

Identifizierung und Funktionsanalyse neuartiger Proteine des PHB-Granulumkomplexes von *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

DANIEL PFEIFFER

AUS AALEN

Hauptberichter: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Jendrossek

Mitberichter: Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Hauer

Mitberichter: Prof. Dr. rer. nat. Karl Forchhammer

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli 2013

INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE DER UNIVERSITÄT STUTTGART

2013

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden unter der Leitung von Prof. Dr. D. Jendrossek am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iii
Abkürzungsverzeichnis	vi
Zusammenfassung	ix
Abstract	xi
1. Allgemeine Einleitung	1
1.1. Vorkommen und Bildung von PHB	1
1.2. Aufbau und Struktur nativer PHB-Granula	3
1.2.1. PHB-Synthasen	7
1.2.2. Intrazelluläre PHB-Depolymerasen	8
1.2.3. Phasine	10
1.2.4. Regulatorproteine	12
1.3. Biosynthese und intrazelluläre Lokalisation nativer PHB-Granula	14
1.4. Zielsetzung	16
2. Identifizierung neuartiger Proteine des PHB-Granulumkomplexes	17
2.1. Protein-Interaktionsstudien	17
2.1.1. Methoden zur Analyse von Protein-Wechselwirkungen	18
2.1.1.1. Two-Hybrid	18
2.1.1.2. Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation	21

2.1.2.	Interaktionen im PHB-Stoffwechsel	22
2.1.2.1.	Two-Hybrid Analyse der PHB-Synthasen aus <i>Ralstonia</i> <i>eutropha</i> und <i>Bacillus megaterium</i>	22
2.1.2.2.	Interaktionen im PHB-Stoffwechsel von <i>R. eutropha</i> . . .	25
2.1.3.	Identifizierung von Interaktionen mittels einer Genbank	27
2.1.3.1.	Ergebnisse mit der PHB-Synthase PhaC1 als Köder . . .	31
2.1.3.2.	Ergebnisse mit Phasinen als Köder	32
2.1.3.3.	Ergebnisse mit PhaR als Köder	34
2.1.3.4.	Ergebnisse mit der PHB-Depolymerase PhaZa1 als Köder	35
2.1.4.	Verifizierung neuer Interaktionen	35
2.2.	Proteomanalyse des PHB-Granulums	40
2.3.	Motivsuche	43
2.3.1.	Verbreitung von Phasinen in PHA-bildenden Spezies	43
2.3.2.	Identifizierung Phasin-artiger Proteine in <i>R. eutropha</i>	46
3.	Funktionsanalyse neuartiger PHB-Granula-assoziiierter Proteine	49
3.1.	Expressionsnachweis und genomischer Kontext	49
3.2.	Einfluss auf Größe, Anzahl und Lokalisierung der PHB-Granula	52
3.2.1.	Eigenschaften von PhaM und PhaP5	57
3.2.1.1.	Lokalisierung sowie Überexpression von PhaM und PhaP5	57
3.2.1.2.	Wechselwirkung von PhaM mit DNA	59
3.2.1.3.	Mikroskopische Untersuchungen der Δ <i>phaM</i> -Mutante . .	61
3.3.	Modell zur Verteilung der PHB-Granula	63
4.	Lokalisierung der PHB-Synthase - Untersuchungen zum Initiationsort der PHB-Granula	70
4.1.	Lokalisierung der PHB-Synthase	72
4.2.	Modell zum Initiationsort der PHB-Granula	75
5.	Ausblick	79

Literaturverzeichnis	81
A. Anhang	112
A.1. Publikationen	112
A.2. Two-Hybrid Ergebnisse	114
A.3. Ergebnisse der Proteomanalyse	117
Erklärung	131
Danksagung	132
Lebenslauf	134

Abkürzungsverzeichnis

Δ	Delta (Gendeletion)
3-HA	3-Hydroxyalkansäure, 3-Hydroxyalkanoat
3-HB	3-Hydroxybuttersäure, 3-Hydroxybutyrat
AFM	Rasterkraftmikroskop, <i>engl.</i> atomic/scanning force microscope
aPHB	ataktisches Poly(3-Hydroxybutyrat)
BACTH	Bakterielles Adenylatzyklase Two-Hybrid System, <i>engl.</i> Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation, <i>engl.</i> bimolecular fluorescence complementation
BLAST	Programm zur Analyse biologischer Sequenzdaten, <i>engl.</i> Basic Local Alignment Search Tool
C-terminal	Carboxy-Terminus eines Proteins
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
cfu	Kolonie-bildende Einheiten, <i>engl.</i> colony forming units
CoA	Coenzym A
cPHB	channel PHB
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dPHB	denaturiertes parakristallines Poly(3-Hydroxybutyrat)
EM	Elektronenmikroskop

EMSA	Nachweis von DNA-bindenden Proteinen, <i>engl.</i> Electrophoretic Mobility Shift Assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
eYfp	gelb fluoreszierendes Protein, <i>engl.</i> enhanced yellow fluorescent protein
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
Gfp	grün fluoreszierendes Protein, <i>engl.</i> green fluorescent protein
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, <i>engl.</i> high performance liquid chromatography
i-PHB	intrazelluläre Poly(3-Hydroxybuttersäure)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny Broth
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation, <i>engl.</i> Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
MCL	medium-chain-length
N-terminal	Amino-Terminus eines Proteins
NAD ⁺ , NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid, Nicotinamidadenindinukleotidphosphat; oxidiert
NADH, NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid, Nicotinamidadenindinukleotidphosphat; reduziert
NB	Nutrient Broth
nPHB	native = biochemisch intakte PHB Granula (amorphes Poly(3-Hydroxybutyrat))
ORF	Offener Leserahmen, <i>engl.</i> open reading frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PGAP	PHB-Granula-assoziiertes Protein

PHA	Polyhydroxyalkanoat
PhaA	β -Ketothiolase
PhaB	Acetoacetyl-CoA-Reduktase
PhaC	PHA-Synthase
<i>phaCAB</i>	Operon der PHB-Biosynthese
PhaM	Granula Segregationsfaktor
PhaP	Phasin
PhaR	Regulator der Phasinexpression in <i>R. eutropha</i>
PhaZ	PHA-Depolymerase
PHB	Poly(3-Hydroxybuttersäure), Poly(3-Hydroxybutyrat)
PHO	Poly(3-Hydroxyoktansäure), Poly(3-Hydroxyoktanoat)
PTS	Phosphotransferasesystem
SAXS	Kleinwinkel-Röntgenbeugung, <i>engl.</i> small angle x-ray scattering
SCL	short-chain-length
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TOF	Flugzeitanalysator, <i>engl.</i> time of flight
w/w	Massenprozent, <i>engl.</i> weight per weight
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Zusammenfassung

Poly(3-hydroxybuttersäure) (PHB) spielt eine wichtige Rolle als Kohlenstoff- und Energiespeicher in zahlreichen Mikroorganismen. Intrazellulär gebildetes PHB liegt hierbei in Form von so genannten nativen PHB-Granula vor. An der Oberfläche der PHB-Granula sind unter anderem Proteine gebunden, welche für deren Synthese (PHB-Synthase, PhaC) oder Abbau (PHB-Depolymerase, PhaZ) verantwortlich sind oder das Oberfläche/Volumenverhältnis der Granula regulieren (Phasine, PhaP). Vorangegangene Arbeiten mit *Ralstonia eutropha* - dem Modellorganismus der PHB-Speicherung - zeigten, dass PHB-Granula in der frühen Phase ihrer Bildung nicht zufällig verteilt in der Zelle vorliegen, sondern gehäuft an den Zellpolen oder der inneren Seite der Cytoplasmamembran lokalisiert sind. Dies ließ eine spezifische Interaktion zwischen PHB-Granula-assoziierten Proteinen mit unbekanntem Zielstrukturen in der Zellperipherie vermuten. Diese Annahme wurde durch die in der Literatur beschriebenen cytoskelettartigen Strukturen auf der Oberfläche nativer PHB-Granula unterstützt. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Proteine, welche spezifisch mit der PHB-Synthase oder anderen Oberflächenproteinen der PHB-Granula (z.B. Phasinen) interagieren, durch einen bakteriellen Two-Hybrid Assay identifiziert und anschließend auf ihre Beteiligung an der PHB-Granulabildung überprüft. Zur Identifizierung neuartiger Proteine des PHB-Granulumkomplexes wurden zudem weitere Methoden eingesetzt. PHB-Granula-assoziierte Proteine wurden ferner über eine Proteomanalyse isolierter PHB-Granula sowie eine Motivsuche nach Konsensussequenzen von Phasinen identifiziert. Im Zuge dieser Experimente konnten die vier bisher nicht beschriebene Proteine PhaP5 (H16_B1934), PhaP6 (H16_B1988),

PhaP7 (H16_B2326) und PhaM (H16_A0141) identifiziert werden. Für diese Proteine konnte gezeigt werden, dass sie Phasin-ähnliche Eigenschaften aufweisen und mit den PHB-Granula assoziiert vorliegen. Insbesondere für PhaM und PhaP5 wurde nachgewiesen, dass diese Anzahl, Oberfläche/Volumen-Verhältnis und Lokalisierung der PHB-Granula regulieren können. PhaM war in der Lage mit dem Schlüsselenzym der PHB-Bildung der PHB-Synthase (PhaC1) zu wechselwirken. Weitere Protein-Protein-Interaktionen konnten zwischen PhaM und PhaP5 sowie zwischen PhaP5 und verschiedenen anderen Phasinen, dem Regulator der Phasin-Expression (PhaR) sowie der PHB-Depolymerase PhaZa1 nachgewiesen werden. Eine Überexpression von PhaM führte zu einer stark erhöhten Anzahl kleiner PHB-Granula, welche nahezu ausschließlich mit dem Nukleoid assoziiert waren. Bei Überexpression von PhaP5 waren die PHB-Granula hingegen überwiegend an den Zellpolen lokalisiert und ein Kontakt zum Nukleoid war nicht mehr nachweisbar. Zellen einer *phaM*-Deletionsmutante waren zudem in einer gleichmäßigen Aufteilung der Granula auf die Tochterzellen gestört und bildeten meist nur ein sehr großes PHB-Granulum. PhaM konnte aufgrund charakteristischer Alanine, Proline und Lysine (AAKP-Motive) im C-terminalen Bereich seiner Aminosäuresequenz den Histon H1-ähnlichen Proteinen zugeordnet werden. PhaM war in der Lage sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unspezifisch an DNA (Nukleoid) zu binden. Aufgrund dieser Eigenschaften kann PhaM PHB-Granula physisch mit dem Nukleoid verknüpfen. Hierdurch wird gewährleistet, dass diese im Zuge der Chromosomensegregation und Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt werden. Anhand dieser neuen Erkenntnisse wurde ein Modell zur Verteilung der PHB-Granula während der Zellteilung entwickelt. In weiteren Experimenten wurde die Lokalisierung der PHB-Synthase untersucht und so neue Erkenntnisse zum Entstehungsort der PHB-Granula gewonnen. Dabei konnte gezeigt werden, dass PHB-Granula vermutlich nicht an der Zellmembran gebildet werden („Budding-Modell“). Die PHB-Synthase liegt hingegen ebenfalls über ihre Wechselwirkung mit PhaM an das Nukleoid gebunden vor. Das Nukleoid stellt damit den Bildungsort sowie Verankerungspunkt der PHB-Granula in der Zelle dar.

Abstract

Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) plays an important role as a storage compound for carbon and energy in many microorganisms. Intracellular PHB is deposited as water-insoluble inclusion bodies (granules). Different proteins which are important for example for biosynthesis (PHB synthase, PhaC), intracellular mobilization (PHB depolymerase, PhaZ) or which control the size/volume-ratio (phasins, PhaP) are bound to PHB granules *in vivo*. Earlier work on *Ralstonia eutropha* - model organism for PHB metabolism - has shown a non random distribution of PHB granules in the cell, which are often located at the cell poles or near the cytoplasmic membrane during the early stages of formation. These results led to the assumption that localisation of PHB granules is controlled by interactions of PHB associated proteins with unknown proteins in the cell periphery. This assumption was supported by the recent identification of cytoskeleton-like structures on the surface of PHB granules. Therefore, a bacterial two-hybrid approach was applied to screen for proteins with the ability to interact with PHB synthase or other proteins (e.g. phasins) of the surface of PHB granules. Identified proteins were subsequently analysed for a possible role in PHB granule formation. Additional, PHB granule associated proteins were identified via proteome analysis of isolated PHB granules and by bioinformatical inspection of the *R. eutropha* genome for sequences with phasin motifs. This led to the identification of four yet undescribed proteins, namely PhaP5 (H16_B1934), PhaP6 (H16_B1988), PhaP7 (H16_B2326) und PhaM (H16_A0141), all of which showed phasin-like properties and were able to bind to the surface of PHB granules *in vivo*. Remarkably, PhaM and PhaP5 were able to control number, size and

localization of PHB granules. PhaM strongly interacted with the key enzyme of PHB synthesis, the PHB synthase (PhaC1). Other interactions were found between PhaM and PhaP5 and between PhaP5 and several of the other phasins, with the regulator of phasin expression (PhaR) and with PHB depolymerase PhaZa1. Overexpression of PhaM resulted in formation of many small granules that were exclusively bound to the nucleoid region. In contrast, overexpression of PhaP5 resulted in localization of PHB granules near the cell poles and apparent detachment of PHB granules from the nucleoid. While the wildtype accumulated in average three to six medium-sized PHB granules, most cells of a constructed *phaM* deletion mutant formed only one big granule and distribution of granules to daughter cells was disordered. The C-terminal part of PhaM contained a high number of prolines, alanines and of residues with positive charge (lysines) that are reminiscent for histone-like proteins (AAKP motifs). PhaM was able to bind unspecifically to DNA *in vitro* and to the nucleoid *in vivo*. In conclusion, PhaM is able to link PHB granules physically with the bacterial nucleoid and to promote that PHB granules are equally separated during cell division and chromosome segregation. This finding was also confirmed for the wild-type. A new model of PHB granule formation and distribution during cell division was suggested. In order to identify the subcellular localisation of PHB granule formation the intracellular localisation of the PHB synthase was determined. Formation of PHB granules at the cytoplasmic membrane (budding model) could be disproved and evidence was obtained that the PHB synthase apparently is nucleoid bound via PhaM leading to a direct linkage of emerging PHB granules to the nucleoid.

1 | Allgemeine Einleitung

1.1. Vorkommen und Bildung von PHB

Bei den Polyhydroxyalkanoaten (PHA) handelt es sich um eine Gruppe natürlich vorkommender aliphatischer Polyester, welche von vielen Mikroorganismen als Reservestoffe gebildet werden [Anderson und Dawes, 1990; Madison und Huisman, 1999]. Am weitesten verbreitet ist die Poly(3-hydroxybuttersäure) (PHB). Diese ist aus Einheiten von (*R*)-3-Hydroxybuttersäure ((*R*)-3-HB) zusammengesetzt. PHA weisen aufgrund ihrer thermoplastischen und elastomeren Beschaffenheit Eigenschaften ähnlich denen synthetischer Polymere auf Erdölbasis auf [Müller und Seebach, 1993; Steinbüchel, 1991]. Ihre Bioabbaubarkeit und Herstellung aus erneuerbaren Rohstoffen führte zur Entwicklung verschiedenster technischer und medizinischer Applikationen [Anderson und Dawes, 1990; Asrar und Gruys, 2002; Williams und Martin, 2002]. Die physikalischen Eigenschaften des Polymers sind dabei von der Monomerzusammensetzung abhängig. PHA aus kurzkettigen Monomeren (3 bis 5 Kohlenstoffatome) werden als PHA_{SCL} (short-chain-length), PHA aus längerkettigen Einheiten (C₆ bis C₁₆) als PHA_{MCL} (medium-chain-length) bezeichnet. Durch Variation der Substratzufuhr kann zudem eine Bildung von Copolymeren mit verbesserten Materialeigenschaften erreicht werden, welche beispielsweise 3-Hydroxyvalerat (P(3HB-*co*-3HV)) oder 4-Hydroxybutyrat (P(3HB-*co*-4HB)) enthalten [Byrom, 1992; Choi *et al.*, 1999; Madison und Huisman, 1999]. Etwa 150 verschiedene Monomere, welche als Bausteine in Frage kommen, sind bekannt [Steinbüchel und Valentin, 1995].

PHA werden von Mikroorganismen unter nicht ausbalancierten Wachstumsbedingungen während der Assimilation von Kohlenstoff bei gleichzeitiger Limitierung eines anderen essentiellen Nährstoffes als Energie- und Kohlenstoffspeicher gebildet [Anderson und Dawes, 1990]. Das Molekulargewicht des Polyesters kann dabei mehrere Millionen Dalton betragen und mehr als 90 % des Zellrockengewichts ausmachen [Anderson und Dawes, 1990]. Zur Bildung des Speicherstoffes kommt es typischerweise bei Stickstoffmangel [Schlegel *et al.*, 1961; Suzuki *et al.*, 1986b,c; Timm und Steinbüchel, 1990], aber auch eine Limitierung von Phosphat, Sulfat, Magnesium oder Sauerstoff bei aeroben Organismen kann dafür auslösend sein [Dawes, 1976; Kaltwasser, 1962; Repaske und Repaske, 1976; Schembri *et al.*, 1995; Schuster und Schlegel, 1967; Suzuki *et al.*, 1986a]. Neben der Funktion als Energie- und Kohlenstoffspeicher, kann eine Bildung von PHB, während der es zu einer Reoxidation von Reduktionsäquivalenten (NADH/NADPH) kommt, auch die Funktion einer Ersatzatmungskette bei Insuffizienz der NADH-Oxidase übernehmen [Genser *et al.*, 1998]. Eine solche Funktion wurde beispielsweise für *Azotobacter vinelandii* beschrieben [Page und Knosp, 1989]. Wird der fehlende Wachstumsfaktor wieder verfügbar oder kommt es zu einer Limitierung der Kohlenstoffquelle, kann das akkumulierte PHB abgebaut und zum Wachstum verwendet werden. Neben dem Vorkommen von PHB als Speicherstoff wurde auch ein niedermolekularer PHB-Typ (< 15.000 Da) beschrieben (so genanntes „complexed“ oder „channel“ PHB = cPHB). Dieser liegt assoziiert mit zellulären Proteinen und der Zellmembran vor und ist wahrscheinlich an Transportvorgängen in Pro- und Eukaryonten beteiligt [Huang und Reusch, 1996; Reusch *et al.*, 1995; Reusch und Sadoff, 1988].

Viele Arbeiten zum PHB-Metabolismus wurden mit dem Modellorganismus *Ralstonia eutropha* H16 (*R. eutropha*) durchgeführt (zur Namensgebung siehe Bowien und Schlegel [1981]; Davis *et al.* [1969]; Repaske [1962]; Vandamme und Coenye [2004]; Vanechoutte *et al.* [2004]; Wilde [1962]; Yabuuchi *et al.* [1995]). *R. eutropha* ist ein Gram-negatives stäbchenförmiges Bodenbakterium, welches den Betaproteobacteria zugehörig ist. Es wird wegen seiner Fähigkeit molekularen Wasserstoff zu oxidieren auch als „Knallgas-Bakterium“ bezeichnet. Unter Abwesenheit von organischen Substraten kann *R. eutropha*

chemolithoautotroph mit H_2 und CO_2 als alleiniger Energie- und Kohlenstoffquelle wachsen [Cramm, 2009; Pohlmann *et al.*, 2006]. In *R. eutropha* und anderen PHB-akkumulierenden Bakterien erfolgt die PHB-Bildung ausgehend von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) in drei Schritten. Katalysiert von der β -Ketothiolase (PhaA) werden zwei Moleküle Acetyl-CoA in einer Claisen-Kondensation zu Acetoacetyl-CoA verknüpft, welches durch eine stereospezifische NADPH-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase (PhaB) in (*R*)-3-Hydroxybutyryl-CoA umgewandelt wird [Haywood *et al.*, 1988a,b; Oeding und Schlegel, 1973]. Im letzten Schritt werden die (*R*)-3-Hydroxybutyryl-CoA Einheiten, unter Abspaltung von CoA, durch die PHB-Synthase (PhaC) zum Polymer verknüpft. Für eine Synthese von PHB ist die Verfügbarkeit an Acetyl-CoA sowie das NADH/NAD⁺-Verhältnis in der Zelle maßgeblich [Anderson und Dawes, 1990]. Für die Regulation der PHB-Bildung in *R. eutropha* wurde ferner eine Beteiligung der stringenten Kontrolle [Brigham *et al.*, 2012b] sowie der beiden generellen PTS-Proteine PtsH und PtsI [Kaddor und Steinbüchel, 2011a,b; Kaddor *et al.*, 2012; Raberg *et al.*, 2012] diskutiert.

1.2. Aufbau und Struktur nativer PHB-Granula

Intrazellulär gebildetes PHB liegt in Form von so genannten nativen PHB-Granula (nPHB-Granula) vor. In diesen befindet sich das Polymer in einem amorphen (glasähnlichen) Zustand umgeben von einer membranähnlichen Struktur aus Lipiden und Proteinen [Dunlop und Robards, 1973; Griebel *et al.*, 1968; Jendrossek und Handrick, 2001]. PHB-Granula können mikroskopisch durch Anfärbung mit Farbstoffen wie Sudan-schwarz B oder Nilblau/Nilrot sichtbar gemacht werden [Burdon, 1946; Ostle und Holt, 1982]. Wird die äußere Hülle der Granula durch physikalische oder chemische Einflüsse beschädigt (z.B. während der Isolierung), kommt es rasch zum Übergang in einen denaturierten, parakristallinen Zustand (zwischen 50 und 60 % Kristallinität) [Scandola *et al.*, 1998]. Dieser wird als denaturiertes PHB (dPHB) bezeichnet. PHA-Granula im nativen Zustand können nur durch besonders schonende Verfahren, wie die Glycerolgradientendichtezentrifugation, isoliert werden [Griebel *et al.*, 1968; Jendrossek und

Handrick, 2001; Merrick und Doudoroff, 1964; Ritchie und Dawes, 1969]. Mit Hilfe von Phospholipiden oder Detergenzien (z.B. Cholat, SDS) zur Substitution der Granulahülle ist es möglich artifizielle amorphe PHB-Granula (aPHB) herzustellen [Horowitz und Sanders, 1995]. Deren physikalische Eigenschaften entsprechen denen nativer Granula.

