM eine Rolle bei der Bestimmung des Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen spielt (Pfeiffer et al., 2011; Wahl et al., 2012). Für die Deletionsmutante *AphaM* mit meist ein bis maximal drei PHB-Granula konnte damit ein ähnlicher Phänotyp wie für die *∆phaP1-*Mutante beschrieben werden (Pötter et al., 2005). Weiterhin wurde in der ∆phaM-Mutante die

PHB-Granulaverteilung auf die Tochterzellen während der Zellteilung beeinflusst, woraus eine Rolle von PhaM bei der Granulasegregation geschlussfolgert wurde, wie dies auch für PhaF aus P. putida beschrieben wurde (Galán et al., 2011; Pfeiffer et al., 2011). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von PhaM konnten zeigen, dass es zu einer Assoziation mit der DNA kommt, was auch durch in vitro DNA-Bindeassays (EMSA) bestätigt werden konnte (Pfeiffer et al., 2011; Wahl et al., 2012). Aufgrund der nachgewiesenen DNA-Bindungseigenschaften von PhaM wurde ein mögliches Scaffold-Modell zur PHB-Granulabildung bzw. -lokalisation angenommen, welches neben den Micellen- und Budding-Modellen zu den favorisierten gehört (Grage et al., 2009; Jendrossek und Pfeiffer, 2014). Laut dem Micellen-Modell kommt es im Zytoplasma zur Interaktion der löslichen PhaC mit dem Substrat, um den Polymerisierungsprozess initiieren. Schließlich zu aggregieren einige Polymermoleküle aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen und bilden so Micellen-ähnliche Strukturen. Daran binden anschließend Phasine, vor allem PhaP1, und andere PHB-Granula-assoziierte Proteine. Das Budding-Modell hingegen basiert Bindung von PhaC1 und PhaP1 die innere auf der an Seite der Zytoplasmamembran. Die gebildete PHB-Kette wird in den Zwischenraum der Phospholipiddoppelschicht der Zellmembran freigesetzt und das Granulum löst sich anschließend von der Membran ab und ist folglich von einer Phospholipid-Monolayer umgeben (Parlane et al., 2017). Die Basis zur Hypothese eines Scaffold-Modells wurde von Tian et al. geschaffen, die mit Hilfe von TEM-Aufnahmen dunkel-gefärbte Bereiche, sogenannte "Mediation Elements" in der Zellmitte nachweisen konnten (Tian et al., 2005). Diese Mediationselemente sollen als Gerüste für Initiationsorte der PhaC-vermittelten PHB-Synthese dienen. Jendrossek und Pfeiffer lieferten mit den Ergebnissen zur gleichzeitigen Interaktion von PhaM mit der PHB-Synthase und der DNA weitere Hinweise für die Existenz des Scaffold-Modells (Jendrossek und Pfeiffer, 2014; Pfeiffer und Jendrossek, 2014).

1.3 Zielsetzung

Trotz der seit Jahrzehnten andauernden Erforschung des PHB-Stoffwechsels, besonders im Modellorganismus R. eutropha H16, sind einige Aspekte innerhalb des PHB-Metabolismus bislang immer noch ungeklärt. Dazu zählen beispielsweise die Funktion und mögliche physiologische Rolle von den kürzlich mittels Proteomuntersuchungen identifizierten neuen PHB-Granula-assoziierten Proteinen A0225 und A2001 (Sznajder et al., 2015). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestand ein erstes Ziel darin, die Funktionen der putativen Patatin-ähnlichen Phospholipase A0225 sowie des hypothetischen Proteins A2001 als Teil des H16 A2001-*phaB2-phaC2*-Operons innerhalb des PHB-Stoffwechsels zu untersuchen. Dabei sollte ein möglicher Einfluss dieser Proteine auf den intrazellulären PHB-Gehalt analysiert werden, indem eine quantitative PHB-Bestimmung der Deletionsmutanten R. eutropha H16 AH16 A0025, AH16 A2001 und Δ H16 A2001-A2003 im Vergleich zu *R. eutropha* H16 Wildtyp durchgeführt werden sollte.

Die Annotierung von A0225 als putative Phospholipase legt eine Rolle im Phospholipid-Metabolismus nahe. Die Aufklärung der Funktion dieses Proteins zusammen mit in vivo Lokalisationsexperimenten von Phospholipidbindeproteinen sollte ferner helfen, eine 50 Jahre alte Frage zu klären, ob sich an der Oberfläche von PHB-Granula Phospholipide befinden (Griebel et al., 1968). Dazu sollte eine Aufreinigung des Proteins A0225 und eine anschließende in vitro Charakterisierung hinsichtlich einer potenziellen Esterase- bzw. Lipaseaktivität erfolgen. Um eine klare Antwort darauf zu geben, ob es sich um eine artifizielle Phospholipidbindung während der PHB-Isolierung handelt oder die PHB-Granulaoberfläche in vivo von Phospholipiden bedeckt ist, sollten in vivo Labeling-Experimente mit der C2-Domäne des Phospholipidbindeproteins Lactadherin (LactC2) in Kooperation mit der AG Forchhammer (Universität Tübingen) durchgeführt werden. Fusionen von LactC2 mit den Fluoreszenzproteinen DsRed2_{EC}, mTurquoise2 oder sfGFP sollten eine Bindung an negativ-geladene Phospholipide bestätigen. Sofern sich Phospholipide am PHB-Granulum befinden, sollte so eine Detektion ermöglicht werden. Dies sollte unabhängig sowohl in PHB-bildenden α -, β - als auch γ -Proteobakterien nachgewiesen werden.

Neben der Klärung des Vorhandenseins von Phospholipiden auf der PHB-Granulaoberfläche bestand ein weiteres Ziel darin, die genaue Rolle von PhaM im PHB-Stoffwechsel zu untersuchen. Es war bereits bekannt, dass PhaM als Aktivator der PHB-Synthase fungiert, gleichzeitig an die DNA bindet und eine wichtige Funktion als PHB-Granulasegregationsfaktor einnimmt (Pfeiffer und Jendrossek, 2014; Pfeiffer *et al.*, 2011; Wahl *et al.*, 2012). Die multifunktionalen Effekte von PhaM und deren mögliche Zusammenhänge sollten näher charakterisiert werden, indem einerseits die Basis der DNA-Bindung von PhaM aufgeklärt werden sollte. Dazu sollten gerichtete Mutagenesen möglicher DNA-Bindungsreste und anschließende *in vitro* DNA-Bindeassays sowie *in vivo* Lokalisationsstudien durchgeführt werden. Andererseits sollte ein möglicher molekularer Mechanismus für die Granulaverteilung identifiziert werden. Dazu sollten chromosomale Integrationen von *phaM-eyfp* und *in vitro* Aktivitätsassays von aufgereinigtem PhaM dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

Tabelle 2-1: Verwendete Organismen

Bakterienstamm	Relevante Eigenschaft	Referenz, SK-Nummer
Escherichia coli Stämme		
BL21 (DE3) pLysS BTH101 ∆ <i>cya</i>	Expressionsstamm, Cm ^r Adenylatcyclase-defizienter <i>BACTH</i> - Expressionsstamm	Novagen, 4512 Karimova <i>et al</i> . 2005, 3656
JM109	Klonierungsstamm	Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985. 3688
S17-1	Konjugationsstamm	Simon <i>et al.</i> 1983, 3886
XL-1 Blue	Transformationsstamm	Stratagene, 4505
Magnetospirillum gryphiswald	ense Stämme	
MSR-1	Wildtyp	Schultheiss <i>et al.</i> 2004, 6346
MSR-1 mamC-egfp	mamC-egfp chromosomale Fusion	Raschdorf <i>et al.</i> 2014, 6149
Pseudomonas putida Stämme		
GPo1	Wildtyp	de Smet <i>et al.</i> 1983, 1340
Ralstonia eutropha Stämme		
H16	Wildtyp	DSMZ 428, 1342
H16 <i>∆phaP1</i>	Deletion des Gens phaP1	Pötter <i>et al.</i> 2004, 3027
H16 <i>∆phaP1-∆phaP4</i>	Deletion der Gene phaP1 – phaP4	Pötter <i>et al.</i> 2004, 3028
H16 <i>∆phaP1-∆phaP5</i>	Deletion der Gene phaP1 – phaP5	Pfeiffer <i>et al.</i> 2011, 4239
H16 phaM-eyfp	phaM-eyfp chromosomale Fusion	Bresan <i>et al.</i> 2017, 6000
H16 ∆phaC phaM-eyfp	<i>phaM-eyfp</i> chromosomale Fusion im <i> ΔphaC-</i> Hintergrund	Bresan <i>et al.</i> 2017, 6059
H16 phaC1-eyfp	phaC1-eyfp chromosomale Fusion	Bresan <i>et al.</i> 2017, 6495
H16 <i>∆phaM phaC1-eyfp</i>	<i>phaC1-eyfp</i> chromosomale Fusion im <i>∆phaM</i> -Hintergrund	Bresan <i>et al.</i> 2017, 6496
H16 ∆phaP1 phaM-eyfp	<i>phaM-eytp</i> chromosomale Fusion im ∆ <i>phaP1-</i> Hintergrund	Diese Arbeit, 6629
H16 ∆phaP1 phaC1-eyfp	<i>phaC1-eyfp</i> chromosomale Fusion im ∆ <i>phaP1-</i> Hintergrund	Diese Arbeit, 6630
H16	Deletion des Gens H16_A0141 (phaM)	Pfeiffer <i>et al.</i> 2011, 3967
H16 <i>∆phaC</i>	Deletion des Gens H16_A1437 (phaC)	Pfeiffer und Jendrossek 2012, 4210
H16 AH16_A0225	Deletion des Gens H16_A0225	Diese Arbeit, 5696
H16 ∆H16_A2001	Deletion des Gens H16_A2001	Diese Arbeit, 5781
H16 ∆H16_A2001- ∆H16_A2003	Deletion der Gene H16_A2001- H16_A2003	Diese Arbeit, 5883

2.2 Plasmide

Tabelle 2-2	Verwendete	Plasmide
-------------	------------	----------

Plasmide	Relevante Eigenschaft	Referenz
Expressionsplasmide mit eYFP-Fu	ision	
pBBR1MCS2	Broad host range Vektor, Kan ^r	Kovach <i>et al.</i> 1995
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-c1	Vektor für Fusionen am C-Terminus von	Wahl <i>et al.</i> 2012
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-n1	Vektor für Fusionen am N-Terminus von eYFP unter Kontrolle des P_{phaC} -Promotors	Pfeiffer <i>et al.</i> 2011
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp	Kontrollvektor für eYFP-Expression	Pfeiffer <i>et al.</i> 2011
pBBR1MCS2::P _{phaC} -phaM-eyfp	C-terminale Fusion von PhaM an eYFP	Pfeiffer <i>et al.</i> 2011
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaM	N-terminale Fusion von PhaM an eYFP	Pfeiffer <i>et al.</i> 2011
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaM ^{∆C}	N-terminale Fusion von Pha $M^{\scriptscriptstyle \Delta C}$ an eYFP	Bresan <i>et al.</i> 2017
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaM ^{K1-2l}	N-terminale Fusion von PhaM ^{K1-2I} an eYFP	Bresan <i>et al.</i> 2017
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaM ^{K1-4I}	N-terminale Fusion von PhaM ^{K1-41} an eYFP	Bresan <i>et al.</i> 2017
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaM ^{K3-8I}	N-terminale Fusion von PhaM ^{K3-8I} an eYFP	Bresan <i>et al.</i> 2017
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaM ^{K1-8I}	N-terminale Fusion von PhaM ^{K1-8I} an eYFP	Bresan <i>et al.</i> 2017
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaM ^{K3-6I}	N-terminale Fusion von PhaM ^{K3-6I} an eYFP	Bresan <i>et al.</i> 2017
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaM ^{K3-6E}	N-terminale Fusion von PhaM ^{K3-6E} an eYFP	Bresan <i>et al.</i> 2017
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaM ^{P1A}	N-terminale Fusion von PhaM ^{P1A} an eYFP	Bresan <i>et al.</i> 2017
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaM ^{P2A}	N-terminale Fusion von PhaM ^{P2A} an eYFP	Bresan <i>et al.</i> 2017
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaM ^{P2H}	N-terminale Fusion von PhaM ^{P2H} an eYFP	Bresan <i>et al.</i> 2017
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaM ^{P3A}	N-terminale Fusion von PhaM ^{P3A} an eYFP	Bresan <i>et al.</i> 2017
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaM ^{P3H}	N-terminale Fusion von PhaM ^{P3H} an eYFP	Bresan <i>et al.</i> 2017
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaM ^{P4A}	N-terminale Fusion von PhaMP4A an eYFP	Bresan <i>et al.</i> 2017
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaM ^{P2-3A}	N-terminale Fusion von PhaM ^{P2-3A} an eYFP	Bresan <i>et al.</i> 2017
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaM ^{P2-3H}	N-terminale Fusion von PhaM ^{P2-3H} an eYFP	Bresan <i>et al.</i> 2017
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaC	N-terminale Fusion von PhaC an eYFP	Pfeiffer <i>et al.</i> 2012
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-phaC ^{C319A}	N-terminale Fusion von inaktiver PhaC ^{C319A} an eYFP	Pfeiffer <i>et al.</i> 2012
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-psd	N-terminale Fusion von Psd (A1038) an eYFP	Bresan <i>et al.</i> 2016
pBBR1MCS2::P _{phaC} -eyfp-rne	N-terminale Fusion von RNase E an eYFP	Diese Arbeit

Expressionsplasmide mit DsRed2_{EC}-Fusion

pCM62	Broad host range Vektor, Tet ^r	Lidstrom & Marx 2001
pCM62::P _{phaC} -dsred2 _{EC} -c1	Vektor für Fusionen am C-Terminus von DsRed2 _{EC} unter Kontrolle des P _{phaC} - Promotors	Bresan <i>et al.</i> 2016
pCM62::P _{phaC} -dsred2 _{EC} -lactC2	N-terminale Fusion von LactC2 an DsRed 2_{EC}	Bresan <i>et al.</i> 2016
pCM62::P _{phaC} -dsred2 _{EC} -phaC	N-terminale Fusion von PhaC an $DsRed2_{EC}$	Bresan <i>et al.</i> 2017
pCM62::P _{phaC} -dsred2 _{EC} -phaC ^{C319A}	N-terminale Fusion von Pha C^{C319A} an DsRed2 _{EC}	Bresan <i>et al.</i> 2017
pBAM::P _{mamDC} - <i>dsred2_{EC}-lactC2</i>	N-terminale Fusion von LactC2 an $DsRed2_{EC}$ unter Kontrolle des P_{mamDC} -Promotors	Bresan <i>et al.</i> 2017
Weitere Expressionsplasmide		
pCM62::P _{phaC} -sfgfp-lactC2	N-terminale Fusion von LactC2 an sfGFP	Bresan <i>et al.</i> 2016
pCM62::P _{phaC} -mturquoise2-lactC2	N-terminale Fusion von LactC2 an mTurquiose2	Bresan <i>et al.</i> 2016
Expressionsplasmide mit His-Tag		
pET28a	His-Tag-Expressionsvektor, Kan ^r	Novagen
pET28a:: <i>phaM</i>	Expressionsvektor für His6-PhaM	Daniel Pfeiffer
pET28a:: <i>phaM^{∆C}</i>	Expressionsvektor für His ₆ -PhaM ^{∆C}	Bresan <i>et al.</i> 2017
pET28a:: <i>phaM^{K1-2l}</i>	Expressionsvektor für His ₆ -PhaM ^{K1-2I}	Bresan <i>et al.</i> 2017
pET28a:: <i>phaM^{K1-4/}</i>	Expressionsvektor für His ₆ -PhaM ^{K1-4I}	Bresan <i>et al.</i> 2017
pET28a:: <i>phaM^{K3-6I}</i>	Expressionsvektor für His ₆ -PhaM ^{K3-6I}	Bresan <i>et al.</i> 2017
pET28a:: <i>phaM^{K3-6E}</i>	Expressionsvektor für His ₆ -PhaM ^{K3-6E}	Bresan <i>et al.</i> 2017
pET28a:: <i>phaC</i>	Expressionsvektor für His6-PhaC	Pfeiffer <i>et al.</i> 2014
pET28a:: <i>phaC^{C319A}</i>	Expressionsvektor für His6-PhaC ^{C319A}	Bresan <i>et al.</i> 2017
pET28a::H16_A0225	Expressionsvektor für His ₆ -A0225	Diese Arbeit
Deletionsplasmide		
pLO3	Suizid-Vektor für die Herstellung von genomischen Deletionen und Integrationen, Tet ^r , <i>sacB</i>	Lenz & Friedrich 1998
pLO3:: <i>HRI(phaM)-eyfp-HRII</i>	Integrationsvektor für phaM-eyfp	Bresan <i>et al.</i> 2017
pLO3:: <i>HRI(phaC)-eyfp-HRII</i>	Integrationsvektor für phaC-eyfp	Bresan <i>et al.</i> 2017
pLO3::∆H16_A0225	Deletionsvektor für H16_A0225	Diese Arbeit
pLO3::∆H16_A2001	Deletionsvektor für H16_A2001	Diese Arbeit
pLO3::ΔH16_A2001-ΔH16_A2003	Deletionsvektor für H16_A2001-A2003	Diese Arbeit

BiFC-Plasmide		
pBBR1MCS2::YN-c1	Expressionsvektor pBBR1MCS2 mit dem N- terminalen Teil von eYFP (YN; AS 1 bis 154) unter Kontrolle des P _{BAD} -Promotors	Pfeiffer <i>et al.</i> 2013
pBBR1MCS2:: <i>YN-phaM</i>	Expressionsvektor für YN-phaM	Pfeiffer <i>et al.</i> 2013
pBBR1MCS2:: <i>YN-phaC1^{C319A}</i>	Expressionsvektor für YN-phaC1 ^{C319A}	Diese Arbeit
pCM62:: <i>YC</i> -c1	Expressionsvektor pCM62 mit dem C- terminalen Teil von eYFP (YC; AS 155 bis 238) unter Kontrolle des P _{BAD} -Promotors	Pfeiffer <i>et al.</i> 2013
pCM62:: <i>YC-phaM</i>	Expressionsvektor für YC-phaM	Pfeiffer <i>et al.</i> 2013
pCM62:: <i>YC-phaC1^{C319A}</i>	Expressionsvektor für YC-phaC1 ^{C319A}	Diese Arbeit
Two-hybrid-Plasmide		
рКТ25	T25 Untereinheit der Adenylatcyclase (<i>cya</i>), Kan ^r	Karimova <i>et al.</i> 2001
pUT18C	T18 Untereinheit der Adenylatcyclase (<i>cya</i>), Amp ^r	Karimova <i>et al.</i> 2001
pKT25:: <i>zip</i>	Vektor, DNA-Fragment codiert für Leucin- Zipper (Positivkontrolle)	Karimova <i>et al.</i> 2001
pUT18C:: <i>zip</i>	Vektor, DNA-Fragment codiert für Leucin- Zipper (Positivkontrolle)	Karimova <i>et al.</i> 2001
pKT25::H16_A0141	Vektor mit T25-Fusion an phaM	Pfeiffer <i>et al.</i> 2011
pUT18C::H16_A0141	Vektor mit T18-Fusion an <i>phaM</i>	Pfeiffer <i>et al.</i> 2011
pKT25::H16_A3115	Vektor mit T25-Fusion an H16_A3115	Diese Arbeit
pUT18C::H16_A3115	Vektor mit T18-Fusion an H16_A3115	Diese Arbeit
pKT25::H16_A0754	Vektor mit T25-Fusion an H16_A0754	Diese Arbeit
pUT18C::H16_A0754	Vektor mit T18-Fusion an H16_A0754	Diese Arbeit
pKT25::H16_A2640	Vektor mit T25-Fusion an H16_A2640	Diese Arbeit
pUT18C::H16_A2640	Vektor mit T18-Fusion an H16_A2640	Diese Arbeit
pKT25::H16_B1085	Vektor mit T25-Fusion an H16_B1085	Diese Arbeit
pUT18C::H16_B1085	Vektor mit T18-Fusion an H16_B1085	Diese Arbeit
pKT25::H16_A3241	Vektor mit T25-Fusion an H16_A3241	Diese Arbeit
pUT18C::H16_A3241	Vektor mit T18-Fusion an H16_A3241	Diese Arbeit
pKT25::H16_A3264	Vektor mit T25-Fusion an H16_A3264	Diese Arbeit

Vektor mit T18-Fusion an H16_A3264

Diese Arbeit

pUT18C::H16_A3264

2.3 Primer

Tabelle 2-3: Verwendete Primer

Xbal

Sacl

Xbal

Xhol

Xhol

EcoRI

BamHI

C-terminale Fusion an eYFP (C1)

Primer	Restriktions - enzyme	Sequenz (5' – 3')	
Deletionen/ Integ	Irationen		
PhaM-f	Sacl Pacl		
eyeer PhaM-HR-f	Paci Paci	CCTTAATTAAGGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGGGATCCCGG	
PhaM-HR-r	Xbal	GCTCTAGACGCACCGCTGTCCAGGCTGGCC	
eYFP-r	Pacl	CCTTAATTAAGGTTACCGGGGCAAGCTGACCG	
PhaC1-HR-f	Sacl	CCTTAATTAACGCTTGCATGAGTGCCGGCGTGC	
PhaC1-HR-r A0225-upstr-f	Xbal Sacl		
A0225-upstr-r	Xbal	GCCGTTAATTAAGCCGGCCGCGCGCTCCTGCCGATTGGAAAG	
A0225-downstr-f	Sacl	CGGCTTAATTAACGGCGGCGGCCGGCCGGCCGGCTCAGTCGACC	
A0225-00wnstr-f	Xbal	GCTCTAGACCGTCAGCAGCGGCATGCCGC	
A2001-upstr-r	Pstl	GCCGTTAATTAAGCCGGGAGGAACTCCTATAGTCAAGCGGCTGGCC	
A2001-downstr-t	Xbal Petl		
A2001-A2003- upstr-f	Sacl	CGATCAGAGCTCCCGTCAGCAGCGGCATGCC	
A2001-A2003-	VI I		

GCCGTTAATTAAGCCGGGAGGAACTCCTATAGTCAAGCGGCTGGCC

CGGCTTAATTAACGGCCCTCTTGTTCACTGTGCTGCGCC

GCTCTAGACACGTTTGGAGCGGAAGACGGCGAAGACG

CCGCTCGAGGCATGAACTATCCTCATCCGCTGATCGCC

CCGCTCGAGGCATGAAAAGAATGTTAATCAACGCAACTCAGCAG

CGGGATCCTCACTTCACGTCGAGTTCGGCGAGGATG

GGGAATTCTTACTCAACAGGTTGCGGACGCGCAGG

eYFP-rne-r His-Tag

eYFP-rne-f

upstr-r

downstr-f A2001-A2003-

downstr-r

A2001-A2003-

eYFP-A1038-f

eYFP-A1038-r

A0225-His-f	Ncol	CATGCCATGGATGGCGGAAAAAGAACGGCAGGAGC
A0225-His-r	HindIII	CGCGGATCCCGGCCACCGTTGCCGC

BiFC

PhaC1-C319A-f	CGTGCTCGGCTTCGCCGTGGGCGGCAC
PhaC1-C319A-r	GTGCCGCCCACGGCGAAGCCGAGCAC

Mutagenesen

PhaM-K1-2I-f	GCACGGGCATTCCCGCCGCCAGGATCGCGCCGG
PhaM-K1-2I-r	CCGGCGCGATCCTGGCGGCGGGAATGCCCGTGC
PhaM-K3-4I-f	GCGCCGGCAATTATTGCGCCGGCCATCAAGGCGGCCA
PhaM-K3-4I-r	TGGCCGCCTTGATGGCCGGCGCAATAATTGCCGGCGC
PhaM-K5-8I-f	GCCGGCCATCATTGCGGCCATCGCAATTCCGGCCAGGGAC
PhaM-K5-8I-r	GTCCCTGGCCGGAATTGCGATGGCCGCAATGATGGCCGGC
PhaM-K3-4I-2-f	AAGCGCCGGCAATTATTGCGCCGGCCAAAAA
PhaM-K3-4I-2-r	TTTTTGGCCGGCGCAATAATTGCCGGCGCTT
PhaM-K5-6I-f	ATTGCGCCGGCCATTATTGCGGCCAAGGCAAA
PhaM-K5-6I-r	TTTGCCTTGGCCGCAATAATGGCCGGCGCAAT
PhaM-∆C-f	CCTCCGCCGGCACGTGAAAGCCCGCCGCC
PhaM-∆C-r	GGCGGCGGGCTTTCACGTGCCGGCGGAGG

PhaM-P218A-f PhaM-P218A-r PhaM-P224A-f PhaM-P229A-f PhaM-P229A-f PhaM-P229A-r PhaM-P238A-f PhaM-P238A-r PhaM-P224H-f PhaM-P224H-f PhaM-P229H-f PhaM-P229H-r PhaM-T69A-f PhaM-T69A-f PhaM-T69A-r PhaM-T69D-f PhaM-T69D-r PhaM-T85A-f PhaM-T85A-r PhaM-T85D-r PhaM-T85D-r PhaM-T85D-r PhaC1-C319A-f PhaC1-C319A-r		GGCACGGGCAAGGCCGCCGCCAGGAAAGCG CGCTTTCCTGGCGGCGGCGCCAGGAAGGCG GCCAGGAAAGCGGCGGCGGCCAAAAGAGGCG CGCCTTCTTTGCCGCCGCGCTTCCTGGC GCAAAGAAGGCGGCGGCCAAAAAGGCGGCC GGCCGCCTTTTGGCCGCCGCCTTCTTTGC GCCAAGGCAAAAGCGGCCAGGGACGCCG CGCCATGGCACGCACGCAAAGAAGGCG CGCCTTCTTGCGTGCGCTTTCCTGGCG CGCCATGCTGCGCACGCCAAAAAAGGCG CGCCTTCTTTGCGTGCGCCTTCTTTGC CAACCTGCTGCGCACCGCCAAAAAAGGCG CTTCCAGGCCCTGGATGCGCCTTCTTGC CAACCTGCTGCGCACCGCCATCCAGGGCCTGGAAG CTTCCAGGCCCTGGATGGCGGTGCGCAGCAGGATTG CAACCTGCTGCGCACCGCATCCAGGGCCTGGAAG CTTCCAGGCCCTGGATGTCGGTGCGCAGCAGGATTG GGTGGCGCTGCAGGCCTTCGGCAACGCGC GCCGTTGCCGAAGGCCTTCGGCAACGCGC GCGCGTTGCCGAAGGCCTCCAGCGCCACC GGTGGCGCTGCAGGACTTCGGCAACGCGC GCGCGTTGCCGAAGGCCTGCAGCGCCACC CGTGCCGCACGGCAAGCCCGCACC CGTGCCGCACGGCGAAGCCGAGCAC GTGCCGCCCACGGCGAAGCCGAGCAC
<i>I wo-nybria</i> (pK I 2	25/put 18C)	
A0754-f A0754-r A2640-f A2640-r B1085-f B1085-r A3241-f A3241-r A3264-f A3264-r A3115-f A3115-r	Xbal Kpnl Xbal Smal Xbal Kpnl Xbal EcoRl Xbal Kpnl Xbal Kpnl	GCTCTAGAGATGGCCCGAGCTACCACGACC GGGGTACCTCAGTCATCGTCACGCGCG GCTCTAGAGATGGCAGGTTTTCGCCCCAAGGCTTC TCCCCCGGGCGTCAGTGGAACAGCG GCTCTAGAGGTGCTGGGGTGGACGACCG GGGGTACCTTAATCTTCCGGCTGGTCGAGGCG GCTCTAGAGATGCTGGACAATCTCACTCAACGCCTGGCGC GGGGTACCCTAGCGGTTGAAGAGGCCCTTCATGC GCTCTAGAGATGATCACCGGCCTTCTCAAGAAAGTCTTCG CGGAATTCCTCAGCTGAGCCGTG GCTCTAGAGATGATCGTTATCCGCTTGGAAATACCTCGTGATCCTG GGGGTACCTTACTTGGCGACCGGCGTG
Sequenzierprime	·	
pLO3-f pLO3-r pCM62-f pCM62-r pET28a-f pET28a-r pBBR1MCS2-f pBBR1MCS2-r pUT18C-f pUT18C-r pKT25-f pKT25-r eyfp-c1-f eyfp-c1-r		GCAAGCAGCAGATTACGCG CCGAGGATGACGATGAGCG AAGGGAGAAAGGCGGACAGG CCATTCGCCATTCAGGCTGC GAAATTAATACGACTCACTATAGGG GGGTTATGCTAGTTATTGCTCAG CAGCTATGACCATGATTACGCC ACGTTGTAAAACGACGGCC GTTCGACGATGGGCTGGGAGCC AGCAATAGCCCGTCAGGGCG CGCCATTATGCCGCATCTGTCC CTTCGCTATTACGCCAGCTGGC GCATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGACTCAGAT ATCTGAGTCCGGACTTGTACAGCTCGTCCATGC

2.4 Nährmedien und Antibiotika

Es wurden verschiedene Nährmedien entsprechend der vorgesehenen Kultivierung der Stämme benutzt. Die Nährmedien wurden sowohl in flüssiger als auch fester (Zusatz von 1,5 % Agar (w/v)) Form genutzt und vor Verwendung bei 121°C autoklaviert.

2.4.1 Komplexmedien

Lysogeny Broth (LB) nach Sambrook et al., 1989

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Nutrient broth (NB)

Nutrient broth	8 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

2.4.2 Mineralmedien

Mineralmedium (MM) nach Schlegel et al., 1961 (modifiziert)

Die folgenden Stammlösungen wurden separat angesetzt und autoklaviert:

$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	1000-fach (20 g in 100 ml H ₂ O _{bidest.})
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	1000-fach (2 g in 100 ml H ₂ O _{bidest.})
Ammoniumeisen(III)-citrat	10.000-fach (5 g in 100 ml H ₂ O _{bidest.})
SL6	10.000-fach

Spurenelementlösung (SL6) nach Pfennig, 1974; 10.000-fach konzentriert

ZnSO₄ · 7 H₂O	1 g
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,3 g
H ₃ BO ₃	3 g
$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	2 g
$CuCl_2 \cdot 2 H_2O$	0,1 g
$NiCl_2 \cdot 6 H_2O$	0,2 g
$Na_2MO_4 \cdot 2 H_2O$	0,3 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Als C-Quelle wurde, sofern nicht anders angegeben, Fruktose (0,5 % (w/v)) verwendet.

2.4.3 Antibiotika

Alle Antibiotika-Stammlösungen (nachfolgende Tabelle) wurden nach Sambrook *et al.*, 1989 angesetzt, steril filtriert, aliquotiert und bei – 20°C aufbewahrt.

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Na-Salz), Amp ₁₀₀	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	100 μg/ml
Chloramphenicol, Cm ₃₄	34 mg/ml in 96 % (v/v) EtOH	34 μg/ml
Kanamycinsulfat, Kan50	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	50 μg/ml für <i>E. coli</i>
Kanamycinsulfat, Kan150	150 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	150 μg/ml für <i>R. eutropha</i>
Tetracyclin, Tet ₁₅	15 mg/ml in 70 % (v/v) EtOH	15 μg/ml

Tabelle 2-4: Verwendete Antibiotika

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Stammhaltung und Konservierung

Zur kurzfristigen Lagerung wurden alle Organismen auf den entsprechenden Nähragarplatten bei 4 – 8°C für maximal vier Wochen gelagert.

Für eine langfristige Konservierung von *E. coli* Stämmen wurden 900 μ l einer Übernachtkultur des entsprechenden Stammes mit 900 μ l Glycerin (98 % (v/v)) in einem Kryoröhrchen gemischt und bei – 70°C eingefroren. Zur Reaktivierung der Zellen wurden 10 ml LB-Medium (optional mit dem entsprechenden Antibiotikum) mit einer Impföse angeimpft und über Nacht bei 37°C und 150 *rpm* geschüttelt.

R. eutropha Stämme wurden hingegen in Form von lyophilisierten Zellen aufbewahrt. Dafür wurden die Zellen einer dicht bewachsenen NB-Agarplatte (optional mit dem entsprechenden Antibiotikum) mit 1,5 ml einer sterilen Lösung aus 10 % (w/v) Skimmilk und 5 % (w/v) myo-Inositol abgelöst. Anschließend wurden 10 – 15 sterile Filterpapier-Testplättchen zur Zellsuspension gegeben, dann in sterile Glasröhrchen überführt und bei – 20°C für etwa zwei Stunden eingefroren. Nach der Lyophilisation der Zellen für 2 Tage wurden die getrockneten Plättchen in sterile Kryoröhrchen mit Glaswolle über Kieselgel als Trockenmittel überführt und bei – 70°C gelagert. Um die konservierten Zellen zu reaktivieren, wurde ein Plättchen in 10 ml NB-Medium mit gegebenenfalls dem entsprechenden Antibiotikum gegeben und über Nacht bei 30°C und 150 *rpm* inkubiert.

2.5.2 Zellkultivierung

Kultivierung von Escherichia coli

E. coli Zellen wurden standardmäßig in LB-Medium (optional mit dem entsprechenden Antibiotikum) bei 37°C und 150 *rpm* in Erlenmeyerkolben kultiviert. Geringere Kultivierungstemperaturen (26°C bzw. 30°C) wurden für die Proteinexpression in *E. coli* BL21 (DE3) genutzt.

19

Kultivierung von Ralstonia eutropha H16

R. eutropha H16 Zellen wurden generell in NB-Medium bei 30°C und 150 *rpm* in Erlenmeyerkolben kultiviert. Für Experimente, in denen die Speicherung und Mobilisierung von PHB untersucht wurde, waren PHB-freie Zellen als Ausgangspunkt unabdingbar. Um dies zu erreichen, wurden die Zellen in zwei aufeinanderfolgenden Vorkulturen in Komplexmedium kultiviert. Die erste Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und für 24 Stunden bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurden 10 % (v/v) der ersten Vorkultur in die zweite überführt und wiederum für 24 – 30 Stunden bei 30°C kultiviert. Schließlich wurden 10 % (v/v) der zweiten Vorkultur anzuimpfen. Letztere bestand aus NB-Medium sowie 0,2 % (w/v) Natriumglukonat als zusätzliche Kohlenstoffquelle, um die PHB-Bildung zu fördern.

Für Experimente zur PHB-Isolierung erfolgte die Kultivierung in Minimalmedium. Essenziell dafür waren wiederum PHB-freie Zellen, was durch eine Kultivierung von zwei Vorkulturen in NB-Medium erreicht wurde. Für die Hauptkultur wurden 10 % (v/v) der zweiten Vorkultur in Mineralmedium mit einem Überschuss einer C-Quelle (2 % (w/v) Natriumglukonat) und einem Mangel an Stickstoff (0,5 g/l NH₄Cl) bei 30°C kultiviert.

Kultivierung von Pseudomonas putida GPo1

P. putida Zellen wurden in Mineralmedium (optional mit dem entsprechenden Antibiotikum) bei 30°C und 150 *rpm* kultiviert. Die Zugabe von 0,3 % (w/v) Natriumoktanoat induzierte die Bildung von PHA. Die Kultivierung erfolgte in Erlenmeyerkolben.

Kultivierung von Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1

Für die Kultivierung von *M. gryphiswaldense* wurde modifiziertes *Flask Standard* Medium (FSM) von Dr. Daniel Pfeiffer (Heyen und Schüler, 2003) genutzt, welches gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde. Die Zellen wurden bei 30°C in 15 ml Falcon Tubes mit geschlossenem Deckel und einem Kulturvolumen von 10 ml unter mikroaeroben Bedingungen bei 120 *rpm* kultiviert.

2.5.3 Wachstumskurven

Wachstumskurven bakterieller Kulturen wurden erstellt, indem die optische Dichte der Zellen während der exponentiellen und stationären Wachstumsphase bei 600 nm am Spektrophotometer (Cary 100 Bio UV-Visible Spektrophotomerer von Varian (Mulgrave Victoria 3170, Australien)) gemessen wurde. Dafür wurden zwei Vorkulturen für jeweils 24 Stunden angezogen und die Hauptkultur schließlich mit einer OD₆₀₀ von \approx 0,1 angeimpft. Die Messungen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden unverdünnt durchgeführt und über einem OD-Wert von 0,5 wurden die Proben mit dem entsprechenden Medium 1:10 verdünnt. Es wurden Triplikate für die Bestimmung der OD₆₀₀ genutzt. Als Referenzwert diente das verwendete Medium.

2.5.4 Herstellung chemisch kompetenter E. coli Zellen

TSS-Medium:	1 x LB-Medium
	10 % (w/v) Polyethylenglycol 8000
	5 % (v/v) DMSO
	30 mM MgCl ₂ · 6 H ₂ O

Die Herstellung der kompetenten *E. coli* Zellen erfolgte nach der Schnellmethode nach Chung *et al.*, 1989. Dafür wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie von *E. coli* angeimpft, über Nacht bei 37°C und 150 *rpm* geschüttelt und am nächsten Morgen in 100 ml LB-Medium überführt. Nach ca. 2 h, bei einer OD_{600} von 0,3 – 0,4, wurden die Zellen für einige Minuten auf Eis gekühlt und anschließend für 10 Minuten bei 5000 *rpm* und 4°C zentrifugiert (Sigma Laboratory Centrifuges 4K15, Swing-out Rotor 11150). Das Pellet wurde in 5 ml kaltem TSS-Medium resuspendiert, aliquotiert (jeweils 200 µl) und für die weitere Verwendung auf Eis aufbewahrt.

2.5.5 Transformation von E. coli nach Chung et al., 1989

Für die Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden 200 µl kompetente Zellen mit 1 µl Plasmid-DNA bzw. 10 µl des Ligationsansatzes für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock der Zellen bei 42°C für 90 Sekunden und einer anschließenden 2-minütigen Inkubation auf Eis wurden 600 µl TSS-Medium zu dem Transformationsansatz gegeben und schließlich für 60 bis 90 Minuten bei 37°C und 150 *rpm* geschüttelt. Abschließend wurden die Zellen auf die entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.5.6 Konjugation

Klassische Konjugation

Für die Konjugation von Donor (E. coli S17-1 mit dem entsprechenden Plasmid) und Rezipient (R. eutropha H16) wurden jeweils Übernachkulturen in 20 ml NB- bzw. LB-Medium (gegebenenfalls mit Antibiotikum) bei 30°C bzw. 37°C angezogen. Am nächsten Morgen wurde für beide Stämme jeweils eine 10 ml Hauptkultur mit 1 ml der Übernachtkultur angeimpft und bei 30°C und 150 rpm geschüttelt. Nach etwa 8 Stunden wurden die Kulturen geerntet (4500 rpm, 15 min, Sigma Laboratory Centrifuges 4K15, Swing-out Rotor 11150) und die Pellets in jeweils 1 ml NB-Medium resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 0,5 ml der Zellsuspensionen gemischt (Verhältnis Rezipient zu Donor 1:1) und davon wiederum 0,5 ml auf eine dicke NB-Platte aufgetropft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Als Kontrollen dienten 0,5 ml der Reinkulturen, die ebenfalls jeweils auf eine NB-Platte getropft wurden. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 1,5 ml 0,9 %-iger (w/v) Saline abgeschwemmt, 1:10 Verdünnungen mit Saline hergestellt und schließlich 100 µl jener Verdünnungen auf MM-Agarplatten mit 0,2 % (w/v) Fruktose und Antibiotikum (350 µg/ml Kanamycin oder 15 µg/ml Tetracyclin) ausplattiert und für drei Tage bei 30°C inkubiert. Einzelkolonien konnten anschließend auf einer frischen MM-Fruktose-Agarplatte mit Antibiotikum gereinigt werden.

Schnelle Konjugation

Eine weitere Möglichkeit der Konjugation bestand darin, sowohl eine Kolonie des Donors (*E. coli* S17-1 mit dem entsprechenden Plasmid) als auch eine des Rezipienten (*R. eutropha* H16) direkt auf eine MM-Agarplatte mit 0,2 % (w/v) Fruktose und 350 µg/ml Kanamycin auszustreichen. Dafür wurde zuerst die Kolonie des Donors mit einer Impföse schlangenlinienförmig ausgestrichen und schließlich eine Kolonie des Rezipienten im rechten Winkel dazu ebenfalls in Schlangenlinien aufgetragen. Dabei war es wichtig, dass der Impfstrich des Rezipienten durch alle Donorstriche gezogen wurde. Die Agarplatte wurde anschließend für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Die erhaltenen Einzelkolonien an den Schnittstellen zwischen Donor-und Rezipienten-Impfstrich wurden auf einer frischen MM-Fruktose-Agarplatte mit 350 µg/ml Kanamycin aufgereinigt.
2.5.7 Herstellung von Deletions- und Integrationsmutanten

Genomische Deletionen bzw. Integrationen wurden nach der Methode nach Lenz und Friedrich, 1998 hergestellt.

Das Prinzip beruht auf einer genomischen Integration des klonierten Plasmids und der anschließenden homologen Rekombination, initiiert durch das auf dem Suizidvektor pLO3 vorhandene Gen *sacB*, welches die Levansaccharase kodiert. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von Saccharose und die Synthese des Polysaccharids Levan, welches hauptsächlich für Gram-negative Bakterien toxisch ist, da die Enzymaktivität bevorzugt innerhalb des Periplasmas Gram-negativer Bakterien auftritt (Ried und Collmer, 1987). Die Selektion wird durch Zugabe von Saccharose erlangt.

Im ersten Schritt wurde die Ziel-Gensequenz in den Suizidvektor pLO3 kloniert. Diese Gensequenz bestand aus zwei flankierenden homologen Bereichen (500 bp) des Gens, welches integriert oder deletiert werden sollte. Dafür wurden die homologen Bereiche jeweils mittels PCR amplifiziert und in einer anschließenden Überlagerungs-PCR ein Fragment generiert, in welchem die Zielsequenz deletiert oder integriert vorlag. Das klonierte pLO3-Plasmid wurde in *E. coli* S17-1 transformiert und dann in *R. eutropha* H16 konjugiert (siehe 2.5.6). Als Selektionsplatten dienten MM-Fruktose-Agarplatten mit 15 μ g/ml Tetracyclin. Nach erfolgreicher Überprüfung positiver Klone mittels PCR wurden diese auf frischen MM-Fruktose-Agarplatten mit 15 μ g/ml Tetracyclin mittels Drei-Strichausstrich aufgereinigt.

Für das Doppel-Crossover wurde von einem aufgereinigten konjugierten Klon eine Übernachtkultur in 10 ml NB-Medium bei 30°C angezogen. Am nächsten Tag wurden von dieser Kultur verschiedene Verdünnungen (1:10, 1:100; 1:1000 und 1:10000) mit 0,9 %-iger (w/v) Saline hergestellt und schließlich 100 µl jeder Verdünnung auf NB-Agarplatten mit 10 % (w/v) Saccharose ausplattiert und für 2 Tage bei 30°C inkubiert. Positive Klone wurden mittels Kolonie-PCR verifiziert (siehe 2.6.1) und auf frischen NB-Saccharose-Agarplatten mittels Drei-Strichausstrich aufgereinigt. Abschließend wurden Einzelkolonien der positiven Klone auf NB-Agarplatten überführt.

23

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Saiki et al., 1988

Eine gängige Methode zur *in vitro* DNA-Amplifikation stellt die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dar. Die dafür verwendeten DNA-Polymerasen waren die Taq-Polymerase (Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm, Deutschland) sowie die PrimeSTAR® HS DNA-Polymerase (TaKaRa BIO INC., Kusatsu, Japan). Bei letzterer handelt es sich um eine hoch prozessive *hot start* DNA-Polymerase mit einer 3' \rightarrow 5'-Exonuklease-*proofreading*-Aktivität. In den nachfolgenden Tabellen sind die verwendeten Reaktionsansätze bzw. PCR-Programme aufgelistet.

Tabelle 2-5: Verwendete PCR-Reaktionsansätze (50 µl Reaktionsvolumen)

Taq-Polymerase	PrimeSTAR® HS DNA-Polymerase
< 10 ng Plasmid-DNA	< 1 ng Plasmid-DNA
< 500 ng genomische DNA	< 100 ng genomische DNA
5 – 25 pmol Primer I	10 – 15 pmol Primer I
5 – 25 pmol Primer II	10 – 15 pmol Primer II
2,5 μl DMSO	2,5 μl DMSO
5 μl Puffer (10x)	10 μl PrimeSTAR Puffer (5x)
1 μl dNTP (10 mM je NTP)	4 μl dNTP Mix (2,5 mM je NTP)
0,25 – 0,3 μl Taq-Polymerase	0,5 µl PrimeSTAR® HS DNA Polymerase
ad 50 µl H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl H ₂ O _{bidest}

Die Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg bezogen. Nach Pipettieren des Reaktionsansatzes wurden die Proben in den PCR-Cycler (Biometra® TGradient von analytikjena, Jena, Deutschland) gestellt und das entsprechende Programm gestartet.

Tabelle 2-6: Verwendete PCR-Programme

Taq-Po	olymerase	F	rimeSTAR® HS	DNA-Polym	erase	
3-step		3-step		2-step		
94°C	3 min	98°C	2 min	98°C	2 min	
94°C	30 sec	98°C	10 sec	98°C	10 sec	
50-68°C*	30 sec	55°C	5 oder 15 sec			30x
72°C	1 min/ kb	72°C	1 min/ kb	68°C	1 min/ kb	
72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	
4°C	∞	4°C	∞	4°C	∞	

* entspricht der anhand des GC-Gehaltes kalkulierten Annealing-Temperatur

Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob Klone nach einer Transformation eines Ligationsansatzes bzw. Plasmids positiv sind, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dafür wurden Kolonien gepickt, in 20 μ l H₂O_{bidest} resuspendiert, für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht und anschließend für 2 Minuten bei *full speed* zentrifugiert (Zentrifuge 5430, Rotor FA-45-30-11, eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Abschließend wurden 0,5 μ l des Überstandes zum PCR-Reaktionsansatz gegeben und die PCR wie oben beschrieben gestartet.

2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

50 x TAE-Puffer:	242 g Tris 57,1 ml reine Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA-Na ₂ pH 8,0 ad 1000 ml H ₂ O _{bidest} pH 8,3
10 x DNA-Ladepuffer.	0,25 % (w/v) Xylencyanol 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 50 % (v/v) Glycerin 0,25 mM EDTA-Na ₂ pH 8,0

Im Anschluss an die PCR erfolgte eine Auftrennung der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurden 1 %-ige (w/v) Agarosegele in 1 x TAE-Puffer in horizontale Gelkammern gegossen, ein Kamm für die Geltaschen eingesetzt und nach Aushärtung mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 1 x DNA-Ladepuffer versetzt und anschließend in die Geltaschen aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde für ca. eine Stunde bei 100 V durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine 10-minütige Färbung der Agarosegele in einem Ethidiumbromidbad (10 μ g/ml). Die angefärbten DNA-Banden konnten schließlich mittels eines UV-Transilluminators (IDA (Image Documentation and Analysis), Raytest, USA) detektiert werden.

2.6.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Für eine Extraktion der amplifizierten DNA aus Agarosegelen wurden die DNA-Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend mit dem Kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) aufgereinigt. Alle Schritte erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Nach der Elution mit Elutionspuffer oder H₂O_{bidest} wurde die Konzentration der aufgereinigten DNA mit Hilfe des Spektrophotometers NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) bestimmt.

2.6.4 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die molekulare Klonierung wurden sowohl die aufgereinigten, amplifizierten PCR-Produkte als auch die Plasmide mit Restriktionsenzymen behandelt. Diese schneiden doppelsträngige DNA an bestimmten Erkennungssequenzen, sodass entweder 3'-Überhänge stumpfe Enden oder 5'bzw. erzeugt werden. Alle Restriktionsendonukleasen wurden von New England BioLabs (NEB, Ipswich, USA) bezogen und die Reaktionspuffer entsprechend des Herstellers verwendet. Für die Restriktion wurden maximal 1 µg Plasmid-DNA bzw. DNA-Fragmente mit dem entsprechenden Puffer und Enzym (1 Unit) versetzt (20 µl Ansatz) und anschließend für 1 bis 2 Stunden bei der vom Hersteller empfohlenen Reaktionstemperatur inkubiert. Die mit Restriktionsendonukleasen behandelten DNA-Fragmente wurden im Anschluss direkt mit dem Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) gereinigt. Die Aufreinigung der linearisierten Plasmide wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese und nachfolgender DNA-Extraktion aus Agarosegelen durchgeführt.

2.6.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch die DNA-Spaltung von Insert und Vektor mit Restriktionsenzymen entstehen Fragmente, die 3'-Hydroxylgruppen und 5'-Phosphatgruppen an ihren Termini enthalten. Die Ligation mit der T4 DNA-Ligase erzeugt schließlich eine kovalente Phosphodiester-Bindung von 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Termini einer doppelsträngigen DNA. Die Konzentration sowie die Länge der DNA-Fragmente spielen dabei eine entscheidende Rolle. Basierend auf der Konzentrationsberechnung mit dem NEBioCalculator[™] wurde die Ligation mit einem molaren Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 mit der T4 DNA-Ligase (New England Biolabs, Ipswich, USA) bei 16°C über Nacht durchgeführt. Folgender Reaktionsansatz wurde standardmäßig verwendet:

Reaktionsansatz:	10 x T4 DNA-Ligase-Puffer	1 µl
	Vektor DNA (4 kb)	30 ng
	Insert DNA (1 kb)	22,5 ng
	T4 DNA-Ligase	1 μl ¯
	H ₂ O _{bidest}	ad 10 µ

Im Anschluss an die Ligation wurde der Reaktionsansatz in kompetente *E. coli* JM109 Zellen transformiert.

2.6.6 Gerichtete Mutagenese

Um gerichtete Punktmutationen auf einem Plasmid nach Papworth *et al.*, 1996 einzuführen, wurde eine PCR mit Oligonukleotiden, die die Mutation enthielten und komplementär zum gewünschten DNA-Strang waren, durchgeführt. Es erfolgte die Amplifikation des gesamten Plasmides mittels PrimeSTAR® HS DNA Polymerase wie unter 2.6.1. beschrieben. Im Anschluss an die PCR wurde die neu amplifizierte Plasmid-DNA mit der gewünschten Mutation mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* für 1 h bei 37°C inkubiert. Dieses Enzym ist selektiv für methylierte DNA, sodass eine Trennung von methylierter Template-DNA und neuer *in vitro* synthetisierter DNA gewährleistet wurde. Letztere konnte anschließend in *E. coli* XL1-Blue transformiert, isoliert und mittels Sequenzierung überprüft werden.

2.6.7 Plasmidisolation aus *E. coli*

Für die Plasmidisolation wurde eine Kolonie in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag erfolgte die Plasmidisolation mit dem innuPREP Plasmid Mini Kit von analytikjena (Jena, Deutschland). Alle Schritte wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Isolation wurde für die Sequenzierung die DNA-Konzentration bestimmt.

2.6.8 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen nach Sanger *et al.*, 1977 wurden von der Firma LGC Genomics, Berlin mit dem Service *Ready2 run* durchgeführt. Dafür wurden jeweils 10 μ l Plasmid-DNA (100 ng/ μ l) mit 2 μ l *forward*-Primer (10 pmol/ μ l) oder 2 μ l *reverse*-Primer (10 pmol/ μ l) in jeweils einem Ansatz von 12 μ l versetzt. Die Analyse erfolgte auf dem ABI 3730xl DNA Analyzer von Applied Biosystem (Foster City, USA).

2.6.9 Elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay (EMSA)

Um die DNA-Bindung von aufgereinigtem His₆-getaggten PhaM und verschiedenen PhaM-Muteinen zu untersuchen, wurde ein elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay (EMSA) durchgeführt. Die dafür benötige *eyfp*-DNA (824 bp) wurde mittels PCR amplifiziert. Als Template diente das Plasmid pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-c1 und es wurden die Primer eyfp-c1-f sowie eyfp-c1-r verwendet. Die PCR erfolgte nach dem 2-Step-Protokoll (siehe 2.6.1) mit einer Elongationszeit von einer Minute. Im Anschluss wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, die erhaltenen Banden ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel extrahiert. Für die Biotin-Markierung der aufgereinigten *eyfp*-DNA wurde das Thermo Scientific Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit (#K0651, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Anschließend wurden 0,62 nM der Biotin-11-dUTP-markierten *eyfp*-DNA mit jeweils 5,4 μ M aufgereinigtem His₆-getaggten PhaM bzw. PhaM-Muteinen in 10 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle diente Biotin-11-dUTP-markierte *eyfp*-DNA ohne Protein. Nach erfolgter Inkubation wurden die Proben auf ein 6 %-iges natives Polyacrylamidgel geladen und die Elektrophorese mit gekühltem 1x TAE-Puffer für 2 Stunden bei 20 mA durchgeführt.

In nachfolgender Tabelle ist die Zusammensetzung des nativen 6 %-igen Polyacrylamidgels aufgelistet.

Lösung/Puffer	Trenngel 6 %	Sammelgel 4 %
H ₂ O _{bidest}	5,2 ml	2,975 ml
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	2 ml	670 μl
Trenngelpuffer	2,6 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1,25 ml
APS-Lösung	100 μl	50 μl
TEMED	10 µl	5 µl

Tabelle 2-7: Zusammensetzung des nativen Polyacrylamidgels (2 Gele, 1mm)

Die Pufferzusammensetzungen sind unter 2.8.3 zu finden.

Nach der PAGE wurde die DNA auf eine positiv-geladene Nylonmembran (Amersham HybondTM-N⁺, GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) übertragen. Für den Southern Blot wurde eine *Wet Blotting*-Apparatur genutzt, mit gekühltem 1x TAE-Puffer gefüllt und für eine Stunde bei 80 V laufen gelassen.

Nachfolgend ist der Aufbau der Blotting-Kassette dargestellt.

+	
	weißer Deckel
	Kunstfasertuch
	2 x Whatman-Papier (feucht)
	positiv-geladene Nylonmembran
	natives Polyacrylamidgel
	2 x Whatman-Papier (feucht)
	Kunstfasertuch
	Schwarzer Deckel

Nach einem anschließenden 10-minütigen UV-*Crosslinking* mit Hilfe des UV-Transilluminators (IDA Raytest, USA) wurde der Blot mit dem Thermo Scientific Biotin Chromogenic Detection Kit (#K0661, Darmstadt, Deutschland) entwickelt.

Alternativ zur Biotin-basierten Detektion der DNA wurde das Experiment auch auf einem Agarosegel mit anschließender Ethidiumbromidfärbung durchgeführt. Dafür wurden 200 ng chromosomale *R. eutropha* H16 DNA mit jeweils 5,4 µM der aufgereinigten PhaM-Proteine in 10 mM Tris-HCI (pH 8), 150 mM NaCI für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend mit 10-fach DNA-Ladepuffer (siehe 2.6.2) versetzt und auf ein 0,7 %-iges (w/v) Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde in kaltem 1 x TAE-Puffer für 1 Stunde bei

100 V durchgeführt und anschließend für 15 Minuten mit Ethidiumbromid (10 µg/ml) gefärbt. Die angefärbten DNA-Banden konnten schließlich mittels des UV-Transilluminators (IDA (Image Documentation and Analysis), Raytest, USA) detektiert werden.

2.6.10 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Um spezifische DNA-Bindungsstellen von PhaM zu identifizieren, wurde eine Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf einer Chromatinisolierung und –fragmentierung und anschließender Immunpräzipitation des an die DNA-gebundenen Proteins. Die immunpräzipitierten DNA-Fragmente werden danach aufgereinigt, angereichert und abschließend sequenziert, um die genauen Sequenzbereiche zu identifizieren. Das Experiment wurde in Kooperation mit der AG Bramkamp am Institut für Mikrobiologie an der LMU München durchgeführt.

Puffer F:	50 mM Tris, pH 7,4 100 mM NaCl 0,5 mM EGTA-Na ₂ 1 mM EDTA-Na ₂ 10 % (v/v) Formaldehyd 36,5 % ad 20 ml H ₂ O _{bidest}
Puffer TSEMS:	50 mM Tris, pH 7,4 50 mM NaCl 10 mM EDTA-Na ₂ 0,5 M Saccharose 1 x PIC (Sigma 100 x PIC) ad 20 ml H ₂ O _{bidest}
Puffer L:	50 mM HEPES-KOH, pH 7,55 140 mM NaCl 1 mM EDTA-Na ₂ 1 % (v/v) Triton X-100 0,1 % (w/v) Deoxycholat 0,1 mg/ml RNaseA 1 x PIC (Sigma 100 x) ad 20 ml H ₂ O _{bidest}
Puffer L5:	50 mM HEPES-KOH, pH 7,55 500 mM NaCl 1 mM EDTA-Na ₂ 1 % (v/v) Triton X-100 0,1 % (w/v) Deoxycholat ad 10 ml H ₂ O _{bidest}

Puffer W:	10 mM Tris, pH 8,0 250 mM LiCl 0,5 % (v/v) NP-40 0,5 % (v/v) Deoxycholat 1 mM EDTA-Na ₂ ad 10 ml H ₂ O _{bidest}
Puffer TE:	10 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA-Na ₂ ad 10 mI H ₂ O _{bidest}
Puffer TES:	50 mM Tris, pH 8,0 10 mM EDTA-Na ₂ 1 % (w/v) SDS ad 10 mI H ₂ O _{bidest}

Im ersten Schritt wurden Sphäroplasten präpariert. Dafür wurde eine Übernachtkultur von *R. eutropha* H16 *phaM-eyfp* (genomische Integration) in 10 ml NB-Medium bei 30°C angezogen. Am nächsten Tag wurde eine 10 ml NB-Kultur mit der Übernachtkultur angeimpft ($OD_{600} = 0,1$) und für etwa 4 Stunden bis zu einer OD_{600} von 1 bei 30°C und 150 rpm kultiviert. Vier ODu (optical density units, entspricht OD * ml) wurden in einem Zentrifugationsschritt für 5 Minuten und 4000 g geerntet. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml NB-Medium resuspendiert und nach Zugabe von weiteren 19 ml NB-Medium und 2 ml Puffer F wurde die Zellsuspension für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter konstantem Mixen inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 Minuten und 4000 g wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und in 2 ml TSEMS-Puffer plus 6 mg/ml Lysozym resuspendiert und für 3 Stunden bei 37°C geschüttelt. Die Sphäroplasten-Bildung wurde mikroskopisch bestätigt. Im Anschluss an die Behandlung mit Lysozym wurden die Zellen geerntet (5 min, 4000 g) und einmal in 4 ml TSEMS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 300 µl TSEMS-Puffer resuspendiert, in drei Aliquots aufgeteilt, nochmals für 2 Minuten bei 20000 g zentrifugiert und die Pellets schließlich in flüssigem N₂ gefroren und bei – 80°C gelagert.

Für die Immunpräzipitation war es wichtig, Pipettenspitzen mit Filter und saubere Lösungen zu verwenden. Es wurden 50 μ l DynaBeads Protein G (#10004D, Invitrogen, Carlsbad, USA) gewaschen und in 50 μ l Puffer L aufgenommen. Die DynaBeads wurden dann mit 15 μ l des anti-GFP-Antikörpers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland; Endkonzentration 0,4 μ g/ μ l) für eine Stunde auf einem vertikalen Rotationsrad inkubiert, um eine Bindung des Antikörpers an

31

DynaBeads Protein G zu gewährleisten. Währenddessen wurden die gefrorenen Zellpellets in 2 ml Puffer L resuspendiert und die DNA mit Hilfe eines Sonikators fragmentiert (500 - 2000 bp). Dafür wurden folgende Einstellungen verwendet: Amplitude 50 %; Puls: 0,5 sec; Pause 0,5 sec. Es wurden 7 Durchläufe für jeweils 20 Sekunden durchgeführt. Die Zelltrümmer wurden pelletiert (10 min, 20.000 g) und 200 µl des Überstandes (Extrakts) wurden als Referenzprobe (Input) bei – 20°C eingefroren. Nach erfolgreicher Antikörperbindung an die DynaBeads Protein G wurden die Beads einmal mit 500 µl Puffer L gewaschen und danach mit 750 µl des Extrakt-Überstandes für 2 Stunden auf dem vertikalen Rotationsrad bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Beads jeweils mit 1 ml L-, L5-, W- und TE-Puffer gewaschen und dann in 520 µl TES-Puffer aufgenommen. Der aufgetauten Referenzprobe wurden 300 µl TES-Puffer und 20 µl 10 % (w/v) SDS hinzugefügt (Endvolumen 520 µl und SDS-Endkonzentration 1 %). Sowohl die Referenzprobe als auch die Probe mit den Beads wurden über Nacht bei 65°C geschüttelt, um ein Eluieren der DNA von den Beads zu ermöglichen. Weiterhin fand ein Lösen der durch Formaldehyd hervorgerufenen DNA-Vernetzung statt.

Für die anschließenden DNA-Reinigungsschritte wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 500 µl Phenol (pH 8,0, untere Phase) versetzt, kurz geschüttelt und für 10 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert. Anschließend wurden 400 µl der oberen Phase mit 1,2 µl GlycoBlue (Ambion[™], 15 mg/ml; Invitrogen, Carlsbad, USA), 40 µl 3 M NaOAC (pH 5,3) und 1 ml Ethanol versetzt. Die Ansätze wurden für 20 Minuten bei -20°C aufbewahrt und dann für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde im nächsten Schritt vorsichtig entfernt. Das DNA-Pellet war als leichter Schlier an der Eppendorf-Gefäßwand zu erkennen. Nach Zugabe von 500 µl 70 %-igem (v/v) Ethanol und kurzem Invertieren des Tubes fand eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 20.000 g statt. Der Überstand wurde wieder vorsichtig entfernt und das DNA-Pellet schließlich in 250 µl Binde-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) resuspendiert. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 55°C inkubiert, dann auf Raumtemperatur abgekühlt und mittels des Qiagen PCR Purification Kits aufgereinigt. Nach der Elution in 50 µl Elutionspuffer wurden die Proben schließlich sequenziert.

2.7 Bioanalytische Methoden

2.7.1 Fluoreszenzmikroskopie

Lokalisationsuntersuchungen von Fusionen mit Fluoreszenzproteinen wie eYFP, DsRed2_{EC}, sfGFP sowie mTurquoise2, oder auch DNA-Interaktionsexperimente sowie die Bildung und Mobilisierung von PHB-Granula wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Um eine Visualisierung der DNA zu ermöglichen, wurde der blau-fluoreszierende DNA-Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) verwendet (Kapuscinski, 1995). Die Anregungs- und Emissionsmaxima der DAPI-DNA-Komplexe liegen im blauen Bereich (Ex: 358 nm/ Em: 461 nm). Der lipophile Fluoreszenzfarbstoff Nilrot hingegen bewirkt eine Anfärbung von hydrophoben Strukturen wie PHB-Granula (Spiekermann *et al.*, 1999). Die Anregung von Nilrot erfolgt im roten Bereich bei etwa 560 nm und das Emissionsmaximum liegt bei über 590 nm. Nilrot ist solvatochromer Farbstoff und sowohl die Anregungs- als auch Emissionswellenlänge sind abhängig von der Polarität des Lösungsmittels. Ein detailliertes Protokoll zur mikroskopischen Visualisierung der PHB-Granula mittels Nilrot ist unter Juengert *et al.*, 2018 zu finden.

Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurden folgende Stammlösungen von DAPI und Nilrot verwendet:

Fluoreszenzfarbstoff	Stammlösung	Endkonzentration
Nilrot	10 μg/ml in DMSO	1 µg/ml
DAPI	0,1 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	20 µg/ml

Tabelle 2-8:	Verwendete	Fluoreszenzfarbstoffe

Für die DAPI-Färbung wurden 1 μ l einer Zellsuspension (OD₆₀₀ ca. 1) mit 3 μ l H₂O_{bidest.} sowie 1 μ l der DAPI-Lösung gemischt und kurz inkubiert. Währenddessen wurden 150 μ l Agarose (1 % (w/v) in H₂O_{bidest.}) auf einen Objektträger getropft, sofort mit einem Deckgläschen bedeckt, für wenige Minuten trocknen gelassen und schließlich wurde das Deckgläschen wieder entfernt. Anschließend wurde 1 μ l der gefärbten Zellsuspension auf dieses Agarosepad getropft, ebenfalls kurz getrocknet und mit dem Deckgläschen abgedeckt.

Die fertigen Präparate wurden mit dem Inversen Eclipse Ti-E Mikroskop (Nikon Instruments, Tokio, Japan) mit einem Plan Apo Objektiv 100x/1,4 Oil (Nikon Instruments, Tokio, Japan) mikroskopiert. Dafür wurden verschiedene Fluoreszenzfiltersätze von AHF Analysentechnik (Tübingen, Deutschland) genutzt, die in nachfolgender Tabelle aufgelistet sind.

Tabelle 2-9: Fluoreszenzfilter und deren Anregungs- und Emissionswellenlängen

Filter	Anregung/Bandbreite	Emission/Bandbreite	Imaging von
DAPI HC Filterset	387/11 nm	447/60 nm	DNA
YFP HC Filterset	500/24 nm	542/27 nm	eYFP
Nilrot Filterset	562/40 nm	594 nm Langpass	Nilrot
TRITC HC Filterset	543/22 nm	593/40 nm	DsRed2 _{EC}

Weiterhin wurden Hellfeld sowie ein Prisma für differentiellen Interferenzkontrast (DIC, Nikon Instruments, Tokio, Japan) verwendet. Die Belichtungszeiten für die Bilder variierten dabei je nach Experiment. Für Zellen mit Überexpressionsplasmiden reichten aufgrund der hohen Kopienzahl des Fusionsproteins 100 ms, wohingegen Zellen mit einer chromosomalen Integration mit etwa 500 ms belichtet wurden. Die Bilder wurden mit der Digitalkamera Orca-Flash4.0 LT sCMOS (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) aufgenommen, mit der Nikon Imaging Software analysiert und mit Hilfe von ImageJ Fiji 1.43 m oder Gimp 2.8.20 bearbeitet.