Genaue Zusammensetzung und struktureller Aufbau der PHB-Granula *in vivo* werden kontrovers diskutiert [Handrick, 2003]. Die ersten Hinweise auf das Vorkommen von Lipiden und Proteinen an der Oberfläche nativer PHB-Granula wurden von Williamson und Wilkinson [1958] und Griebel *et al.* [1968] beschrieben. PHB bildet mit 97,5 % (w/w) den Hauptbestandteil der Granula, gefolgt von Proteinen (2 %, w/w) und Lipiden und Phospholipiden (0,5 %, w/w) [Griebel *et al.*, 1968; Griebel und Merrick, 1971; Lundgren *et al.*, 1964]. Das Vorliegen einer Lipidschicht auf der Oberfläche der PHB-Granula ist nicht eindeutig geklärt - während bestimmte mikroskopische Aufnahmen klar auf das Vorliegen eines Monolayers deuten [Boatman, 1964; Jensen und Sicko, 1971; Lundgren *et al.*, 1964; Merrick *et al.*, 1965; Wang und Lundgren, 1969], zeigen andere Veröffentlichungen teils widersprüchliche Ergebnisse [Chapman, 1956; Cohen-Bazire und Kunisawa, 1963]. Diese Unterschiede sind möglicherweise auch auf unterschiedliche Methoden zur Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie zurückzuführen. Bei den in isolierten Präparationen nativer PHB-Granula nachweisbaren Lipiden könnte es sich auch um ein Artefakt aufgrund einer Verunreinigung durch Membranfragmente während der Isolationsprozedur handeln [Jendrossek, 2009]. Auch über die unspezifische Bindung von Proteinen an die hydrophobe Oberfläche der PHB-Granula wurde berichtet. Es wurde beispielsweise neben dem Chaperon GroEL [Pötter *et al.*, 2004] auch für den Zellaufschluss eingesetztes Lysozym an isolierten Granula nachgewiesen [Liebergesell *et al.*, 1992].

Für Poly(3-Hydroxyoctanoat)-(PHO)-Granula aus *Pseudomonas oleovorans* wurde von Stuart *et al.* [1995] ein Modell vorgeschlagen, welches von zwei durch eine Phospholipidschicht separierten parakristallinen Proteinschichten ausgeht [Fuller *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 1995]. Im Gegensatz dazu wurde von Preusting *et al.* [1991] für PHO-Granula ei-

ne einschichtige Granulumhülle beschrieben, bestehend aus in regelmäßigen Abständen von 7,3 nm angeordneten Partikeln mit einer Größe von 7 - 13 nm. Eine Doppelmembran wurde aufgrund der Dünne der Grenzschicht ausgeschlossen [Preusting *et al.*, 1991]. Auch für PHB-Granula aus *Rhodospirillum rubrum* [Boatman, 1964] und *Ferrobacillus ferrooxidans* [Wang und Lundgren, 1969] wurden Werte von 2,5 bis 4 nm ermittelt, welche ebenfalls auf einen Monolayer schließen lassen. Ferner wurde über das Vorliegen einer Granulumhülle/Membran für PHB-Granula aus *Bacillus cereus* und *Bacillus megaterium* berichtet [Dunlop und Robards, 1973; Lundgren *et al.*, 1964; Merrick *et al.*, 1965].

Von Mayer *et al.* anhand von Ultradünnschnitten vorgenommene Vergleiche der PHB-Granula Grenzflächenschicht mit typischen Doppelmembranen (Cytoplasmamembran, Vesikel) zeigen, dass im Falle von *R. eutropha* sehr wahrscheinlich nur eine einfache Protein-/Phospholipidschicht mit einer Dicke von 4 nm vorliegt [Mayer, 1992; Mayer und Hoppert, 1997; Mayer *et al.*, 1996]. Insbesondere aktuelle Arbeiten von Beeby *et al.* [2012] mittels Kryoelektronentomographie, welche eine dreidimensionale Untersuchung eines nahezu nativen Zustandes von Zellen mit hoher Auflösung ermöglicht, deuten darauf hin, dass die Oberflächenschicht der Granula von *R. eutropha* mehr einer Proteinhülle als einem Lipid Mono- oder Bilayer entspricht. Verschiedene Untersuchungen der PHA-Granula Oberfläche mittels Rasterkraftmikroskopie an *R. eutropha*, *Comamonas acidovorans*, rekombinanten *Escherichia coli* (*E. coli*) und verschiedenen *Pseudomonas* Spezies [Dennis *et al.*, 2008; Kuchta *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2002; Sudesh *et al.*, 2002a,b] konnten die Existenz teils netzwerkartiger Strukturen, ähnlich eines Cytoskeletts, sowie partikulärer globulärer Strukturen mit einer lateralen Größe von 10 - 30 nm nachweisen. Bei diesen Strukturen handelt es sich vermutlich um die PHB-Synthase und andere Granula-assoziierte Proteine (Phasine). Granula des Copolymers P(3HB-co-3HA) aus *Pseudomonas* sp. 61-3 wiesen hingegen eine eher glatte Oberflächenstruktur auf [Matsumoto *et al.*, 2002]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Stuart *et al.* [1998] der PHA-Granula aus *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas oleovorans* deuteten auf das Vorhandensein hochgeordneter geometrischer „Pattern“. Diese waren jedoch

auf Granula aus *R. eutropha* nicht nachweisbar. Hiraishi *et al.* [2005] untersuchten die nach einer *in vitro* Synthese (ohne Phospholipide und Phasine) mit der PHB-Synthase aus *R. eutropha* gebildeten Granula mittels Rasterkraftmikroskopie und beobachteten ebenfalls eine partikuläre Oberfläche, vermutlich bestehend aus PHB-Synthase Molekülen.

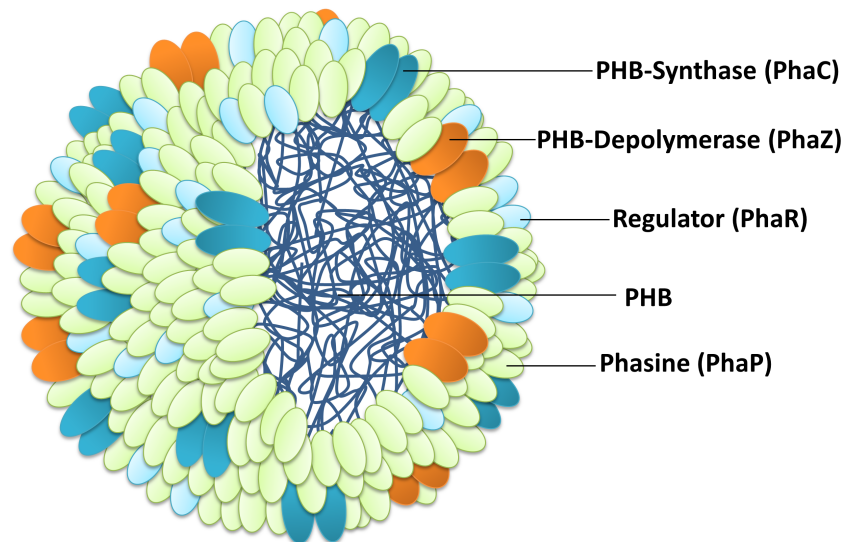


Abbildung 1.1.: Schematische Darstellung eines PHB-Granulums. Das Innere besteht aus dem PHB-Polymer, welches von einer Oberflächenschicht umgeben ist, die unter anderem katalytische und strukturelle Proteine sowie möglicherweise Phospholipide enthält. Bei den gebundenen Proteinen handelt es sich um PHB-Synthasen (PhaC), PHB-Depolymerasen (PhaZ), strukturelle Proteine (Phasine, PhaP), Regulatorproteine (PhaR) und um Proteine mit bisher unbekannter Funktion.

In PHB-produzierenden Bakterien konnten bisher vier verschiedene Klassen Granula-assoziiierter Proteine gefunden werden (Abbildung 1.1): (1) PHB-Synthasen (PhaC), (2) intrazelluläre PHB-Depolymerasen (PhaZ), (3) Phasine (PhaP) und (4) ein Regulatorprotein der Phasinexpression (PhaR) [Pötter und Steinbüchel, 2006; Steinbüchel *et al.*, 1995]. Nach heutigem Wissensstand sollten PHB-Granula eher als komplexe subzelluläre organellenartige Strukturen und nicht nur als einfache Polymerspeicher betrachtet werden [Jendrossek, 2009].

1.2.1. PHB-Synthasen

Die PHB-Synthase stellt das Schlüsselenzym der PHB-Synthese dar, welche durch Coenzym A aktivierte Einheiten von (*R*)-3-Hydroxybuttersäure zum Polymer verknüpft. Abhängig von ihrer Substratspezifität, ihrem Aufbau und anhand von Sequenzähnlichkeiten können PHA-Synthasen in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden [Rehm, 2003, 2006; Stubbe und Tian, 2003; Stubbe *et al.*, 2005]. Klasse I und Klasse II PHA-Synthasen bestehen aus nur einer Untereinheit mit einem Molekulargewicht zwischen 61 kDa und 73 kDa. Je nach Substratspezifität akzeptieren Klasse I PHA-Synthasen (z.B. in *R. eutropha*) hauptsächlich CoA-aktivierte (*R*)-3-Hydroxycarbonsäuren mit 3 bis 5 C-Atomen, während Klasse II PHA-Synthasen (z.B. in *Pseudomonas putida*) bevorzugt CoA-Thioester verschiedener (*R*)-3-Hydroxycarbonsäuren mit 6 bis 14 C-Atomen umsetzen. Bei den Klasse III PHA-Synthasen (z.B. in *Allochromatium vinosum*) handelt es sich um Enzyme aus zwei verschiedenen Untereinheiten (PhaC Untereinheit mit rund 40 kDa und etwa 21 - 28 % Sequenzidentität zu Klasse I und II PHA-Synthasen und der PhaE Untereinheit mit ebenfalls etwa 40 kDa und keiner Sequenzähnlichkeit zu Klasse I und II). Klasse III PHA-Synthasen bevorzugen CoA-aktivierte Hydroxycarbonsäuren mit 3 bis 5 C-Atomen. Klasse IV PHA-Synthasen (z.B. in *Bacillus megaterium*) sind ähnlich den Klasse III PHA-Synthasen, allerdings ist hier die PhaE Untereinheit durch PhaR (ca. 20 kDa) ersetzt, wobei PhaR hier im Gegensatz zu *R. eutropha* keinen Regulator darstellt.

Alle PHA-Synthasen haben ein charakteristisches Cystein im aktiven Zentrum gemeinsam (Cystein 319 in *R. eutropha*). Dieses befindet sich in einer katalytischen Triade mit anderen konservierten Aminosäuren (Histidin und Aspartat), vergleichbar mit Esterasen und Lipasen [Stubbe und Tian, 2003]. PHA-Synthasen sind damit der Superfamilie der α/β -Hydrolasen zugehörig [Jia *et al.*, 2000]. Für die Aktivität der *R. eutropha* PHB-Synthase ist eine Dimerisierung des Enzyms notwendig [Gerngross und Martin, 1995; Wodzinska *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2003]. In *R. eutropha* existiert neben der PHB-Synthase PhaC1 das Gen einer weiteren PHB-Synthase (*phaC2*) [Pohlmann *et al.*, 2006].

Dieses wird allerdings nach bisherigem Wissensstand als nicht exprimiert betrachtet [Brigham *et al.*, 2010; Peplinski *et al.*, 2010].

Es konnte mittels verschiedener Methoden gezeigt werden, dass Synthasen an der Oberfläche nativer PHB-Granula lokalisiert sind:

- Eine PHB-Synthaseaktivität ist mit isolierten nativen PHB-Granula assoziiert [Griebel und Merrick, 1971]
- Immunogoldlabeling der Synthase in Kombination mit Elektronenmikroskopie [Gerngross *et al.*, 1993; Liebergesell *et al.*, 1994; Mayer *et al.*, 1996] sowie Rasterkraftmikroskopie [Hiraishi *et al.*, 2005]
- Bestimmung der *in vivo*-Lokalisation von PhaC-Gfp-Fusionsproteinen [Jendrossek, 2009; McCool und Cannon, 1999; Peters *et al.*, 2007; Peters und Rehm, 2005]
- Cho *et al.* [2012] konnten mit einem Strep-Tag versehenes PhaC1 als Komplex zusammen mit einem ≈ 350 kDa PHB-Molekül und dem Phasin PhaP1 aufreinigen

1.2.2. Intrazelluläre PHB-Depolymerasen

Der Abbau von PHA innerhalb der Zelle (Mobilisierung) wird durch intrazelluläre PHA-Depolymerasen (i-PHA-Depolymerasen) katalysiert, welche eine Spezifität für amorphe PHA aufweisen [Handrick *et al.*, 2000; Jendrossek und Handrick, 2002; Saito *et al.*, 1992]. Intrazelluläre PHA-Depolymerasen sind dabei normalerweise in oder an der Oberflächenschicht der Granula lokalisiert, so dass schonend isolierte nPHA-Granula eine gewisse Eigenhydrolyseaktivität aufweisen [Jendrossek und Handrick, 2001]. Während zum Abbau von denaturierten, extrazellulären PHA bereits eine größere Anzahl dazu befähigter Enzyme bekannt ist [Jendrossek und Handrick, 2001], ist die Zahl untersuchter intrazellulärer Depolymerasen vergleichsweise gering. Einen Überblick gibt die PHA-Depolymerase Engineering Database¹ [Knoll *et al.*, 2009].

¹<http://www.ded.uni-stuttgart.de/>

Die ersten biochemischen Studien zum intrazellulären PHB-Abbau wurden von [Merrick und Doudoroff, 1964] an *Rhodospirillum rubrum* durchgeführt. Diese konnten zeigen, dass Zellextrakte aus *Rhodospirillum rubrum* zwei lösliche Komponenten enthalten, einen hitzestabilen Aktivator und die PHB-Depolymerase selbst, welche für die Hydrolyse von nPHB-Granula nötig sind. Da der Effekt des Aktivators durch vorsichtige Behandlung der nPHB-Granula mit Trypsin [Griebel und Merrick, 1971] oder unspezifischen Proteasen [Technow, 1999] ersetzt werden konnte, wurde angenommen, dass dieser die Zugänglichkeit der PHB-Depolymerase zum Polymer durch Entfernung von Proteinen an der Granulaoberfläche, ähnlich einer Protease, ermöglicht. Später konnte gezeigt werden, dass es sich beim Aktivator (ApdA) um ein Phasin (ohne Proteaseaktivität) handelt [Handrick *et al.*, 2004b]. Die nPHB-Depolymerase selbst (PhaZ1) wurde ebenfalls gereinigt und kloniert [Handrick, 2003; Handrick *et al.*, 2004a]. Hierbei zeigte sich, dass es sich hierbei um ein im Periplasma lokalisiertes und nicht um ein, wie ursprünglich vermutet, intrazelluläres Enzym handelt. Intrazelluläre Depolymerasen aus *Rhodospirillum rubrum* wurden mittlerweile ebenfalls identifiziert [Sznajder und Jendrossek, 2011]. Andere charakterisierte i-PHB-Depolymerasen stammen beispielsweise aus *Paracoccus denitrificans* [Gao *et al.*, 2001] oder *Bacillus thuringiensis* [Tseng *et al.*, 2006]. Eine intrazelluläre nPHB-Depolymerase aus *Bacillus megaterium*, welche auch in der Lage ist denaturiertes PHB umzusetzen, wurde von Chen *et al.* [2009] beschrieben.

Von Saegusa *et al.* [2001] wurde die erste intrazellulär vorliegende PHB-Depolymerase (PhaZa1) aus *R. eutropha* charakterisiert. PhaZa1 gehört zur Gruppe der Cysteinhydrolasen [Kobayashi und Saito, 2003]. Mittlerweile sind Belege dafür vorhanden, dass *R. eutropha* bis zu sieben PHB-Depolymerasen (PhaZa1 - PhaZa5 sowie PhaZd1 und PhaZd2, alternative Bezeichnung PhaZ1 - PhaZ7) und zwei Oligomerhydrolasen (PhaZb und PhaZc, alternativ PhaY1 und PhaY2) besitzt [Abe *et al.*, 2005; Gebauer, 2009; Handrick *et al.*, 2000; Kobayashi und Saito, 2003; Kobayashi *et al.*, 2003, 2005; Leuprecht, 2012; Pohlmann *et al.*, 2006; Saegusa *et al.*, 2001, 2002; Schwartz *et al.*, 2003; Uchino *et al.*, 2007, 2008; York *et al.*, 2003]. Signifikante Depolymeraseaktivität *in vivo* konnte allerdings bisher nur für PhaZa1 eindeutig belegt werden [Handrick *et al.*, 2000;

Uchino *et al.*, 2007, 2008; York *et al.*, 2003]. Deletionen anderer Depolymerasen haben zumindest teilweise in Kombination mit einer *phaZa1*-Deletion ein verändertes Abbauverhalten zur Folge [York *et al.*, 2003], was eine Beteiligung dieser Enzyme am intrazellulären PHB-Abbau vermuten lässt. Neue elektronenmikroskopische Vergleichsstudien verschiedener PHB-Depolymerasemutanten von *R. eutropha* zeigen, dass PHB-Depolymerasen offenbar nicht nur einen Einfluss auf das Abbauverhalten sondern auch auf die dreidimensionale Struktur der Granula haben. Sie sind damit möglicherweise während der PHB-Bildungsphase an Umbauprozessen der PHB-Granula beteiligt [Brigham *et al.*, 2012a]. PhaZa1 liegt *in vivo* Granula-gebunden vor [Uchino *et al.*, 2008]. Des Weiteren konnten Uchino *et al.* zeigen, dass PhaZa1 in der Lage ist PHB in Gegenwart von CoA zu 3-Hydroxybutyryl-CoA (3-HB-CoA) zu spalten, eine Reaktion die als Thiolyse bezeichnet wurde [Uchino und Saito, 2006; Uchino *et al.*, 2007]. Der Vorteil für die Zelle liegt vermutlich in einer Konservierung der normalerweise bei der Hydrolyse des Polyesters frei werdenden Energie in Form des energiereichen Thioesters 3-HB-CoA. Eine, wenn auch nur sehr schwache, thiolytische Aktivität wurde zuvor erstmals für die PHB-Synthase aus *R. eutropha* nachgewiesen [Uchino und Saito, 2006].

1.2.3. Phasine

Phasine sind kleine strukturelle, katalytisch offenbar nicht aktive Proteine und bilden den Hauptanteil der Granulahülle [Pötter und Steinbüchel, 2006]. Sie sind von grundlegender Bedeutung für die Größe und Anzahl der gebildeten Granula. Zudem sind sie für deren strukturelle Integrität verantwortlich [Wieczorek *et al.*, 1995]. Phasine sind jedoch nicht essentiell für eine Bildung von PHB. Die Bezeichnung „Phasin“ ist von den „Oleosinen“ abgeleitet, welches amphiphile Strukturproteine sind, die sich an der Oberfläche der Ölkörper (Oleosomen) bestimmter Pflanzenzellen befinden [Steinbüchel *et al.*, 1995; Wieczorek *et al.*, 1995].

In *R. eutropha* H16 ist PhaP1 das Hauptphasin und bedeckt vermutlich den überwiegenden Teil der Granulaoberfläche. Der Anteil von PhaP1 am Gesamtzellprotein kann

bis zu 5 % (w/w) ausmachen [Wieczorek *et al.*, 1995]. Eine Überexpression von PhaP1 führt zu einer erhöhten Anzahl kleiner PHB-Granula, während *phaP1*-Deletionsmutanten nur wenige sehr große Granula bilden und einen verminderten PHB-Gehalt aufweisen [Wieczorek *et al.*, 1995; York *et al.*, 2001b]. Wieczorek *et al.* [1995] konnten mittels Immunogoldmarkierung zeigen, dass sich PhaP1 an der Oberfläche der PHB-Granula befindet. Dieser Befund wurde von Neumann *et al.* [2008] durch Fluoreszenzmikroskopie (Gfp-Fusion) und Immunoblot bestätigt. Ein diskretes PHB-Bindemotiv konnte hierbei jedoch nicht gefunden werden. Die Quartärstruktur von PhaP1 wurde als ein Trimer vermutet [Neumann *et al.*, 2008]. Eine Expression von PhaP1 in Bakterien, welche Lipideinschlüsse (Triacylglyceride) bilden zeigte, dass PhaP1 auch in der Lage ist *in vivo* an diese zu binden [Hänisch *et al.*, 2006; Wältermann *et al.*, 2005].

Neben PhaP1 wurden in *R. eutropha* H16 drei weitere Phasine (PhaP2, PhaP3 und PhaP4) gefunden, welche zwischen 32 und 64 % Sequenzidentität zueinander aufweisen [Pohlmann *et al.*, 2006; Pötter *et al.*, 2004, 2005; Pötter und Steinbüchel, 2005]. Transkriptomdaten zeigen, dass die Gene aller vier Phasine unter PHB-Speicherbedingungen abgelesen werden [Brigham *et al.*, 2010, 2012b; Peplinski *et al.*, 2010; Pötter *et al.*, 2004]. Die Expression des Hauptphasins PhaP1 ist jedoch bei weitem am stärksten. Einzelne Deletionen der Gene *phaP2*, *phaP3* und *phaP4* zeigen keinen Phänotyp [Kuchta *et al.*, 2007; Pötter *et al.*, 2005]. PhaP3 und PhaP4, nicht aber PhaP2, konnten von Pötter *et al.* [2004] massenspektrometrisch als PHB-Granula-assoziierte Proteine nachgewiesen werden. Jedoch zeigten Bindungsstudien, dass PhaP2 *in vitro* ebenfalls die Fähigkeit besitzt an PHB zu binden [Pötter *et al.*, 2004]. PhaP2 wurde zudem vormals von Srinivasan *et al.* [2002] als ein unter PHB-Synthesebedingungen hochreguliertes Protein im Proteom nachgewiesen, war allerdings zu diesem Zeitpunkt noch nicht als weiteres Phasin bekannt. In einer Δ *phaP1* Mutante wurde ein erhöhter Level von PhaP3 gefunden, was dafür spricht, dass PhaP3 in der Lage ist den Verlust von PhaP1 teilweise zu kompensieren [Pötter *et al.*, 2004]. Die genaue Funktion der Phasine PhaP2, PhaP3 und PhaP4 ist bislang unklar. Auch eine Rolle von Phasinen beim PHB-Abbau wurde vermutet [Kuchta *et al.*, 2007]. In anderen PHA-Produzenten wie PHA_{MCL}-bildenden

Pseudomonaden (z.B. *Pseudomonas putida* [Galán *et al.*, 2011; Prieto *et al.*, 1999]) oder Gram-positiven PHB-speichernden Bakterien (z.B. *Bacillus mageterium* [McCool und Cannon, 1999]) finden sich ebenfalls Phasine. Die verschiedenen Phasinsubtypen weisen allerdings teils beträchtliche Unterschiede in ihrer Sequenz zueinander auf [McCool und Cannon, 1999]. Einen Überblick hierzu gibt Abschnitt 2.3.

Interessanterweise zeigten Rasterkraftmikroskopaufnahmen von isolierten nPHB-Granula, dass das Phasin PhaP1 für die Ausbildung einer netzwerkartigen Struktur auf der Oberfläche der PHB-Granula, ähnlich eines Cytoskeletts, notwendig ist [Dennis *et al.*, 2008]. Deletionsmutanten von *phaP1* weisen stattdessen ein eher zufälliges Muster globulärer Strukturen auf. Welche Rolle PhaP1 bei der Ausbildung derartiger Strukturen übernimmt und ob es selbst ein Bestandteil dieser ist, ist bisher nicht bekannt. Die gefundenen Strukturen scheinen von ungewöhnlich hoher Stabilität zu sein, da sie auch nach einer Behandlung der Zellen mit Natriumhypochlorit noch sichtbar sind. Über eine Natriumhypochloritbehandlung aus lyophilisierten *R. eutropha* Zellen isolierte PHB-Granula behalten die Zellform bei, was ebenso für das Vorhandensein bisher noch unbekannter cytoskelettähnlicher Elemente spricht, welche eine strukturelle Verknüpfung der Granula bewirken [Kuchta *et al.*, 2007].

1.2.4. Regulatorproteine

Pötter *et al.* [2002] konnten in *R. eutropha* ein Protein mit regulatorischer Funktion (PhaR) identifizieren. PhaR besitzt nicht nur die Fähigkeit an PHB-Granula zu binden, sondern kann durch Bindung an regulatorische DNA-Bereiche die Expression der Gene *phaP1* und *phaP3* sowie seines eigenen Gens (*phaR*) regulieren (Autoregulation) [Pötter *et al.*, 2002, 2005; Pötter und Steinbüchel, 2005; York *et al.*, 2001a, 2002]. PhaR fungiert hierbei als transkriptioneller Repressor und bindet an DNA-Regionen oberhalb der entsprechenden Gene [Pötter *et al.*, 2002, 2005]. Unter Abwesenheit von PHB liegt PhaR überwiegend DNA-gebunden vor und reprimiert die Expression der Phasine PhaP1 und PhaP3. Kommt es zu einer Bildung von PHB bindet PhaR an die Granula und die Re-

pression der Phasingene wird aufgehoben. Die gebildeten Phasine binden ebenfalls an PHB und verdrängen so PhaR wieder nach und nach von den Granula, bis eine vollständige Abdeckung der Granula-Oberfläche mit Phasinen (hauptsächlich PhaP1) erreicht ist. Hierdurch wird die Expression ihrer Gene wieder langsam abgeschaltet.

Eine $\Delta phaR$ Mutante bildet eine große Anzahl kleiner PHB-Granula, da durch Wegfallen der Autoregulation PhaP1 überproportional gebildet wird [Pötter *et al.*, 2002]. In *Paracoccus denitrificans* scheint die Regulation durch PhaR identisch zu der in *R. eutropha* zu sein [Maehara *et al.*, 2001, 2002, 1999; Yamada *et al.*, 2007]. In *Bacillus megaterium* wurde ebenfalls ein Repressor (PhaQ) identifiziert, welcher in der Lage ist an PHB zu binden und seine eigene sowie die Expression des Phasins (PhaP) reprimiert [Lee *et al.*, 2004]. PhaQ weist allerdings keine signifikanten Ähnlichkeiten zu PhaR aus *R. eutropha* oder *Paracoccus denitrificans* auf.

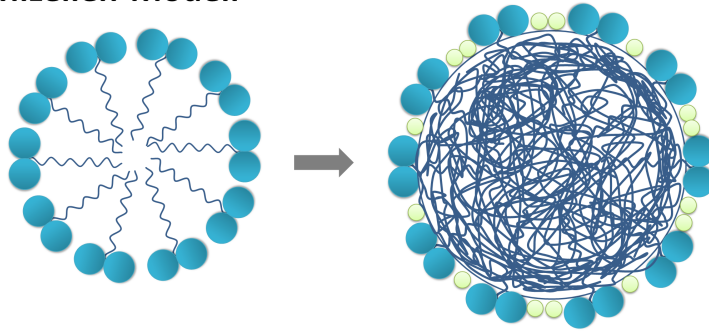
In *Pseudomonas putida* wurden zwei Proteine (PhaF und PhaI) gefunden, die vermutlich als Phasine fungieren, aber auch eine regulatorische Funktion haben [Matsumoto *et al.*, 2002; Prieto *et al.*, 1999]. PhaF besitzt offenbar eine duale Funktion, indem es direkt oder indirekt die Expression der PHA-Synthase sowie von *phaF* und *phaI* reguliert [Hoffmann und Rehm, 2004; Prieto *et al.*, 1999]. Mittels einer Histon-ähnlichen Domäne ist PhaF zudem in der Lage unspezifisch an DNA (Nukleoid) zu binden. PhaF kann ferner selbst an die Granula binden und ist damit an der räumlichen Verteilung von PHB-Granula in der Zelle und bei der Zellteilung beteiligt [Galán *et al.*, 2011]. Ein weiterer Transkriptionsregulator (PhaD) reguliert in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle die Expression des *phaIF* Operons und einer benachbarten Transkriptionseinheit, welche zwei Gene einer PHA-Synthase (*phaC1* und *phaC2*), ein Gen einer Depolymerase (*phaZ*) sowie das *phaD* Gen selbst enthält [de Eugenio *et al.*, 2010].

1.3. Biosynthese und intrazelluläre Lokalisation nativer PHB-Granula

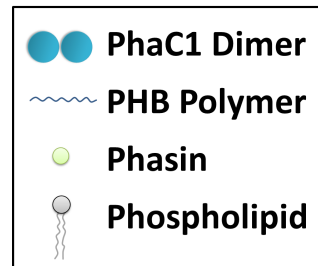
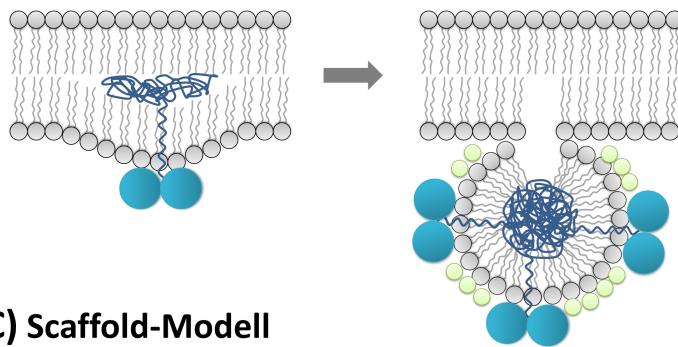
Für die Biosynthese nativer PHB-Granula *in vivo* wurden verschiedene Modelle propagiert (Abbildung 1.2). Die Bildung von Mizellen durch die PHB-Synthase (A) sowie die Ausbildung der Granula an der Cytoplasmamembran („Budding-Modell“, (B)) [Stubbe und Tian, 2003]. Nach einer weiteren Modellvorstellung („Scaffold-Modell“ [Cho *et al.*, 2012]) erfolgt die Bildung der PHB-Granula an so genannten „Mediation Elements“ in der Zellmitte (C) [Tian *et al.*, 2005a,b]. Die Modellvorstellung der Bildung von PHB-Granula an den „Mediation Elements“ ist prinzipiell mit der eines Mizellen-Modells kombinierbar. Nach dem Mizellen-Modell kommt es während der Synthese von Polymerketten aus löslichen Substraten durch die PHB-Synthase aufgrund zunehmender Hydrophobizität zur Bildung mizellenartiger Strukturen im Cytoplasma. Die PHB-Synthase bleibt an der Oberfläche der PHB-Granula gebunden. Das „Budding-Modell“ nimmt an, dass sich die PHB-Synthase an bzw. in der Zellmembran befindet und die wachsende PHB-Polymerkette in die Cytoplasmamembran freisetzt, wo es durch die hydrophobe Interaktion mit dem Phospholipidbilayer zur Ausbildung cytoplasmamembrangebundener PHB-Granula kommt. Mit zunehmender Größe lösen sich PHB-Granula von der Zellmembran ab und befinden sich dann im Cytoplasma. PHB-spezifische Proteine (z.B. Phasine, PHB-Depolymerasen) binden bei diesem Vorgang an die PHB-Granula.

Während nach dem Mizellen-Modell PHB-Granula zufällig verteilt in der Zelle vorliegen, ergibt sich als Konsequenz aus dem „Budding-Modell“, dass PHB-Granula in der frühen Phase ihrer Bildung nahe oder an der Zellmembran lokalisiert sind. Mikroskopische Studien mit *Rhodospirillum rubrum*, *R. eutropha*, *Azotobacter vinelandii*, *Caryophanon latum* und rekombinanten *E. coli* (mit *phaCAB*) geben Hinweise darauf, dass die PHB-Granulabildung an der Zellmembran erfolgt [Hermawan und Jendrossek, 2007; Jendrossek, 2005, 2009; Jendrossek *et al.*, 2007; Peters *et al.*, 2007; Peters und Rehm, 2005; Shekhovtsev und Zharikova, 1978]). Nach anderen Daten liegt die PHB-Synthase

A) Mizellen-Modell



B) Budding-Modell



C) Scaffold-Modell

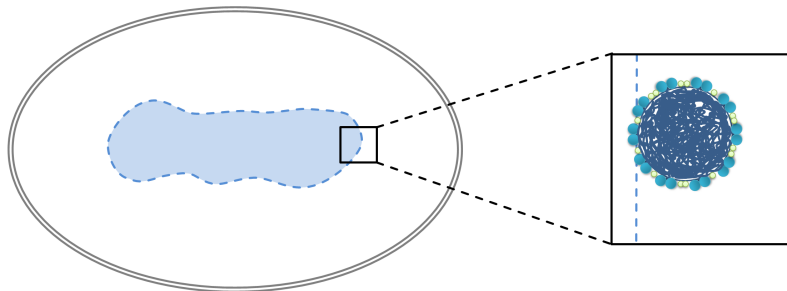


Abbildung 1.2.: Modelle zur PHB-Granulabildung. (A) Entstehung von PHB-Granula durch Mizellenbildung. (B) PHB-Granulabildung durch „Budding“ an der inneren Zellmembran. (C) „Scaffold-Modell“ - Die PHB-Granulabildung erfolgt hierbei an so genannten „Mediation Elements“ in der Zellmitte. Erklärung siehe Text. Proteinsymbole sind nicht maßstabsgetreu dargestellt.

in PHB-freien Zellen im Cytoplasma vor [Gerngross *et al.*, 1993; Haywood *et al.*, 1989] und die Initiation der PHB-Synthese findet mehr oder weniger in der Mitte der Zelle an bestimmten Strukturen („Mediations Elementes“) statt [Beeby *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2005a,b]. Dies steht im Gegensatz zur Hypothese einer Bildung der PHB-Granula an der Zellmembran.

1.4. Zielsetzung

Wie vorangegangene Arbeiten zeigten, liegen PHB-Granula in der frühen Phase ihrer Bildung nicht zufällig verteilt in der Zelle vor, sondern sind häufig an den Zellpolen oder der inneren Seite der Cytoplasmamembran lokalisiert. Diese Annahme wurde durch die in der Literatur beschriebenen cytoskelettartigen Strukturen auf der Oberfläche nativer PHB-Granula unterstützt. Diese Arbeiten ließen eine spezifische Interaktion zwischen PHB-Granula-assoziierten Proteinen mit noch unbekanntem Zielstrukturen in der Zellperipherie vermuten. Aufgrund der vorliegenden Hinweise einer nicht zufälligen Lokalisierung von PHB-Granula sollten verschiedene Ansätze zur Identifizierung neuartiger Proteine des PHB-Granulumkomplexes von *R. eutropha* H16 (Modellorganismus der PHB-Speicherung) verfolgt werden (Kapitel 2). Hierbei sollten unter anderem Protein-Protein-Interaktionsstudien durchgeführt werden, mit der Absicht Proteine, welche möglicherweise an einer Steuerung der Lokalisierung der PHB-Granula beteiligt sind, über eine Interaktion mit bereits bekannten PHB-Granula-assoziierten Proteinen (PHB-Synthase, Phasine) zu identifizieren. In diesen Experimenten gefundene Kandidatenproteine sollten dann einer Funktionsanalyse unterzogen werden. Hierzu sollten über mikroskopische Untersuchungen ihre intrazelluläre Lokalisierung sowie durch Ausschalten beziehungsweise Überexpression der zugehörigen Gene ihr Einfluss auf Größe, Anzahl und Lokalisierung der PHB-Granula bestimmt werden. Die Ergebnisse dazu sind in Kapitel 3 beschrieben. Da die Lokalisierung der PHB-Synthase sowie weiterer PHB-assoziiierter Proteine in PHB-freien Zellen beziehungsweise in der frühen Phase der Granulabildung nicht eindeutig geklärt war, sollte der Entstehungsmechanismus und Bildungsort der PHB-Granula in diesem Projekt ebenfalls untersucht werden. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse und eine detaillierte Beschreibung der verschiedenen Vorstellungen zur Granula Biogenese mit einem überarbeiteten Modell gibt Kapitel 4.

2 | Identifizierung neuartiger Proteine des PHB-Granulumkomplexes

Eine Zielsetzung dieser Arbeit war die Identifizierung und Funktionsanalyse neuartiger Proteine des PHB-Granulumkomplexes. Zur Auffindung bisher nicht beschriebener Gen- bzw. Proteinkandidaten mit möglicher Funktion im PHB-Stoffwechsel, wurden drei verschiedene Strategien verfolgt. Proteine, welche spezifisch mit der PHB-Synthase oder anderen Oberflächenproteinen der PHB-Granula (z.B. Phasinen) interagieren, sollten durch einen Two-Hybrid Assay identifiziert werden (Abschnitt 2.1). Um unbekannt am PHB-Granulum gebundene Proteine zu identifizieren, wurde zudem eine Proteomanalyse nativer mittels Dichtegradientenzentrifugation isolierter PHB-Granula durchgeführt (Abschnitt 2.2). Weiterhin wurde basierend auf der veröffentlichten Genomsequenz von *R. eutropha* H16 [Pohlmann *et al.*, 2006] eine Datenbanksuche nach Konsensusmotiven zur Ermittlung von Verwandtschaftsverhältnissen sowie zur Auffindung weiterer Phasinartiger Proteine in *R. eutropha* eingesetzt (Abschnitt 2.3).

2.1. Protein-Interaktionsstudien

Protein-Protein-Wechselwirkungen sind bei der Regulation und Steuerung zellulärer Prozesse von zentraler Bedeutung. Vorangegangene Arbeiten welche auf eine nicht zufällige Lokalisierung der PHB-Granula deuten [Hermawan und Jendrossek, 2007; Jendrossek, 2005], legten die Vermutung nahe, dass Wechselwirkungen PHB-assoziiierter Proteine mit

noch unbekanntem Proteinen in der Zellperipherie an der Steuerung der intrazellulären Lokalisierung der Granula beteiligt sind. Diese Annahme wurde durch die Beschreibung von cytoskelettähnlichen Strukturen auf der Oberfläche von isolierten PHB-Granula unterstützt [Dennis *et al.*, 2008; Kuchta *et al.*, 2007]. Vorhandene Daten zeigen klar, dass die Lokalisation subzellulärer Komponenten präzise in der Zelle gesteuert wird. So sind Protein-Wechselwirkungen beispielsweise bei der Bildung von Magnetosomen in magnetotaktischen Bakterien von Bedeutung. Hierbei kommt es zur Interaktion des Magnetosom-gebundenen Proteins MamJ mit dem Cytoskelettprotein MamK [Komeili, 2007; Komeili *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2007; Scheffel *et al.*, 2008, 2006]. Auch für die subzelluläre Organisation von Carboxysomen in *Synechococcus elongatus* wurde ein geregelter Mechanismus unter Beteiligung des Cytoskelettproteins ParA vermutet [Savage *et al.*, 2010]. Ebenso wurde in methanogenen Archaeen eine geregelte Lokalisierung für Polyphosphat-Granula diskutiert [Toso *et al.*, 2011]. Ferner zeigen beispielsweise transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen von *Caryophanon latum*, dass ein minimaler Abstand von etwa 14 nm zwischen PHB-Granulum und Cytoplasmamembran besteht. Dies deutet darauf hin, dass andere Komponenten (möglicherweise Proteine) für den Kontakt zwischen Granulum und Membran notwendig sind [Jendrossek *et al.*, 2007]. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb Proteine in der Zellperipherie, welche spezifisch mit der PHB-Synthase oder anderen Oberflächenproteinen der PHB-Granula (z.B. Phasinen) interagieren, durch einen „Two-Hybrid Assay“ identifiziert werden. Gefundene Interaktionen sollten anschließend gegebenenfalls über weitere Methoden bestätigt werden.

2.1.1. Methoden zur Analyse von Protein-Wechselwirkungen

2.1.1.1. Two-Hybrid

Bei der Two-Hybrid Technik handelt es sich um eine genetische Methode, welche sich den modularen Aufbau von Transkriptionsaktivatoren zunutze macht. Diese bestehen

aus einer DNA-Bindedomäne und einer transkriptionsaktivierenden Domäne [Phizicky und Fields, 1995]. Werden beide Domänen getrennt an zwei interagierende Proteine fusioniert ist eine funktionelle Komplementation des Transkriptionsregulators möglich. Neben den klassischen ursprünglich in Hefe entwickelten Two-Hybrid Assays [Fields und Song, 1989] existieren auch bakterielle Two-Hybrid Systeme [Hu *et al.*, 2000; Ladant und Karimova, 2000; Stynen *et al.*, 2012], welche ihre Vorteile in der Einfachheit ihrer Handhabung sowie bei der Durchmusterung großer DNA-Banken ausspielen. Diese bakteriellen Two-Hybrid Systeme beruhen beispielsweise auf dem *E. coli* LexA Repressorprotein [Dmitrova *et al.*, 1998; Kornacker *et al.*, 1998]. Andere Systeme basieren auf einer Rekonstituierung eines aktiven λ -Repressors [Dove und Hochschild, 2004; Lallo *et al.*, 1999] oder einer Adenylatzyklaseaktivität (CyaA) in *E. coli* *cyaA*-Knockout Stämmen [Battesti und Bouveret, 2012; Karimova *et al.*, 1998, 2000]. Auch ein Two-Hybrid System basierend auf dem PHB-Regulatorprotein PhaR wurde kürzlich beschrieben [Wang *et al.*, 2011].