Um das Wachstum der Zellen und damit die Verteilung der PHB-Granula innerhalb der Zellen live beobachten zu können, wurden *Live Cell Imaging* Experimente mit speziellen Glasbodenschalen von WillCo Wells B.V. (Amsterdam, Niederlande) durchgeführt. Dafür wurden 200 µl NB-Agarose (1 % (w/v) in NB-Medium) mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat in die Vertiefung der WillCo-dish® pipettiert und kurz angetrocknet. Anschließend wurde das NB-Agarose-Pad vorsichtig mit einer Pinzette gewendet und auf die Unterseite wurde 1 µl einer Zellsuspension in frischem NB-Medium pipettiert und getrocknet. Bei den Zellen handelte es sich stets um PHB-freie Zellen, um auch die frühe Bildung der PHB-Granula verfolgen zu können. Sobald der Zelltropfen sichtbar getrocknet war, wurde das NB-Agarose-Pad in die Ausgangsposition in die Vertiefung gebracht und mit weiteren 1000 µl NB-Agarose (1 % (w/v) in NB-Medium) mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat überschichtet, kurz getrocknet und dann in einer Inkubationskammer bei 30°C mikroskopiert. Um ein

schnelles Ausbleichen sowie eine Schädigung der Zellen zu verhindern, wurden die Belichtungsintervalle und – zeiten je nach Fokus der Experimente ausgewählt.

2.7.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementierung (BiFC)

Um die *in vivo* Interaktionen von PhaM^{WT} mit inaktiver PhaC1^{C319A} zu untersuchen, wurden bimolekulare Fluoreszenzkomplementierungsexperimente (BiFC) durchgeführt. Das Prinzip basiert generell auf der Komplementierung von einem Fluoreszenzkomplex, wenn zwei Proteine, die mit nicht-fluoreszierenden Fragmenten eines Fluoreszenzproteins fusioniert sind, miteinander interagieren. In dieser Arbeit wurde das eYFP-Protein genutzt, für welches bereits der N-terminale Teil (YN) und C-terminale Part (YC) in BiFC-Experimenten beschrieben wurden. Die Untereinheiten YN und YC bewirken bei einer räumlichen Interaktion die Komplementierung der eYFP-Funktionalität, was sich in etwa 10 % der ursprünglichen Fluoreszenzintensität von eYFP widerspiegelt (Kerppola, 2008).

Um die Experimente in *R. eutropha* durchzuführen, wurden zwei kompatible *broad host range* Vektoren verwendet, die jeweils ein Fusionsprotein aus PhaM^{WT} oder PhaC^{C319A} mit einer Untereinheit von eYFP (YN oder YC) exprimierten. Dafür wurden die Plasmide pBBR1MCS2 und pCM62 mit einem induzierbaren Arabinose-Promotor (P_{BAD}) genutzt (Pfeiffer und Jendrossek, 2013). Die Kontrollstämme *R. eutropha* H16 pBBR1MCS2::*YN*-c1 pCM62::*YC*-c1 sowie pBBR1MCS2::*YN-phaM* pCM62::*YC*-c1 und pBBR1MCS2::*YN-phaM* pCM62::*YC-phaM* lagen bereits vor (Pfeiffer und Jendrossek, 2013). Für die Klonierung der Plasmide mit inaktiver PhaC1^{C319A} wurde den Plasmiden pBBR1MCS2::*YN-phaC1* sowie pCM62::*YC-phaC1* von Pfeiffer und Jendrossek, 2013 mit Hilfe einer gerichteten Mutagenese mit den Primern PhaC1^{C319A}-f und PhaC1^{C319A}-r die Mutation C319A eingeführt (siehe 2.6.6) und in *R. eutropha* H16 Δ*phaC1* konjugiert.

Für die mikroskopische Analyse wurden die Stämme in zwei NB-Vorkulturen bei 30°C angezogen, um die Zellen PHB-frei zu bekommen (siehe 2.5.2). Dem Medium wurde dabei sowohl Tetracyclin (15 μ g/ml) als auch Kanamycin (150 μ g/ml) zugesetzt. Die zweite Vorkultur wurde bereits mit 0,2 % (w/v) Arabinose versetzt. Für die Hauptkultur wurden 10 % (v/v) der zweiten Vorkultur in 10 ml NB-Medium überführt, welches die Antibiotika, 0,2 % (w/v) Arabinose und 0,2 % (w/v) Na-Glukonat enthielt, und bei 30°C kultiviert. Nach 4 Stunden wurden die Zellen

mikroskopiert (siehe 2.7.1). Dafür wurde eine Belichtungszeit der eYFP-Fluoreszenz von 4 Sekunden für alle Aufnahmen gewählt. Die Einstellung der Lookup-Tabellen erfolgte ebenfalls äquivalent für alle Bilder.

2.7.3 Gaschromatographie

Gaschromatographie ermöglicht eine Quantifizierung des PHB-Gehaltes. Da PHB bereits bei Temperaturen unterhalb des Siedespunktes instabil ist, muss eine Umwandlung in Produkte erfolgen, die bei den Temperaturen in der GC-Säule stabil und flüchtig sind. Dies wird durch die saure Methanolyse nach Brandl *et al,.* 1988 (modifiziert) ermöglicht, wodurch PHB in flüchtige Hydroxycarboxylsäuremethylester umgewandelt wird.

Die Durchführung erfolgte nach dem detaillierten Protokoll von Juengert et al., 2018.

2.7.4 HPLC

Für die Detektion der hydrolytischen NTPase-Aktivität von PhaM wurden HPLC-Messungen durchgeführt.

Puffer A:	0,1 M K ₂ HPO ₄ 0,1 M KH ₂ PO ₄ 4 mM TBAHS pH 6
Puffer B:	0,1 M K ₂ HPO ₄ 0,1 M KH ₂ PO ₄ 4 mM TBAHS 30 % (v/v) Methanol pH 7,2 vor Methanolzugabe einstellen
Spülmittel A:	100 % (v/v) Methanol
Spülmittel B:	95 % (v/v) Methanol 5 % (v/v) H ₂ O _{bidest}
10 x Proben-Puffer:	100 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 20 mM MgCl ₂ · 6 H ₂ O 0,5 % (v/v) Tween 80 pH 7,4

100 x Nukleotide:

30 mM in 100 mM Tris/HCl, pH 9,0

Die Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt. Für die Verwendung wurde mit 100 mM HCl ein pH-Wert von 7,0 eingestellt und anschließend ein 10-fach Arbeitsstock mit 20 mM Tris/HCl pH 7,4 hergestellt, der frisch verwendet wurde.

Folgender Reaktionsansatz wurde pipettiert:

15 μM PhaM 25 μl 10 x Nukleotide (GTP, GDP) 25 μl 10 x Proben-Puffer ad 250 μl H₂O_{bidest}

Vor Zugabe von PhaM wurde bereits die Probe des Zeitpunktes t = 0 (50 μ I) genommen und in flüssigem N₂ gefroren. Als Kontrollen diente ein Ansatz ohne GTP sowie Ansätze ohne PhaM, um die Autohydrolyse der Nukleotide festzustellen. Die Proben wurden anschließend bei 30°C und 150 *rpm* auf dem Mikrotiter-Plattenschüttler MS1 IKA® (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) inkubiert und nach 15, 30 und 60 Minuten erfolgte die Entnahme von jeweils 50 μ I Probe, die sofort in flüssigem N₂ gefroren wurde. Nach einem 2-minütigen Aufkochen und Abzentrifugieren des denaturierten Proteins (2 min, *full speed*, eppendorf Centrifuge 5430) wurden 40 μ I der Proben in die HPLC-Vials überführt. Gleichzeitig wurden Standardgeraden für GTP und GDP (300 μ M, 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M und 25 μ M) pipettiert.

Für die HPLC-Messungen wurde eine Lichrospher 100 RP (*reversed phase*) 18-Säule (250 x 4,0 mm) mit 5 µm Partikelgröße von Trentec Analysentechnik (Gerlingen, Deutschland) als stationäre Phase verwendet. Alle Puffer wurden vor Benutzung entgast. Zu Beginn der Messungen wurde folgendes Spülprogramm mit den Spülmitteln A und B mit einem Fluss von 1 ml/min durchgeführt:

Zeit (min)	% Spülmittel B	Zeit (min)	% Spülmittel B
0	50	80	40
5	60	85	20
10	70	90	0
20	80	120	0
25	90	125	10
30	100	130	20
60	100	140	30
65	80	145	40
75	60	150	50

Im Anschluss wurden die Proben mittels der HPLC von Agilent Technologies 1100 Series (Santa Clara, USA) gemessen. Dafür dienten die Puffer A und Puffer B als mobile Phase. Das genutze Programm mit einem Fluss von 2 ml/min ist in nachfolgender Tabelle dargestellt. Die Detektion der Peaks erfolgte bei 254 nm.

Zeit (min)	% Puffer B
0	0
2,5	0
5	30
10	60
13	0
17	0
18	100
20	0
25	0

Tabelle 2-11: Fließmittel-Gradient für das Programm der Probenmessung

2.7.5 Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC)

Zur Charakterisierung der biomolekularen Wechselwirkung von His₆-PhaM mit Nukleotiden wurden in Kooperation mit der AG Forchhammer der Universität Tübingen Messungen zur isothermischen Titrationskalorimetrie durchgeführt. Das Prinzip beruht auf einer Enthalpie-Änderung, wenn es zu einer Komplexbildung zwischen dem Protein und den Nukleotiden kommt, die es ermöglicht, die Bindungsaffinität K_D zu berechnen (Leavitt und Freire, 2001; Luque und Freire, 1998). Das Titrationskalorimeter besteht aus einer Referenzzelle, in der sich Puffer befindet, sowie der Probenzelle, die das Protein im gleichen Puffer enthält. Zwischen beiden Zellen besteht keine Temperaturdifferenz. Wird der Ligand des Proteins (Titrant) mit einer Spritze in die Probenzelle injiziert, kommt es bei einer Interaktion zu einer Temperaturänderung, auf die das Kalorimeter mit einer entsprechenden Anpassung der Heizleistung reagiert, um die Temperatur in der Probenzelle absolut konstant zu halten. Durch wiederholte Injektionen des Liganden sollte es bei einer Bindung zu einer geringeren Heizleistung mit zunehmender Zeit kommen, da es zu einer zunehmenden Sättigung des Komplexes aus Protein und Ligand kommt.

Folgende Ansätze wurden für die Messungen vorbereitet:

Referenzzelle: 2 mM MgCl₂ (100 mM Stammlösung in H₂O_{bidest}) ad 2 ml Puffer (10 mM Tris, 250 mM NaCl, pH 8)

Probenzelle:	2 mM MgCl ₂ (100 mM Stammlösung in H_2O_{bidest}) 50 μ M PhaM in 10 mM Tris, 250 mM NaCl, pH 8 ad 2 ml Puffer (10 mM Tris, 250 mM NaCl, pH 8)
Titrant:	2 mM MgCl ₂ (100 mM Stammlösung in H ₂ O _{bidest}) 2 mM Nukleotide (100 mM Stammlösung in H ₂ O _{bidest}) ad 2 ml Puffer (10 mM Tris, 250 mM NaCl, pH 8)

Alle Proben wurden vor Verwendung mit Hilfe der Vakuumpumpe ThermoVac (MicroCal-LLC, Northampton, USA) entgast und unter Vermeidung von Luftblasen in mit gespülte die mehrmals Puffer Probenund Referenzzelle des Titrationskalorimeters (VP-ITC MicroCalorimeter MicroCal-LLC, Northampton, USA) eingebracht. Der Titrant wurde automatisiert in die Injektionseinheit, die ebenfalls mehrfach mit Puffer gespült wurde, aufgenommen. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 20°C und unter ständigem Rühren der Proben durchgeführt. Zu Beginn des ITC-Experiments wurden 2 µl des Titranten mit einer Dauer von 4 Sekunden injiziert und für die nachfolgenden 29 Injektionen 10 µl des Titranten mit einer Dauer von 20 Sekunden und einem Abstand von 300 Sekunden. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der MicroCal Origin Version 7 Software.

2.7.6 CD-Spektroskopie

CD-Spektroskopie-Messungen wurden in Kooperation mit Dr. Sara Weirich von der AG Jeltsch durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Interaktion von PhaM mit GTP einen sichtbaren Effekt auf die Konformation ausübt. Die Messungen wurden mit dem J-815 CD-Spektrophotometer von Jasco (Umstadt, Deutschland) in 0,2 mm (40 µl Volumen) Küvetten durchgeführt. Dafür wurde folgender Reaktionsansatz für eine Stunde bei 30°C vorinkubiert:

300 μ M PhaM^{WT} in 10 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 8 6 mM GTP in 100 mM Tris-HCl, pH 9

Die CD-Spektren wurden in einem Bereich von 190 nm bis 240 nm mit einer Standardsensitivität und Bandbreite von 1 nm aufgenommen. Das Spektrum ohne Protein (nur Puffer) wurde von den erhaltenen Spektren abgezogen. Es wurden 60 Scans durchgeführt und gemittelt.

2.8 Biochemische Methoden

2.8.1 Isolierung von nPHB-Granula aus *R. eutropha* H16 nach Wieczorek *et al.*, 1996 (modifiziert)

Aufschluss- und Waschpuffer:	10 mM Tris-HCl pH 8,0
1. Glycerindichtegradient:	1. 5 ml 87 %-iges (v/v) Glycerin 2. 10 ml 50 %-iges (v/v) Glycerin
2. Glycerindichtegradient:	 5 ml 87 %-iges (v/v) Glycerin 5 ml 80 %-iges (v/v) Glycerin 5 ml 60 %-iges (v/v) Glycerin 5 ml 40 %-iges (v/v) Glycerin

Um native PHB-Granula aus R. eutropha H16 zu isolieren, wurden Zellen mit einem hohen PHB-Gehalt (> 70 %) benötigt. Dafür wurden zuerst zwei Vorkulturen in NB-Medium bei 30°C und 150 rpm angezogen, um die Zellen PHB-frei zu bekommen. Die erste Vorkultur (2 x 20 ml) wurde nach 24 Stunden in die zweite Vorkultur (2 x 20 ml in 2 x 150 ml) überführt und für weitere 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurden sechs 3 I-Kolben mit je 360 ml Schlegel-Medium und 2 % (w/v) Na-Glukonat mit jeweils 40 ml der zweiten Vorkultur angeimpft und nach ca. 40 Stunden bei 30°C und 150 rpm geernet. Die Zellernte erfolgte bei 5000 rpm (Beckman Coulter Avanti JXN-26, Rotor JLA-8.1, Brea, USA) und 4°C für 20 Minuten. Die Zellen wurden in 20 ml Aufschlusspuffer mit 100 µl DNasel (1 mg/ml) und 100 µl RNaseA (1 mg/ml) resuspendiert und durch dreimalige Passage in der French Press (Aminco, Silver Spring, Maryland, USA) bei einem Druck von 1000 Psi aufgeschlossen. Die Isolierung der PHB-Granula mit Hilfe der erfolgte Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation. Dafür wurde die aufgeschlossene Zellsuspension vorsichtig ersten Glycerin-Dichtegradienten auf den gegeben und eine Ultrazentrifugation für 40 min bei 4°C und 20.000 rpm (Beckman Coulter Optima[™] LE-80K-Ultrazentrifuge, Rotor SW 32 Ti, Brea, USA) durchgeführt. Dabei war es wichtig, dass sowohl für das Beschleunigen als auch das Abbremsen der Zentrifugation der Modus "slow" eingestellt wurde. Anschließend wurde die weiße PHB-Bande zwischen dem 87 %-igen (v/v) und 50 %-igen (v/v) Glycerin vorsichtig mit einer Pipette mit abgeschnittener Spitze abgenommen, in ein Volumen Waschpuffer aufgenommen und vorsichtig auf den zweiten Glycerindichtegradienten

40

gegeben. Nach wiederholter Ultrazentrifugation wurde die weiße PHB-Bande wiederum mit einer Pipette mit geweiteter Spitze abgenommen, in ein 15 ml Falcon überführt und mehrmals mit Waschpuffer gewaschen. Abschließend wurde getestet, ob es sich um native PHB-Granula handelt. Dafür wurden 100 μ l der aufgereinigten PHB-Granulasuspension mit 900 μ l Waschpuffer versetzt und durch Zugabe von 1 μ l aufgereinigter PhaZ7 konnte die Abnahme der OD₆₅₀ (PHB-Hydrolyse) im Photometer beobachtet werden (Handrick *et al.*, 2001; Jendrossek *et al.*, 2013).

2.8.2 Proteinaufreinigung mittels Nickel-NTA

Puffer A (ohne Imidazol):	300 mM NaCl 50 mM NaH₂PO₄ 5 % (v/v) Glycerin (von 98 % (v/v)) pH 8,0 mit NaOH
Puffer A mit 10 x Hecameg:	Puffer A 0,5 % (w/v) Hecameg
Puffer I (mit Imidazol):	300 mM NaCl 50 mM NaH ₂ PO ₄ 500 mM Imidazol 5 % (v/v) Glycerin (von 98 % (v/v)) pH 8,0 mit HCl

Für die Proteinaufreinigung (z.B. His_6 -PhaM, His_6 -PhaC1 oder His_6 -A0225) wurde *E. coli* BL21 (DE3) pLysS verwendet, in den die entsprechenden pET28a-Expressionsplasmide transformiert und auf LB-Agarplatten mit Kan₅₀ und Cm₃₄ ausplattiert wurden.

Die Aufreinigungsschritte von His₆-PhaM, His₆-PhaC1 und His₆-A0225 erfolgten äquivalent. Für die Anzucht des *E. coli* BL21 (DE3) pLysS wurden zwei Vorkulturen á 60 ml LB-Medium mit Kan₅₀ und Cm₃₄ mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 150 *rpm* geschüttelt. Am nächsten Tag wurden jeweils 20 ml der Vorkultur in sechs 3 I-Kolben mit 400 ml LB-Medium mit Kan₅₀ und Cm₃₄ überführt und bei 30°C und 150 *rpm* wachsen gelassen. Bei einer OD₆₀₀ von ~ 0,6 (nach etwa 3 h) wurden 0,1 mM IPTG zur Hauptkultur gegeben und über Nacht bei 26°C und 150 *rpm* geschüttelt.

Alle weiteren Schritte wurden gekühlt oder auf Eis durchgeführt. Nach der Zellernte bei 8000 *rpm* und 4°C für 20 Minuten (Beckman Coulter Avanti JXN-26, Rotor JLA-8.1, Brea, USA) wurde das Pellet in 30 ml (je 10 g Feuchtgewicht) Puffer A mit 0,05

% (w/v) Hecameg und 20 mM Imidazol sowie 50 µl *DNasel* (1 mg/ml) resuspendiert und durch dreimalige Passage in der *French Press* (Aminco, Silver Spring, Maryland, USA) bei einem Druck von 1000 Psi aufgeschlossen. Um die Zelltrümmer von löslichen Zellbestandteilen abzutrennen, erfolgte eine Ultrazentrifugation (Beckman Coulter Optima[™] LE-80K-Ultrazentrifuge, Rotor Typ 70.1 Ti, Brea, USA) für 90 Minuten bei 35.000 *rpm* und 4°C.

Währenddessen wurde die Ni-NTA-Agarose-Säule vorbereitet. Dafür wurde die Protino® Ni-NTA-Agarose (4 ml Bettvolumen) von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) mit 10 ml Puffer A mit 0,05 % (w/v) Hecameg und 20 mM Imidazol äquilibriert. Nach der Ultrazentrifugation wurde der Rohextrakt auf die Säule aufgetragen. Im Anschluss erfolgten zwei Waschschritte mit niedrig-konzentriertem Imidazol-Puffer. Für die Elution wurden steigende Imidazolkonzentrationen im Puffer verwendet. In nachfolgender Tabelle sind die benötigten Puffer und deren Zusammensetzung aufgelistet.

Fraktion	lmidazol- konzen- tration	Puffer A	Puffer A mit 10 x Hecameg	Puffer I	Benötigtes Volumen
Waschfraktion 1	20 mM	ad 40 ml	4 ml	1,6 ml	40 ml
Waschfraktion 2	50 mM	ad 20 ml	2 ml	2 ml	20 ml
Elutionsfraktion 1	100 mM	1,4 ml	0,2 ml	0,4 ml	2 ml
Elutionsfraktion 2	200 mM	1,0 ml	0,2 ml	0,8 ml	2 ml
Elutionsfraktion 3	250 mM	1,6 ml	0,4 ml	2,0 ml	4 ml
Elutionsfraktion 4	400 mM	0,8 ml	0,8 ml	6,4 ml	8 ml

Tabelle 2-12: Benötigte Puffer und deren Zusammensetzung

Von den Wasch- und Elutionsfraktionen sowie vom Rohextrakt wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen wurden daraufhin gepoolt und mittels FPLC umgepuffert.

2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli, 1970 unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Für die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Molekulargewichte wurden diskontinuierliche SDS-Gele bestehend aus Sammel- und Trenngel verwendet. Folgende Lösungen und Puffer wurden für die Herstellung der Gele verwendet:

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung: gebrauchsfertig von Carl Roth, Karlsruhe (37,5:1)

SDS-Lösung:	10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Ammoniumpersulfat-Lösung:	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)
Trenngelpuffer:	1 M Tris/HCl pH 8,7
Sammelgelpuffer:	0,25 M Tris/HCI pH 6,8
3 x Laemmlipuffer:	15 ml SDS Lösung 15 ml Glycerin (87 % (v/v)) 1,5 ml 2-Mercaptoethanol 75 mg Bromphenolblau ad 50 ml H ₂ O _{bidest}
SDS-Elektrophoresepuffer:	2,1 g Tris 7,5 g Glycin 1,0 g SDS ad 1000 ml H ₂ O _{bidest}

Die Zusammensetzung der Trenn- sowie Sammelgele ist in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

Lösung/Puffer	Trenngel 8 %	Trenngel 12 %	Sammelgel 4 %
H ₂ O _{bidest}	4,6 ml	3,2 ml	2,975 ml
Acrylamid-Bisacrylamid- Lösung	2,6 ml	4 ml	670 μl
Trenngelpuffer	2,6 ml	2,6 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	1,25 ml
SDS-Lösung	100 μl	100 μl	50 μl
APS-Lösung	100 µl	100 μl	50 μl
TEMED	10 µl	10 µl	5 µl

Tabelle 2-13: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele (2 Gele, 1mm)

Es wurden zunächst alle Bestandteile des Trenngels zusammengegeben und anschließend in die Gelkassette zwischen zwei Glasplatten gegossen. Die Trenngellösung wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine flache Grenzfläche während der Polymerisation zu erhalten. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, die Sammelgellösung hinzugegeben und ein Kamm für die Ausformung der Probentaschen eingesetzt.

Die polymerisierten SDS-Gele wurden in die Gelelektrophorese-Apparatur eingesetzt und mit SDS-Elektrophoresepuffer überschichtet. Bevor die Proben aufgetragen wurden, wurden diese mit 3 x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht.

Die Elektrophorese erfolgte bei 20 – 25 mA pro Gel. Als Molekulargewichtsstandard diente der "*Precision Plus Protein Standard*" von Bio-Rad (München, Deutschland).

2.8.4 Silberfärbung

Für die Proteinfärbung wurde die Silberfärbung nach Wray *et al.*, 1981 verwendet. Dafür wurde das SDS-Gel für 10 Minuten in Fixierlösung inkubiert, anschließend zweimal für 5 Minuten mit Wasser gewaschen, 1 Minute mit Natriumthiosulfatlösung behandelt und dreimal für 20 Sekunden mit Wasser gewaschen. Nach einer 10minütigen Inkubation mit Silbernitrat wurde erneut dreimal für 20 Sekunden gewaschen und im Anschluss mit der Entwicklerlösung entwickelt. Die Stopplösung diente zum Abstoppen der Reaktion.

Fixierlösung:	300 ml Methanol 182 ml Formaldehydlösung (37 % (v/v)) ad 500 ml H ₂ O _{bidest}
Na ₂ S ₂ O ₃ -Lösung 0,02 % (w/v):	0,05 g Na ₂ S ₂ O ₃ ad 250 ml H ₂ O _{bidest}
Silbernitratlösung 0,1 % (w/v):	0,25 g AgNO ₃ ad 250 ml H ₂ O _{bidest} Lagerung lichtgeschützt bei Raumtemperatur
Entwicklerlösung:	7,5 g Na_2CO_3 125 µl Formaldehydlösung (37 % (v/v)) 200 µl $Na_2S_2O_3$ -Lösung (0,02 % (w/v)) ad 250 ml H_2O_{bidest}
Stopplösung:	18,6 g EDTA-Na ₂ ad 1000 ml H ₂ O _{bidest}

2.8.5 FPLC und Aufkonzentrieren der Proteine

Umpufferungspuffer:

10 mM Tris-HCl 250 mM NaCl pH 8,0

Um überschüssige Salze und Imidazol zu entfernen, wurde eine Umpufferung mittels FPLC (ÄKTA purifier, Amersham Biosciences, San Francisco, USA) durchgeführt. Für die Umpufferung von His₆-PhaC1 wurde eine HiPrep[™] 26/10 Säule von GE Healthcare (Buckinghamshire, Großbritannien) verwendet, wohingegen für His₆-PhaM die Größenausschlusschromatographiesäule HiLoad[™] 16/60 Superdex[™] 200 prep grade von GE Healthcare (Buckinghamshire, Großbritannien) genutzt wurde. Die entsprechenden Säulen wurden mit Umpufferungspuffer, der zuvor entgast wurde, äguilibriert und anschließend konnten die Proteinproben aufgetragen werden. Für die Size exclusion chromatography von His₆-PhaM musste das Protein zuvor auf ein Volumen von < 2 ml eingeengt werden. Dies erfolgte mit einer Ultracel® 10 kDa Ultrafiltrationsmembran von Amicon Millipore Corporation (Burlington, USA). Nach erfolgter Umpufferung bzw. Größenausschlusschromatographie wurden die Proteine aufkonzentriert. Für His₆-PhaM wurde wiederholt die Ultracel® 10 kDa Ultrafiltrationsmembran von Amicon Millipore Corporation (Burlington, USA) verwendet und für His₆-PhaC1 eine Ultracel® 30 kDa Ultrafiltrationsmembran von Amicon Millipore Corporation (Burlington, USA). Anschließend konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

2.8.6 Proteinbestimmung mittels BCA

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels des Pierce[™] BCA Protein Assay Kits von Thermo Scientific (Darmstadt, Deutschland). Das Prinzip beruht auf der Biuret-Reaktion in Kombination mit einer Komplexbildung von Cu⁺ mit Bicinchoninsäure (BCA). Das Absorptionsmaximum des entstandenen wasserlöslichen, farbigen Komplexes liegt bei 562 nm.

2.8.7 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Turbidimetrischer Test zur Bestimmung der PHB-Depolymeraseaktivität

Die Bestimmung der putativen Depolymeraseaktivität von aufgereinigtem His₆-A0225 erfolgte mit Hilfe eines turbidimetrischen Tests modifiziert nach Müller und Jendrossek, 1993. Dafür wurde die Trübungsabnahme einer nPHB-Suspension im Cary 100 Bio UV-Visible Spektrophotomerer von Varian (Mulgrave Victoria 3170, Australien) bei 650 nm und 43°C über die Zeit verfolgt. Für den Test wurden native PHB-Granula (nPHB) in 100 mM Tris-HCl (pH 9,5) mit 10 µl Trypsin (1,25 mg/ml) für 10 Minuten bei 43°C aktiviert und die Reaktion anschließend mit 10 µl Ovomucoidlösung (25 mg/ml) abgestoppt. Die aktivierte nPHB-Stammsuspension wurde in 10 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ (pH 8) auf eine OD_{650nm} von 1 eingestellt und in Plastikküvetten (d = 1 cm) im Spektrophotometer bei 43°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Enzymlösung A0225 und die Messung der Trübung über einen Zeitraum von 20 Minuten. Als Positivkontrolle wurde 1 µl des bereits vorhandenen aufgereinigten PhaZ7 (1,3 mg/ml) genutzt.

Bestimmung von Esterase- und Lipaseaktivitäten

Für die Untersuchungen der Enzymaktivität von A0225 wurde die Esterase- bzw. Lipaseaktivität modifiziert nach Winkler und Stuckmann, 1979 bestimmt. Das Prinzip beruht auf der durch Esterasen- bzw. Lipasen-induzierten Freisetzung von ρ -Nitrophenol und der anschließenden spektrophotometrischen Detektion bei 405 nm und 40°C. Folgende Substrate wurden für den Test verwendet:

10 mM ρ -Nitrophenylcaprat (C₁₆H₂₃NO₄) in 96 % (v/v) Ethanol (Esterase-Test) 10 mM ρ -Nitrophenylacetat (C₈H₇NO₄) in 96 % (v/v) Ethanol (Esterase-Test)

10 mM ρ -Nitrophenylpalmitat ($C_{22}H_{35}NO_4$) in 96 % (v/v) Ethanol (Lipase-Test)

Für die Reaktion wurde folgender Ansatz pipettiert:

Substrat (10 mM in 96 % (v/v) Ethanol)	20 µl
Enzymlösung A0225	100 μl
100 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl ₂ , pH 7,9	ad 1000 μl

Als Positivkontrolle wurde die Hydrolyse-Aktivität einer Lipase mit dem Substrat ρ -Nitrophenylpalmitat gemessen. Die Freisetzung von ρ -Nitrophenol und die damit

verbundene Zunahme der Gelbfärbung wurden für 10 Minuten im Spektrophotometer verfolgt.

2.8.8 Limitierte Proteolyse

Um zu untersuchen, ob die Bindung bzw. Wechselwirkung von Nukleotiden mit PhaM einen Einfluss auf die Konformation des Proteins hat und damit das proteolytische Verhalten verändert, wurde eine limitierte Proteolyse durchgeführt. Dies wurde zum einen mit Proteinase K nach Solomaha und Palfrey, 2005 und zum anderen mit Trypsin nach Varne *et al.*, 2002 untersucht.

Für die limitierte Proteolyse mit Proteinase K wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

5 μ g aufgereinigtes His₆-PhaM

1 μ l Nukleotide (GTP, GDP oder ATP; 30 mM in 100 mM Tris/HCl, pH 7,0) ad 13 μ l H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde für 20 Minuten bei 30°C vorinkubiert und anschließend wurden 0,6 μ l einer 1:3320 Verdünnung (5 μ g/ml) von Proteinase K (Stammlösung 16,6 mg/ml) sowie 1,5 μ l einer 10 %-igen (w/v) SDS-Lösung hinzugeben und für 90 Minuten auf Eis inkubiert. Das Verhältnis von PhaM zu Proteinase K betrug 1500:1. Als Kontrolle diente unverdautes PhaM.

Die proteolytische Spaltung wurde durch Zugabe von 3 x SDS-Laemmli-Puffer abgestoppt. Die Proben wurden dann für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht, auf einem 12 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Silberfärbung detektiert.

Die limitierte Proteolyse mit Trypsin erfolgte bis auf einige Änderungen äquivalent. Es wurden 1 μ l einer 1:15 Verdünnung von Trypsin (Stammlösung 1,25 mg/ml) verwendet. Somit betrug das eingesetzte Verhältnis von PhaM zu Trypsin 600:1. Weiterhin wurde auf die Zugabe von 1 % (w/v) SDS verzichtet und die Proteolysedauer betrug lediglich 10 Minuten.

2.8.9 Kolorimetrischer PhaM-Aktivitätsassay

Zur Untersuchung der potenziellen GTPase-Aktivität wurde ein sensitiver, nichtradioaktiver Malachitgrün-basierter Assay nach Quan und Robinson, 2005 durchgeführt. Der Assay ermöglicht die Detektion von freigesetztem, anorganischem Phosphat. Das Prinzip beruht auf der Bildung eines farblosen Phosphomolybdatkomplexes bei niedrigem pH-Wert. In Gegenwart des basischen pH-Indikatorfarbstoffes Malachitgrün geht dieser farblose Komplex in einen farbigen über. Anschließend ist eine spektrophotometrische Quantifizierung bei 642 nm möglich.

Nachfolgend sind alle benötigten Puffer und Reagenzien aufgeführt.

Malachitgrün-Reagenz:	50 mg Malachitgrün 500 mg (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O
	ad 50 ml 1 M HCl

Das Malachitgrün-Reagenz wurde filtriert (0,45 µm Filter) und im Dunkeln aufbewahrt.

10 x GTPase-Assay-Puffer:	100 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 20 mM MgCl ₂ · 6 H ₂ O 0,5 % (v/v) Tween 80 pH 7,4
Stopp-Puffer:	0,5 M EDTA-Na₂ pH 8,0
10 x Leupetin:	10 μ g/ml in H ₂ O _{bidest}
100 x PMSF:	100 mM PMSF in reinst Ethanol 1 mM PMSF-Arbeitslösung (10-fach) in H ₂ O _{bidest}
5 x Phosphatstandards:	1 mM NaH ₂ PO ₄ in H ₂ O _{bidest} Verdünnungen zu folgenden 5 x Standards: 500, 250, 150, 100, 50, 25 und 5 μM

Für die Herstellung der Phosphatstandards wurde $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ für drei Stunden bei 110°C im Ofen getrocknet, um das Wasser zu entfernen.

100 x Nukleotide: 30 mM in 100 mM Tris/HCl, pH 9,0

(GTP, GDP oder ATP)

Die Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt. Für die Verwendung wurde mit 100 mM HCI ein pH-Wert von 7,0 eingestellt und anschließend wurde ein 10fach Arbeitsstock mit 20 mM Tris/HCl pH 7,4 hergestellt, der frisch verwendet wurde.

Der Assay wurde in Triplikaten in 96-well-Platten auf Eis durchgeführt. Folgender Reaktionsmix wurde pro Probe angesetzt (Gesamtvolumen 40 µl):

> 4 μl 10 x GTPase-Assay-Puffer 10 x Nukleotide (GTP, GDP oder ATP) 4 μl 4 μl 10 x Leupeptin 10 x PMSF 4 μl 16 µl H₂O_{bidest} Protein (PhaM, 15 µM, Zugabe kurz vorher) 8 ul

Für die Phosphatstandards wurden jeweils 8 µl jedes Standards anstatt des Proteins sowie 4 µl H₂O_{bidest} anstelle der Nukleotide verwendet.

Für den Assay wurde zudem eine Blank-Kontrolle ohne Protein mitgeführt, um eine spontane Hydrolyse der Nukleotide zu detektieren. Weiterhin wurde eine Kontrolle ohne Nukleotide verwendet, um Hintergrundphosphat im Puffer nachzuweisen.

Nach Zugabe des Proteins (Initiation der Reaktion) wurde die 96-well-Platte bei 30°C bei 100 rpm im Mikrotiter-Plattenschüttler MS1 IKA® (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 10 µl Stopp-Puffer abgestoppt. Die Proben waren für 2 Stunden stabil im Stopp-Puffer. Die Zugabe von 150 µl Malachitgrün-Reagenz zu den wells und eine Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur ermöglichte die Entwicklung des Assays. Die Absorption des entstandenen Malachitgrün-Phosphomolybdatkomplexes wurde bei 642 nm im Plattenreader Eon von BioTek® Instruments (Winooski, USA) gemessen.

Für die Proteomanalyse wurde der Reaktionsansatz, wie oben beschrieben, mit 15 µM PhaM, 15 µM PhaC1 und 0,3 mM ATP für 1 Stunde bei 30°C inkubiert und anschließend wie unter 2.8.13 beschrieben behandelt.

2.8.10 Detektion von freigesetztem P_i in nativen Polyacrylamidgelen

Native Polyacrylamidgele bieten eine gute Möglichkeit für die Auftrennung intakter Proteine. Eine anschließende Inkubation in einer geeigneten Reaktionslösung ermöglicht den Nachweis spezifischer Enzymreaktionen. Um zu zeigen, dass anorganisches Phosphat spezifisch von PhaM freigesetzt wird, wurde der hochsensitive P_i-Nachweis in nativen Gelen nach Suhai *et al.*, 2009 durchgeführt.

Das Prinzip der Phosphatdetektion beruht auf der Bildung eines Bleiphosphat-Komplexes in Gegenwart von Phosphat, welcher als weiße Banden sichtbar wird. Um eine bessere Visualisierung dieser Banden zu ermöglichen, werden die weißen Banden durch Zugabe von Ammoniumsulfid in braun-schwarze Bleisulfid-Banden umgewandelt.

Gelelektrophorese-Puffer:	25 mM Tris 200 mM Glycin pH 8,5 (abhängig vom isoelektrischen Punkt des Proteins)
4 x Ladepuffer:	125 mM Tris 20 % (v/v) Glycerin 0,002 % (w/v) Bromphenolblau pH 8
ATP-Inkubationspuffer:	35 mM Tris 4 mM ATP (frisch hinzugegeben) 1,5 mM MgCl ₂ pH 8,5
Blei(II)-nitrat-Puffer:	35 mM Tris 270 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol 0,075 % (w/v) Blei(II)-nitrat
Waschpuffer:	35 mM Tris pH 8,5
Entwicklungslösung:	1 % (v/v) Ammoniumsulfid
<i>Coomassie-Färbelösung</i> <i>nach</i> (Weber und Osborn, 1969)	0,06 % (w/v) Serva-Blau G-250 :0,06 % (w/v) Serva-Blau R-250 45,4 % (v/v) Methanol 9,2 % (v/v) Eisessig Lösung filtrieren

Es wurden 22 µg aufgereinigtes PhaM (1 mg/ml) mit 4-fach Ladepuffer gemischt (Gesamtvolumen 30 µl) und auf ein natives 15 %-iges Polyacrylamidgel auftragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 15 mA in kaltem Gelelektrophorese-Puffer bis die Lauffront am unteren Ende des Gels angekommen war (ca. 2 h). Anschließend wurde das Gel 3-mal für 10 Minuten mit 20 ml Waschpuffer gewaschen und dann mit 20 ml ATP-Inkubationspuffer (10 ml/h) für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach wiederholtem Waschen (dreimal) mit jeweils 20 ml Waschpuffer für 10 Minuten wurde das Gel über Nacht in 10 ml Blei(II)-nitrat-Puffer bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Am nächsten Tag wurden drei Waschschritte mit jeweils 20 ml Waschpuffer durchgeführt und die Zugabe von 1 ml Entwicklungslösung ermöglichte die Detektion der braunen Bleisulfid-Banden an den Stellen, wo Bleiphosphat gebildet wurde. Anschließend konnte das Gel mit Coomassie gefärbt und mit Wasser entfärbt werden.

Lösung/Puffer	Trenngel 15 %	Sammelgel 4,5 %
H ₂ O _{bidest}	9,68 ml	5,92 ml
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	20 ml	1,5 ml
Trenngelpuffer	10 ml	-
Sammelgelpuffer	-	2,5 ml
APS-Lösung	280 μl	70 µl
TEMED	40 µl	10 µl

Tabelle 2-14: Zusammensetzung des nativen Polyacrylamidgels (4 Gele, 1 mm)

Die Pufferzusammensetzungen sind unter 2.8.3 zu finden.

2.8.11 Bakterielles Adenylatzyklase Two-Hybrid System

Um zwei putative Protein-Interaktionspartner zu untersuchen, wurde ein modifiziertes bakterielles Adenylatzyklase *Two-Hybrid* System nach Karimova *et al.*, 1998 durchgeführt.

Das Prinzip beruht auf einer Komplementierung der Adenylatzyklase-Aktivität, wenn zwei Proteine, die an die jeweiligen Untereinheiten T25 und T18 der Adenylatzyklase fusioniert sind, miteinander in räumliche Nähe kommen und interagieren. Grundlage dafür ist ein Adenylatzyklase-defizienter (Δcya) *E. coli* Stamm. Die Interaktion der T25-Domäne und der T28-Untereinheit bewirken die Synthese des *second*

messengers cAMP, welcher die Laktose- und Maltose-Operons positiv reguliert. Die Transkription der Operon-Gene kann daraufhin mit kolorimetrischen Assays detektiert werden.

5 x M63-Mineralmedium:	10 g $(NH_4)_2SO_4$ 68 g KH_2PO_4 2,5 mg FeSO ₄ · 7 H_2O ad 1 I H_2O_{bidest} pH 7 mit KOH
M63-Mineralsalz-Maltose-Agar:	200 ml 5 x M63-Mineralmedium 1 ml 1 M MgSO ₄ \cdot 7 H ₂ O 10 ml Maltose (20 % (w/v), sterilfiltriert) 1 ml Thiamin (0,5 % (w/v)) 0,5 ml Ampicillin (100 mg/ml) 0,5 ml Kanamycin (50 mg/ml) 0,5 ml 1 M IPTG 2 ml X-Gal (2 % (w/v) in Dimethylformamid)

Alle Komponenten wurden gemischt und unter sterilen Bedingungen zu bereits autoklaviertem Agar (15 g in 800 ml H_2O_{bidest}) gegeben, gemixt und in die quadratischen Petrischalen gegossen.

LB-X-Gal-IPTG-Amp-Kan-Agar: 0,5 ml 1 M IPTG 2 ml X-Gal (2 % (w/v) in Dimethylformamid) 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) 1 ml Kanamycin (50 mg/ml)

Die Komponenten wurden zu 1 I autoklaviertem Agar (15 g) gegeben, gemischt und in Petrischalen gegossen.

1 ml Ampicillin (100 mg/ml) 1ml Kanamycin (50 mg/ml) 0.5 ml 1 M IPTG
10 ml Laktose (1 % (w/v), sterilfiltriert)

Die Zusätze wurden mit 1 I autoklaviertem MacConkey-Agar (40 g) gemischt und in quadratische Petrischalen gegossen.

Im ersten Schritt wurden die Gene der putativen PhaM-Interaktionspartner sowohl in den pKT25 als auch pUT18C Vektor kloniert. Anschließend wurden jeweils 10 ng der fertigen Plasmide in allen benötigen Kombinationen in kompetente *E. coli* BTH101 Zellen transformiert, auf LB-X-Gal-IPTG-Amp-Kan-Agar-Platten ausplattiert und bei 30°C über Nacht inkubiert. Jeweils 4 Klone der Transformanten wurden für jede Plasmidkombination auf neuen LB-X-Gal-IPTG-Amp-Kan-Platten aufgereinigt.

Anzucht der Zellen in 96-*deep-well*-Platten

Die Zellen (jeweils 4 Klone pro Plasmid-Kombination) wurden sowohl für den Tropftest als auch den Miller-Assay in 96-*deep-well*-Platten angezogen. Dafür wurden 1 ml LB-Medium, versetzt mit 100 μ g/ml Ampicillin, 50 μ g/ml Kanamycin sowie 0,5 mM IPTG, mit jeweils einer Kolonie angeimpft, mit einem gaspermeablen Film verschlossen und bei 30°C auf dem Schüttler (90 *rpm*) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die OD₆₀₀ der Zellen gemessen. Dafür wurden 40 μ l der angewachsenen Zellen mit 160 μ l 0,9 %-iger (w/v) Saline in einer 96-*well*-Mikrotiterplatte verdünnt (1:5 Verdünnung) und im Plattenreader Eon von BioTek® Instruments (Winooski, USA) gemessen. Als Referenzwert wurden 40 μ l LB-Medium und 160 μ l 0,9 %-ige (w/v) Saline genutzt.

Miller-Assay in 96-well-Platten nach Thibodeau et al. 2004

Z-Puffer:	10,7 g Na ₂ HPO ₄ \cdot 2 H ₂ O 5,5 g NaH ₂ PO ₄ \cdot H ₂ O 0,75 g KCI 0,246 g MgSO ₄ \cdot 7 H ₂ O 2,7 ml β -Mercaptoethanol ad 1 I H ₂ O _{bidest} pH 7, nicht autoklaviert, Lagerung im Kühlschrank
ONPG-Lösung:	4 mg/ml in Z-Puffer ohne Mercaptoethanol, Lagerung bei – 20°C

Um die Zellen für den β-Galaktosidase-Assay zu permeabilisieren, wurden 900 µl Z-Puffer mit 20 µl 0,1 % (w/v) SDS in 96-*deep-well*-Platten gemischt und 100 µl der verdünnten Zellen hinzugegeben. Anschließend wurden 20 µl Toluol in jedes *well* pipettiert, die Platte mit einem gaspermeablen Film verschlossen und das Toluol für 40 Minuten bei 37°C im Schüttler (150 *rpm*) verdampft. Daraufhin wurden 150 µl der permeabilisierten Zellen in eine 96-*well*-Mikrotiterplatte gegeben und für 30 Minuten bei 28°C im Reader vorinkubiert. Die Zellen wurden dann mit 30 µl der vorgewärmten ONPG-Substrat-Lösung gemischt und die Zunahme der Absorption bei 420 nm wurde für 40 Minuten im Plattenreader Eon von BioTek® Instruments (Winooski, USA) aufgenommen.

Die modifizierte Berechnung der β-Galaktosidase-Aktivität in *Miller units* erfolgte nach Thibodeau *et al.* 2004.

$$\beta$$
 – Galaktosidase – Aktivität = $\frac{V * 1000 * CF1}{A_{600} * CF2 * rel. Vol permeabilisierter Zellen}$

- V: Reaktionsgeschwindigkeit der β-Galaktosidase A₄₂₀/min
- CF1: Konversionsfaktor, wandelt gemessene A₄₂₀-Werte des Readers in gemessene A₄₂₀-Werte am Spektrophotometer um (Messung verschiedener Verdünnungen von *o*-Nitrophenyl-(ONP)-Lösungen im Reader und Spektrophotometer und Plotten der Werte gegeneinander, CF1 ist der Anstieg der Regressionsgerade) *berechneter Wert:* 0,397935
- CF2: Konversionsfaktor, wandelt gemessene A₆₀₀-Werte des Readers in gemessene A₆₀₀-Werte am Spektrophotometer um (Messung verschiedener Verdünnungen der Bakterienkultur im Reader und Spektrophotometer und Plotten der Werte gegeneinander, CF1 ist der Anstieg der Regressionsgerade) *berechneter Wert*: 0,2284

Tropftests auf M63-Mineralsalz-Maltose-Agar und MacConkey-Agar

Die Tropftests wurden mit zwei verschiedenen Indikatoragarplatten durchgeführt: MacConkey- und M63-Mineralsalz-Maltose-Agar. Kommt es zu einer Interaktion der getesteten Proteine, interagieren die einzelnen Untereinheiten der Adenylatzyklase miteinander, was zur Wiedererlangung der Adenylatzyklasefunktion führt. Dies resultiert in der Rotfärbung von Kolonien auf MacConkey-Agar (Bakterien setzen Laktose fermentativ um) sowie der Blaufärbung von Kolonien auf X-Gal-enthaltenem Mineralsalzagar mit Maltose.

Für die Tropftests wurden von jeder getesteten Plasmidkombination jeweils 4 Klone auf die entsprechenden quadratischen Agarplatten getropft. Dafür wurden jeweils 2 μ I der 1:5 verdünnten Zellen aufgetropft, die Tropfen getrocknet und die Platten bei 30°C inkubiert. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte 24 h sowie 48 h später.

2.8.12 Pull down-Experiment

Aufschluss- und Waschpuffer:

25 mM NaPP 5 % (v/v) Glycerin 50 mM NaCl 5 mM MgSO₄ 5 mM KCl 20 mM Imidazol pH 7,5

Die *pull down*-Experimente ermöglichten die Identifizierung neuer Interaktionspartner von eYFP-Fusionsproteinen. Die Versuche wurden mittels magnetischer Agarosebeads mit gekoppelten rekombinanten anti-GFP Antikörperfragmenten von Chromotek (GFP-Trap®_MA, #gtma-20, München, Deutschland) durchgeführt. Laut Hersteller konnte bereits eine Spezifität der GFP-Trap®_MA gegenüber YFP nachgewiesen werden.

Für den *pull down* wurden alle Gene von Interesse mit *eyfp* fusioniert und in *R. eutropha* H16 exprimiert. Dies wurde sowohl im Wildtyp-Hintergrund als auch in der Deletionsmutante $\Delta phaC1$ durchgeführt.

Um die Zellen PHB-frei zu bekommen, wurde eine erste Vorkultur für 24 h bei 30°C geschüttelt und anschließend 1:10 verdünnt in die zweite Vorkultur überführt. Nach 24 h bei 30°C wurden 180 ml Hauptkultur + 0,2 % (w/v) Na-Glukonat mit 20 ml der zweiten Vorkultur angeimpft und bei 30°C geschüttelt. Nach 5 Stunden erfolgte eine mikroskopische Überprüfung der Proteinexpression sowie die Zellernte bei 5000 *rpm* und 4°C für 20 Minuten (Sigma Laboratory Centrifuges 4K15, Swing-out Rotor 11150). Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis und mit vorgekühlten Puffern durchgeführt. Für den *pull down* wurden zudem *Protein LoBind Tubes* (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verwendet.

Das Zellpellet wurde in 5 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und durch dreimalige Passage in der *French Press* (Aminco, Silver Spring, Maryland, USA) bei einem Druck von 1000 Psi aufgeschlossen. Anschließend wurden 500 µl des aufgeschlossenen Zelllysats zu 20 µl der magnetischen Beads, die im Vorfeld 3-mal mit Waschpuffer äquilibriert wurden, gegeben und für eine Stunde auf Eis auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde das Zelllysat entfernt und die Beads 5-mal mit jeweils 500 µl Puffer gewaschen. Vor der Elution wurden die Beads in ein neues *LoBind Tube* überführt und die Proteine abschließend mit 40 µl 2,5 %-iger (w/v) SDS-Lösung eluiert.

55

2.8.13 Proteomanalyse

Kolloidales Coomassie:

0,12 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 10 % (w/v) Ammoniumsulfat 10 % (v/v) Phosphorsäure 20 % (v/v) Methanol

Für die Proteomanalyse der *pull down*-Experimente sowie des *in vitro* PhaM-Aktivitätstests wurden die Proben mit 3-fach Laemmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht. Im Falle der *pull down*-Experimente wurden die magnetischen Beads mit Hilfe eines Magneten separiert, was die Überführung der Proben ohne magnetische Beads in ein neues Tube ermöglichte.

Die Proben wurden auf ein 12 %-iges SDS-Gel geladen und ca. 1 cm im Trenngel bei 20 mA separiert. Anschließend wurden die Gele über Nacht lichtgeschützt mit kolloidalem Coomassie nach Candiano *et al.*, 2004 gefärbt und am nächsten Tag mehrfach mit Wasser entfärbt.

Die Proteomanalyse mittels Massenspektrometrie erfolgte in Kooperation mit dem Life Science Center der Universität Hohenheim, AG Pfannstiel. Für die Auswertung der Daten wurde die Proteomsoftware *Scaffold* genutzt.

2.8.14 PHB-Synthase-Aktivitäts-Assay

Diskontinuierlicher PHB-Synthase-Assay modifiziert nach Ellman, 1959 und Gerngross und Martin, 1995.

DTNB-Puffer:	0,5 M KH₂PO₄ pH 7,8 mit KOH
Assay-Puffer:	150 mM KH₂PO₄ 0,2 % (v/v) Glycerin pH 7,2 mit KOH
Stopp-Lösung:	10 % (w/v) TCA in H ₂ O _{bidest}
Ellmans Reagenz:	1 mM DTNB in DTNB-Puffer
Substrat:	20 mM $_{D,L}$ - β -Hydroxybutyryl-Coenzym A (3-HB-CoA) in H ₂ O _{bidest}

Die Aktivität der PHB-Synthase PhaC1 wurde mittels eines *in vitro* Assays bestimmt. Dafür wurde folgender Reaktionsmix pipettiert: 195 μl Assay-Puffer
5 μl 3-HB-CoA
30 nM aufgereinigtes His₆-getaggtes PhaM

Der Reaktionsansatz wurde bei 30°C im Heizblock vorgewärmt und 20 µl wurden für den Probenpunkt T₀ in 40 µl Stopp-Lösung pipettiert. Anschließend wurde die *in vitro* PHB-Synthese durch Zugabe von 340 nM His₆-PhaC1 zum Reaktionsmix gestartet. Zum Abstoppen der Reaktion wurden Aliquots (20 µl) des Ansatzes zu den definierten Zeitpunkten sofort mit 40 µl 10 %-iger (w/v) TCA-Lösung gemischt. Präzipitiertes Protein wurde im Anschluss durch einen Zentrifugationsschritt bei *full speed* (Zentrifuge 5430, Rotor FA-45-30-11, eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für eine Minute entfernt. Die Zugabe von jeweils 145 µl Ellmans Reagenz zu 55 µl der abgestoppten Aliquots ermöglichte eine Konzentrationsbestimmung des freigesetzten CoA. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption des gebildeten NTB bei 412 nm im Plattenreader Eon von BioTek® Instruments (Winooski, USA) gemessen. Eine Unit der PHB-Synthase-Aktivität entspricht der Bildung von 1 µmol NTB/min.

2.8.15 Crosslinking-Experiment

Crosslinking-Puffer:	20 mM KPP pH 7,5 5 % (v/v) Glycerin
Stopp-Lösung:	1 M Tris-HCl pH 8

Für *in vitro* Interaktionsexperimente mit PhaM und PhaC1 wurden *Crosslinking*-Experimente mit Glutardialdehyd (GDA) durchgeführt (Cheung und Nimni, 1982). Dafür wurden 14 μ M aufgereinigtes His₆-PhaC1 mit steigenden Konzentrationen His₆-PhaM (1; 2,5; 5; 8 μ M) in *Crosslinking*-Puffer gemischt (Gesamtvolumen 10 μ I) und für 30 Minuten auf Eis aufbewahrt. Anschließend wurden 0,5 μ I frisch verdünnte 2,5 %-ige (v/v) GDA-Lösung hinzugegeben und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Für die Kontrollen wurde Wasser verwendet. Nach Abstoppen der *Crosslinking*-Reaktion mit 1 μ I Stopp-Lösung wurden die Proben mit 5,5 μ I 3-fach Laemmli-Puffer gemischt und anschließend auf ein 8 %-iges SDS-Gel ohne Aufkochen aufgetragen. Nach erfolgter SDS-PAGE bei 20 mA pro Gel wurde das Gel mit kolloidalem Coomassie (siehe 2.8.13) lichtgeschützt über Nacht gefärbt und am nächsten Tag mit Wasser entfärbt.

3 Ergebnisse

3.1 Neue PGAPs

Die vorherigen Arbeiten von Sznajder *et al.*, 2015 hatten zur Identifizierung weiterer PHB-Granulum-gebundener Proteine in *R. eutropha* geführt. Bei den mittels Proteomanalysen in der PHB-Granula-Fraktion gefundenen Treffern handelte es sich um vier neue Proteine, die zuvor nicht an PHB-Granula nachgewiesen werden konnten. Damit konnten bislang insgesamt 14 PHB-Granula-assoziierte Proteine (PGAPs) in *R. eutropha* identifiziert werden. Drei dieser neuen PGAPs wurden als hypothetische Proteine mit α/β -Hydrolasemotiv annotiert: A0225, A0671 und B1632. Laut *KEGG Genome* Datenbank weisen die Gene H16_A0671 sowie H16_B1632 Ähnlichkeiten zur PHB-Synthase- bzw. Depolymerase-Signatur auf. Das Gen H16_A0225 hingegen kodiert für eine Patatin-ähnliche Phospholipase. Keine Funktion konnte bislang für das vierte identifizierte Protein A2001 vorausgesagt werden. Allerdings bildet das Gen H16_A2001 ein gemeinsames Operon mit den Genen *phaB2* und *phaC2*.

Fluoreszenzmikroskopische in vivo Analysen von Fusionsproteinen der identifizierten vier Proteine mit eYFP hatten bereits bestätigt, dass die Proteine an PHB-Granula gebunden vorliegen (Sznajder et al., 2015). Um einen möglichen Einfluss der Proteine A0671 (PhaZe1) und B1632 (PhaZe2) auf den PHB-Metabolismus zu untersuchen, wurde von Sznajder et al., 2015 eine guantitative Bestimmung des PHB-Gehaltes mittels Gaschromatographie für die Stämme R. eutropha Δ H16 A0671, Δ H16 B1632 sowie Δ H16 A0671 Δ H16 B1632 im Vergleich zu R. eutropha H16 WT durchgeführt. Dabei konnte ein geringer Effekt der Deletionsmutanten bezüglich der Mobilisierungsfähigkeit von PHB während der stationären Phase detektiert werden, was auf eine funktionelle Beteiligung beider Proteine im PHB-Stoffwechsel schließen lässt (Sznajder et al., 2015). Es fanden keine weiteren Charakterisierungsexperimente statt. Die Funktionen der Proteine A2001 und A0225 wurden bislang nicht näher untersucht. Ausgehend davon bestand ein erstes Ziel der vorliegenden Arbeit darin, die zwei weiteren neuen PGAPs A2001 und A0225 näher zu charakterisieren. Dies sollte die Herstellung der R. eutropha Deletionsmutanten der beiden Gene H16_A2001 und H16_A0225 und eine

58
anschließende quantitative Bestimmung des PHB-Gehaltes mittels Gaschromatographie sowie mikroskopische Untersuchungen zur PHB-Bildung und -mobilisierung einschließen.

3.1.1 A2001 – hypothetisches Protein im Operon mit PhaB2 und PhaC2

Das identifizierte PHB-Granulum-assoziierte Protein A2001 ist laut *KEGG Genome* Datenbank als hypothetisches Protein annotiert. Der genomische Kontext zeigt, dass sich das Gen H16_A2001, welches auf dem Chromosom 1 von *R. eutropha* H16 lokalisiert ist, in einem putativen Operon mit H16_A2002 und H16_A2003 befindet. Das Gen H16_A2002 kodiert für die Acetoacetyl-CoA Reduktase PhaB2 und bei dem Genprodukt von H16_A2003 handelt es sich um die Poly(3-Hydroxybutyrat)-Polymerase PhaC2 (Abbildung 1). PhaB2 stellt das aktive Isoenzym von PhaB aus dem *phaCAB* Operon zur PHB-Synthese dar. Die Deletion von *phaB2* ergab keinen Phänotyp (Budde *et al.*, 2010). Die Funktion der alternativen PHB-Synthase PhaC2 (H16_A2003) ist nicht bekannt und es konnte kein phänotypischer Unterschied für den Deletionsstamm *R. eutropha* H16 Δ H16_A2003 festgestellt werden. Eine fluoreszenzmikroskopische Analyse von PhaC2-eYFP zeigte dennoch eine klare Kolokalisation mit PHB-Granula (Pfeiffer und Jendrossek, 2012).



Abbildung 1: Genomischer Kontext des neu identifizierten PHB-Granula-assoziierten Proteins A2001 in *R. eutropha* H16. Das als hypothetisches Protein annotierte Gen H16_A2001 ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert. Es bildet zusammen mit den Genen H16_A2002 (*phaB2*) und H16_A2003 (*phaC2*) ein putatives Operon. Das Protein A2001 besitzt ein Phasin_2-Motiv, welches in *R. eutropha* H16 bei neun weiteren Proteinen gefunden werden kann. Die Bezeichnung der Gene wurde der *KEGG Genome* Datenbank entnommen.

Das Genprodukt des Gens H16_A2001 ist ein etwa 17,8 kDa großes Protein mit 159 Aminosäuren, welches laut *KEGG Genome* Datenbank ein sogenanntes Phasin_2-Motiv aufweist. Dieses Motiv konnte innerhalb der *R. eutropha* Gendatenbank bei neun weiteren Genen gefunden werden: H16_A1381, H16_A2172, H16_B0520, H16 B1244, H16 B1315, H16 B2021, H16 B2326 sowie PHG202. Sechs dieser Gene kodieren für bereits identifizierte Phasine, darunter PhaP1 (A1381), PhaP2 (PHG202), PhaP3 (A2172), PhaP4 (B2021), PhaP5 (B1934) und PhaP7 (B2326). Folglich könnte A2001 als PhaP8 bezeichnet werden. Zu den weiteren Proteinen mit einem Phasin_2-Motiv zählen ein hypothetisches Protein (B1315), eine Signaltransduktionshistidinkinase (B1244) sowie ein konserviertes hypothetisches Membranprotein (B0520).

Um eine mögliche Rolle von A2001 während des PHB-Stoffwechsels zu untersuchen, wurde das Gen H16 A2001 deletiert und der Stamm anschließend im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Es wurden eine guantitative PHB-Bestimmung mittels Gaschromatographie und eine gleichzeitige fluoreszenzmikroskopische Analyse des PHB-Phänotyps durchgeführt. Die Stämme R. eutropha H16 WT und △H16 A2001 wurden in zwei Vorkulturen über jeweils 24 Stunden in NB-Medium kultiviert, um die Zellen PHB-frei zu bekommen. Die NB-Hauptkultur mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat wurde mit 10 % (v/v) der zweiten Vorkultur angeimpft und bei 30°C inkubiert. Während der PHB-Bildungs- und Mobilisierungsphase wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben genommen, die einerseits für die GC-Analyse andererseits mikroskopiert wurden. verwendet und Ebenso wurde das Wachstumsverhalten der beiden Stämme untersucht und die OD₆₀₀ gemessen (Abbildung 2). Beide Stämme zeigten ein identisches Wachstum, wobei innerhalb der ersten 10 Stunden ein exponentieller Anstieg der OD₆₀₀-Werte verfolgt werden konnte. Die guantitative Bestimmung des PHB-Gehaltes brachte ebenso keinen Unterschied zwischen *R. eutropha* H16 WT und der Deletionsmutante Δ H16 A2001 hervor. Für beide Stämme konnte jeweils ein maximaler PHB-Gehalt von über 30 % des Zelltrockengewichts bestimmt werden (Abbildung 2A). Weder für die Bildungsnoch Mobilisierungsphase von PHB konnte ein Einfluss des hypothetischen Proteins A2001 identifiziert werden. Die Nilrot-Färbung der PHB-Granula in der PHB-Bildungsphase nach 4 Stunden bestätigte zudem, dass es zu keinem sichtbaren phänotypischen Unterschied zwischen beiden Stämmen kam (Abbildung 2B). Auch während der Abbauphase konnten keine Unterschiede detektiert werden. Damit konnte auch aus der mikroskopischen Untersuchung geschlussfolgert werden, dass A2001 keine wichtige Rolle innerhalb des PHB-Metabolismus zu spielen scheint.



Abbildung **Bestimmung PHB-Gehaltes** mittels 2: des Gaschromatographie und Fluoreszenzmikroskopie sowie Wachstumskurven von *R. eutropha* H16 WT und △H16_A2001. Dargestellt sind die quantitative Bestimmung des PHB-Gehaltes vom Zelltrockengewicht sowie der Wachstumsverlauf (OD₆₀₀) in Abhängigkeit von der Zeit für *R. eutropha* H16 WT und ∆H16_A2001. Die Anzucht der Zellen erfolgte auf NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat bei 30°C. Die Messung mittels Gaschromatographie wurde mit drei biologischen sowie drei technischen Replikaten durchgeführt (Standardabweichungen dargestellt). Für die Messung der OD₆₀₀ wurden die drei biologischen Replikate verwendet (A). Gezeigt sind die mikroskopischen Aufnahmen der Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase nach 4 Stunden. Die Anfärbung der Zellen mit PHB-Granula erfolgte mittels Nilrot. Die Maßstäbe entsprechen 1 µm (B). Es konnten keine Unterschiede sowohl mittels Gaschromatographie als auch mit Hilfe der Mikroskopie festgestellt werden.

Im nächsten Schritt sollte erforscht werden, ob eine Deletion des gesamten putativen Operons (Δ H16_A2001-H16_A2003) einen Einfluss auf den PHB-Stoffwechsel ausübt. Dafür wurde ebenso eine Quantifizierung des PHB-Gehaltes des Stammes *R. eutropha* H16 Δ H16_A2001-H16_A2003 im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt. Auch das Wachstumsverhalten sowie der PHB-Phänotyp wurden bestimmt. Die PHB-freien Zellen wurden in NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat bei 30°C





Abbildung Bestimmung **PHB-Gehaltes** mittels Gaschromatographie 3: des und Fluoreszenzmikroskopie sowie Wachstumskurven von R. eutropha H16 WT und AH16 A2001-H16 A2003. Dargestellt sind die quantitative Bestimmung des PHB-Gehaltes vom Zelltrockengewicht sowie der Wachstumsverlauf (OD₆₀₀) in Abhängigkeit von der Zeit für R. eutropha H16 WT und der Dreifachdeletionsmutante ∆H16 A2001-H16 A2003. Die Anzucht der Zellen erfolgte auf NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat bei 30°C. Die Messung mittels Gaschromatographie wurde mit drei biologischen sowie drei technischen Replikaten durchgeführt (Standardabweichungen dargestellt). Für die Messung der OD₆₀₀ wurden die drei biologischen Replikate verwendet (A). Gezeigt sind die mikroskopischen Aufnahmen der Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase nach 4 Stunden. Die Anfärbung der Zellen mit PHB-Granula erfolgte mittels Nilrot. Die Maßstäbe entsprechen 1 μm (B). Es konnten keine Unterschiede sowohl mittels Gaschromatographie als auch mit Hilfe der Mikroskopie festgestellt werden.

Es konnten keine deutlichen Unterschiede im Wachstum sowie im PHB-Gehalt zwischen Wildtyp und der Dreifachdeletionsmutante Δ H16_A2001-H16_A2003 detektiert werden (Abbildung 3A). Bis zum Zeitpunkt von etwa 16 Stunden konnte bei beiden Stämmen ein Anstieg im PHB-Gehalt verzeichnet werden, was in maximalen Werten von etwa 45 % PHB des Zelltrockengewichtes resultierte. Die höchste OD₆₀₀ konnte ebenfalls nach 16 Stunden gemessen werden. Die mikroskopische Untersuchung mit Nilrot zeigte ebenso keine phänotypischen Unterschiede der PHB-Granula und deren Lokalisation (Abbildung 3B). Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass die Deletion des putativen Operons mit dem hypothetischen Protein A2001, PhaB2 und PhaC2 keinen Einfluss auf den PHB-Gehalt ausübt und die Funktion des Operons ungeklärt bleibt, da keine weiteren Experimente durchgeführt wurden.