Das von Karimova *et al.* entwickelte „bakterielle Adenylatzyklase Two-Hybrid System“ (BACTH) konnte bereits in zahlreichen Beispielen [Commichau *et al.*, 2009; de Paz *et al.*, 2005; Karimova *et al.*, 2009, 2001; Klepp *et al.*, 2009; Lüttmann *et al.*, 2009; Parashar *et al.*, 2009; Ringgaard *et al.*, 2007; Rust *et al.*, 2009] erfolgreich zur Identifizierung neuartiger Protein-Protein-Wechselwirkungen, unter anderem auch mit Membranproteinen [Claessen *et al.*, 2008; Karimova *et al.*, 2005; Lenarcic *et al.*, 2009], verwendet werden. Es erschien deshalb für die gegebene Problemstellung als besonders geeignet. Bei diesem genetischen Testsystem werden zwei putative Protein-Interaktionspartner (X und Y) an zwei komplementäre Fragmente (T18 und T25) der katalytischen Domäne der Adenylatzyklase aus *Bordetella pertussis* fusioniert (Abbildung 2.1). Eine Interaktion der Proteine führt zu einer funktionellen Komplementation der Fragmente T18 und T25 und somit zur Bildung von cAMP in einem *E. coli* Stamm mit fehlender endogener Adenylatzyklase. cAMP wiederum führt zur Aktivierung kataboler Operone (z.B. des Laktose- und Maltose-Operons). Der entsprechende Phänotyp lässt sich in *E. coli* leicht durch die Verwendung verschiedener Indikatormedien untersuchen (Wachstum auf Mi-

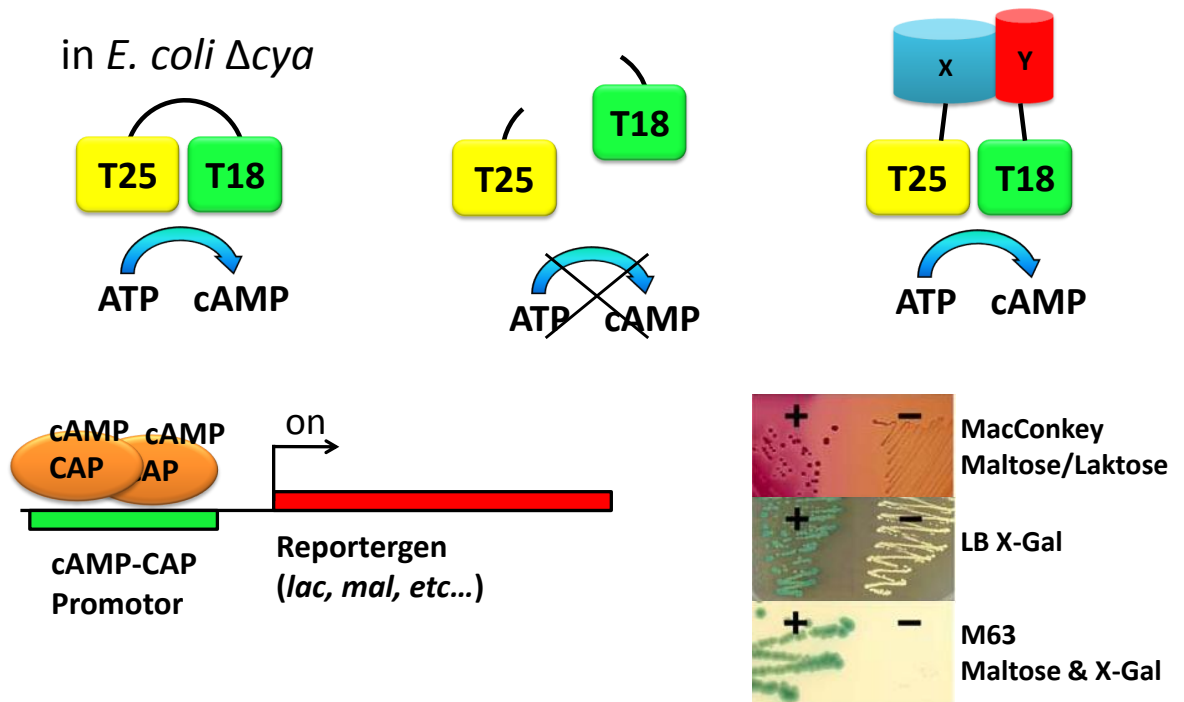


Abbildung 2.1.: Prinzip des BACTH Systems. Eine Interaktion der Proteine X und Y führt zu einer funktionellen Komplementation der Fragmente T18 und T25 einer Adenylatzyklase und somit zur Bildung von cAMP in einem *E. coli* *cya*⁻ Stamm. Nach Karimova *et al.* [1998].

nimalmedium mit Maltose oder Laktose, Rotfärbung auf MacConkey mit Maltose oder Laktose, Blaufärbung auf LB X-Gal Medium). Eine Selektion von Klonen mit erhöhter Adenylatzyklaseaktivität auf Minimalmedien mit Maltose oder Laktose als alleiniger Kohlenstoffquelle erlaubt die Durchmusterung großer Genbanken [Karimova *et al.*, 2009]. Das BACTH-System wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um Interaktionen sowohl von bereits bekannten PHB-assoziierten Proteinen aufzudecken, als auch um neue Interaktionspartner ausfindig zu machen.

2.1.1.2. Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation

Als zweite Technik zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen wurde die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) eingesetzt. Eine Protein-Protein-Interaktion führt hierbei zu einer funktionellen Komplementation des „Yellow Fluorescent Proteins“ (eYfp) [Kerppola, 2006, 2008a,b, 2009]. Über Fluoreszenzmikroskopie kann zudem der Ort der Protein-Wechselwirkung (z.B. PHB-Granulum, Cytoplasmamembran, etc.) in der Zelle sichtbar gemacht werden. BiFC stellt eine Alternative zu FRET (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer) dar. Beide Methoden konnten bereits erfolgreich in Bakterien zum Nachweis von Protein-Interaktionen verwendet werden [Alexeeva *et al.*, 2010; Atmakuri *et al.*, 2003; Kerppola, 2008a; KostECKI *et al.*, 2010; Magliery *et al.*, 2005; Soufo und Graumann, 2006; Vaknin und Berg, 2004]. Zur Durchführung der BiFC werden zwei nicht fluoreszierende Fragmente (YN und YC) beispielsweise des „Yellow Fluorescent Proteins“ an zwei putative Protein-Interaktionspartner (X und Y) fusioniert (Abbildung 2.2). Eine Interaktion der Proteine begünstigt die Ausbildung eines bimolekularen Fluoreszenzkomplexes (fluoreszentes eYfp).

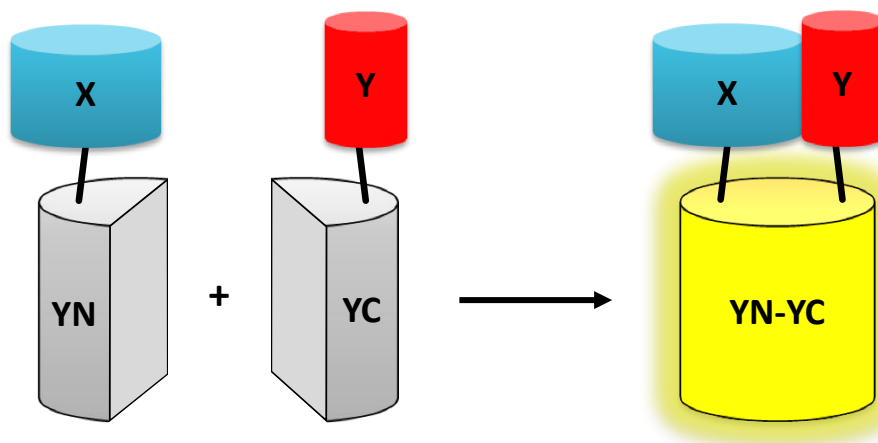


Abbildung 2.2.: Prinzip des BiFC Systems. Zwei nicht fluoreszente Fragmente (YN und YC) des „Yellow Fluorescent Proteins“ (eYfp) werden an zwei putative Interaktionspartner (X und Y) fusioniert. Eine Protein-Interaktion führt zu einer funktionellen Komplementation von eYfp.

Die Vorteile der BiFC im Vergleich zu FRET liegen in dem einfacheren methodischen sowie apparativen Aufwand. Zudem können sehr schwache und transiente Interaktionen detektiert werden, da die Ausbildung der fluoreszenten Komplexe quasi irreversibel ist. Eine Echtzeitanalyse von Interaktionen ist allerdings im Vergleich zu FRET nicht möglich, da die endgültige Ausbildung der Fluoreszenzkomplexe bis zu mehrere Stunden benötigen kann (Ausbildung des Fluorophors durch eine autokatalytische Reaktion) [Kerppola, 2008a]. Durch BiFC sollten insbesondere im Two-Hybrid mit *E. coli* gefundene Interaktionen im ursprünglichen Organismus *R. eutropha* bestätigt werden. Zur Durchführung der BiFC in *R. eutropha* wurde ein System basierend auf den beiden kompatiblen Vektoren pBBR1MCS-2 [Kovach *et al.*, 1995] und pCM62 [Marx und Lidstrom, 2001] entwickelt (Abbildung 1 in Pfeiffer und Jendrossek [2013]). Dieses konnte erfolgreich zum Nachweis von Protein-Wechselwirkungen eingesetzt werden [Pfeiffer und Jendrossek, 2013]. Beide Vektoren verfügen über einen breiten Wirtsbereich und sind durch Konjugation nach *R. eutropha* übertragbar.

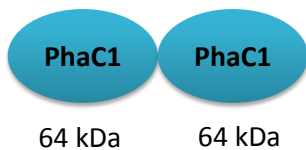
2.1.2. Interaktionen im PHB-Stoffwechsel

2.1.2.1. Two-Hybrid Analyse der PHB-Synthasen aus *Ralstonia eutropha* und *Bacillus megaterium*

Um die Funktionalität des BACTH Systems zu überprüfen, wurden in ersten Experimenten als Beispiele bekannter Protein-Interaktionen aus dem PHB-Stoffwechsel die PHB-Synthasen aus *R. eutropha* und *Bacillus megaterium* (*B. megaterium*) untersucht [Pfeiffer und Jendrossek, 2011]. Für diese konnte eine Interaktion der zugrundeliegenden Untereinheiten bereits direkt oder indirekt nachgewiesen werden [McCool und Cannon, 2001; Wodzinska *et al.*, 1996]. Bei den beiden PHB-Synthasen handelt es sich um die Klasse I PHB-Synthase aus *R. eutropha*, welche aus zwei PhaC1-Untereinheiten (Molekulargewicht des Monomers ca. 64 kDa) aufgebaut ist und um die Klasse IV PHB-Synthase aus *B. megaterium*, welche aus PhaC (ca. 41 kDa) und PhaR (ca. 23 kDa)

(nicht zu verwechseln mit dem gleichnamigen Regulatorprotein PhaR aus *R. eutropha*) besteht [Rehm, 2003, 2006; Stubbe und Tian, 2003; Stubbe *et al.*, 2005]. Zur Durchführung des Two-Hybrid Assays wurden die Untereinheiten der PHB-Synthasen an das T18 bzw. T25 Fragment der *Bordetella pertussis* Adenylatzyklase fusioniert (Abbildung 2.3). Die Konstrukte wurden in den Adenylatzyklase-defizienten Reporterstamm *E. coli* BTH101 kotransformiert und die Stämme auf entsprechenden Indikatorplatten ausplattiert [Pfeiffer und Jendrossek, 2011]. Im Falle der PHB-Synthase aus *R. eutropha* wurde eine C-terminale Fusion an die entsprechenden Adenylatzyklaseuntereinheiten bevorzugt, da das Enzym dies eher zu tolerieren scheint als Fusionen mit seinem eigenen C-Terminus [Jahns und Rehm, 2009].

***Ralstonia eutropha* (Typ I):
PhaC1 Homodimere**



***Bacillus megaterium* (Typ IV) :
PhaC- und PhaR-Untereinheit**

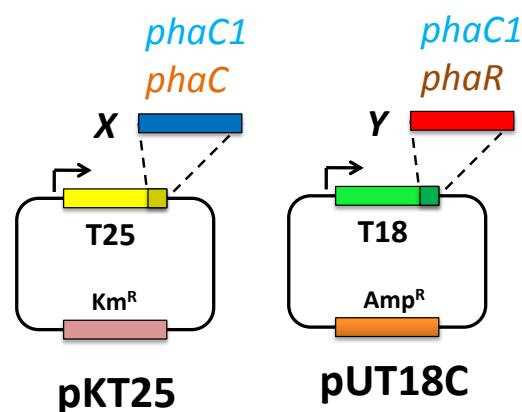
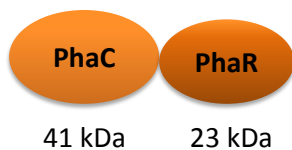


Abbildung 2.3.: Two-Hybrid mit den PHB-Synthasen aus *R. eutropha* und *B. megaterium*. Zur Durchführung des Two-Hybrid Assays wurden die Untereinheiten der PHB-Synthasen (PhaC1 bzw. PhaC und PhaR) C-terminal an das T18 bzw. T25 Fragment der *Bordetella pertussis* Adenylatzyklase fusioniert, wobei die Vektoren pUT18C (high-copy Vektor basierend auf pUC19, Ampicillinresistenz) und pKT25 (low-copy Vektor basierend auf pSU40, Kanamycinresistenz) verwendet wurden.

Nach Inkubation der Platten zeigte sich sowohl bei der Positivkontrolle (Leucinzipper), als auch bei den Kombinationen mit beiden PHB-Synthaseuntereinheiten (T18-PhaR_{Bmeg} + T25-PhaC_{Bmeg}, T18-PhaC1_{Reu} + T25-PhaC1_{Reu}) eine Blaufärbung der Kolonien, die Negativkontrollen hingegen blieben weiß (Abbildung 2 in Pfeiffer und Jendrossek [2011]). Im Vergleich zu den Negativkontrollen konnte für die Kombinationen T18-PhaR_{Bmeg}/T25-PhaC_{Bmeg} und T18-PhaC1_{Reu}/T25-PhaC1_{Reu} eine signifikant erhöhte β -Galaktosidaseaktivität gemessen werden (spezifische Aktivität etwa doppelt bis dreimal so hoch wie bei den Negativkontrollen). Diese war allerdings im Vergleich zur Positivkontrolle (Leucinzipper) um etwa den Faktor zehn geringer, was auf relativ schwache Wechselwirkungen der Untereinheiten hindeutete.

Mit dem verwendeten Two-Hybrid System war es somit möglich *in vivo* eine Interaktion der PhaR- und PhaC-Untereinheiten der PHB-Synthase aus *B. megaterium* sowie die Homodimerisierung der PhaC1-Untereinheiten der PHB-Synthase aus *R. eutropha* nachzuweisen. Im Falle von PhaC und PhaR aus *B. megaterium* konnten McCool und Cannon [2001] zwar zeigen, dass für eine Aktivität der PHB-Synthase beide Untereinheiten notwendig sind, ob es zu einer direkten Interaktion von PhaR mit PhaC kommt oder PhaR auf indirektem Weg als Aktivator von PhaC fungiert, war allerdings bisher nicht bekannt.

Eine Dimerisierung der PhaC1-Untereinheiten aus *R. eutropha* konnte bereits von Wodzinska *et al.* [1996] durch Größenausschlusschromatographie sowie durch Mutageneseexperimente [Zhang *et al.*, 2003] nachgewiesen werden. Eine Anwesenheit von CoA-aktivierten Hydroxycarbonsäureverbindungen verstärkte hierbei die Dimerisierung und Aktivierung der PHB-Synthase [Wodzinska *et al.*, 1996]. Die Homodimerisierung der *R. eutropha* PHB-Synthase wurde in der vorliegenden Arbeit zudem durch bimolekulare Fluoreszenzkomplementation bestätigt (Abbildung 3 in Pfeiffer und Jendrossek [2013]). Mittels BiFC ließ sich eine Dimerisierung der Untereinheiten sowohl unter Abwesenheit von PHB (lösliche Fluoreszenzkomplexe mit homogener Verteilung) als auch unter PHB-Speicherbedingungen (PHB-gebundene Fluoreszenzkomplexe) nachweisen.

2.1.2.2. Interaktionen im PHB-Stoffwechsel von *R. eutropha*

Da das Two-Hybrid System geeignet war, um Protein-Protein-Wechselwirkungen von PHB-Synthasen nachzuweisen, wurden zusätzliche Konstrukte erstellt, um weitere Interaktionen im PHB-Stoffwechsel von *R. eutropha* in Form eines Matrix-Schemas [Le-grain und Selig, 2000] aufzudecken. Bei den untersuchten Proteinen handelte es sich um die Phasine (PhaP1 - PhaP4), den Regulator PhaR, die β -Ketothiolase (PhaA) und die Acetoacetyl-CoA Reduktase (PhaB) (beide aus dem *phaCAB*-Operon) sowie die intra-zelluläre PHB-Depolymerase PhaZa1. Insgesamt wurden 99 verschiedene Kombinationen getestet (Abbildung 3 in Pfeiffer und Jendrossek [2011]). Bekannte sowie die dabei neu identifizierten Wechselwirkungen im PHB-Stoffwechsel auf Protein- und DNA-Ebene sind in Abbildung 2.4 schematisch zusammengefasst.

Nahezu alle untersuchten Proteine waren in der Lage Homooligomere auszubilden. Die stärksten Wechselwirkungen (deutlichster Farbumschlag) bei der Ausbildung von Ho-

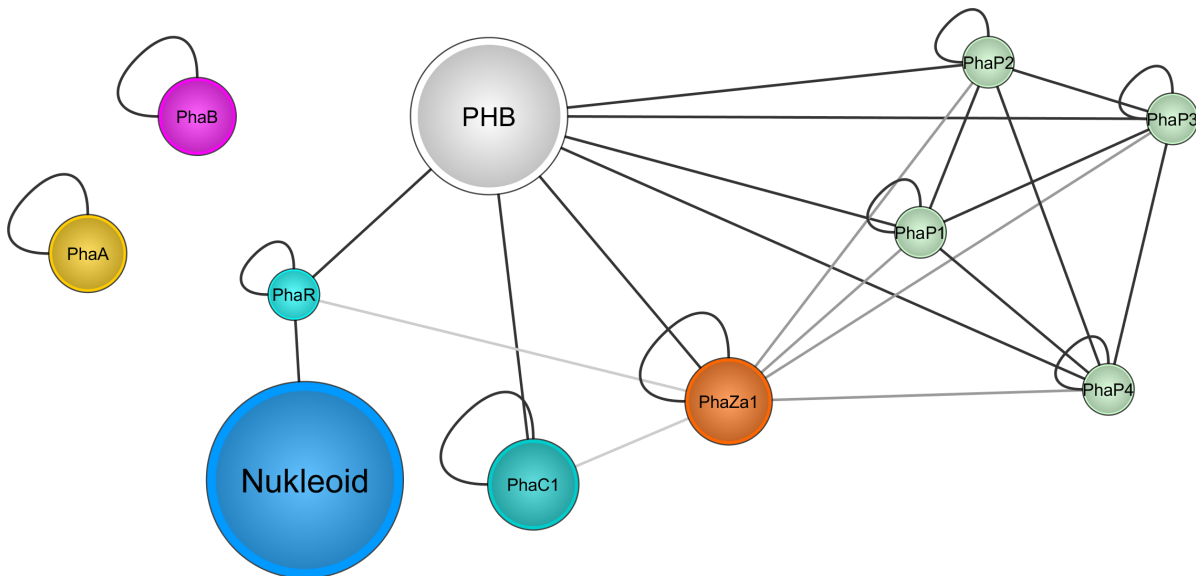


Abbildung 2.4.: Interaktionen zwischen bekannten am PHB-Stoffwechsel von *R. eutropha* beteiligten Proteinen. Basierend auf den im Two-Hybrid identifizierten Protein-Interaktionen wurde ein Interaktionsnetzwerk erstellt. Schwache oder nicht eindeutig belegte Interaktionen sind in grau dargestellt. Neben den Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen sind auch Eigeninteraktionen sowie bekannte Wechselwirkungen mit dem Nukleoid oder den PHB-Granula eingezeichnet.

mooligomeren zeigten PhaP2 und PhaR. Signifikante Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen (Heterooligomerisierung) wurden für die vier Phasine (PhaP1 - PhaP4) festgestellt. Insbesondere PhaP2 und PhaP4 zeigten eine starke Wechselwirkung. Phasine sind demnach nicht nur in der Lage Homooligomere auszubilden, sondern können auch untereinander interagieren und so Heterooligomere bilden. Die gefundenen Phasin-Interaktionen sind in Hinblick auf die bekannten netzwerkartigen Strukturen auf der Oberfläche der PHB-Granula interessant. Es existieren Hinweise, dass Phasine an der Ausbildung dieser Strukturen beteiligt sind [Dennis *et al.*, 2008; Kuchta *et al.*, 2007]. Von Neumann *et al.* [2008] konnte mittels Kleinwinkel-Röntgenbeugung (SAXS) und Gelpermeationschromatographie gezeigt werden, dass PhaP1 offenbar als dreieckiges planares Protein vorliegt und vermutlich Trimere bildet. Vergleiche der Aminosäuresequenz (Primärstruktur) und der Verteilung hydrophober Aminosäuren der vier Phasine aus *R. eutropha* zeigten eine hohe Ähnlichkeit der verschiedenen Phasine mit mehreren Bereichen stark konservierter Aminosäuren. Hierbei weisen jeweils PhaP1 und PhaP3 sowie PhaP2 und PhaP4 eine höhere Ähnlichkeit zueinander auf. Dies ließ sich durch Sekundärstrukturvorhersagen bestätigen, welche einen hohen Anteil α -helikaler Strukturen (etwa 90 %) als Charakteristikum der Phasinproteine ergaben [Neumann *et al.*, 2008]. Die hohe Ähnlichkeit der vier Phasine untermauert die experimentellen Befunde, welche zeigen, dass diese in der Lage sind auch untereinander zu interagieren. Fraglich bleibt inwieweit in der Zelle Komplexe und höhermolekulare Aggregate aus verschiedenen Phasinen von Bedeutung sind, da *in vivo* PhaP1 das bei weitem häufigste Phasin ist [Pötter *et al.*, 2004]. Möglicherweise kommt den Phasinen PhaP2, PhaP3 und PhaP4 mehr eine regulatorische Rolle zu, während das Hauptphasin PhaP1 als Struktur-bestimmende Komponente der Granula von Bedeutung ist.

Weiterhin zeigten Klone mit Kombinationen der Two-Hybrid Fusionen der PHB-Depolymerase PhaZa1 mit verschiedenen Phasinen sowie PhaR eine Farbentwicklung. Die β -Galaktosidaseaktivität dieser Stämme war allerdings im Vergleich zu den Kontrollen nur geringfügig erhöht, was für eher schwache Protein-Wechselwirkungen spricht. Für Phasine wird eine Rolle bei der Regulation des PHB-Abbaus vermutet [Kuchta *et al.*, 2007].

Möglicherweise sind hier Wechselwirkungen zwischen PHB-Depolymerase und Phasinen von Bedeutung. So sind beispielsweise Mutanten, welche eine Deletion des Hauptphasins PhaP1 aufweisen, in der Lage akkumuliertes PHB wieder schneller abzubauen [Kuchta *et al.*, 2007] und weisen eine etwa dreifach erhöhte Eigenhydrolyserate isolierter nPHB-Granula *in vitro* auf [Gebauer, 2009].

2.1.3. Identifizierung von Interaktionen mittels einer Genbank

Zur Auffindung bisher nicht beschriebener Gen- bzw. Proteinkandidaten mit möglicher Funktion im PHB-Stoffwechsel wurde eine Two-Hybrid Genbank von *R. eutropha* mit verschiedenen PHB-assoziierten Proteinen als Köder (z.B. der PHB-Synthase) durchmustert. Die Köderproteine wurden hierbei als Fusion an die Adenylatzyklaseuntereinheit T25 und die Genbank als Fusion mit der T18 Domäne exprimiert [Pfeiffer und Jendrossek, 2011; Pfeiffer *et al.*, 2011]. Das experimentelle Vorgehen ist in Abbildung 2.5 schematisch dargestellt. Durch eine spezielle Klonierungsstrategie (BstXI-Adapter), welche eine Religation des geschnittenen Vektors unterbindet [Klickstein und Neve, 2001], konnte erreicht werden, dass rund 95 % aller Klone Inserts genomischer DNA zwischen 0,4 und 2 kb enthielten [Pfeiffer und Jendrossek, 2011]. Die erhaltene Genbank bestand aus rund $2,6 \cdot 10^6$ Klonen und war somit dreizehnmal so groß wie die zuvor theoretisch berechnete Mindestanzahl an Klonen für eine repräsentative Abdeckung des *R. eutropha* Genoms ($2 \cdot 10^5$ nach Clarke und Carbon [1976]).

Die Genbank wurde durch Transformation in den Adenylatzyklase-defizienten Reporterstamm *E. coli* BTH101 mit verschiedenen Köderproteinen auf Interaktionspartner durchmustert [Pfeiffer und Jendrossek, 2011; Pfeiffer *et al.*, 2011]. Es konnten Transformationsraten erreicht werden, welche in einem Faktor von 40 bis 400 in Relation zur Größe der Genbank stehen und somit theoretisch ein Auffinden von Mehrfachtreffern ermöglichen, unter der Annahme, dass alle Gene des *R. eutropha* Genoms gleichermaßen repräsentativ in der Bank vertreten sind. Je nach eingesetztem Köderprotein konnten zwischen 20 und mehrere hundert $\text{Mal}^+/\text{Lac}^+$ Klone isoliert werden (aus jeweils 10^8 -

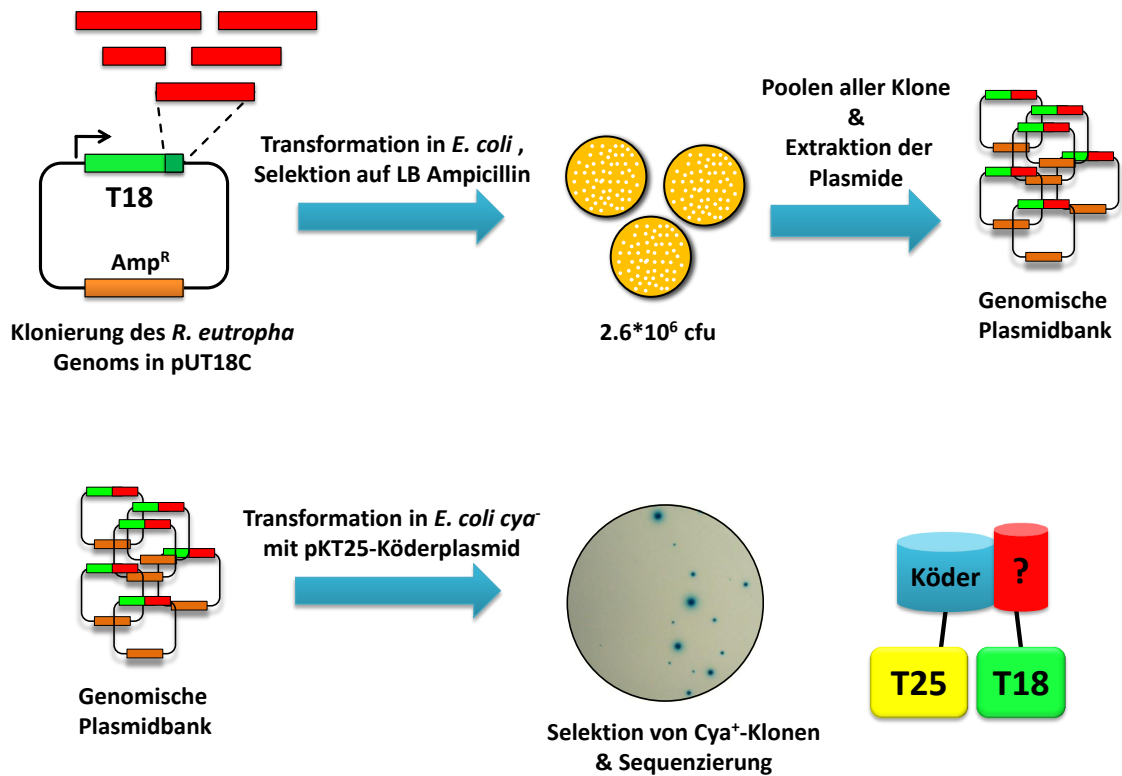


Abbildung 2.5.: Identifizierung von Interaktionspartnern mittels einer Genbank. Nach unspezifischer Fragmentierung chromosomaler DNA mittels DNaseI wurden Fragmente eines geeigneten Größenbereichs als T18-Fusionen kloniert und die Genbank anschließend als Plasmidpool abgelegt. Diese Genbank wurde durch Transformation in einen Adenylatzyklase-defizienten Reporterstamm mit verschiedenen Köderproteinen auf Interaktionspartner durchmustert. Auf Minimalmedium mit Maltose als alleiniger Kohlenstoffquelle können nur Cya⁺-Klone wachsen (Wiederherstellung der Adenylatzyklaseaktivität bei Interaktion der T18- und T25-Fusionen). Diese färben sich durch Zusatz von X-Gal blau.

10^9 ausplattierten Kolonie-bildenden Einheiten). Von diesen wurden jeweils zwischen 20 - 80 sequenziert. In die Auswertung wurden nur Klone einbezogen, welche bis zum spätestens achten Tag hochgewachsen waren, da sich zeigte, dass mit zunehmender Inkubationszeit die Anzahl falsch-positiver Ergebnisse stark zunimmt. Als falsch-positives Ergebnis wurden zur Auswertung der Genbankdaten in erster Linie Klone bezeichnet, welche ein Gen in einem falschen, nicht annotierten, Leserahmen besaßen (zufälliges Peptid zeigt eine Interaktion mit dem Köderprotein). Es muss allerdings angemerkt werden, dass weiterhin als falsch-positiv Proteine aufzufassen sind, welche beispielsweise zu einer

direkten Aktivierung des Reportergens führen oder die aufgrund ihrer intrinsischen Sekundärstruktureigenschaften generell zur Wechselwirkung mit anderen Proteinen neigen [Serebriiskii und Golemis, 2001] und deren Interaktion sich nicht in weiteren unabhängigen Experimenten, zum Beispiel durch Two-Hybrid mit den vollständigen Proteinen in verschiedenen Permutationen oder durch andere Methoden zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen bestätigen lässt. Es ist bekannt, dass Two-Hybrid basierte Screening-Methoden einen hohen Anteil falsch-positiver (und falsch-negativer) Ergebnisse liefern können [Legrain und Selig, 2000]. Der genaue Anteil falsch-positiver Ergebnisse ist nicht bekannt, neueren Auswertungen nach soll er bei bis zu 70 Prozent liegen [Deane *et al.*, 2002].

Die Gesamtanzahl erhaltener Kolonien sowie die Anzahl falsch-positiver Ergebnisse war stark vom eingesetzten Köderprotein abhängig. Als Köder wurden die PHB-Synthase (PhaC1), die Phasine PhaP1 - PhaP4, das Regulatorprotein PhaR sowie die PHB-Depolymerase PhaZa1 eingesetzt. Es wurden beispielsweise mit PhaC1 als Köder mehrere hundert Klone erhalten, während die Anzahl an Klonen für die Phasine (insbesondere für PhaP1) deutlich geringer war. Mit PhaP2 wurde nur ein Klon isoliert, welcher ein Gen in einem falschen Leserahmen besaß. Für andere Köderproteine ergab sich teilweise eine beträchtliche Anzahl falsch-positiver Ergebnisse. In Tabelle 2.1 sind die eingesetzten Köderproteine und die erhaltenen „Treffer“ (Beute) zusammengefasst. Dabei wurden aufgrund der hohen Anzahl an Ergebnissen nur solche aufgelistet, welche insgesamt mindestens zweimal mit einem oder verschiedenen Köderproteinen gefunden wurden. Alle Eintreffter sind im Anhang A.2 aufgeführt. Ergänzend zu den unter Pfeiffer und Jendrossek [2011]; Pfeiffer *et al.* [2011] aufgeführten Ergebnissen wurden zum Teil noch weitere Klone sequenziert. Mit den am häufigsten gefundenen Proteinen wurde zudem erneut eine Genbanksuche durchgeführt (2. Runde). Die Ergebnisse hierzu sind unter 2.1.4 diskutiert.

Tabelle 2.1.: Identifizierung neuer Interaktionspartner PHB-assoziiierter Proteine mittels einer Genbank. Angegeben sind die im Two-Hybrid gegen die Genbank eingesetzten Köderproteine sowie die Anzahl aller Treffer (Beute), die in mindestens zwei Klone identifiziert werden konnten. Die Anzahl der Klone wurde zur besseren Darstellung mit einer Rotfärbung (hellrot bis dunkelrot) hinterlegt, welche die Häufigkeit des Auffindens wiedergibt. Treffer, welche nur einmal gefunden wurden, sind im Anhang aufgelistet. Weiterhin ist die Anzahl an Klone angegeben, welche DNA-Fragmente in einem falschen Leserahmen beinhalten sowie Klone deren Sequenzierung ein nur unzureichendes oder nicht eindeutiges Ergebnis lieferte. Die Interaktionsstärke wurde über die Geschwindigkeit des Wiederanwachstums auf Minimalagar abgeschätzt: + = sehr langsames Wachstum und schwache Blaufärbung bis + + + + = rasches Wachstum mit starker Blaufärbung.

Treffer BLAST (Beute)	locus_tag	Interaktionsstärke	Köderprotein											total
			Runde 1					Runde 2						
			PhaC1	PhaZa1	PhaR	PhaP1	PhaP2	PhaP3	PhaP4	H16_B1934	H16_A0141	H16_A0141	total	
hypothetical protein	H16_B1934	++ bis ++++		2			24					54	4	84
hypothetical membrane associated protein	H16_A0141	++ bis ++++	20			1						1	5	27
transcriptional regulator, GntR-family	H16_B1761	+++ bis ++++										9		9
poly(3-hydroxybutyrate) polymerase	H16_A1437	++ bis ++++											7	7
predicted phosphate transport regulator	H16_A2274	+ bis +++		1			4		2					7
methyl-accepting chemotaxis transducer	H16_B2044	+++					7							7
transcriptional regulator of phasin expression (PhaR)	H16_A1440	++			3									3
acyl-CoA dehydrogenase	H16_A1530	+ bis +++					1						2	3
methyl-accepting chemotaxis protein	H16_B0232	+ bis +++					3							3
LysR family transcriptional regulator	H16_B1446	+ bis +++			2		1							3
putative phytoene synthase	H16_B2206	+ bis +++	3											3
predicted GTPase	H16_A0378	+++					2							2
putative silver efflux P-type ATPase	H16_A1986	++ bis ++++		2										2
glutamyl-tRNA synthetase	H16_A2403	++-+++		2										2
outer membrane protein (porin)	H16_A2688	+++											2	2
putative membrane protein of unknown function	H16_A3517	+++					2							2
signal transduction histidine kinase	H16_B2347	+ bis ++					1						1	2
phasin PhaP2	PHG202	+++				1								2
Einfachtreffer		+ bis ++++	10	14	2	3	6	3	2	5	24	5	24	69
nicht im Leserahmen und sonstige Klone		+ bis ++++	23	31	16	7	1	15	25	6	26	6	26	150
Gesamtzahl sequenzierter Klone			56	52	23	11	53	21	27	80	66	80	66	389

Mittels des gewählten Ansatzes konnte eine Vielzahl potentieller neuer Interaktionspartner erhalten werden. Die meisten Klone enthielten keine Gensequenzen vollständiger Proteine, sondern kodierten für Proteinfragmente unterschiedlicher Größe. Hieraus können zum Teil schon Rückschlüsse über zum Beispiel an der Interaktion beteiligte Domänen abgeleitet werden. Zur Verifizierung der Ergebnisse ist aber der Interaktionsnachweis mit den vollständigen Proteinen notwendig [Battesti und Bouveret, 2012]. Bereits bekannte Interaktionen konnten zum Teil über die Genbank bestätigt werden (zum Beispiel PhaR mit PhaR, PhaP2 mit PhaP1 und PhaP3). Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse sortiert nach den einzelnen Köderproteinen gesondert aufgeführt und diskutiert.

2.1.3.1. Ergebnisse mit der PHB-Synthase PhaC1 als Köder

Basis der durchgeführten Two-Hybrid Experimente war die Hypothese, dass Bildungsort und Lokalisierung der PHB-Granula durch die Wechselwirkung PHB-assoziiierter Proteine mit noch unbekannt Proteinen in der Zelle gesteuert werden können. Da die PHB-Synthase das Schlüsselenzym der PHB-Granulabildung darstellt und ihre Untereinheiten (64 kDa) weit größer sind als die anderer Granula-assoziiierter Proteine, lag die Vermutung nahe, dass die Synthase aus der Oberflächenschicht der Granula herausragt [Hiraishi *et al.*, 2005; Mayer *et al.*, 1996] und so möglicherweise besonders gut in der Lage ist Wechselwirkungen mit anderen Strukturen einzugehen.

Als Mehrfachtreffer unter insgesamt 56 sequenzierten Klonen konnten mit der PHB-Synthase als Köder zwei Proteine identifiziert werden (H16_B2206 und H16_A0141). Drei Klone enthielten Teile des Gens einer putativen Phytoensynthase (H16_B2206). Diese liegt unter anderem in einem Operon mit einer Squalen Zyklase (H16_B2207) und ist normalerweise an der Biosynthese von Carotinoiden beteiligt. Hierbei katalysiert sie über ihre Transferaseaktivität die Verknüpfung von Geranylgeranyl-Pyrophosphat Einheiten zum Phytoen, einem farblosen Tetraterpen mit 40 Kohlenstoffatomen [Iwata-Reuyl *et al.*, 2003; Jones und Porter, 1985]. Eine Wechselwirkung des Proteins mit der PHB-Synthase konnte allerdings nach Durchführung des Two-Hybrid Interaktionstests

mit der vollständigen Phytoensynthese nicht eindeutig bestätigt werden. Zudem war in Lokalisierungsstudien (eYfp-Fusion) keine Assoziation der Phytoensynthese mit den PHB-Granula nachweisbar [Schuth, 2011; Tischbierek, 2012]. Die Bedeutung des Auffindens eines an der Carotinoidbiosynthese beteiligten Proteins bleibt deshalb vorerst unklar.

Als häufigster Treffer wurde ein für ein hypothetisches Membranprotein kodierendes Gen (H16_A0141) identifiziert (in 20 von 56 Klonen). Dieses liegt in einem Operon mit fünf anderen Genen, deren Funktionen unter anderem dem Fettsäuremetabolismus zugeordnet werden können (zum Beispiel α/β -Hydrolase/Esterase, Enoyl-CoA Hydratase). Auffallend war zudem der hohe Anteil an Prolin, Lysin und Alanin im C-terminalen Bereich des Proteins, welcher charakteristisch ist für DNA-bindende Proteine der Histon H1 Familie [Medvedkin *et al.*, 1995]. Die Interaktion des H16_A0141 Proteins mit der PHB-Synthase sowie mit anderen PHB-assoziierten Proteinen konnte in weiteren Experimenten bestätigt werden und ist unter 2.1.4 beschrieben.

Bei den restlichen mit der PHB-Synthase nur jeweils einmal gefundenen Proteinen handelte es sich um weitere hypothetische Proteine, einen Transporter, eine Acetyl-CoA Acetyltransferase, ein Methyl-Accepting Chemotaxisprotein, eine Histidinproteinkinase sowie zwei Transkriptionsregulatoren. Hiervon wurde bisher nur das hypothetische Transmembranprotein H16_A2313 weiteruntersucht. Das Protein zeigte zwar eine starke Eigeninteraktion, die Interaktion mit der PHB-Synthase konnte allerdings im Two-Hybrid mit dem vollständigen Protein nicht bestätigt werden (unveröffentlichte Ergebnisse).

2.1.3.2. Ergebnisse mit Phasinen als Köder

In Two-Hybrid Experimenten mit den Phasinen PhaP1-4 als Köderprotein, konnten hauptsächlich für PhaP2 Klone isoliert werden. Die wenigen Klone, welche für die Phasine PhaP1, PhaP3 und PhaP4 isoliert wurden, beinhalteten überwiegend DNA-Fragmente, welche sich in einem falschen Leserahmen befanden. Mit PhaP1 als Köder wurde in

einem Klon das hypothetische Protein H16_A2924 gefunden, dessen C-terminale Fusion an eYfp eine Membranlokalisierung zeigte (unveröffentlichte Ergebnisse). H16_A2924 fungiert möglicherweise als membranständiger Anti-Sigma Faktor K (RskA) [Husson, 2006; Saïd-Salim *et al.*, 2006; Sklar *et al.*, 2010].

Die bereits im Kreuzungsschema (siehe unter 2.1.2.2) identifizierten Interaktionen zwischen PhaP1 und PhaP2 sowie PhaP1 und PhaP3 konnten ebenfalls über die Genbank bestätigt werden. Allerdings wurden andere bereits bekannte Interaktionen wie die Homooligomerisierung von PhaP2 oder die Interaktion zwischen PhaP2 und PhaP4 nicht über die Genbank gefunden. Möglicherweise ist dies auf eine ungleiche Verteilung von interagierenden Fragmenten in der Genbank zurückzuführen, wobei häufig vertretene Fragmente mit starker Interaktion auch überwiegend wiedergefunden werden. Eine PCR mit Phasin-spezifischen Primern gegen die Genbank zeigte, dass zumindest die Gene aller vier Phasine in der Genbank vertreten sind.

Als häufigster Treffer mit PhaP2 als Köder wurde in 24 Klonen ein bisher nicht beschriebenes Phasin-artiges Protein (H16_B1934) gefunden, welches hohe Ähnlichkeit zu Phasinen aus anderen Bakterien wie ApdA aus *Rhodospirillum rubrum* und Mms16 aus *Magnetospirillum gryphiswaldense* aufweist [Handrick *et al.*, 2004b,c; Pfeiffer und Jendrossek, 2011; Schultheiss *et al.*, 2005]. Eine Interaktion von H16_B1934 mit PhaP2 sowie mit anderen PHB-assoziierten Proteinen konnte in weiteren Experimenten bestätigt werden und ist unter 2.1.4 beschrieben.

Als weiterer Mehrfachtreffer wurde mit PhaP2, PhaP3 sowie PhaZa1 (siehe unten) als Köder das als „Phosphattransportregulator“ annotierte Protein H16_A2274 identifiziert. Das zugehörige Gen liegt in einem Operon mit einem putativen Phosphattransporter (H16_A2273, *pitA*). Die Interaktionen des Phosphattransportregulators mit den Phasinen sowie der PHB-Depolymerase PhaZa1 konnten in der Arbeitsgruppe bestätigt werden. Deletionsmutanten von H16_A2274 weisen einen erhöhten Gehalt des anorganischen Speicherstoffes Polyphosphat auf und sind unter bestimmten Mediumsbedingungen im PHB-Abbau gestört (unveröffentlichte Ergebnisse in der Arbeitsgruppe, Anna

Sznajder). Der Phosphattransportregulator stellt möglicherweise einen Link zwischen dem Polyphosphat- und PHB-Stoffwechsel dar, indem er an der Regulation der Phosphataufnahme auf genetischer Ebene (Expression von *pitA*) als auch der Steuerung des PHB-Abbaus durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkung mit der PHB-Depolymerase PhaZa1 und Phasinen beteiligt ist. Weiterhin wird so unter Umständen über den PHB-Gehalt der Zelle die Phosphataufnahme geregelt. Der Phosphattransportregulator wurde zudem in einer Proteomanalyse als PHB-Granula-assoziiertes Protein identifiziert (siehe unter 2.2). In Lokalisierungsstudien (eYfp-Fusion) wurde allerdings keine PHB Assoziation des Proteins festgestellt. Da der Regulator allerdings vermutlich nur indirekt über die Wechselwirkung mit anderen PHB-assoziierten Proteinen an PHB-Granula gebunden wird, ist eine Granula-Assoziation aufgrund der Überexpression entsprechender Fluoreszenzproteininfusionen vermutlich maskiert.

Weitere mit PhaP2 als Köder gefundene Proteine waren zwei Chemotaxisproteine (H16_B0232 und H16_B2044) sowie eine möglicherweise an der Signaltransduktion beteiligte Histidinkinase (H16_B2347). Fluoreszenzfusionen dieser Proteine zeigten eine gehäufte Lokalisierung an der Membran und den Zellpolen (unveröffentlichte Ergebnisse). Dies wurde für entsprechende Proteine mit ähnlicher Funktion bereits mehrfach beschrieben [Greenfield *et al.*, 2009; Ringgaard *et al.*, 2011; Yamaichi *et al.*, 2012]. Ob diese Proteine über ihre Lokalisierung an den Zellpolen und Wechselwirkung mit PhaP2 indirekt Einfluss auf die Lokalisierung der PHB-Granula nehmen können ist bislang nicht geklärt. Weiterhin wurde die Wechselwirkung dieser Proteine mit PhaP2 bisher nicht experimentell bestätigt.

2.1.3.3. Ergebnisse mit PhaR als Köder

Mit PhaR als Köder wurde im überwiegenden Anteil der Klone PhaR selbst gefunden und die vormals im Kreuzungsschema nachgewiesene Eigeninteraktion somit bestätigt. Weitere sequenzierte Klone enthielten Teile anderer Transkriptionsregulatoren, welche

vermutlich aufgrund von Ähnlichkeiten zu PhaR in der Lage sind mit diesem Heterooligomere auszubilden.