3.1.2 A0225 – eine Patatin-ähnliche Phospholipase

Das zweite bisher nicht näher charakterisierte Protein A0225 wird von dem Gen H16_A0225 kodiert, welches sich ebenfalls auf dem Chromosom 1 von *R. eutropha* H16 befindet. Laut *KEGG Genome* Datenbank ist das Genprodukt als Protein der α/β -Hydrolase-Superfamilie annotiert (Abbildung 4).



Abbildung 4: Genomischer Kontext des neu identifizierten PHB-Granula-assoziierten Proteins A0225 in *R. eutropha* H16. Das auf dem Chromosom 1 befindliche Gen H16_A0225 kodiert für eine putative Esterase der α/β -Hydrolase-Superfamilie, welche ein Patatin-Motiv sowie eine DUF3734 (*domain of unknown function*) aufweist. Die Bezeichnung der Gene wurde der *KEGG Genome* Datenbank entnommen.

Die Aminosäureseguenz weist zwei Motive auf: ein Patatin-Motiv sowie eine Domäne unbekannter Funktion (DUF3734). Die E-Werte für die gefundenen Motive betragen 1,1*10⁻²⁶ bzw. 3.5*10⁻³⁷. Patatin stellt ein wichtiges Speicherprotein in Kartoffeln dar. welches die enzymatische Aktivität von Lipidacyl-Hydrolasen besitzt und so die Spaltung von Fettsäuren von Membranlipiden katalysiert (Mignery et al., 1988). DUF3734-Motive werden häufig bei Proteinen gefunden, die als Familie der Patatinphospholipasen annotiert werden. Interessanterweise existieren im Zusammenhang mit Proteinen des PHB-Metabolismus zwei weitere annotierte Patatin-ähnliche Phospholipasen. Zum einen das Gen H16 A0140, welches sich in einem Operon mit PhaM (H16 A0141) befindet, und andererseits das Gen H16 A1813, welches zusammen mit dem 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenasegen (H16 A1814) vermutlich ko-transkribiert wird. Aufgrund dieser Tatsache und der Lokalisation auf der PHB-Granulaoberfläche könnte eine Rolle des Proteins A0225 im PHB-Stoffwechsel angenommen werden, die nachfolgend untersucht wurde. Dafür wurde die Deletionsmutante Δ H16 A0225 generiert und der mögliche Einfluss auf den PHB-Gehalt guantitativ mit Hilfe der Gaschromatographie bestimmt. Als Kontrolle diente R. eutropha H16 WT. Die durch zwei Vorkulturen erhaltenen PHBfreien Zellen der beiden Stämme wurden für die GC- und Wachstumsanalyse sowie Mikroskopie in NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat bei 30°C kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen (Abbildung 5). Es konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Deletionsmutante Δ H16 A0225 im PHB-Gehalt festgestellt werden. Beide Stämme zeigten auch einen gleichen Wachstumsverlauf (Abbildung 5A). Die Anfärbung der Zellen während der Bildungs- und Abbauphase mit Nilrot ließ keine Rückschlüsse auf einen Einfluss des Proteins A0225 auf den PHB-Phänotyp zu (Abbildung 5B, Probenzeitpunkt 4h).



Abbildung 5: Bestimmung des **PHB-Gehaltes** mittels Gaschromatographie und Fluoreszenzmikroskopie sowie Wachstumskurven von *R. eutropha* H16 WT und △H16 A0225. Dargestellt ist die quantitative Bestimmung des PHB-Gehaltes vom Zelltrockengewicht sowie der Wachstumsverlauf (OD₆₀₀) in Abhängigkeit von der Zeit für *R. eutropha* H16 WT und Δ H16 A0225. Die Anzucht der Zellen erfolgte auf NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat bei 30°C. Die Messung mittels Gaschromatographie wurde mit drei biologischen sowie drei technischen Replikaten durchgeführt (Standardabweichungen dargestellt). Für die Messung der OD₆₀₀ wurden die drei biologischen Replikate verwendet (A). Gezeigt sind die mikroskopischen Aufnahmen der Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase nach 4 Stunden. Die Anfärbung der Zellen mit PHB-Granula erfolgte mittels Nilrot. Die Maßstäbe entsprechen 1 µm (B). Es konnten keine Unterschiede sowohl mittels Gaschromatographie als auch mit Hilfe der Mikroskopie festgestellt werden.

Insgesamt zeigte das Ergebnis, dass eine Deletion des Gens H16_A0225 keine sichtbaren Auswirkungen auf den PHB-Gehalt bzw. PHB-Metabolismus hat.

Da die bisherigen Ergebnisse keine eindeutige Beteiligung des PGAPs A0225 am PHB-Stoffwechsel nachweisen konnten, sollte in den nachfolgenden Experimenten überprüft werden, ob das Protein biochemische Funktionen aufweist, die in Zusammenhang mit einer Phospholipase-Aktivität stehen. Dazu wurde das Gen H16_A0225 mit einem N-terminalen Hexa-Histidintag in den Expressionsvektor pET28a kloniert, in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformiert

und anschließend rekombinant aufgereinigt. Dies wurde mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule durchgeführt.

Mit dem aufgereinigten, rekombinanten Protein (Abbildung 1 im Anhang) wurden im Anschluss erste biochemische Charakterisierungsexperimente durchgeführt. Dazu zählten ein turbidimetrischer Test zur Bestimmung einer putativen Depolymeraseaktivität sowie die Bestimmung der möglichen Esterase- und Lipase-Aktivitäten.

Für den turbidimetrischen Depolymerase-Test wurde eine Suspension nativer PHB-Granula (nPHB) in einem Tris-HCI-Puffer mit CaCl₂ auf eine OD₆₅₀ von etwa 1 bei 43°C im Spektrophotometer eingestellt. Die Zugabe der Enzymlösung A0225 zur Suspension sollte bei aktiver Depolymeraseaktivität eine Trübungsabnahme hervorrufen. Als Positivkontrolle diente aufgereinigtes PhaZ7. Nach Zugabe des Proteins A0225 konnte allerdings keine Abnahme der Trübung nach 20 Minuten gemessen werden, wohingegen die Positivkontrolle eine schnelle Trübungsabnahme der Polymersuspension innerhalb von 5 Minuten verursachte (Abbildung 2A im Anhang). Da ein Effekt bei PhaZ7 beobachtet wurde, konnte die native Form der PHB-Granula bestätigt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass das aufgereinigte Protein A0225 keine Depolymeraseaktivität aufweist. Im nächsten Experiment wurde die Esterase- bzw. Lipase-Aktivität von A0225 untersucht. Dafür wurden verschiedene Substrate verwendet: die C16-Verbindung p-Nitrophenylcaprat, die C8-Verbindung ρ -Nitrophenylacetat sowie die C22-Verbindung ρ -Nitrophenylpalmitat. Mit den ersten beiden genannten Substraten sollte die Esteraseaktivität detektiert werden und die C22-Verbindung sollte den Nachweis einer potenziellen Lipase-Aktivität ermöglichen. Die Hydrolyse des Substrats bewirkt die Freisetzung von p-Nitrophenol, was spektrophotometrisch bei 405 nm und 40°C bestimmt werden kann. Das Ergebnis zeigte, dass das Protein A0225 in der Lage war, ρ -Nitrophenylacetat (C8) schnell umzusetzen, wohingegen eine langsamere Zunahme der Gelbfärbung für ρ -Nitrophenylcaprat (C16) beobachtet werden konnte. Keine Hydrolyse erfolgte in Gegenwart des Substrats ρ -Nitrophenylpalmitat (C22). Für die eingesetzte Positivkontrolle (Lipase) konnte eine schnelle Freisetzung von p-Nitrophenol nachgewiesen werden (Abbildung 2B im Anhang). Damit konnte geschlussfolgert werden, dass die putative Patatin-ähnliche Phospholipase A0225

66

eine Esteraseaktivität aufweist, aber nicht in der Lage ist, Ester von langkettigen Fettsäuren zu hydrolysieren.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das PHB-assoziierte Protein A0225 in vivo keinen sichtbaren Effekt auf den PHB-Metabolismus ausübte. In vitro konnte eine Esterase-, aber keine Lipaseaktivität nachgewiesen werden. Die Hypothese, dass A0225 als Lipase Phospholipide am PHB-Granulum synthetisiert und somit eine plausible Erklärung für die in der Literatur beschriebenen Phospholipide am PHB-Granulum liefert, konnte anhand dieser biochemischen Charakterisierungsexperimente nicht bestätigt werden. Auch die Annahme, dass A0225 Phospholipide, die fälschlicherweise an PHB-Granula gebunden haben, abbaut, konnte nicht gezeigt werden. Um dies zu überprüfen, wäre es möglich, nPHB-Granula aus der Deletionsmutante Δ H16 A0225 zu isolieren und Unterschiede des Phospholipidgehaltes im Vergleich zum Wildtyp mittels Dünnschichtchromatographie zu analysieren. Weitere Experimente mit A0225 wurden allerdings nicht im Zuge dieser Arbeit durchgeführt.

3.2 Untersuchungen zur *in vivo* Lokalisation von Phospholipiden

Das *in vivo* Vorhandensein von Phospholipiden als Teil der PHB/PHA-Granulaoberfläche ist in der Literatur umstritten (Beeby *et al.*, 2012; Griebel *et al.*, 1968; Jendrossek und Pfeiffer, 2014; Grage *et al.*, 2009). Die Grundlage für die Annahme, dass PHB-Granula neben einer Reihe von funktionalen und strukturellen Proteinen auch aus Phospholipiden aufgebaut sind, beruht größtenteils auf den *in vitro* Daten von Griebel *et al.*, 1968. Aufgrund der Tatsache, dass es während einer Isolation der PHB-Granula zu einer artifiziellen Phospholipidbindung kommen kann, können diese *in vitro* Ergebnisse als unzureichend betrachtet werden. Die bisher durchgeführten *in vitro* Experimente mit A0225 erbrachten keinen Hinweis für die mögliche Synthese von Phospholipiden am Granulum. Um einen aussagekräftigen *in vivo* Beweis für die Präsenz von Phospholipiden an PHB-Granula zu finden, sollte die *in vivo* Lokalisation von Proteinen untersucht werden, die eine Affinität zu Phospholipiden aufweisen.

3.2.1 C2-Domäne des Lactadherins (LactC2) in *R. eutropha* H16

Als eines dieser Phospholipidbindeproteine wurde LactC2 untersucht. Dabei handelt es sich um die C2-Domäne des Milchproteins Lactadherin aus dem Rind. Die C2-Domäne bindet dabei spezifisch an Phospholipide *in vivo* (Andersen *et al.*, 2000; Andersen *et al.*, 1997). Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Lokalisation eines Fusionsproteins aus LactC2 und einem Fluoreszenzprotein mikroskopisch zu untersuchen.

Dafür wurde ein rekombinantes Protein kloniert, bei dem der C-Terminus des Fluoreszenzproteins DsRed2_{EC} an den N-Terminus der C2-Domäne des Lactadherins (LactC2) fusioniert wurde. Dieses Konstrukt wurde in den *broad host range* Vektor pCM62 ligiert, wo es unter die Kontrolle des konstitutiven Promotors des *R. eutropha* Operons *phaCAB* gestellt war. Um die Funktionalität des klonierten Plasmides pCM62::P_{phaC}-dsred2_{EC}-lactC2 zu überprüfen, wurde es in *E. coli* JM109 transformiert und die Expression des Fusionsproteins mikroskopisch analysiert (Abbildung 6). Als Kontrolle wurde der zuvor klonierte Vektor pCM62::P_{phaC}-dsred2_{EC} genutzt. Die mikroskopischen Daten zeigten, dass DsRed2_{EC} ohne LactC2 eine einheitliche zytoplasmatische Fluoreszenz aufwies (Abbildung 6A). Dies bestätigte

die Löslichkeit des Fluoreszenzproteins DsRed2_{EC}. Im Gegensatz dazu konnte bei dem Fusionsprotein DsRed2_{EC}-LactC2 eine Lokalisation an der bakteriellen Zellmembran beobachtet werden. Vereinzelt kam es auch zu Fluoreszenzspots in der Zellperipherie in der Nähe der Zellpole (Abbildung 6B). Dabei könnte es sich um Artefakte aufgrund des Überexpressionseffektes gehandelt haben. Die Ergebnisse bestätigten, dass das Fusionsprotein DsRed2_{EC}-LactC2 in der Lage ist, an Phospholipide in der Zellmembran von *E. coli in vivo* zu binden. Es konnte ausgeschlossen werden, dass die Bindung durch DsRed2_{EC} hervorgerufen wurde, da DsRed2_{EC} allein eine lösliche Fluoreszenz zeigte.



Abbildung 6: Expression von DsRed2_{EC} sowie DsRed2_{EC}-LactC2 in *E. coli* JM109. Die Expression des Fluoreszenzproteins DsRed2_{EC} zeigte eine gleichmäßig verteilte Fluoreszenz im Zytoplasma (A). Das Fusionsprotein DsRed2_{EC}-LactC2 lokalisierte an der Zellmembran. Vereinzelt konnten auch Foci an den Zellpolen wahrgenommen werden (B). Von links nach rechts: Phasenkontrast, DsRed2_{EC}-Kanal. Die Maßstäbe entsprechen 2 μ m.

Anschließend sollte überprüft werden, ob das Fusionsprotein auch in R. eutropha H16 sowohl an die Zellmembran als auch an potenziell vorhandene Phospholipide der PHB-Granulaoberfläche bindet. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden die eingesetzten R. eutropha H16 Stämme unter PHB-permissiven Bedingungen kultiviert. Als Kontrolle wurde zuerst das Plasmid pCM62::PphaCdsred2_{EC} in R. eutropha H16 WT konjugiert. Die Mikroskopie dieses Stammes ergab eine lösliche rote Fluoreszenz innerhalb des Zytoplasmas (Abbildung 7A). Das Fluoreszenzprotein DsRed2_{EC} wurde damit sowohl in *E. coli* als auch in *R. eutropha* löslich exprimiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass im Bereich der im Phasenkontrast sichtbaren PHB-Granula keine DsRed2_{EC}-Fluoreszenz detektiert wurde. DsRed2_{EC} ohne LactC2 war demnach nicht in der Lage, an PHB-Granula zu binden. Nach der Konjugation des Stammes E. coli S17-1 pCM62::P_{phaC}-dsred2_{EC}*lactC2* mit *R. eutropha* H16 *AphaC* konnte eine gleichmäßige Fluoreszenz an der Zellmembran detektiert werden (Abbildung 7B). Eine Bildung von PHB-Granula in R. eutropha H16 AphaC ist aufgrund der Deletion der PHB-Synthase PhaC1 nicht möglich. Das Ergebnis verifizierte, dass das Fusionsprotein DsRed2_{EC}-LactC2 auch

in *R. eutropha* H16 an die Zellmembran binden kann. Um zu untersuchen, ob DsRed2_{EC}-LactC2 auch an PHB-Granula bindet und damit die *in vivo* Anwesenheit von Phospholipiden bestätigt, wurde das Fusionsprotein in *R. eutropha* H16 WT exprimiert. Das Ergebnis zeigte, dass DsRed2_{EC}-LactC2 an die Zellmembran bindet, aber keine Fluoreszenz im Bereich der PHB-Granula sichtbar wurde (Abbildung 7C). Um zu beweisen, dass es sich bei den im Phasenkontrast sichtbaren, dunklen globulären Regionen um PHB-Granula handelt, sollten die PHB-Granula markiert werden. Dafür wurde das Fusionsprotein eYFP-PhaC1^{C319A} genutzt, welches spezifisch an der Oberfläche der Granula lokalisiert. Aufgrund der C319A Mutation, die zur Inaktivierung der PHB-Synthase PhaC1 führt, kommt es jedoch zu keiner Veränderung des PHB-Gehaltes in *R. eutropha* H16 (Pfeiffer und Jendrossek, 2012). Eine weitere Möglichkeit des Nachweises der PHB-Granula wäre die Nilrotfärbung gewesen. Allerdings wäre damit keine Differenzierung zwischen der Nilrot- und DsRed2_{EC}-Fluoreszenz möglich gewesen.



Abbildung 7: Expression des Fusionsproteins $DsRed_{Ec}$ -LactC2 in *R. eutropha* H16. Die *R. eutropha* H16 Zellen wurden unter PHB-permissiven Bedingungen bei 30°C kultiviert. Die Expression des Fluoreszenzproteins $DsRed_{EC}$ in *R. eutropha* H16 Wildtyp-Zellen zeigte eine zytoplasmatische Fluoreszenz (A). In Abwesenheit von PHB ($\Delta phaC1$) hatte das Fusionsprotein DsRed_{EC}-LactC2 an die Membran gebunden (B). Unter PHB-permissiven Bedingungen war eine Membranlokalisation des Fusionsproteins $DsRed_{EC}$ -LactC2 zu beobachten. PHB-Granula waren als schwarze Granula im Phasenkontrastbild zu erkennen (C). Eine gleichzeitige Expression der Fusionsproteine $DsRed_{EC}$ -LactC2 und eYFP-PhaC1^{C319A} zeigte keine Kolokalisation der PHB-Granula mit der C2-Domäne von LactC2 (D). Die Maßstäbe entsprechen 2 µm. Von links nach rechts: Phasenkontrast, $DsRed_{EC}$ -Kanal, eYFP-Kanal, Überlagerung der Fluoreszenzkanäle.

Die beiden Fusionsproteine DsRed2_{EC}-LactC2 sowie eYFP-PhaC1^{C319A} wurden in *R. eutropha* H16 WT konjugiert. Dabei zeigte sich, dass die eYFP-Fluoreszenz mit den dunklen Regionen im Phasenkontrast kolokalisierte, was bestätigte, dass es sich um PHB-Granula handelte. Im DsRed2_{EC}-Fluoreszenzkanal wurde wiederholt sichtbar, dass DsRed2_{EC}-LactC2 nur an die Zellmembran bindet, aber keine Kolokalisation mit dem Fusionsprotein eYFP-PhaC1^{C319A} festgestellt werden konnte (Abbildung 7D).

Mit diesem Ergebnis konnte bestätigt werden, dass die C2-Domäne von Lactadherin an die Zellmembran von *R. eutropha* H16 bindet, aber nicht an PHB-Granula. Schlussfolgernd kann angenommen werden, dass es *in vivo* keine Phospholipide auf der PHB-Granulaoberfläche gibt.

3.2.2 Expression des Fusionsproteins DsRed2_{EC}-LactC2 in *R. eutropha* H16 Phasinmutanten

Phasine, insbesondere das Hauptphasin PhaP1, stellen die Strukturproteine der PHB-Granulaoberfläche dar, die den größten Teil aller PHB-Granula-assoziierten Proteine (PGAPs) ausmachen (Pötter *et al.*, 2004; Sznajder *et al.*, 2015). Um zu überprüfen, ob die Anwesenheit der Phasine auf der PHB-Granulaoberfläche eine Interaktion mit Phospholipiden verhindert, wurde die Lokalisation des Fusionsproteins DsRed2_{EC}-LactC2 in verschiedenen *R. eutropha* H16 Phasinmutanten untersucht (Abbildung 8). Dafür wurde das Plasmid pCM62::P_{phaC}-dsred2_{EC}-lactC2 in die *R. eutropha* H16 Phasindeletionsmutanten ($\Delta phaP1$, $\Delta phaP1$ - $\Delta phaP4$ und $\Delta phaP1$ - $\Delta phaP5$) konjugiert und unter PHB-permissiven Bedigungen exprimiert.

Die Expression des Fusionsproteins DsRed2_{EC}-LactC2 in *R. eutropha* H16 $\Delta phaP1$ zeigte eine Lokalisation an der Zellmembran, aber nicht an den PHB-Granula. Die Anwesenheit der PHB-Granula wurde durch das Fusionsprotein eYFP-PhaC1^{C319A} bestätigt (Abbildung 8A, untere Reihe). Im Gegensatz zu *R. eutropha* WT kam es im $\Delta phaP1$ -Hintergrund zur Bildung weniger großer PHB-Granula, wie es schon von Wieczorek *et al.*, 1995 beschrieben wurde. Wurden die vier Phasine PhaP1, PhaP2, PhaP3 und PhaP4 auf einmal deletiert, konnte ein gleicher Phänotyp wie bei der Deletion von PhaP1 beobachtet werden (Abbildung 8B). Eine Bindung von DsRed2_{EC}-LactC2 an PHB-Granula konnte auch hier nicht nachgewiesen werden. Die vorhandenen PHB-Granula konnten mit Nilrot angefärbt werden (Abbildung 8B,

untere Reihe). Wie auch bei den vorherigen Stämmen konnte beim Stamm *R. eutropha* H16 $\Delta phaP1-\Delta phaP5$ keine Bindung des Fusionsproteins DsRed2_{EC}-LactC2 an PHB-Granula gezeigt werden, sondern lediglich eine zytoplasmatische Membranfluoreszenz (Abbildung 8C).



Abbildung 8: Expression des Fusionsproteins DsRed2_{EC}-LactC2 in *R. eutropha* H16 Phasinmutanten. Ko-Expression der Fusionsproteine DsRed2_{EC}-LactC2 und eYFP-PhaC1^{C319A} in *R. eutropha* H16 $\Delta phaP1$ (A). Expression des Fusionsproteins DsRed2_{EC}-LactC2 in *R. eutropha* H16 $\Delta phaP1$ - $\Delta phaP4$ (B). Lokalisation des Fusionsproteins DsRed2_{EC}-LactC2 in *R. eutropha* H16 $\Delta phaP1$ - $\Delta phaP5$ (C). Die untere Reihe zeigt die Färbung der PHB-Granula mit Nilrot bzw. PhaC1^{C319A}; von links nach rechts: Phasenkontrast, Nilrot-Kanal, Überlagerung (B, C). Es konnte keine Bindung des Fusionsproteins DsRed2_{EC}-LactC2 an PHB-Granula nachgewiesen werden. Die Maßstäbe entsprechen 2 µm.

Die Experimente zeigten, dass die Abwesenheit der Phasine keine Bindung von DsRed2_{EC}-LactC2 an die PHB-Granulaoberfläche bewirkte. Dies suggeriert, dass Phospholipide nicht an PHB-Granula binden können, auch nicht bei strukturellen Veränderungen aufgrund der Phasindeletionen.

3.2.3 Expression weiterer Fusionsproteine mit LactC2

Bei dem Fluoreszenzprotein DsRed2_{EC} handelt sich um ein tetrameres Protein mit einer Monomergröße von etwa 26 kDa (Day und Davidson, 2009; Baird et al., 2000). Ein Experiment nächstes bestand darin. zu untersuchen, ob der Oligomerisierungszustand des Proteins DsRed2_{EC} eine Interaktion von LactC2 mit möglicherweise vorkommenden Phospholipiden auf der PHB-Granulaoberfläche beeinflusst. Dafür wurden zwei monomere Fluoreszenzproteine anstelle von DsRed2_{FC} genutzt. Zum einen das schneller reifende *superfolder*GFP (sfGFP) sowie mTurquoise2 aus der Gruppe der Cyan-Fluoreszenzproteine (Day und Davidson, 2009; Goedhart et al., 2012). Es wurden die zwei Konstrukte pCM62::PphaC-sfgfplactC2 und pCM62::PphaC-mturquoise2-lactC2 von der AG Forchhammer von der Universität Tübingen erhalten und in R. eutropha H16 WT konjugiert. Die anschließenden mikroskopischen Untersuchungen unter PHB-permissiven Bedingungen konnten zeigen, dass die beiden Fusionsproteine sfGFP-LactC2 und mTurquoise2-LactC2 in R. eutropha H16 WT exprimiert wurden (Abbildung 9 und 10). Bei der Lokalisation der Fusionsproteine konnte eine gleichmäßige Fluoreszenz an der Zellmembran beobachtet werden, wie dies auch bei DsRed2_{EC-}LactC2 der Fall war. Abermals konnte keine Bindung von LactC2 an die PHB-Granula nachgewiesen werden. Die Färbung mit Nilrot bestätigte, dass es sich bei den im Durchlicht sichtbaren dunklen Granula um PHB handelte (Abbildung 10B). Die Expression beider Fusionsproteine führte zu keiner sichtbaren Veränderung der Zellmorphologie und -vitalität.



sfGFP-LactC2

Abbildung 9: Expression des Fusionsproteins sfGFP-LactC2 in *R. eutropha* H16 WT. Das Fusionsprotein sfGFP-LactC2 lokalisierte unter PHB-permissiven Bedingungen an der Membran von *R. eutropha* H16, jedoch nicht an PHB-Granula. Der Maßstab entspricht 2 μ m.



Abbildung 10: Expression des Fusionsproteins mTurquoise2-LactC2 in *R. eutropha* H16 WT. Die Expression des Fusionsproteins mTurquoise2-LactC2 zeigte unter PHB-permissiven Bedingungen eine Membranbindung der LactC2-Domäne (von links nach rechts: Durchlicht, Fluoreszenzkanal, Überlagerung) (A). Nilrot-gefärbte PHB-Granula kolokalisierten nicht mit dem Fusionsprotein (von links nach rechts: Durchlicht, Nilrot-Kanal, mTurquoise2-Kanal, Überlagerung) (B). Die Maßstäbe entsprechen 2 μm.

3.2.4 Mikroskopie isolierter PHB-Granula aus *R. eutropha* WT H16 DsRed2_{EC}-LactC2

Die Annahme, dass sich an der PHB-Granulaoberfläche Phospholipide befinden, beruht auf in vitro Ergebnissen isolierter PHB-Granula (Griebel et al., 1968). Während der Isolation von nativen PHB-Granula kann es zu einer artifiziellen Bindung von Phospholipiden kommen, die anschließend nachgewiesen werden. Ein Ziel war es, zu untersuchen, ob eine artifizielle Bindung von Phospholipiden während der PHB-Granulaisolierung erreicht werden kann. Grundlage dafür waren *R. eutropha* H16 Zellen, die das Fusionsprotein DsRed2_{FC}-LactC2 exprimierten. Eine Bindung von DsRed2_{EC}-LactC2 an artifiziell gebundene Phospholipide auf der PHB-Granulaoberfläche sollte so mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. R. eutropha H16 WT pCM62::P_{phaC}-dsred2_{EC}-lactC2 wurde in NB-Medium mit 2 % (w/v) Na-Glukonat kultiviert, um möglichst viel PHB anzureichern. Die PHB-Granula wurden nach dem Aufschluss der Zellen über zwei Glycerin-Dichtegradientenzentrifugationen isoliert. und anschließend gewaschen mikroskopisch untersucht. Als Kontrolle diente isoliertes PHB aus R. eutropha H16 WT Zellen, die das Fluoreszenzprotein DsRed2_{EC} exprimierten.

Das mikroskopische Ergebnis zeigte, dass bei der Kontrolle ohne exprimierter C2-Domäne des Lactadherins PHB-Granula mit einer Größe von ca. 0,5 µm im DIC-Kanal sichtbar waren. Es konnte allerdings keine Fluoreszenz im DsRed2_{FC}-Kanal nachgewiesen werden. Damit konnte angenommen werden. dass das Fluoreszenzprotein DsRed2_{EC} während der PHB-Isolierung nicht artifiziell an PHB-Granula gebunden hatte. Gleichzeitig bestätigte das Ergebnis die in vivo Daten (Abbildung 11). Im Vergleich dazu konnten bei isolierten PHB-Granula aus Zellen mit DsRed2_{EC}-LactC2-Expression ebenfalls PHB-Granula mit einer Größe von etwa 0,5 µm im DIC-Kanal beobachtet werden. Im Fluoreszenzkanal konnten gelegentlich rote Fluoreszenzsignale detektiert werden, die bei der Überlagerung von DIC- und DsRed2_{EC}-Kanal eine Kolokalisation mit den PHB-Granula bestätigten. Schlussfolgernd konnte mit Hilfe von DsRed2_{EC}-LactC2 gezeigt werden, dass Phospholipide artifiziell während der PHB-Isolierung an PHB-Granula binden können, was wiederum eine *in vitro* Bindung von DsRed2_{EC}-LactC2 bewirkt. Dies könnte die nachgewiesenen geringen Phospholipidmengen isolierter PHB-Granula von Griebel et al., 1968 erklären.



Abbildung 11: Isolierte PHB-Granula von *R. eutropha* H16. Isolierte PHB-Granula von *R. eutropha* H16 Zellen, die das Fusionsprotein DsRed2_{EC}-LactC2 exprimierten, wiesen gelegentlich eine DsRed2_{EC}-Fluoreszenz auf (A). Keine DsRed2_{EC}-Fluoreszenz konnte hingegen bei PHB-Granula detektiert werden, die aus *R. eutropha* H16 Zellen isoliert wurden, die nur das Fluoreszenzprotein DsRed2_{EC} exprimierten (B). Die Maßstäbe entsprechen 0,5 μ m.

3.2.5 Lokalisation von DsRed2_{EC}-LactC2 in α -Proteobakterien

Die bisherigen Ergebnisse konnten zeigen, dass das Fusionsprotein DsRed2_{EC}-LactC2 in dem β -Proteobakterium *R. eutropha* H16 an die Membran bindet, aber keine Interaktion mit PHB-Granula stattfindet. Eine Phospholipidschicht der PHB-Granula würde im Gegensatz zur Zellmembran eine positive Membrankrümmung aufweisen, die möglicherweise einen Einfluss auf die Bindung des Fusionsproteins hätte. Um dies zu überprüfen, wurde die Expression des Fusionsproteins DsRed2_{EC}-LactC2 in dem α -Proteobakterium *M. gryphiswaldense* MSR-1 untersucht. Letzteres ist in der Lage, sowohl PHB als auch Magnetosomen zu bilden. Bei den Magnetosomen handelt es sich um Organellen magnetotaktischer Bakterien, die von einer Membran umgeben sind (Grünberg *et al.*, 2004). Die Zusammensetzung der Magnetosomen-Membran ähnelt dabei sehr der der Zellmembran, besitzt aber eine positive Membrankrümmung (Komeili, 2012; Scheffel *et al.*, 2006).

Die *M. gryphiswaldense* MSR-1 WT Zellen mit den entsprechenden Plasmiden sowie das Medium FSM wurden von Dr. Daniel Pfeiffer vom Lehrstuhl für Mikrobiologie (Universität Bayreuth) erhalten. Die M. gryphiswaldense MSR-1 WT Zellen mit dem Plasmid pBAM::PmamDC-dsRed2_{EC}-c1-lactC2 wurden bei 30°C in 15 ml Falcontubes unter sauerstoffarmen Bedingungen bei 120 rpm angezogen und anschließend mikroskopiert. Das Ergebnis zeigte eine filamentöse Fluoreszenz des Fusionsproteins DsRed2_{EC}-LactC2, die nicht mit den im Durchlicht sichtbaren PHB-Granula kolokalisierte (Abbildung 12A, oberen zwei Reihen). Weiterhin konnte auch eine Bindung des Fusionsproteins an die Zellmembran beobachtet werden (Abbildung 12A, untere Reihe). Im Vergleich zu PHB-Granula mit einem Durchmesser von 200 - 400 nm sind individuelle Magnetosomen mit einem Durchmesser von rund 35 nm nicht im Lichtmikroskop sichtbar, da sie unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops liegen. Aufgrund ihrer kettenförmigen Anordnung kommt es allerdings zu einer filamentösen Fluoreszenz, wenn rekombinante Proteine an Magnetosomen binden. Dies konnte in Abbildung 12A bestätigt werden. Um eindeutig zu zeigen, dass es sich bei der detektierten filamentösen Fluoreszenz um Magnetosomen-Ketten handelte, wurde M. gryphiswaldense MSR-1 mit dem Fusionsprotein MamC-eGFP mikroskopiert. Bei MamC handelt es sich um ein Magnetosomen-spezifisches Protein und eine Fusion mit eGFP führt zu einer sichtbaren Kolokalisation mit den Magnetosomen. Das Ergebnis ist in Abbildung 12B

dargestellt. Dabei konnte wie bei dem Fusionsprotein $DsRed2_{EC}$ -LactC2 eine filamentöse Fluoreszenz beobachtet werden, die bestätigt, dass $DsRed2_{EC}$ -LactC2 an die Membran der Magnetosomen binden kann. Eine positive Membrankrümmung hat demnach keine Auswirkungen auf die Interaktion von LactC2 mit den Phospholipiden. Da das rekombinante Protein $DsRed2_{EC}$ -LactC2 auch in *M. gryphiswaldense* MSR-1 WT nicht an PHB-Granula gebunden hatte, konnten die Ergebnisse aus *R. eutropha* H16 WT verifiziert werden.



Abbildung 12: Expression von DsRed2_{EC}-LactC2 und MamC-eGFP in *M. gryphiswaldense* MSR-1 WT. Die Zellen wurden in FSM-Medium bei 30°C angezogen. Zellen mit dem Fusionsprotein DsRed2_{EC}-LactC2 zeigten eine filamentöse Fluoreszenz (A, oberen zwei Reihen) oder eine Fluoreszenz an der Zellmembran (A, untere Reihe). In Zellen mit dem Fusionsprotein MamC-eGFP, welches an Magnetosomen bindet, kolokalisierte die Fluoreszenz mit Magnetosomen, aber nicht mit PHB-Granula (B). Von links nach rechts: Durchlicht, Fluoreszenzkanal und Überlagerung. Die Maßstäbe entsprechen 2 µm.

3.2.6 Lokalisation von DsRed2_{EC}-LactC2 in γ-Proteobakterien

Die bisherigen Ergebnisse aus α - sowie β -Proteobakterien konnten keine Phospholipidmembran um PHB-Granula nachweisen. Im nächsten Schritt galt es, zu überprüfen, ob MCL (*medium chain length*) PHA-akkumulierende Bakterien, wie das γ -Proteobakterium *P. putida*, eine Phospholipidschicht um die PHA-Granula haben. Dafür wurden *P. putida* GPo1 WT Zellen, die das Fusionsprotein sfGFP-LactC2 exprimierten, kultiviert. Dabei wurden die Zellen einerseits unter PHA-permissiven Bedingungen mit Natriumoktanoat in Mineralsalzmedium und andererseits ohne Natriumoktanoat angezogen. Die Lokalisation der PHA-Granula sowie der Fusionsproteine wurde anschließend mikroskopisch analysiert (Abbildung 13).



Abbildung 13: Expression des Fusionsproteins sfGFP-LactC2 in *P. putida* GPo1. Das Fusionsprotein sfGFP-LactC2 lokalisierte bei Abwesenheit von PHA-Granula in Mineralsalzmedium an der Zellmembran von *P. putida* GPo1 (A). Die Zugabe von Natriumoktanoat in Mineralsalzmedium induzierte die Bildung von PHA-Granula, welche sowohl im Durchlicht als dunkle Granula sichtbar waren als auch mit Nilrot angefärbt werden konnten (B). Auch unter PHA-permissiven Bedingungen war keine Kolokalisation des Fusionsproteins sfGFP-LactC2 mit PHA-Granula zu beobachten (C). Die Maßstäbe entsprechen 2 μ m.

Ohne Zugabe von Natriumoktanoat konnten keine gebildeten PHA-Granula im Durchlicht beobachtet werden. Die Lokalisation des rekombinanten Proteins sfGFP-LactC2 zeigte eine Bindung an die Zellmembran (Abbildung 13A). Die durch Natriumoktanoat induzierte Bildung von PHA konnte mittels Nilrot nachgewiesen werden (Abbildung 13B). Allerdings konnte keine Kolokalisation der PHA-Granula mit dem Fusionsprotein sfGFP-LactC2 nachgewiesen werden (Abbildung 13C). Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass auch MCL PHA-Granula keine Phospholipidschicht besitzen. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass weder bei α -, β - noch γ -Proteobakterien Phospholipide auf der PHB/PHA-Granulaoberfläche vorhanden sind.

3.2.7 Expression der RNase E aus *E. coli* in *R. eutropha* H16

RNase E aus *E. coli* stellt neben der C-Domäne von Lactadherin ein weiteres Phospholipidbinde-Protein dar. Verantwortlich für die Bindung an Phosphatidylserin (PS) und auch Phosphatidylethanolamin (PE) ist das Segment A des Proteins (Khemici *et al.*, 2008).

Der Vektor pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-rne wurde kloniert, in *E. coli* S17-1 transformiert und in *R. eutropha* H16 WT konjugiert. Um zu überprüfen, ob das rekombinante Protein eYFP-Rne in der Lage ist, Phospholipide zu binden, wurde es in *R. eutropha* H16 WT unter PHB-permissiven Bedingungen exprimiert. Die mikroskopischen *in vivo* Daten zeigten eine Bindung des Fusionsproteins eYFP-Rne an die Zellmembran, aber keine Interaktion mit den PHB-Granula, deren Anwesenheit mittels Nilrotfärbung nachgewiesen wurde (Abbildung 14). Das Ergebnis bestätigte einerseits, dass RNase E aus *E. coli* in der Lage ist, Phospholipide zu binden. Andererseits konnten keinerlei Hinweise auf die *in vivo* Präsenz von Phospholipiden um PHB-Granula aufgezeigt werden, was die Ergebnisse mit dem Fusionsprotein DsRed2_{EC}-LactC2 widerspiegelte.



Abbildung 14: Bindung von RNase E aus *E. coli* an Phospholipide in *R. eutropha* H16. Die Fusion des Membranproteins RNase E aus *E. coli* mit eYFP zeigte eine Fluoreszenz an der Zellmembran von *R. eutropha* H16 unter PHB-permissiven Bedingungen. PHB-Granula wiesen keine Fluoreszenz des Fusionsproteins auf (A). Die Färbung mit Nilrot bestätigte, dass es sich bei den im Durchlicht sichtbaren Granula um PHB-Granula handelte (B). Die Maßstäbe entsprechen 1 μm.

3.2.8 Lokalisation der Phosphatidylserin-Decarboxylase in R. eutropha H16

Bei Phosphatidylethanolamin (PE), welches durch Decarboxylierung von Phosphatidylserin (PS) entsteht, handelt sich es neben Phosphatidylglycerol/Cardiolipin um das wichtigste Phospholipid in R. eutropha (Horowitz und Sanders, 1994). Der Syntheseschritt der Decarboxylierung wird von der Phosphatidylserin-Decarboxylase katalysiert, die von dem Gen psd (H16 A1038) kodiert wird. Es wurde das Plasmid pBBR1MCS2::PphaC-eyfp-psd kloniert, in R. eutropha H16 WT konjugiert und anschließend unter PHB-permissiven Bedingungen exprimiert. Fluoreszenzmikroskopische in vivo Untersuchungen des rekombinanten Proteins eYFP-Psd in R. eutropha H16 WT zeigten, dass dieses Protein an der Zellmembran lokalisierte (Abbildung 15). Damit kann angenommen werden, dass die Decarboxylierung von PS kurz bevor oder nach Insertion von PE in die Membran stattfindet. Die Kolokalisation von eYFP-Psd mit den PHB-Granula konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Folglich stimmt dieses Ergebnis mit den vorherigen überein, wo keine Phospholipide an PHB-Granula in vivo detektiert werden konnten.



Abbildung 15: Expression der Phosphatidylserin-Decarboxylase (Psd) in *R. eutropha* H16 WT. Die Fusion des Enzyms Phosphatidylserin-Decarboxylase mit eYFP zeigte, dass das Protein an die Zellmembran von *R. eutropha* H16 WT gebunden hat, aber nicht an eine potenzielle Phospholipidschicht der im Durchlichtbild sichtbaren PHB-Granula. Die Zellen wurden in NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat kultiviert. Der Maßstab entspricht 2 μ m.

Die Ergebnisse, die in Absprache und enger Kooperation mit Mitgliedern der AGs Forchhammer (Universität Tübingen) und Schüler (Universität Bayreuth) erhalten wurden, konnten kürzlich in *Scientific Reports* publiziert werden (Bresan *et al.*, 2016).

3.3 PhaM – PAKKA-Motiv

Laut KEGG Genome Datenbank ist PhaM (H16 A0141) als hypothetisches Membranprotein annotiert. Bisherige Untersuchungen konnten allerdings keine experimentellen Hinweise aufzeigen. dass PhaM an der inneren Zytoplasmamembran lokalisiert ist. Weitere Experimente zur Charakterisierung von PhaM in Kombination mit Phänotyp-Analysen von *AphaM* Mutanten hingegen zeigten, dass es DNA-Bindungseigenschaften besitzt, was eine Kontrolle der Verteilung der PHB-Granula auf die Tochterzellen während der Replikation nahelegt (Pfeiffer et al., 2011). Nachfolgende Abbildung zeigt eine schematische Übersicht über die Lokalisation des Fusionsproteins eYFP-PhaM sowie der DNA im Verlauf der Zellteilung (Abbildung 16).

Üborlagonung

Durchlicht	eYFP	DAPI	DAPI eYFP	Überlagerung
0	•	~	•	Ø
-	-	~	*	-
60	1	1	1	and the second s
Cardo	1	1	1	0
and	٠,	~	~	No.

Abbildung 16: Lokalisation von eYFP-PhaM und der DNA während verschiedener Zellzyklusphasen in *R. eutropha* H16. Aufgenommene *R. eutropha* H16 WT Zellen mit einer Überexpression von eYFP-PhaM zeigten im Laufe der Zellteilung einen Verteilungsmechanismus der PHB-Granula auf die Tochterzellen, wobei dauerhaft eine Interaktion von PhaM mit der DAPI-gefärbten DNA beobachtet werden konnte. Ein postuliertes Modell der detektierten Phänotypen ist dargestellt (DNA – gestrichelt; eYFP-PhaM – grüne Kreise). Die Zellen wurden in NB-Medium + 0,2 % (w/v) Glukonat kultiviert. Die Maßstäbe entsprechen 1 μm.

Es wurden repräsentative Lokalisationsmuster ausgewählt, die mehrfach beobachtet werden konnten. Während aller dargestellten Phasen konnte eine Bindung von PhaM an die DNA beobachtet werden. Zu Beginn zeigte sich ein eYFP-PhaM-Focus, der mit der DAPI-gefärbten DNA in der Zellmitte kolokalisierte. Im Laufe des Zellwachstums konnte ein zweiter DNA-DAPI-Focus beobachtet werden. Daraus ergab sich folgender Phänotyp: in jeder Zellhälfte befand sich ein DNA-Komplex, der jeweils mit dem in der Teilungsebene befindlichen PhaM interagierte. Eine Zellinvagination fand zu diesem Zeitpunkt noch nicht statt. Mit dem weiteren Zellwachstum kam es zur Bildung eines zweiten eYFP-PhaM-Fluoreszenzsignals, welches sich wie das erste in der Zellmitte positionierte. Mit beginnender Zellteilung konnte ein drittes DNA-DAPI-Signal detektiert werden, welches sich zwischen beiden eYFP-PhaM-Foci befand und eine langgestreckte Ausprägung annahm. Nach erfolgreicher Zellteilung lagen zwei Tochterzellen vor, in deren Zellmitte sich ein eYFP-PhaM-Komplex befand. flankiert ieweils DNA-DAPIvon zwei Fluoreszenzsignalen.

Dieser beobachtete Verteilungsmechanismus der PHB-Granula während der Zellteilung in Zusammenhang mit einer DNA-Bindung verstärkt die Annahme einer wichtigen Rolle für PhaM.

Bioinformatische Analysen von PhaM ergaben, dass im N-Terminus von PhaM viele negativ-geladene Aminosäuren lokalisiert sind, wohingegen der C-Terminus von PhaM einen hohen Anteil an basischen Resten aufweist. Dieser Bereich aus insgesamt 24 Aminosäuren besitzt keine negativ-geladenen Aminosäuren wie Aspartat und Glutamat, aber viele Alanine, Proline und positiv-geladene Lysine, die zusammen ein sogenanntes PAKKA-Motiv bilden. Ein Alignment von PhaM mit einem paralogen (PHG287) sowie orthologen Protein (A0084) zeigte, dass bei diesen Proteinen ebenso ein erhöhter Anteil an Alaninen, Prolinen und Lysinen zu finden ist (Abbildung 17). Bei dem Genprodukt PHG287 handelt es sich um ein konserviertes hypothetisches Protein. Das Gen RALTA_A0084 aus *Cupriavidus taiwanensis* kodiert für ein Histon-ähnliches Protein. Anhand des Alignments konnte gezeigt werden, dass alle drei Proteine ein PAKKA- sowie ein weiteres AKP-Motiv aufweisen. In nachfolgender Tabelle sind die prozentualen Anteile der Aminosäuren Alanin, Lysin und Prolin für PhaM, das konservierte hypothetische Protein sowie für das Histon-ähnliche Protein angegeben.

82

Tabelle 3	-1: Prozent	tualer /	Anteil d	der Amin	osäuren	Alanin,	Lysin	und	Prolin	von	PhaM,	einem
Paralog (PHG287) sc	owie Or	rtholog	(RALTA	_A0084)	von Pha	M (H16	_A01	41).			

	Aminosäurekomposition [%]						
Aminosäure	H16_A0141	PHG287	RALTA_A0084				
Ala	22,4	21,8	24,5				
Lys	5,3	19,0	4,1				
Pro	8,0	6,1	8,6				

		10	20	30		40	50
PHG287 H16_A0141 RALTA_A0084	MFGQ I PD F T MFGQ I PD F T	NGFDFMRR NGFDFMRR	LWGSGSGN LWGGGAGN	1PAGMMPGI 1PAGLMPGI	QAMTPP QAMTPP	MDLDDLDKF MDLEDLDKF	RIADLKA RIADLKA
	60	70		80	90	100	
PHG287 H16_A0141 RALTA_A0084	VESWLQLNT VESWLQLNT	NLLRTTIQ	GLEVQRAT GLEVQRAT	LVALQTFO	GNALSPE	AMQSAMEN\ AMQSAMEN\ AMQSAMEN\	/ARAANT /ARAANA
	110	120	130	14	0	150	160
PHG287 H16_A0141 RALTA_A0084	PSAAAPERD. PSAEAPQRT	AGADAD - S GADTGSGG	GTQQEPPA GAPAEPPA	AERPQAA AEPAQAA	ASDT ADEGDAA	DSALPPNAA DAAPAPNAA	A LWWD L L A LWWDML
	170		180	190	200) 2	211
PHG287 H16_A0141 RALTA_A0084	QQQFNQ I AS QQQFNQ I AS	SAAAAS I A SAAAASMV	PFGMGGVG PFGMGGFG	GFGTAA	SPDAA <mark>A</mark> APAGA <mark>A</mark>	K <mark>A</mark> SAKATKI QAAAAPKTI QAAPEPKPA	TAAKKAA DAPG <mark>KA</mark> A AAAG <mark>KA</mark> P
	221	231	24 ⁻	1	251	261	
PHG287 H16_A0141 RALTA_A0084	PAKKAAPAK SAGTGKPAA SAGTARPAA	KAAPAKKA RKAPAKKA K <mark>KAPAKK</mark> A	AAA - SPVA PAKKAAKA AARKSANA	KPLKDTFN KPARDAGN KPARKDSE	NKSSLLA NGEDNGK EGGEGSG	HLVAQTELE NG NG	DKKTVQT
	:	281	291	301		311	321
PHG287 H16_A0141 RALTA_A0084	VLTHLENTM	VSA I HKK <mark>G</mark> G <mark>NNG</mark> S <mark>NNG</mark>	AGEFTFPG ANGSSAA - AGGSVTN -	LFKVSAIC	QVPATKK	RFGKNPFTC	GQEQWFA
	331	341					
PHG287	AKPASVKVK	VRAMKKLK	DAAM				
RALTA_A0084							

Abbildung 17: Alignment von PhaM mit einem Paralog und Ortholog. Die Sequenz von PhaM (H16_A0141) wurde mit dem orthologen Protein A0084 aus *Cupriavidus taiwanensis* sowie dem Paralog PHG287 alignt. Das Genprodukt von RALTA_A0084 ist als konserviertes hypothetisches Protein annotiert und das Gen PHG287 auf dem Megaplasmid pHG1 kodiert für ein Histon-ähnliches Protein. Das Sequenzalignment erfolgte mit *"Multiple Sequence Alignment Clustal Omega"*. Die Software *"Jalview"* wurde für die Darstellung genutzt. Als *threshold* der Konservierung der einzelnen Aminosäuren wurde 20 genutzt. Die Farbintensität der markierten Aminosäuren zeigt die Stärke der Konservierung an. Alle Proteine weisen ein PAKKA- sowie AKP-Motiv auf. PhaM besitzt zudem ein zweites PAKKA-Motiv.

PhaM Wildtyp, kurz PhaM^{WT}, besitzt insgesamt zwei dieser PAKKA-Motive sowie angrenzend an das Doppelmotiv weitere Alanine, Proline und Lysine (Abbildung 17). Dabei kann angenommen werden, dass die positiv-geladenen Lysine mit dem negativ-geladenen Phosphatrückgrat der DNA interagieren und somit eine Histonähnliche Funktion einnehmen.

Um die DNA-Bindungseigenschaften dieses Bereiches von PhaM zu untersuchen, wurden zum einen gerichtete Punktmutationen innerhalb sowie *up*- und *downstream* der PAKKA-Motive eingeführt. Andererseits ermöglichte das Einbringen eines vorzeitigen Stopp-Codons die Charakterisierung eines C-terminal verkürzten PhaM (PhaM^{ΔC}). Abbildung 18A zeigt, dass die positiv-geladenen Lysinreste hauptsächlich gegen Isoleucine substituiert wurden (PhaM^{K1-2I}, PhaM^{K1-4I}, PhaM^{K3-8I}, PhaM^{K1-8I}, PhaM^{K3-6I}). Es wurde aber auch ein Konstrukt kloniert, bei dem die vier zentralen Lysine des Doppelmotives gegen negativ-geladene Glutamatreste ausgetauscht wurden, um eine mögliche Abstoßung mit den negativen Phosphatgruppen der DNA zu untersuchen (PhaM^{K3-6E}). Neben den Lysinresten wurde ein weiteres Augenmerk auf die Prolinreste gelegt. Es wurden Substitutionen außerhalb der PAKKA-Motive eingeführt (PhaM^{P1A}, PhaM^{P4A}), aber es standen besonders die Proline innerhalb der PAKKA-Motive im Vordergrund (Abbildung 18B). Jene wurden entweder durch Alanine (PhaM^{P2A}, PhaM^{P3A}, PhaM^{P2-3A}) oder Histidine substituiert (PhaM^{P2H}, PhaM^{P2-3H}).

Alle Konstrukte wurden mit Hilfe der gerichteten Mutagenese kloniert. Als Ausgangpunkt diente das Plasmid mit einer N-terminalen Fusion von PhaM an eYFP (pBBR1MCS2:: P_{phaC} -eyfp-phaM), um mikroskopische Charakterisierungen zu ermöglichen. Dieses Plasmid bewirkte aufgrund des konstitutiven PhaC1-Promotors eine Überexpression der Genprodukte. Die Plasmide wurden in *E. coli* S17-1 transformiert und anschließend in *R. eutropha* H16 WT konjugiert.

Α				
	210	220	230	240
PhaM ^{w⊤}	AASAGTGK	PAARKAPA	KKAPAKKAAI	KAKPARD
PhaM∆ ^C	AASAGT			
PhaM ^{K1-2I}	AASAGTGI	PAAR I APA	KKAPAKKAAI	KAKPARD
PhaM ^{K1-4I}	AASAGTGI	PAAR I APA		KAKPARD
PhaM ^{K3-8I}	AASAGTGK	PAARKAPA	IIAPAIIAA	IAIPARD
PhaM ^{K1-8I}	AASAGTGI	PAAR I APA	IIAPAIIAA	AIPARD
PhaM ^{K3-6I}	AASAGTGK	PAARKAPA	I I A P A I I A AI	KAKPARD
PhaM ^{K3-6E}	AASAGTGK	PAARKAPA	EEAPAEEAAI	KAKPARD
В				
-	210	220	230	240
PhaM ^{w⊤}	AASAGTGK	PAARKAPA	KKAPAKKAA	KAKPARD
PhaM ^{P1A}	AASAGTGK	AAARKAPA	KKAPAKKAA	KAKPARD
PhaM ^{P2A}	AASAGTGK	PAARKAAA	KKAPAKKAA	KAKPARD
PhaM ^{P2H}	AASAGTGK	PAARKA <mark>H</mark> A	KKAPAKKAA	KAKPARD
PhaM ^{P3A}	AASAGTGK	PAARKAPA	KKA <mark>A</mark> AKKAAI	KAKPARD
PhaM ^{P3H}	AASAGTGK	PAARKAPA	KKA<mark>H</mark>AKKAA I	KAKPARD
PhaM ^{P4A}	AASAGTGK	PAARKAPA	KKAPAKKAA	KAK <mark>A</mark> ARD
PhaM ^{P2-3A}	AASAGTGK	PAARKAAA	KKA<mark>A</mark>AKKAA	KAKAARD
PhaM ^{P2-3H}	AASAGTGK	PAARKA <mark>H</mark> A	KKAHAKKAA	KAKAARD

Abbildung 18: Gerichtete Mutagenese der Lysin- sowie Prolinreste im Bereich der C-terminalen PAKKA-Motive. Der C-Terminus von PhaM weist einen hohen Anteil von positiv-geladenen Lysinsowie Alanin- und Prolinresten auf (PAKKA-Motiv). Die PAKKA-Motive sowie die angrenzenden Lysine und Proline sind grau hervorgehoben. Blau markierte Reste zeigen Substitutionen der ausgewählten Lysin- sowie Prolinreste. Lysinreste wurden entweder durch neutrale Isoleucine (PhaM^{K1-2I}, PhaM^{K1-4I}, PhaM^{K3-8I}, PhaM^{K1-8I}, PhaM^{K3-6I}) oder negativ-geladene Glutamatreste (PhaM^{K3-6E}) ausgetauscht. Die Einführung eines vorzeitigen Stopp-Codons resultierte in einer verkürzten Form von PhaM (PhaM^{AC}) (A). Die Prolinreste wurden durch Alanin (PhaM^{P2A}, PhaM^{P3A}, PhaM^{P2-3A}) oder Histidin (PhaM^{P2H}, PhaM^{P3H}, PhaM^{P2-3H}) substituiert (B). Für das Alignment wurde die Software *"Multiple Sequence Alignment Clustal Omega"* verwendet. Die Darstellung erfolgte mit der Software *"Jalview"*.

3.3.1 Wechselwirkung eines C-terminalen verkürzten PhaM mit der DNA

Um phänotypische Unterschiede zu untersuchen, wurden die *R. eutropha* H16 Stämme mit den klonierten Mutagenese-Konstrukten mikroskopisch analysiert. Dafür wurden die Zellen jeweils in zwei NB-Vorkulturen kultiviert, um PHB-freie Zellen zu erhalten. Die Hauptkultur wurde schließlich mit 1/20 der zweiten Vorkultur in NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat bei 30°C angezogen. Es wurden alle zwei Stunden Proben genommen und mit DAPI sowie Nilrot angefärbt. Nilrot färbte PHB-Granula, wohingegen DAPI eine Visualisierung der DNA ermöglichte, was für mikroskopische Interaktionsstudien *in vivo* genutzt wurde (Chazotte, 2011; Spiekermann *et al.*, 1999).

Der Vergleich zwischen der Kontrolle mit pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{WT} und pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{ΔC} zeigte bereits erste phänotypische Unterschiede. Nach vier Stunden waren beim Wildtyp viele kleine gebildete PHB-Granulacluster im Durchlicht zu beobachten, was durch die Anfärbung mit Nilrot bestätigt wurde (Abbildung 19A, links oben). Innerhalb der gebildeten PHB-Cluster lagen individuelle PHB-Granula unterhalb der Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie. Frühere Transmissionselektronmikroskopische Aufnahmen konnten dies allerdings visualisieren (Pfeiffer et al. 2011, Wahl et al. 2012). Die Färbung der DNA mit DAPI zeigte Fluoreszenzfoci in der Zellmitte, die mit eYFP-PhaM^{WT} kolokalisierten. Die Einführung des Stopp-Codons bewirkte die Überexpression eines verkürzten PhaM ohne PAKKA-Doppelmotiv, was in der Bildung deutlich größerer Granula resultierte, die häufig an den Zellpolen oder in der Teilungsebene lokalisiert waren (Abbildung 19A, oben rechts). Wie auch bei der Kontrolle kam es zu einer Kolokalisation der eYFP-Fluoreszenz mit den PHB-Granula, wobei die eYFP-Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle deutlich fokussierter vorlag. Die DNA-DAPI-Färbung zeigte auch hier deutliche Foci in der Zellmitte. Bei der Überlagerung der Fluoreszenzkanäle DAPI und eYFP konnte allerdings festgestellt werden, dass die eYFP-PhaM^{ΔC}-Foci nicht mit der DNA interagierten (Abbildung 19C), bei eYFP-PhaM^{WT} aber eine deutliche Assoziation sichtbar war (Abbildung 19B). Damit wird deutlich, dass die Deletion des PhaM C-Terminus eine Ablösung von PhaM von der DNA bewirkt. Der Darstellungszeitpunkt nach vier Stunden wurde gewählt, da es repräsentativ das Ergebnis widerspiegelte.



Abbildung 19: *In vivo* Lokalisation der eYFP-PhaM^{WT} Überexpression im Vergleich zur eYFP-PhaM^{ΔC} Überexpression in *R. eutropha* H16 Zellen. Die Zellen mit den Überexpressionskonstrukten wurden in NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat und 150 µg/ml Kanamycin bei 30°C angezogen. Zum Zeitpunkt der Aufnahmen wurden die Zellen bereits 4 Stunden kultiviert. Zellen mit eYFP-PhaM^{WT} Überexpression zeigten diffuse eYFP-Fluoreszenzsignale, die mit der DAPI-gefärbten DNA kolokalisierten (**A, linke Reihe; B)**. Expression einer C-terminal verkürzten Version von PhaM (eYFP-PhaM^{ΔC}) resultierte in einer stärker fokussierten eYFP-Fluoreszenz und gleichzeitiger Ablösung von der DAPI-gefärbten DNA (**A, rechte Reihe; C**). Die Maßstäbe entsprechen 1µm. Von oben bis unten: Durchlicht, eYFP-Kanal, DAPI-Kanal sowie Überlagerung aller Kanäle. Die kleinen Bilder innerhalb der Durchlichtbilder zeigen Nilrot-gefärbte Zellen mit PHB-Granula.

3.3.2 Einfluss der C-terminalen PhaM-Lysinreste auf die DNA-PhaM-Interaktion

Die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass eine vorzeitige Einführung eines Stopp-Codons und damit Verkürzung des PhaM-Proteins eine Wechselwirkung zwischen PhaM und DNA unterbindet. Deshalb bestand der nächste Schritt darin, zu überprüfen, ob und welche Lysine des PAKKA-Bereiches dafür verantwortlich sind. Für die Mikroskopie wurden die *R. eutropha* H16 Stämme mit den veränderten Plasmiden äquivalent zum vorherigen Experiment kultiviert und alle zwei Stunden Proben genommen. Neben der Mikroskopie wurde ebenfalls das Wachstumsverhalten der einzelnen Stämme untersucht. Als Kontrollen dienten *R. eutropha* H16 pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{WT} sowie *R. eutropha* H16 pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{AC}, da hier zwei unterschiedlich charakteristische

Phänotypen festgestellt werden konnten. Neben diesen Stämmen waren jene Stämme Bestandteil des Experimentes, die verschiedene Lysinsubstitutionen innerhalb des PhaM-Proteins aufwiesen (Abbildung 21A).

Die OD-Messung bei 600 nm zeigte über einen Zeitraum von 48 Stunden ein ähnliches Wachstumsverhalten aller Stämme. Ein geringfügiger, aber nicht signifikanter Unterschied der OD₆₀₀-Werte (geringere OD₆₀₀-Werte) war bei den Stämmen mit einer Überexpression von eYFP-PhaM^{WT} und eYFP-PhaM^{K1-2I} in der exponentiellen Phase zu beobachten. Die Stämme mit den höchsten OD₆₀₀-Werten waren jene mit Lysinsubstitutionen innerhalb des PAKKA-Doppelmotives oder mit der Deletion des PhaM C-Terminus. Insgesamt konnte aber gezeigt werden, dass substituierte Lysinreste innerhalb des Bereiches des PAKKA-Doppelmotives bzw. eine C-terminale Deletion von PhaM zu keinen signifikanten Veränderungen im Zellwachstum führten (Abbildung 20).



Abbildung 20: Wachstumskurve von *R. eutropha* H16 Zellen mit PhaM-Überexpressionskonstrukten mit gerichteten Lysin-Mutationen. Die *R. eutropha* H16 Zellen mit den Überexpressionkonstrukten wurden in NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat und 150 μ g/ml Kanamycin bei 30°C kultiviert. Die Messung der OD₆₀₀ über einen Zeitraum von 48 Stunden erfolgte in Triplikaten. Bei allen Stämmen war ein ähnliches Wachstumsverhalten beobachtbar. Geringfügig niedrigere OD₆₀₀-Werte wies die Kontrolle eYFP-PhaM^{WT} auf, wohingegen der Stamm mit eYFP-PhaM^{AC} die höchsten OD₆₀₀-Werte erreichte.

Für die Mikroskopie wurden die Zellen der jeweiligen Stämme mit DAPI gefärbt. Die mikroskopische Untersuchung nach vier Stunden zeigte, dass die verschiedenen Stämme auch hier in zwei phänotypisch unterscheidbare Gruppen eingeteilt werden konnten. Zum einen Stämme mit einer Überexpression von eYFP-PhaM-Muteinen, die den Phänotyp von eYFP-PhaM^{WT} widerspiegelten. Andererseits Stämme, in denen die Überexpression eYFP-PhaM-Muteine phänotypische der Übereinstimmungen zu eYFP-PhaM^{∆C} hervorbrachte. Die Bildung von kaum im Durchlicht sichtbaren PHB-Clustern, eine diffuse eYFP-Fluoreszenz sowie eine klare Assoziation der Fluoreszenz mit der DAPI-Fluoreszenz war bei den R. eutropha H16 pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{K1-2I} Plasmiden Stämmen mit den bzw. pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{K1-41} erkennbar (Abbildung 21B). Es handelte sich dabei um Überexpressionen von PhaM mit Lysinmutationen außerhalb (eYFP-PhaM^{K1-2I}) sowie *downstream* und nur innerhalb des ersten PAKKA-Motives (eYFP-PhaM^{K1-4I}). Die Einführung von Lysinsubstitutionen innerhalb des PAKKA-Doppelmotives (eYFP-PhaM^{K3-8I}, eYFP-PhaM^{K1-8I}, eYFP-PhaM^{K3-6I}) ging mit einer klar fokussierten eYFP-Fluoreszenz, großen gut im Durchlicht sichtbaren PHB-Granula/Clustern sowie einer eingeschränkten Kolokalisation der eYFP- und DAPI-Fluoreszenz einher (Abbildung 21C). Der stärkste Phänotyp war dabei bei eYFP-PhaM^{K1-8I} zu beobachten, wo insgesamt 8 Lysine substituiert worden waren. Besonders auffällig war hierbei, dass pro Zelle meist nur ein großes PHB-Cluster zu sehen war. Bei Zellen nach der unmittelbaren Zellteilung zeigte sich zudem, dass nur eine der Tochterzellen ein solches PHB-Cluster aufweisen konnte und erst im Laufe des weiteren Wachstums neue PHB-Granula gebildet wurden. Wurden die positivgeladenen Lysine innerhalb des PAKKA-Doppelmotives gegen negativ-geladene Glutamatreste (eYFP-PhaM^{K3-6E}) ausgetauscht, zeigte sich ein ebenfalls stark ausgeprägter Phänotyp mit einem oder zwei PHB-Clustern pro Zelle. Auch eine Wechselwirkung zwischen eYFP-PhaM^{K3-6E} und der DNA konnte nicht beobachtet werden. Wie auch bei eYFP-PhaM^{AC} waren die PHB-Cluster der PhaM-Muteine eYFP-PhaM^{K3-8I}, eYFP-PhaM^{K1-8I}, eYFP-PhaM^{K3-6I} und eYFP-PhaM^{K3-6E} häufig in der Teilungsebene oder an den Zellpolen lokalisiert.



Abbildung 21: Phänotypische Charakterisierung der PhaM-Überexpressionskonstrukte mit gerichteten Lysin-Mutationen in *R. eutropha* H16 Zellen. Die Zellen wurden in NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat und 150 µg/ml Kanamycin bei 30°C kultiviert. Die Bilder wurden nach vier Stunden der PHB-Bildung aufgenommen. Das Sequenzalignment zeigt Wildtyp PhaM sowie PhaM-Muteine mit den substituierten Lysinresten (blau) und dem Doppel-PAKKA-Motiv (grau) (**A**). Substitutionen der Lysine *downstream* (eYFP-PhaM^{K1-2l}) sowie *downstream* und innerhalb des ersten PAKKA-Motives (eYFP-PhaM^{K1-4l}) resultierten in einem Phänotyp wie bei Wildtyp PhaM (**B**). Der Austausch der Lysinreste innerhalb des PAKKA-Doppelmotives gegen Isoleucine (eYFP-PhaM^{K3-8l}, eYFP-PhaM^{K1-8l}, eYFP-PhaM^{K3-6l}) oder Glutamatreste (eYFP-PhaM^{K3-6E}) spiegelte den Phänotyp der C-terminalen Deletion von PhaM (eYFP-PhaM^{ΔC}) wider (**C**). Von links nach rechts: Durchlicht, eYFP-Kanal, DAPI-Kanal, Überlagerung der Fluoreszenzkanäle und Überlagerung aller Kanäle. Die Maßstäbe entsprechen 1 μm.