2.1.3.4. Ergebnisse mit der PHB-Depolymerase PhaZa1 als Köder

Mit PhaZa1 als Köderprotein wurden ebenfalls das mit PhaP2 gefundene Phasin-ähnliche Protein H16_B1934 in zwei Klonen sowie der mit PhaP2 und PhaP3 gefundene Phosphattransportregulator (H16_A2274) in einem Klon identifiziert. Mehrmals gefunden wurden ferner eine putative Silver Efflux P-Typ ATPase (H16_A1986) sowie eine Glutamyl-tRNA Synthetase (H16_A2403) in jeweils zwei Klonen. Die Funktion von H16_A1986 und H16_A2403 sowie weiterer Proteine (siehe Anhang A.2) wurde jedoch bisher nicht näher untersucht. Unter den nur einmal gefundenen Proteinen befand sich zudem die PHB-Depolymerase PhaZa3. Eine Interaktion von PhaZa1 und PhaZa3 konnte jedoch im Kreuzungsschema mit den vollständigen Proteinen nicht bestätigt werden [Leuprecht, 2012].

2.1.4. Verifizierung neuer Interaktionen

Aufgrund ihres häufigen Auftretens im Genbankversuch wurden im weiteren Verlauf der Arbeit in erster Linie die beiden Proteine H16_A0141 und H16_B1934 untersucht. Für beide konnte gezeigt werden, dass sie mit den PHB-Granula assoziiert vorliegen und Größe, Anzahl sowie intrazelluläre Lokalisierung dieser beeinflussen können (siehe dazu Kapitel 3). Aufgrund der klaren Assoziation zum PHB-Stoffwechsel wurden sie entsprechend der Nomenklatur für dem PHA-Metabolismus zugehörige Proteine annotiert. H16_A0141 wurde aufgrund seiner ursprünglichen Benennung als hypothetisches Membran-assoziiertes Protein als „PhaM“ bezeichnet. H16_B1934 wurde wegen seiner Ähnlichkeit zu Phasinen aus anderen Organismen als „PhaP5“ (fünftes Phasin in *R. eutropha*) betitelt. Zur Bestätigung der Interaktionen wurde der Two-Hybrid Assay mit den vollständigen Proteinen durchgeführt, da über die Genbank gefundene Klone meist

nicht die vollständigen ORFs der entsprechenden Gene enthielten. Außerdem wurde auf Interaktion mit anderen PHB-assoziierten Proteinen getestet und beide Proteine in einer zweiten Runde erneut im Two-Hybrid gegen die Genbank eingesetzt [Pfeiffer und Jendrossek, 2011; Pfeiffer *et al.*, 2011]. Um ausgewählte, mittels des *E. coli* basierten Two-Hybrid Systems gefundene Protein-Interaktionen in *R. eutropha* selbst nachzuweisen, wurde zudem bimolekulare Fluoreszenzkomplementation verwendet. Für einen *in vitro* Nachweis von Protein-Wechselwirkungen kamen ferner Crosslinking-Experimente und analytische Gelfiltration zum Einsatz [Pfeiffer und Jendrossek, 2013].

Für PhaP5 konnte die starke Interaktion mit dem Phasin PhaP2 bestätigt werden (Abbildung 4 in Pfeiffer und Jendrossek [2011]). PhaP5 zeigte außerdem Wechselwirkungen mit allen anderen Phasinen, dem Regulator der Phasin Expression PhaR, der PHB-Depolymerase PhaZa1 sowie eine starke Eigeninteraktion. Letztere konnte auch über BiFC (Abbildung 3 in Pfeiffer und Jendrossek [2013]) sowie Glutaraldehyd-Crosslinking und Gelfiltration bestätigt werden [Pfeiffer und Jendrossek, 2013]. Für PhaP5 wurde im Vergleich mit Standardproteinen ein apparentes Molekulargewicht des nativen Proteinkomplexes von 42 kDa bestimmt (Abbildung 6 in Pfeiffer und Jendrossek [2013]). Mit einem theoretischen Molekulargewicht des His-Tag Proteins von 16,6 kDa müsste es sich bei der Quartärstruktur von PhaP5 um ein Dimer oder Trimer handeln. Ein Trimer konnte jedoch durch Crosslinking Experimente eindeutig ausgeschlossen werden. PhaP5 nach Crosslinking zeigte eine deutliche Bande im Bereich eines Dimers (Abbildung 5 in Pfeiffer und Jendrossek [2013]). Wurde PhaP5 vor dem Crosslinking einer Hitzebehandlung unterzogen, wurde das gleiche Ergebnis erhalten. Dies spricht für eine hohe Thermostabilität des Proteins, vergleichbar mit der des homologen Proteins ApdA, das selbst Autoklavieren übersteht [Handrick *et al.*, 2004b,c].

Eine Interaktion zwischen der PHB-Synthase (PhaC1) und PhaM konnte ebenfalls im Two-Hybrid sowie über BiFC bestätigt werden (Abbildung 1 in Pfeiffer *et al.* [2011] und Abbildung 2 in Pfeiffer und Jendrossek [2013]). Die Interaktion beider Proteine wurde ferner mittlerweile von einer anderen Arbeitsgruppe über Koaffinitätsaufreinigung von

PhaM mit Strep-getaggttem PhaC1 bestätigt [Cho *et al.*, 2012]. Außerdem war PhaM ebenso in der Lage Homooligomere auszubilden. Dies konnte über mehrere unabhängige Methoden bestätigt werden [Pfeiffer und Jendrossek, 2013; Pfeiffer *et al.*, 2011]. Gereinigtes PhaM-His₆ (theoretisches Molekulargewicht 27,6 kDa) eluierte in der Gelfiltration mit einem K_{av} -Wert von 0,187, was einem Molekulargewicht von rund 330 kDa entspricht und darauf hindeutet, dass PhaM als Dodecamer (theoretischen Molekulargewicht 331,7 kDa) vorliegt (Abbildung 6 in Pfeiffer und Jendrossek [2013]). Im Crosslinking konnte gleichermaßen ein hochmolekulares Produkt oberhalb der 250 kDa Bande des Molekulargewichtsmarkers erhalten werden (Abbildung 5 in Pfeiffer und Jendrossek [2013]). Da sich in allen PhaM Präparationen jedoch Abbauprodukte des Proteins befanden (diese werden ebenfalls von PhaM-spezifischen Antikörpern erkannt), dürfte das ermittelte Molekulargewicht mit einem Fehler durch die Wechselwirkung der kleineren Fragmente mit dem vollständigen PhaM behaftet sein [Pfeiffer und Jendrossek, 2013]. Eine Homooligomerisierung von PhaM konnte außerdem im Two-Hybrid (Abbildung 1 in Pfeiffer *et al.* [2011]) sowie mittels BiFC (Abbildung 3 in Pfeiffer und Jendrossek [2013]) nachgewiesen werden.

Weiterhin konnte eine im Two-Hybrid deutlich nachweisbare Interaktion zwischen PhaM und PhaP5 festgestellt werden (Abbildung 1 in Pfeiffer *et al.* [2011]). Mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation ließ sich ebenfalls eine Wechselwirkung von PhaM und PhaP5 nachweisen. Diese lag allerdings nahe der Nachweisgrenze (Abbildung 2 in Pfeiffer und Jendrossek [2013]). Ein *in vitro* Nachweis der Interaktion zwischen PhaM und PhaP5 mittels Gelfiltration und Crosslinking war nicht erfolgreich [Pfeiffer und Jendrossek, 2013]. Nach Mischen der Proteine konnten keine zusätzlichen Peaks in der Gelfiltration beziehungsweise keine weiteren Crosslinking-Produkte gefunden werden. Möglicherweise sind für diesen Nachweis weitere Optimierungsschritte nötig (Modifikation der Pufferbedingungen, andere stöchiometrische Verhältnisse der Proteine). Unter Umständen ist PhaP5 auch mit einem hochmolekularen PhaM-Komplex assoziiert. Dies würde im Versuchsaufbau zu keiner erkennbaren Zunahme des Molekulargewichts führen (Auflösungsgrenze der Gelfiltrationssäule). Da PhaM und PhaP5 jeweils eine starke Tendenz zur

Homooligomerisierung haben, steht diese Reaktion ferner in Konkurrenz zu einer Wechselwirkung der Proteine untereinander. Für bestimmte Kombinationen zwischen PhaM und PhaP2 bzw. PhaR konnte ebenfalls eine leicht erhöhte β -Galaktosidaseaktivität im Two-Hybrid gemessen werden (Abbildung 1 in Pfeiffer *et al.* [2011]). PhaM wurde ferner einmal als Beute mit PhaP2 im Two-Hybrid über die Genbank gefunden. Hierbei dürfte es sich allerdings, wenn überhaupt, um nur relativ schwache Wechselwirkungen handeln [Pfeiffer *et al.*, 2011].

Mit PhaP5 als Köder gegen die Genbank wurde im überwiegenden Anteil der Klone PhaP5 selbst identifiziert (54 von 80 sequenzierten Klonen). PhaM konnte in einem Klon als Beute gefunden werden. Die Interaktionen von PhaP5 mit PhaP2 und anderen PHB-assoziierten Proteinen konnten über die Genbank nicht wiedergefunden werden. Möglicherweise sind Klone mit PhaP5 in der Genbank überrepräsentativ vorhanden und die starke PhaP5-Eigeninteraktion begünstigt ein Wiederauffinden ihrer selbst. Weitere elf mit PhaP5 als Köder isolierte Klone enthielten putative Transkriptionsregulatoren (neunmal H16_B1761, einmal H16_B2456, einmal H16_A3677). Jeweils zwei Klone beinhalten Teile einer Acyl-CoA Dehydrogenase (H16_A1530, ebenfalls mit PhaP2 gefunden) und eines Porins (H16_A2688). Da der Transkriptionsregulator H16_B1761 eine FCD-Domäne aufweist, welche ein Acyl-CoA Bindemotiv darstellt, könnte er, ebenso wie die gefundene Acyl-CoA Dehydrogenase, für den PHB-Metabolismus von Bedeutung sein. Die übrigen Proteine wurden bisher nicht näher untersucht und ihre Bedeutung ist unklar.

Im Kreuzungsschema für PhaM gefundene Wechselwirkungen wurden größtenteils über die Genbank bestätigt (siehe Tabelle 2.1). Es konnten die Interaktionen mit PHB-Synthase, PhaP5 sowie die PhaM-Eigeninteraktion mehrfach über die Genbank wiedergefunden werden. Alle restlichen mit PhaM als Köder erhaltenen Klone wurden nur jeweils einmal isoliert. Daher ist nicht auszuschließen, dass die Sequenzierung weiterer Klone zusätzliche interessante Ergebnisse bringen würde. Unter den Ergebnissen befand sich eine beträchtliche Anzahl an DNA-assoziierten Proteinen (bzw. deren Teildomänen).

Aufgrund dieser Wechselwirkungen sowie der AAKP-Motive im C-terminalen Bereich von PhaM, welche typisch sind für DNA-gebundene Proteinen der Histon H1 Familie, sollte untersucht werden ob PhaM möglicherweise selbst die Fähigkeit besitzt an DNA zu binden. Zudem ließen die gefundenen Interaktionen zwischen PhaM und PhaP5 sowie anderen PHB-assoziierten Proteinen vermuten, dass beiden Proteinen bisher nicht bekannte möglicherweise prominente Funktionen im PHB-Stoffwechsel zukommen.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde deshalb der Einfluss von PhaM und PhaP5 auf Bildung, Lokalisierung, Größe und Anzahl der PHB-Granula untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Kapitel 3 beschrieben. Unter Vorwegnahme der dort gewonnenen Erkenntnisse, dass PhaM in der Lage ist mit dem Nukleoid zu wechselwirken und sowohl PhaM als auch PhaP5 an die Oberfläche der PHB-Granula binden, kann das in Abbildung 2.4 gezeigte Interaktionsnetzwerk um zwei Proteine erweitert werden (Abbildung 2.6).

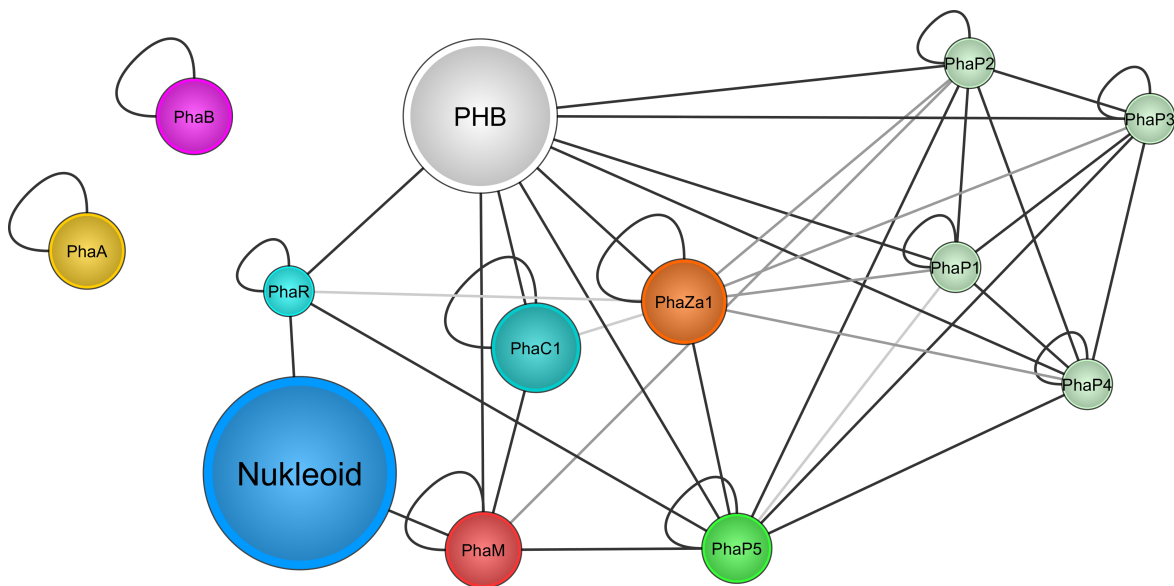


Abbildung 2.6.: Interaktionen im PHB-Stoffwechsel von *R. eutropha*. Basierend auf den im Two-Hybrid identifizierten Protein-Interaktionen wurde ein Interaktionsnetzwerk erstellt, welches um die beiden neu identifizierten Proteine PhaM und PhaP5 erweitert wurde. Schwache oder nicht eindeutig belegte Interaktionen sind in grau dargestellt. Neben den Interaktionen zwischen den verschiedenen Proteinen sind auch Eigeninteraktionen sowie bekannte Wechselwirkungen mit dem Nukleoid oder den PHB-Granula eingezeichnet.

2.2. Proteomanalyse des PHB-Granulums

Um über eine unabhängige Methode am PHB-Granulum gebundene Proteine zu identifizieren, wurde eine Proteomanalyse durchgeführt. Hierzu wurden native PHB-Granula mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert [Handrick *et al.*, 2000]. Anschließend wurden nach mehrmaligem Waschen der Granula die gebundenen Proteine durch Behandlung mit Detergenz abgetrennt. Nach Auftrennung der Proteine durch eindimensionale SDS-Gelelektrophorese erfolgte deren Identifizierung mittels HPLC-ESI-MS-MS in Zusammenarbeit mit dem Life Science Center der Universität Hohenheim [Pfeiffer und Jendrossek, 2013]. Mittels Massenspektrometrie konnte über 400 verschiedene Proteine eindeutig identifiziert werden. Diese Ergebnisse sind in Anhang A.3 aufgelistet.

Da es zu einer artifiziellen Bindung vieler hydrophober Proteine (z.B. Membranproteine) an die PHB-Granula während des Zellaufschlusses kommt, ist anzunehmen, dass die massenspektrometrische Analyse PHB-Granula-gebundener Proteine einen hohen Anteil falsch-positiver Ergebnisse liefert. So wurden beispielsweise viele Enzyme des Zentralstoffwechsels oder Translationsapparates identifiziert, von denen nicht anzunehmen ist, dass sie normalerweise mit den PHB-Granula assoziiert vorliegen. Unter den Treffern befand sich zudem ein hoher Anteil an Chaperonen, Porinen und Transportern. Eine artifizielle Bindung dieser Proteine wurde bereits für vergleichbare Studien an PHB-Granula [Pötter *et al.*, 2004] und Lipid-Bodies [Wältermann und Steinbüchel, 2005] beschrieben.

Die bereits bekannten dem PHB-Stoffwechsel zugehörigen Proteine PhaC1, PhaZa1, PhaR, PhaP1, PhaP2, PhaP3 und PhaP4 konnten über den massenspektrometrischen Ansatz an den PHB-Granula nachgewiesen werden (siehe Anhang A.3 sowie in Pfeiffer und Jendrossek [2013]). Dies ist als Bestätigung der Ergebnisse anderer Methoden wie Immunogoldmarkierung [Gerngross *et al.*, 1993; Pötter *et al.*, 2002; Wieczorek *et al.*, 1995], Fluoreszenzmikroskopie [Neumann *et al.*, 2008; Peters *et al.*, 2007; Peters und Rehm, 2005; Pfeiffer und Jendrossek, 2011, 2012; Uchino *et al.*, 2007] (siehe hierzu auch

Kapitel 3) oder weiteren Untersuchungen des Granulumproteoms [Pötter *et al.*, 2004] anzusehen. Im Falle von PhaP2 wurde dieses jedoch vormals von Pötter *et al.* [2004] nach Analyse PHB-Granula-gebundener Proteine mittels 2D-PAGE und MALDI-TOF als nicht-Granula-assoziiert beschrieben. *In vitro* Daten zeigten hingegen, dass PhaP2 durchaus in der Lage ist an PHB zu binden. Möglicherweise sind diese unterschiedlichen Ergebnisse auf eine zu geringe Sensitivität der verwendeten Methode zurückzuführen, da die PHB-Synthese in den Arbeiten von Pötter *et al.* [2004] ebenfalls nicht gefunden werden konnte. Eine weitere Erklärung wäre eine zu schwache Expression von PhaP2 unter den von Pötter *et al.* verwendeten Kulturbedingungen. Srinivasan *et al.* [2002] konnten PhaP2 als während der PHB-Bildung hochreguliertes Protein in mit Fruktose als Kohlenstoffquelle angezogenen Zellen nachweisen.

Neben bereits bekannten PHB-Granula-assoziierten Proteinen konnten in der durchgeführten Proteomanalyse Proteine wiedergefunden werden, welche auch in den Two-Hybrid Experimenten identifiziert wurden. Hierunter befanden sich auch die Proteine H16_B1934 (PhaP5) und H16_A0141 (PhaM), welche in weiteren Experimenten eindeutig als neuartige PHB-Granula-assoziierte Proteine bestätigt werden konnten (siehe dazu Kapitel 3). Auch der ebenfalls mehrmals gefundene Phosphattransportregulator (H16_A2274) wurde identifiziert. Dieses Ergebnis der Proteomanalyse wurde als Hinweis aufgefasst, dass diese Proteine vermutlich assoziiert mit den PHB-Granula vorliegen und unter PHB-permissiven Bedingungen exprimiert sind. Mittels der massenspektrometrischen Methode ließen sich zudem bei Analyse zeitlich gestaffelter Proben quantitative Aussagen über die Stärke der Expression sowie Lokalisierung (Analyse von löslicher Fraktion und Granula-gebundenen Proteinen) zu verschiedenen Zeitpunkten von PHB-Bildung und -Abbau treffen. Im Falle von PhaM und PhaP5 wurde dies jedoch über Western Blot sowie Fluoreszenzmikroskopie untersucht (siehe hierzu Kapitel 3).

Weitere über Proteomanalyse und Two-Hybrid gefundene Proteine, welche bisher jedoch nicht genauer untersucht wurden, waren die zwei kleinen hypothetischen Proteine H16_B1405 sowie H16_A0157 (in Nachbarschaft zum *phaM* Gen gelegen), eine

Zn-abhängige Peptidase der M16B Familie (H16_A0364), H16_A1103 (Glutathion S-Transferase), H16_A2357 (Membran-Protease Untereinheit vom Stomatin/Prohibitin-Typ), H16_A2389 (DNA Polymerase III γ - und τ -Untereinheiten) sowie H16_A2617 (Tfp Pilus Assemblierungsprotein FimV). Zwei über Two-Hybrid und Proteomanalyse identifizierte Methyl-Accepting Chemotaxis Proteine (H16_B0232, H16_B0233) befinden sich zudem in direkter Nachbarschaft und der gleichen Transkriptionseinheit. Das Pilus Assemblierungsprotein FimV tauchte auch als Ergebnis bei der Verwendung von PhaM als Köder gegen die Genbank auf. FimV weist gewisse Ähnlichkeiten zu PhaM auf (siehe auch unter 3.3). FimV kommt eine Rolle beim Zusammenbau von Pili zu. Zudem tritt es in Interaktion mit Komponenten des bakteriellen Cytoskeletts und seine Überexpression führt zu starker Elongation der Zellen [Mattick, 2002; Wehbi *et al.*, 2011].

2.3. Motivsuche

2.3.1. Verbreitung von Phasinen in PHA-bildenden Spezies

Um weitere bisher in *R. eutropha* nicht beschriebene PHB-assoziierte Proteine ausfindig zu machen, wurde versucht diese anhand charakteristischer Motive zu identifizieren. In der Pfam Datenbank¹ geliste Einträge sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst. Die Pfam-Datenbank (Pfam = Protein Familien) dient der Kategorisierung von Proteindomänen anhand charakteristischer Muster basierend auf „Hidden Markov Modellen“ (HMM) und schließt alle bekannten Proteine ein [Finn *et al.*, 2010; Sonnhammer *et al.*, 1997].

Tabelle 2.2.: In der Pfam Datenbank geliste Einträge charakteristischer Motive PHB-assoziiierter Proteine.