3.3.3 Einfluss der C-terminalen PhaM-Prolinreste auf die DNA-PhaM-Interaktion

Neben den Lysinsubstitutionen sollte auch der Einfluss der Prolinreste im Bereich bzw. innerhalb des PAKKA-Doppelmotives auf die Interaktion von PhaM mit der DNA untersucht werden. Dafür wurden die Prolinreste gegen Alanin (eYFP-PhaM^{P1A}, eYFP-PhaM^{P2A}, eYFP-PhaM^{P3A}, eYFP-PhaM^{P4A} sowie eYFP-PhaM^{P2-3A}) oder Histidin (eYFP-PhaM^{P2H}, eYFP-PhaM^{P3H} sowie eYFP-PhaM^{P2-3H}) ausgetauscht (Abbildung 18B). Für die Mikroskopie wurden die *R. eutropha* H16 Stämme mit den veränderten Plasmiden äquivalent zu den vorherigen Experimenten in NB-Glukonat-Medium kultiviert und alle zwei Stunden Proben genommen. Um auch einen möglichen Einfluss der Prolinsubstitutionen auf das Wachstumsverhalten der Stämme zu untersuchen, wurde die optische Dichte bei 600 nm über einen Zeitraum

von 48 Stunden gemessen. Als Kontrolle diente der Überexpresssionsstamm *R. eutropha* H16 pBBR1MCS2:: P_{phaC} -eyfp-pha M^{WT} .

Die Wachstumskurven in Abbildung 22 zeigen, dass die Prolinsubstitutionen zu einem gleichen Wachstumsverhalten aller Stämme führten. Sowohl die eingeführten Alanin- als auch die Histidinmutationen haben damit keinen Einfluss auf das Wachstum.



Abbildung 22: Wachstumskurve von *R. eutropha* H16 Zellen mit PhaM-Überexpressionskonstrukten mit gerichteten Prolin-Mutationen. Die *R. eutropha* H16 Zellen mit den Überexpressionkonstrukten wurden in NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat und 150 μ g/ml Kanamycin bei 30°C kultiviert. Die Messung der OD₆₀₀ über einen Zeitraum von 48 Stunden erfolgte in Triplikaten. Bei allen Stämmen war ein identisches Wachstumsverhalten beobachtbar.

Bei der nach vier Stunden durchgeführten Mikroskopie der DAPI-gefärbten Zellen konnte beobachtet werden, dass alle Stämme den Phänotyp des Stammes *R. eutropha* H16 pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{WT} widerspiegelten (Abbildung 23). Es kam zu einer Bildung von mehreren Clustern kleiner PHB-Granula, die mit der eYFP-Fluoreszenz kolokalisierten. Die eYFP-Fluoreszenzsignale waren dabei vorrangig in der Zellmitte lokalisiert. Die Überlagerung von eYFP und DAPI zeigte eine Interaktion der DNA mit PhaM-Wildtyp sowie den PhaM-Muteinen. Sowohl für die einzelnen Alanin- (eYFP-PhaM^{P1A}, eYFP-PhaM^{P2A}, eYFP-PhaM^{P3A}, eYFP-PhaM^{P4A}) und Histidinmutationen (eYFP-PhaM^{P2H}, eYFP-PhaM^{P3H}) als auch für die Doppelsubstitutionen (eYFP-PhaM^{P2-3A} sowie eYFP-PhaM^{P2-3H}) konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Damit zeigt sich, dass die Proline in der flankierenden Region bzw. innerhalb des PAKKA-Doppelmotives keinen Einfluss auf die DNA-Bindung ausüben, der phänotypisch oder im Wachstumsverhalten sichtbar wird.



Abbildung 23: Phänotypische Charakterisierung der PhaM-Überexpressionskonstrukte mit gerichteten Prolin-Mutationen in *R. eutropha* H16 Zellen. Die Zellen wurden in NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat und 150 μg/ml Kanamycin bei 30°C kultiviert. Die Bilder wurden nach vier Stunden der PHB-Bildung aufgenommen. Das Sequenzalignment zeigt Wildtyp PhaM sowie PhaM-Muteine mit den substituierten Prolinresten (blau) und dem Doppel-PAKKA-Motiv (grau). Sowohl bei den Alaninmutationen (eYFP-PhaM^{P1A}, eYFP-PhaM^{P2A}, eYFP-PhaM^{P3A}, eYFP-PhaM^{P4A} sowie eYFP-PhaM^{P2-3H}) als auch den Histidinsubstitutionen (eYFP-PhaM^{P2H}, eYFP-PhaM^{P3H} sowie eYFP-PhaM^{P2-3H}) konnten im Vergleich zu PhaM^{WT} keine phänotypischen Veränderungen beobachtet werden. Von links nach rechts: Durchlicht, eYFP-Kanal, DAPI-Kanal, Überlagerung der Fluoreszenzkanäle und Überlagerung aller Kanäle. Die Maßstäbe entsprechen 1 μm.

3.3.4 In vitro Untersuchungen zur PhaM-DNA-Interaktion mittels EMSA

Die mikroskopischen *in vivo* Analysen zeigten, dass die im C-Terminus von PhaM lokalisierten Lysinreste der PAKKA-Motive einen Einfluss auf die Interaktion von PhaM mit der DNA haben. Um diese Ergebnisse *in vitro* zu bestätigen, wurde ein elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay, kurz EMSA, durchgeführt. Frühere EMSA-Ergebnisse legten bereits dar, dass PhaM *in vitro* an die DNA bindet (Pfeiffer *et al.*, 2011). Dafür wurden die jeweiligen gerichteten Mutationen in den Ausgangsvektor pET28a::*phaM* eingeführt. Die mutierten Plasmide wurden in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformiert und die Muteine nach erfolgreicher Expression aufgereinigt (Abbildung 3 im Anhang).

Für die Experimente wurden jeweils die aufgereinigten His₆-getaggten Proteine von PhaM^{WT}, PhaM^{K1-2I}, PhaM^{K1-4I}, PhaM^{K3-6I}, PhaM^{K3-6E} sowie PhaM^{ΔC} mit DNA inkubiert. Um zu überprüfen, ob PhaM mit spezifischen DNA-Sequenzen interagiert, wurde sowohl Biotin-markierte lineare *eyfp* DNA (Abbildung 24) als auch chromosomale *R. eutropha* H16 DNA (Abbildung 25) genutzt.



Abbildung 24: Elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay (EMSA) der aufgereinigten PhaM-Muteine mit linearer *eyfp* DNA in einem nativen Polyacrylamidgel. Es wurden jeweils 0,62 nM eines PCR-generierten, Biotin-11-dUTP-markierten DNA-Fragmentes (*eyfp* DNA, 824 bp) mit den jeweiligen His₆-getaggten PhaM-Muteinen (5,4 μ M) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Gelelektrophorese auf einem 6 %-igen (w/v) nativen Polyacrylamidgel und anschließendem Blotting sowie UV-*Crosslinking* wurden die biotinylierten DNA-Protein-Komplexe detektiert, wobei unterschiedliche Mobilitätsverhalten beobachtet werden konnten.

Das Ergebnis der biotinylierten DNA-Protein-Komplexe (Abbildung 24) zeigte, dass bei dem Komplex DNA-PhaM^{WT} ein charakteristischer Shift der DNA-Bande im Vergleich zur Kontrolle ohne PhaM zu beobachten war. Ein identisches Mobilitätsverhalten der DNA konnte in Gegenwart von PhaM^{K1-2I} detektiert werden. Dieses *in vitro* EMSA-Ergebnis bestätigte die mikroskopischen *in vivo* Untersuchungen von PhaM^{WT} und PhaM^{K1-2I}, wo kein phänotypischer Unterschied festgestellt werden konnte. Die Interaktion von PhaM^{WT} bzw. PhaM^{K1-2I} mit der DNA bewirkte eine Einschränkung der Mobilität der DNA im Gel.

Die Komplexe aus DNA und den PhaM-Muteinen PhaM^{K1-4I}, PhaM^{K3-6I}, PhaM^{K3-6E} sowie PhaM^{ΔC} wiesen ein von PhaM^{WT} abweichendes Bandenmuster auf. Bei PhaM^{K1-4I} konnte einerseits eine schwache DNA-Bande auf Höhe der Kontrolle nachgewiesen werden. Andererseits traten auch zwei weitere stärkere Banden mit einer eingeschränkten Mobilität auf: eine mit einem ebenso starken Mobilitätsshift wie bei PhaM^{WT} und eine andere Bande mit einer stärkeren Migration der DNA als bei PhaM^{WT}, aber dennoch deutlich eingeschränkt im Vergleich zur Kontrolle ohne PhaM. PhaM^{K3-6I} zeigte eine schwache Bande ohne sichtbaren Shift sowie eine Bande mit einem deutlichen Mobilitätsverlust der DNA. Kein elektrophoretischer Mobilitätsshift konnte für DNA-Komplexe mit PhaM^{K3-6E} und PhaM^{ΔC} detektiert werden. Auch *in vitro* wurde damit ein deutlicher Unterschied zwischen PhaM^{WT} und dem verkürzten PhaM^{ΔC} in Bezug auf die Interaktion mit der DNA aufgezeigt.

Um zu bestätigen, dass dieses Ergebnis unabhängig von der eingesetzten DNA reproduziert werden kann, wurde anstelle von Biotin-markierter, linearer *eyfp* DNA chromosomale DNA aus *R. eutropha* H16 eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 25 dargestellt. Ebenso wie in Abbildung 24 konnte im Vergleich zur DNA ohne PhaM (Spur 1) ein starker Mobilitätsshift für PhaM^{WT} und PhaM^{K1-2I} beobachtet werden. Eine im Vergleich zur Kontrolle (ohne PhaM) deutlich eingeschränkte aber dennoch vorhandene Mobilität konnte für PhaM^{K1-4I} gezeigt werden. Für PhaM^{K3-6I} konnte hingegen ein stärkerer Bandenshift (Mobilitätsverlust) nachgewiesen werden. Keinen Shift der Banden und damit keine *in vitro* Bindung von PhaM an die DNA wiesen PhaM^{K3-6E} und PhaM^{ΔC} auf. Insgesamt verifizierte dieses Ergebnis die mit *eyfp* DNA durchgeführten Experimente. Anhand dieses EMSA-Ergebnisses mit chromosomaler DNA konnte folgender Schluss über das Mobilitätsverhalten der PhaM-Muteine in Gegenwart von DNA (Migrationsgeschwindigkeit der DNA im Gel) gezogen werden:

 $PhaM^{K3-6E}$ und $PhaM^{\Delta C} > PhaM^{K1-4I} > PhaM^{K3-6I} > PhaM^{WT}$ und $PhaM^{K1-2I}$.


Abbildung 25: Elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay (EMSA) der aufgereinigten PhaM-Muteine mit chromosomaler *R. eutropha* H16 DNA in einem Agarosegel. Genomische DNA (200 ng) aus *R. eutropha* H16 wurde mit jeweils 5,4 μM aufgereinigtem Protein für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, auf ein 0,7 %-iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und abschließend mit Ethidiumbromid entwickelt. Die PhaM-Muteine zeigten unterschiedliche Mobilitätsmuster.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine Veränderung der Lysinreste innerhalb der PAKKA-Motive auch *in vitro* einen deutlichen Einfluss von PhaM auf die DNA-Bindung hat.

3.3.5 Einfluss der PhaM-Mutationen auf den PHB-Gehalt der Zellen

Um zu überprüfen, ob die Einführung des vorzeitigen Stopp-Codons bei PhaM (eYFP-PhaM^{AC}) oder die Substitution der Lysine innerhalb des PAKKA-Doppelmotives (eYFP-PhaM^{K3-6I}) einen Einfluss auf den PHB-Gehalt haben, wurde eine quantitative PHB-Bestimmung mittels Gaschromatographie durchgeführt. Als Kontrollen dienten R. eutropha H16 WT sowie R. eutropha H16 mit dem Überexpressionsplasmid pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{WT} (eYFP-PhaM^{WT}). Für den Versuch wurden jeweils zwei Vorkulturen der verschiedenen R. eutropha H16 Stämme in NB-Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 30°C kultiviert, um die Zellen möglichst PHB-frei zu bekommen. Anschließend wurden die Zellen in NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat überführt und das Wachstum sowie der PHB-Gehalt über einen Zeitraum von 48 Stunden verfolgt (Abbildung 26). Zu Beginn wiesen alle untersuchten Stämme einen PHB-Gehalt vom Zelltrockengewicht von unter 4 % auf. Mit zunehmender Zeit stieg der PHB-Anteil in den Zellen und erreichte ein Maximum nach 12 Stunden. Danach begannen die Zellen, das vorhandene PHB wieder zu mobilisieren. Es wurde deutlich, dass R. eutropha H16 WT Zellen ohne Überexpressionsplasmid sowohl während der exponentiellen Wachstumsphase als auch zu Beginn der Mobilisierung nach 24 Stunden einen höheren PHB-Anteil als die anderen Stämme aufwiesen. Nach 12 Stunden wurde ein maximaler PHB-Gehalt von etwa 33 % des Zelltrockengewichts erreicht.



Abbildung 26: Wachstum und PHB-Gehalt der *R. eutropha* H16 Stämme mit Überexpression von PhaM^{K3-61} und PhaM^{ΔC} oder PhaM^{WT}. Dargestellt sind der PHB-Gehalt sowie die OD₆₀₀ der *R. eutropha* H16 Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. PHB-freie *R. eutropha* H16 WT Zellen sowie Zellen mit den Überexpressionsplasmiden pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{WT}, pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{K3-61} oder pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{ΔC} wurden in NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat kultiviert. Die Messung der OD₆₀₀ sowie die quantitative Bestimmung des PHB-Gehaltes mittels Gaschromatographie erfolgten zu den angegebenen Zeitpunkten. Das Experiment wurde mit jeweils drei biologischen und zwei technischen Replikaten durchgeführt. *R. eutropha* H16 WT Zellen dienten als repräsentatives Beispiel für Zellen ohne Überexpressionseffekt.

Überexpressionskonstrukten Die R. eutropha H16 Stämme mit den pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{K3-6/} pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{WT}, und pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{AC} zeigten untereinander einen ähnlichen Verlauf der PHB-Bildungs- sowie Mobilisierungsphase. Der größte Unterschied wurde nach 12 Stunden sichtbar, wo bei den Zellen mit eYFP-PhaM^{K3-6I} als auch eYFP-PhaM^{ΔC} ein höherer PHB-Gehalt (25 % bzw. 28 %) im Vergleich zu eYFP-PhaM^{WT} (19 %) nachgewiesen werden konnte. Während der exponentiellen Wachstumsphase konnten die Zellen mit eYFP-PhaM^{ΔC} geringfügig mehr PHB als die Zellen mit eYFP-PhaM^{WT} und eYFP-PhaM^{K3-6I} anreichern. Nach 48 Stunden wurde bei den Zellen mit den Überexpressionsplasmiden eYFP-PhaM^{K3-6I} und eYFP-PhaM^{ΔC} ein PHB-Gehalt von etwa 6 % ermittelt. Ein ähnlicher Wert (4 %) konnte auch für die WT Zellen ohne Überexpressionseffekt gemessen werden. Dagegen betrug der PHB-Anteil der Zellen mit eYFP-PhaM^{WT} noch etwa 11 % vom Zelltrockengewicht.

Während der exponentiellen Wachstumsphase wurde nach 4 Stunden jeweils eine Probe von den Stämmen mit Überexpressionseffekt genommen. Die Zellen wurden mit Nilrot gefärbt und mikroskopisch analysiert (Abbildung 27). Die Nilrotfärbung zeigte keine signifikanten Unterschiede des PHB-Gehaltes, was dem Ergebnis der quantitativen PHB-Bestimmung mittels Gaschromatographie entsprach. Lediglich der Phänotyp der PHB-Granula zeigte Unterschiede auf. Während sich beim Stamm mit dem Plasmid pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{WT} mehrere kleinere PHB-Cluster bildeten, die schlechter im Durchlicht sichtbar waren, konnten bei den Stämmen mit den Plasmiden pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{K3-61} bzw. pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfpphaM^{AC} größere PHB-Granulacluster wahrgenommen werden. Dies bestätigte die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung in Abbildung 21.



Abbildung 27: PHB-Granulaverteilung der Nilrot-gefärbten *R. eutropha* **H16 Zellen mit Überexpression von PhaM**^{WT}, **PhaM**^{ΔC} **oder PhaM**^{K3-6I}. Eine repräsentative Probe für die mikroskopische Bestimmung des PHB-Gehaltes wurde nach vier Stunden genommen. Für die Mikroskopie wurden die Zellen mit Nilrot gefärbt. Kleine PHB-Granulacluster bildeten sich bei Zellen mit dem Plasmid pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{WT}. Stärker ausgeprägte Phänotypen mit großen PHB-Clustern zeigten die Zellen mit der Überexpression von eYFP-PhaM^{ΔC} sowie eYFP-PhaM^{K3-6I}. Anhand der Nilrotfärbung aller Zellen konnte kein signifikanter Unterschied des PHB-Gehaltes festgestellt werden. Die Maßstäbe entsprechen 2 μm.

Die detektierten, leichten Unterschiede des PHB-Gehaltes der *R. eutropha* H16 Stämme mit den PhaM-eYFP-Überexpresssionskonstrukten spiegelten sich im Phänotyp der Stämme wider, da größere Granula detektiert werden konnten, die in einem höheren PHB-Gehalt resultieren könnten. Eine Überexpression scheint aber generell im Vergleich zu *R. eutropha* H16 WT ohne Überexpression zu leicht niedrigeren PHB-Mengen zu führen.

3.3.6 In vitro PHB-Aktivitätstest in Gegenwart von PhaM^{WT} bzw. PhaM^{△C}

Frühere Ergebnisse zeigten, dass PhaM als natürlicher Aktivator der PHB-Synthase in vitro fungiert. In Gegenwart von PhaM konnte die lag-Phase der PhaC1-Synthase-Aktivität verhindert werden und die spezifische Aktivität von PhaC1 war etwa 3-fach erhöht (Pfeiffer und Jendrossek, 2014). Die Experimente zum Einfluss der C-terminalen PhaM PAKKA-Motive auf die PhaM-DNA-Interaktion bestätigten, dass die Motive für eine Bindung von PhaM an die DNA verantwortlich sind. Gezeigt werden konnte, dass eine Veränderung der Motive einen phänotypischen Unterschied der PHB-Granula hervorrief. Mittels der PHB-Quantifizierung konnten zwar Unterschiede festgestellt werden, allerdings konnte keine Abnahme des PHB-Gehaltes gemessen werden (Abbildung 27). Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass der C-Terminus von PhaM keine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit der PHB-Synthase PhaC1 spielt und damit keinen negativen Einfluss auf die PHB-Bildung ausübt. Um dies zu bestätigen, wurde ein diskontinuierlicher PHB-Synthase-Aktivitätsassay in vitro durchgeführt (Abbildung 23). Dafür wurde aufgereinigtes His₆-PhaC1 ohne oder in Gegenwart von His₆-PhaM^{WT} bzw. His₆-PhaM^{ΔC} mit dem Substrat 3-HB-CoA bei 30°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und durch Zugabe von DTNB konnte freigewordenes Coenzym A zu NTB reagieren. Die Bildung von NTB konnte anschließend spektroskopisch bei 412 nm aufgenommen werden.



Abbildung 28: PhaC1 *in vitro* **Aktivitätstest in Anwesenheit von PhaM**^{WT} **oder PhaM**^{ΔC}. Es wurde ein diskontinuierlicher PHB-Synthaseassay durchgeführt. Dafür wurden 340 nM His₆-PhaC1 mit dem Substrat 3-HB-CoA bei 30°C inkubiert. Nach einer *lag*-Phase von einer Minute startete die Bildung von PHB. Die Zugabe von His₆-PhaM^{WT} bzw. His₆-PhaM^{ΔC} initiierte die sofortige PHB-Bildung, wobei kein Unterschied zwischen den PhaM-Varianten gezeigt werden konnte. Das Experiment wurde Triplikaten durchgeführt (Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen).

Der Assay zeigte, dass die Kontrolle ohne PhaM die typische *lag*-Phase aufwies. Erst nach einer Minute konnte an Anstieg der Absorption und damit eine Bildung von PHB detektiert werden. Nach etwa 6 Minuten stellte sich die Reaktion aufgrund des Substratverbrauchs ein. Im Gegensatz dazu bewirkte die Zugabe von PhaM einen sofortigen Anstieg der Absorption bei 412 nm. Bereits nach zwei Minuten war das eingesetzte Substrat 3-HB-CoA verbraucht. Dabei machte es keinen Unterschied, ob His₆-PhaM^{WT} bzw. His₆-PhaM^{ΔC} zum Assay hinzugefügt wurden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Deletion des C-Terminus von PhaM keinen Einfluss auf die aktivierende Eigenschaft von PhaM hat. Für die Interaktion von PhaM mit PhaC1 scheint vielmehr der N-Terminus von PhaM eine entscheidende Rolle zu spielen.

3.3.7 Crosslinking-Verhalten von PhaM und PhaC1

Es ist bekannt, dass es sich bei der aktiven Form der R. eutropha PHB-Synthase um ein Homodimer handelt (Jia et al., 2001). Die Homooligomerisierung von PhaC1 und damit Konvertierung in die hoch aktive Form wird *in vitro* durch die Zugabe von PhaM beschleunigt. Die vorherigen in vitro PHB-Synthase-Aktivitätstests konnten bereits zeigen, dass der C-Terminus von PhaM keine wichtige Rolle bei der Aktivierung von PhaC1 zu spielen scheint. Um dieses Ergebnis mit einer weiteren in vitro Methode zu reproduzieren, wurde die Oligomerisierung mittels chemischen Crosslinkings mit Glutardialdehyd (GDA) untersucht. Dazu wurde aufgereinigtes aktives His₆-PhaC1^{WT} mit jeweils steigenden Konzentrationen von His₆-PhaM^{WT} oder His₆-PhaM^{ΔC} sowie 2,5 % (v/v) GDA inkubiert und das Oligomerisierungsverhalten auf einem 8 %-igen SDS-Gel analysiert (Abbildung 29). Die Kontrollen (Spur 2 – 4) ohne Crosslinker zeigten Banden, die der Größe der aufgereinigten Proteine entsprachen. Die Zugabe von GDA zu PhaM oder PhaC1 allein zeigte eine typische Oligomerisierung (Spur 5 -6). Bei PhaM^{WT} wurden Banden oberhalb von 180 kDa sichtbar, was Produkte mit einem hohen Molekulargewicht (HMW – high molecular weights products) widerspiegelte. Bei PhaC1^{WT} traten zwei charakteristische Banden auf: eine bei etwa 63 kDa, die der Größe des Monomers von PhaC1 entsprach, und die zweite bei etwa 130 kDa, welche mit der Größe des PhaC1-Dimers übereinstimmte. Die Zugabe von PhaM^{WT} zum Ansatz mit PhaC1^{WT} bewirkte eine Abnahme der PhaC1-Monomer-Bande mit steigenden PhaM-Konzentrationen (Spur 7 - 10). Die PhaC1-Dimer-Bande sowie die Banden der hochmolekularen Produkte zeigten keinen Intensitätsverlust.



Abbildung 29: *Crosslinking* von PhaM^{WT} und PhaC1^{WT}. Die Oligomerisierung der Fraktionen mit His₆-PhaC1^{WT} sowie His₆-PhaM^{WT} wurde mittels Glutardialdehyd-*Crosslinking* analysiert. Es wurden 2,5 % (v/v) GDA, 14 μ M PhaC1^{WT} sowie 8 μ M PhaM^{WT} für die Kontrollen genutzt (Spuren 2 – 6). Für einen sichtbaren Oligomerisierungseffekt wurden steigende Konzentrationen von PhaM^{WT} verwendet (1,3; 2,6; 5,2 sowie 7,8 μ M). Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 8 %-igen SDS-Gel. Das Gel wurde über Nacht mit kolloidalem Coomassie gefärbt und anschließend mit Wasser entfärbt.

Wurde anstelle von PhaM^{WT} PhaM^{ΔC} zum Ansatz mit PhaC1^{WT} gegeben, so konnte auch hier beobachtet werden, dass es mit steigenden Konzentrationen von PhaM^{ΔC} zu einer Abnahme der PhaC1-Monomerbande kam (Abbildung 30, Spur 7 – 10). Wie auch in Abbildung 29 zeigten die Kontrollen ohne GDA die entsprechenden Molekulargewichtsgrößen (Spur 2 – 4). Aufgrund der Einführung des vorzeitigen Stopp-Codons wies His₆-PhaM^{ΔC} ein geringeres Molekulargewicht als His₆-PhaM^{WT} auf. Bei diesem *Crosslinking*-Experiment wurde zudem deutlich, dass erhöhte PhaM^{ΔC}-Konzentrationen dazu führten, dass neben der Bildung von HMW-Produkten auch eine PhaM^{ΔC}-Monomer-Bande sichtbar wurde (Spur 5, 7 – 10). Diese Bande konnte beim PhaM^{WT} ohne PhaC1-Koinkubation nicht detektiert werden (Abbildung 29, Spur 5). Daraus lässt sich schließen, dass die Deletion des C-Terminus von PhaM einen Einfluss auf den Oligomerisierungsgrad von PhaM ausüben könnte, aber die Interaktion mit PhaC1 nicht beeinflusst wird.



Abbildung 30: *Crosslinking* PhaM^{ΔC} und PhaC1^{WT}. Die Oligomerisierung der Fraktionen mit His₆-PhaC1^{WT} sowie His₆-PhaM^{ΔC} wurde mittels Glutardialdehyd-*Crosslinking* analysiert. Es wurden 2,5 % (v/v) GDA, 14 μ M PhaC1^{WT} sowie 8 μ M PhaM^{ΔC} für die Kontrollen genutzt (Spuren 2 - 6). Für einen sichtbaren Oligomerisierungseffekt wurden steigende Konzentrationen von PhaM^{ΔC} verwendet (1,3; 2,6; 5,2 sowie 7,8 μ M). Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 8 %-igen SDS-Gel. Das Gel wurde über Nacht mit kolloidalem Coomassie gefärbt und anschließend mit Wasser entfärbt.

3.3.8 Untersuchung spezifischer DNA-Bindungsstellen mittels ChIP

Die EMSA-Experimente zeigten, dass die Bindung von PhaM an die DNA unspezifisch erfolgt, was bedeutet, dass PhaM nicht an bestimmte Konsensussequenzen innerhalb der DNA bindet. Um dies zu bestätigen, wurden Chromatin-Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt (Abbildung 4 im Anhang). Dabei werden mit Hilfe einer Immunpräzipitation und anschließender Sequenzierung DNA-Bereiche identifiziert, an die das untersuchte Protein gebunden hat.

Die Experimente wurden mit dem Stamm *R. eutropha* H16 mit genomisch integriertem *phaM-eyfp* durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde *Corynebacterium glutamicum parB-mcherry2* verwendet, da für *R. eutropha* keine geeignete Positivkontrolle vorlag. Von ParB ist bereits bekannt, dass es *parS*-Sequenzen im Chromosom bindet, somit wäre eine chromosomale Integration von *parB-eyfp* in *R. eutropha* H16 eine gute Positivkontrolle. Das Ergebnis der ChIP-Analyse ist in Abbildung 4 im Anhang dargestellt. Anhand des Ergebnisses geht hervor, dass PhaM nicht spezifisch an bestimmte DNA-Sequenzen in *R. eutropha* H16 bindet. Das ist in Übereinstimmung mit den *in vitro* DNA-Bindeassays, die ebenfalls eine

unspezifische DNA-Bindung von PhaM nachweisen konnten. Leichte erhöhte Peaks konnten in Bereichen transkriptioneller Regulatoren, zum Beispiel für H16_A1644 (*transcriptional regulator, MocR family*), sowie im Bereich des Gens H16_B1933, welches sich in unmittelbarer Nähe zu PhaP5 (H16_B1934) befindet, detektiert werden. Allerdings handelt es sich dabei um keine spezifischen Bindungsstellen.

Aufgrund der EMSA- und ChIP-Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass PhaM unter den verwendeten Bedingungen keine spezifischen DNA-Sequenzen erkennt und daran bindet.

3.4 PhaM – physiologische Interaktionspartner

3.4.1 Mittels Proteomanalyse identifizierte Interaktionspartner von PhaM

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Interaktionspartner von PhaM zu identifizieren, die Rückschluss zur physiologischen Rolle von PhaM geben könnten. Grundlage dafür waren Proteomanalysen von *pull down*-Experimenten, bei denen die Fusionsproteine PhaM-eYFP bzw. eYFP-PhaM als Köder genutzt wurden. Die Verwendung von magnetischen Beads, die eine Bindungsaffinität für eYFP aufwiesen, ermöglichte die Untersuchung von PhaM-gebundenen Proteinen. Die Experimente wurden sowohl in *R. eutropha* H16 WT als auch im $\Delta phaC$ -Hintergrund durchgeführt, um einen möglichen Einfluss der PHB-Granula auf die Wechselwirkung von PhaM mit Beuteproteinen zu analysieren.

Die Stämme *R. eutropha* H16 WT pBBR1MCS2::P_{phaC}-phaM-eyfp sowie *R. eutropha* H16 $\Delta phaC$ pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM wurden in zwei Vorkulturen in NB-Medium für 24 Stunden angezogen und anschließend in NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Natrium-Glukonat überführt (OD₆₀₀ 0,1) und weiter kultiviert. Die Zellen wurden nach 4 Stunden während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Eine mikroskopische Untersuchung bestätigte das Vorhandensein der PHB-Granula sowie die Expression des Fusionsproteins. Die eYFP-Foci kolokalisierten mit den gebildeten PHB-Granula (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Zellen wurden aufgeschlossen und das *pull down*-Experiment mit Hilfe der magnetischen Beads durchgeführt. Als Kontrolle dienten Zellen mit dem Plasmid pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp, um falsch-positive Treffer auszuschließen.

Das Ergebnis der Proteomanalyse ist in nachfolgender Tabelle 3-2 zusammengefasst.

Tabelle 3-2: Proteomanalyse des *pull down*-Experiments von PhaM in *R. eutropha* H16 WT und Δ*phaC.* Als Köderproteine für die *pull down*-Experimente dienten PhaM-eYFP bzw. eYFP-PhaM und eYFP wurde als Kontrolle verwendet. Die Zellen wurden in NB-Medium mit 0,2 % Na-Glukonat angezogen und nach 4 Stunden während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Es wurde ein *treshold* von 6 gefundenen Peptidfragmenten für die Auswertung gesetzt. Angegeben sind der Locus_tag, das identifizierte Protein sowie die Anzahl der identifizierten, verschiedenen Peptidfragmente aller möglichen Fragmente, die eine Trypsinspaltung hervorrufen kann. Die *in silico* Trypsinspaltung wurde mit dem Bioinformatiktool PeptideMass von ExPASy durchgeführt (Peptide mit einer Masse über 500 Dalton wurden angezeigt). Hervorgehoben sind die PGAPs PhaP1 (H16_A1381), PhaC1 (H16_A1437) sowie PhaM (H16_A0141).

		PhaM-	∆phaC	
		eYFP	eYFP-	eYFP-
			PhaM	Kontrolle
		+ PHB	- PHB	
Locus_tag	Identifiziertes Protein	Anzahl Peptide		
H16 A2306	translation initiation factor IF-2	33 von 71	0 von 71	3 von 71
H16 A1045	polynucleotide phosphorylase/polyadenylase	30 von 51	12 von 51	6 von 51
H16 A2580	ribonuclease G and E	25 von 64	0 von 64	2 von 64
H16 A1374	pyruvate dehydrogenase subunit E1	23 von 64	0 von 64	2 von 64
H16 A1482	trigger factor	20 von 43	0 von 43	2 von 43
H16 A2294	GTP-binding elongation factor family protein	19 von 42	0 von 42	2 von 42
H16 A3492	elongation factor G	18 von 53	0 von 53	7 von 53
H16 A3264	preprotein translocase subunit SecA	18 von 72	0 von 72	3 von 72
H16 A1485	ATP-dependent Lon protease	18 von 64	6 von 64	2 von 64
H16 A3052	ATP-dependent protease Clp. ATPase subunit	16 von 58	0 von 58	0 von 58
H16 A2560	trypsin-like serine protease	16 von 35	0 von 35	0 von 35
H16 A2699	ATP-dependent RNA helicase	16 von 56	0 von 56	0 von 56
H16 A3436	pili assembly protein PilQ	15 von 53	0 von 53	0 von 53
H16 A3268	cell division protein FtsZ	14 von 24	0 von 24	0 von 24
H16 A2630	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	14 von 43	2 von 43	0 von 43
H16 A1381	PhaP1	13 von 14	2 von 14	2 von 14
H16 A0917	ATPase	13 von 36	0 von 36	6 von 36
H16 A0982	flp pilus assembly protein secretin CpaC	12 von 29	0 von 29	0 von 29
H16 A1437	Poly(3-hydroxybutyrate) polymerase	12 von 35	8 von 35	16 von 35
H16 A2905	mannose-1-phosphate guanylyltransferase	11 von 28	0 von 28	1 von 28
H16 A3081	Poly(A) polymerase	11 von 34	0 von 34	0 von 34
H16 A2972	outer membrane cobalamin receptor, TonB dependent	11 von 41	4 von 41	2 von 41
H16 A3645	chromosome partitioning protein ParB	11 von 23	0 von 23	0 von 23
H16 A3360	ABC transporter ATP-binding protein	11 von 46	0 von 46	0 von 46
H16 A2611	acetyl-CoA carboxylase subunit beta	10 von 23	0 von 23	2 von 23
H16 A1188	phosphopyruvate hydratase	9 von 27	6 von 27	0 von 27
H16 A1429	transcriptional accessory protein	9 von 61	0 von 61	0 von 61
H16 A3502	transcription antitermination protein NusG	9 von 14	0 von 14	1 von 14
H16 A0802	UDP-glucose 6-dehydrogenase	9 von 37	0 von 37	0 von 37
H16 A0754	DNA segregation ATPase Ftsk	9 von 49	3 von 49	0 von 49
H16 A3043	response regulator	8 von 12	0 von 12	0 von 12
H16 A1223	acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit α	8 von 23	0 von 23	0 von 23
H16_A0141	PhaM	7 von 13	9 von 13	0 von 13
H16_A3641	F0F1 ATP synthase subunit B	7 von 13	3 von 13	0 von 13
H16 A0983	flp pilus assembly ATPase CpaF	7 von 45	0 von 45	0 von 45
H16 A0531	ATP-dependent RNA helicase	7 von 43	0 von 43	0 von 43
H16 A0195	G3E family GTPase	6 von 27	0 von 27	2 von 27
H16 A2558	GTP-binding protein LepA	6 von 39	4 von 39	4 von 39
H16_A1484	ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpX	6 von 30	0 von 30	0 von 30
H16_A3241	signal recognition particle GTPase	6 von 33	0 von 33	0 von 33
H16_A2030	inosine 5'-monophosphate dehydrogenase	6 von 38	0 von 38	0 von 38
H16_A3269	cell division protein FtsA	6 von 27	0 von 27	0 von 27
H16_A0331	C-terminal processing peptidase-3, periplasmic	6 von 44	0 von 44	0 von 44

Anhand der Tabelle wird ersichtlich, dass viele Proteine identifiziert wurden, die bislang in keinen Zusammenhang mit dem PHB-Stoffwechsel stehen. Unter den Treffern konnten aber auch drei PHB-Granula-assoziierte Proteine gefunden werden. Darunter die PHB-Synthase PhaC1, von der bereits gezeigt werden konnte, dass sie mit PhaM interagiert, was anhand dieses pull down-Experiments bestätigt werden konnte. Mit dem Köderprotein PhaM-eYFP konnten 12 von 35 möglichen Peptidfragmenten im WT-Hintergrund nachgewiesen werden. Bei dem pull down mit aufgeschlossenen R. eutropha H16 AphaC1 Zellen konnten allerdings ebenfalls 8 von 35 Fragmenten detektiert werden, was auf Verunreinigungen der MS-Messung durch vorherige PhaC1-pull downs schließen lässt. Weiterhin konnte entsprechend der Erwartungen PhaM identifiziert werden, da es als Köderprotein eingesetzt wurde. Die PhaM-Peptide lagen für beide *pull downs* (WT und $\Delta phaC1$) in ähnlichen Größenordnungen mit 7 bzw. 9 Peptidfragmenten von 13 möglichen Peptiden. Als drittes PGAP konnte PhaP1 als Interaktionspartner von PhaM detektiert werden. Die Anzahl der gefundenen Peptidfragmente von allen möglichen Fragmenten durch Trypsinbehandlung war bei PhaP1 mit PhaM-eYFP als Köder sehr hoch (13 von 14 Fragmenten). Im $\Delta phaC1$ -Hintergrund konnten allerdings nur 2 Peptidfragmente nachgewiesen werden.

Auffällig war, dass es zu großen quantitativen Unterschieden zwischen den Ergebnissen aus R. eutropha H16 Wildtyp und AphaC kam. Während im WT-Hintergrund mit sichtbaren PHB-Granula viele Proteine identifiziert werden konnten, wurde bei $\Delta phaC$ nur ein Bruchteil dieser Proteine gefunden. Wie zu erwarten, konnten auch innerhalb der eYFP-Kontrolle weniger Peptidfragmente detektiert werden, mit Ausnahme von PhaC-Peptidfragmenten. Eine Erklärung hierfür liegt möglicherweise in der Reihenfolge der gemessenen Proben, da die eYFP-Kontrolle unmittelbar nach einem PhaC1-pull down gemessen wurde, was zu Verunreinigungen führen könnte. Die Beoachtung von Verunreinigungen konnte bei mehreren unabhängigen *pull down*-Experimenten bei Kollegen gezeigt werden, was die Aussagekraft der Proteomanalyse bzw. die Reproduzierbarkeit der Methode infrage stellt. Generell ist es sehr unwahrscheinlich, dass es Dutzende Interaktionspartner von PhaM gibt. Es handelt sich möglicherweise um PHB-Granulakontaminationen oder falsch-positive Treffer.

Um dennoch Aussagen über putative Interaktionspartner von PhaM treffen zu können, wurde eine detailliertere Auswertung durchgeführt. Dazu wurden ausgewählte identifizierte Proteine in Gruppen eingeteilt, die charakteristische Merkmale teilen (Tabelle 3-3). Es handelte sich dabei nicht immer um Proteine mit der größten Anzahl an detektierten Peptidfragmenten, aber um Fragmente, die spezifisch für PhaM nachgewiesen werden konnten. Die Tabelle mit allen detektierten Peptidfragmenten der Proteomanalyse ist im Anhang dargestellt (Tabelle Anhang 6-3).

Tabelle 3-3: Einteilung der Proteomergebnisse in Gruppen mit gemeinsamen Charakteristika. Gezeigt sind die Ergebnisse der Proteomanalyse der *pull down*-Experimente von PhaM in *R. eutropha* H16 WT und *∆phaC*, die in verschiedene Gruppen mit gemeinsamen Eigenschaften eingeteilt wurden. Angegeben sind die Gennummer (Locus_tag), das identifizierte Protein sowie die Anzahl der nachgewiesenen Peptidfragmente. Als Köderproteine für die *pull down*-Experimente dienten PhaMeYFP bzw. eYFP-PhaM. Die Zellen wurden in NB-Glukonat-Medium kultiviert und während der exponentiellen Wachstumsphase nach 4 Stunden geerntet. Markierte Proteine wurden für anschließende BACTH-Experimente genutzt.

Locus_tag	Identifiziertes Protein	Peptidfragmente		Peptidfragmente	
		PhaM-eYFP + PHB	∆ <i>phaC</i> eYFP- PhaM - PHB		
Bakterielle Mo	tilitätsproteine				
Pilus-Bildungsp	proteine				
H16_A0981 H16_A0982 H16_A0983 H16_B0186 H16_B0187 H16_A3436	flp pilus assembly protein CpaB flp pilus assembly protein secretin CpaC flp pilus assembly ATPase CpaF flp pilus assembly ATPase flp pilus assembly ATPase CpaF pili assembly protein PilQ	4 12 7 2 2 15	0 0 0 0 0		
Chromosomer	rassozierte Proteine				
Divisomprotein	e				
H16_A3268 H16_A3269 H16_A2322 H16_A0754	cell division protein FtsZ cell division protein FtsA ATPase DNA segregation ATPase Ftsk	14 6 1 9	0 0 0 3		
Inhibitoren der	Inhibitoren der FtsZ-Assemblierung				
H16_A0084 H16_A0085	cell division topological specificity factor MinE cell division inhibitor MinD	4 9	0 2		
Andere Chromosomenverteilungsproteine					
H16_A0113 H16_A3645 H16_A3646 H16_B0004	rod shape-determining protein MreB chromosome partitioning protein ParB ATPase involved in chromosome partitioning chromosome partitioning protein ParB	11 11 2 4	4 0 0 0		

Locus_tag	Identifiziertes Protein	Peptidfragme	ente	
PHG375	partitioning protein	2	0	
Chaperone un	d Faltungsproteine	3	0	
onaperone un				
Hitzeschockpro	oteine			
H16_A3052	ATP-dependent protease Clp, ATPase subunit	16	0	
H16_A2249	ATP-dependent protease Clp, ATPase subunit	6	0	
H16_A1484	ATP-dependent protease ATP-binding subunit CIpX	6	0	
Translationsfa	ktoren	10	0	
Initiationsfaktor	en			
H16_A2306	translation initiation factor IF-2	33	0	
Elongationsfak	toren			
H16_A3491	elongation factor Tu	21	1	
H16_A3492	elongation factor G	18	0	
H16 A2549	elongation factor P	4	0	
Hydrolasen				
GTP-Hydrolase	en (zelluläre und subzelluläre Bewegung) (3.6.5)			
H16_A3241	signal recognition particle GTPase (3.6.5.4)	6	0	
Saure Anhydric	I-Hydrolasen (zelluläre und subzelluläre Bewegung) (3.6.4)			
H16_A0531	ATP-dependent RNA helicase	7	0	
Saure Anhydrid-Hydrolasen (Transmembranbewegung von Substanzen) (3.6.3) Sulfat-transportierende ATPase				
H16_A3360	BC transporter ATP-binding protein	11	0	
Sekretionspro	teine			
Sec-System				
H16_A3264	preprotein translocase subunit SecA	18	0	
H16_A3115	preprotein translocase subunit SecD	4	0	
H16_A0335 H16_A3464	preprotein translocase subunit SecA	2	0	

Das Ergebnis zeigte, dass mittels der Proteomanalyse potenzielle Interaktionspartner von PhaM identifiziert werden konnten, die vielfältige physiologische Funktionen ausüben. Es konnten zum Beispiel ATP-abhängige Hitzeschockproteine nachgewiesen werden. Die meisten Fragmente wurden für die ATPase- bzw. ATP-Bindedomäne zweier ATP-abhängiger Proteasen gefunden (H16_A3052 und H16_A0200). Weiterhin wurden Proteine des bakteriellen Bewegungsapparates detektiert. Für verschiedene Pilus-Bindeproteine wie H16_A0982 sowie H16_A3436 wurden 12 bzw. 15 Peptidfragmente identifiziert. Einen großen Anteil machten die

Divisomproteine und Chromosomen-assoziierten Proteine aus, wobei einige gefundene Proteine wenige Peptidfragmente aufwiesen. Für nur das Zelldivisionsprotein FtsZ (H16 A3268) konnten 14 Fragmente aufgezeigt werden. Andere Treffer waren Proteine, welche als Translationsfaktoren agieren, zum Beispiel der Initiationsfaktor IF-2 (H16 A2306) mit 33 Peptidfragmenten oder der Elongationsfaktor Tu (H16 A3491) mit 21 Peptiden. Außerdem wurden spezifisch für PhaM Proteine detektiert, die eine Rolle als Hydrolasen spielen. Dazu zählten beispielsweise die Signalerkennungs-GTPase Ffh (H16 A3241) mit 6 Fragmenten. Eine weitere Proteingruppe machten die Sekretionsproteine aus, wo hauptsächlich die Translokase SecA mit 18 Peptiden gefunden werden konnte.

Wie bereits erwähnt, konnten die detektieren putativen PhaM-Interaktionspartner zu einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit nur gefunden werden, wenn der *pull down* mit einem *R. eutropha* H16 WT Zelllysat durchgeführt wurde, welches ebenfalls PHB enthielt. Das Experiment mit aufgeschlossenen *R. eutropha* H16 $\Delta phaC1$ Zellen hingegen zeigte, dass keine oder nur sehr wenige Peptidfragmente einiger Proteine identifiziert wurden. Daraus lässt sich schließen, dass das Vorhandensein der PHB-Granula möglicherweise einen Einfluss auf die putativen Interaktionspartner von PhaM hat. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um viele falsch-positive Treffer oder um PHB-Granula-Kontaminationen handelt.

3.4.2 Two-Hybrid Experimente mit putativen PhaM-Interaktionspartnern

Im Anschluss an die Proteomanalyse zur Identifizierung möglicher PhaM-Interaktionspartner sollten einige der gefundenen Proteine mit einer weiteren Methode auf ihre Fähigkeit überprüft werden, eine Wechselwirkung mit PhaM einzugehen. Gleichzeitig sollte ausgeschlossen werden, dass es sich um falschpositive Treffer oder PHB-Granula-Kontaminationen handelte. Dafür wurde das bakterielle Adenylatzyklase *Two-Hybrid* (BACTH) System genutzt, welches auf der Komplementierung der Adenylatzyklase-Funktion beruht, wenn die Untereinheiten des Enzyms durch die Interaktion der Fusionspartner in räumliche Nähe zueinanderkommen.

Folgende Proteine wurden auf die Interaktion mit PhaM und sich selbst untersucht: H16_A3115 (*preprotein translocase subunit* SecD), H16_A0754 (*DNA segregation ATPase* Ftsk), H16_A2640 (*hypothetical protein*), H16_B1085 (*signal transduction* *histidine kinase*), H16_A3241 (*signal recognition particle* GTPase) sowie H16_A3264 (*preprotein translocase subunit* SecA) (Tabellen im Anhang 6-1 und 6-2). Dafür wurden die entsprechenden Gene jeweils an die T18- sowie T25-Untereinheit der Adenylatzyklase fusioniert und anschließend in den Adenylatzyklase-defizienten *E. coli* Stamm BTH101 transformiert. Als Negativkontrollen dienten Vektoren, die nur eine Untereinheit der Adenylatzyklase enthielten. Positivkontrollen stellten Fusionskonstrukte mit Zip sowie PhaM (A0141) dar. Für PhaM konnte bereits eine Eigeninteraktion nachgewiesen werden (Pfeiffer *et al*, 2011). Es wurden sowohl β -Galaktosidase-Tests (Abbildung 31) als auch Plattentests mit Indikatorplatten (Abbildung 32 sowie Abbildung 5 im Anhang) durchgeführt.



Abbildung 31: β -Galaktosidase-Assay als Interaktionstest einiger ausgewählter *pull down*-Treffer und PhaM. Dargestellt sind die im β -Galaktosidase-Assay gemessenen *Miller units* der getesteten *Two-Hybrid* Interaktionspartner. Flüssigkulturen der Ko-Transformanten der *E. coli* BTH101 Stämme (Triplikate) wurden mittels Toluol für 40 Minuten bei 37°C permeabilisiert. Die permeabilisierten Zellen wurden im Anschluss mit ONPG (*o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid)-Substrat-Lösung behandelt. Die Absorption des freigesetzten gelben Nitrophenols wurde über einen Zeitraum von 40 Minuten bei 420 nm und 28°C gemessen. T25/T18 diente als Negativkontrolle und T25-Zip/T18-Zip sowie T25-A0141/T18-A0141 wurden als Positivkontrollen verwendet.

Anhand des β-Galaktosidase-Tests konnte gezeigt werden, dass es zu einer starken Interaktion der Zip-Positivkontrolle kam und im Vergleich dazu keine Wechselwirkung der Leervektoren mit jeweils einer Untereinheit der Adenylatzyklase detektiert werden konnte. Weiterhin konnten die bisherigen Ergebnisse bestätigt werden, dass PhaM in der Lage ist, mit sich selbst zu interagieren, da etwa 2000 Miller units berechnet werden konnten, was der Größenordnung der Positivkontrolle entsprach. Anhand der mitgeführten Kontrollen konnte die Funktionalität des Experiments nachgewiesen werden. Als Grenze für weitere Interaktionen wurden 500 Miller units angesehen. Zwei weitere Interaktionen konnten damit bestimmt werden, wobei es sich um Selbst-Interaktionen handelte. Zum einen für die DNA-Segregations-ATPase FtsK (H16 A0754) und andererseits für eine Signalhistidin-Kinase (H16 B1085). Alle weiteren untersuchten Interaktionskombinationen zeigten keine signifikanten Interaktionen und befanden sich ebenfalls unterhalb des gesetzten tresholds von 500 Miller units. Eine leicht erhöhte β-Galaktosidase-Aktivität von etwa 300 Miller units konnte für die Selbst-Interaktion der Translokase SecD (H16_A3115) gezeigt werden.

Das Ergebnis des β-Galaktosidase-Tests wurde mittels der Plattentests bestätigt. Dafür wurden einerseits M63-Mineralsalz-Maltose-Agarplatten verwendet, denen X-Gal als Indikator zugesetzt wurde. Eine Interaktion der untersuchten Proteine führte somit zur Blaufärbung der Kolonien. Dies konnte sowohl bei der Zip-Positivkontrolle als auch bei PhaM mit sich selbst beobachtet werden. Weiterhin konnte die Selbst-Interaktion von H16_A0754 sowie H16_A3115 belegt werden, wohingegen keine Blaufärbung für die Eigen-Interaktion von H16_B1085 detektiert werden konnte. Alle weiteren getesteten Proteinkombinationen bildeten ebenfalls nur weiße Kolonien. Dieses Ergebnis konnte auch auf MacConkey-Indikatorplatten verifiziert werden, wo es zu einer Rotfärbung der Kolonien kam, wenn die Bakterien die im Agar enthaltene Laktose fermentativ umsetzten (Abbildung 5 im Anhang). Insgesamt konnte das BACTH-Screening die im *pull down* gefundenen putativen Interaktionspartner von PhaM nicht bestätigten, was bedeuten könnte, dass die Treffer des *pull down*-Experiments falsch-positiv sind. Für die Interaktion mit PhaM könnten auch weitere Interaktionspartner nötig sein, die mittels des BACTH-Screenings nicht identifiziert werden können, da es die direkte Interaktion zwischen zwei Proteinen untersucht und mögliche zusätzliche Wechselwirkungen mit anderen Proteinen außen vorlässt.



Abbildung 32: BACTH-Plattentest von ausgewählten pull down-Treffern und PhaM. Für die Untersuchung der Interaktion von einigen ausgewählten pull down-Treffern mit PhaM wurde ein Tropftest auf M63-Mineralsalz-Maltose-Agarplatten mit zugesetztem X-Gal, IPTG, Ampicillin und Kanamycin durchgeführt. Dafür wurden Ko-Transformanten von *E. coli* BTH101 Stämmen, die die entsprechenden T18- sowie T25-Fusionkonstrukte exprimierten, auf die Platten getropft und bei 30°C für 24 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Zip-Vektoren (Zip) und als Negativkontrolle wurden Leervektoren (-) verwendet. Blau-gefärbte Kolonien zeigen eine positive Interaktion wohingegen eine Weißfärbung gegen eine Interaktion der Fusionspartner spricht.

3.5 PhaC1 – PhaM vermittelter PHB-Initiationskomplex

3.5.1 Heterogenität der PHB-Granula in *R. eutropha* H16 mit genomisch integriertem *phaM-eyfp*

PhaM spielt eine große Rolle bei der Bildung und Lokalisation der PHB-Granula aufgrund der bereits nachgewiesenen in vitro und in vivo Affinität zur DNA und PHB-Synthase PhaC1. In vivo Lokalisationsstudien von PhaM wurden bislang nur in *R. eutropha* H16 Stämmen durchgeführt, die ein entsprechendes Plasmid mit einem eYFP-markierten PhaM trugen. Der Phänotyp zeigte eine klare Kolokalisation sowohl mit PHB-Granula als auch mit DNA. Da es aber aufgrund der Überexpression des Fusionsproteins zu artifiziellen Lokalisationsmustern kommen kann, sollte mit Hilfe einer genomischen Integration von *phaM-eyfp* die PHB-Bildung in Gegenwart der physiologischen Kopienzahl von PhaM untersucht werden. Dafür wurde der Stamm *R. eutropha* H16 mit der genomischen Integration von *phaM-eyfp* in zwei Vorkulturen in NB-Medium für jeweils 24 Stunden angezogen, um die Zellen PHB-frei zu bekommen. Anschließend wurden die Zellen für ein Live Cell Imaging Experiment auf ein NB-Agarpad mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat getropft, 1 bis 2 Minuten getrocknet, mit NB-Glukonat-Agar überschichtet und mikroskopisch analysiert. Es wurden alle 5 Minuten Aufnahmen gemacht, wobei die eYFP-Bilder mit einer Belichtungszeit von 500 ms aufgenommen wurden. Zum Zeitpunkt t = 0 min, was 10 Minuten auf PHBpermissiven NB-Glukonat-Medium entsprach, bereits zwei eYFPkonnten Fluoreszenzfoci detektiert werden, allerdings keine sichtbaren PHB-Granula (Abbildung 33A). Dies deutet darauf hin, dass PhaM unter PHB-permissiven Bedingungen einen Initiationskomplex mit der aktiven PhaC1 bildet, denn bereits nach 5 Minuten konnte im Durchlichtkanal an der Stelle der PhaM-eYFP-Fluoreszenz ein PHB-Granulum wahrgenommen werden (schwarzer Pfeilkopf). Für das neu gebildete PHB-Granulum konnte dann eine Bewegung innerhalb der Zelle gezeigt werden, wobei nach 25 Minuten eine Lokalisation der sichtbaren PHB-Granula, welche mit der eYFP-Fluoreszenz kolokalisierten, in der Nähe der Zellpole zu beobachten war.



Abbildung 33: *Time-lapse*-Experiment von *R. eutropha* H16 Wildtyp mit einem chromosomal integrierten *phaM-eyfp* Gen. PHB-freie Zellen wurden auf ein NB-Glukonat-Agarpad überführt und unmittelbar danach wurde die frühe Phase der PHB-Bildung mikroskopisch verfolgt. Zum Zeitpunkt t = 0 min waren keine PHB-Granula sichtbar, aber bereits Fluoreszenzfoci. Nach 5 Minuten konnte die Bildung eines ersten PHB-Granulums beobachtet werden, das mit einem Fluoreszenzfokus von PhaM-eYFP kolokalisierte. Die schwarzen Pfeilköpfe zeigen die Position des frühen PHB-Granulums (A). Weiterhin wurde eine spätere Phase der PHB-Bildung aufgenommen (B). Schwarze Pfeilköpfe zeigen auch hier die Formation von PHB-Granula an der Position eines bereits existierenden Fluoreszenzfokus (Zeitpunkte t = 300 – 340 min). Zu späteren Zeitpunkten konnte eine Heterogenität der PHB-Granula beobachtet werden: während sich neue PHB-Granula an Stellen bereits existierender Fluoreszenzfoci bildeten, war bei gereiften PHB-Granula keine Fluoreszenz mehr sichtbar (schwarze Pfeile). Der weiße Pfeilkopf zeigt die Reifung eines Granulums: nach 310 bis 330 Minuten lag eine Kolokalisation des PhaM-eYFP Fokus mit dem PHB-Granulum vor und nach 340 Minuten kam es zum Verlust des Fluoreszenzfokus (B). Die eYFP-Bilder wurden mit einer Belichtungszeit von 500 ms aufgenommen. Die Maßstäbe entsprechen 1 µm.

Wurde die PHB-Bildung und Lokalisation der eYFP-Foci zu einem späteren Zeitpunkt untersucht, konnte festgestellt werden, dass sichtbare PHB-Granula ohne Kolokalisation mit PhaM-eYFP auftraten (Abbildung 33B, schwarze Pfeile nach 320 Minuten). Dies könnte darauf hindeuten. dass sich der PhaM-PhaC1-Initiationskomplex während der späten Phase der PHB-Bildung von den PHB-Granula ablöst. Dieser Reifungsprozess der PHB-Granula konnte besonders zwischen 300 und 340 Minuten beobachtet werden. Zum Zeitpunkt 300 Minuten konnte an der Stelle des schwarzen Pfeilkopfes kein sichtbares PHB-Granulum im Durchlichtkanal detektiert werden, aber bereits ein eYFP-Focus. Nach weiteren 10 Minuten kam es zur Bildung des PHB-Granulums, welches mit der eYFP-Fluoreszenz kolokalisierte. Nach 330 Minuten wurde bereits sichtbar, dass die Intensität der eYFP-Fluoreszenz abnahm, was auf ein Ablösen von PhaM hindeutete.

Eine Abnahme der Fluoreszenz aufgrund starker, langanhaltender Belichtung konnte ausgeschlossen werden, da weitere Fluoreszenzfoci zu diesem Zeitpunkt noch eine starke Intensität aufwiesen. Schon 30 Minuten nach der Bildung des PHB-Granulums (Zeitpunkt t = 340 min) konnte keine weitere eYFP-Fluoreszenz an dem PHB-Granulum gezeigt werden, was ein vollständiges Ablösen des angenommenen Initiationskomplexes bedeuten könnte (weißer Pfeilkopf).

3.5.2 In vivo Lokalisationsverhalten von genomisch integriertem phaC1-eyfp

Ahnliche Ergebnisse, wie dies bereits für die in vivo Lokalisationsstudien von *R. eutropha* H16 *phaM-eyfp* (genomisch integriert) gezeigt werden konnte, wurden auch für den R. eutropha H16 Stamm mit einem genomisch integrierten phaC1-eyfp bestätigt. Für die Live Cell Imaging Experimente wurden die Zellen ebenfalls in zwei Vorkulturen für jeweils 24 h in NB-Medium angezogen, um die Zellen PHB-frei zu bekommen. Für die Mikroskopie wurden die Zellen auf NB-Glukonat-Agar getropft, für 10 Minuten getrocknet und anschließend wurde die PHB-Bildung und -Lokalisation untersucht (Abbildung 34). Es konnte beobachtet werden, dass zum Zeitpunkt t = 0 min zwei PhaC1-eYFP-Foci sichtbar waren und bereits die Bildung der PHB-Granula an den Stellen der eYFP-Fluoreszenz vermutet werden konnte. Nach 20 Minuten konnten zwei gebildete PHB-Granula an den Zellpolen visualisiert werden, welche sich bis zum Zeitpunkt t = 80 min vergrößerten und ebenfalls mit der PhaC1-eYFP-Fluoreszenz kolokalisierten Eine (Abbildung 34A). weitere Beobachtung war, dass sich zwei PHB-Granula niemals in einer Zellhälfte aufhielten, was zur Folge haben könnte, dass es während der Zellteilung zu einer "gerechten" Aufteilung der PHB-Granula auf die Tochterzellen kommt.

Zu späteren Zeitpunkten der PHB-Bildung konnte die Bildung eines PHB-Granulums an der Stelle eines existierenden eYFP-Fokus verfolgt werden (Abbildung 34B, schwarze Pfeilköpfe). Nach 9 Stunden Wachstum konnte eine Heterogenität der gebildeten PHB-Granula beobachtet werden: einige Granula zeigten keine Kolokalisation mit den PhaC1-eYFP-Foci (schwarze Pfeilköpfe in Abbildung 34C), wohingegen andere noch eine Bindung von PhaC1-eYFP an die PHB-Granula aufwiesen (weiße Pfeilköpfe in Abbildung 34C). Dies spricht für die Reifung der Granula und ein Ablösen des PhaC1-PhaM-Initiationskomplexes, wie dies auch schon für die genomische Integration von *phaM-eyfp* angenommen werden konnte.



Abbildung 34: *Time lapse*-Experiment von *R. eutropha* H16 Wildtyp mit einem chromosomal integrierten *phaC1-eyfp* Gen. PHB-freie Zellen wurden auf ein frisches NB-Glukonat-Agar-Pad überführt, für 10 Minuten getrocknet und anschließend wurde die PHB-Granulabildung mikroskopisch bei 30°C aufgenommen. Gezeigt sind verschiedene Aufnahmepunkte jeweils mit Durchlicht-Kanal und der Überlagerung von eYFP- und Durchlichtkanal. In den frühen Stadien der PHB-Bildung wurden Aufnahmeintervalle von 20 Minuten gewählt (A). Zu späteren Zeitpunkten wurde ein 5-Minuten-Intervall genutzt. Schwarze Pfeilköpfe zeigen die Bildung eines PHB-Granulums an der Position eines bereits bestehenden Fluoreszenzfokus (B). Nach einer Inkubation von neun Stunden konnte eine Heterogenität von PHB-Granula beobachtet werden, die entweder mit PhaC1-eYFP kolokalisierten oder nicht. Schwarze Pfeilköpfe markieren PHB-Granula ohne Fluoreszenz und PHB-Granula mit fluoreszierenden Foci werden durch weiße Pfeilköpfe hervorgehoben (C). Die eYFP-Bilder wurden mit einer Belichtungszeit von 500 ms aufgenommen. Die Maßstäbe entsprechen 1 μ m.

3.5.3 In vivo Lokalisation von genomisch integriertem phaC1-eyfp in R. eutropha H16 \triangle phaM

Die *Live Cell Imaging* Experimente mit einem chromosomal integrierten *phaC1-eYFP* zeigten, dass PHB-Granula in beiden Zellhälften aufzufinden waren, was während der Zellteilung eine Aufteilung der PHB-Granula auf die Tochterzellen ermöglichte. Da vorherige Ergebnisse bereits eine Rolle von PhaM bei der Verteilung der PHB-Granula auf die Tochterzellen nahelegten, sollte das Lokalisationsverhalten der PHB-Granula sowie der PhaC1-eYFP-Fluoreszenz in *R. eutropha* H16 Δ *phaM* untersucht werden. Dafür wurden, wie bereits bei den vorherigen Experimenten beschrieben, die Zellen mit Hilfe zweier NB-Vorkulturen über 24 h PHB-frei bekommen und anschließend auf NB-Glukonat-Agar kultiviert. Dabei zeigte sich, dass zu Beginn des Experiments eine lösliche Fluoreszenz von PhaC1-eYFP vorlag und keine PHB-Granula im Durchlichtkanal detektiert werden konnten. Innerhalb der nächsten 60 Minuten kam es zur Bildung eines in der Zellmitte befindlichen PHB-Granulums,

welches auch die Bildung eines eYFP-Fokus zur Folge hatte (Abbildung 35). Damit konnte geschlussfolgert werden, dass PhaM eine wichtige Rolle bei der Bildung des PhaC1-PhaM-Initiationskomplexes zukommt. Weiterhin zeigte sich deutlich, dass die Bildung der PHB-Granula im *△phaM*-Hintergrund im Vergleich zum Wildtyp verzögert stattfand und erst nach knapp einer Stunde ein PHB-Granulum gebildet wurde. Dieses *in vivo* Ergebnis stimmt mit dem positiven *in vitro* Effekt von PhaM auf die PhaC1-Oligomerisierung und PhaC1-Aktivität sowie der damit verbundenen schnelleren PHB-Bildung überein.

Interessanterweise kam es im weiteren Verlauf des Experiments zur Bildung eines weiteren PHB-Granulums, welches sich in enger räumlicher Nähe zum bereits vorhandenen Granulum befand. Dies zeichnete sich bereits nach 120 Minuten ab, war aber erst nach 180 Minuten als eigenständiges Granulum sichtbar. Nach 200 Minuten, als sich beide Granula in einer Zellhälfte befanden, konnte der Anfang der Zellteilung ausgemacht werden, da es zu einer beginnenden Invagination in der Zellmitte kam. Während der Zellteilung kam es nicht zur Verteilung der beiden bestehenden PHB-Granula auf die Tochterzellen, sondern zur Bildung eines neuen PHB-Granulums in der Tochterzelle ohne Granulum. Das neu gebildete PHB-Granulum wies eine PhaC1-eYFP-Fluoreszenz auf, wohingegen bei den älteren PHB-Granula auch ein Ablösen von PhaC1-eYFP und eine damit einhergehende Reifung der PHB-Granula beobachtet werden konnte.



Abbildung 35: Live Cell Imaging von R. eutropha H16 Δ phaM mit einem chromosomal integrierten phaC1-eyfp-Gen. PHB-freie Zellen wurden auf ein frisches NB-Glukonat-Agarpad überführt, für 10 Minuten getrocknet und anschließend wurde die PHB-Granulabildung mikroskopisch bei 30°C aufgenommen. Gezeigt sind verschiedene Aufnahmepunkte jeweils mit Durchlicht-Kanal und der Überlagerung von eYFP- und Durchlichtkanal. Zum Zeitpunkt t = 0 min zeigte sich eine lösliche PhaC1-eYFP-Fluoreszenz und erste Fluoreszenzfoci wurden während der PHB-Bildung nach 60 Minuten beobachtet. Nach 260 Minuten konnte nur eine teilweise Kolokalisation der PhaC1-eYFP-Foci mit den PHB-Granula detektiert werden. Die eYFP-Bilder wurden mit einer Belichtungszeit von 500 ms aufgenommen. Die Maßstäbe entsprechen 1 μ m.

Nach einer sechsstündigen Inkubation konnte eine Heterogenität der PHB-Granula festgestellt werden, da einige Granula eine eYFP-Fluoreszenz aufwiesen, andere hingegen nicht (nicht dargestellt). Zudem konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Verteilung der PHB-Granula während der Zellteilung deutlich eingeschränkt war, da sich PHB-Granula meist nur in einer Zellhälfte befanden. Dieses Ergebnis hebt die besondere Bedeutung für PhaM für die PHB-Granulaverteilung hervor.

3.5.4 Einfluss von PhaP1 auf die Lokalisation von PhaM-eYFP und PhaC1eYFP

Die Reifung der PHB-Granula mit fortschreitender Zeit und eine damit verbundene Granula-Heterogenität konnten mit Hilfe der genomischen Integrationen von phaMeyfp und phaC1-eyfp in R. eutropha H16 WT nachgewiesen werden. Während der PHB-Granulabildung kommt es zu einer Zunahme der PHB-Granula-assoziierten Proteine (PGAPs), wobei das Hauptphasin PhaP1 einen großen Teil der PGAP-Fraktionen ausmacht. Ein Ablösen von PhaC1 und PhaM vom PHB-Granulum könnte durch einen Anstieg der PhaP1-Menge hervorgerufen werden. Um dies zu überprüfen, wurde die Reifung der PHB-Organellen in R. eutropha H16 AphaP1 phaM-eyfp bzw. phaC1-eyfp mikroskopisch untersucht. (Abbildung 36). Als Kontrollen dienten R. eutropha H16 WT phaM-eyfp bzw. phaC1-eyfp. Die Zugabe von Na-Glukonat zum NB-Medium führte zur verstärkten Bildung von PHB. Die repräsentativen mikroskopischen Bilder wurden nach 8 Stunden der PHB-Bildung aufgenommen, um eine mögliche Heterogenität gereifter PHB-Granula zu detektieren. Die WT-Kontrollen zeigten eine Bildung vieler PHB-Granula, die mit der eYFP-Fluoreszenz kolokalisierten (Abbildung 36, beiden unteren Reihen). Bei der Uberlagerung des Durchlichtkanals mit den Fluoreszenzkanälen konnte zudem beobachtet werden, dass nicht alle PHB-Granula einen gebundenen Fluoreszenzfokus aufwiesen, was auf ein Ablösen von PhaM bzw. PhaC1 schließen lässt. Die genomischen Integrationen von *phaM-eyfp* bzw. *phaC1-eyfp* im ∆*phaP1-*Hintergrund führten zu einem veränderten Phänotyp der PHB-Entstehung: statt vieler kleinerer PHB-Granula kam es zur Bildung weniger großer sichtbarer Granula. Die Uberlagerung der eYFP-Fluoreszenz mit dem Durchlichtkanal ermöglichte die Detektion einer PHB-Granulaheterogenität: nicht alle Granula kolokalisierten mit PhaM-eYFP bzw. PhaC1-eYFP (schwarze Pfeilköpfe). Bei dem Stamm R. eutropha H16 ∆phaP1 phaC1-eyfp konnten zudem besonders viele kleine PhaC1-eYFP-Foci

beobachtet werden, denen im Durchlichtkanal kein sichtbares PHB-Granulum zugeordnet werden konnte.



Abbildung 36: Phänotypische Charakterisierung der genomischen Integrationen phaC1-eyfp und phaM-eyfp in R. eutropha H16 WT sowie Δ phaP1. Die Zellen wurden in NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat und 150 µg/ml Kanamycin bei 30°C kultiviert. Die Bilder wurden nach 8 Stunden in der exponentiellen Wachstumsphase aufgenommen. Die chromosomalen Integrationen von phaMeyfp und phaC1-eyfp zeigten in R. eutropha H16 WT viele PHB-Granula, die mit der eYFP-Fluoreszenz kolokalisierten. Im Δ phaP1-Hintergrund konnte die Bildung weniger großer PHB-Granula beobachtet werden, an die PhaM-eYFP bzw. PhaC1-eYFP gebunden war. Schwarze Pfeilköpfe markieren PHB-Granula ohne eYFP-Fluoreszenz. Von links nach rechts: Durchlicht, eYFP-Fluoreszenz, eYFP-DAPI-Überlagerung, Überlagerung aller Kanäle. Die Maßstäbe entsprechen 2 µm.

Parallel zur mikroskopischen Untersuchung erfolgte eine OD_{600} -Messung der Stämme, welche in Abbildung 37 dargestellt ist. Das Wachstumsverhalten der WT-Kontrollstämme zeigte keine Unterschiede. Für die genomischen Integrationen von *phaM-eyfp* bzw. *phaC1-eyfp* im $\Delta phaP1$ -Hintergrund konnte innerhalb der ersten 8 Stunden ein identischer Anstieg der OD-Werte festgestellt werden. Für die erreichten OD_{600} -Maxima wurden schließlich Unterschiede beobachtet. *R. eutropha* H16 $\Delta phaP1$ phaC1-eyfp wies im Vergleich zu *R. eutropha* H16 WT phaC1-eyfp signifikant geringere OD-Werte auf. Ähnliches konnte für den Stamm *R. eutropha* H16 $\Delta phaP1$ phaM-eyfp detektiert werden. Eine Erklärung dafür liegt vermutlich in der reduzierten Anzahl an gebildeten PHB-Granula, was einen Einfluss auf die OD-Messung ausübt.



Abbildung 37: Vergleich der Wachstumskurven von genomisch integriertem *phaM-eyfp* und *phaC1-eyfp* in *R. eutropha* H16 *ΔphaP1* sowie Wildtyp. Dargestellt ist das Wachstum der *R. eutropha* H16 Stämme WT *phaM-eyfp*, WT *phaC1-eyfp*, *ΔphaP1 phaM-eyfp* sowie *ΔphaP1 phaC1-eyfp* in NB-Medium + 0,2 % (w/v) Na-Glukonat bei 30°C über einen Zeitraum von 48 h. Nach zwei Vorkulturen über 24 h wurde die Hauptkultur 1:10 angeimpft. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen *R. eutropha* H16 WT *phaM-eyfp* und *ΔphaP1 phaM-eyfp* gezeigt werden, wohingegen das Wachstum des Stammes *R. eutropha* H16 *ΔphaP1 phaC1-eyfp* im Vergleich zu *R. eutropha* H16 WT *phaC1-eyfp* signifikant (p < 0,028) geringer war. Es wurde ein ungepaarter T-Test nach der Holm-Sidak-Methode durchgeführt. Die Wachstumskurven wurden in biologischen Triplikaten gemessen.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass das Hauptphasin PhaP1 keinen Einfluss auf die Reifung der PHB-Granula hat und, dass eine Zunahme von PhaP1 mit fortschreitender Zeit nicht das Ablösen von PhaM und PhaC1 vom PHB-Granulum verursacht.

3.5.5 Rolle der PHB-Synthase bei der Bindung von PhaM an PHB-Granula

Die bisherigen Ergebnisse konnten zeigen, dass die PHB-Synthase PhaC1 den Aktivator PhaM benötigt, um einen Initiationskomplex für die PHB-Synthese zu bilden, was die PHB-Bildung auch in vivo zu beschleunigen scheint. Der Einfluss von PhaC1, sowohl in aktiver als auch inaktiver Form, auf die Lokalisation von PhaM sollte anschließend mikroskopisch überprüft werden. Dafür wurde das Lokalisationsmuster der chromosomalen Integration von phaM-eyfp in R. eutropha H16 im WT- sowie *∆phaC1*-Hintergrund untersucht. PHB-freie Zellen wurden in NB-Glukonat-Medium kultiviert. Die dargestellten Mikroskopiebilder wurden während der exponentiellen Wachstumsphase nach 4 Stunden aufgenommen (Abbildung 38). Der Stamm R. eutropha H16 phaM-eyfp spiegelte die bereits beobachtete Lokalisation der Heterogenität der PHB-Granula wider. Nicht alle Granula wiesen eine PhaMeYFP-Fluoreszenz auf (Abbildung 38A, mittlere Reihe). Im *△phaC1*-Hintergrund konnten hingegen keine Fluoreszenzfoci detektiert werden, sondern eine überwiegend lösliche Fluoreszenz innerhalb des Zytoplasmas im Bereich der Nukleoidregion (Abbildung 38A, untere Reihe). Die sichtbaren Aussparungen der Fluoreszenz an den Zellpolen (Abbildung 38A, schwarze Pfeilköpfe) konnten in dem Kontrollstamm R. eutropha H16 pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp nicht beobachtet werden (Abbildung 38A, obere Reihe). Bei der Kontrolle trat vielmehr eine homogen-verteilte zytoplasmatische Fluoreszenz auf. Mit dem Ergebnis konnte gezeigt werden, dass entweder die PHB-Synthase oder ein PHB-Molekül eine wichtige Rolle für die Lokalisation von PhaM spielt.

Um zu überprüfen, welcher der beiden genannten Faktoren (PhaC1 oder PHB-Molekül) für das Lokalisationsverhalten von PhaM ausschlaggebend ist, wurden zwei weitere Stämme unter PHB-permissiven Bedingungen kultiviert und mikroskopisch untersucht. Zu einem der Stamm R. eutropha H16 △phaC1 phaM-eyfp mit dem Überexpressionsplasmid pCM62::P_{phaC}-dsred2_{EC}-phaC und andererseits der Stamm eutropha H16 AphaC1 phaM-eyfp mit dem Überexpressionsplasmid R. pCM62::P_{phaC}-dsred2_{EC}-phaC^{C319A}. Beim Stamm mit der exprimierten aktiven PHB-Synthase konnten PHB-Granula im Durchlichtkanal sowie im DsRed2_{EC}-Kanal detektiert werden, was die Funktionalität des Plasmides verifizierte. Weiterhin traten PhaM-eYFP-Fluoreszenzfoci auf, die mit den PHB-Granula kolokalisierten (Abbildung 38B). Ein Crossover der eYFPsowie DsRed2_{EC}-Fluoreszenz konnte ausgeschlossen werden, da die Überlagerung aller Kanäle voneinander getrennte Fluoreszenzfoci aufwies. Im Gegensatz dazu führte die Expression der inaktiven PhaC1^{C319A} zur keiner Bildung von PHB-Granula, PhaM-eYFP- sowie DsRed2_{EC}-PhaC1^{C319A}-Foci, sondern der Stamm zeigte eine lösliche Fluoreszenz innerhalb des Zytoplasmas mit Aussparungen an den Zellpolen (Abbildung 38C). Die generelle Fähigkeit der inaktiven PhaC1^{C319A} in *R. eutropha* H16 WT an PHB-Granula zu binden, konnte bereits in früheren Experimenten nachgewiesen werden (Pfeiffer und Jendrossek, 2012) und eine Sequenzierung des Plasmid schloss eine lösliche Expression aufgrund möglicher Mutationen aus.

Damit kann geschlussfolgert werden, dass es zu einer Fokussierung der PhaMeYFP-Fluoreszenz nur kommt, wenn in Gegenwart der aktiven PHB-Synthase PHB-Moleküle gebildet werden. Dies trifft ebenso auf die Fähigkeit zur Focibildung von PhaC1 zu. Eine *in vivo* Interaktion von PhaM und inaktiver PhaC1 trotz fehlender Fluoreszenzfoci- und PHB-Bildung kann dennoch möglich sein.



Abbildung 38: Expressionsmuster von chromosomal integriertem *phaM-eyfp* in *R. eutropha* H16 im Wildtyp- und $\Delta phaC1$ -Hintergrund. *R. eutropha* H16 WT Zellen mit dem Kontrollplasmid pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp zeigten eine gleichmäßig verteilte grüne Fluoreszenz innerhalb des Zytoplasmas (obere Reihe, A). Die Bildung von Fluoreszenzfoci konnte bei Zellen mit einem chromosomal verankerten *phaM-eyfp* Gen beobachtet werden (mittlere Reihe, A). Eine Expression von PhaM-eYFP im $\Delta phaC1$ -Hintergrund resultierte hingegen in einer heterogen verteilten, grünen Fluoreszenz im Zytoplasma mit Aussparungen an den Zellpolen (schwarze Pfeilköpfe, untere Reihe, A). Die DsRed2_{EC}-PhaC1-induzierte Bildung von PHB-Granula führte zur Lokalisation der PhaM-eYFP-Fluoreszenz in Bereichen der PHB-Granula in Zellen mit $\Delta phaC1$ -Hintergrund (B). Eine Ko-Expression von PhaM-eYFP und DsRed2_{EC}-PhaC1^{C319A} zeigte hingegen eine zytoplasmatisch verteilte Fluoreszenz in Zellen mit $\Delta phaC1$ -Hintergrund (C). Die Maßstäbe entsprechen 1 µm.

3.5.6 Oligomerisierung der inaktiven PHB-Synthase PhaC1^{C319A}

Die mikroskopischen Daten konnten zeigen, dass PhaM und PhaC1 nur Foci bilden, wenn PHB synthetisiert wurde. Ein Interaktion von PhaM und inaktiver PHB-Synthase konnte in diesem Zusammenhang nicht direkt nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob die inaktive PhaC1 in der Lage ist, mit PhaM zu interagieren sowie Homodimere zu bilden, wie dies bereits für die aktive PhaC1 nachgewiesen werden konnte, wurden *Crosslinking*-Experimente durchgeführt (Jia *et al.*, 2001). Dafür wurde aufgereinigte PhaC1^{C319A} in Gegenwart von steigenden Konzentrationen an PhaM^{WT} mit 2,5 %-iger (v/v) Glutardialdehydlösung (GDA) vernetzt und das *Crosslinking*-Verhalten auf einem SDS-Gel analysiert (Abbildung 39A). Als Kontrollen dienten PhaM^{WT} (Spur 1), PhaC1^{C319A} (Spur 2) sowie PhaM^{WT} mit PhaC1^{C319A} ohne GDA (Spur 3), und PhaM^{WT} (Spur 4) und PhaC1^{C319A} (Spur 5) allein mit GDA. Ein Vergleich ermöglichte das Experiment mit PhaC1^{WT} und PhaM^{WT} (Abbildung 39B).

Wildtyp-Synthase sowie inaktive Synthase (PhaC1^{C319A}) existierten in einem Equilibrium von Monomeren, Dimeren und höheren Oligomeren, wie dies in Spur 6 nach Vernetzen mit GDA sichtbar wurde. Die Zugabe von steigenden Mengen PhaM^{WT} führte zu einer Abnahme der Monomer-Fraktion sowohl für PhaC1^{WT} als auch PhaC1^{C319A} (Abbildung 39, jeweils Spuren 7 – 10). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Mutation Cys319Ala keinen Einfluss auf die Fähigkeit der PHB-Synthase zur Oligomerisierung hat. Weiterhin konnte keine Einschränkung mit der Komplexbildung mit PhaM^{WT} festgestellt werden.

Damit bestätigte dieses *in vitro* Ergebnis, dass die homogen verteilte Fluoreszenz von DsRed2_{EC}-PhaC1^{C319A} in *R. eutropha* H16 $\Delta phaC1$, die im vorherigen Experiment gezeigt werden konnte, keine Auswirkung einer insuffizienten Dimerisierung von PhaC1 sowie fehlenden Komplexbildung mit PhaM war.



Abbildung 39: *Crosslinking* von PhaM^{WT} und PhaC1^{C319A} im Vergleich zu PhaM^{WT} und PhaC1^{WT}. Die Oligomerisierung der Fraktionen mit His₆-PhaC1^{WT} sowie His₆-PhaM^{WT} (**A**) und His₆-PhaC1^{C319A} sowie His₆-PhaM^{WT} (**B**) wurde mittels Glutardialdehyd-*Crosslinking* analysiert. Es wurden 2,5 % (v/v) GDA, 14 μ M PhaC1^{C319A} bzw. PhaC1^{WT} (Spuren 3, 4, 6) sowie 8 μ M PhaM^{WT} (Spuren 2, 4, 5) für die Kontrollen genutzt (jeweils Spuren 2 – 6). Für einen sichtbaren Oligomerisierungseffekt wurden steigende Konzentrationen von PhaM^{WT} verwendet (1,3; 2,6; 5,2 sowie 7,8 μ M; Spuren 7 – 10). Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 8 %-igen SDS-Gel. Das Gel wurde über Nacht mit kolloidalem Coomassie gefärbt und anschließend mit Wasser entfärbt.

3.5.7 Untersuchungen der Lokalisation von PhaM und PhaC1^{C319A} mittels BiFC

Die *Crosslinking*-Experimente gaben bereits einen ersten *in vitro* Aufschluss darüber, dass PhaM und die inaktive PhaC1^{C319A} miteinander interagieren. Um dies *in vivo* zu bestätigen, wurden Experimente zur bimolekularen Fluoreszenzkomplementierung (BiFC) durchgeführt. Dabei wurden zwei Vektoren verwendet, die jeweils einen Teil des eYFP-Proteins enthielten, welcher wiederum an PhaM bzw. PhaC1^{C319A} fusioniert war. Eine *in vivo* Interaktion von PhaM und inaktiver PHB-Synthase sollte so zu einer Komplementierung der eYFP-Fluoreszenz führen. Als Ausgangsvektoren dienten pBBR1MCS2::*YN*-c1 sowie pCM62::*YC*-c1. Die Negativkontrollen *YC*-c1 *YN*c1; *YC*-c1 *YN-phaM* sowie die Positivkontrolle *YC-phaM YN-phaM* wurden in *R. eutropha* H16 WT untersucht. Eine Interaktion von aktiver PhaC1 mit PhaM konnte mittels der BiFC bereits von Pfeiffer und Jendrossek, 2013 nachgewiesen werden. Die Interaktionsstudien von PhaM und PhaC1^{C319A} in dieser Arbeit fanden in *R. eutropha* H16 Δ phaC1 statt.

Die Stämme wurden in zwei NB-Vorkulturen über jeweils 24 h angezogen. Die zweite Vorkultur enthielt bereits 0,2 % (w/v) Arabinose. Anschließend wurden die Zellen in NB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika sowie 0,2 % (w/v) Na-Glukonat und 0,2 % (w/v) Arabinose überführt und nach 4 Stunden mikroskopisch analysiert (Abbildung 40). Die Einstellung der LUT erfolgte für alle Proben gleich. Die Negativkontrollen zeigten keine Komplementierung der eYFP-Fluoreszenz (Abbildung 40A), nur die Bildung von im Durchlichtkanal sichtbaren PHB-Granula. Ein eYFP-Fluoreszenzsignal konnte für die Interaktion von PhaM mit sich selbst gezeigt werden, was die Ergebnisse von Pfeiffer und Jendrossek, 2013 bestätigte (Abbildung 40B). Bei den Stämmen mit YC-phaC1^{C319A} und YN-phaM sowie YCphaM und YN-phaC1^{C319A} konnte keine Bildung von PHB-Granula im Durchlichtkanal kam es zur Bildung eines detektiert werden. Dennoch klaren eYFP-Fluoreszenzsignals, was auf die Interaktion von PhaM und PhaC1^{C319A} und einer daraus resultierenden eYFP-Komplementierung schließen lässt. Die Fluoreszenz lokalisierte sich im Bereich der DNA, was durch die Anfärbung letzterer mit DAPI sichtbar wurde. Vereinzelt kam es zur Bildung von Fluoreszenzfoci an der DNA (Abbildung 40C).



Abbildung 40: BiFC-Analyse zwischen PhaM und PhaM sowie PhaC1^{C319A} und PhaM in *R. eutropha* H16 Δ *phaC1*. Die Zellen wurden in NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Arabinose, 0,2 % (w/v) Glukonat sowie 15 µg/ml Tetracyclin und 150 µg/ml Kanamycin bei 30°C kultiviert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte nach 4 Stunden. Als Negativkontrollen diente ein Stamm mit den korrespondierenden eYFP-Fragmenten (YC-c1 YN-c1) sowie ein weiterer mit nur einer phaM-Fusion (YC-c1 YN-phaM) (A). Bei der Positivkontrolle handelte es sich um Zellen mit zwei phaM-Fusionen (YC-phaM YN-phaM) (B). Die Kombinationen YC-phaM YN-phaC1^{C319A} sowie YC-phaC1^{C319A} YN-phaM zeigten im Δ phaC1-Hintergrund eine Interaktion, was die Detektion der eYFP-Fluoreszenz ermöglichte (C). Alle Bilder wurden mit einer Belichtungszeit von 4 ms aufgenommen. Die Einstellung der LUT erfolgte äquivalent für alle Proben. Die Maßstäbe entsprechen 1 µm.

Insgesamt spiegelte dieses Ergebnis die bisherigen Beobachtungen der genomischen Integration von *phaM-eyfp* mit der Koexpression des Plasmids pCM62::P_{phaC}-dsred2_{EC}-phaC^{C319A} in *R. eutropha* H16 Δ phaC1 wider.

3.6 PhaM – Einfluss von *in vivo* Phosphorylierungen

3.6.1 Identifikation von *in silico* Phosphorylierungsstellen in PhaM

Eine in silico Motivsuche mit ScanProsite für PhaM gab Hinweise auf einige Phosphorylierungsstellen in PhaM (Abbildung 41). Darunter konnten drei potenzielle Phosphorylierungen an zwei Serinen (S97, S141) und einem Threoninrest (T126) gefunden werden, die als Casein Kinase 2 (CK2) Phosphorylierungsstellen identifiziert wurden. Ein weiteres Phosphorylierungsmotiv war die Proteinkinase C (PKC) Phosphorylierung, die an dem Threoninrest T215 vorhergesagt wurde. Die Substratspezifität der Serine/Threonine Kinase Casein 2 kann wie folgt zusammengefasst werden: eine saure Aminosäure, entweder Glutamat (E) oder Aspartat (D), muss sich drei Reste C-terminal von der Phosphatakzeptor-Stelle entfernt befinden (Angabe von ScanProsite). Für die zwei gefundenen CK2-Phosphorylierungsstellen S97 und T126 konnte jeweils ein Glutamatrest E100 und E129 aufgezeigt werden. Für die CK2-Phosphorylierungstelle S141 wurde ein Aspartat D144 gefunden. Die Protein Kinase C zeigt in vivo eine Präferenz für die Phosphorylierung eines Serin- oder Threoninrestes nahe einer C-terminalen basischen Aminosäure. Für die gefundene PKC-Phosphorylierungsstelle T215 konnte C-terminal ein Lysin identifiziert werden.

PhaM	10 MFGQIPDFTNGFDFMRRLV	2,0 3,0 NGSGSGMPAGMMPGLQ	40 AMTPPMDLDDLDKR	50 HADLKAVES
	60 70	80 00	P 100	110
PhaM	WLQLNTNLLRTTIQGLEV	QRATLVALQTFGNALSI	PEAMQSAMENVARA	ANTPSAAAP
	120 🕑 130	140	150 160	170
PhaM	ERDAGADADSG <mark>T</mark> QQEPPA	AERPQAAA <mark>S</mark> DTDSALPI	PNAALWWDLLQQQF	NQIASSAAA
PhoM				220 ARKARAKKA
FIIAM	ASTAF FOMOOV OUF GTAA	SF DAAAQAAAAAA TA TDI	AF GRAASAG <mark>I</mark> GRFA	
	230 240	250 260		
PhaM	PAKKAAKAKPARDAGNGEI	DNGKNGGNNGANGSSA	Α	

Abbildung 41: *In silico* Screening für Phosphorylierungsstellen von PhaM. Mittels *ScanProsite* wurde eine *in silico* Motivsuche für PhaM durchgeführt. Vier potenzielle Phosphorylierungsstellen konnten gefunden werden. Drei davon repräsentierten Casein Kinase 2 (CK2) Phosphorylierungsstellen, an zwei Serinen (S97, S141) und einem Threoninrest (T126) (lila hervorgehoben). Die vierte Stelle war eine Proteinkinase C (PKC) Phosphorylierung an einen Threoninrest (T215) (blau markiert). Die Darstellung erfolgte mittels *"Jalview"*.

3.6.2 Nachweis der Phosphorylierungen mittels Proteomanalyse

Im Zuge einer Proteomanalyse von PhaM sollte untersucht werden, ob die *in silico* gefundenen Phosphorylierungsstellen von PhaM auch tatsächlich auftreten. Für die Proteomanalyse mittels Massenspektrometrie wurden die Stämme *R. eutropha* H16 pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM und pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM^{K3-6/} in jeweils zwei NB-Vorkulturen angezogen und schließlich in NB-Medium mit 0,2 % (w/v) Na-Glukonat für 4 Stunden bei 30°C kultiviert. Nach Aufschluss der Zellen wurde ein *pull down* mit magnetischen Beads durchgeführt. Letztere wiesen eine Spezifität für das Fluoreszenzprotein eYFP auf, sodass das Fusionsprotein eYFP-PhaM analysiert werden konnte.

PhaM	10 20 30 40 50 MFGQIPDFTNGFDFMRRLWGSGSGMPAGMMPGLQAMTPPMDLDDLDKRIADLKAV	ES
PhaM	60 70 80 90 100 110 WLQLNTNLLRT <mark>I</mark> IQGLEVQRATLVALQ <mark>I</mark> FGNALSPEAMQSAMENVARAANTPSAA	AP
PhaM	120 130 140 150 160 ERDAGADADSGTQQEPPAAERPQAAASDTDSALPPNAALWWDLLQQQFNQIASSA	170 .AA
PhaM	180 190 200 210 220 ASIAPFGMGGVGGFGTAASPDAAAQAAAAKPKTDAPGKAASAGTGKPAARKAPAK	KA
PhaM	230 240 250 260 PAKKAAKAKPARDAGNGEDNGKNGGNNGANGSSAA	

Abbildung 42: Identifizierte Phosphorylierungsstellen von PhaM mittels Proteomanalyse. In zwei unabhängigen Proteomexperimenten konnten zwei Phosphorylierungsstellen mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Dabei handelte es sich um zwei phosphorylierte Threoninreste (T69, T85). Die Darstellung erfolgte mit *"Jalview"*.

Die Ergebnisse identifizierten je eine phosphorylierte Aminosäure in zwei unabhängigen Proteomanalysen. Dabei handelte es sich um die Threoninreste T69 und T85 (Abbildung 42). Bei beiden Experimenten konnte jeweils ein Peptidfragment von PhaM gefunden werden, welches phosphoryliert vorlag. Die Anzahl der Spektren zeigte, dass nur rund 0,2 normalisierte Spektren von insgesamt 45 Spektren von PhaM gefunden wurden, bei denen eine Phosphorylierung detektiert werden konnte. Folglich ist die Wahrscheinlichkeit für die Phosphorylierung von PhaM während der exponentiellen Wachstumsphase (Zeitpunkt 4 h) sehr gering.

Bei dem Vergleich der *in vitro* erhaltenen Proteomdaten mit der *in silico* Vorhersage konnten weiterhin keine Übereinstimmungen in den Phosphorylierungsstellen bestätigt werden. Allerdings wurde nur ein Peptidfragment gefunden, welches die *in silico* Phosphorylierungsstelle S97 einschloß. Peptidfragmente, die die weiteren drei *in silico* Phosphorylierungsstellen T126, S141 und T215 enthielten, konnten bei der Proteomanalyse nicht detektiert werden.

3.6.3 Mutagenese der Phosphorylierungsstellen und Mikroskopie

Trotz der nicht eindeutigen Ergebnisse der Proteomanalyse sollte überprüft werden, ob die gefundenen Phosphorylierungen von PhaM einen Einfluss auf den Phänotyp bzw. PHB-Gehalt ausüben. Dafür wurden gerichtete Mutagenesen der identifizierten Threoninreste T69 und T85 durchgeführt. Diese wurden zum einen durch Alanine substituiert, die aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe nicht phosphorylierbar sind. die Andererseits wurden Threonine gegen negative-geladene Aspartreste ausgetauscht, die eine Phosphorylierung imitieren (Abbildung 43). Als Grundlage Uberexpressionsplasmid pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM, diente das um eine mikroskopische Analyse zu ermöglichen.

	<u></u> မို	70	80	90
PhaM	WLQLNTNLLRT	IQGLE	VQRATLVALQ	FGNALS
PhaM(T69A)	WLQLNTNLLRT	AIQGLE	VQRATLVALQ	FGNALS
PhaM(T69D)	WLQLNTNLLRT	DIQGLE	VQRATLVALQ	FGNALS
PhaM(T85A)	WLQLNTNLLRT	TIQGLE	VQRATLVALQ	FGNALS
PhaM(T85D)	WLQLNTNLLRT	IQGLE	VQRATLVALQ	FGNALS

Abbildung 43: Gerichtete Mutagenese der potenziellen Phosphorylierungsstellen in PhaM. Die zwei phosphorylierten Threoninreste T69 und T85 wurden entweder durch Alanine ausgetauscht (T69A, T85A) oder durch negativ-geladene Aspartatreste substituiert (T69D, T85D). Die veränderten Aminosäuren sind blau markiert. Die Darstellung erfolgte mittels *"Jalview"*.

Die klonierten Mutageneseplasmide wurden in *R. eutropha* H16 konjugiert und zusammen mit dem Kontrollplasmid pBBR1MCS2::P_{phaC}-eyfp-phaM wie unter 2.5.2 beschrieben kultiviert und sowohl während der PHB-Aufbau- als auch -abbauphase mikroskopisch untersucht. Das in Abbildung 44 dargestellte Ergebnis zeigt Zellen, die

sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden (t = 4 h). Es konnten insgesamt keine Unterschiede zwischen der Kontrolle eYFP-PhaM und den Stämmen mit den mutierten putativen Phosphorylierungsstellen von PhaM festgestellt werden. Es kam zu einer Kolokalisation der im Durchlicht sichtbaren gebildeten PHB-Granula mit der eYFP-Fluoreszenz. Der PHB-eYFP-PhaM-Komplex lokalisierte bei allen Stämmen in der Zellmitte, wo gleichzeitig eine Bindung des eYFP-Fokus mit der DAPI-gefärbten DNA detektiert werden konnte. Das Wachstumsverhalten der Stämme wies ebenso keine Unterschiede auf (nicht dargestellt).

die Schlussfolgernd kann gesagt werden. dass mutierten putativen Phosphorylierungsstellen von PhaM in vivo keinen Einfluss auf den Phänotyp der Zellen ausüben und eine Kolokalisation des PHB-PhaM-Komplexes mit der DNA nicht eingeschränkt wird. Aufgrund dieses Ergebnisses sowie der Widersprüchlichkeit der Ergebnisse der Proteomanalyse und den in silico Daten wurden keine weiterführenden Experimente zur Bestimmung des PHB-Gehaltes mittels Gaschromatographie durchgeführt.



Abbildung 44: Phänotypische Charakterisierung der putativen Phosphorylierungsstellen in PhaM in *R. eutropha* H16. Die *R. eutropha* H16 Zellen mit den Mutagenese-Plasmiden wurden in NB-Medium + 0,2 % (w/v) Na-Glukonat bei 30°C kultiviert. Die dargestellten repräsentativen Zellen wurden nach 4 Stunden Wachstum mikroskopiert. Es konnten keinerlei Unterschiede zur Kontrolle festgestellt werden. Die Maßstäbe entsprechen 1 μ m.

3.7 PhaM – SRP α -Motiv

Neben dem PAKKA-Doppelmotiv gibt es laut *KEGG Genome* Datenbank ein weiteres Motiv in PhaM: das sogenannte SRPα-N-terminal-Motiv. Dabei handelt es sich um den N-Terminus der α-Untereinheit des Signalerkennungspartikels (SRP, *engl. signal recognition particle*). Das Signalerkennungspartikel ist ein multimeres Protein, welches zusammen mit dem Rezeptor SR (Signalerkennungspartikelrezeptor) in Prokaryoten eine Rolle beim Transport von sekretorischen Proteinen zur Plasmamembran spielt (Reyes *et al.*, 2007). In Eubakterien besteht das SRP aus drei Domänen, darunter eine Nukleotidbinde-GTPase-Domäne, die den Transportprozess kontrolliert.

In Abbildung 45 ist die Sequenzlänge dieses Motives dargestellt, welches die Aminosäuren 96 bis 245 von PhaM umfasst. Innerhalb dieses SRPα-Motives befindet sich auch das bereits in dieser Arbeit charakterisierte PAKKA-Doppelmotiv. Der in der *KEGG Genome* Datenbank angegebene E-Wert (*engl. Expect Value*) gibt Aussagen über die Wahrscheinlichkeit des Auftretens. Je niedriger dieser Wert ist, desto wahrscheinlicher ist, dass dieses Motiv innerhalb des Proteins vorkommt. Das bereits nachgewiesene Motiv PhaC_N (N-Terminus der PHB-Polymerase) von PhaC1 weist beispielsweise einen E-Wert von 1,9*10⁻⁶⁸ auf. Im Gegensatz dazu weist das SRPα-N-terminal-Motiv lediglich einen E-Wert von 0,31 auf, womit die Wahrscheinlichkeit für die Existenz dieses Motives sehr gering ist.



Abbildung 45: SRP α -**Motiv in PhaM.** Laut *KEGG Genome* Datenbank konnte ein Motiv für PhaM gefunden werden. Dabei handelte es sich um das Motiv der α -Untereinheit des Signalerkennungspartikels (SRP), welches die Aminosäuren 96 bis 245 von PhaM einschließt (grau markiert). Der E-Wert für dieses Motiv betrug lediglich 0,31.
3.7.1 Malachitgrün-basierter kolorimetrischer PhaM-Aktivitätsassay

Für einen Nachweis einer potenziellen NTPase-Aktivität von PhaM, die mit dem SRPα-Motiv in Verbindung stehen könnte, wurde ein Malachitgrün-basierter kolorimetrischer Assay durchgeführt. Dieser ermöglicht die Detektion von freigesetztem anorganischen Phosphat, indem der gebildete farblose Phosphomolybdatkomplex in Gegenwart des basischen pH-Indikatorfarbstoffes Malachitgrün in einen farbigen Komplex übergeht, der bei 642 nm gemessen werden kann (Quan und Robinson, 2005).

Für den Assay wurde aufgereinigtes His₆-PhaM (Abbildung 6 im Anhang) mit den Nukleotiden GTP, GDP oder ATP für einen Zeitraum von 30 Minuten bei 30°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von EDTA und Malachitgrün-Reagenz entwickelt. Die Absorption konnte bei 642 nm gemessen werden. In Abbildung 46A ist die Farbentwicklung durch Malachitgrün-Zugabe sichtbar. Dabei konnte gezeigt werden, dass es nur bei PhaM mit GTP oder ATP zu einer deutlichen Grünfärbung kam. Die Inkubation mit GDP bewirkte hingegen keine Färbveränderung. Die gemessenen Absorptionswerte spiegelten diese Ergebnisse wider (Abbildung 46B). Die Inkubation mit GDP führte zu keiner nennenswerten Absorption bei 642 nm. Für die Inkubation von PhaM mit GTP konnte hingegen eine Absorption von etwa 0,18 gemessen werden. Wurde der Reaktionsansatz mit ATP inkubiert, konnte für PhaM ein Absorptionswert von 0,24 detektiert werden.

Die mitgeführten Phosphatstandards (5, 25, 50, 100, 150, 250, 500 μ M) ermöglichten eine genaue Berechnung des freigesetzten anorganischen Phosphats (Abbildung 46C). Dabei zeigte sich, dass der Ansatz PhaM und ATP die größten Mengen an anorganischem Phosphat (etwa 76 μ M) freisetzte, was die gemessenen Absorptionswerte bestätigte. Mit GTP konnten nur Werte von etwa 50 μ M detektiert werden (Abbildung 46D).

Mit diesem Ergebnis konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von PhaM mit den Nukleosidtriphosphaten GTP oder ATP eine Freisetzung von anorganischem Phosphat bewirkte, wohingegen eine Ko-Inkubation von PhaM mit GDP keinen Effekt hervorrief.

131



Abbildung 46: Kolorimetrischer PhaM-Aktivitätsassay in Gegenwart verschiedener Nukleotide. Für den kolorimetrischen PhaM-Aktivitätsassay wurden 13,5 μ M PhaM eingesetzt. Die Endkonzentration der jeweiligen Nukleotide im Reaktionsmix betrug 0,3 mM. Der Reaktionsansatz wurde 30 Minuten bei 30°C bei 100 *rpm* inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 mM EDTA-Na₂ abgestoppt und mit einem Malachitgrün-Reagenz für 5 Minuten bei Raumtemperatur entwickelt. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. Als Kontrollen dienten Proben ohne Protein (Autohydrolyse der Nukleotide) sowie Proben ohne Nukleotide (endogenes Phosphat des Proteins) (A). Die Absorption wurde anschließend im Plattenreader bei 642 nm gemessen (B). Anhand einer mitgeführten Phosphatstandardreihe konnten das freigesetzte anorganische Phosphat (C) und die Aktivität des PhaM-Proteins berechnet werden (1 Unit = Enzymmenge, die 1 µmol freies Phosphat pro Minute bei 30°C katalysiert) (D).

Interessanterweise konnte bei Experimenten mit PhaC1 auch festgestellt werden, dass PhaC1 in der Lage ist, ATP, aber nicht GTP zu hydrolysieren (Abbildung 47). Es konnte in Gegenwart von ATP ein mittlerer Absorptionswert (A_{642nm}) von 0,65 detektiert werden, was ebenfalls für die Ko-Inkubation von PhaM mit ATP erreicht werden konnte (Abbildung 47A). Im Gegensatz dazu resultierte eine Inkubation von PhaC1 mit GTP lediglich in einem A_{642nm} -Wert von etwa 0,15, was keinem detektierbaren P_i entsprach. Für PhaM mit GTP lag die Absorption bei 0,3, was einer Freisetzung von etwa 50 μ M P_i entsprach (Abbildung 47B). Eine mitgeführte BSA-Kontrolle konnte weder für ATP noch GTP eine Änderung der Absorption feststellen, was die Ergebnisse für PhaC1 und PhaM festigte. Weitere Aktivitätsassays mit PhaC1 wurden im Verlauf der Arbeit nicht durchgeführt.



Abbildung 47: Kolorimetrischer Aktivitätsassay mit PhaM, PhaC1 und BSA in Gegenwart verschiedener Nukleotide Für den kolorimetrischen Aktivitätsassay wurden 15 μ M PhaM, 15 μ M PhaC1 sowie 15 μ M BSA eingesetzt. Die Endkonzentration der jeweiligen Nukleotide im Reaktionsmix betrug 0,3 mM. Der Reaktionsansatz wurde 30 Minuten bei 30°C bei 100 *rpm* inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 mM EDTA-Na₂ abgestoppt und mit einem Malachitgrün-Reagenz für 5 Minuten bei Raumtemperatur entwickelt. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. Als Kontrollen dienten Proben ohne Protein (Autohydrolyse der Nukleotide) sowie Proben ohne Nukleotide (endogenes Phosphat des Proteins) (A). Die Absorption wurde anschließend im Plattenreader bei 642 nm gemessen (B). Anhand einer mitgeführten Phosphatstandardreihe konnten das freigesetzte anorganische Phosphat (C) und die Aktivität des PhaM-Proteins berechnet werden (1 Unit = Enzymmenge, die 1 μ mol freies Phosphat pro Minute bei 30°C katalysiert) (D).

Um zu überprüfen, ob sich bei der NTPase-Reaktion von PhaM eine Sättigung der ATP- bzw. GTP-Umsetzung einstellt, wurde die Freisetzung des anorganischen Phosphats über einen Zeitraum von 2 Stunden gemessen. Dafür wurden 15 μ M His₆-PhaM mit 0,3 mM GTP oder ATP bei 30°C inkubiert und nach 5, 10, 20, 30, 60 und 120 Minuten wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 mM EDTA-Na₂ abgestoppt und mit Malachitgrün-Reagenz entwickelt. Die Messung der Absorption bei 642 nm ergab einen Anstieg mit zunehmender Zeit sowohl für die Inkubation mit GTP als auch ATP. Bis zu dem Zeitpunkt von 2 Stunden konnte keine Sättigung der Enzymreaktion von PhaM festgestellt werden. Leicht erhöhte Absorptionswerte konnten für die ATP-Hydrolyse detektiert werden (Abbildung 48A).

Für die Inkubation von PhaM mit GTP konnten nach 2 Stunden im Mittel 327 μ M anorganisches Phosphat detektiert werden, wohingegen für PhaM mit ATP ein Wert von durchschnittlich 364 μ M P_i erreicht wurde. Trotz der abgezogenen Nukleotid-Autohydrolysewerte wurde mehr anorganisches Phosphat freigesetzt als durch die Nukleotide eingesetzt wurde. Möglich wäre, dass die eingesetzten Nukleotide ATP und GTP mit anorganischem Phosphat verunreinigt waren.



Abbildung 48: Kinetik der Aktivität von PhaM. Für den kolorimetrischen PhaM-Aktivitätsassay wurden 15 μ M PhaM eingesetzt. Die Endkonzentration der jeweiligen Nukleotide im Reaktionsmix betrug 0,3 mM. Der Reaktionsansatz wurde bei 30°C und 100 *rpm* inkubiert. Die Reaktion wurde nach den angegebenen Zeitpunkten mit 100 mM EDTA-Na₂ abgestoppt und zuletzt mit einem Malachitgrün-Reagenz für 5 Minuten bei Raumtemperatur entwickelt. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Absorption wurde anschließend im Plattenreader bei 642 nm gemessen (A). Anhand einer mitgeführten Phosphatstandardreihe konnte das freigesetzte anorganische Phosphat (B) und die Enzymaktivität des PhaM Proteins berechnet werden (C). Die Angabe der Aktivität von PhaM erfolgte in Units/I. Eine Unit entspricht der Menge an PhaM, die 1 µmol freies anorganisches Phosphat pro Minute bei 30°C katalysiert (D).

Die Berechnung der enzymatischen Aktivität erfolgte nach der in Abbildung 48D angegebenen Formel und wurde in Abbildung 48C graphisch dargestellt. Über die Zeit konnte eine Abnahme der Aktivität von PhaM aufgrund sinkender Substratkonzentrationen beobachtet werden. Für die Inkubation mit ATP wurde ein Maximum von 40 Units/I nach 20 Minuten erreicht. Für den Ansatz von PhaM mit GTP konnte eine maximale Aktivität von 75 Units/I nach 5 Minuten errechnet werden, womit gezeigt werden konnte, dass PhaM in Gegenwart von GTP innerhalb der ersten 5 Minuten deutlich aktiver ist als mit ATP. Bei ATP konnte hingegen eine geringfügig höhere Aktivität mit zunehmender Zeit detektiert werden. Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass es sich bei der detektierten Phosphatfreisetzung um eine enzymatische Reaktion von PhaM handelte.

3.7.2 Rolle der PhaM-Hitzestabilität auf die Aktivität von PhaM

Frühere Untersuchungen von Pfeiffer und Jendrossek, 2014 konnten bereits die hohe Thermostabilität von PhaM zeigen. Hitzebehandeltes sowie unbehandeltes PhaM führten zu einer Verkürzung der *lag*-Phase der PhaC1-Aktivität *in vitro*. Der Einfluss der Hitzestabilität auf die gefundene Aktivität von PhaM sollte ebenfalls charakterisiert werden. Dafür wurde PhaM für 20 Minuten bei 95°C aufgekocht und anschließend vergleichend zu unbehandeltem PhaM auf die Fähigkeit untersucht, eine Phosphatfreisetzung von GTP bzw. ATP zu katalysieren.



Abbildung 49: Einfluss der PhaM-Hitzestabilität auf die enzymatische Aktivität. Für den kolorimetrischen PhaM-Aktivitätsassay wurden 15 μ M hitzebehandeltes (für 20 Minuten bei 95°C) oder unbehandeltes PhaM eingesetzt. Die Endkonzentration der jeweiligen Nukleotide im Reaktionsmix betrug 0,3 mM. Der Reaktionsansatz wurde bei 30°C und 100 *rpm* inkubiert. Die Reaktion wurde nach 30 Minuten mit 100 mM EDTA-Na₂ abgestoppt und zuletzt mit einem Malachitgrün-Reagenz für 5 Minuten bei Raumtemperatur entwickelt. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Absorption wurde anschließend im Plattenreader bei 642 nm gemessen (A). Die Berechnung des freigesetzten Phosphats erfolgte anhand der mitgeführten Standards (B). Die Hitzebehandlung führte zum Verlust der NTPase-Aktivität von PhaM.

Entgegen der Erwartungen konnte kein freies anorganisches Phosphat mit hitzebehandeltem PhaM detektiert werden (Abbildung 49). Für die unbehandelte Kontrolle konnte hingegen freies Phosphat (etwa 52 µM bei PhaM mit GTP sowie etwa 175 µM bei PhaM und ATP) nachgewiesen werden. Die hohe Thermostabilität von PhaM konnte damit nicht in Bezug auf die enzymatische NTPase-Aktivität bestätigt werden. Eine Inkubation von PhaC1 für 20 Minuten bei 95°C hatte ebenfalls zur Folge, dass keine Aktivität gemessen werden konnte (Ergebnisse nicht dargestellt). Insgesamt konnte sowohl für PhaM als auch für PhaC1 gezeigt werden, dass eine Hitzebehandlung bei 95°C über 20 Minuten mit einem Verlust der Aktivität einherging.

3.7.3 Aktivität des C-terminal verkürzten PhaM (PhaM^{ΔC})

Als nächstes wurde untersucht, ob die Deletion des C-Terminus von PhaM einen Einfluss auf die enzymatische PhaM-Aktivität zur GTP- bzw. ATP-Hydrolyse hat. Dafür wurden jeweils 15 μ M aufgereinigtes His₆-PhaM^{ΔC} sowie His₆-PhaM^{WT}mit 0,3 mM Nukleotiden für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Das freigesetzte anorganische Phosphat wurde mittels Malachitgrün-Reagenz bei 642 nm detektiert. Das Ergebnis zeigte sowohl für PhaM^{WT} als auch PhaM^{ΔC} eine höhere Absorption für ATP (0,55 bzw. 0,75) im Vergleich zu GTP (0,35 bzw. 0,40), was mit größeren Mengen an freiem P_i einherging (Abbildung 50). Bei einer Inkubation mit GTP konnte kein Unterschied in der enzymatischen Aktivität von PhaM^{WT} und PhaM^{ΔC} festgestellt werden. Etwas erhöhte Mengen an anorganischem Phosphat wurden von PhaM^{ΔC} (etwa 250 μ M) im Vergleich zu PhaM^{WT} (rund 170 μ M) freigesetzt, wenn es zusammen mit ATP inkubiert wurde. Dies würde darauf hindeuten, dass das verkürzte PhaM eine bessere Aktivität gegenüber ATP aufweist.



Abbildung 50: Kolorimetrischer Aktivitätsassay von PhaM^{AC} und PhaM^{WT}. Für den kolorimetrischen PhaM-Aktivitätsassay wurden jeweils 15 μ M PhaM^{AC} sowie PhaM^{WT} eingesetzt. Die Endkonzentration der jeweiligen Nukleotide im Reaktionsmix betrug 0,3 mM. Der Reaktionsansatz wurde bei 30°C und 100 *rpm* für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 mM EDTA-Na₂ abgestoppt und zuletzt mit einem Malachitgrün-Reagenz für 5 Minuten bei Raumtemperatur entwickelt. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Absorption wurde anschließend im Plattenreader bei 642 nm gemessen (A). Anhand einer mitgeführten Phosphatstandardreihe konnte das freigesetzte anorganische Phosphat berechnet werden (B). PhaM^{AC} und PhaM^{WT} zeigten beide eine NTPase-Aktivität.

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass die vorzeitige Einführung eines Stopp-Codons zur Deletion des C-Terminus von PhaM keinen negativen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von PhaM hat. Damit kann geschlussfolgert werden, dass der Sequenzbereich, der die enzymatische Reaktion katalysiert, nicht das PAKKA-Doppelmotiv einschließt, obwohl dieses Teil des SRPα-Motives ist.

3.7.4 Einfluss chromosomaler DNA auf die PhaM-Aktivität

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die C-terminalen PAKKA-Motive von PhaM eine wichtige Rolle bei der Interaktion von PhaM mit der DNA spielen und eine Deletion dieses Motives zu keiner Abnahme der Aktivität führte. Ein möglicher positiver Einfluss der DNA auf die PhaM-Aktivität wurde bislang nicht untersucht. Um dies zu überprüfen, wurde ein kolorimetrischer Assay von PhaM in Anwesenheit von DNA durchgeführt. Dafür wurden 15 µM PhaM und 0,3 mM Nukleotide ohne und mit 200 ng chromosomaler R. eutropha H16 DNA für 60 Minuten bei 30°C inkubiert. Eine in vitro Interaktion von PhaM^{WT} mit der angegebenen DNA-Menge konnte bereits in EMSA-Tests nachgewiesen werden. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 51 dargestellt. Dabei zeigte sich, wie auch schon von vorherigen Experimenten bestätigt, dass die Reaktion von PhaM mit ATP mehr anorganisches Phosphat als der Ansatz PhaM plus GTP freisetzte. Eine Ko-Inkubation mit DNA zeigte chromosomaler keine signifikanten Unterschiede bei der Phosphatfreisetzung auf. Damit konnte kein positiver Einfluss einer Interaktion von PhaM und der DNA auf die Enzymaktivität von PhaM nachgewiesen werden.



Abbildung 51: PhaM-Aktivitätsassay in Gegenwart chromosomaler DNA. Für den Malachitgrünbasierten kolorimetrischen Assay wurden 15 μM PhaM^{WT} mit 0,3 mM Nukleotiden (GTP oder ATP) mit und ohne chromosomaler *R. eutropha* H16 DNA (200 ng) über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach anschließender Zugabe von Malachitgrün-Reagenz konnte das freigesetzte P_i spektrophotometrisch bei 642 nm detektiert werden. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. Als Kontrollen dienten Proben ohne Protein sowie Proben ohne Nukleotide. Eine mitgeführte Phosphatstandardreihe ermöglichte die Berechnung des freigesetzten anorganischen Phosphats. Die Ko-Inkubation mit DNA führte zu keiner Erhöhung oder Abnahme der Aktivität.

3.7.5 Nachweis der PhaM-Aktivität mittels HPLC

Der Nachweis des freigesetzten anorganischen Phosphats erfolgte mittels eines kolorimetrischen Malachitgrün-basierten Tests. Um zum einen dieses Ergebnis mit einer weiteren Methode zu reproduzieren und außerdem zu überprüfen, ob das Nukleosidtriphosphat in anorganisches Phosphat und Nukleosiddiphosphat umgesetzt wurde, wurden HPLC Messungen durchgeführt.

Dafür wurden 15 µM PhaM zusammen mit 0,3 mM GTP in einem Magnesiumhaltigen Puffer bei 30°C inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben genommen und mittels HPLC analysiert. Als Kontrollen dienten GTP-Proben ohne PhaM, um die Autohydrolyse von GTP zu berücksichtigen, sowie PhaM ohne GTP, um eine Phosphatkontamination von PhaM auszuschließen. Weiterhin wurden Proben für GTP- und GDP-Standardgeraden mitgeführt. Mittels GTP- und GDP-Proben konnten die jeweiligen Retentionszeiten bestimmt werden. GDP konnte nach etwa 9,6 Minuten detektiert werden und GTP nach 11,1 Minuten.



Abbildung 52: HPLC-Chromatogramme der PhaM-Aktivitätsmessung in Gegenwart von GTP. Dargestellt sind die Chromatogramme der HPLC-Messungen von PhaM mit GTP. Die zunehmende Zeit der Inkubation von PhaM mit GTP bewirkte eine Abnahme des GTP-Peaks und einen Anstieg der Absorption von GDP. GDP konnte nach 9,6 Minuten (R1) detektiert werden, GTP nach etwa 11,1 Minuten (R2). Die Retentionszeiten wurden mit Kontrollen GTP bzw. GDP ohne PhaM bestätigt. Eine Rechtsverschiebung auf der X-Achse ermöglichte eine bessere Visualisierung der Ab- und Zunahme der Peaks.

Das Ergebnis verdeutlichte, dass mit zunehmender Zeit eine Abnahme des GTP-Peaks und ein Anstieg des GDP-Peaks stattfanden (Abbildung 52). Aufgrund der mitgeführten GTP-Kontrolle konnte eine Autohydrolyse von GTP ausgeschlossen werden.

Das Ergebnis bestätigte eine enzymatische Aktivität von PhaM, bei der GTP in GDP und P_i umgewandelt wurde, da kein nennenswerter GMP-Peak in den Proben gemessen werden konnte bzw. keine Zunahme des Peaks erfolgte.

Die mitgeführten GTP- und GDP-Standardgeraden ermöglichten eine Berechnung der detektierten Nukleotide (Abbildung 53). Zum Zeitpunkt 0 konnten etwa 135 μ M GTP und bereits 32 μ M GDP nachgewiesen werden. Da ähnliche Werte für die GTP-Kontrolle ohne PhaM erreicht wurden, kann davon ausgegangen werden, dass das verwendete GTP nicht als Reinsubstanz vorlag. Entgegen der Erwartungen konnten ebenfalls nicht die eingesetzten 300 μ M detektiert werden.

Es konnte eine kontinuierliche Abnahme von GTP gezeigt werden und nach 60 Minuten wurden nur noch 70 μ M GTP detektiert, womit sich der Anteil an GTP ungefähr halbierte. Die gemessene molare Konzentration von GDP hingegen lag nach einer Stunde bei 96 μ M, was einer Zunahme von 64 μ M GDP entsprach (Abbildung 53A).



Abbildung 53: Quantitative Messung der PhaM-Aktivität mittels HPLC. Für die HPLC-Analyse wurden 15 μ M PhaM mit 0,3 mM GTP bei 30°C inkubiert. Es wurden alle 15 Minuten Proben über einen Zeitraum von 60 Minuten genommen. Standardgeraden von GTP und GDP ermöglichten die Berechnung der molaren Konzentrationen von GTP und GDP, wobei sich bei GTP eine Abnahme zeigte und der Anteil an GDP stieg (A). Die Summe der molaren Konzentrationen von GTP und GDP, blieb über den Zeitraum von 60 Minuten konstant (B). Als mobile Phase wurde 0,1 M K₂HPO₄, 0,1 M KH₂PO₄, 4 mM TBAHS, pH 6,2 (Puffer A) sowie ein Gemisch aus Puffer A und Methanol (70:30, Puffer B) verwendet. Eine 100 RP-18 Säule (5 μ m Partikelgröße) diente als stationäre Phase.

Anhand der Abbildung 53B wurde deutlich, dass die Summe der molaren Konzentrationen von GTP und GDP über die Zeit weitestgehend konstant blieb. Geringfüge Abweichungen können durch Mess- und Pipettierfehler entstanden sein. Die gemessenen molaren GMP-Konzentrationen lagen konstant unter 5 µM, was auf eine Verunreinigung schließen lässt. Damit konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Reaktion von PhaM GDP und anorganisches Phosphat freisetzte und nicht GMP und Pyrophosphat.

Die Messungen der PhaM-Aktivität mittels HPLC bestätigen die Ergebnisse der Malachitgrün-basierten kolorimetrischen Assays und verifizierten, dass PhaM in der Lage ist, GTP umzusetzen.

3.7.6 Rolle von Kofaktoren in Bezug auf die PhaM-Aktivität

Magnesium-Ionen spielen als Kofaktoren eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl enzymatischer Reaktionen. Wichtige Enzymklassen, die Magnesium für ihre Aktivität benötigen sind zum Beispiel Kinasen, ATPases, Glutamin-Synthetasen oder Pyrophosphatasen. Besonders Reaktionen, die die ATP-Verwertung kontrollieren, hängen zweifelsfrei von Mg ab. Dabei kann ATP als Substrat oder als Phosphat-Donor agieren (Wolf und Cittadini, 2003).

Für die Malachitgrün-basierten Aktivitätsassays von PhaM wurde ein Assay-Puffer benutzt, der Magnesium-Ionen enthielt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Zugabe von EDTA-Na₂ die Reaktion abgestoppt werden konnte, was darauf schließen lässt, dass EDTA als Chelator für die Magnesium-Ionen fungierte. Um dies zu überprüfen und den Einfluss von Mg²⁺ auf die enzymatische Reaktion von PhaM zu untersuchen, wurde ein Assay-Puffer ohne Magnesium verwendet. Weiterhin wurden zwei verschiedene Inkubationstemperaturen analysiert. Das Ergebnis der Experimente bestätigte, dass ohne Magnesium-Ionen kein Phosphat freigesetzt wurde (Abbildung 54). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass niedrigere Reaktionstemperaturen dazu führten, dass weniger anorganisches Phosphat freigesetzt wurde. Bei einer Temperatur von 30°C wurden nach 60 Minuten etwa 220 μ M P_i detektiert, wohingegen bei 12°C nach einer Stunde nur rund 37 μ M P_i nachgewiesen werden konnten, was etwa einem Sechstel der Reaktion bei 30°C entsprach.

Schlussfolgernd konnte gezeigt werden, dass PhaM Magnesium als Kofaktor nutzt und EDTA als Chelator der Magnesium-Ionen dient. Weiterhin konnte, wie bei enzymatischen Reaktionen üblich, eine Abhängigkeit der PhaM-Aktivität von der Reaktionstemperatur bestätigt werden.



Abbildung 54: Einfluss von Magnesium-Ionen und der Inkubationstemperatur auf die Aktivität von PhaM. Für den kolorimetrischen Assay wurden 15 μ M PhaM^{WT} und 0,3 mM GTP mit und ohne 2 mM MgCl₂ über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 30°C oder 12°C inkubiert und anschließend mittels Malachitgrün-Reagenz entwickelt. Die Absorption des freigesetzten Phosphats wurde bei 642 nm gemessen (A). Phosphatstandards ermöglichten die Berechnung des P_i (B). Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt und entsprechende Kontrollen zur GTP-Autohydrolyse und PhaM-Phosphatkontamination wurden mitgeführt. Eine enzymatische Reaktion konnte nur in Anwesenheit von Mg²⁺ beobachtet werden, wobei ebenfalls eine Abhängigkeit von der Temperatur detektiert wurde.

Neben Magnesium-Ionen wurde auch der Einfluss von Calcium-Ionen auf die enzymatische Aktivität von PhaM untersucht. Aufgereinigtes PhaM wurde mit GTP oder ATP in einem Puffer mit CaCl₂ für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Zugabe von EDTA-Na₂ führte wie auch bei den Assays mit MgCl₂ zum Abstoppen der Reaktion. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne MgCl₂ sowie mit MgCl₂. Das Ergebnis zeigte wiederholt, dass Magnesium-Ionen eine wichtige Rolle für die PhaM-Aktivität spielen, da ohne Mg²⁺ kein freigesetztes Phosphat detektiert werden konnte (Abbildung 54). In Gegenwart von MgCl₂ stieg die Menge an anorganischem Phosphat auf etwa 55 µM, wenn GTP als Nukleosidtriphosphat genutzt wurde. Eine Zunahme von ungefähr 185 µM P_i konnte hingegen für PhaM plus ATP beobachtet werden. Im Vergleich zum Zusatz von MgCl₂ konnte bei einer Inkubation von PhaM mit GTP in einem CaCl₂-haltigen Puffer kein Phosphat nachgewiesen werden. Lediglich 45 µM P_i konnten für PhaM plus ATP in Gegenwart von Ca²⁺ detektiert werden. Das Ergebnis hebt die besondere Rolle von Mg²⁺⁻Ionen für die enzymatische Aktivität von PhaM hervor. Die Experimente zeigten zudem wiederholt, dass in Gegenwart von ATP größere Mengen an anorganischem Phosphat freigesetzt wurden, was eine bessere Spezifität von PhaM gegenüber ATP nahelegt.



Abbildung 55: Einfluss 2-wertiger Kationen auf die Aktivität von PhaM. Es wurden 15 μ M PhaM^{WT} mit 0,3 mM GTP oder ATP mit oder ohne 2-wertige Kationen für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Endkonzentration von MgCl₂ oder CaCl₂ betrug 2 mM im Assay. Nach erfolgter Entwicklung mit Malachitgrün-Reagenz wurde die Absorption des freigesetzten anorganischen Phosphats bei 642 nm gemessen (A) sowie die Menge des P_i berechnet (B). Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt und entsprechende Kontrollen zur GTP-Autohydrolyse und PhaM-Phosphatkontamination wurden mitgeführt. Ca²⁺-Ionen spielen eine geringere Rolle bei der NTPase-Aktivität von PhaM.

3.7.7 Detektion des freigesetzten Phosphats in nativen Polyacrylamidgelen

Die kolorimetrischen Malachitgrün-basierten Aktivitätsassays sowie die HPLC-Messungen bestätigen eine enzymatische Reaktion von PhaM, bei der sowohl GTP als auch ATP umgesetzt wurden und freies anorganisches Phosphat nachgewiesen werden konnte. Eine weitere Methode, um die enzymatische Aktivität des nativen PhaM Proteinkomplexes nachzuweisen, ist eine native Polyacrylamidgelektrophorese in Gegenwart von ATP und die anschließende In-Gel-Detektion des freigesetzten Phosphats (Suhai et al., 2009). Dafür wurden 22 µg PhaM^{WT} auf einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit einem ATP- und Magnesiumhaltigen Puffer inkubiert. Die darauffolgende Zugabe von Blei(II)-nitrat führte zur Bildung von einer weißen Bleiphosphat-Bande, was eine eindeutige Detektion erschwerte. Die anschließende Entwicklung mit Ammoniumsulfid hingegen brachte eine braune Blei(II)-sulfid-Bande am oberen Gelrand zum Vorschein (Abbildung 56, Spur 1). Damit konnte gezeigt werden, dass PhaM auch in nativen Polyacrylamidgelen eine Aktivität aufweist. Eine nachfolgende Färbung mit Coomassie bestätigte, dass sich die detektierte braune Blei(II)-sulfid-Bande auf Höhe

des supramolekularen PhaM-Komplexes befand (Abbildung 56, Spur 2). Eine alleinige Färbung von PhaM^{WT} mit Coomassie ohne Vorbehandlung mit Blei(II)-nitrat zeigte ein identisches Laufverhalten des nativen Proteins (Abbildung 56, Spur 3). Damit konnte nachgewiesen werden, dass die Freisetzung von anorganischem Phosphat durch PhaM^{WT} hervorgerufen wurde und nicht durch mögliche Protein-Verunreinigungen.

Neben der Bestätigung der enzymatischen Aktivität von PhaM konnte wiederholt gezeigt werden, dass PhaM im nativen Zustand einen hochmolekularen Komplex bildet, der aus mehreren Untereinheiten von PhaM besteht. Interessanterweise Blei(II)-sulfid-Bande konnte die nur als schmale Bande innerhalb des Proteinkomplexes detektiert werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass möglicherweise eine spezifische Domäne oder ein bestimmter Oligomerisierungsgrad von PhaM die NTPase-Aktivität ausübt.



Abbildung 56: Nachweis des von PhaM freigesetzten anorganischen Phosphats in einem nativen Polyacrylamidgel. Dargestellt ist die Gelelektrophorese von 22 µg PhaM^{WT} auf einem 15 %-igen nativen Polyacrylamidgel mit anschließender Inkubation mit einem ATP-haltigen Puffer und Detektion des freigesetzten anorganischen Phosphats mittels Blei(II)-nitrat und Ammoniumsulfid. Eine braune Blei(II)-sulfid-Bande zeigte sich nach Inkubation des weißen Bleiphosphat-Präzipitats mit Ammoniumsulfid (links). Eine zusätzliche blaue PhaM^{WT}-Bande entwickelte sich nach darauffolgender Coomassie-Färbung (Mitte). Die Färbung von PhaM^{WT} mit Coomassie ohne Blei(II)-nitrat-Behandlung detektierte natives PhaM^{WT}(rechts).

3.7.8 Limitierte Proteolyse von PhaM mit Proteinase K und Trypsin

Die bisherigen Ergebnisse konnten bereits eindeutig zeigen, dass PhaM eine hydrolytische Aktivität aufweist und in Gegenwart von GTP bzw. ATP anorganisches Phosphat freigesetzt wird. Diese Beobachtung legt nahe, dass eine Interaktion der Nukleotide mit PhaM einen Einfluss auf die Konformation und damit das proteolytische Verhalten von PhaM haben könnten. Um dies zu untersuchen, wurde eine limitierte Proteolyse von PhaM mit den Proteasen Trypsin und Proteinase K durchgeführt, wobei eine Inkubation mit und ohne Nukleotiden stattfand. Das eingesetzte Verhältnis von PhaM und Proteinase K betrug 1500:1, wohingegen bei dem Versuch mit Trypsin ein PhaM/Trypsin Verhältnis von 600:1 genutzt wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 57 dargestellt. Sowohl bei dem proteolytischen Verdau mit Proteinase K als auch mit Trypsin konnte gezeigt werden, dass die Ko-Inkubation von PhaM mit GTP oder ATP eine deutlich stärkere Proteolyse von PhaM hervorrief. Bei Zugabe von GDP konnte dies nicht beobachtet werden. Ohne Nukleotide konnte generell ein ähnliches Spaltungsmuster erreicht werden, allerdings lag unverdautes PhaM im Überschuss vor (Abbildung 57A, C).

Die limitierte Proteolyse mit der Serinprotease Proteinase K, welche Peptide am Carboxylrest von aliphatischen, aromatischen und hydrophoben Aminosäuren spaltet, resultierte in einem Spaltungsmuster mit einem höheren Anteil an kleineren Spaltprodukten unter 25 kDa, was durch die Quantifizierung des SDS-Gels mittels ImageJ bestätigt wurde (Abbildung 57C). Ein etwas differenziertes, proteolytisches Verhalten verursachte die Inkubation mit der Serinprotease Trypsin, welche Peptidbindungen nach den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet (Olsen *et al.*, 2004). Das SDS-Gel zeigte eine stärkere Bandenintensität für größere Spaltprodukte über 25 kDa. Die Quantifizierung spiegelte dies allerdings nur bedingt wider, da PhaM ohne Proteasebehandlung als Referenz für die Quantifizierung diente und im Gel bereits eine schwache Bande auf Höhe der kleineren Spaltprodukte

(< 25 kDa) sichtbar wurde, die auch für eine mögliche Verunreinigung sprechen könnte. Anhand dieses Ergebnisses konnte ein Einfluss von GTP und ATP auf die Konformation von PhaM festgestellt werden. Die Interaktion oder mögliche Bindung von GTP oder ATP an PhaM ermöglicht den Proteasen scheinbar einen leichteren Zugang zu PhaM, was in einer schnelleren Spaltung resultieren kann.