Pfam-Nr.	Motiv	Beschreibung
PF05597	Phasin	PHA granule associated protein (phasin)
PF09361	Phasin_2	Phasin protein
PF09602	PhaP_Bmeg	PHA inclusion protein (PhaP_Bmeg)
PF09712	PHA_synth_III_E	PHA synthase subunit (PHA_synth_III_E)
PF07167	PhaC_N	PHB polymerase (PhaC) N-terminus
PF12551	PHBC_N	PHB polymerase N terminal
PF05233	PHB_acc	PHB accumulation regulatory domain
PF07879	PHB_acc_N	PHB/PHA accumulation regulator DNA-binding domain
PF06850	PHB_depo_C	PHB depolymerase C-terminus

Während die sechs letzten Einträge in Tabelle 2.2 Motive beschreiben, die überwiegend in PHA-Synthasen, PHA-Depolymerasen und dem Regulatorprotein PhaR zu finden sind, sind die Einträge „Phasin“, „Phasin_2“ und „PhaP_Bmeg“ charakteristisch für Phasine. Das Motiv „Phasin_2“ ist hauptsächlich in Vertretern der Klassen der Alpha- und Betaproteobakterien (zu letzteren gehört auch *R. eutropha*) anzutreffen, während das Motiv „Phasin“ typisch ist für Phasine der Vertreter der Gammaproteobakterien wie PHA_{MCL}-bildende Pseudomonaden. Allerdings ist das Motiv „Phasin“ auch in anderen Klassen zugehörigen Bakterien zu finden, wo es beispielsweise Bestandteil der kleinen Untereinheit von Typ III und Typ IV PHA-Synthasen ist. Das Motiv „PhaP_Bmeg“ ist

¹<http://pfam.sanger.ac.uk/>

hingegen typisch für Gram-positive Bakterien der Gattung *Bacillus*. Stammesgeschichtliche Herkunft und Verbreitung von Proteinen der Phasin_2 Familie sind in Abbildung 2.7 zusammengefasst.

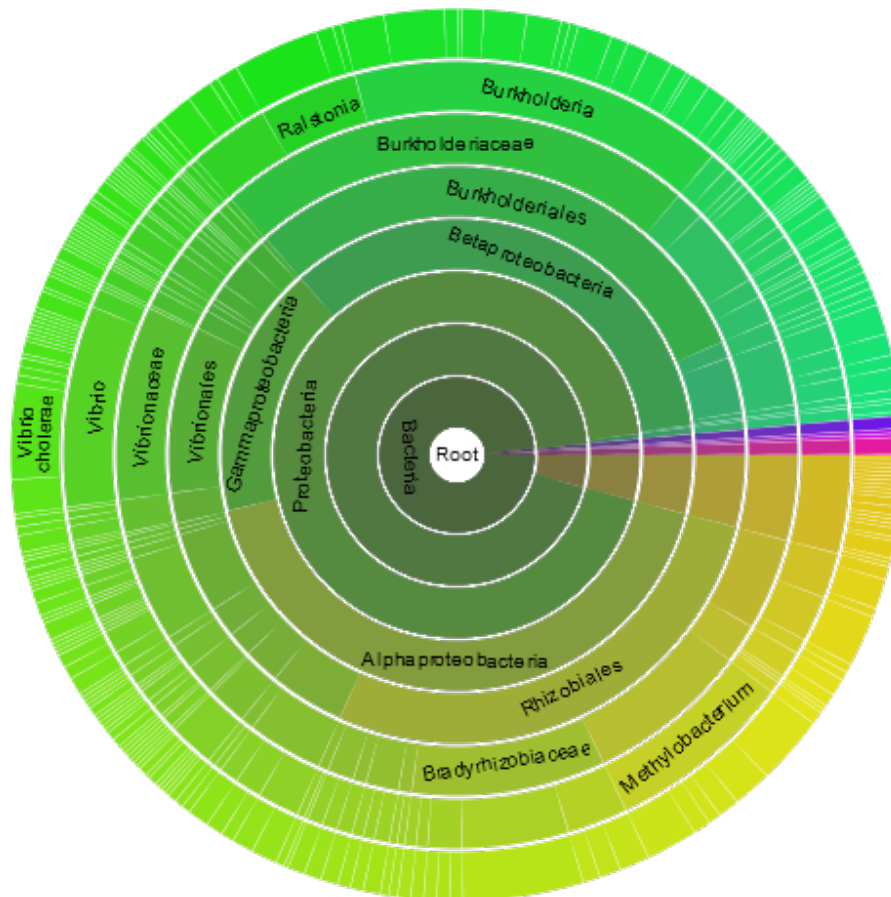


Abbildung 2.7.: Phylogenetischer Stammbaum der Verteilung von Phasin_2 Familie Proteinen unter verschiedenen Spezies. Die Gewichtung einzelner Vertreter erfolgte anhand der Anzahl bekannter Sequenzen. Von innen nach außen sind angegeben Domäne, Reich, Stamm, Klasse, Ordnung, Familie, Gattung und Art. Die hinterlegte Farbe richtet sich entsprechend nach der Zugehörigkeit zu den drei Domänen des Lebens. Eine Gesamtübersicht über die Verbreitung anderer Phasin Motive findet sich ebenfalls in der Pfam Datenbank. Stand Februar 2013, Pfam Datenbank.

Um weitere Aussagen über die Häufigkeit von den verschiedenen Phasin Familien zugehörigen Proteinen innerhalb des Genoms einer Spezies zu machen, wurde zudem exemplarisch die Anzahl an Sequenzen mit entsprechenden Motiven in ausgewählten prominenten PHA-Bildnern (Modellorganismen) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

Tabelle 2.3.: Anzahl und Auftreten verschiedener Proteine der Phasin Familie in Modellorganismen. Angegeben sind die taxonomische Zugehörigkeit der einzelnen Stämme, Typ und Anzahl verschiedener Phasin-Motive sowie die zugehörigen Gene.

Gattung, Art und Stamm mit zugehöriger Klasse	Anzahl	Motive	Gene
<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1 Alphaproteobacteria	8	Phasin, Phasin_2	amb1212, amb0546, amb0571, amb1096, amb1121, amb1194, amb3386, amb3662
<i>Methylobacterium</i> sp. 4-46 Alphaproteobacteria	10	Phasin, Phasin_2	M446_0853, M446_0784, M446_1257, M446_2258, M446_2947, M446_4277, M446_5237, M446_5238, M446_5724, M446_5741
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841 Alphaproteobacteria	6	Phasin, Phasin_2	pRL100104, RL0770, RL2211, RL4662, pRL100120, pRL120730
<i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC 11170 Alphaproteobacteria	3	Phasin_2	Rru_A2111, Rru_A2817, Rru_A3283
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 Betaproteobacteria	5	Phasin_2	CV_1366, CV_1912, CV_2587, CV_3374, CV_3449
<i>Ralstonia eutropha</i> H16 Betaproteobacteria	8	Phasin_2	H16_A1381, H16_A2172, H16_B1934, H16_B1988, H16_B2021, H16_B2296, H16_B2326, PHG202
<i>Allochromatium vinosum</i> DSM 180 Gammaproteobacteria	7	PhaP_Bmeg, Phasin, Phasin_2	Alvin_0062, Alvin_0916, Alvin_1154, Alvin_2975, Alvin_0065, Alvin_0884, Alvin_1275
<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ Gammaproteobacteria	7	Phasin	Avin_18660, Avin_38900, Avin_03930, Avin_23670, Avin_23680, Avin_34720, Avin_35210
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 Gammaproteobacteria	5	Phasin, Phasin_2	PP_2105, PP_5007, PP_5008, PP_5235, PP_0797
<i>Bacillus megaterium</i> DSM 319 Bacilli	4	PhaP_Bmeg, Phasin, Phasin_2	BMD_1211, BMD_1214, BMD_4648, BMD_0025
<i>Synechococcus</i> sp. WH8102 Cyanobacteria	2	PhaP_Bmeg, Phasin	SYNW0578, SYNW1624

In den Genomsequenzen der untersuchten Modellorganismen wurden zwischen zwei und zehn verschiedene Proteine mit Phasin-Motiven identifiziert. Dabei waren auch Organismen, welche Proteine mit Motiven der verschiedenen Phasin-Subtypen besaßen. Bei den gefundenen Proteinen handelt es sich größtenteils um relative kleine, meist als hypothetisch annotierte Proteine mit einer Größe von bis zu 200 Aminosäuren. In einigen Fällen wurde diesen Proteinen bereits eine Funktion als Phasin zugeordnet. Manchen Proteinen wurden zum Teil andere, in den meisten Fällen allerdings nicht experimentell überprüfte, Funktionen zugeschrieben. So fand sich beispielweise bei *B. megaterium* das Motiv „Phasin“ auch in der kleinen Untereinheit der Typ IV PHB-Synthase (PhaR) sowie in einer (putativen) Ribonuklease. In *Allochromatium vinosum* wurde ebenfalls in der kleinen Untereinheit der PHA-Synthase (PhaE) das Motiv „Phasin“ gefunden. Weiterhin fanden sich diverse Chemotaxisproteine mit Phasin-Motiven. In *R. eutropha* konnten acht Proteine mit dem Motiv „Phasin_2“ gefunden werden. Insbesondere *R. eutropha* ist bekannt dafür häufig mehrere Kopien verschiedener Gene (Paraloge) zu besitzen. So finden sich beispielweise sieben Gene putativer PHB-Depolymerasen und eine doppelte Ausführung der Enzyme des Calvin-Benson-Bassham Zykluses [Pohlmann *et al.*, 2006]. Auch bei anderen Bakterien konnte eine hohe Anzahl putativer Phasingene identifiziert werden. So weisen beispielsweise Bakterien der Gattung *Magnetospirillum* eine hohe Anzahl hypothetischer Phasingene auf, welche zum Teil als „magnetic particle membrane specific GTPase“ annotiert sind. Vorherige Arbeiten zeigen allerdings, dass es sich hierbei um keine Magnetosom-spezifischen Proteine, sondern ebenfalls um Phasine handelt [Handrick *et al.*, 2004b; Schultheiss *et al.*, 2005].

2.3.2. Identifizierung Phasin-artiger Proteine in *R. eutropha*

Zur Auffindung bisher nicht beschriebener Proteine mit den in Tabelle 2.2 aufgeführten Motiven wurden die KEGG Datenbank² verwendet. Mit Ausnahme von Proteinen zugehörig der „Phasin_2“ Proteinfamilie konnten für alle anderen gelisteten Motive keine

²<http://www.genome.jp/kegg/>

neuen Proteine in *R. eutropha* identifiziert werden (bereits bekannte PHB-assoziierte Proteine ausgenommen). In der Genomsequenz von *R. eutropha* H16 [Pohlmann *et al.*, 2006] finden sind insgesamt acht Proteine mit „Phasin_2“ Motiv (Tabelle 2.3). Neben den bereits bekannten zur „Phasin_2“ Proteinfamilie zugehörigen Phasinen PhaP1 bis PhaP4 wurden die vier weiteren Proteine H16_B1934, H16_B1988, H16_B2296 und H16_B2326 identifiziert. H16_B1934 (PhaP5) konnte bereits in einem Two-Hybrid Verfahren sowie über eine Proteomanalyse als putatives im PHB-Stoffwechsel involviertes beziehungsweise als PHB-Granula-assoziiertes Protein identifiziert werden (siehe unter 2.1 und 2.2). Bei H16_B1988 und H16_B2326 handelt es sich um relativ kleine hypothetische Proteine (theoretisches Molekulargewicht 22,7 und 16,4 kDa), mit vergleichbarer Größe zu anderen bekannten Phasinen. H16_B2296 ist hingegen als ein Transkriptionsregulator vom LysR-Typ annotiert. Diese putativen Phasine wurden mittels mikroskopischer Methoden auf ihre Beteiligung am PHB-Stoffwechsel untersucht [Pfeiffer und Jendrossek, 2011, 2012]. Die Ergebnisse hierzu sind in Kapitel 3 zusammengefasst. Eine Assoziation mit den PHB-Granula konnte für H16_B1934, H16_B1988 und H16_B2326 nachgewiesen werden. Diese Proteine wurden deshalb entsprechend der Nomenklatur für Phasine als PhaP5, PhaP6 und PhaP7 bezeichnet [Pfeiffer und Jendrossek, 2011, 2012].

Vergleiche der Aminosäuresequenzen zeigten, dass PhaP1 bis PhaP4 hohe Sequenzähnlichkeiten (38 bis 70 %) aufweisen, während diese im Vergleich zu H16_B1934, H16_B1988 und H16_B2326 nur gering ausfällt (< 20 %) (Tabelle 3 in Pfeiffer und Jendrossek [2011] und Abbildung 4 in Pfeiffer und Jendrossek [2012]) Die Unterschiede zwischen den einzelnen Proteinen sind demnach so groß, dass eine Identifizierung nur auf Basis von einfachen Sequenzvergleichen nicht unbedingt zum Erfolg geführt hätte. Die von der Pfam Datenbank genutzten Algorithmen zur Mustererkennung sind hierbei von Vorteil [Finn *et al.*, 2010; Sonnhammer *et al.*, 1997].

Das „Phasin_2“ Motiv stellt vermutlich kein PHB-Granula Bindungsmotiv per se dar, da es einen Großteil der Gesamtsequenz bekannter Phasine ausmacht und auch Proteine

ohne „Phasin_2“ Motiv wie beispielsweise die PHB-Synthase oder das Regulatorprotein PhaR in der Lage sind an PHB-Granula zu binden. Phasine zeichnen sich unter anderem durch einen erhöhten Anteil hydrophober Aminosäuren aus [Neumann *et al.*, 2008]. Aufgrund ihres amphiphilen Charakters können sie mit dem hydrophoben Polymer in Wechselwirkung treten und befinden sich an der Grenzfläche zum umgebenden Cytoplasma. Bei der PHB-Bindung scheint insbesondere die Wechselwirkung kurzer hydrophober Abschnitte sowie die Tertiär- und Quartärstruktur der Phasine, für welche ein hoher Anteil α -helikaler Strukturen vorhergesagt wurde, maßgeblich zu sein [Neumann *et al.*, 2008].

3 | Funktionsanalyse neuartiger PHB-Granula-assoziiierter Proteine

Mittels der in Kapitel 2 verwendeten Ansätze zur Identifizierung neuartiger Proteine des PHB-Granulumkomplexes konnte eine Vielzahl an Treffern erhalten werden. Für die mittels Two-Hybrid und einer Proteomanalyse identifizierten Proteine PhaM (H16_A0141) und PhaP5 (H16_B1934) konnten zudem die Wechselwirkungen mit anderen PHB-Granula-assoziierten Proteinen bestätigt werden. Über eine Motivsuche wurden neben PhaP5 ferner drei weitere Phasin-artige Proteine (H16_B1988 (PhaP6), H16_B2296 und H16_B2326 (PhaP7)) identifiziert. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde der Einfluss all dieser Proteine auf die Bildung, Lokalisierung, Größe und Anzahl der PHB-Granula untersucht. Hierzu wurden Lokalisierungsstudien mittels eYfp (enhanced Yellow Fluorescent Protein) durchgeführt sowie der Einfluss einer Überexpression und Deletion der zugehörigen Gene untersucht.

3.1. Expressionsnachweis und genomischer Kontext

Um zu überprüfen ob die in Kapitel 2 identifizierten Proteine in *R. eutropha* exprimiert werden, wurden Transkriptomdaten aus verschiedenen Quellen analysiert [Brigham *et al.*, 2010, 2012b; Peplinski *et al.*, 2010]. Die genomische Organisation der zugehörigen Gene ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

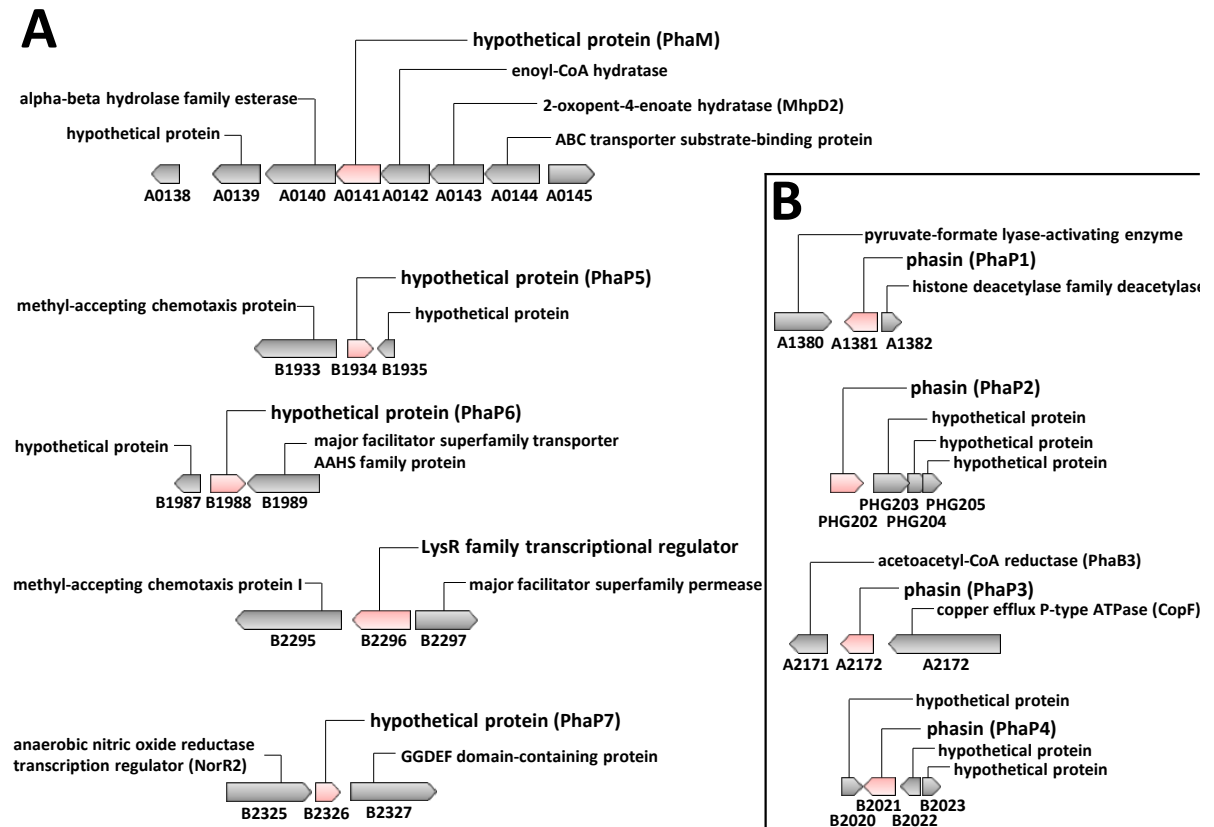


Abbildung 3.1.: Genomischer Kontext in dieser Arbeit identifizierter Gene (A) sowie bereits bekannter Phasingene in *R. eutropha* H16 (B). Das *phaM* Gen befindet sich in einem putativen Operon auf Chromosom 1 mit Genen, deren Funktionen unter anderem dem Fettsäuremetabolismus zugerechnet werden können. Der überwiegende Teil der Phasingene liegt hingegen einzeln eher zufällig im Genom verteilt auf Chromosom 1 und 2 sowie im Fall von PhaP2 auf dem Megaplasmid pHG1 vor. Lediglich das *phaP3* Gen liegt in Nachbarschaft zum Gen einer Acetoacetyl-CoA Reduktase (*phaB3*). Die Bezeichnung der Gene wurde nach der Kegg Datenbank vorgenommen.

Die Analyse bereits publizierter Transkriptomdaten [Brigham *et al.*, 2010] zeigte, dass die entsprechenden zugehörigen Transkripte aller untersuchten Gene (H16_A0141 (*phaM*), H16_B1934 (*phaP5*), H16_B1988 (*phaP6*), H16_B2296 und H16_B2326 (*phaP7*)) unter PHB-permissiven Bedingungen vorhanden sind (Abbildung 6 in Pfeiffer und Jendrossek [2012]). Das Transkript des *phaM* Gens war konstitutiv vorhanden, ähnlich dem der PHB-Synthase (PhaC1). Auch die mit *phaM* in einem putativen Operon gelegenen Gene scheinen konstitutiv abgelesen zu werden. Die Transkription der untersuchten Phasingene war hingegen während der PHB-Bildung erhöht, vergleichbar mit dem Hauptphasin

PhaP1 [Brigham *et al.*, 2012b; Pfeiffer und Jendrossek, 2012]. Der absolute Expressionslevel von PhaP1 ist jedoch um mehrere Größenordnungen höher als der anderer Phasine [Brigham *et al.*, 2010, 2012b; Peplinski *et al.*, 2010; Pfeiffer und Jendrossek, 2012; Pötter *et al.*, 2002, 2004, 2005].

Eine konstitutive Bildung von PhaM über einen vollständigen Zyklus von PHB-Bildung und -Abbau konnte ferner über einen Immunoblot-Nachweis bestätigt werden (Abbildung 4 in Pfeiffer und Jendrossek [2013]). Weiterhin wurde herausgefunden, dass die Expression von PhaM nicht an die Menge an PHB in der Zelle gekoppelt ist, wie beispielsweise für PhaP1 beschrieben [Lawrence *et al.*, 2005; Pötter *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2005a; Wieczorek *et al.*, 1995; York *et al.*, 2001a]. PhaM scheint vielmehr ähnlich wie die PHB-Synthase konstant gebildet zu werden [Brigham *et al.*, 2010, 2012b; Lawrence *et al.*, 2005; Peplinski *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2005a]. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit vorhandenen Transkriptomdaten [Brigham *et al.*, 2010, 2012b]. Der Expressionslevel von PhaM bewegt sich in einer ähnlichen Größenordnung wie jener der PHB-Synthase, was auf ein ausgewogenes stöchiometrisches Verhältnis beider Proteine deutet.

PhaP5 konnte ebenfalls im Immunoblot nachgewiesen werden [Pfeiffer und Jendrossek, 2013]. PhaP5 war jedoch unter den verwendeten Kulturbedingungen weit schwächer exprimiert als PhaM. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle untersuchten Gene nach vorhandener Datenlage unter PHB-Speicherbedingungen in *R. eutropha* auch exprimiert werden. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass Kulturbedingungen verschiedener Arbeiten nicht unbedingt direkt vergleichbar sind. Über eine Proteomanalyse konnte zudem eine Bildung der Proteine und Assoziation mit den PHB-Granula für PhaM und PhaP5 sowie für die Phasine PhaP1 - PhaP4 bestätigt werden (siehe unter 2.2). PhaP6 (H16_B1988), PhaP7 (H16_B2326) sowie H16_B2296 konnten hierbei jedoch nicht nachgewiesen werden.