144



Abbildung 57: Limitierte Proteolyse von PhaM mit Proteinase K sowie Trypsin mit und ohne Nukleotiden. Für die limitierte Proteolyse mit Proteinase K wurden jeweils 5 µg aufgereinigtes PhaM ohne oder mit 2 mM Nukleotiden (GTP, GDP, ATP) für 20 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Proteolyse von PhaM wurde durch Zugabe von Proteinase K (Verhältnis PhaM zu Proteinase K: 1500:1) und 1 % SDS induziert und nach 90 Minuten auf Eis mit 3-fach SDS-Ladepuffer und 5-minütigem Aufkochen bei 95°C abgestoppt. Als Kontrolle diente unverdautes PhaM (A). Die Quantifizierung der durch Proteinase K-Behandlung erhaltenen größeren und kleineren Spaltprodukte von PhaM sowie unverdautes PhaM wurde mit der Software ImageJ durchgeführt (B). Die limitierte Proteolyse mit Trypsin erfolgte äquivalent mit Ausnahme des eingesetzten Verhältnisses von PhaM zu Trypsin (600:1) und einer verkürzten Proteolysedauer von lediglich 10 Minuten (C). Die trypsinierten PhaM-Spaltprodukte sowie unverdautes PhaM wurden mittels ImageJ quantifiziert (D).

3.7.9 Crosslinking von PhaM in Anwesenheit von GTP oder ATP

Die limitierte Proteolyse von PhaM mit Proteinase K und Trypsin konnte zeigen, dass PhaM in Gegenwart von ATP oder GTP für die genannten Proteasen besser zugänglich nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob ist. Im die Nukleosidtriphosphate einen Einfluss auf das Crosslinking-Verhalten ausüben. Es konnte bisher gezeigt werden, dass Glutardialdehyd die Bildung hochmolekularer PhaM-Komplexe bewirkte. Eine Interaktion von PhaM mit ATP oder GTP und eine damit verbundene mögliche Konformationsänderung von PhaM könnte ein verändertes Crosslinking hervorrufen. Dafür wurden 15 µM PhaM mit oder ohne 10 µM PhaC1 in Gegenwart von ATP oder GTP mit 2,5 %-iger (v/v) Glutardialdehydlösung (GDA) behandelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 58 dargestellt.



Abbildung 58: *Crosslinking*-Experimente von PhaM in Anwesenheit von PhaC1 und GTP oder ATP. Für die *Crosslinking*-Experimente wurden 15 μ M PhaM sowie optional 10 μ M PhaC1 mit 3 mM ATP (A) oder GTP (B) für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe von frisch verdünnter 2,5 %-iger (v/v) Glutardialdehyd-Lösung (Wasser für die Kontrollen) und 5-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Reaktionen durch Zugabe von 0,5 M EDTA-Na₂-Lösung, Tris-HCI und 3-fach SDS-Ladepuffer abgestoppt und auf 8 %-igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden über Nacht mit kolloidalem Coomassie gefärbt und anschließend mit Wasser entfärbt.

Als Kontrollen dienten Proben ohne GDA (Spuren 1 - 4). Es konnte kein Unterschied bei einer Ko-Inkubation mit Nukleosidtriphosphaten beobachtet werden. Die Zugabe von GDA induzierte die Bildung der hochmolekularen PhaM-Produkte (Spuren 6 – 9). Wurde dem Ansatz ATP zugefügt, konnte ein leichter Unterschied im Crosslinking-Verhalten von PhaM detektiert werden. Die PhaM-Monomer-Bande mit einer Größe von etwas unter 35 kDa trat auch in Gegenwart des Crosslinkers GDA auf, was in der Probe ohne ATP nicht in der Intensität beobachtet werden konnte (Spur 6 und 7). Dieses Ergebnis könnte für ein verändertes Crosslinking von PhaM sprechen, was aufgrund einer ATP-induzierten Konformationsänderung zustande kommen könnte. Allerdings konnte ebenfalls eine PhaM-Monomer-Bande mit etwas geringerer Intensität als in Spur 7 in der Probe mit PhaM und PhaC1 aber ohne ATP detektiert werden (Spur 8). Eine Größenausschlusschromatographie von PhaM mit und ohne ATP zeigte keine Veränderungen des Molekulargewichtes von PhaM, die auf eine Änderung des PhaM-Oligomerisierungszustandes schließen lassen könnten (Abbildung 7 im Anhang). Das Crosslinking-Experiment mit GTP zeigte keinen Unterschied, unabhängig davon, ob eine Inkubation mit bzw. ohne GDA oder PhaC1 erfolgte. Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass GTP keinen Einfluss auf die Oligomerisierung von PhaM ausübt.

Insgesamt konnten keine eindeutigen Rückschlüsse auf einen sichtbaren Einfluss von GTP bzw. ATP auf die Konformation von PhaM mittels der *Crosslinking*-Experimente erzielt werden.

3.7.10 Einfluss von GTP auf die Konformation von PhaM

Es konnte bislang gezeigt werden, dass bei einem Reaktionsmix aus PhaM, GTP und Magnesium-Ionen anorganisches Phosphat freigesetzt wurde. Um einen möglichen Einfluss von GTP auf die Konformation bzw. Proteinstruktur von PhaM weiter zu untersuchen, wurden CD-Messungen durchgeführt. Dafür wurden 300 µM aufgereinigtes PhaM mit 6 mM GTP in Proteinpuffer (10 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 8) für 60 Minuten bei 30°C inkubiert und anschließend mit dem J-815 CD-Spektrophotometer von Jasco gemessen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen einer Inkubation von PhaM mit und ohne GTP detektiert werden (Abbildung 59), was darauf schließen lässt, dass GTP keine Konformationsänderung von PhaM bewirkt, die mit Hilfe der CD-Spektroskopie sichtbar wird. Folglich konnten die Ergebnisse der limitierten Proteolyse einer möglichen GTP- bzw. ATP-vermittelten Konformationsänderung von PhaM nicht mittels CD-Spektroskopie bestätigt werden. Der Einfluss von ATP auf die Konformation von PhaM wurde nicht mit Hilfe der CD-Spektroskopie analysiert.



Abbildung 59: CD-Spektroskopie von PhaM mit und ohne GTP. Für die CD-Spektroskopie wurden 300 μM PhaM mit 6 mM GTP für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Die CD-Messung wurde von 190 bis 240 nm mit 60 Wiederholungen durchgeführt. Als Blank diente der Proteinpuffer 10 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 8. Es konnten keine sichtbaren Konformationsunterschiede gezeigt werden.

3.7.11 PHB in vitro Synthase-Assay in Anwesenheit von GTP bzw. GDP

Es konnte bereits bei PhaC1 *in vitro* Assays nachgewiesen werden, dass PhaM eine Verkürzung der *lag*-Phase bewirkt und folglich die Aktivierung der PHB-Synthase PhaC1 induziert. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Inkubation von PhaM mit GTP in einer gesteigerten Proteolyse resultierte. Um den Einfluss von GTP und GDP auf die PhaM-vermittelte Aktivierung von PhaC1 zu untersuchen, wurden PHB *in vitro* Synthaseassays in Anwesenheit von GTP und GDP durchgeführt. Dafür wurde PhaC1 mit und ohne PhaM sowie mit Nukleotiden für 30 Minuten bei 30°C inkubiert und durch Zugabe des Substrats 3-HB-CoA wurde die PHB-Synthese initiiert. Als Kontrolle diente PhaC1 ohne den Aktivator PhaM. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten genommen und die Reaktion durch Zugabe von TCA abgestoppt. Die Absorption des gebildeten NTB konnte anschließend bei 412 nm gemessen werden (Abbildung 60).

Bei der Kontrolle konnte die typische *lag*-Phase von PhaC1 beobachtet werden. Im Gegensatz dazu induzierte die Ko-Inkubation mit PhaM die PHB-Synthese nach wenigen Sekunden und erreichte bereits nach 30 Sekunden eine Absorption bei 412 nm von über 0,1, wohingegen bei der Kontrolle zu dem Zeitpunkt kein Anstieg der Absorption zu verzeichnen war. Eine schnelle Zunahme der Absorption trat ebenfalls für PhaM + GTP bzw. PhaM + GDP auf. Die erreichten Maxima der Absorptionswerte unterschieden sich dabei geringfügig, wobei für PhaM mit GDP die höchsten Werte (rund 0,14) erreicht wurden und für PhaM mit GTP die niedrigsten (etwa 0,12). Ein ungepaarter T-Test nach der Holm-Sidak-Methode mit einem Alpha-Wert von 0,01 ergab einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen PhaM + GTP und PhaM + GDP. Das Ergebnis zeigte, dass sowohl GTP als auch GDP keinen negativen Einfluss auf die PhaC1-aktivierende Funktion von PhaM hatten und es dennoch zu einer sofortigen *in vitro* PHB-Synthese kam. Es traten lediglich geringfügige Unterschiede in der Stärke der PHB-Bildung auf.



Abbildung 60: Einfluss von GDP bzw. GTP auf den PhaM-stimulierten diskontinuierlichen PHB-Synthaseassay *in vitro*. Dargestellt ist die *in vitro* PHB-Synthaseaktivität ohne Anwesenheit von PhaM sowie mit PhaM, mit PhaM plus GTP und mit PhaM plus GDP mit zunehmender Zeit. Es wurden 34 µM der aufgereinigten PHB-Synthase PhaC1 sowie 30 nM des aufgereinigten PhaM-Proteins eingesetzt. Die Endkonzentration der Nukleotide GTP und GDP im Assay betrug jeweils 0,3 mM. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt (Standardabweichungen dargestellt).

3.7.12 Untersuchungen zur Interaktion von PhaM und Nukleotiden mittels isothermischer Titrationskalorimetrie

Die Ergebnisse der limitierten Proteolyse lieferten Hinweise, dass es zu einer Wechselwirkung von GTP bzw. ATP mit PhaM kommt, die in einer besseren Zugänglichkeit für Endopeptidasen resultiert. Mit GDP oder ADP konnte dies nicht gezeigt werden. Um die Interaktion von PhaM mit Nukleotiden genauer zu untersuchen und eine mögliche Bindung dieser an PhaM zu bestätigen, wurden Messungen zur isothermischen Titrationskalorimetrie durchgeführt. Dafür wurden die jeweiligen Nukleotide (ATP, ADP, GTP, GDP) in einen Reaktionsmix aus PhaM und einem Mg²⁺-haltigen Puffer titriert und anschließend die dadurch verursachte Änderung der Temperatur (Heizleistung des Kalorimeters) in dem System aufgezeichnet. Das Ergebnis einer Titration von ATP zur PhaM-Probenlösung zeigte, dass es zu einer detektierten Reaktion kam (Abbildung 61A). Dabei konnte eine gleichbleibende Zunahme der Heizungsleistung (~ 0,5 µcal/sec) mit allen Injektionen von ATP beobachtet werden. Da es sich bei der ATP-Bindung bzw. -Hydrolyse um eine endotherme Reaktion in der Probenzelle in Bezug auf das System handelt (dem System wird Energie entzogen und die Probenzelle muss geheizt werden), entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen. Allerdings konnte mit zunehmender Zeit keine Abnahme der Heizungsleistung detektiert werden. Folglich konnte geschlussfolgert

Ergebnisse

werden, dass keine Bindungssättigung des Komplexes aus ATP und PhaM vorlag. Ein identisches Ergebnis konnte für die Injektion mit GTP erzielt werden (Ergebnis nicht dargestellt). Erfolgte eine Titration von ADP zur Probenzelle mit PhaM, konnten ebenfalls Peaks detektiert werden. Aufgrund der sehr niedrigen detektierten Heizleistung (< 0,2 µcal/sec) des Kalorimeters sind diese Peaks auf die eigentlichen Injektionen des Titranten zurückzuführen, die eine geringfügige Temperaturänderung bewirkten (Abbildung 62B). Von einer enzymatischen Reaktion kann nicht ausgegangen werden.



Abbildung 61: Messungen der isothermischen Titrationskalorimetrie von PhaM in Gegenwart von ATP bzw. ADP. In der Probenzelle befanden sich 50 μ M His₆-PhaM, 2 mM MgCl₂ sowie der Puffer (10 mM Tris, 250 mM NaCl, pH 8), der ebenfalls in der Referenzzelle vorlag. Als Titrant dienten 2 mM ATP (A) oder ADP (B), der in einem Abstand von 5 Minuten in die Probenzelle injiziert wurde. Die Messungen wurden bei 20°C durchgeführt. Es konnte eine Zunahme der Heizleistung (μ cal/sec), also eine endotherme Reaktion, aber keine Sättigung detektiert werden (A).

Ergebnisse

Um aufgrund einer schnellen auszuschließen. dass es Umsetzung der Nukleosidtriphosphate durch PhaM zu keiner nachweisbaren Bindung der Nukleotide kam, wurde die Messung mit einem nicht-hydrolysierbaren Nukleotidanalog durchgeführt. Dazu wurde GMP-PNP (Guanosin 5'-[β,γ-imido]triphosphat) verwendet, Sauerstoffatom der β-γ-Phosphatbindung durch eine nichtbei dem das hydrolysierbare Amingruppe ersetzt wurde. Das Ergebnis zeigte, dass es nur zu einer geringen Zunahme der Heizungsleistung (< 0,1 µcal/sec) kam und ebenfalls keine Sättigung mit zunehmender Zeit beobachtet werden konnte. Folglich kam es auch mit dem GTP-Analog GMP-PNP zu keiner Bindung an PhaM (Abbildung 62). Somit kann angenommen werden, dass PhaM nicht spezifisch mit den Purinbasen interagiert, sondern eine Interaktion mit der β-γ-Phosphatbindung stattfinden könnte, die im Falle des Analogs GMP-PNP unterbunden wird. Um dies zu überprüfen, könnte beispielsweise ein Experiment in Gegenwart von Pentanatriumtriphosphat durchgeführt werden.



Molares Verhältnis (GMP-PNP/PhaM)

Abbildung 62: Messungen der isothermischen Titrationskalorimetrie von PhaM in Gegenwart von GMP-PNP. In der Probenzelle befanden sich 50 μ M His₆-PhaM, 2 mM MgCl₂ sowie der Puffer (10 mM Tris, 250 mM NaCl, pH 8), der ebenfalls in der Referenzzelle vorlag. Als Titrant diente 2 mM GMP-PNP, der in einem Abstand von 5 Minuten in die Probenzelle injiziert wurde. Die Messungen wurden bei 20°C durchgeführt. Die geringe detektierte Zunahme der Heizleistung zeigte keine Bindung von GMP-PNP an PhaM.

3.7.13 Phosphorylierungsanalyse von PhaM in Gegenwart von ATP

Die bisherigen Ergebnisse konnten zeigen, dass PhaM in der Lage ist, Nukleotide wie ATP und GTP zu hydrolysieren. Die physiologische Funktion der NTPase-Aktivität konnte bislang nicht geklärt werden. Deshalb sollte untersucht werden, ob sich PhaM über eine Autophosphorylierung selbst regulieren kann oder als Kinase fungiert und die PHB-Synthase PhaC1 phosphoryliert. Dafür wurde aufgereinigtes His₆-getaggtes PhaM mit oder ohne His₆-PhaC1 in Gegenwart von ATP und einem Mg-haltigen Puffer für 1 Stunde bei 30°C inkubiert und anschließend mittels Massenspektrometrie auf Phosphorylierungsstellen untersucht. Als Kontrollen dienten His₆-PhaM ohne ATP, His₆-PhaM sowie His₆-PhaC1 mit ATP sowie His₆-PhaC1 allein.

Das Ergebnis ist in nachfolgender Tabelle 3-4 dargestellt. Es konnten verschiedene phosphorylierte Aminosäuren bei PhaM und PhaC1 detektiert werden, wobei die Anzahl der gefundenen Peptidfragmente stark variierte.

Tabelle 3-4: Identifizierung von Phosphorylierungsstellen von PhaM und PhaC1 mittels Massenspektrometrie. Für die Proteomanalyse wurden 15 μ M aufgereinigtes His₆-PhaM mit und ohne 15 μ M His₆-PhaC1 in Gegenwart von 0,3 mM ATP in einem Mg-haltigen Puffer für 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Als Kontrollen dienten die Proteine ohne ATP. Angegeben sind die mittels Massenspektrometrie detektierten Phosphorylierungsstellen sowie die Anzahl der gefundenen phosphorylierten Peptidfragmente in Klammern und der Anteil der normalisierten Phosphopeptid-Spektren an den gesamten normalisierten Peptid-Spektren.

		His ₆ -PhaM	His ₆ -PhaM + ATP	His ₆ -PhaC1	His ₆ -PhaC1 + ATP	His ₆ -PhaM + His ₆ -PhaC1 + ATP
PhaM	Phosphorylierte Peptidfragmente	S23 (17 x) T37 (11 x)	S20 (3 x) S23 (27 x) T37 (16 x)			S23 (2 x) T37 (1 x) S67 (1 x)
	Anteil Phospho- Spektren an allen PhaM- Peptidspektren	17,5/900	17,5/900			10/100
PhaC1	Phosphorylierte Peptidfragmente			T41 (1 x) S149 (1 x)	S149 (1 x) S156 (1 x)	S149 (1 x) S196 (1 x)
	Anteil Phospho- Spektren an allen PhaC1- Peptidspektren			17,5/1000	17,5/1000	5/900

Für PhaM konnten zwei Aminosäuren (S23, T37) identifiziert werden, bei denen sich der Anteil an phosphorylierten Peptidfragmenten bei einer Ko-Inkubation mit ATP erhöhte. Bei diesen Aminosäureresten handelte es sich um Reste, die weder bei bioinformatischen in silico Screenings noch bei dem pull down-Experiment gefunden werden konnten. Für den Aminosäurerest PhaM^{S23} konnten ohne ATP 17 phosphorylierte Peptidfragmente gefunden werden und nach einer Inkubation mit ATP 27 Peptide. Auch für den AS-Rest PhaM^{T37} stieg die Anzahl der phosphorylierten Peptidfragmente von 11 auf 16. Die markierungsfreie, relative Quantifizierung mit Hilfe der Anzahl der Spektren ergab allerdings keine Unterschiede. Anhand der relativen Quantifizierung kann daher nicht von einer Autophosphorylierung von PhaM in Gegenwart von ATP ausgegangen werden. Für die Ko-Inkubation von His₆-PhaC1 und His₆-PhaM in Gegenwart von ATP konnten bei PhaM drei verschiedene Phosphorylierungsstellen (S23, T37 und S67) identifiziert werden und bei PhaC1 zwei phosphorylierte Aminosäuren (S149, S196). Allerdings wurden nur jeweils ein Peptidfragment für PhaM^{T37}, PhaM^{S67}, PhaC1^{S149}. PhaC1^{S196} und zwei Fragmente für PhaM^{S23} gefunden. Die Quantifizierung der normalisierten Spektren für PhaM zeigte jedoch, dass der Anteil der normalisierten Phospho-Spektren (10/100) im Vergleich zu den Proben von PhaM ohne PhaC1 (17,5/900) gestiegen ist. Der Anteil von phosphorylierten PhaC1-Spektren an den gesamten detektierten PhaC1-Spektren blieb hingegen unverändert. Unter Berücksichtigung der Kontrollen His₆-PhaC1 und His₆-PhaC1 mit ATP konnten daher für PhaC1 keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich einer PhaM-vermittelten Phosphorylierung von PhaC1 erzielt werden. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass PhaM keine Rolle als PhaC1-Kinase zu spielen scheint.

Insgesamt lieferte das Proteomexperiment zur PhaM-Synthaseaktivität keine Hinweise weder für eine Autophosphorylierung von PhaM noch eine Phosphorylierung von PhaC1 durch PhaM und damit eine Kinasefunktion.

153

4 Diskussion

R. eutropha H16 ist der Modellorganismus für Untersuchungen hinsichtlich des PHB-Stoffwechsels. Trotz der seit Jahrzehnten andauernden Erforschung sind einige Aspekte innerhalb des PHB-Metabolismus bislang immer noch ungeklärt. Dazu gehören beispielsweise die genaue Zusammensetzung und Oberflächenstruktur der PHB-Granula (Parlane *et al.*, 2017). Offene Fragen gibt es auch im Bezug auf die genaue physiologische Funktion einiger kürzlich identifizierter PHB-assoziierter Proteine, darunter auch PhaM, welches eine wichtige Rolle im PHB-Stoffwechsel zu spielen scheint.

4.1 Phospholipide binden artifiziell an PHB-Granula

Das Vorhandensein der putativen Phospholipase A0225, die am PHB-Granulum gefunden wurde, führte zu der Frage, ob (Phospho)-Lipide an der Oberfläche der PHB-Granula auftreten oder nicht. Die Hypothese von Phospholipiden am PHB-Granulum stammt von der Arbeit von Merrick und Kollegen, die native PHB-Granula aus Bacillus megaterium isolierten und vier Komponenten innerhalb der nPHB-Fraktion identifizieren konnten. Neben einem Hauptanteil von PHB mit 97,7 % (w/w) und einem Proteinanteil von 1,87 % (w/w) konnten auch 0,46 % (w/w) Lipide detektiert werden, darunter Phosphatidsäure und eine Aceton-lösliche Komponente unbekannter Struktur (Griebel et al., 1968). Ein Enzym mit einer postulierten Phospholipaseaktivität, wie das neu identifizierte PGAP A0225, könnte Phospholipide modifizieren, was die gefundenen Ergebnisse von Griebel et al. erklären würde. Ebenso wäre es möglich, dass A0225 Phospholipid-spaltende Aktivität oder auch eine Phospholipid-Synthese-Aktivität aufweist, da eine hydrophobe Mikroumgebung der PHB-Granula vorliegt. Es wurde bereits die Fähigkeit von Lipasen beschrieben, in Gegenwart hydrophober Lösungsmittel und gleichzeitiger Abwesenheit von Wasser oder geringer Wasserkonzentration Phospholipide zu synthetisieren (Jaeger et al., 1999). Die biochemischen Charakterisierungen von A0225 konnten allerdings keine Lipaseaktivität nachweisen. Die genaue Rolle von A0225 innerhalb des PHB-Stoffwechsels bleibt damit bislang ungeklärt und weiterführende Experimente waren nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Da die Experimente mit der putativen Phospholipase A0225 in vitro durchgeführt wurden, hätten auch gefundene Unterschiede nicht eindeutig die in vivo Präsenz von Phospholipiden belegen können. Eine Möglichkeit das in vivo Vorhandensein bzw. die subzelluläre Lokalisation von Phospholipiden am PHB-Granulum zu untersuchen, sind Phospholipidbindeproteine, von denen bereits einige beschrieben wurden (Lemmon, 2008; Stace und Ktistakis, 2006). Die Aktivität vieler dieser Proteine ist von Ca²⁺ abhängig und spezifisch für Phospholipide, die in Eukaryoten zu finden sind, wie beispielsweise Phosphatidylinositol (Lemmon, 2008; Varnai und Balla, 2006). (Eukaryotische) Proteine, die beispielsweise spezifisch an Phosphatidylethanolamin (PE) binden können, werden als Phosphatidylethanolamin-Bindeproteine (PEBPs) bezeichnet, von denen einige einfach kloniert und anschließend rekombinant in E. coli aufgereinigt werden können (Rautureau et al., 2006). Auch Bakterien exprimieren solche PEBPs, allerdings besitzen diese Proteine meist antibiotische Aktivität, wie beispielsweise das zyklische Peptid Cinnamycin (Ro09-0198) (Emoto et al., 1996; Nishibori et al., 2005). Ein weiteres, geeignetes Phospholipid-spezifisches Protein, welches keine antibiotische Aktivität oder Ca²⁺-Abhängigkeit aufweist, ist das Glykoprotein Lactadherin aus dem Rind, das auch als PAS-6/7 bezeichnet wird. Lactadherin besitzt eine C-terminal lokalisierte Phospholipidbinde-Domäne (LactC2), welche in dieser Arbeit genutzt wurde, um die in vivo Präsenz von Phospholipiden zu untersuchen. Dafür wurde ein Fusionsprotein mit dem Fluoreszenzprotein DsRed2_{EC} kloniert und die Lokalisation mikroskopisch untersucht. Sowohl in E. coli als auch in R. eutropha H16 konnte eine Membranbindung von DsRed2_{EC}-LactC2 bestätigt werden. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit in vitro Bindeassays von Andersen et al., die zeigen konnten, dass diese C2-Domäne an die Oberfläche von negativ-geladenen Phospholipiden wie Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylglycerin (PG) sowie deren Vorstufe, Phosphatidsäure (PA), und in geringen Mengen auch Phosphatidylethanolamin (PE) bindet. Eine Bindung an Phosphatidylcholin konnte hingegen nicht nachgewiesen werden (Andersen et al., 1997, 2000). Die in R. eutropha identifizierten Membranlipide sind PG, PS, Cardiolipin (CL) und PE, wobei letzteres Phospholipid die Hauptkomponente darstellt (Thiele et al., 1972). LactC2 bindet bevorzugt PS in vivo, aber es konnte gezeigt werden, dass

Diskussion

Lactadherin auch Phospholipidmixturen bindet, die einen Überschuss an PE PS aufweisen und nur geringe Mengen an (0,03)%), die was Membranzusammensetzung in *R. eutropha* gut widerspiegelt (Andersen *et al.*, 2000; Otzen *et al.*, 2012). Demnach müsste das Fusionsprotein DsRed2_{FC}-LactC2 auch mögliche Phospholipide auf der PHB/PHA-Granulaoberfläche binden können. Verstärkt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass die Bindung von LactC2 an PS-enthaltene Phospholipide durch einen hohen Grad der Membrankrümmung stimuliert wird (Otzen et al., 2012). Neben den Zellpolen von stäbchenförmigen Bakterien, die eine negative Membrankrümmung aufweisen, trifft dies auch auf PHA/PHB-Granula zu, sofern dieses Phospholipide enthalten. Eine Bindung von DsRed2_{EC}-LactC2 an PHB-Granula konnte allerdings nicht für R. eutropha bestätigt werden. Eine weitere von LactC2 unabhängige Bestätigung, dass sich an der PHB-Oberfläche keine Phospholipide befinden, konnte mit Hilfe der Fusionsproteine eYFP-Rne (RNase E) und eYFP-Psd (Phosphatidylserin-Decarboxylase) gezeigt werden. Beide Fusionsproteine lokalisierten an der Zellmembran. Um auszuschließen, dass eine Bindung von DsRed2E_c-LactC2 aufgrund einer starken positiven Krümmung der PHB-Granula verhindert wird, wurde das Lokalisationsverhalten des Fusionsproteins in *M. gryphiswaldense* untersucht, deren Magnetosomen nachgewiesenerweise von einer Membran umgeben sind und gleichzeitig ebenfalls eine positive Membrankrümmung aufweisen. Die Zusammensetzung der Magnetosomem-Membran ähnelt dabei sehr jener der Zellmembran (Komeili, 2012; Scheffel et al., 2006). Aufgrund der beobachteten Magnetosomenbindung des Fusionsproteins DsRed2_{FC}-LactC2 konnte ausgeschlossen werden, dass die positive Krümmung der PHB-Granula mit einer möglichen Phospholipidmembran eine Bindung von LactC2 verhindert. Neben den Magnetosomen bildet *M. gryphiswaldense* auch PHB-Granula, bei denen allerdings keine Bindung des Fusionsproteins DsRed2_{EC}-LactC2 beobachtet werden konnte, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus R. eutropha H16 ist. Eine Bindung der C2-Domäne von Lactadherin an die Zellmembran von *M. gryphiswaldense*, als Vertreter der α-Proteobakterien, konnte allerdings bestätigt werden. Auch in dem y-Proteobakterium P. putida konnte eine Zellmembranbindung von LactC2 gezeigt werden, wohingegen keine Bindung an PHA-Granula detektiert werden konnte. Insgesamt lieferten diese Ergebnisse ausreichende Hinweise dafür, dass LactC2 an Phospholipide von Zellmembranen in Prokaryoten binden kann. Eine Anwesenheit

Diskussion

von Phospholipiden auf der Oberfläche von natürlich gebildeten PHA/PHB-Granula konnte hingegen nicht verifiziert werden, was die Daten von Kryotomographie-Experimenten widerspiegelt (Beeby et al., 2012). Interessanterweise konnte gezeigt, dass PHB-Granula, die in rekombinanten E. coli gebildet wurden, teilweise mit dem Fusionsprotein DsRed2_{EC}-LactC2 kolokalisierten (Bresan et al., 2016). Da nur die PHB-Synthesegene, aber keine Phasingene in E. coli exprimiert werden, kann von einer fehlenden nativen Protein-bedeckten PHA-Oberfläche ausgegangen werden. Dies würde bedeuten, dass ein Kontakt mit der Zellmembran zustande kommen könnte, besonders, weil PHB-Granula in *E. coli* bevorzugt an den Zellpolen lokalisiert sind (Jendrossek, 2005; Peters und Rehm, 2005). Folglich könnte es zu einer artifiziellen Bindung von Phospholipiden an die hydrophobe Polymeroberfläche in E. coli kommen. Eine artifizielle Phospholipid-Bindung an die PHB-Granulaoberfläche konnte während der Isolation von nativen Granula aus R. eutropha H16 Zellen, die das Fusionsprotein DsRed2_{FC}-LactC2 exprimierten. durch eine fluoreszenzmikroskopische Analyse bestätigt werden. Dieses Ergebnis liefert eine plausible Erklärung für die Detektion von geringen Mengen an Phospholipiden bei isolierten PHB-Granula von Merrick und Kollegen (Griebel et al., 1968).

Bei PhaP1 handelt es sich um das Hauptphasin, welches 3 bis 5 % des gesamten zellulären Proteinanteils ausmacht, und PhaP1 Deletionsmutanten in R. eutropha zeigten einen typischen Phänotyp, bei dem einzelne PHA-Granula zu einem gemeinsamen Granulum fusionierten (Pötter et al., 2004; Pötter et al., 2002; Wieczorek et al., 1995). Folglich könnte davon ausgegangen werden, dass solange PHB-Granula nicht vollständig mit Phasinen, vor allem PhaP1, bedeckt sind, Phospholipide an PHB-Granula binden. Oder viele Phasine auf der PHB Granulaoberfläche könnten eine Bindung des Fusionsproteins erschweren. Eine Expression des Fusionsproteins DsRed2_{EC}-LactC2 in *R. eutropha* H16 *AphaP1* konnte allerdings keine Kolokalisation mit den PHB-Granula detektieren, was darauf schließen lässt, dass trotz der Abwesenheit von PhaP1 keine Phospholipide an die PHB-Granula gebunden haben. Eine zusätzliche Deletion der weiteren Phasine PhaP2 – PhaP5 konnte ebenfalls keine Bindung von LactC2 an PHB-Granula bestätigen. Dies ist auch in Übereinstimmung mit Ergebnissen, die zeigten, dass die Phasine PhaP2 – PhaP4 nicht das Hauptphasin PhaP1 kompensieren können (Pötter et al., 2002; Wieczorek et al., 1995). Eine weitere Möglichkeit, warum keine Phospholipide an der PHB-Granulaoberfläche detektiert werden konnten, könnte

157

auch an einer größe- bzw. konformationsbedingten Unzugänglichkeit des Fusionsproteins DsRed2_{EC}-LactC2 liegen. Bei DsRed2_{EC} handelt es sich um ein Tetramer, das ein Molekulargewicht von etwa 89 kDa aufweist (Day und Davidson, 2009), womit das Fusionsprotein DsRed2_{EC}-LactC2 ein Gesamtmolekulargewicht von etwas über 100 kDa besitzt. Fusionsproteine mit den Monomeren mTurquoise2 und superfolderGFP (sfGFP) konnten allerdings ebenfalls keine Bindung an PHB-Granula nachweisen, womit ausgeschlossen werden konnte, dass die Größe von DsRed2_{EC}-LactC2 eine Bindung verhindert.

4.2 PAKKA-Motive vermitteln die DNA-Bindung von PhaM

In vivo Lokalisationsuntersuchungen von PhaM mit dem Fluoreszenzprotein eYFP konnten nachweisen, dass PhaM mit der DAPI-gefärbten DNA interagiert. Elektrophoretische Mobilitätsshift-Assays konnten dies in vitro bestätigen (Pfeiffer et al., 2011). Eine spezifische Interaktion von PhaM mit der DNA konnte dabei nicht festgestellt werden, denn es kam sowohl mit genomischer DNA aus R. eutropha H16 als auch mit PCR-amplifizierter eyfp-DNA zu einer Bindung von PhaM an die jeweilige DNA. Sequenzanalysen von PhaM zeigten, dass sich innerhalb des C-Terminus von PhaM zwei PAKKA-Motive befinden, die für die DNA-Bindung bei PhaM verantwortlich sind (Bresan und Jendrossek, 2017). Jenes Motiv konnte bereits innerhalb der C-terminalen Domäne bei dem Histon-ähnlichen Protein Hlp in Mycobacterium smegmatis nachgewiesen werden. Hlp ist ein 27 kDa großes Protein und ebenfalls in der Lage, unspezifisch mit der DNA von M. smegmatis zu interagieren (Mukherjee et al., 2008). Der lysinreiche Sequenzbereich von Hlp mit den PAKKA-Wiederholungen im C-Terminus wurde mit einem Schutz der DNA vor ungünstigen Bedingungen in Verbindung gebracht (Dey et al., 2017). In Pseudomonas aeruginosa konnte das AAKP-Motiv des AlgP-Regulatorproteins mit der DNA-Interaktion in Verbindung gebracht werden (Medvedkin et al., 1995). Der hohe Anteil an Lysinen und Alaninen, die von einem Prolinrest durchsetzt werden, resultiert in einer α-helikalen Alanin-Lysin-Organisation mit einem Prolin-Knick, was auch als AKP-Helix bezeichnet wird (Kasinsky et al., 2001). Bei dem Phasin PhaF aus P. putida, welches charakteristische Ähnlichkeiten mit PhaM aus R. eutropha H16 aufweist, handelt es sich um ein Histon-H1-ähnliches Protein, das aus zwei verschiedenen Domänen aufgebaut ist: einerseits eine ebenfalls im C-Terminus

Diskussion

die lokalisierte DNA-Bindungsregion, acht Tandem-Wiederholungen der Aminosäuren AAKP enthält, und andererseits die N-terminal vorliegende PHA-Bindungsregion, die sogenannte Phasin-Domäne (Prieto et al., 1999). Das PAKKA-Motiv von PhaM weist zudem Ähnlichkeiten mit dem (S/T)PKK-Motiv des eukaryotischen Histon H1 Proteins auf, welches die DNA-Kondensierungsdomäne darstellt (Bharath et al., 2002; Kasinsky et al., 2001). Kürzlich konnte ein weiteres Protein identifiziert werden, welches die Größe und den Anteil von lipid droplets in Rhodococcus jostii bestimmt. Das sogenannte MLDS (microorganism lipid droplet small) Protein bindet genomische DNA, was eine Rekrutierung der Lipidtröpfchen zur Folge hat. Die Bindung der Lipidtröpfchen an die DNA trägt zum Überleben bei Stress bei. Das MLDS Protein enthält vier PAKKA-Motive innerhalb des C-Terminus und DNA-Shift-Assays bestätigten eine unspezifische DNA-Bindung (Zhang et al., 2017). Gerichtete Mutationsanalysen des PAKKA-Motives von PhaM konnten zeigen, dass die positiv-geladenen Lysinreste bei der Wechselwirkung mit der DNA die entscheidende Rolle spielen. Eine Substitution der Lysinreste gegen Isoleucine verhinderte die DNA-Bindung und besonders der Austausch der Lysinreste innerhalb der zwei PAKKA-Motive gegen negativ-geladene Glutaminsäurereste rief einen starken Phänotyp hervor, der auf keinerlei Interaktion mit der DNA schlussfolgern ließ. Im Gegensatz dazu konnte den möglicherweise DNA-interkalierenden Prolinresten kein sichtbarer Effekt zugeordnet werden. Daher kann angenommen werden, dass die unspezifische Wechselwirkung von PhaM mit der DNA durch die Interaktion der positiv-geladenen Lysinreste mit dem negativ-geladenen Phosphatrückgrat der DNA zustande kommt (Bresan und Jendrossek, 2017). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den Experimenten des MLDS Proteins, bei dem ein Austausch der Lysinreste gegen Glutaminsäurereste mit einem Verlust der DNA-Bindungseigenschaften einherging (Zhang et al., 2017). Eine Deletion des C-terminalen Bereichs von PhaM mit den PAKKA-Motiven bestätigte zudem, dass eine DNA-Bindung nur mit Hilfe dieses Motives möglich ist (Bresan und Jendrossek, 2017). Gleiches wurde ebenfalls von Zhang et al. und Mukherjee et al. nachgewiesen. In der Arbeit von Kim et al. konnte auch mit Hilfe eines DNA-Shift-Assays bestätigt werden, dass ein C-terminal verkürztes PhaM ohne PAKKA-Motiv aus R. eutropha H16 nicht mehr an die DNA bindet (Kim et al., 2017).

Die durchgeführten *in vitro* DNA-Shift-Experimente zeigten, dass PhaM keine sequenzspezifischen Bindungsstellen innerhalb der DNA bevorzugt. Die

Diskussion

Chromatinimmunpräzipitationen (ChIP) bestätigten diese Ergebnisse und konnten keine signifikanten, charakteristischen Bindungsregionen nachweisen. Die erhaltenen Daten entsprechen den in der Literatur gezeigten Beobachtungen, bei denen beispielsweise für PhaF aus P. putida keine sequenz-spezifische DNA-Bindung nachgewiesen werden konnte (Galán et al., 2011). Weiterhin wurde ebenfalls eine unspezifische doppelsträngige DNA-Bindung der repetitiven PAKKA-Sequenzen für Histon-ähnliche HU Proteine gezeigt (Bonnefoy und Rouvière-Yaniv, 1991). Es konnte allerdings beobachtet werden, dass eine DNA-Bindung in einer strukturspezifischen Art und Weise erfolgt: deformierte DNA-Strukturen wie Uberhänge, Verzweigungen oder Nicks werden bevorzugt (Kamashev et al., 2017). Für PhaM konnte bislang nicht gezeigt werden, ob die Bindung der DNA an eine spezifische Struktur gekoppelt ist. Aufschluss über den genauen Bindungsmechanismus könnte die Kristallstruktur von PhaM geben, welche bislang leider noch nicht vorliegt.

Trotz der eingeschränkten DNA-Bindung der C-terminal verkürzten Version von PhaM (PhaM^{Δ C}) konnte gezeigt werden, dass es zu keiner Einschränkung in der Interaktion mit PhaC1 kam. *In vitro* Tests wiesen nach, dass auch PhaM^{Δ C} PhaC1 aktiviert, was bestätigt, dass der N-Terminus von PhaM für die Bindung an PhaC1 verantwortlich ist (Bresan und Jendrossek, 2017). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den von Kim *et al.* publizierten Daten, die zeigen, dass sowohl PhaM ohne PAKKA-Motiv als auch natives PhaM die Aktivität von PhaC1 erhöhen. Für die Bindung von PhaM an PhaC1 ist der N-Terminus von PhaC1 essentiell, wohingegen die katalytische Domäne von PhaC1 keine Rolle bei der Interaktion mit PhaM spielt (Kim *et al.*, 2017).

4.3 Physiologische Rolle der PhaM-DNA-Bindung

Die genaue physiologische Rolle der DNA-Bindung von PhaM konnte bislang noch nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der DNA-Bindungseigenschaften könnte eine transkriptionelle Funktion von PhaM angenommen werden, wie dies auch für PhaF aus *P. putida* beschrieben wurde (Maestro *et al.*, 2013). In eukaryotischen Organismen gibt es Hinweise darauf, dass H1 Histone die Zugänglichkeit der Transkriptionsmaschinerie zur nukleosomalen DNA beeinflussen (Zlatanova *et al.*, 2000). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Histone der H1 Familie die

Kompaktierung der DNA während verschiedener Stadien des Zellzyklus kontrollieren (Kasinsky et al., 2001). Ein Protein des PHB-Stoffwechsels, welches sowohl an DNA als auch PHB-Granula bindet, ist PhaR, welches im Gegensatz zu PhaM nur spezifisch an bestimmte DNA-Bereiche bindet. PhaR spielt eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsregulation von PhaP1 und PhaP3 und fungiert als transkriptioneller Repressor (Pötter und Steinbüchel, 2005; Pötter et al., 2005; Pötter et al., 2002). Einen möglichen Hinweis, dass PhaM ebenfalls eine Rolle bei der Regulierung der Transkription spielen könnte, lieferten die pull down-Ergebnisse, bei denen einige Proteine der Transkriptionsmaschinerie identifiziert wurden, wie zum Beispiel das accessory protein (H16_A1429). transcriptional Anhand von Two-Hybrid Experimenten mit PhaM als Köderprotein konnten ebenfalls transkriptionelle Regulatoren identifiziert werden, die eine Rolle von PhaM bei regulatorischen Funktionen nahelegen (Doktorarbeit von Daniel Pfeiffer). Aufgrund der unspezifischen DNA-Bindung von PhaM kann angenommen werden, dass PhaM keinen direkten Einfluss auf die Transkription ausübt, sondern möglicherweise mit einem weiteren Regulatorprotein interagiert.

Neben der möglichen regulatorischen Funktion konnten mikroskopische Untersuchungen sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass eine Überexpression von PhaM zu deutlichen Unterschieden bei der räumlichen Verteilung sowie der Größe und Anzahl der PHB-Granula führte (Pfeiffer et al., 2011; Wahl et al., 2012). Die Deletionsmutante $\Delta phaM$ zeigte eine sichtbar veränderte Verteilung der PHB-Granula auf die Tochterzellen, was eine wichtige Funktion bei der Granulasegregation und der intrazellulären Lokalisation dieser impliziert (Wahl et al., 2012). Ein ähnlicher Phänotyp konnte für PhaF in P. putida KT2442 detektiert werden, wo der Einfluss von PhaF bei der balancierten PHA-Granulaverteilung während der Zellteilung beobachtet werden konnte (Galán et al., 2011). Eine Deletion von PhaF führte zu deutlichen Unterschieden im PHA-Gehalt und zu einem Ungleichgewicht der Granulaverteilung (Prieto et al., 1999). Auch das Protein TadA Rhodococcus opacus weist analoge Funktionen zur Verteilung bzw. aus Lokalisierung von "Lipid-Bodies" auf und ist ebenfalls in der Lage, an DNA zu binden, ebenso wie das bereits erwähnte MLDS Protein aus Rhodococcus jostii (MacEachran et al., 2010; Zhang et al., 2017). Diese Ergebnisse legen nahe, dass es einen Verteilungsmechanismus für diese Speicherstoffe gibt. In Prokaryoten wurden bereits einige Systeme des Zytoskeletts beschrieben, die eine Lokalisation von

Organellen steuern. Dazu zählt beispielsweise das MamK/MamJ-System aus M. gryphiswaldense, welches eine kettenförmige Anordnung der Magnetosomen bewirkt (Scheffel et al., 2006). Weitere detailliert beschriebene Systeme sind zum Beispiel das MinCDE-System zur Kontrolle der Zellteilung oder das ParAB-System, welches eine wichtige Rolle bei der Chromosomensegregation spielt (Leonard et al., 2005). Bei ParA sowie MinD handelt es sich um P-loop ATPasen, die das sogenannte Walker A-Motiv mit einem konservierten Lysinrest beinhalten (Koonin, 1993; Leonard et al., 2005). ParA und MinD bilden in der ATP-gebundenen Form Dimere, die dynamische, zytoskelettartige Filamente an der DNA bzw. Zellmembran formen. Die ATPase-Aktivität dieser Proteine wird durch die N-Termini der entsprechenden Partnerproteine ParB bzw. MinE stimuliert (Gerdes et al., 2010; Leonard et al., 2005; Pratto et al., 2008). ParA zeigt gewisse Parallelen zu PhaM auf, da ParA in der ATPgebundenen Dimerform unspezifisch an DNA binden kann. ParA-ADP hingegen ist nicht in der Lage, mit der DNA zu assoziieren (Leonard et al., 2005; Murray und Errington, 2008). Möglich wäre, dass PhaM selbst in der Lage ist, ATP- oder GTPabhängig Filamente am Nukleoid auszubilden, die schließlich eine PHB-Granulasegregation bewirken oder aber einen Stimulator für die NTPase-Aktivität darstellen. PhaM weist allerdings nicht das charakteristische Walker A-Motiv (KGGXXK[ST]) auf, was bedeuten könnte, dass ein von PhaM-gesteuerter Verteilungsmechanismus der PHB-Granula einem bislang nicht beschriebenen Mechanismus zugrunde liegt. Ein neuer Mechanisumus wurde auch für die Lokalisierung der PHA-Granula in *P. putida* KT2442 durch PhaF angenommen (Galán et al., 2011). Laut KEGG Genome Datenbank weist PhaM gewisse Ähnlichkeiten zu dem ATPase-aktivierenden Protein ParB, welches an die DNA bindet, und zu FimV (Pilus Assembly Protein) auf, das den Auf- und Abbau von Filamenten reguliert (Semmler et al., 2000; Wehbi et al., 2011). Auch die pull down-Experimente mit PhaM konnten einige Proteine identifizieren, die im Zusammenhang mit der Chromosomenverteilung oder dem bakteriellen Bewegungsapparat stehen. Es konnten unter anderem Peptidfragmente von ParB (A3645), MinD (A0085), der DNA-Segregations-ATPase FtsK (A0754) oder der Flp Pilus Assembly ATPase CpaF (A0983) gefunden werden, die als mögliche Interaktionspartner von PhaM infrage kommen und so Einfluss auf die PHB-Granulaverteilung ausüben könnten.

4.4 Proteomanalyse zur Identifizierung von PhaM-Interaktionspartnern und Phosphorylierungen von PhaM

Proteomik ermöglicht Untersuchungen hinsichtlich der Zelllokalisation, posttranslationaler Modifikationen oder möglicher Interaktionspartner von Proteinen innerhalb der Zelle (Anderson und Anderson, 1998; Blackstock und Weir, 1999). Mit Hilfe von *pull down*-Experimenten und anschließenden Proteomanalysen mittels Massenspektrometrie sollten putative Interaktionspartner von PhaM identifiziert werden.

Wie im Ergebnisteil unter 3.4.1 gezeigt, konnten bei den *pull downs* mit PhaM als Köderprotein viele Proteine identifiziert werden, darunter Proteine des bakteriellen Bewegungsapparates, Chromosomen-assoziierte Proteine. Chaperone und Faltungsproteine, Translationsfaktoren oder Sekretionsproteine. Einige der identifizierten Proteine lieferten mögliche Hinweise bezüglich der physiologischen Funktion von PhaM. Das gefundene transcriptional accessory protein (H16 A1429) weist beispielsweise auf eine regulatorische Funktion von PhaM hin oder die Proteine des bakteriellen Bewegungsapparates könnten eine Rolle bei der PhaM-vermittelten PHB-Granulaverteilung spielen. Aufgrund der Tatsache, dass viele der identifizierten Proteine nur in Gegenwart von PHB gefunden wurden, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um falsch-positive Treffer handelt. Unspezifische Bindungen von Proteinen an die hydrophobe Oberfläche der PHB-Granula wurden bereits in der Literatur beschrieben (Pötter et al., 2004). Möglich wäre eine artifizielle Bindung falsch-positiver Treffer an PHB-Granula während des Zellaufschlusses. Weiterhin wurden die pull down-Experimente mit einem R. eutropha H16 Gesamtzellextrakt durchgeführt, was die Wahrscheinlichkeit für Kontaminationen mit Strukturproteinen und Chaperonen erhöht. Letztere Proteine (z.B. GroEL oder DnaK) repräsentieren zudem sehr abundante Proteine innerhalb der Zelle, was erklärt, warum besonders viele Peptidfragmente dieser Proteine gefunden wurden. Dies erschwert es, weniger abundante, aber spezifisch interagierende Proteine von diesen kontaminierenden, häufig auftretenden Proteinen mit geringer Affinität zu unterscheiden. Das Mitführen einer eYFP-Kontrolle (Negativkontrolle) ohne das Köderprotein PhaM bestätigte, dass es sie bei GroEL, Flagellin oder den identifizierten 30S ribosomalen Proteinen mit hoher Wahrscheinlichkeit um falsch-positive Treffer handelt. Pull down-Experimente mit Sepharose-Beads konnten falsche-positive Proteine verschiedener Klassen detektieren. Dazu zählen Struktur- bzw. Zytoskelettproteine, Translations- und Elongationsfaktoren, Histone, ribosomale Proteine und Hitzeschockproteine (Trinkle-Mulcahy *et al.*, 2008). Auch im *pull down*-Experiment mit den magnetischen Agarosebeads (GFP-Trap®) konnten viele Proteine dieser Klassen identifiziert werden (siehe Tabelle 3-3).

Das im *pull down*-Experiment gefundene Hauptphasin PhaP1 repräsentiert ein abundantes Protein, was 3 bis 5% des Gesamtzellextraktes ausmacht, was eine Detektion im Proteomexperiment erklären könnte (Pötter et al., 2004). Allerdings konnte mit Hilfe der bimolekularen Fluoreszenzkomplementierung bestätigt werden, dass PhaM mit PhaP1 interagiert. Für andere identifizierte putative Interaktionspartner von PhaM (z.B. DNA-Segregations-ATPase FtsK, SecA, SecD) konnte hingegen mittels einer BACTH-Analyse nicht gezeigt werden, dass eine Interaktion mit PhaM stattfindet. Bei den gefundenen Proteinen handelte es sich somit entweder um falsch-positive Treffer oder indirekte Interaktionspartner von PhaM. Um aussagekräftige Schlussfolgerungen aus möglichen Interaktionspartnern ziehen zu können, wären ausreichende Proteinguantifizierungen notwendig, welche sich grundsätzlich in markierungsfreie und -basierte Ansätze differenzieren lassen (Otto et al., 2014). Markierungsfreie Quantifizierungstechniken beruhen einerseits auf der Ionenintensität bzw. Peakfläche oder andererseits auf der Anzahl der durch Massenspektrometrie aufgenommenen Peptidspektren (Neilson et al., 2011). Eine Quantifizierung mit Hilfe der Peptidspektren basiert darauf. dass die Wahrscheinlichkeit ein Protein zu identifizieren mit zunehmender Menge des Proteins in der Probe steigt. Als Merkmal für die Proteinmenge könnten demnach die Anzahl der Spektren herangezogen werden.

Neben der Suche nach potenziellen Interaktionspartnern von PhaM wurden auch Phosphorylierungen als posttranslationale Modifikationen von PhaM untersucht. Anhand der Spektrenanzahl konnte gezeigt werden, dass vor allem *in vivo* gefundene Phosphorylierungen von PhaM mit nur 0,2 phosphorylierten Spektren von insgesamt 45 Spektren von PhaM sehr selten auftraten (0,44 %). Folglich erscheint es unwahrscheinlich, dass PhaM nach vier Stunden in der exponentiellen Wachstumsphase phosphoryliert vorliegt. Für die *in vitro* detektierten Phosphorylierungen von PhaM konnten auch nur rund 2 % phosphorylierte Spektren

164

für PhaM detektiert werden. Die Identifizierung von Phosphopeptiden wird allerdings dadurch erschwert, dass der Phosphatrest relativ labil ist und häufig während der Fragmentierung verloren geht (Dephoure et al., 2013). Ein weiteres Problem besteht generell in der Häufigkeit der Phosphorylierungen. Aufgrund oft unklarer Ursachen sind nur wenige Phosphorylierungsstellen wirklich phosphoryliert, was dazu führt, dass nur selten phosphorylierte Peptidfragmente detektiert werden (Olsen et al., 2010; Wu et al., 2011). Daher könnte es sein, dass die gefundenen Phosphorylierungen von PhaM physiologisch existieren. Dennoch kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob alle identifizierten Phosphorylierungsstellen von PhaM auftreten, da die Peptide gleicher Sequenzlänge, die scheinbar an real verschiedenen Aminosäureresten phosphoryliert sind, identische Massen aufweisen. Folglich ist keine Differenzierung der benachbarten phosphorylierten Reste möglich. Je näher zwei Phosphorylierungsstellen zueinander liegen, desto schwieriger ist die Detektion aminosäurereste-spezifischer Fragment-Ionen (Dephoure et al., 2013). Die Identifizierung aller möglichen Phosphorylierungsstellen von PhaM wird zusätzlich dadurch erschwert, dass nur die sequenzspezifische Protease Trypsin für die Fragmentierung verwendet wurde. Nicht alle phosphorylierten Reste liegen in Regionen von MS-geeigneten Peptiden, die durch Spaltung mit Trypsin entstehen. Nur rund 80 - 90 % der gesamten Proteinsequenz werden detektiert (Dephoure et al., 2013). Um die identifizierten Daten zu reproduzieren, wäre es daher sinnvoll, verschiedene Proteasen zu nutzen, die Peptide von 8 bis 20 Aminosäuren generieren, oder eine Spaltung mit zwei Proteasen durchzuführen. Die Zugabe von Phosphatase-Inhibitoren würde zusätzlich verhindern, dass vorhandenes Phosphat abgespalten wird.

Eine absolute Quantifizierung von Phosphorylierungsstellen durch Bestimmung der phosphorylierten Spektren ist nicht möglich, da Standard-Massenspektrometrie keinerlei Informationen über die Stöchiometrie der Phosphorylierungsstellen liefert. Phosphorylierte und unphosphorylierte Peptide sind chemisch unterschieden und verhalten sich demnach während der Massenspektrometrie unterschiedlich. Folglich einfacher Vergleich der phosphorylierten und unphosphorylierten ist ein Spektrenanzahl für eine absolute guantitative Aussage nicht anwendbar. Eine Quantifizierung auf Basis einer Inkorporation stabiler Isotopentags würde es ermöglichen, biologisch relevante Phosphorylierungsstellen von PhaM zu identifizieren (Dephoure 2013). relative Quantifizierung et al., Eine der Phosphopeptide, wie dies im Ergebnisteil erfolgte, ist mit Hilfe der Peakflächen oder der normalisierten Spektren von phosphoryliert und unphosphoryliert möglich.

4.5 PhaM besitzt in vitro NTPase-Aktivität

Die Suche nach möglichen Motiven von PhaM, die Rückschlüsse auf den Mechanismus und die physiologische Rolle von PhaM geben könnten, führte zur Identifizierung des sogenannten SRPα-N-terminal-Motives, welches im N-Terminus der α-Untereinheit des Signalerkennungspartikels (SRP) zu finden ist. Bei dem Signalerkennungspartikel handelt es sich um einen Protein-RNA Komplex, welcher den Transport von Sekretions- und Membranproteinen zur Plasmamembran vermittelt. Der Prozess wird dabei von einer GTPase-Domäne kontrolliert (Luirink und Sinning, 2004). In Eubakterien besteht das SRP aus einem Protein (Ffh) mit drei Domänen: einem α-helikalen Teil, einer Nukleotidbinde-GTPase-Domäne sowie einer Untereinheit für die Bindung von Signalpeptiden (Luirink und Sinning, 2004; Römisch et al., 1989). Das SRP bindet hydrophobe N-terminale Signalsequenzen von Proteinen und fördert die Translokation des Proteins zum Zielort, wo es zur Dissoziation des Komplexes kommt. Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch für angenommen werden, wie es die PHB-Granulabewegung steuert. PhaM Mikroskopische Live Cell Imaging Experimente der genomischen Integration von *phaM* mit *eyfp* konnten bereits zeigen, dass bevor es zur Bildung erster sichtbarer PHB-Granula kommt, PhaM-eYFP-Fluoreszenzfoci detektiert werden, an deren Orten sich anschließend PHB-Granula ausbilden. Bei älteren, reiferen PHB-Granula kommt es hingegen zu einem Ablösen der Fluoreszenz und es werden anschließend neue Initiationsorte gebildet, wo neue PHB-Granula sichtbar werden (Bresan und Jendrossek. 2017). Es konnte bereits durch *Two-Hybrid*-Experimente und fluoreszenzmikroskopische Analysen gezeigt werden, dass PhaM mit der PHB-Synthase PhaC1 interagiert (Pfeiffer et al., 2011). Annehmbar wäre, dass PhaM als Teil des PhaM-PhaC1-Initiationskomplexes das neu synthetisierte hydrophobe PHB-Molekül bindet und durch die gleichzeitige Assoziation mit der DNA eine gerichtete aktive Verteilung der PHB-Granula bewirkt sowie schließlich zur Dissoziation der PHB-Granula vom PhaM-PhaC1-Komplex führt. Dieser putative Verteilungsmechanismus könnte mittels der NTPase-Aktivität von PhaM gesteuert werden, die anhand von kolorimetrischen Assays und HPLC-Messungen detektiert
wurde. Die kolorimetrischen Assays bestätigten dabei eine NTPase-Aktivität von PhaM in Gegenwart von GTP sowie ATP, wohingegen keine Hydrolyse mit GDP beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse der limitierten Proteolyse wiesen weiterhin darauf hin, dass ATP bzw. GTP eine Konformationsänderung von nativem PhaM bewirken, die eine schnellere Proteolyse durch Endopeptidasen ermöglichen. Dies konnte hingegen nicht für die Inkubation mit den Nukleosiddiphosphaten ADP und GDP nachgewiesen werden. Die limitierte Proteolyse nativer Proteine kann genutzt werden, um Proteinoberflächenstrukturen, ligandeninduzierte Konformationsänderungen, Domänenstrukturen oder Proteinfaltung und –entfaltung zu untersuchen (Hubbard, 1998). Trotz der fehlenden Kristallstruktur von PhaM konnte die limitierte Proteolyse mit Trypsin und Proteinase K zeigen, dass die Inkubation mit ATP bzw. GTP dazu führt, dass bestimmte Regionen von PhaM für die Enzyme schneller zugänglich werden. Dabei kann es sich um flexible Oberflächenloops von PhaM handeln. Fontana et al. konnten zeigen, dass die limitierte Proteolyse von globulären Proteinen bei flexiblen Loops auftritt und helikale Kettensegmente ausgeschlossen sind (Fontana et al., 1993). Auffällig bei PhaM war, dass der Effekt sowohl mit Trypsin als auch Proteinase K beobachtet werden konnte. Proteinase K ist eine Endopeptidase, die Peptidbindungen von aliphatischen, aromatischen und hydrophoben Aminosäuren hydrolysiert. Da der Anteil dieser Aminosäuren bei PhaM mit knapp 50 % sehr hoch ist, resultierte die Inkubation von PhaM mit Proteinase K in einem breiten, unspezifischen Spaltungsmuster. In Gegenwart von ATP bzw. GTP fand im Vergleich zur Inkubation mit ADP bzw. GDP ein deutlich schnellerer Abbau statt. Damit wurde deutlich, dass die Konformation bzw. Dynamik von PhaM nach Inkubation mit GTP bzw. ATP die limitierte Proteolyse bestimmte und nicht die Aminosäureseguenz (Fontana et al., 1997). Trypsin hingegen spaltet nur Peptidbindungen C-terminal von den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin (Hubbard, 1998). PhaM besitzt einen Anteil von etwa 10 % an Lysinen und Argininen, wobei die Lysine hauptsächlich innerhalb der C-terminalen Region der PAKKA-Motive fokussiert sind, was die Wahrscheinlichkeit für eine Spaltung in dem Bereich erhöht. Unter nativen Bedingungen ist allerdings davon auszugehen, dass sich ein Großteil der putativen Peptidbindungen innerhalb des Proteinkerns befindet und nur Oberflächenstrukturen für Trypsin zugänglich sind. Anhand des SDS-Gels wurde deutlich, dass die proteolytische Spaltung mit Trypsin vor allem in größeren Spaltprodukten über 25 kDa resultierte, wohingegen unbehandeltes PhaM bei einer

Größe von etwas unter 35 kDa detektiert wurde. Damit könnte angenommen werden, dass ATP bzw. GTP eine Konformationsänderung von PhaM bewirken, die dazu führt, dass die Peptidbindungen im Bereich der PAKKA-Motive besser für Trypsin zugänglich werden, was größere Spaltprodukte zur Folge hat. Eine gute Möglichkeit die Peptidspaltprodukte der Trypsin-Proteolyse zu untersuchen und einen Aufschluss über die Strukturveränderung nach GTP- bzw. ATP-Inkubation zu erhalten, wären anschließende Massenspektrometrie-Experimente (Suh et al., 2007). Folglich die könnten Regionen identifiziert werden. ohne Inkubation mit Nukleosidtriphosphaten resistent gegenüber der Trypsinspaltung sind. Von Bedeutung wären dabei die ersten Spaltungen, da dadurch erhaltene Proteinfragmente oder entfaltete Proteine unterschiedliche Konformationen und Dynamiken aufweisen, die es leichter für Proteasen angreifbar macht (Fontana et al., 1997). In diesem Zusammenhang wäre es ebenfalls interessant, einen möglichen Konformationsunterschied von PhaM nach Bindung an die DNA zu untersuchen, wie dies bereits für Proteine in der Literatur beschrieben wurde (Cohen et al., 1995). Der kalorimetrische Aktivitätstest lieferte bereits erste Hinweise, dass es in Gegenwart von chromosomaler R. eutropha H16 DNA weder zu einer Steigerung noch Minderung der PhaM-NTPase-Aktivität kam.

Aufgrund der Ergebnisse der limitierten Proteolyse kann angenommen werden, dass die Nukleosidtriphosphate GTP und ATP in der Lage sind, an PhaM zu binden. CD-Analysen konnten allerdings keine sichtbaren Konformationsunterschiede nach mit GTP einer Inkubation nachweisen. Auch bei einer Größenausschlusschromatographie von PhaM mit und ohne ATP konnte kein Unterschied detektiert werden. der auf eine Veränderung des Oligomerisierungsgrades von PhaM schließen lässt. Die Experimente der isothermischen Titrationskalorimetrie (ITC) konnten ebenfalls keine Bindung von GTP und ATP an PhaM bestätigen, sondern zeigten lediglich, dass es zu einer endothermen Reaktion kam, die in keiner Sättigung des PhaM-NTP-Komplexes resultierte. Anzunehmen wäre, dass es zu einer schnellen Umsetzung der eingesetzten Nukleotide kommt, die eine messbare Bindung und mögliche Bindungssättigung verhindern. Versuche mit nicht-hydrolisierbaren Nukleotidanaloga konnten allerdings ebenfalls keine Bindung von PhaM feststellen. Eine mögliche Begründung dafür wäre, dass PhaM nicht spezifisch für die Purinbasen Adenosin und Guanosin ist. sondern möglicherweise eine Spezifität für die

β-γ-Phosphatbindung aufweist. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den Resultaten des kalorimetrischen Aktivitätstests und der HPLC-Messungen, die eine Hydrolyseaktivität von PhaM in Gegenwart von ATP und GTP, aber nicht GDP detektieren konnten. Um eine γ-Phosphat-Spezifität der PhaM-Aktivität zu überprüfen, könnten andere Substrate wie Pentanatriumtriphosphat, Uridintriphosphat (UTP) als Pyrimidinnukleosidtriphosphat oder Thiaminpyrophosphat genutzt werden.

Entgegen der Erwartungen konnten in silico Screenings nicht das für viele Nukleotidbindeproteine charakteristische Walker A-Motiv bei PhaM finden (Walker et al., 1982). Eine weitere Region mit einem konservierten Aspartatrest, welche als Walker B-Motiv bezeichnet wird, spielt eine wichtige Rolle bei der Koordination divalenter Kationen, die für die Hydrolyse der ß-y-Bindung von ATP und GTP essentiell sind (Pai et al., 1990; Sablin et al., 1996; Walker et al., 1982). Auch dieses Motiv konnte bislang nicht bei PhaM identifiziert werden, allerdings konnten die ITC-Experimente und kalorimetrischen Assays zeigen, dass Mg²⁺-Ionen für die hydrolytische Aktivität von PhaM benötigt werden. Magnesium-Ionen dienen als essentielle Kofaktoren, die eine Enzym-Substrat-Interaktion vermitteln, metabolische Intermediate stabilisieren oder direkt an Enzyme binden. Im letzteren Fall können Ma²⁺-Ionen die Enzymstruktur verändern und eine katalytische Rolle einnehmen (Wolf und Cittadini, 2003). Aufgrund der Tatsache, dass es während der Aufreinigung von PhaM zu einem Verlust gebundener Magnesium-Ionen kommen kann, kann nicht geschlussfolgert werden, ob PhaM im Komplex mit Mg²⁺ vorliegt oder Magnesium an das Substrat bindet. Im Fall von ATPasen kommt es beispielsweise zur Ausbildung eines ATP-Mg-Substrates. Auch bei Pyrophosphatasen liegt Magnesium gebunden an das Substrat vor. Im Gegensatz dazu ist Magnesium bei Glutaminsynthasen oder Ribulosephosphatcarboxylasen an das Enzym gebunden (Wolf und Cittadini, 2003). Einen Aufschluss darüber, ob ein PhaM-Magnesium-Komplex existiert, könnten EPRoder NMR-Experimente liefern (Feuerstein et al., 1987).

Der kalorimetrische Assay lieferte unerwarterweise einen Hinweis darauf, dass auch die PHB-Synthase PhaC1 eine ATPase-Aktivität aufweist. Um auszuschließen, dass es sich um ein falsch-positives Ergebnis handelt, wurde der kalorimetrische Malachitgrün-Assay auch mit BSA durchgeführt, wobei keinerlei Aktivität detektiert wurde. Da auf die gefundene PhaC1-ATPase-Aktivität bislang nicht weiter eingegangen wurde, kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass es ein

Fehler der experimentellen Durchführung bzw. der Methode war. Sollte die PhaC1-ATPase-Aktivität in weiteren Experimenten bestätigt werden, könnte angenommen werden, dass PhaC1 nach Aufbrauchen des Substrats *(R)*-3-HB-CoA ATP aufgrund der Strukturähnlichkeit zu Coenzym A bindet und dieses hydrolysiert. Diese Hypothese könnte mit Hilfe eines kalorimetrischen Assay mit der aufgereinigten inaktiven PhaC1^{C319A} überprüft werden. Für PhaM konnte die Aktivität mit unabhängigen Methoden bestätigt werden. Zudem wurde ein *In-Gel-*Aktivitätstest durchgeführt, der freigesetztes anorganisches Phosphat innerhalb des PhaM-Oligomerkomplexes detektierte. Damit konnte gleichzeitig ausgeschlossen werden, dass ein verunreinigtes Protein zu einem falsch-positiven Ergebnis führte. Interessanterweise befand sich die detektierte Phosphatbande nur in einem Bereich des PhaM-Proteins, was darauf schließen lassen könnte, dass eine spezifische Domäne oder Oligomerisierungsgrad von PhaM für die Aktivität verantwortlich ist. Aufschluss darüber könnte die Kristallstruktur von PhaM geben.

4.6 Auftretende Heterogenität der PHB-Granula

In vivo Live Cell Imaging Experimente konnten eine Heterogenität der PHB-Granula zeigen, was sich durch ein Ablösen der PHB-Granula-assoziierten Proteine PhaM und PhaC1 widerspiegelt. Dies war bei Granula beobachtbar, deren Größe sich nicht mehr sichtbar veränderte und damit angenommen werden kann, dass es trotz vorhandener Nährstoffe zu einem Abbruch der weiteren Synthese an diesen Granula kam (Bresan und Jendrossek, 2017). Das wiederum würde auch erklären, warum PHB-Granula ab einer bestimmten Größe nicht mehr wachsen, sondern mehrere einzelne Granula gebildet werden. In vitro Untersuchungen mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) konnten zeigen, dass es während der frühen Phase der PHB-Bildung, wo bereits geringe Mengen des Substrats (R)-3-HB-CoA verbraucht wurden, zur Ausbildung eines Konjugats aus PhaC1 und der naszenten PHB-Kette kam. Nach einer kurzen lag-Phase kam es zu einem schnellen Anstieg der Reaktion und nach 4 Minuten war das Substrat komplett verbraucht (Hiraishi et al., 2005). Diese in vitro Ergebnisse der PhaC1-PHB-Konjugatbildung sind in Übereinstimmung mit den beobachteten in vivo Live Cell Imaging Bildern, wo es zur Formation eines PHB-Initiationskomplexes mit PhaC1 bzw. PhaM kam (Bresan und Jendrossek, 2017). Es ist anzunehmen, dass sowohl PhaM als auch PhaC1 Teil

dieses Komplexes sind, da PhaM als Aktivator von PhaC1 fungiert (Pfeiffer und Jendrossek, 2014). Interessanterweiser ist PhaM aus R. eutropha nicht in der Lage, direkt mit der Klasse I PHB-Synthase aus Aeromonas zu interagieren und diese in vitro zu aktivieren. wie dies caviae Koaffinitätssexperimente und in vitro PHB-Synthaseaktivitätstests zeigen konnten. Dies lässt auf eine spezifische Interaktion von PhaM und PhaC1 aus R. eutropha schließen. Auch eine Bindung von PhaM aus R. eutropha an einen Komplex aus PHB und PHB-Synthase aus Aeromonas caviae konnte nicht nachgewiesen werden. Dies suggeriert, dass PhaM kein direktes PHB-assoziiertes Protein ist, sondern ein bifunktionales Protein, das gleichzeitig an DNA und PHB-Synthase aus R. eutropha bindet (Ushimaru und Tsuge, 2016). Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese eines PhaC1-PhaM-Komplexes als Ausgangspunkt der PHB-Synthese in R. eutropha H16. Mikroskopische Analysen lieferten zudem weitere Hinweise auf einen Initiationskomplex mit PhaC1 und PhaM, da PhaM in einem PHB-negativen (\(\Delta phaC1\) Hintergund keine Foci bildet, sondern eine lösliche Fluoreszenz im Bereich des Nukleoids aufweist, was auch in Gegenwart der inaktiven PHB-Synthase PhaC1^{C319A} bestätigt wurde. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass es aufgrund einer eingeschränkten Dimerisierung der inaktiven Synthase PhaC1^{C319A} zur löslichen Fluoreszenz von PhaM kam. Dass es trotz der löslichen Fluoreszenz von PhaM und PhaC1 zu einer diffusen Interaktion kam, konnte in vivo mit Hilfe der BiFC-Experimente geklärt werden. Es kann angenommen werden, dass es zur Ausbildung eines PhaC1-PhaM-PHB-Konjugats kommt, welches nicht als Granulum im Mikroskop sichtbar ist. Aufgrund der PhaM-vermittelten PhaC1-Aktivierung führt dies zu einer schnelleren Bildung der PHB-Granula. Dies ist in Übereinstimmung mit einer langsameren und abweichenden PHB-Bildung in R. eutropha H16 AphaM phaC1-eyfp Zellen, wie dies Time Lapse Experimente zeigen konnten. Es wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass die PHB-Synthase bei Abwesenheit von PHB in löslicher Form im Zytoplasma vorliegt (Haywood et al., 1989). Dies wurde anhand von Aufnahmen von R. eutropha H16 $\Delta phaM$ phaC1-eyfp Zellen zum Zeitpunkt t = 0 bestätigt. Schlussfolgernd kann daher angenommen werden, dass der Verlust der PhaM- bzw. PhaC1-Fluoreszenz von älteren, größeren PHB-Granula mit der gleichzeitigen Bildung einer neuen PHB-Kette gekoppelt ist, da zu keinem späteren Zeitpunkt eine lösliche Fluoreszenz detektiert wurde. Ein Abbau der Proteine kann dabei ausgeschlossen werden, da für PhaM eine konstitutive

Expression über einen vollständigen Zyklus von PHB-Bildung und -Mobilisierung nachgewiesen werden konnte (Pfeiffer und Jendrossek, 2013), womit sich das Expressionslevel von PhaM in einer vergleichbaren Größenordnung wie jenes der PHB-Synthase bewegt und konstant gebildet wird (Brigham *et al.*, 2010; Brigham *et al.*, 2012; Lawrence *et al.*, 2005). Auch eine erstmalige mikroskopische Analyse von Zellen der stationären Phase konnte ein durch wiederholt lange Belichtungszeiten hervorgerufenes Ausbleichen des Fluorophors ausschließen. Sowohl PhaM als auch PhaC1 können als PHB-assoziierte Proteine mittels Proteomanalysen nachgewiesen werden. Eine Unterscheidung zwischen Granula, die an der Oberfläche kein PhaC1 und PhaM mehr gebunden haben, und denen, die mit PhaC1 und PhaM assoziiert sind, ist mittels Proteomexperimenten schwer realisierbar. Eine Möglichkeit wäre es, *Cell Sorting* Experimente durchzuführen. Basis dafür wären die chromosomalen Integrationen von *phaM* und *phaC1* mit *eyfp*, die eine fluoreszenzbasierte Sortierung von Granula mit PhaM bzw. PhaC1 ermöglichen. Granula ohne PhaM bzw. PhaC1 könnten anschließend mit Hilfe einer Nilrotfärbung sortiert werden.

Die auftretende Heterogenität der PHB-Granula während der späten Bildungsphase könnte auf Strukturveränderungen der PHB-Granula zurückzuführen sein. PHB-Granula von rekombinanten Bakterien, die entweder alle oder nur einige PHB-Synthesegene besitzen, variieren in der Größe der PHB-Granula, was darauf schließen lässt, dass PHB-assoziierte Proteine einen Einfluss auf die Größe und Morphologie der Granula haben (Wieczorek et al., 1995). Die Expression des Phasins PhaP1 ist beispielsweise von der Menge des gebildeten PHB abhängig und steigt mit zunehmenden PHB in der Zelle (Lawrence et al., 2005; Pötter et al., 2002; Wieczorek et al., 1995). Ein Anstieg des Phasinexpressionslevels kann folglich im Laufe der PHB-Bildung zu qualitativen Veränderungen der gebildeten PHB-Granula führen. Diese Reifung der Granula kann ein Ablösen von PhaM und PhaC1 zur Folge haben. Ushimaru und Tsuge konnten zudem mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigen, dass PhaM aus R. eutropha einen Effekt auf die Morphologie rekombinanter PHB-Granula in E. coli ausübt und schlussfolgerten, dass die Protein-Protein-Interaktion zwischen PhaM und PhaC1 aus R. eutropha einen wichtigen Faktor für die Morphologie der PHB-Granula darstellt (Ushimaru und Tsuge, 2016).

Möglich wäre, dass es sich entweder um einen passiven oder aktiv-gesteuerten Reifungsprozess handelt. Die Zunahme der PHB-Granula-assoziierten Proteine wie

PhaP1 könnte ein passives Verdrängen von PhaM und PhaC1 bewirken, was mikroskopisch nicht bestätigt werden konnte. Eine Möglichkeit der aktiven Steuerung der PHB-Granulareifung könnte mit Hilfe der auftretenden NTPase-Aktivität von PhaM erklärt werden. Zum einen wäre es, wie bereits beschrieben, annehmbar, dass PhaM als Teil des PhaM-PhaC1-Initiationskomplexes das neu synthetisierte, hydrophobe PHB-Molekül bindet und durch die gleichzeitige Assoziation mit der DNA eine gerichtete Verteilung der PHB-Granula bewirkt sowie schließlich zur Dissoziation der PHB-Granula vom PhaM-PhaC1-Komplex führt. Andererseits könnte eine Regulation über Phosphorylierungen auch eine Rolle spielen. Proteomdaten weisen darauf hin, dass PhaC1 während der stationären Wachstumsphase phosphoryliert vorliegt, wohingegen in der exponentiellen Wachstumsphase keine Phosphorylierungen detektiert werden konnten (Jüngert et al., 2018). Da PhaM mit PhaC1 interagiert. wäre es denkbar, dass PhaM eine Funktion als Phosphotransferase einnimmt und PhaC1 phosphoryliert, was ein Ablösen von PhaC1 bewirken könnte. Eine mögliche Rolle von PhaM als Kinase konnte ausgeschlossen werden, da pull down-Experimente von R. eutropha H16 phaC1*eyfp* im $\Delta phaM$ -Hintergrund die Phosphorylierungen von PhaC1 dennoch nachweisen konnten (Doktorarbeit von Janina Jüngert). Auch eine Proteomanalyse von aufgereinigtem His₆-PhaM, welches zusammen mit His₆-PhaC1 und ATP in Mg-haltigen Puffer inkubiert wurde, brachte keine zusätzlichen einem Phosphorylierungen von PhaC1 hervor. Quantitative Untersuchungen zum PHB-Gehalt von R. eutropha H16 Zellen mit einer PHB-Synthase, die anstelle von vier Phosphorylierungsstellen (Tyrosinresten) phosphomimetische putativen Aspartatreste aufwies (PhaC1^{T30D, T94D, T109D, T373D}), zeigten im Vergleich zu PhaC1 Wildtyp eine verminderte PHB-Synthese. Die Phosphorylierungen von PhaC1 bewirken folglich keinen Verlust, sondern lediglich eine Einschränkung der PhaC1-Aktivität, was auch in vitro bestätigt werden konnte (Jüngert et al., 2018). Beim Übergang der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase wäre eine Phosphorylierung der PHB-Synthase, die ein Ablösen der PhaC1 vom PHB-Granulum und damit eine Abnahme der PHB-Synthaseaktivität bewirkt, eine mögliche Art der Regulierung der PHB-Bildung. Fraglich bei der Hypothese bleibt, wie die Aktivität von PhaM gesteuert wird, da PhaC1 zu Zeitpunkten der frühen PHB-Bildung nicht phosphoryliert vorliegt. Proteomdaten von PhaM deuteten ebenfalls auf Phosphorylierungen von PhaM hin, die eine Regulation der Aktivität erklären

könnten. Dies konnte allerdings *in vivo* mit phosphomimetischen bzw. unphosphorylierbaren PhaM nicht bestätigt werden. Eine Proteomanalyse von aufgereinigtem His₆-PhaM mit und ohne Inkubation von ATP lieferte keine Hinweise für eine Autophosphorylierung von PhaM.

4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Insgesamt konnte diese Arbeit neue interessante Einblicke in die Physiologie des PHB-Stoffwechsels aufzeigen. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse ergeben sich neu gewonnene Erkenntnisse in Bezug auf die Wechselwirkung von PhaM und der PHB-Synthase, die zur Überarbeitung des bereits beschriebenen Scaffold-Modells von Cho et al. sowie Jendrossek und Pfeiffer führen (Abbildung 61) (Cho et al., 2012; Jendrossek und Pfeiffer, 2014). PhaM, welches vermutlich als hochmolekularer Komplex vorliegt, bildet zusammen mit der dimeren Form von PhaC1 einen Initiationskomplex. Durch die Wechselwirkungen des C-terminalen PAKKA-Motives von PhaM mit dem negativ-geladenen Phosphatrückgrat der DNA kommt es zu einer Assoziation dieses Komplexes mit dem Nukleoid. In Gegenwart des Substrats (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA (3HB-CoA) werden PHB-Polymerketten synthetisiert, die anfänglich nicht im Mikroskop sichtbar sind und nur in Gegenwart von PHB-Molekülen kommt es zur Foci-Bildung von PhaM und PhaC1. Durch die Rekrutierung weiterer Phasine, vor allem PhaP1, und dem weiteren Wachstum der PHB-Polymerkette kommt es zur Ausbildung eines PHB-Granulums, welches im Mikroskop sichtbar ist. Dabei wird eine weitere Assoziation mit dem Nukleoid angenommen, was DAPI-Färbungen bestätigten. Da das Nukleoid als Mediation Element der PHB-Synthese fungiert, ist die Lokalisation der PHB-Granula geregelt und nicht zufällig, wie dies im Micellen-Modell angenommen wird (Cho et al., 2012). Das PHB-Granulum bindet keine Phospholipide und besteht höchstwahrscheinlich auch nicht aus einer Phospholipid-Monolayer, was das Scaffold-Modell stärker untersützt, wohingegen das Budding-Modell ausgeschlossen werden kann.



Abbildung 63: Modell zur PHB-Granulaheterogenität in *R. eutropha* H16. Die PHB-Synthase (PhaC1) liegt vermutlich als Dimer vor und bildet mit dem PhaM-Oligomer einen hochmolekularen Initiationskomplex, der über PhaM mit dem Nukleoid assoziiert ist. In Gegenwart des Substrats (*R*)-3-Hydroxybutyryl-CoA (3HB-CoA) kommt es zur Synthese einer naszenten, löslichen PHB-Kette, an die Phasine, vor allem PhaP1 binden. Die Phasine liegen entweder in oligomerer Form frei in der Zelle vor oder sind mit PhaM bzw. PhaC1 über Proteininteraktionen assoziiert (A). Während der PHB-Synthese kommt es zur Bindung weiterer Phasine und anderer Granula-assoziierter Proteine wie PHB-Depolymerasen, was in der Formation eines unlöslichen PHB-Granulums resultiert. Phospholipide (PL) sind dabei höchstwahrscheinlich nicht Teil des Granulums. Das Nukleoid dient als Verankerungspunkt (B). Zu späteren Zeitpunkten existieren heterogene PHB-Granula. Einerseits welche, an deren Oberfläche PhaC1 und PhaM gebunden vorliegen, und andererseits ältere, "reife" Granula, bei denen es zu einer Ablösung von PhaC1 und PhaM kam. Eine Möglichkeit der aktiven Steuerung des Ablösens bzw. der gerichteten Verteilung stellt die nachgewiesene NTPase-Aktivität von PhaM dar. Nach Ablösen von PhaC1 und PhaM ist es denkbar, dass es zu keiner weiteren Assoziation mit dem Nukleoid kommt (C).

Bei älteren PHB-Granula kommt es dann zu einer "Reifung" der Granula, die im Ablösen des PhaM-PhaC1-Komplexes resultiert. Es ist anzunehmen, dass das "reife" Granulum nicht mehr mit dem Nukleoid assoziiert ist. Der abgelöste Komplex aus PhaC1 und PhaM könnte hingegen weiterhin mit dem Nukleoid assoziiert sein und die Bildung eines weiteren PhaC1-PhaM-PHB-Konjugats initiieren. Die nachgewiesene NTPase-Aktivität von PhaM könnte eine Rolle bei der "Reifung" der Granula spielen und damit eine wichtige Rolle innerhalb des PHB-Stoffwechsels einnehmen. Die PhaM-vermittelte Hydrolyse von GTP bzw. ATP könnte einen Einfluss auf die PhaC1-Aktivität ausüben, da PhaM neben der PHB-Synthaseaktivierenden Funktion auch eine deaktivierende Aufgabe übernehmen könnte. Auch wäre eine NTP-abhängige und gerichtete Bewegung bzw. Verteilung der PHB-Granula innerhalb der Zelle denkbar, da PhaM eine Rolle bei der Granulasegregation während der Zellteilung spielt.

Die genaue physiologische Bedeutung der PhaM-NTPase-Aktivität und ein möglicher molekularer Mechanismus bleiben indes ungeklärt und bieten Möglichkeiten für zukünftige Untersuchungen. Im Zuge der Aufklärung eines molekularen Mechanismus der "Reifung" oder PHB-Granulaverteilung wäre die Kristallstruktur von PhaM hilfreich, die Aufschlüsse über die enzymatische Aktivität von PhaM geben könnte. Da PhaM keine typischen Motive für eine Nukleotidbindung bzw. -hydrolyse aufweist, wäre es möglich, dass die NTPase-Aktivität einem bisher nicht Mechanismus unterliegt. Mittels der Kristallstruktur könnten beschriebenen Aminosäurereste identifiziert werden, die eine Rolle bei der Bindung der Nukleotide spielen. Daraus könnten vergleichende Aktivitätstest mit PhaM WT und Muteinen resultieren. Eine weitere Möglichkeit wäre es, eine Quervernetzung von PhaM mit GTP oder ATP mit Hilfe von Glutardialdehyd vorzunehmen und anschließend mittels Massenspektrometrie zu überprüfen, ob PhaM mit den Nukleotiden einen Komplex bildet, so wie dies für PhaM mit PhaC1 der Fall ist. Weiterhin wäre es interessant mittels NMR(Kernspinresonanz)- oder EPR(Elektronenspinresonanz)-Spektroskopie zu überprüfen, ob die Magnesium-Ionen im Komplex mit PhaM vorliegen. Diesbezüglich wäre ein Vergleich der NTPase-Aktivität mit analogen Mn²⁺-Ionen interessant.

Die ITC-Experimente konnten zeigen, dass es zu keiner Bindungssättigung von GTP bzw. ATP an PhaM kommt, sondern zu einer schnellen Umsetzung dieser, wobei die kalorimetrischen Tests und HPLC-Experimente bestätigen, dass PhaM keine Spezifität für die Purinbasen aufweist und scheinbar spezifisch für die β - γ -Phosphatbindung ist. Um dies zu überprüfen, wäre es hilfreich, andere Substrate wie Pentanatriumtriphosphat, Uridintriphosphat (UTP) als Pyrimidinnukleosidtriphosphat oder Thiaminpyrophosphat zu verwenden. Weiterhin könnte mit Hilfe der ITC-Experimente die Bindungsaffinität und Stöchiometrie der Komplexbildung von PhaM und PhaC1 berechnet werden, die einen Aufschluss über die stöchiometrische Zusammensetzung des Initiationskomplexes geben könnten.

Die Ergebnisse der limitierten Proteolyse mit Proteinase K und Trypsin legen nahe, dass es bei Anwesenheit von GTP bzw. ATP zu einer Konformationsänderung kommt, die eine bessere Zugänglichkeit für Endopeptidasen ermöglicht. Dabei wäre es interessant, mittels Massenspektrometrie zu überprüfen, welche Peptidfragmente ohne Nukleosidtriphosphate resistent gegenüber der spezifischen Trypsinspaltung sind und schließlich bei Behandlung mit Nukleosidtriphosphaten frei zugänglich für Trypsin werden (Fontana et al., 1997). In diesem Zusammenhang wäre es ebenfalls interessant, einen möglichen Konformationsunterschied von PhaM nach Bindung an die DNA zu untersuchen (Cohen et al., 1995). Aufgrund der Eigenschaft von PhaM, die PHB-Segregation zu steuern, wäre es interesant, die diskutierte Verbindung zur Chromosmensegregation genauer zu untersuchen. Dafür wäre es denkbar, die Origins der DNA-Replikation zu markieren und mit Hilfe einer chromosmalen Ko-Markierung von PhaM Lokalisationsstudien in vivo durchzuführen. Chromosomale Integrationen der Proteine ParA und ParB mit eYFP wurden im Zuge einer möglichen Verknüpfung von PhaM mit dem parAB-System bereits vorgenommen, konnten allerdings bislang keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielen.

5 Literaturverzeichnis

- Amara, A. A., & Rehm, B. H. A. (2003). Replacement of the catalytic nucleophile cysteine-296 by serine in class II polyhydroxyalkanoate synthase from Pseudomonas aeruginosa-mediated synthesis of a new polyester: identification of catalytic residues. *The Biochemical Journal*, 374(Pt 2), 413–421.
- Andersen, M. H., Berglund, L., Rasmussen, J. T., & Petersen, T. E. (1997). Bovine PAS-6/7 Binds α V β 5 Integrin and Anionic Phospholipids through Two Domains. *Biochemistry*, 36(18), 5441–5446.
- Andersen, M. H., Graversen, H., Fedosov, S. N., Petersen, T. E., & Rasmussen, J. T. (2000). Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin. *Biochemistry*, 39(20), 6200–6206.
- Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, *54*(4), 450–472.
- Anderson, N. L., & Anderson, N. G. (1998). Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, *19*(11), 1853–1861.
- Baird, G. S., Zacharias, D. A., & Tsien, R. Y. (2000). Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 11984–11989.
- Beeby, M., Cho, M., Stubbe, J., & Jensen, G. J. (2012). Growth and localization of polyhydroxybutyrate granules in ralstonia eutropha. *Journal of Bacteriology*, *194*(5), 1092–1099.
- Bharath, M. M. S., Ramesh, S., Chandra, N. R., & Rao, M. R. S. (2002). Identification of a 34 amino acid stretch within the C-terminus of histone H1 as the DNA-condensing domain by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, *41*(24), 7617–7627.
- Blackstock, W. P., & Weir, M. P. (1999). Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in Biotechnology*, *17*(3), 121–127.
- Blakemore, R. (1975). Magnetotactic bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, *190*(4212), 377–379.
- Boatman, E. S. (1964). Observations on the fine strucutre of spheroplasts of Rhodospirillum. *The Journal of Cell Biology*, *20*(2), 297–311.
- Bonnefoy, E., & Rouvière-Yaniv, J. (1991). HU and IHF, two homologous histone-like proteins of Escherichia coli, form different protein-DNA complexes with short DNA fragments. *The EMBO Journal*, *10*(3), 687–696.

- Bowien, B., & Schlegel, H. G. (1981). Physiology and Biochemistry of Aerobic Hydrogen-Oxidizing Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, *35*(1), 405–452.
- Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., & Fuller, R. C. (1988). Pseudomonas oleovorans as a Source of Poly(beta-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. *Applied and Environmental Microbiology*, *54*(8), 1977–1982.
- Bresan, S., & Jendrossek, D. (2017). New insights into PhaM-PhaC-mediated localization of polyhydroxybutyrate granules in Ralstonia eutropha H16. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(12), e00505-17.
- Bresan, S., Sznajder, A., Hauf, W., Forchhammer, K., Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2016). Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids. *Scientific Reports*, *6*, 26612.
- Brigham, C. J., Budde, C. F., Holder, J. W., Zeng, Q., Mahan, A. E., Rha, C., & Sinskey, A. J. (2010). Elucidation of β-Oxidation Pathways in Ralstonia eutropha H16 by Examination of Global Gene Expression. *Journal of Bacteriology*, 192(20), 5454–5464.
- Brigham, C. J., Reimer, E. N., Rha, C., & Sinskey, A. J. (2012). Examination of PHB Depolymerases in Ralstonia eutropha: Further Elucidation of the Roles of Enzymes in PHB Homeostasis. *AMB Express*, *2*(1), 26.
- Bryant, D. A., Vassilieva, E. V, Frigaard, N.-U., & Li, H. (2002). Selective protein extraction from Chlorobium tepidum chlorosomes using detergents. Evidence that CsmA forms multimers and binds bacteriochlorophyll a. *Biochemistry*, *41*(48), 14403–14411.
- Budde, C. F., Mahan, A. E., Lu, J., Rha, C., & Sinskey, A. J. (2010). Roles of Multiple Acetoacetyl Coenzyme A Reductases in Polyhydroxybutyrate Biosynthesis in Ralstonia eutropha H16. *Journal of Bacteriology*, *192*(20), 5319–5328.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Righetti, P. G. (2004). Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *ELECTROPHORESIS*, *25*(9), 1327–1333.
- Cannon, G. C., Bradburne, C. E., Aldrich, H. C., Baker, S. H., Heinhorst, S., & Shively, J. M. (2001). Microcompartments in Prokaryotes: Carboxysomes and Related Polyhedra. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(12), 5351–5361.
- Chapman, G. B. (1956). Electron microscopy of ultra-thin sections of bacteria. II. Sporulation of Bacillus megaterium and Bacillus cereus. *Journal of Bacteriology*, *71*(3), 348–355.
- Chazotte, B. (2011). Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2011*(1), pdb.prot5556.

- Chek, M. F., Kim, S.-Y., Mori, T., Arsad, H., Samian, M. R., Sudesh, K., & Hakoshima, T. (2017). Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from Chromobacterium sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Scientific Reports*, *7*(1), 5312.
- Cheung, D. T., & Nimni, M. E. (1982). Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde I: reaction with model compounds. *Connective Tissue Research*, *10*(2), 187–199.
- Cho, M., Brigham, C. J., Sinskey, A. J., & Stubbe, J. (2012). Purification of Polyhydroxybutyrate Synthase from Its Native Organism, Ralstonia eutropha: Implications for the Initiation and Elongation of Polymer Formation in Vivo. *Biochemistry*, *51*(11), 2276–2288.
- Choi, M. H., Yoon, S. C., & Lenz, R. W. (1999). Production of poly(3-hydroxybutyric acid-co-4-hydroxybutyric acid) and poly(4-hydroxybutyric acid) without subsequent degradation by Hydrogenophaga pseudoflava. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(4), 1570–1577.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., & Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(7), 2172–2175.
- Cohen, S. L., Chait, B. T., Ferré-D'Amaré, A. R., & Burley, S. K. (1995). Probing the solution structure of the DNA-binding protein Max by a combination of proteolysis and mass spectrometry. *Protein Science*, *4*(6), 1088–1099.
- Day, R. N., & Davidson, M. W. (2009). The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society Reviews*, *38*(10), 2887–2921.
- de Smet, M. J., Eggink, G., Witholt, B., Kingma, J., & Wynberg, H. (1983). Characterization of intracellular inclusions formed by Pseudomonas oleovorans during growth on octane. *Journal of Bacteriology*, *154*(2), 870–878.
- Dephoure, N., Gould, K. L., Gygi, S. P., & Kellogg, D. R. (2013). Mapping and analysis of phosphorylation sites: a quick guide for cell biologists. *Molecular Biology of the Cell*, *24*(5), 535–542.
- Dey, D., Nagaraja, V., & Ramakumar, S. (2017). Structural and evolutionary analyses reveal determinants of DNA binding specificities of nucleoid-associated proteins HU and IHF. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *107*, 356–366.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics, 82(1), 70–77.
- Emoto, K., Kobayashi, T., Yamaji, A., Aizawa, H., Yahara, I., Inoue, K., & Umeda, M. (1996). Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23), 12867–12872.

- Feuerstein, J., Kalbitzer, H. R., John, J., Goody, R. S., & Wittinghofer, A. (1987). Characterisation of the metal-ion-GDP complex at the active sites of transforming and nontransforming p21 proteins by observation of the 17O-Mn superhyperfine coupling and by kinetic methods. *European Journal of Biochemistry*, 162(1), 49–55.
- Fontana, A., de Laureto, P. P., & De Filippis, V. (1993). Molecular Aspects of Proteolysis of Globular Proteins. *Studies in Organic Chemistry*, *47*, 101–110.
- Fontana, A., Zambonin, M., Polverino de Laureto, P., De Filippis, V., Clementi, A., & Scaramella, E. (1997). Probing the conformational state of apomyoglobin by limited proteolysis. *Journal of Molecular Biology*, *266*(2), 223–230.
- Galán, B., Dinjaski, N., Maestro, B., de Eugenio, L. I., Escapa, I. F., Sanz, J. M., Prieto, M. A. (2011). Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in Pseudomonas putida KT2442. *Molecular Microbiology*, *79*(2), 402–418.
- Gerdes, K., Howard, M., & Szardenings, F. (2010). Pushing and Pulling in Prokaryotic DNA Segregation. *Cell*, *141*(6), 927–942.
- Gerngross, T. U., & Martin, D. P. (1995). Enzyme-catalyzed synthesis of poly[(R)-(β)-3-hydroxybutyrate]: formation of macroscopic granules in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(14), 6279–6283.
- Gerngross, T. U., Reilly, P., Stubbe, J., Sinskey, A. J., & Peoples, O. P. (1993). Immunocytochemical analysis of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthase in Alcaligenes eutrophus H16: localization of the synthase enzyme at the surface of PHB granules. *Journal of Bacteriology*, *175*(16), 5289–5293.
- Goedhart, J., von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimousin, M., Joosen, L., Hink, M. A., Royant, A. (2012). Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nature Communications*, *3*, 751.
- Grage, K., Jahns, A. C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I. A., Atwood, J. A., & Rehm, B. H. A. (2009). Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, *10*(4), 660–669.
- Griebel, R. J., & Merrick, J. M. (1971). Metabolism of poly-β-hydroxybutyrate: effect of mild alkaline extraction on native poly-β-hydroxybutyrate granules. *Journal of Bacteriology*, *108*(2), 782–789.
- Griebel, R., Smith, Z., & Merrick, J. M. (1968). Metabolism of poly-β-hydroxybutyrate. I . purification , composition , and properties of native poly-β-hydroxybutyrate granules from Bacillus megaterium. *Biochemistry*, *1445*(1966), 3676–3681.
- Grünberg, K., Müller, E.-C., Otto, A., Reszka, R., Linder, D., Kube, M., Schüler, D. (2004). Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in Magnetospirillum gryphiswaldense. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(2), 1040–1050.

- Handrick, R., Reinhardt, S., Focarete, M. L., Scandola, M., Adamus, G., Kowalczuk, M., & Jendrossek, D. (2001). A New Type of Thermoalkalophilic Hydrolase of Paucimonas lemoignei with High Specificity for Amorphous Polyesters of Short Chain-length Hydroxyalkanoic Acids. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(39), 36215–36224.
- Handrick, R., Reinhardt, S., & Jendrossek, D. (2000). Mobilization of poly(3hydroxybutyrate) in Ralstonia eutropha. *Journal of Bacteriology*, *182*(20), 5916– 5918.
- Handrick, R., Reinhardt, S., Schultheiss, D., Reichart, T., Schüler, D., Jendrossek, V., & Jendrossek, D. (2004). Unraveling the function of the Rhodospirillum rubrum activator of polyhydroxybutyrate (PHB) degradation: the activator is a PHBgranule-bound protein (phasin). *Journal of Bacteriology*, *186*(8), 2466–2475.
- Hauf, W., Watzer, B., Roos, N., Klotz, A., & Forchhammer, K. (2015). Photoautotrophic Polyhydroxybutyrate Granule Formation Is Regulated by Cyanobacterial Phasin PhaP in Synechocystis sp. Strain PCC 6803. Applied and Environmental Microbiology, 81(13), 4411–4422.
- Haywood, G. W., Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1989). The importance of PHBsynthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by Alcaligenes eutrophus. *FEMS Microbiology Letters*, *57*(1), 1–6.
- Heyen, U., & Schüler, D. (2003). Growth and magnetosome formation by microaerophilic Magnetospirillum strains in an oxygen-controlled fermentor. *Appl Microbiol Biotechnol*, *61*, 536–544.
- Hiraishi, T., Kikkawa, Y., Fujita, M., Normi, Y. M., Kanesato, M., Tsuge, T., Doi, Y. (2005). Atomic Force Microscopic Observation of in Vitro Polymerized Poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: Insight into Possible Mechanism of Granule Formation. *Biomacromolecules*, *6*(5), 2671–2677.
- Horowitz, D. M., & Sanders, J. K. M. (1994). Amorphous, biomimetic granules of polyhydroxybutyrate: preparation, characterization, and biological implications. *Journal of the American Chemical Society*, *116*(7), 2695–2702.
- Hubbard, S. J. (1998). The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1382*(2), 191–206.
- Jaeger, K.-E., Dijkstra, B. W., & Reetz, M. T. (1999). Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annual Review of Microbiology*, *53*(1), 315–351.
- Jendrossek, D. (2005). Fluorescence Microscopical Investigation of Poly(3hydroxybutyrate) Granule Formation in Bacteria. *Biomacromolecules*, *6*(2), 598– 603.
- Jendrossek, D. (2009). Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). *Journal of Bacteriology*, *191*(10), 3195–3202.

- Jendrossek, D., Hermawan, S., Subedi, B., & Papageorgiou, A. C. (2013). Biochemical analysis and structure determination of Paucimonas lemoignei poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZ7 muteins reveal the PHB binding site and details of substrate-enzyme interactions. *Molecular Microbiology*, *90*(3), 649–664.
- Jendrossek, D., & Pfeiffer, D. (2014). New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology*, *16*(8), 2357–2373.
- Jensen, T. E., & Sicko, L. M. (1971). Fine structure of poly-beta-hydroxybutyric acid granules in a blue-green alga, Chlorogloea fritschii. *Journal of Bacteriology*, *106*(2), 683–686.
- Jia, Y., Yuan, W., Wodzinska, J., Park, C., Sinskey, A. J., & Stubbe, J. (2001). Mechanistic studies on class I polyhydroxybutyrate (PHB) synthase from Ralstonia eutropha: class I and III synthases share a similar catalytic mechanism. *Biochemistry*, 40(4), 1011–1019.
- Juengert, J., Bresan, S., & Jendrossek, D. (2018). Determination of Polyhydroxybutyrate (PHB) Content in Ralstonia eutropha Using Gas Chromatography and Nile Red Staining. *BIO-PROTOCOL*, *8*(5).
- Kaltwasser, H. (1962). Die rolle der Polyphosphate im Phosphatstoffwechsel eines Knallgasbakteriums (Hydrogenomonas Stamm 20). *Archiv Für Mikrobiologie*, *41*(3), 282–306.
- Kamashev, D., Agapova, Y., Rastorguev, S., Talyzina, A. A., Boyko, K. M., Korzhenevskiy, D. A., Rakitina, T. V. (2017). Comparison of histone-like HU protein DNA-binding properties and HU/IHF protein sequence alignment. *PLOS ONE*, *12*(11), e0188037.
- Kapuscinski, J. (1995). DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry : Official Publication of the Biological Stain Commission*, *70*(5), 220–233.
- Karimova, G., Dautin, N., & Ladant, D. (2005). Interaction Network among Escherichia coli Membrane Proteins Involved in Cell Division as Revealed by Bacterial Two-Hybrid Analysis. *Journal of Bacteriology*, *187*(7), 2233–2243.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., & Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(10), 5752–5756.
- Karimova, G., Ullmann, A., & Ladant, D. (2001). Protein-protein interaction between Bacillus stearothermophilus tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *3*(1), 73–82.
- Kasinsky, H. E., Lewis, J. D., Dacks, J. B., & Ausiò, J. (2001). Origin of H1 linker histones. *The FASEB Journal*, *15*(1), 34–42.

- Kerppola, T. K. (2008). Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis as a Probe of Protein Interactions in Living Cells. *Annual Review of Biophysics*, *37*(1), 465–487.
- Khemici, V., Poljak, L., Luisi, B. F., & Carpousis, A. J. (2008). The RNase E of Escherichia coli is a membrane-binding protein. *Molecular Microbiology*, *70*(4), 799–813.
- Kim, J., Kim, Y.-J., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K.-J. (2017). Crystal structure of Ralstonia eutropha polyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms. *Biotechnology Journal*, *12*(1), 1600648.
- Kim, Y.-J., Choi, S. Y., Kim, J., Jin, K. S., Lee, S. Y., & Kim, K.-J. (2017). Structure and function of the N-terminal domain of Ralstonia eutropha polyhydroxyalkanoate synthase, and the proposed structure and mechanisms of the whole enzyme. *Biotechnology Journal*, *12*(1), 1600649.
- Komeili, A. (2012). Molecular mechanisms of compartmentalization and biomineralization in magnetotactic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(1), 232–255.
- Koonin, E. V. (1993). A Superfamily of ATPases with Diverse Functions Containing Either Classical or Deviant ATP-binding Motif. *Journal of Molecular Biology*, *229*(4), 1165–1174.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, *166*(1), 175–176.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–685.
- Lawrence, A. G., Schoenheit, J., He, A., Tian, J., Liu, P., Stubbe, J., & Sinskey, A. J. (2005). Transcriptional analysis of Ralstonia eutropha genes related to poly-(R)-3-hydroxybutyrate homeostasis during batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *68*(5), 663–672.
- Leavitt, S., & Freire, E. (2001). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Current Opinion in Structural Biology*, *11*(5), 560–566.
- Lemmon, M. A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(2), 99–111.
- Lenz, O., & Friedrich, B. (1998). A novel multicomponent regulatory system mediates H2 sensing in Alcaligenes eutrophus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(21), 12474–12479.
- Leonard, T. A., Butler, P. J., & Löwe, J. (2005). Bacterial chromosome segregation: structure and DNA binding of the Soj dimer--a conserved biological switch. *The EMBO Journal*, *24*(2), 270–282.

- Leonard, T. A., Møller-Jensen, J., & Löwe, J. (2005). Towards understanding the molecular basis of bacterial DNA segregation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *360*(1455), 523–535.
- Lidstrom, M. E., & Marx, C. J. (2001). Development of improved versatile broad-hostrange vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria. *Microbiology*, *147*(8), 2065–2075.
- Liebergesell, M., Schmidt, B., & Alexander, S. (1992). Isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in Chromatium vinosum D. *FEMS Microbiology Letters*, *99*(2), 227–232.
- Liebergesell, M., Sonomoto, K., Madkour, M., Mayer, F., & Steinbüchel, A. (1994). Purification and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid) synthase from Chromatium vinosum and localization of the enzyme at the surface of poly(hydroxyalkanoic acid) granules. *European Journal of Biochemistry*, *226*(1), 71–80.
- Luirink, J., & Sinning, I. (2004). SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research*, *1694*(1–3), 17–35.
- Lundgren, D. G., Pfister, R. M., & Merrick, J. M. (1964). Structure of Poly-betahydroxybutyric Acid Granules. *Journal of General Microbiology*, *34*(3), 441–446.
- Luque, I., & Freire, E. (1998). Structure-based prediction of binding affinities and molecular design of peptide ligands. *Methods in Enzymology*, *295*, 100–127.
- MacEachran, D. P., Prophete, M. E., & Sinskey, A. J. (2010). The Rhodococcus opacus PD630 heparin-binding hemagglutinin homolog TadA mediates lipid body formation. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(21), 7217–7225.
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly(3hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *63*(1), 21–53.
- Maestro, B., Galán, B., Alfonso, C., Rivas, G., Prieto, M. A., & Sanz, J. M. (2013). A New Family of Intrinsically Disordered Proteins: Structural Characterization of the Major Phasin PhaF from Pseudomonas putida KT2440. *PLoS ONE*, *8*(2), e56904.
- Mayer, F., & Hoppert, M. (1997). Determination of the thickness of the boundary layer surrounding bacterial PHA inclusion bodies, and implications for models describing the molecular architecture of this layer. *Journal of Basic Microbiology*, *37*(1), 45–52.
- Mayer, F., Madkour, M. H., Pieper-Fürst, U., Wieczorek, R., Liebergesell, M., & Steinbüchel, A. (1996). Electron microscopic observations on the macromolecular organization of the boundary layer of bacterial PHA inclusion bodies. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 42(6), 445–455.

- McCool, G. J., & Cannon, M. C. (1999). Polyhydroxyalkanoate inclusion bodyassociated proteins and coding region in Bacillus megaterium. *Journal of Bacteriology*, 181(2), 585–592.
- McCool, G. J., & Cannon, M. C. (2001). PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in Bacillus megaterium. *Journal of Bacteriology*, *183*(14), 4235–4243.
- Medvedkin, V. N., Permyakov, E. A., Klimenko, L. V, Mitin, Y. V, Matsushima, N., Nakayama, S., & Kretsinger, R. H. (1995). Interactions of (Ala*Ala*Lys*Pro)n and (Lys*Lys*Ser*Pro)n with DNA. Proposed coiled-coil structure of AlgR3 and AlgP from Pseudomonas aeruginosa. *Protein Engineering*, 8(1), 63–70.
- Merrick, J. M., & Doudoroff, M. (1964). Depolymerization of poly-betahydroxybutyrate by intracellular enzyme system. *Journal of Bacteriology*, *88*, 60– 71.
- Mezzina, M. P., & Pettinari, M. J. (2016). Phasins, Multifaceted Polyhydroxyalkanoate Granule-Associated Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(17), 5060–5067.
- Mezzina, M. P., Wetzler, D. E., Catone, M. V., Bucci, H., Di Paola, M., & Pettinari, M. J. (2014). A Phasin with Many Faces: Structural Insights on PhaP from Azotobacter sp. FA8. *PLoS ONE*, *9*(7), e103012.
- Mignery, G. A., Pikaard, C. S., & Park, W. D. (1988). Molecular characterization of the patatin multigene family of potato. *Gene*, *62*(1), 27–44.
- Mukherjee, A., Bhattacharyya, G., & Grove, A. (2008). The C-Terminal Domain of HU-Related Histone-like Protein Hlp from Mycobacterium smegmatis Mediates DNA End-Joining. *Biochemistry*, *47*(33), 8744–8753.
- Müller, B., & Jendrossek, D. (1993). Purification and properties of poly(3hydroxyvaleric acid) depolymerase from Pseudomonas lemoignei. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(4), 487–492.
- Murray, H., & Errington, J. (2008). Dynamic Control of the DNA Replication Initiation Protein DnaA by Soj/ParA. *Cell*, *135*(1), 74–84.
- Neilson, K. A., Ali, N. A., Muralidharan, S., Mirzaei, M., Mariani, M., Assadourian, G., Haynes, P. A. (2011). Less label, more free: Approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *PROTEOMICS*, *11*(4), 535–553.
- Nishibori, A., Kusaka, J., Hara, H., Umeda, M., & Matsumoto, K. (2005). Phosphatidylethanolamine Domains and Localization of Phospholipid Synthases in Bacillus subtilis Membranes. *Journal of Bacteriology*, *187*(6), 2163–2174.
- Oeding, V., & Schlegel, H. G. (1973). Beta-ketothiolase from Hydrogenomonas eutropha H16 and its significance in the regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism. *The Biochemical Journal*, *134*(1), 239–248.
- Offner, S., Ziese, U., Wanner, G., Typke, D., & Pfeifer, F. (1998). Structural characteristics of halobacterial gas vesicles. *Microbiology*, *144*(5), 1331–1342.

- Olsen, J. V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M. L., Jensen, L. J., Mann, M. (2010). Quantitative Phosphoproteomics Reveals Widespread Full Phosphorylation Site Occupancy During Mitosis. *Science Signaling*, *3*(104), ra3ra3.
- Olsen, J. V, Ong, S.-E., & Mann, M. (2004). Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, *3*(6), 608–614.
- Otto, A., Becher, D., & Schmidt, F. (2014). Quantitative proteomics in the field of microbiology. *PROTEOMICS*, *14*(4–5), 547–565.
- Otzen, D. E., Blans, K., Wang, H., Gilbert, G. E., & Rasmussen, J. T. (2012). Lactadherin binds to phosphatidylserine-containing vesicles in a two-step mechanism sensitive to vesicle size and composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1818*(4), 1019–1027.
- Pai, E. F., Krengel, U., Petsko, G. A., Goody, R. S., Kabsch, W., & Wittinghofer, A. (1990). Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 A resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *The EMBO Journal*, 9(8), 2351–2359.
- Papworth, C., Bauer, J. C., Braman, J., & Wright, D. A. (1996). Site-directed mutagenesis in one day with >80 % efficiency. *Strategies*, *9*(8), 3–3.
- Parlane, N. A., Gupta, S. K., Rubio-Reyes, P., Chen, S., Gonzalez-Miro, M., Wedlock, D. N., & Rehm, B. H. A. (2017). Self-Assembled Protein-Coated Polyhydroxyalkanoate Beads: Properties and Biomedical Applications. ACS Biomaterials Science & Engineering, 3(12), 3043–3057.
- Peplinski, K., Ehrenreich, A., Doring, C., Bomeke, M., Reinecke, F., Hutmacher, C., & Steinbuchel, A. (2010). Genome-wide transcriptome analyses of the "Knallgas" bacterium Ralstonia eutropha H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism. *Microbiology*, *156*(7), 2136–2152.
- Peters, V., Becher, D., & Rehm, B. H. A. (2007). The inherent property of polyhydroxyalkanoate synthase to form spherical PHA granules at the cell poles: The core region is required for polar localization. *Journal of Biotechnology*, *132*(3), 238–245.
- Peters, V., & Rehm, B. H. A. (2005). In vivo monitoring of PHA granule formation using GFP-labeled PHA synthases. *FEMS Microbiology Letters*, *248*(1), 93–100.
- Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2011). Interaction between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins as revealed by two-hybrid analysis and identification of a new phasin in Ralstonia eutropha H16. *Microbiology*, *157*(10), 2795–2807.
- Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2012). Localization of poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) granule-associated proteins during PHB granule formation and identification of two new phasins, phap6 and phap7, in Ralstonia eutropha H16. *Journal of Bacteriology*, 194(21), 5909–5921.

- Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2013). Development of a transferable bimolecular fluorescence complementation system for the investigation of interactions between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins in Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(9), 2989–2999.
- Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2014). PhaM Is the Physiological Activator of Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Synthase (PhaC1) in Ralstonia eutropha. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(2), 555–563.
- Pfeiffer, D., Wahl, A., & Jendrossek, D. (2011). Identification of a multifunctional protein, PhaM, that determines number, surface to volume ratio, subcellular localization and distribution to daughter cells of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, granules in Ralstonia eutropha H16. *Molecular Microbiology*, *82*(4), 936–951.
- Pfennig, N. (1974). Rhodopseudomonas globiformis, sp. n., a new species of the Rhodospirillaceae. *Archives of Microbiology*, *100*(1), 197–206.
- Pieper-Fürst, U., Madkour, M. H., Mayer, F., & Steinbüchel, A. (1994). Purification and characterization of a 14-kilodalton protein that is bound to the surface of polyhydroxyalkanoic acid granules in Rhodococcus ruber. *Journal of Bacteriology*, 176(14), 4328–4337.
- Pötter, M., Madkour, M. H., Mayer, F., & Steinbüchel, A. (2002). Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in Ralstonia eutropha H16. *Microbiology*, *148*(8), 2413–2426.
- Pötter, M., Müller, H., Reinecke, F., Wieczorek, R., Fricke, F., Bowien, B., Steinbüchel, A. (2004). The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in Ralstonia eutropha. *Microbiology*, 150(7), 2301–2311.
- Pötter, M., Müller, H., & Steinbüchel, A. (2005). Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in Ralstonia eutropha H16. *Microbiology*, 151(3), 825–833.
- Pötter, M., & Steinbüchel, A. (2005). Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation. *Biomacromolecules*, 6(2), 552–560.
- Pötter, M., & Steinbüchel, A. (2006). Biogenesis and Structure of Polyhydroxyalkanoate Granules. In *Inclusions in Prokaryotes* (pp. 109–136).
- Pratto, F., Cicek, A., Weihofen, W. A., Lurz, R., Saenger, W., & Alonso, J. C. (2008). Streptococcus pyogenes pSM19035 requires dynamic assembly of ATP-bound ParA and ParB on parS DNA during plasmid segregation. *Nucleic Acids Research*, *36*(11), 3676–3689.
- Prieto, M. A., Bühler, B., Jung, K., Witholt, B., & Kessler, B. (1999). PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of Pseudomonas oleovorans GPo1 involved in the regulatory expression system for pha genes. *Journal of Bacteriology*, 181(3), 858–868.

- Quan, A., & Robinson, P. J. (2005). Rapid purification of native dynamin I and colorimetric GTPase assay. *Methods in Enzymology*, *404*, 556–569.
- Ramsay, B. A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dubé, B., Bataille, P., & Ramsay, J. A. (1990). Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(7), 2093–2098.
- Raschdorf, O., Plitzko, J. M., Schüler, D., & Müller, F. D. (2014). A tailored galK counterselection system for efficient markerless gene deletion and chromosomal tagging in Magnetospirillum gryphiswaldense. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(14), 4323–4330.
- Rautureau, G., Jouvensal, L., Decoville, M., Locker, D., Vovelle, F., & Schoentgen, F. (2006). Cloning, high yield over-expression, purification, and characterization of CG18594, a new PEBP/RKIP family member from Drosophila melanogaster. *Protein Expression and Purification*, 48(1), 90–97.
- Rehm, B. H. A. (2003). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *The Biochemical Journal*, *376*(Pt 1), 15–33.
- Rehm, B. H. A., & Qi, Q. (2001). Polyhydroxybutyrate biosynthesis in Caulobacter crescentus: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase. *Microbiology*, *147*(12), 3353–3358.
- Repaske, R., & Repaske, A. C. (1976). Quantitative requirements for exponential growth of Alcaligenes eutrophus. *Applied and Environmental Microbiology*, *32*(4), 585–591.
- Reyes, C. L., Rutenber, E., Walter, P., & Stroud, R. M. (2007). X-ray Structures of the Signal Recognition Particle Receptor Reveal Targeting Cycle Intermediates. *PLoS ONE*, *2*(7), e607.
- Ried, J. L., & Collmer, A. (1987). An nptl-sacB-sacR cartridge for constructing directed, unmarked mutations in gram-negative bacteria by marker exchange-eviction mutagenesis. *Gene*, *57*(2–3), 239–246.
- Römisch, K., Webb, J., Herz, J., Prehn, S., Frank, R., Vingron, M., & Dobberstein, B. (1989). Homology of 54K protein of signal-recognition particle, docking protein and two E. coli proteins with putative GTP–binding domains. *Nature*, 340(6233), 478–482.
- Sablin, E. P., Jon Kull, F., Cooke, R., Vale, R. D., & Fletterick, R. J. (1996). Crystal structure of the motor domain of the kinesin-related motor ncd. *Nature*, *380*(6574), 555–559.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.), 239*(4839), 487–491.
- Sallam, A., Kast, A., Przybilla, S., Meiswinkel, T., & Steinbüchel, A. (2009). Biotechnological process for production of beta-dipeptides from cyanophycin on a technical scale and its optimization. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(1), 29–38.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.
- Scandola, M., Focarete, M. L., & Frisoni, G. (1998). Simple Kinetic Model for the Heterogeneous Enzymatic Hydrolysis of Natural Poly(3-hydroxybutyrate).
- Scheffel, A., Gruska, M., Faivre, D., Linaroudis, A., Plitzko, J. M., & Schüler, D. (2006). An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. *Nature*, 440(7080), 110–114.
- Schlegel, H. G., Gottschalk, G., & Von Bartha, R. (1961). Formation and utilization of poly-beta-hydroxybutyric acid by Knallgas bacteria (Hydrogenomonas). *Nature*, *191*, 463–465.
- Schlegel, H. G., Kaltwasser, H., & Gottschalk, G. (1961). Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. *Archiv Für Mikrobiologie*, *38*(3), 209–222.
- Schultheiss, D., Kube, M., & Schüler, D. (2004). Inactivation of the flagellin gene flaA in Magnetospirillum gryphiswaldense results in nonmagnetotactic mutants lacking flagellar filaments. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(6), 3624–3631.
- Schuster, E., & Schlegel, H. G. (1967). Chemolithotrophes Wachstum von Hydrogenomonas H16 im Chemostaten mit elektrolytischer Knallgaserzeugung. *Archiv Für Mikrobiologie*, *58*(4), 380–409.
- Semmler, A. B. T., Whitchurch, C. B., Leech, A. J., & Mattick, J. S. (2000). Identification of a novel gene, fimV, involved in twitching motility in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology*, *146*(6), 1321–1332.
- Seufferheld, M., Vieira, M. C. F., Ruiz, F. A., Rodrigues, C. O., Moreno, S. N. J., & Docampo, R. (2003). Identification of Organelles in Bacteria Similar to Acidocalcisomes of Unicellular Eukaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 29971–29978.
- Simon, R., Priefer, U., & Pühler, A. (1983). A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology*, 1(9), 784–791.
- Solomaha, E., & Palfrey, H. C. (2005). Conformational changes in dynamin on GTP binding and oligomerization reported by intrinsic and extrinsic fluorescence. *The Biochemical Journal*, *391*(Pt 3), 601–611.
- Spiekermann, P., Rehm, B. H., Kalscheuer, R., Baumeister, D., & Steinbüchel, A. (1999). A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives of Microbiology*, 171(2), 73–80.

- Stace, C., & Ktistakis, N. (2006). Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1761*(8), 913–926.
- Steinbüchel, A., Aerts, K., Babel, W., Follner, C., Liebergesell, M., Madkour, M. H., ... Valentin, H. E. (1995). Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Canadian Journal of Microbiology*, 41 Suppl 1, 94–105.
- Steinbüchel, A., & Valentin, H. E. (1995). Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, *128*(3), 219–228.
- Steinbüchel, A., Wieczorek, R., Alvarez, H., & Jossek, R. (1996). In Proceedings, International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Eggink G. et al.
- Suh, M.-J., Pourshahian, S., & Limbach, P. A. (2007). Developing limited proteolysis and mass spectrometry for the characterization of ribosome topography. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *18*(7), 1304–1317.
- Suhai, T., Heidrich, N. G., Dencher, N. A., & Seelert, H. (2009). Highly sensitive detection of ATPase activity in native gels. *ELECTROPHORESIS*, *30*(20), 3622–3625.
- Sznajder, A., Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2015). Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in Ralstonia eutropha H16. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(5), 1847–1858.
- Thibodeau, S. A., Fang, R., & Joung, J. K. (2004). High-throughput betagalactosidase assay for bacterial cell-based reporter systems. *BioTechniques*, *36*(3), 410–415.
- Thiele, O. W., Dreysel, J., & Hermann, D. (1972). The "free" lipids of two different strains of hydrogen-oxidizing bacteria in relation to their growth phases. *European Journal of Biochemistry*, *29*(2), 224–236.
- Tian, J., He, A., Lawrence, A. G., Liu, P., Watson, N., Sinskey, A. J., & Stubbe, J. (2005). Analysis of transient polyhydroxybutyrate production in Wautersia eutropha H16 by quantitative Western analysis and transmission electron microscopy. *Journal of Bacteriology*, *187*(11), 3825–3832.
- Tian, J., Sinskey, A. J., & Stubbe, J. (2005). Class III Polyhydroxybutyrate Synthase: Involvement in Chain Termination and Reinitiation. *Biochemistry*, *44*(23), 8369–8377.
- Timm, A., & Steinbüchel, A. (1990). Formation of polyesters consisting of mediumchain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by Pseudomonas aeruginosa and other fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(11), 3360–3367.

- Trinkle-Mulcahy, L., Boulon, S., Lam, Y. W., Urcia, R., Boisvert, F.-M., Vandermoere, F., Lamond, A. (2008). Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *The Journal of Cell Biology*, *183*(2), 223–239.
- Ushimaru, K., & Tsuge, T. (2016). Characterization of binding preference of polyhydroxyalkanoate biosynthesis-related multifunctional protein PhaM from Ralstonia eutropha. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(10), 4413–4421.
- Vandamme, P., & Coenye, T. (2004). Taxonomy of the genus Cupriavidus: a tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(6), 2285–2289.
- Vaneechoutte, M., Kämpfer, P., De Baere, T., Falsen, E., & Verschraegen, G. (2004). Wautersia gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including Ralstonia eutropha and related species, and proposal of Ralstonia [Pseudomonas] syzygii (Roberts et al. 1990) comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2), 317–327.
- Varnai, P., & Balla, T. (2006). Live cell imaging of phosphoinositide dynamics with fluorescent protein domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1761*(8), 957–967.
- Varne, A., Muthukumaraswamy, K., Jatiani, S. S., & Mittal, R. (2002). Conformational analysis of the GTP-binding protein MxA using limited proteolysis. *FEBS Letters*, *516*(1), 129–132.
- Wahl, A., Schuth, N., Pfeiffer, D., Nussberger, S., & Jendrossek, D. (2012). PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in Ralstonia eutropha. *BMC Microbiology*, *12*(1), 262.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., & Gay, N. J. (1982a). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal*, *1*(8), 945–951.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., & Gay, N. J. (1982b). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal*, *1*(8), 945–951.
- Weber, K., & Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, *244*(16), 4406–4412.
- Wehbi, H., Portillo, E., Harvey, H., Shimkoff, A. E., Scheurwater, E. M., Howell, P. L., & Burrows, L. L. (2011). The peptidoglycan-binding protein FimV promotes assembly of the Pseudomonas aeruginosa type IV pilus secretin. *Journal of Bacteriology*, 193(2), 540–550.

- Wieczorek, R., Pries, A., Steinbüchel, A., & Mayer, F. (1995). Analysis of a 24kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in Alcaligenes eutrophus. *Journal of Bacteriology*, *177*(9), 2425–2435.
- Wieczorek, R., Steinbüchel, A., & Schmidt, B. (1996). Occurrence of polyhydroxyalkanoic acid granule-associated proteins related to the Alcaligenes eutrophus H16 GA24 protein in other bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 135(1), 23–30.
- Williamson, D. H., & Wilkinson, J. F. (1958). The Isolation and Estimation of the Poly--hydroxy-butyrate Inclusions of Bacillus Species. *Journal of General Microbiology*, *19*(1), 198–209.
- Winkler, U. K., & Stuckmann, M. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by Serratia marcescens. *Journal of Bacteriology*, *138*(3), 663–670.
- Wittenborn, E. C., Jost, M., Wei, Y., Stubbe, J., & Drennan, C. L. (2016). Structure of the Catalytic Domain of the Class I Polyhydroxybutyrate Synthase from Cupriavidus necator. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(48), 25264–25277.
- Wolf, F. I., & Cittadini, A. (2003). Chemistry and biochemistry of magnesium. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(1–3), 3–9.
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V. P., & Hancock, R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, *118*(1), 197–203.
- Wu, R., Haas, W., Dephoure, N., Huttlin, E. L., Zhai, B., Sowa, M. E., & Gygi, S. P. (2011). A large-scale method to measure absolute protein phosphorylation stoichiometries. *Nature Methods*, 8(8), 677–683.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., & Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to Ralstonia gen. Nov.: Proposal of Ralstonia pickettii (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., Ralstonia solanacearum (Smith 1896) comb. Nov. and Ralstonia eutropha (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiology and Immunology*, *39*(11), 897–904.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, *33*(1), 103–119.
- York, G. M., Junker, B. H., Stubbe, J., & Sinskey, A. J. (2001). Accumulation of the PhaP Phasin of Ralstonia eutropha Is Dependent on Production of Polyhydroxybutyrate in Cells. *Journal of Bacteriology*, *183*(14), 4217–4226.
- York, G. M., Lupberger, J., Tian, J., Lawrence, A. G., Stubbe, J., & Sinskey, A. J. (2003). Ralstonia eutropha H16 encodes two and possibly three intracellular Poly[D-(β)-3-hydroxybutyrate] depolymerase genes. *Journal of Bacteriology*, *185*(13), 3788–3794.

- Yuan, W., Jia, Y., Tian, J., Snell, K. D., Müh, U., Sinskey, A. J., Stubbe, J. (2001). Class I and III Polyhydroxyalkanoate Synthases from Ralstonia eutropha and Allochromatium vinosum: Characterization and Substrate Specificity Studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 394(1), 87–98.
- Zhang, C., Yang, L., Ding, Y., Wang, Y., Lan, L., Ma, Q., Liu, P. (2017). Bacterial lipid droplets bind to DNA via an intermediary protein that enhances survival under stress. *Nature Communications*, *8*, 15979.
- Zlatanova, J., Caiafa, P., & Van Holde, K. (2000). Linker histone binding and displacement: versatile mechanism for transcriptional regulation. *FASEB Journal*: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 14(12), 1697–1704

6 Anhang



Abbildung Anhang 1: SDS-PAGE des aufgereinigten His₆-getaggten A0225. Nach erfolgter Aufreinigung mittels einer Ni-NTA-Säule wurden das Protein His₆-A0225 sowie eine Waschfraktion auf einem 12 %-igen SDS-Gel separiert und anschließend mit Hilfe der Silberfärbung detektiert. A0225 weist ein Molekulargewicht von 53 kDa auf.



Abbildung Anhang 2: Turbidimetrischer Test zur Bestimmung der Depolymeraseaktivität sowie Esterase- und Lipasetest von A0225. Eine nPHB-Granulasuspension ($OD_{650} \sim 1$) wurde mit dem aufgereinigten A0225 versetzt und bei 43°C der Verlauf der OD_{650} über die Zeit verfolgt, wobei keine Abnahme der Trübung gemessen wurde. Als Positivkontrolle diente PhaZ7 (A). Für die Messung der Esteraseaktivität wurde A0225 mit den Substraten ρ -Nitrophenylacetat (C8) oder ρ -Nitrophenylcaprat (C16) inkubiert und die Zunahme der Absorption bei 405 nm und 40°C verfolgt. Es konnte eine starke Hydrolyse für C8 detektiert werden und eine geringe Zunahme des freigesetzten ρ -Nitrophenol für das C16-Substrat. Die Lipaseaktivität von A0225 wurde mit Hilfe des Substrats ρ -Nitrophenylpalmitat (C22) vergleichend zur Positivkontrolle (Lipase) mit der C22-Verbindung untersucht. Es konnte keine Aktivität nachgewiesen werden (B).



Abbildung Anhang 3: SDS-PAGE der aufgereinigten His₆-getaggten PhaM Muteine. Nach erfolgter Aufreingung mittels Ni-NTA-Säulen wurden 100 ng der Muteine auf einem 12 %-igen SDS-Gel separiert und anschließend mit Hilfe der Silberfärbung detektiert. PhaM^{WT} bewegte sich in einer Größenordnung von etwa 34 kDa, was auch für die anderen Muteine PhaM^{K1-2I}, PhaM^{K1-4I}, PhaM^{K3-6I}, PhaM^{K3-6E} zutraf. Für PhaM^{ΔC} konnte hingegen lediglich ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa gezeigt werden.



Abbildung Anhang 4: Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) von PhaM zur Untersuchung putativer DNA-Bindungsstellen. Für die ChIP-Experimente wurde der Stamm *R. eutropha* H16 *phaM-eyfp* verwendet. Für die Alignments wurde das Referenzgenom von *R. eutropha* H16 genutzt (pHG1 – A; Chromosom 1 – B; Chromosom 2 – C, 100 Basenpaarebereich von Chromosom 2 – D). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Online Tools *"Deep tools" (bam compare).* Die Inputs und die Outputs wurden normalisiert und das Verhältnis der Readanzahl mit einem *500 bp* binning ausgegeben. Als Kontrolle zur erfolgreichen Durchführung des Experiments diente *C. glutamicum parB-mCherry2.* Eine analoge Kontrolle für *R. eutropha* H16 lag nicht vor. Es konnte keine spezifische Bindungsstelle von PhaM an der DNA festgestellt werden.

Tabelle Anhang 6-1: Proteomanalyse des pull down-Experiments mit PhaM-eYFP als Köderprotein aus *R. eutropha* H16 WT. Die Zellen wurden in NB-Medium mit 0,2 % Na-Glukonat angezogen und nach 4 Stunden während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Mit den hervorgehobenen Treffern wurden im Anschluss BACTH-Experimente durchgeführt. Es wurde ein *treshold* von 6 Peptidfragmenten gesetzt (Ausnahme H16_A3115). Bei den gefundenen Peptidfragmenten handelte es sich um spezifische Fragmente, die mit dem Köderprotein PhaM-eYFP gefunden wurden. In der ersten Spalte ist der Anteil der identifizierten, verschiedenen Peptidfragmente von allen möglichen Fragmenten, die eine Trypsinspaltung hervorrufen kann, angegeben. Die *in silico* Trypsinspaltung wurde mit dem Bioinformatiktool PeptideMass von ExPASy durchgeführt (Peptide mit einer Masse über 500 Dalton wurden angezeigt).

Peptide	Locus_tag	Identifiziertes Protein	MW
33 von 71	H16_A2306	translation initiation factor IF-2	104 kDa
30 von 51	H16_A1045	polynucleotide phosphorylase/polyadenylase	78 kDa
25 von 64	H16_A2580	ribonuclease G and E	112 kDa
23 von 64	H16_A1374	pyruvate dehydrogenase subunit E1	100 kDa
20 von 43	H16_A1482	trigger factor	51 kDa
19 von 42	H16_A2294	GTP-binding elongation factor family protein	67 kDa
18 von 53	H16_A3492	elongation factor G	89 kDa
18 von 72	H16_A3264	preprotein translocase subunit SecA	105 kDa
18 von 64	H16_A1485	ATP-dependent Lon protease	89 kDa
16 von 58	H16_A3052	ATP-dependent protease Clp, ATPase subunit	84 kDa
16 von 35	H16_A2560	trypsin-like serine protease	52 kDa
16 von 56	H16_A2699	ATP-dependent RNA helicase	69 kDa
15 von 53	H16_A3436	pili assembly protein PilQ	76 kDa
14 von 24	H16_A3268	cell division protein FtsZ	42 kDa
14 von 43	H16_A2630	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	65 kDa
13 von 14	H16_A1381	PhaP1	20 kDa
13 von 36	H16_A0917	ATPase	54 kDa
12 von 29	H16_A0982	flp pilus assembly protein secretin CpaC	50 kDa
12 von 35	H16_A1437	Poly(3-hydroxybutyrate) polymerase	64 kDa
11 von 28	H16_A2905	mannose-1-phosphate guanylyltransferase	53 kDa
11 von 34	H16_A3081	Poly(A) polymerase	58 kDa
11 von 41	H16_A2972	outer membrane cobalamin receptor, TonB dependent(BtuB)	67 kDa
11 von 23	H16_A3645	chromosome partitioning protein ParB	33 kDa
11 von 46	H16_A3360	ABC transporter ATP-binding protein	62 kDa
10 von 23	H16_A2611	acetyl-CoA carboxylase subunit beta	32 kDa
9 von 27	H16_A1188	phosphopyruvate hydratase	46 kDa
9 von 61	H16_A1429	transcriptional accessory protein	85 kDa
9 von 14	H16_A3502	transcription antitermination protein NusG	22 kDa
9 von 37	H16_A0802	UDP-glucose 6-dehydrogenase	50 kDa
9 von 49	H16_A0754	DNA segregation ATPase Ftsk	84 kDa
8 von 12	H16_A3043	response regulator	23 kDa
8 von 23	H16_A1223	acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit alpha	36 kDa
7 von 13	H16_A0141	PhaM	27 kDa
7 von 13	H16_A3641	F0F1 ATP synthase subunit B	17 kDa
7 von 45	H16_A0983	flp pilus assembly ATPase CpaF	67 kDa
7 von 43	H16_A0531	A I P-dependent RNA helicase	56 kDa
6 von 27	H16_A0195	G3E family GTPase	41 kDa
6 von 39	H16_A2558	GTP-binding protein LepA	66 kDa
6 von 30	H16_A1484	ATP-dependent protease ATP-binding subunit CIpX	47 kDa
6 von 33	H16_A3241	signal recognition particle G [Pase	50 kDa
6 von 38	H16_A2030	inosine 5'-monophosphate dehydrogenase	52 kDa
6 von 27	H16_A3269	cell division protein FtsA	44 kDa
6 von 44	H16_A0331	C-terminal processing peptidase-3, periplasmic	58 kDa
4 von 38	H16_A3115	preprotein translocase subunit SecD	67 kDa

Tabelle Anhang 6-2: Proteomanalyse des pull down-Experiments mit eYFP-PhaM als Köderprotein aus *R. eutropha* H16 △*phaC1*. Die Zellen wurden in NB-Medium mit 0,2 % Na-Glukonat angezogen und nach 4 Stunden während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Mit den hervorgehobenen Treffern wurden im Anschluss BACTH-Experimente durchgeführt. Es wurde ein *treshold* von 6 Peptidfragmenten gesetzt (Ausnahme H16_B1085). Bei den gefundenen Peptidfragmenten handelte es sich um spezifische Fragmente, die mit dem Köderprotein PhaM-eYFP gefunden wurden. In der ersten Spalte ist der Anteil der identifizierten, verschiedenen Peptidfragmente von allen möglichen Fragmenten, die eine Trypsinspaltung hervorrufen kann, angegeben. Die *in silico* Trypsinspaltung wurde mit dem Bioinformatiktool PeptideMass von ExPASy durchgeführt (Peptide mit einer Masse über 500 Dalton wurden angezeigt).

Peptide	Locus Tag	Identifiziertes Protein	MW
22 von 44	PHG252	nitrous-oxide reductase	70 kDa
14 von 28	H16_A2640	hypothetical protein H16_A2640	44 kDa
11 von 50	H16_A2437	polyphosphate kinase	78 kDa
9 von 13	H16_A0141	PhaM	27 kDa
6 von 27	H16_A1188	phosphopyruvate hydratase	46 kDa
6 von 84	H16_B1980	2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase	129 kDa
6 von 15	H16_A2318	cbb3-type cytochrome oxidase, monoheme subunit II	25 kDa
6 von 48	PHG240	anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase	76 kDa
2 von 43	H16_B1085	signal transduction histidine kinase	65 kDa



Abbildung Anhang 5: *BACTH*-Plattentest auf MacConkey-Agar von einigen ausgewählten *pull down*-Treffern und PhaM. Für die Untersuchung der Interaktion von einigen ausgewählten *pull down*-Treffern mit PhaM wurde ein Tropftest auf MacConkey-Agarplatten mit zugesetzter Laktose, IPTG, Ampicillin und Kanamycin durchgeführt. Dafür wurden Ko-Transformanten von *E. coli* BTH101 Stämmen, die die entsprechenden T18- sowie T25-Fusionkonstrukte exprimierten, auf die Platten getropft und bei 30°C für 24 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Zip-Vektoren (Zip) und als Negativkontrolle wurden Leervektoren (-) verwendet. Blau-gefärbte Kolonien zeigen eine positive Interaktion wohingegen eine Weißfärbung gegen eine Interaktion der Fusionspartner spricht.



Abbildung Anhang 6: Größenausschlusschromatographie von PhaM. Die Größenausschlusschromatographie von PhaM erfolgte mit Hilfe einer SuperdexTM 200 HiLoadTM 16/60 Säule. Als Puffer wurde 10 mM Tris-HCI, 250 mM NaCI, pH 8 verwendet. Dargestellt ist ein Elutionsprofil von PhaM mit mehreren charakteristischen Peaks. Der größte Peak zwischen 40 und 60 wurde für die weiterführenden Experimente gesammelt und aufkonzentriert.



Abbildung Anhang 7: Größenausschlusschromatographie von PhaM mit und ohne ATP. Die Größenausschlusschromatographie von PhaM erfolgte mit Hilfe einer SuperdexTM 200 HiLoadTM 16/60 Säule. Als Puffer wurde 10 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 8 verwendet. Für die Kalibrierung der Säule wurden folgende Standards eingesetzt: Thyroglobin (670 kDa), β -Amylase (200 kDa), BSA (66 kDa) und Anhydrase (29 kDa). Vor Auftragen des Proteins PhaM (rund 1,5 mg/ml) wurde es für 30 Minuten mit 1 mM ATP vorinkubiert

Anhang

Tabelle Anhang 6-3: Ergebnisse der Proteomanalyse des *pull down*-Experiments. Als Köderproteine dienten PhaM-eYFP aus *R. eutropha* H16 Wildtyp und eYFP-PhaM aus *R. eutropha* H16 *AphaC1*. Als Kontrolle wurden *R. eutropha* H16 Zellen mit dem Plasmid pBBR1MCS2::P_{phaC}-*eyfp* verwendet. Die Zellen wurden in NB-Medium mit 0,2 % Na-Glukonat angezogen und nach 4 Stunden während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Das Köderprotein PhaM-eYFP wurde als Referenzpunkt gesetzt und entsprechend der gefundenen Peptidfragmente sortiert.

	Molekular		eyfp-		∆phaC
Locus tag	gewicht	Protein	Kontrolle	phaM-eyfp	eyfp-phaM
H16_A0706	57 kDa	chaperonin GroEL	41	45	27
H16_A2306	104 kDa	translation initiation factor IF-2	3	33	0
H16_A3496	156 kDa	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	21	32	15
H16_A1045	78 kDa	polynucleotide phosphorylase/polyadenylase	6	30	12
H16_A0798	62 kDa	30S ribosomal protein S1	20	30	5
H16_A3639	55 kDa	F0F1 ATP synthase subunit alpha	27	29	23
H16_A3089	70 kDa	molecular chaperone DnaK	7	27	34
H16_A3497	153 kDa	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	16	25	4
H16_A2580	112 kDa	ribonuclease G and E	2	25	0
H16_A1374	100 kDa	pyruvate dehydrogenase subunit E1	0	23	1
H16_A3491	43 kDa	elongation factor Tu	14	21	1
H16_B2360	45 kDa	flagellin	16	20	10
H16_A1482	51 kDa	trigger factor	2	20	0
H16_A3637	51 kDa	F0F1 ATP synthase subunit beta	12	19	18
H16_A2294	67 kDa	GTP-binding elongation factor family protein	2	19	0
H16_A3492	77 kDa	elongation factor G	7	18	0
H16_A1485	89 kDa	ATP-dependent Lon protease	2	18	6
H16_A3264	105 kDa	preprotein translocase subunit SecA	3	18	0
H16_A3235	108 kDa	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	4	17	1
H16_A3500	24 kDa	50S ribosomal protein L1	4	17	9
H16_A1377	62 kDa	dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) component ofpyruvate dehydrogenase	2	17	0
H16_A0083	39 kDa	outer membrane protein (porin)	12	16	11
H16_A2055	27 kDa	30S ribosomal protein S2	19	16	6
H16_A0200	49 kDa	ATP-dependent protease ATP-binding subunit HsIU	10	16	0
H16_A3052	84 kDa	ATP-dependent protease Clp, ATPase subunit	0	16	0
H16_A2699	69 kDa	ATP-dependent RNA helicase	0	16	0
H16_A2560	52 kDa	trypsin-like serine protease	0	16	0
H16_A3436	76 kDa	pili assembly protein PilQ	0	15	0
H16_A2630	65 kDa	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	0	14	2
H16_A3472	20 kDa	50S ribosomal protein L5	9	14	8

Anh	ang
-----	-----

Locus tag	Molekular gewicht	Protein	eyfp- Kontrolle	phaM-eyfp	∆phaC eyfp-phaM
H16_A3469	19 kDa	50S ribosomal protein L6	7	14	11
H16_A2054	31 kDa	elongation factor Ts	4	14	0
H16_B0568	93 kDa	bifunctional aconitate hydratase 2/2-methylisocitrate dehydratase	2	14	0
H16_A3268	42 kDa	cell division protein FtsZ	0	14	0
H16_A0917	54 kDa	ATPase	6	13	0
H16_A1381	20 kDa	phasin (PHA-granule associated protein)	2	13	2
H16_A3484	23 kDa	50S ribosomal protein L3	4	13	8
H16_A0372	34 kDa	ribose-phosphate pyrophosphokinase	3	13	0
H16_A1437	64 kDa	Poly(3-hydroxybutyrate) polymerase	16	12	8
H16_A3467	18 kDa	30S ribosomal protein S5	10	12	0
H16_A3458	36 kDa	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	7	12	0
H16_A3499	18 kDa	50S ribosomal protein L10	2	12	9
H16_A3459	23 kDa	30S ribosomal protein S4	8	12	3
H16_A0982	50 kDa	flp pilus assembly protein secretin CpaC	0	12	0
H16_A0471	47 kDa	glutamate dehydrogenase	11	11	6
H16_B2531	49 kDa	argininosuccinate synthase	7	11	0
H16_A0788	23 kDa	outer membrane protein or related peptidoglycan-associated (lipo)protein	6	11	3
H16_A0113	37 kDa	rod shape-determining protein MreB	3	11	4
H16_A3088	41 kDa	chaperone protein DnaJ	7	11	4
H16_A3474	13 kDa	50S ribosomal protein L14	3	11	2
H16_A3483	23 kDa	50S ribosomal protein L4	3	11	7
H16_A2325	106 kDa	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	6	11	0
H16_A2972	67 kDa	outer membrane cobalamin receptor, TonB dependent(BtuB)	2	11	4
H16_A2324	43 kDa	dihydrolipoamide succinyltransferase	4	11	0
H16_A3081	58 kDa	Poly(A) polymerase	0	11	0
H16_A2905	53 kDa	mannose-1-phosphate guanylyltransferase	1	11	0
H16_A3360	62 kDa	ABC transporter ATP-binding protein	0	11	0
H16_A3645	33 kDa	chromosome partitioning protein ParB	0	11	0
H16_A2276	16 kDa	50S ribosomal protein L9	3	10	4
H16_A2629	27 kDa	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	3	10	2
H16_A2611	32 kDa	acetyl-CoA carboxylase subunit beta	2	10	0
H16_A1375	57 kDa	dihydrolipoamide acetyltransferase	3	10	0
H16_A3481	30 kDa	50S ribosomal protein L2	0	10	3
An	hang				
----	------				
----	------				

Locus tag	Molekular gewicht	Protein	eyfp- Kontrolle	phaM-evfp	∆phaC evfp-phaM
H16 A3402	41 kDa	outer membrane protein (porin)	12	9	5
H16 A1460	20 kDa	peroxiredoxin	8	9	5
H16 A0085	29 kDa	cell division inhibitor MinD	4	9	2
H16_A3182	75 kDa	outer membrane receptor, TonB dependent	2	9	0
H16_A3478	30 kDa	30S ribosomal protein S3	17	9	0
H16_A3502	22 kDa	transcription antitermination protein NusG	1	9	0
H16_A1429	85 kDa	transcriptional accessory protein	0	9	0
H16_A1188	46 kDa	phosphopyruvate hydratase	0	9	6
H16_A0802	50 kDa	UDP-glucose 6-dehydrogenase	0	9	0
H16_A3688	42 kDa	TRAP-type transporter, periplasmic component	6	8	4
H16_A2829	49 kDa	translocation protein TolB	0	8	2
H16_A3043	23 kDa	response regulator	0	8	0
H16_A0302	44 kDa	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (serine-type)	0	8	0
H16_A3490	12 kDa	30S ribosomal protein S10	6	8	0
H16_B0091	53 kDa	Iron-sulfur cluster-binding protein	1	8	4
H16_A1212	42 kDa	hypothetical protein H16_A1212	3	8	0
H16_A0547	41 kDa	succinyl-CoA synthetase subunit beta	0	8	0
H16_B0093	28 kDa	Fe-S oxidoreductase	0	8	0
H16_A1223	36 kDa	acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit alpha	0	8	0
H16_A0003	93 kDa	DNA gyrase subunit B	0	8	0
H16_A2717	57 kDa	ATP-dependent helicase	0	8	0
H16_A1151	43 kDa	aromatic amino acid aminotransferase	0	8	0
H16_A0342	45 kDa	aa3-type cytochrome oxidase, subunit II	0	8	0
H16_A0367	18 kDa	phosphopantetheine adenylyltransferase	3	8	0
H16_A1499	71 kDa	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0	7	6
PHG027	23 kDa	fructose-1,6-bisphosphate	3	7	2
H16_A0141	27 kDa	hypothetical protein H16_A0141	0	7	9
H16_A1205	45 kDa	uncharacterized lipoprotein	3	7	0
H16_A3641	17 kDa	F0F1 ATP synthase subunit B	0	7	3
H16_A2323	50 kDa	dihydrolipoamide dehydrogenase	0	7	0
H16_A3493	18 kDa	30S ribosomal protein S7	2	7	0
H16_A3494	14 kDa	30S ribosomal protein S12	0	7	1
H16_A0983	67 kDa	flp pilus assembly ATPase CpaF	0	7	0

An	hang
----	------

Locus tag	Molekular gewicht	Protein	eyfp- Kontrolle	phaM-evfp	∆phaC evfp-phaM
H16 A1037		ketol-acid reductoisomerase	0	7	0
H16 A1118	34 kDa	MoxR-like ATPase	2	7	0
H16_A0531	56 kDa	ATP-dependent RNA helicase	0	7	0
H16_A0990	33 kDa	outer membrane protein and related peptidoglycan-associated (lipo)proteins	0	6	5
H16_A1324	62 kDa	electron transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase	0	6	2
H16_A2410	28 kDa	enoyl-(acyl carrier protein) reductase	4	6	0
H16_A2249	96 kDa	ATP-dependent protease Clp, ATPase subunit	3	6	0
H16_A0815	31 kDa	electron transfer flavoprotein alpha subunit	7	6	0
H16_A0195	41 kDa	G3E family GTPase	2	6	0
H16_A2038	87 kDa	phosphoenolpyruvate synthase	0	6	0
H16_B0090	59 kDa	L-lactate permease	0	6	0
H16_A2654	71 kDa	heat shock protein 90	4	6	0
H16_A2558	66 kDa	GTP-binding protein LepA	0	6	0
H16_A2307	55 kDa	transcription elongation factor NusA	0	6	0
H16_A0453	68 kDa	aspartyl-tRNA synthetase	0	6	0
H16_A1484	47 kDa	ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpX	0	6	0
H16_A3269	44 kDa	cell division protein FtsA	0	6	0
H16_A3501	15 kDa	50S ribosomal protein L11	2	6	0
H16_A3241	50 kDa	signal recognition particle GTPase	0	6	0
H16_A0331	58 kDa	C-terminal processing peptidase-3, periplasmic	0	6	0
H16_A2030	52 kDa	inosine 5'-monophosphate dehydrogenase	0	6	0
H16_A3077	37 kDa	phosphoribosylaminoimidazole synthetase	0	6	0
H16_A2567	26 kDa	3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	0	6	0
H16_A2221	28 kDa	Zn-dependent protease with chaperone function	0	5	5
PHG342	37 kDa	hypothetical protein PHG342	3	5	3
H16_A1041	56 kDa	2-isopropylmalate synthase	0	5	0
H16_A2900	39 kDa	GDP-D-mannose 4,6 dehydratase	2	5	0
H16_A3744	61 kDa	inner membrane protein translocase component YidC	0	5	4
H16_A0897	14 kDa	50S ribosomal protein L19	0	5	4
H16_B0092	24 kDa	hypothetical protein H16_B0092	0	5	2
H16_A2266	47 kDa	homoserine dehydrogenase	0	5	0
H16_A3473	11 kDa	50S ribosomal protein L24	0	5	2
H16_A0482	16 kDa	50S ribosomal protein L13	2	5	1

An	hang
----	------

Locus tag	Molekular gewicht	Protein	eyfp- Kontrolle	phaM-evfp	∆phaC evfp-phaM
H16 A1053	48 kDa	NADH dehvdrogenase subunit D	0	5	0
H16 A3034	9 kDa	50S ribosomal protein L28	3	5	0
H16 A1056	84 kDa	NADH dehvdrogenase subunit G	0	5	0
H16 A0371	22 kDa	50S ribosomal protein L25/general stress protein Ctc	0	5	3
H16 A2395	46 kDa	transcription termination factor Rho	0	5	0
H16 A3272	50 kDa	UDP-N-acetylmuramateL-alanine ligase	0	5	0
H16_A3468	13 kDa	50S ribosomal protein L18	2	5	0
H16_A0814	27 kDa	electron transfer flavoprotein beta-subunit	2	5	0
H16_A1124	51 kDa	microcin-processing peptidase 2	0	5	0
H16_A1150	47 kDa	intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase	0	5	0
H16_A2047	89 kDa	outer membrane protein, surface antigen OMA87	0	5	0
H16_A3030	41 kDa	ABC transporter periplasmic protein	10	4	2
H16_A3310	28 kDa	ABC transporter periplasmic protein	0	4	3
H16_B1248	16 kDa	DNA-binding protein, histone-like	4	4	0
H16_A0084	9 kDa	cell division topological specificity factor MinE	0	4	0
H16_A0441	148 kDa	dehydrogenase	0	4	1
H16_A2640	44 kDa	hypothetical protein H16_A2640	0	4	14
H16_A3640	19 kDa	F0F1 ATP synthase subunit delta	0	4	0
H16_A3333	39 kDa	GTP-dependent nucleic acid-binding protein EngD	2	4	0
H16_A1071	35 kDa	bo3-type quinol oxidase, subunit II	0	4	0
H16_A0981	36 kDa	flp pilus assembly protein CpaB	0	4	0
H16_A2549	21 kDa	elongation factor P	0	4	0
H16_A2362	24 kDa	transmembrane protein	0	4	2
H16_A2274	23 kDa	phosphate transport regulator	0	4	0
H16_A1185	61 kDa	CTP synthetase	2	4	0
H16_A1225	45 kDa	aspartate kinase	0	4	0
H16_A3638	32 kDa	F0F1 ATP synthase subunit gamma	3	4	0
H16_A2058	66 kDa	16S rRNA uridine-516 pseudouridylate synthase	0	4	0
H16_A3470	14 kDa	30S ribosomal protein S8	0	4	1
H16_A0001	65 kDa	chromosomal replication initiation protein	0	4	0
H16_A0391	35 kDa	sugar phosphate isomerase involved in capsule formation	0	4	0
H16_A3396	28 kDa	ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome c1	0	4	0
H16_B0004	37 kDa	chromosome partitioning protein ParB	0	4	0

Anha	ang
------	-----

Locus tag	Molekular gewicht	Protein	eyfp- Kontrolle	phaM-evfp	∆phaC evfp-phaM
H16 A1445	41 kDa	beta-ketothiolase	1	4	0
H16 A2921	112 kDa	phosphoenolpyruvate carboxylase	0	4	0
H16 A3115	67 kDa	preprotein translocase subunit SecD	0	4	0
H16_A0935	41 kDa	ABC-type transporter, periplasmic component	0	3	2
H16_A3729	43 kDa	acriflavin resistance protein A	0	3	0
H16_B2240	35 kDa	chemotaxis signal transduction protein	2	3	0
H16_A2944	22 kDa	outer membrane protein peptidoglycan-associated(lipo)proteins	0	3	0
H16_A1459	18 kDa	hypothetical protein H16_A1459	1	3	0
H16_B1934	16 kDa	hypothetical protein H16_B1934	7	3	5
H16_A2053	25 kDa	uridylate kinase	0	3	0
H16_A2394	12 kDa	thioredoxin	2	3	0
H16_A2769	95 kDa	alanyl-tRNA synthetase	0	3	0
H16_A3234	45 kDa	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	0	3	0
H16_A2725	91 kDa	RNA polymerase sigma factor RpoD	0	3	0
H16_A3094	54 kDa	glycolate oxidase subunit GlcD	0	3	0
H16_A3397	53 kDa	ubiquinol-cytochrome-c reductase, cytochrome b	2	3	3
H16_A2335	52 kDa	glutamine synthetase	0	3	2
H16_A3252	11 kDa	50S ribosomal protein L21	0	3	1
H16_A0139	34 kDa	hypothetical protein H16_A0139	0	3	0
H16_A2751	107 kDa	valyI-tRNA synthetase	0	3	0
H16_A3164	26 kDa	short chain dehydrogenase	0	3	0
H16_A3643	35 kDa	F0F1 ATP synthase subunit A	0	3	0
H16_A0544	38 kDa	recombinase A	0	3	0
H16_A3460	14 kDa	30S ribosomal protein S11	4	3	0
H16_A0483	14 kDa	30S ribosomal protein S9	2	3	0
H16_A0952	35 kDa	hypothetical protein H16_A0952	0	3	0
H16_A2277	11 kDa	30S ribosomal protein S18	3	3	0
H16_A3546	45 kDa	hypothetical protein H16_A3546	0	3	0
H16_A2637	19 kDa	hypothetical protein H16_A2637	0	3	0
H16_A1214	30 kDa	inositol monophosphatase	0	3	0
H16_A1397	29 kDa	ABC-type transporter, ATPase component	0	3	0
H16_A2557	34 kDa	signal peptidase I	0	3	0
H16_A2669	73 kDa	DNA topoisomerase IV subunit B	0	3	0

Anhang

Locus tag	Molekular gewicht	Protein	eyfp- Kontrolle	phaM-eyfp	∆phaC eyfp-phaM
H16_A3143	16 kDa	FUR family transcriptional regulator	0	3	0
H16_A2447	69 kDa	FtsH endopeptidase	0	3	0
H16_A0512	54 kDa	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase c)protein	0	3	0
H16_A0894	9 kDa	30S ribosomal protein S16	0	3	0
H16_A2752	33 kDa	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0	3	0
H16_A0333	14 kDa	rhodanese-related sulfurtransferase	0	3	0
H16_A0454	33 kDa	hypothetical protein H16_A0454	0	3	0
H16_A0803	34 kDa	D-beta-D-heptose 7-phophosphate kinase	0	3	0
H16_A2275	51 kDa	replicative DNA helicase	0	3	0
H16_A2397	10 kDa	50S ribosomal protein L31 type B	0	3	0
H16_A3172	50 kDa	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit	0	3	0
H16_A3441	84 kDa	periplasmic multimodular transpeptidase/transglycosylase	0	3	0
H16_A3465	15 kDa	50S ribosomal protein L15	1	3	0
H16_A3482	12 kDa	50S ribosomal protein L23	0	3	0
H16_B0159	51 kDa	trypsin-like serine protease	0	3	0
H16_B2131	64 kDa	choline dehydrogenase	0	3	0
H16_A2828	18 kDa	outer membrane protein or related peptidoglycan-associated (lipo)protein	0	2	0
H16_B2304	21 kDa	lipoprotein	2	2	2
H16_A0057	39 kDa	hypothetical protein H16_A0057	0	2	0
H16_A0335	19 kDa	preprotein translocase subunit SecB	0	2	0
H16_A0495	20 kDa	hypothetical protein H16_A0495	4	2	2
H16_A3341	10 kDa	hypothetical protein H16_A3341	0	2	0
PHG287	16 kDa	histone-like protein	3	2	0
H16_A3636	15 kDa	F0F1 ATP synthase subunit epsilon	0	2	1
H16_B0186	44 kDa	flp pilus assembly ATPase	0	2	0
H16_A0353	22 kDa	Sco1/SenC family cytochrome oxidase assembly protein	0	2	0
H16_A2357	50 kDa	membrane protease subunit stomatin/prohibitin-like protein	0	2	0
H16_A1072	73 kDa	bo3-type quinol oxidase, subunit I	0	2	0
H16_A1073	24 kDa	bo3-type quinol oxidase, subunit III	0	2	0
H16_A3614	30 kDa	cytochrome c555	0	2	0
H16_A3684	10 kDa	HU family DNA-binding protein	0	2	0
H16_A3498	13 kDa	50S ribosomal protein L7/L12	0	2	2
H16_A0817	47 kDa	D-amino acid dehydrogenase small subunit	0	2	1

An	hang
----	------

Locus tag	Molekular gewicht	Protein	eyfp- Kontrolle	phaM-eyfp	∆phaC eyfp-phaM
H16 A0323	35 kDa	glutathione synthetase	0	2	0
H16 A2279	14 kDa	30S ribosomal protein S6	0	2	0
H16_A2626	39 kDa	ABC transporter periplasmic protein	0	2	0
H16_A3475	11 kDa	30S ribosomal protein S17	0	2	0
H16_B0295	36 kDa	selenophosphate synthase	0	2	0
H16_A0160	26 kDa	cell division protein ftsN	0	2	0
H16_A0260	35 kDa	ATPase	0	2	0
H16_A0402	19 kDa	single-stranded DNA-binding protein	0	2	0
H16_A1051	18 kDa	NADH dehydrogenase subunit B	0	2	0
H16_A1061	76 kDa	NADH dehydrogenase subunit L	0	2	0
H16_A2309	66 kDa	16S rRNA uridine-516 pseudouridylate synthase family protein	1	2	0
H16_A2622	25 kDa	ABC transporter ATPase	0	2	0
H16_A2662	43 kDa	MocR family transcriptional regulator	0	2	0
H16_A2901	112 kDa	glycosyltransferase	0	2	0
H16_A2903	46 kDa	ABC-type transporter, ATPase component	0	2	0
H16_A3401	42 kDa	trypsin-like serine protease	0	2	0
H16_A3479	12 kDa	50S ribosomal protein L22	0	2	0
H16_A2368	15 kDa	nucleoside diphosphate kinase	0	2	0
H16_A3114	11 kDa	preprotein translocase subunit YajC	0	2	0
H16_A3464	48 kDa	preprotein translocase subunit SecY	0	2	0
H16_A1919	50 kDa	lactaldehyde dehydrogenase	12	2	0
H16_A1372	23 kDa	response regulator	1	2	0
H16_A0243	29 kDa	hydroxymethylpyrimidine/phosphomethylpyrimidine kinase	0	2	0
H16_A2634	35 kDa	malate dehydrogenase	0	2	0
H16_A1137	20 kDa	molecular chaperone GrpE	0	2	0
PHG375	37 kDa	partitioning protein	0	2	0
H16_A1463	27 kDa	osmolarity response regulator	0	2	0
H16_A3104	38 kDa	Type IV pilus twitching motility protein PilT	0	2	0
H16_A1423	16 kDa	HSP20 family molecular chaperone	5	2	0
H16_B0187	48 kDa	flp pilus assembly ATPase CpaF	0	2	0
H16_A1424	15 kDa	HSP20 family molecular chaperone	6	2	0
H16_A2267	46 kDa	aminotransferase AlaT	0	2	0
H16_A2349	101 kDa	exoribonuclease R	0	2	0

An	hang
----	------

Locus tag	Molekular	Protein	eyfp- Kontrolle	nhaM-evfn	∆phaC evfp-phaM
PHG168	71 kDa	hypothetical protein PHG168	0	2	0
H16 A0202	22 kDa	response regulator	0	2	0
H16 A0230	42 kDa	S-adenosylmethionine synthetase	0	2	0
H16 A0231	36 kDa	hypothetical protein H16 A0231	0	2	0
H16 A0475	27 kDa	ABC transporter ATPase	0	2	0
H16_A0568	38 kDa	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	0	2	0
H16_A0774	92 kDa	cyanophycin synthetase	0	2	0
H16_A0904	63 kDa	ABC transporter ATPase/permease	0	2	0
H16_A0912	26 kDa	hypothetical protein H16_A0912	0	2	0
H16_A0977	12 kDa	hypothetical protein H16_A0977	0	2	0
H16_A1004	38 kDa	outer membrane protein (porin)	0	2	0
H16_A1142	21 kDa	hypothetical protein H16_A1142	0	2	0
H16_A1218	18 kDa	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0	2	0
H16_A1342	14 kDa	50S ribosomal protein L20	0	2	0
H16_A2356	34 kDa	membrane protease subunit stomatin/prohibitin-like protein	0	2	0
H16_A2360	50 kDa	GTP-binding protein EngA	0	2	0
H16_A2365	33 kDa	hypothetical protein H16_A2365	0	2	0
H16_A2632	15 kDa	succinate dehydrogenase (cytochrome b subunit)	0	2	0
H16_A2877	24 kDa	protein-L-isoaspartate carboxylmethyltransferase	0	2	0
H16_A2990	54 kDa	leucyl aminopeptidase	0	2	0
H16_A3175	17 kDa	thiol peroxidase	0	2	0
H16_A3189	33 kDa	recombination associated protein	0	2	0
H16_A3417	24 kDa	ATP phosphoribosyltransferase catalytic subunit	0	2	0
H16_A3457	15 kDa	50S ribosomal protein L17	0	2	0
H16_A3471	12 kDa	30S ribosomal protein S14	9	2	0
H16_A3646	28 kDa	ATPase involved in chromosome partitioning	0	2	0
H16_A3704	98 kDa	DNA topoisomerase III	0	2	0
H16_B0520	111 kDa	hypothetical protein H16_B0520	0	2	0
H16_B2202	21 kDa	hypothetical protein H16_B2202	0	2	0
H16_B2545	31 kDa	IcIR family transcriptional regulator	0	2	0
H16_B1492	12 kDa	hypothetical protein H16_B1492	0	1	0
H16_A3096	39 kDa	glycolate oxidase FAD binding subunit	0	1	0
H16_A0705	10 kDa	co-chaperonin GroES	0	1	0

/

H16 A1626 73 kDa DNA-directed RNA polymerase sigma subunit (RpoD) 0 1 0 H16_A3461 14 kDa 30S ribosomal protein S13 0 1 0 H16_B0157 15 kDa organic hydropenexide resistance protein 0 1 0 H16_A0472 33 kDa ABC transporter periplasmic protein 0 1 0 H16_A0543 31 kDa succinyl-CoA synthetase subunit alpha 1 1 0 H16_A1158 45 kDa cysteine desulfurase 0 1 0 H16_A1159 36 kDa heat shock protein 33 (HSP33) 0 1 0 H16_A7310 36 kDa heat shock protein 33 (HSP33) 0 1 0 H16_A7316 36 kDa prestrive-suprotein 34 (HSP33) 0 1 0 H16_A7316 36 kDa preptrive-suprotein 34 (HSP33) 0 1 0 H16_A7387 60 kDa preptrive cS53 0 1 0 H16_A7387 26 kDa preptrive cS53 0 1 0 H16_B16877 31 kDa postr	Locus tag	Molekular gewicht	Protein	eyfp- Kontrolle	phaM-eyfp	∆phaC eyfp-phaM
H16_A3461 14 kDa 305 ribosomal protein S13 0 1 0 H16_B0157 15 kDa organic hydroperoxide resistance protein 0 1 0 H16_A172 33 kDa ABC transporter periplasmic protein 0 1 0 H16_A172 33 kDa ABC transporter periplasmic protein 0 1 0 H16_A1158 45 kDa oxidative stress-inducible genes activator 0 1 0 H16_A1158 45 kDa cysteine desulfurase 0 1 0 H16_A1191 36 kDa beat shock protein 33 (HSP33) 0 1 0 H16_A3140 40 kDa glutaminase-asparaginase (amidohydrolase) 0 1 0 H16_A3222 43 kDa ATPase 0 1 0 1 0 H16_A3345 23 kDa ibiquinol-cytochrome creductase, iron-sulfur subunit (Rieske Fe-S protein) 0 1 0 H16_A3451 23 kDa eytochrome c553 0 1 0 H16_B2571 54 kDa peptide chain release factor 3 0 1 0	H16_A1626	73 kDa	DNA-directed RNA polymerase sigma subunit (RpoD)	0	1	0
H16, B0157 15 kDa organic hydroperoxide resistance protein 0 1 0 H16, A0472 33 kDa ABC transporter periplasmic protein 0 1 0 H16, A3110 35 kDa oxidative stress-inducible genes activator 0 1 0 H16, A0548 31 kDa succinyl-CoA synthetase subunit alpha 1 1 0 H16, A1113 45 kDa cysteine desulfurase 0 1 0 H16, A1114 36 kDa heat shock protein 33 (HSP33) 0 1 0 H16, A2122 43 kDa ATPase 0 1 0 H16, A3232 69 kDa 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 0 1 0 H16, A3338 22 kDa ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit (Rieske Fe-S protein) 0 1 0 H16, A347 23 kDa cytochrome c553 0 1 0 1 0 H16, B2071 14 kDa hypothetical protein H16_B2071 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	H16_A3461	14 kDa	30S ribosomal protein S13	0	1	0
H16_A0472 33 kDa ABC transporter periplasmic protein 0 1 0 H16_A0543 33 kDa oxidative stress-inducible genes activator 0 1 0 H16_A0543 31 kDa succiny-LCoA synthetase subunit alpha 1 1 0 H16_A1191 36 kDa cysteine desulfurase 0 1 0 H16_A1191 36 kDa heat shock protein 33 (HSP33) 0 1 0 H16_A1222 43 kDa ATPase 0 1 0 H16_A3116 36 kDa iscitrate dehydrogenase 0 1 0 H16_A3308 22 kDa ubiquinol-cytochrome creductase, iron-sulfur subunit (Rieske Fe-S protein) 0 1 0 H16_A3477 16 kDa 50S ribosomal protein L16 3 1 0 1 0 H16_B237 14 kDa hypothetical protein H16_B2071 0 1 0	H16_B0157	15 kDa	organic hydroperoxide resistance protein	0	1	0
H16_A3110 35 kDa oxidative stress-inducible genes activator 0 1 0 H16_A0548 31 kDa succinyl-CoA synthetase subunit lapha 1 1 0 H16_A1158 45 kDa ocysteine desulfurase 0 1 0 H16_A1191 36 kDa heat shock protein 33 (HSP33) 0 1 0 H16_A222 43 kDa ATPase 0 1 0 H16_A2322 69 kDa 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 0 1 0 H16_A3151 36 kDa preprotein translocase subunit SecF 0 1 0 H16_A3451 23 kDa otytochrome c reductase, iron-sulfur subunit (Rieske Fe-S protein) 0 1 0 H16_A3451 23 kDa peptide chain release factor 3 1 0 1 0 H16_B2071 141 kDa hypothetical protein L16 3 1 0	H16_A0472	33 kDa	ABC transporter periplasmic protein	0	1	0
H16_A0548 31 kDa succinyl-CoA synthetase subunit alpha 1 1 0 H16_A1158 45 kDa cysteine desulfurase 0 1 0 H16_A11910 36 kDa glutaminase-asparaginase (amidohydrolase) 0 1 0 H16_A2322 43 kDa ATPase 0 1 0 H16_A2326 49 kDa isocitrate dehydrogenase 0 1 0 H16_A33056 46 kDa isocitrate dehydrogenase 0 1 0 H16_A3316 36 kDa preprotein translocase subunit SecF 0 1 0 H16_A3477 16 kDa 505 ribosomal protein L16 3 1 0 H16_B2571 59 kDa peptide chain release factor 3 0 1 0 H16_B2671 54 kDa non-ribosomal protein L16 0 0 0 0 H16_B1803 54 kDa non-ribosomal peptide synthetase 9 0 22 0 0 H16_B2637 59 kDa nethyl-accepting chemotaxis protein 0 0 0 0 0 <	H16_A3110	35 kDa	oxidative stress-inducible genes activator	0	1	0
H16_A1158 45 kDa cysteine desulfurase 0 1 0 H16_A1191 36 kDa heat shock protein 33 (HSP33) 0 1 0 H16_A1191 40 kDa ATPase 0 1 0 H16_A2322 43 kDa ATPase 0 1 0 H16_A2322 43 kDa ATPase 0 1 0 H16_A3056 46 kDa isocitrate dehydrogenase 0 1 0 H16_A3398 22 kDa ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit (Rieske Fe-S protein) 0 1 0 H16_A3451 23 kDa cytochrome c553 0 1 0 1 0 H16_A3471 16 kDa hypothetical protein H16_B2071 0 1 0 1 0 H16_B2571 59 kDa peptide chain release factor 3 0 1 0 <td>H16_A0548</td> <td>31 kDa</td> <td>succinyl-CoA synthetase subunit alpha</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>0</td>	H16_A0548	31 kDa	succinyl-CoA synthetase subunit alpha	1	1	0
H16_A1191 36 kDa heat shock protein 33 (HSP33) 0 1 0 H16_A1910 40 kDa glutaminase-asparaginase (amidohydrolase) 0 1 0 H16_A22732 43 kDa ATPase 0 1 0 H16_A3056 46 kDa isocitrate dehydrogenase 0 1 0 H16_A3161 36 kDa preprotein translocase subunit SecF 0 1 0 H16_A3451 23 kDa cytochrome c 553 0 1 0 H16_B4371 16 kDa 50S ribosomal protein L16 3 1 0 H16_B2571 59 kDa peptide chain release factor 3 0 1 0 PHG252 70 kDa non-ribosomal protein H16_B2071 0 1 0 H16_B163 31 kDa non-ribosomal protein A16 2 0 0 H16_B163 astize reductase 9 0 22 0 0 H16_B1833 54 kDa mon-ribosomal poptide synthetase 0 0 0 0 H16_B1833 54 kDa D-(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hyd	H16_A1158	45 kDa	cysteine desulfurase	0	1	0
H16_A1910 40 kDa glutaminase-asparaginase (amidohydrolase) 0 1 0 H16_A2322 43 kDa ATPase 0 1 0 H16_A2322 43 kDa ATPase 0 1 0 H16_A2326 69 kDa i-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 0 1 0 H16_A3056 46 kDa isocitrate dehydrogenase 0 1 0 H16_A3398 22 kDa ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit (Rieske Fe-S protein) 0 1 0 H16_A3477 16 kDa 50S ribosomal protein L16 3 1 0 1 0 H16_B2071 141 kDa hypothetical protein H16_B2071 0 1 0 1 0 H16_B2571 59 kDa peptide chain release factor 3 0 1 0 0 22 H16_B233 61 kDa non-ribosomal protein kH4 0	H16_A1191	36 kDa	heat shock protein 33 (HSP33)	0	1	0
H16_A2322 43 kDa ATPase 0 1 0 H16_A2732 69 kDa 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 0 1 0 H16_A3056 46 kDa isocitrate dehydrogenase 0 1 0 H16_A316 36 kDa preprotein translocase subunit SecF 0 1 0 H16_A3377 16 kDa cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit (Rieske Fe-S protein) 0 1 0 H16_A3451 23 kDa cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit (Rieske Fe-S protein) 0 1 0 H16_A3457 16 kDa 50S ribosomal protein L16 3 1 0 1 0 H16_B2571 59 kDa peptide chain release factor 3 0 1 0 1 0 PHG252 70 kDa nitrous-oxide reductase 9 0 22 0 0 H16_B1687 31 kDa non-ribosomal peptide synthetase 1 0 0 0 0 H16_B253 f6 kDa methyl-accepting chemotaxis protein 0 0 0 0 0 0 0	H16_A1910	40 kDa	glutaminase-asparaginase (amidohydrolase)	0	1	0
H16_A2732 69 kDa 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 0 1 0 H16_A3056 46 kDa isocitrate dehydrogenase 0 1 0 H16_A3116 36 kDa preprotein translocase subunit SecF 0 1 0 H16_A3351 23 kDa ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit (Rieske Fe-S protein) 0 1 0 H16_A3451 23 kDa cytochrome c553 0 1 0 H16_B2071 14 kDa 50S ribosomal protein L16 3 1 0 H16_B2527 14 kDa hypothetical protein H16_B2071 0 1 0 PHG252 70 kDa nitrous-oxide reductase 9 0 22 H16_B1687 31 kDa nor-ribosomal peptide synthetase 2 0 0 H16_B233 1kDa nor-ribosomal peptide synthetase 1 0 0 0 H16_B1980 129 kDa 2-xoxacid ferredoxin oxidoreductase 1 0 0 0 H16_B1933 54 kDa methyl-accepting chemotaxis protein 1 0 3 0	H16_A2322	43 kDa	ATPase	0	1	0
H16_A3056 46 kDa isocitrate dehydrogenase 0 1 0 H16_A316 36 kDa preprotein translocase subunit SecF 0 1 0 H16_A3398 22 kDa ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit (Rieske Fe-S protein) 0 1 0 H16_A3477 16 kDa 50S ribosomal protein L16 3 1 0 H16_B2071 141 kDa hypothetical protein H16_B2071 0 1 0 H16_B257 59 kDa peptide chain release factor 3 0 1 0 PHG252 70 kDa nitrous-oxide reductase 9 02 22 H16_B1687 31 kDa non-ribosomal peptide synthetase 2 0 0 H16_B2231 65 kDa methyl-accepting chemotaxis protein 0 0 0 0 H16_B1980 129 kDa 2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase 1 0 6 H16_A2357 74 kDa D-(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase 0 0 0 H16_A2357 74 kDa arylsulfatase A or related enzyme 3 0 0 0 </td <td>H16_A2732</td> <td>69 kDa</td> <td>1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td>	H16_A2732	69 kDa	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	0	1	0
H16_A3116 36 kDa preprotein translocase subunit SecF 0 1 0 H16_A3398 22 kDa ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit (Rieske Fe-S protein) 0 1 0 H16_A3451 23 kDa cytochrome c553 0 1 0 H16_A3477 16 kDa 50S ribosomal protein L16 3 1 0 H16_B2071 141 kDa hypothetical protein H16_B2071 0 1 0 H16_B257 70 kDa neptide chain release factor 3 0 1 0 PHG252 70 kDa nitrous-oxide reductase 9 0 22 H16_B1687 331 kDa non-ribosomal peptide synthetase 2 0 0 H16_B233 65 kDa methyl-accepting chemotaxis protein 0 0 0 0 H16_B1980 129 kDa 2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase 1 0 6 0 0 0 H16_A1602 64 kDa arylsulfatase A or related enzyme 3 0 0 0 0 0 H16_A2377 34 kDa cetion/multidrug ef	H16_A3056	46 kDa	isocitrate dehydrogenase	0	1	0
H16_A3398 22 kDa ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit (Rieske Fe-S protein) 0 1 0 H16_A3451 23 kDa cytochrome c553 0 1 0 H16_A3477 16 kDa 50S ribosomal protein L16 3 1 0 H16_B2071 141 kDa hypothetical protein H16_B2071 0 1 0 H16_B2571 59 kDa peptide chain release factor 3 0 1 0 PHG252 70 kDa nitrous-oxide reductase 9 0 22 H16_B2033 65 kDa methyl-accepting chemotaxis protein 0 0 0 H16_B1803 129 kDa 2-coxoacid ferredoxin oxidoreductase 1 0 6 H16_B1933 54 kDa methyl-accepting chemotaxis protein 1 0 0 0 H16_B1933 54 kDa methyl-accepting chemotaxis protein 1 0 3 0 0 H16_A1602 64 kDa arylsulfatase A or related enzyme 3 0 0 0 H16_B2039 72 kDa chemotaxis protein histidine kinase 0 <	H16 A3116	36 kDa	preprotein translocase subunit SecF	0	1	0
H16_A3451 23 kDa cytochrome c553 0 1 0 H16_A3477 16 kDa 50S ribosomal protein L16 3 1 0 H16_B2071 141 kDa hypothetical protein H16_B2071 0 1 0 H16_B2571 59 kDa peptide chain release factor 3 0 1 0 PHG252 70 kDa nitrous-oxide reductase 9 0 22 H16_B1687 331 kDa non-ribosomal peptide synthetase 2 0 0 H16_B0233 65 kDa methyl-accepting chemotaxis protein 0 0 0 H16_B1980 129 kDa 2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase 1 0 6 H16_A2251 74 kDa D-(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase 1 0 3 H16_B1980 129 kDa 2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase 1 0 0 0 H16_B1933 54 kDa methyl-accepting chemotaxis protein 1 0 3 0 0 H16_A2357 43 kDa cation/multidrug efflux system, mebrane-fusion component 0 0 0	H16_A3398	22 kDa	ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit (Rieske Fe-S protein)	0	1	0
H16_A3477 16 kDa 50S ribosomal protein L16 3 1 0 H16_B2071 141 kDa hypothetical protein H16_B2071 0 1 0 H16_B2571 59 kDa peptide chain release factor 3 0 1 0 PHG252 70 kDa nitrous-oxide reductase 9 0 22 H16_B1687 331 kDa non-ribosomal peptide synthetase 2 0 0 H16_B1087 65 kDa methyl-accepting chemotaxis protein 0 0 0 0 H16_B1980 129 kDa 2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase 1 0 6 H16_B1980 129 kDa 2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase 1 0 0 H16_B1983 54 kDa methyl-accepting chemotaxis protein 1 0 3 0 H16_A251 74 kDa D-(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase 0 0 0 0 H16_B1933 54 kDa methyl-accepting chemotaxis protein 1 0 3 0 0 H16_B1933 54 kDa arylsulfatase A or related enzyme 3	H16_A3451	23 kDa	cytochrome c553	0	1	0
H16_B2071141 kDahypothetical protein H16_B2071010H16_B257159 kDapeptide chain release factor 3010PHG25270 kDanitrous-oxide reductase9022H16_B1687331 kDanon-ribosomal peptide synthetase200H16_B023365 kDamethyl-accepting chemotaxis protein0000H16_B023465 kDamethyl-accepting chemotaxis protein0000H16_B1930129 kDa2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase10600H16_B193354 kDaD-(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase00000H16_A160264 kDaarylsulfatase A or related enzyme300000H16_B23972 kDacation/multidrug efflux system, mebrane-fusion component00000H16_A231625 kDacbb3-type cytochrome oxidase, monoheme subunit II30600H16_B008024 kDaOmpW family porin1022000H16_A231633 kDacbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV3044	H16_A3477	16 kDa	50S ribosomal protein L16	3	1	0
H16_B257159 kDa peptide chain release factor 3010PHG25270 kDanitrous-oxide reductase9022H16_B1687331 kDanon-ribosomal peptide synthetase200H16_B023365 kDamethyl-accepting chemotaxis protein000H16_B023365 kDamethyl-accepting chemotaxis protein000H16_B023465 kDaDNA gyrase subunit A000H16_B1980129 kDa2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase106H16_B193354 kDamethyl-accepting chemotaxis protein103H16_B193354 kDamethyl-accepting chemotaxis protein103H16_A160264 kDaarylsulfatase A or related enzyme3000H16_B023972 kDachemotaxis protein histidine kinase0000H16_A231825 kDacbb3-type cytochrome oxidase, monoheme subunit II3060H16_B008024 kDaMypothetical protein H16_A04966000H16_A231633 kDacbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV304	H16 B2071	141 kDa	hypothetical protein H16 B2071	0	1	0
PHG25270 kDanitrous-oxide reductase9022H16_B1687331 kDanon-ribosomal peptide synthetase200H16_B023365 kDamethyl-accepting chemotaxis protein000H16_A078999 kDaDNA gyrase subunit A000H16_B1980129 kDa2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase106H16_A225174 kDaD-(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase000H16_B193354 kDamethyl-accepting chemotaxis protein103H16_A160264 kDaarylsulfatase A or related enzyme300H16_B35743 kDacation/multidrug efflux system, mebrane-fusion component000H16_A235743 kDacation/multidrug efflux system, mebrane-fusion component000H16_A237430 kDaM23B subfamily metallopeptidase000H16_A237430 kDaM23B subfamily metallopeptidase000H16_B008024 kDaOmpW family porin102H16_A049620 kDahypothetical protein H16_A0496600H16_A231633 kDacbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV304	H16_B2571	59 kDa	peptide chain release factor 3	0	1	0
H16_B1687331 kDanon-ribosomal peptide synthetase200H16_B023365 kDamethyl-accepting chemotaxis protein0000H16_A078999 kDaDNA gyrase subunit A0000H16_B1980129 kDa2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase106H16_A225174 kDaD-(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase0000H16_B193354 kDamethyl-accepting chemotaxis protein103300H16_A160264 kDaarylsulfatase A or related enzyme300000H16_A335743 kDacation/multidrug efflux system, mebrane-fusion component0000000H16_A237430 kDaM23B subfamily metallopeptidase000 <td< td=""><td>PHG252</td><td>70 kDa</td><td>nitrous-oxide reductase</td><td>9</td><td>0</td><td>22</td></td<>	PHG252	70 kDa	nitrous-oxide reductase	9	0	22
H16_B023365 kDamethyl-accepting chemotaxis protein000H16_A078999 kDaDNA gyrase subunit A000H16_B1980129 kDa2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase106H16_A225174 kDaD-(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase000H16_B193354 kDamethyl-accepting chemotaxis protein103H16_A160264 kDaarylsulfatase A or related enzyme300H16_A335743 kDacation/multidrug efflux system, mebrane-fusion component000H16_B023972 kDachemotaxis protein histidine kinase0000H16_A237430 kDaM23B subfamily metallopeptidase0000H16_B080024 kDaOmpW family porin1022H16_A049620 kDahypothetical protein H16_A04966000H16_A231633 kDacbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV304	H16_B1687	331 kDa	non-ribosomal peptide synthetase	2	0	0
H16_A078999 kDaDNA gyrase subunit A000H16_B1980129 kDa2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase106H16_A225174 kDaD-(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase000H16_B193354 kDamethyl-accepting chemotaxis protein103H16_A160264 kDaarylsulfatase A or related enzyme300H16_A335743 kDacation/multidrug efflux system, mebrane-fusion component000H16_B023972 kDachemotaxis protein histidine kinase0000H16_A237430 kDaM23B subfamily metallopeptidase0000H16_A231825 kDacbb3-type cytochrome oxidase, monoheme subunit II30600H16_A049620 kDahypothetical protein H16_A04966000H16_A231633 kDacbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV304	H16_B0233	65 kDa	methyl-accepting chemotaxis protein	0	0	0
H16_B1980129 kDa2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase106H16_A225174 kDaD-(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase000H16_B193354 kDamethyl-accepting chemotaxis protein103H16_A160264 kDaarylsulfatase A or related enzyme300H16_A335743 kDacation/multidrug efflux system, mebrane-fusion component000H16_B023972 kDachemotaxis protein histidine kinase0000H16_A237430 kDaM23B subfamily metallopeptidase0000H16_B08024 kDaOmpW family porin102H16_A049620 kDahypothetical protein H16_A0496600H16_A231633 kDacbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV304	H16_A0789	99 kDa	DNA gyrase subunit A	0	0	0
H16_A225174 kDaD-(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase000H16_B193354 kDamethyl-accepting chemotaxis protein103H16_A160264 kDaarylsulfatase A or related enzyme300H16_A335743 kDacation/multidrug efflux system, mebrane-fusion component000H16_B023972 kDachemotaxis protein histidine kinase0000H16_A237430 kDaM23B subfamily metallopeptidase0000H16_A231825 kDacbb3-type cytochrome oxidase, monoheme subunit II306H16_B008024 kDaOmpW family porin102H16_A049620 kDahypothetical protein H16_A0496600H16_A231633 kDacbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV304	H16_B1980	129 kDa	2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase	1	0	6
H16_B193354 kDamethyl-accepting chemotaxis protein103H16_A160264 kDaarylsulfatase A or related enzyme300H16_A335743 kDacation/multidrug efflux system, mebrane-fusion component000H16_B023972 kDachemotaxis protein histidine kinase0000H16_A237430 kDaM23B subfamily metallopeptidase0000H16_A231825 kDacbb3-type cytochrome oxidase, monoheme subunit II306H16_B008024 kDaOmpW family porin102H16_A049620 kDahypothetical protein H16_A0496600H16_A231633 kDacbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV304	H16_A2251	74 kDa	D-(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase	0	0	0
H16_A160264 kDaarylsulfatase A or related enzyme300H16_A335743 kDacation/multidrug efflux system, mebrane-fusion component000H16_B023972 kDachemotaxis protein histidine kinase0000H16_A237430 kDaM23B subfamily metallopeptidase0000H16_A231825 kDacbb3-type cytochrome oxidase, monoheme subunit II306H16_B008024 kDaOmpW family porin102H16_A049620 kDahypothetical protein H16_A0496600H16_A231633 kDacbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV304	H16_B1933	54 kDa	methyl-accepting chemotaxis protein	1	0	3
H16_A335743 kDacation/multidrug efflux system, mebrane-fusion component000H16_B023972 kDachemotaxis protein histidine kinase0000H16_A237430 kDaM23B subfamily metallopeptidase0000H16_A231825 kDacbb3-type cytochrome oxidase, monoheme subunit II306H16_B008024 kDaOmpW family porin102H16_A049620 kDahypothetical protein H16_A0496600H16_A231633 kDacbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV304	H16_A1602	64 kDa	arylsulfatase A or related enzyme	3	0	0
H16_B023972 kDachemotaxis protein histidine kinase000H16_A237430 kDaM23B subfamily metallopeptidase0000H16_A231825 kDacbb3-type cytochrome oxidase, monoheme subunit II306H16_B008024 kDaOmpW family porin102H16_A049620 kDahypothetical protein H16_A0496600H16_A231633 kDacbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV304	H16_A3357	43 kDa	cation/multidrug efflux system, mebrane-fusion component	0	0	0
H16_A237430 kDaM23B subfamily metallopeptidase000H16_A231825 kDacbb3-type cytochrome oxidase, monoheme subunit II306H16_B008024 kDaOmpW family porin102H16_A049620 kDahypothetical protein H16_A0496600H16_A231633 kDacbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV304	H16_B0239	72 kDa	chemotaxis protein histidine kinase	0	0	0
H16_A231825 kDacbb3-type cytochrome oxidase, monoheme subunit II306H16_B008024 kDaOmpW family porin102H16_A049620 kDahypothetical protein H16_A0496600H16_A231633 kDacbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV304	H16_A2374	30 kDa	M23B subfamily metallopeptidase	0	0	0
H16_B008024 kDaOmpW family porin102H16_A049620 kDahypothetical protein H16_A0496600H16_A231633 kDacbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV304	H16_A2318	25 kDa	cbb3-type cytochrome oxidase, monoheme subunit II	3	0	6
H16_A049620 kDahypothetical protein H16_A0496600H16_A231633 kDacbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV304	H16_B0080	24 kDa	OmpW family porin	1	0	2
H16_A2316 33 kDa cbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV 3 0 4	H16_A0496	20 kDa	hypothetical protein H16_A0496	6	0	0
	H16_A2316	33 kDa	cbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV	3	0	4

An	hang
----	------

Locus tag	Molekular gewicht	Protein	eyfp- Kontrolle	phaM-eyfp	∆phaC eyfp-phaM
H16 A2803	47 kDa	cyclopropane fatty acid synthase	9	0	0
H16 A0533	17 kDa	universal stress protein	3	0	0
H16 A3346	42 kDa	saccharopine dehydrogenase [NADP+,L-glutamate-forming]	6	0	0
H16_A1514	29 kDa	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0	0	0
H16_A0989	15 kDa	hypothetical protein H16_A0989	0	0	0
H16_B1686	107 kDa	non-ribosomal peptide synthetase	0	0	0
H16_B1683	113 kDa	non-ribosomal peptide synthetase modules and related proteins	0	0	0
H16_B1631	32 kDa	phosphate acetyltransferase	2	0	0
H16_B0701	48 kDa	hypothetical protein H16_B0701	0	0	0
H16_A3676	217 kDa	large extracellular alpha-helicalprotein	0	0	0
H16_B0228	63 kDa	methyl-accepting chemotaxis protein	0	0	0
PHG240	76 kDa	anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase	0	0	6
PHG253	13 kDa	cytochrome C	0	0	2
H16_A2319	54 kDa	cbb3-type cytochrome oxidase, subunit I	0	0	2
H16_A3547	131 kDa	indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase	0	0	1
H16_B1679	84 kDa	outer membrane receptor, TonB dependent	3	0	0
H16_B1692	50 kDa	putative aminotransferase	1	0	0
H16_A0473	27 kDa	ABC transporter permease	0	0	0
H16_A1440	21 kDa	transcriptional regulator of phasin expression	0	0	0
H16_B0702	61 kDa	SpoVR family protein	0	0	0
H16_B1358	60 kDa	phenylacetic acid degradation protein K,phenylacetaldehyde dehydrogenase	3	0	0
PHG202	20 kDa	phasin	0	0	0
H16_A2566	9 kDa	acyl carrier protein	0	0	0
H16_B2122	40 kDa	methyl-accepting chemotaxis protein	0	0	0
H16_A3097	46 kDa	glycolate oxidase iron-sulfur subunit	0	0	0
H16_B1685	216 kDa	non-ribosomal peptide synthetase	0	0	0
H16_A2555	28 kDa	ribonuclease III	0	0	0
H16_A2588	24 kDa	hypothetical protein H16_A2588	0	0	0
H16_B0264	42 kDa	flagellar hook protein FlgE	0	0	0
H16_A1052	23 kDa	NADH dehydrogenase subunit C	0	0	0
H16_A1466	38 kDa	squalene/phytoene synthase	0	0	0
H16_A2730	37 kDa	DNA-binding/iron metalloprotein/AP endonuclease	0	0	0
H16_A1038	24 kDa	phosphatidylserine decarboxylase	0	0	0

Ar	זha	ng
		<u> </u>

	Molekular		eyfp-		∆phaC
Locus tag	gewicht	Protein	Kontrolle	phaM-eyfp	eyfp-phaM
PHG124	66 kDa	siderophore biosynthesis protein	0	0	0
H16_A0505	17 kDa	hypothetical protein H16_A0505	0	0	0
PHG126	78 kDa	ferrisiderophore receptor protein, TonB dependent	0	0	0
H16_A0669	29 kDa	protein tyrosine/serine phosphatase	0	0	0
H16_A1339	72 kDa	threonyl-tRNA synthetase	0	0	0
H16_A1391	52 kDa	ferredoxin-like domain-containing protein	0	0	0
H16_A1401	37 kDa	dihydroorotate dehydrogenase 2	0	0	0
H16_A2891	50 kDa	hypothetical protein H16_A2891	0	0	0
H16_A3146	36 kDa	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0	0	0
H16_A3694	26 kDa	response regulator	0	0	0
H16_B0245	24 kDa	chemotaxis regulator CheZ	0	0	0
H16_A0734	45 kDa	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	0	0	0
H16_A1058	18 kDa	NADH dehydrogenase subunit I	0	0	0
H16_A2623	28 kDa	leucine/isoleucine/valine transporter ATP-binding subunit	0	0	0
H16_A2902	44 kDa	hypothetical protein H16_A2902	0	0	0
H16_A3251	9 kDa	50S ribosomal protein L27	0	0	0
H16_A2437	78 kDa	polyphosphate kinase	0	0	11
H16_A2820	12 kDa	hypothetical protein H16_A2820	0	0	2
H16_A3423	23 kDa	ABC-type transporter, auxilary periplasmic component involved in toluene tolerance	0	0	2
H16_B0386	75 kDa	Acetyl-CoA synthetase (NDP-forming)	0	0	2
H16_B0508	46 kDa	D-amino acid dehydrogenase small subunit	0	0	2
H16_B1085	65 kDa	signal transduction histidine kinase	0	0	2
H16 B2330	34 kDa	U32 family peptidase	0	0	2
H16_B0253	75 kDa	flagellar biosynthesis protein FlhA	1	0	1
H16_B2229	45 kDa	O-acetylhomoserine sulfhydrylase	0	0	1

Lebenslauf

Stephanie Schulze, geb	. Bresan		
Dirschauer Straße 4, 703	74 Stuttgart		
Geburtsdatum und – ort	t:	21. November 1990 in Görlitz (Deutschland)	
Staatsangehörigkeit:		deutsch	
Schulische Ausbildung			
08/2001 – 07/2009:	Joliot-Curie	Gymnasium, Görlitz	
	Abschluss:	Abitur	
10/2009 – 09/2012:	Friedrich-Schiller-Universität, Jena		
	Bachelorstudium Biochemie/Molekularbiologie		
	Bachelorark Universitäts	eit am Institut fü Medizinische Mikrobiologie, klinikum Jena	
	<i>Thema</i> : Epi Universitäts	demiologie von <i>Klebsiella</i> ESBL-Stämmen am klinikum Jena	
	Abschluss	Bachelor of Science (B.Sc.)	
10/2012 - 01/2015:	Friedrich-So	chiller-Universität, Jena	
	Masterstudi	um Molecular Medicine	
	Masterarbeit am Institut für Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Jena		
	<i>Thema</i> : A biochemical system for the rapid and reversi on/off switching of Ras activity		
	Abschluss	Master of Science (M.Sc.)	
Promotion			
01/2015 – 07/2018:	Universität S	Stuttgart	
	Doktorarbeit am Institut für Mikrobiologie		

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dieter Jendrossek für die Überlassung des spannenden Themas, die Betreuung und tatkräftige Unterstützung mit Hilfen und Denkanstößen zu wissenschaftlichen Fragestellungen. Seine Art schaffte eine angenehme und offene Arbeitsatmosphäre. Ich danke ihm auch für die Möglichkeit, auf nationalen und internationalen Konferenzen teilzunehmen und dabei tiefe Einblicke in neue wissenschaftliche Erkenntnisse kennenzulernen.

Herrn Prof. Dr. Georg Sprenger möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Promotion an seinem Institut durchführen zu können und für die Diskussionen und Hilfestellungen während der Halbjahresbesprechungen.

Bei Prof. Dr. Karl Forchhammer bedanke ich mich herzlich für die freundliche Bereitschaft, die Zweitbegutachtung meiner Arbeit zu übernehmen. Weiterhin bin ich ihm für die sehr gute Kooperation im Zuge meiner ersten Veröffentlichung und für die Ermöglichung zur Durchführung von ITC-Experimenten an seinem Institut dankbar.

Mein besonderer Dank gilt allen der AG Jendrossek, die mich während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit tatkräftig unterstützt haben. Janina Jüngert danke ich insbesondere für die Anregungen und Unterstützung bei Experimenten und für den sportlichen Ausgleich zwischendurch. Simone Reinhardt und Anna Schweter danke ich für all die Hilfe bei molekularbiologischen und mikrobiologischen Arbeiten. Dr. Anna Sommer danke ich für ihre unterstützende Hilfe bei allen Fragen, besonders zu Beginn meiner Doktorarbeit, und ihre enge Mitarbeit im Zuge meiner ersten Veröffentlichung. Bei Dr. Jakob Birke, Wolf Röther und Erik Eppinger bedanke ich mich für ihre Anregungen und Hilfestellungen, besonders an der FPLC und HPLC. Die wunderbare Zusammenarbeit, freundliche und offene Atmosphäre, auch außerhalb des Instituts, haben mir viel Freude bereitet und dafür bin ich sehr dankbar.

Allen weiteren Kollegen des Instituts für Mikrobiologie möchte ich auch ganz herzlich für die tolle Zusammenarbeit und gute Arbeitsatmosphäre danken.

Bei Dr. Daniel Pfeiffer möchte ich mich für die enge Kooperation und Mitarbeit im Zuge der Veröffentlichung in Scientific Reports sowie für die *M. gryphiswaldense* Stämme und seine Ratschläge bedanken.

Dr. Waldemar Hauf von der AG Forchhammer danke ich für die gemeinsame Arbeit an der Veröffentlichung und die Zusendung der Plasmide pCM62::P_{PhaC}-*lactC2-sfgfp* und pCM62::P_{PhaC}-*lactC2-mTurquoise2*, die Teil meiner ersten Veröffentlichung waren.

Bei Khaled Selim von der AG Forchhammer möchte ich mich insbesondere für die Durchführung der ITC-Experimente und die zahlreichen Diskussionen und Anregungen bedanken.

Dr. Sara Weirich von der AG Jeltsch danke ich für ihre Hilfe mit den CD-Spektroskopie-Messungen.

Bei der AG Bramkamp von der LMU München, insbesondere bei Marc Bramkamp und Kati Böhm, möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, die ChIP-Experimente durchführen zu können.

Der AG Pfannstiel, besonders Frau Würtz und Prof. Pfannstiel, vom Life Science Center der Universität Hohenheim möchte ich für die Proteomanalyse und die anregenden Diskussionen danken.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Felix, der mich in allen Entscheidungen unterstützt hat und mir immer einen starken Rückhalt gegeben hat. Meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden danke ich vor allem für die wunderbare Unterstützung während des Studiums und meiner Promotion. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich geworden.