3.2. Einfluss auf Größe, Anzahl und Lokalisierung der PHB-Granula

Um ihre intrazelluläre Lokalisierung zu bestimmen sowie Auswirkungen einer Überexpression nachzuweisen, wurden die verschiedenen Proteine sowie Fusionen an eYfp unter Kontrolle des konstitutiven Promotors der PHB-Synthase (P_{PhaC}) in *R. eutropha* exprimiert. Die unterschiedlichen Stämme wurden mittels Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie untersucht. Eine Assoziation mit den PHB-Granula konnte für alle untersuchten Proteine, ausgenommen H16_B2296, aufgezeigt werden [Pfeiffer und Jendrossek, 2011, 2012; Pfeiffer *et al.*, 2011; Wahl *et al.*, 2012]. Für H16_B2296 wurde hingegen nachgewiesen, dass es sich vermutlich um ein DNA-bindendes Regulatorprotein vom LysR-Typ handelt (Abbildung 5 in Pfeiffer und Jendrossek [2012]). Warum dieses Protein ein Phasin_2 Motiv besitzt ist bislang unklar (siehe dazu auch unter 2.3). Weiterhin konnte bestätigt werden, dass die bereits bekannten Phasine PhaP1 - PhaP4 ebenfalls mit den PHB-Granula assoziiert vorliegen (Abbildung 5 in Pfeiffer und Jendrossek [2011] und Abbildung 3 in Pfeiffer und Jendrossek [2012]). Eine Granula-Assoziation dieser Proteine wurde vormals bereits zum Teil in anderen Arbeiten nachgewiesen [Neumann *et al.*, 2008; Pötter *et al.*, 2004; Wieczorek *et al.*, 1995].

Im Falle von PhaM und PhaP5 wurden neben den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen auch elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht [Pfeiffer *et al.*, 2011; Schuth, 2011; Wahl, 2011; Wahl *et al.*, 2012]. Diese zeigten klar, dass beide Proteine Phasin-artige Eigenschaften besitzen und bei Überexpression signifikante Unterschiede in der räumlichen Verteilung sowie Größe und Anzahl der PHB-Granula in der Zelle vorliegen. PhaM konnte ferner aufgrund des eindeutigen Phänotyps einer $\Delta phaM$ -Mutante eine wahrscheinliche Funktion als „Granula-Segregationsfaktor“ zugeordnet werden. Diese Ergebnisse sind deshalb im nächsten Unterkapitel gesondert dargelegt.

Für PhaP6 (H16_B1988) und PhaP7 (H16_B2326) wurde eine Assoziation mit den PHB-Granula nachgewiesen. Diese konnte jedoch erst nach mehreren Stunden einer Kul-

tivierung unter PHB-permissiven Bedingungen beobachtet werden (Abbildung 5 in Pfeiffer und Jendrossek [2012]). Ein verzögertes Binden an die PHB-Granula wurde auch für eine PhaP3-eYfp-Fusion beobachtet [Pfeiffer und Jendrossek, 2012]. Die genauen Gründe für diese verzögerte Bindung an PHB konnten nicht ermittelt werden. Eine generelle Affinität beider Proteine für PHB scheint jedoch vorhanden zu sein. Möglicherweise wird ihre Assoziation mit den Granula über andere Proteine reguliert.

Ferner war bei Überexpression von PhaP6 und PhaP7 generell ein gehäuftes Auftreten der PHB-Granula an den Zellpolen zu beobachten [Pfeiffer und Jendrossek, 2012]. Dieser Effekt konnte auch bei Überexpression anderer Phasine beobachtet werden und war am prominentesten für PhaP5 (siehe unter 3.2.1). PhaP6 und PhaP7 waren jedoch im Gegensatz zu PhaM und PhaP1 - PhaP5 nicht eindeutig in der Lage den Phänotyp einer $\Delta phaP1$ -Mutante (verringertes PHB-Gehalt sowie meist nur ein sehr großes PHB-Granulum je Zelle) zu komplementieren (unveröffentlichte Ergebnisse). Des Weiteren konnten beide Proteine nicht im Two-Hybrid Assay oder über die Proteomanalyse gefunden werden. Ihre Gene scheinen jedoch nach obigen Transkriptomdaten abgelesen zu werden. Dies wirft die Frage auf, ob PhaP6 und PhaP7 wirklich als neuartige Phasine aufzufassen sind. Allerdings konnte anderen Phasinen abgesehen von PhaP1 bisher ebenfalls keine eindeutige Funktion zugeordnet werden [Kuchta *et al.*, 2007; Pötter *et al.*, 2004, 2005]. Deletionsmutanten von *phaP6* und *phaP7* zeigten, wie jene der Phasine *phaP2*, *phaP3* und *phaP4*, keinen bestimmten Phänotyp [Kuchta *et al.*, 2007; Pfeiffer und Jendrossek, 2012; Pötter *et al.*, 2004, 2005]. Für eine $\Delta phaP5$ -Mutante konnte ebenfalls kein eindeutiger Phänotyp festgestellt werden (siehe unter 3.2.1). Möglicherweise ist die Expression anderer Phasine in Relation zu PhaP1 zu gering, um bei ihrem Fehlen signifikante Auswirkungen auf die PHB-Granula feststellen zu können. Unter Umständen kommen diesen Phasinen regulatorische Funktionen zu, wie die in Kapitel 2 gefundenen Protein-Wechselwirkungen vermuten lassen.

In Tabelle 3.1 sind alle in *R. eutropha* H16 bekannten PHB-Granula-assoziierten Proteine einschließlich der in dieser Arbeit gefundenen zusammengefasst.

Tabelle 3.1.: Zusammenfassende Darstellung PHB-Granula-assoziiierter Proteine (PGAPs) in *R. eutropha* H16. Angegeben sind Molekulargewicht (MW), Gennummer (locus_tag), im Two-Hybrid identifizierte Interaktionen (schwache Interaktionen sind eingeklammert) sowie Hinweise auf eine PHB-Granula Assoziation: FM = Fluoreszenzmikroskopie (Gfp-Fusion), EM-IG = Elektronenmikroskopie mit Immungoldmarkierung, AFM = Rasterkraftmikroskopie, MS = Massenspektrometrie, PPI = Protein-Protein-Interaktion mit anderen PHB-Granula-assoziierten Proteinen, CO-AFP = Koaffinitätsaufreinigung, ÜE/DEL = Phänotypische Auswirkungen einer Überexpression/Deletion auf die PHB-Granula, Motiv = Vorhandensein eines für PGAPs typischen Motivs. *Die Funktionsbeschreibungen sind teilweise nur putativ bzw. mit zwar nachgewiesener Funktionalität des Proteins unter Überexpressionsbedingungen, aber nicht eindeutig belegter Funktion im Wildtyp.

Protein	MW [kDa]	locus_tag	Funktions- beschreibung	Evidenz	<i>In vivo</i> Interaktion	Literatur
PhaC1	64,3	H16_A1437	PHB-Synthase	FM, EM-IG, AFM, MS, PPI, CO-AFP, ÜE/DEL, Motiv	PhaM, (PhaZa1), PhaC1	Cho <i>et al.</i> [2012]; Gerngross <i>et al.</i> [1993]; Hiraihi <i>et al.</i> [2005]; Jendrossek [2009]; Peoples und Sinskey [1989]; Peters <i>et al.</i> [2007]; Peters und Rehm [2005]; Pfeiffer und Jendrossek [2012, 2013]; Pfeiffer <i>et al.</i> [2011]; Schubert <i>et al.</i> [1988]; Slater <i>et al.</i> [1988]
PhaC2	65,4	H16_A2003	PHB-Synthase* (Funktion unbekannt, da Gen vermutlich nicht exprimiert)	FM		Brigham <i>et al.</i> [2010, 2012b]; Peplinski <i>et al.</i> [2010]; Pfeiffer und Jendrossek [2012]
PhaR	21,0	H16_A1440	Regulator	EM-IG, MS, PPI, ÜE/DEL, Motiv	PhaP5, PhaR, (PhaZa1)	Pfeiffer und Jendrossek [2011, 2013]; Pötter <i>et al.</i> [2002]; Seo <i>et al.</i> [2003]

3.2. Einfluss auf Größe, Anzahl und Lokalisierung der PHB-Granula

Fortsetzung von Tabelle 3.1

PhaP1	20,0	H16_A1381	Hauptphasin	FM, EM-IG, AFM, MS, PPI, CO-AFP, ÜE, DEL, Motiv	PhaP1, PhaP2, (PhaP3-5, PhaZa1)	Dennis <i>et al.</i> [2008]; Kuchta <i>et al.</i> [2007]; Neumann <i>et al.</i> [2008]; Peters <i>et al.</i> [2007]; Pfeiffer und Jendrossek [2012, 2013]; Pfeiffer <i>et al.</i> [2011]; Pötter <i>et al.</i> [2004]; Wieczorek <i>et al.</i> [1995]; York <i>et al.</i> [2001b]
PhaP2	20,2	PHG202	Phasin*	FM, MS, PPI, ÜE, Motiv	PhaP1-5, (PhaZa1)	Pfeiffer und Jendrossek [2011, 2012, 2013]
PhaP3	19,6	H16_A2172	Phasin*	FM, MS, PPI, ÜE, Motiv	PhaP2-5, (PhaP1, PhaZa1)	Pfeiffer und Jendrossek [2011, 2012, 2013]; Pötter <i>et al.</i> [2004]
PhaP4	20,2	H16_B2021	Phasin*	FM, MS, PPI, ÜE, Motiv	PhaP2-5, (PhaP1, PhaZa1)	Pfeiffer und Jendrossek [2011, 2012, 2013]; Pötter <i>et al.</i> [2004]
PhaP5	15,7	H16_B1934	Phasin*	FM, MS, PPI, ÜE, Motiv	(PhaP1), PhaP2-5, PhaR, PhaZa1, PhaM	Pfeiffer und Jendrossek [2011, 2012, 2013]; Pfeiffer <i>et al.</i> [2011]; Wahl <i>et al.</i> [2012]
PhaP6	22,7	H16_B1988	Phasin*	FM, (ÜE), Motiv		Pfeiffer und Jendrossek [2012]
PhaP7	16,4	H16_B2326	Phasin*	FM, (ÜE), Motiv		Pfeiffer und Jendrossek [2012]
PhaM	26,6	H16_A0141	Granula-Segregationsfaktor, (Phasin)	FM, MS, PPI, CO-AFP, ÜE, DEL	PhaC1, PhaP5, PhaM, (PhaP2)	Cho <i>et al.</i> [2012]; Pfeiffer und Jendrossek [2013]; Pfeiffer <i>et al.</i> [2011]; Wahl <i>et al.</i> [2012]

3. Funktionsanalyse neuartiger PHB-Granula-assoziiierter Proteine

Fortsetzung von Tabelle 3.1

PhaZ1 (PhaZa1)	47,3	H16_A1150	Depolymerase	FM, MS, PPI, ÜE/DEL, Motiv	PhaP5, PhaZa1, (PhaR, PhaC1)	Brigham <i>et al.</i> [2012a]; Gebauer [2009]; Handrick <i>et al.</i> [2000]; Leuprecht [2012]; Pfeiffer und Jen- drossek [2011, 2013]; Sae- gusa <i>et al.</i> [2001]; Uchino <i>et al.</i> [2007, 2008]; York <i>et al.</i> [2003]
PhaZ2 (PhaZa2)	44,8	H16_A2862	Depolymerase	DEL, Mo- tiv		Brigham <i>et al.</i> [2012a]; Leuprecht [2012]; York <i>et al.</i> [2003]
PhaZ3 (PhaZa5)	45,2	H16_B0339	Depolymerase	FM, DEL, Motiv		Brigham <i>et al.</i> [2012a]; Leuprecht [2012]
PhaZ4 (PhaZa4)	27,4	PHG178	Depolymerase*	FM, Mo- tiv		Leuprecht [2012]; Schwartz <i>et al.</i> [2003]
PhaZ5 (PhaZa3)	45,2	H16_B1014	Depolymerase	FM, PPI, DEL, Mo- tiv	(PhaP1-5)	Brigham <i>et al.</i> [2012a]; Leuprecht [2012]; Uchino <i>et al.</i> [2008]; York <i>et al.</i> [2003]
PhaZ6 (PhaZd1)	39,2	H16_B2073	Depolymerase* (an PHB und im Cytosol nachgewie- sen)	(ÜE, FM)		Abe <i>et al.</i> [2005]; Leu- precht [2012]
PhaZ7 (PhaZd2)	38,4	H16_B2401	Depolymerase*	(ÜE, FM)		Leuprecht [2012]
PhaY1 (PhaZb)	74,3	H16_A2251	Oligomerhydro- lase (vermutlich nicht am Granulum lokalisiert)		PhaY1	Kobayashi <i>et al.</i> [2003, 2005]; Leuprecht [2012]; Saegusa <i>et al.</i> [2002]; Uchi- no <i>et al.</i> [2008]
PhaY2 (PhaZc)	31,6	H16_A1335	Oligomerhydro- lase (vermutlich nicht am Granulum lokalisiert)			Kobayashi <i>et al.</i> [2005]; Leuprecht [2012]; Uchino <i>et al.</i> [2008]

3.2.1. Eigenschaften von PhaM und PhaP5

3.2.1.1. Lokalisierung sowie Überexpression von PhaM und PhaP5

Mittels mikroskopischer Methoden konnte gezeigt werden, dass PhaP5 und PhaM in *R. eutropha* als PHB-assoziierte Proteine vorliegen. Beiden Proteinen scheinen ferner weitere Funktionen zuzukommen, da ihre Expression die intrazelluläre Lokalisierung der PHB-Granula determiniert. PhaP5 war in PHB-haltigen Zellen eindeutig mit den PHB-Granula kolokalisiert, welche überwiegend an den Zellpolen und der zukünftigen Zellteilungsebene lokalisiert waren. Im Gegensatz dazu war das eYfp-Fusionsprotein in PHB-freien Zellen homogen über die ganze Zelle verteilt (Abbildung 3 in [Pfeiffer und Jendrossek, 2012]). PhaM zeigte hingegen bereits in PHB-freien Zellen eine nicht homogene Verteilung. Hierbei wurde eine verstärkte Fluoreszenz in der Zellmitte beobachtet, während besonders an den Zellpolen und den Rändern der Zellen keine Fluoreszenz zu beobachten war (Abbildung 2 in [Pfeiffer *et al.*, 2011]). Auffallend war, dass PHB-Granula bei Überexpression von PhaM ebenfalls mehr zur Zellmitte hin orientiert in geclusterten Strukturen vorlagen. Eine erhöhte Expression von PhaP5 führte demgegenüber überwiegend zur Ausbildung deutlicher Granulacluster an den Zellpolen. Mittels TEM konnte gezeigt werden, dass sowohl im Wildtyp sowie auch im PhaM überexprimierenden Stamm PHB-Granula überwiegend mit dem Nukleoid assoziiert sind (Abbildung 4 in Pfeiffer *et al.* [2011] und Abbildung 3 in Wahl *et al.* [2012]). Im Gegensatz dazu führte eine Überexpression von PhaP5 zur Loslösung der PHB-Granula vom Nukleoid (Abbildung 6 in Pfeiffer *et al.* [2011] und Abbildung 6 in Wahl *et al.* [2012]).

Im PhaM überexprimierenden Stamm war zudem die Anzahl der PHB-Granula drastisch erhöht. Interessanterweise befanden sich diese häufig in zwei „Bündeln“ an den jeweils zu den Zellpolen hin orientierten Seiten des Nukleoids. Kommt es zur Teilung einer Zelle erhält jede der Tochterzellen eines dieser „Granula-Bündel“. Während es im Wildtyp mit zunehmender Inkubationszeit (in NB-Medium) zu einer Zunahme der Anzahl auf bis zu fünf Granula pro Zelle sowie zu einer starken Zunahme der Größe der PHB-Granula

kam, war im PhaM überexprimierenden Stamm lediglich eine Zunahme der Anzahl der Granula zu beobachten, während die Größe der Granula weit unter der des Wildtyps blieb. Bei Überexpression von PhaP5 waren die PHB-Granula hingegen fast ausschließlich in aggregierter Form an den Zellpolen lokalisiert und der Kontakt zum Nukleoid schien gestört. Weiterhin kam es ebenfalls zu einer Erhöhung der Anzahl und Abnahme der Größe der PHB-Granula im Vergleich zum Wildtyp. Die elektronenmikroskopisch gut sichtbaren Auswirkungen von PhaM und PhaP5 sind in Abbildung 3.2 exemplarisch dargestellt.

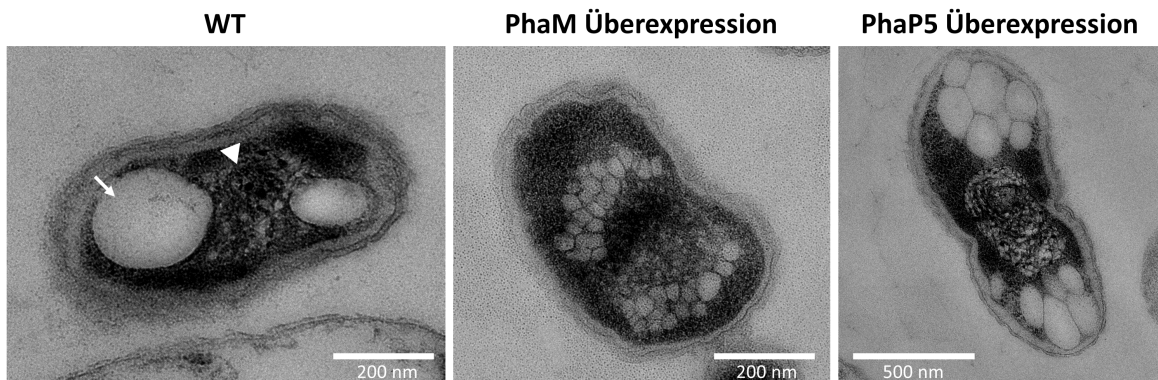


Abbildung 3.2.: Einfluss von PhaM und PhaP5 auf Größe, Anzahl und Lokalisierung der PHB-Granula in *R. eutropha*. Im Wildtyp (WT) liegen die PHB-Granula (Pfeil) mit den im Elektronenmikroskop als dunkle Region sichtbaren denaturierten und fixierten Nukleoiden (Pfeilspitze) assoziiert vor. Sowohl bei Überexpression von PhaM als auch PhaP5 ist die Anzahl der PHB-Granula erhöht. Im PhaM überexprimierenden Stamm sind diese zudem deutlich kleiner als im Wildtyp. Bei Überexpression von PhaM befinden sich diese in zwei „Bündeln“ an beiden Seiten des Nukleoids. Hingegen ist bei Überexpression von PhaP5 der Kontakt der Granula zum Nukleoid gestört, welche an den Zellpolen aggregiert vorliegen.

Aufgrund ihrer Eigenschaft die Größe und Anzahl der PHB-Granula in der Zelle beeinflussen zu können, sind PhaP5 und PhaM eindeutig den Phasinen zuzurechnen. Dies wird ferner dadurch bestätigt, dass PhaM und PhaP5 in der Lage sind den Phänotyp einer $\Delta phaP1$ -Mutante zu komplementieren (unveröffentlichte Ergebnisse). Wieczorek *et al.* [1995] konnten vormals am Hauptphasin PhaP1 zeigen, dass eine Überexpression zu einer Erhöhung der Granulaanzahl und zu einer Verringerung der Granulagröße führt. Im Gegensatz dazu hat eine Deletion von *phaP1* den gegenteiligen Effekt und wenige

sehr große PHB-Granula und einen generell verringerten PHB-Gehalt der Zelle zur Folge [Wieczorek *et al.*, 1995; York *et al.*, 2001b].

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zum so genannten Aktivator des Polymerabbaus (ApdA) aus *Rhodospirillum rubrum* [Handrick *et al.*, 2004a,b,c] wurde vermutet, dass PhaP5 auch eine Rolle bei der PHB-Mobilisierung spielt. Ein aktivierender Effekt auf die PHB-Depolymerase aus *R. rubrum* konnte allerdings in *in vitro* Versuchen bei Substitution von ApdA durch PhaP5 nicht festgestellt werden [Pfeiffer und Jendrossek, 2011]. Jedoch handelt es sich bei dem durchgeführten Nachweis um ein artifizielles System (Hydrolyse von nPHB aus *R. eutropha* durch PhaZ1 aus *R. rubrum* unter Anwesenheit von ApdA bzw. PhaP5). Ob PhaP5 eine solche Funktion in *R. eutropha* selbst besitzt und dort an der Regulation der PHB-Mobilisierung beteiligt ist, wurde bisher nicht näher untersucht. Inwieweit das Aktivator/PHB-Depolymerase System in *R. rubrum in vivo* überhaupt von Bedeutung ist, ist außerdem bislang nicht bekannt.

3.2.1.2. Wechselwirkung von PhaM mit DNA

Aufgrund der Vorhersage für PhaM als hypothetisches Membranprotein, wurde auch untersucht, ob dieses an der Cytoplasmamembran lokalisiert vorliegen kann [Pfeiffer *et al.*, 2011]. Bisher konnten jedoch keine experimentellen Hinweise gefunden werden, dass PhaM tatsächlich an der inneren Cytoplasmamembran lokalisiert ist. Eine direkte Assoziation der PHB-Granula mit der Membran war zudem eher selten zu beobachten. Auffallend war hingegen die eindeutige Assoziation der PHB-Granula mit dem Nukleoid bei Überexpression von PhaM. Zudem weist PhaM einen hohen Anteil an C-terminalen Alaninen, Prolinen und Lysinen (AAKP-Motive) auf, wie sie auch bei DNA gebundenen Proteinen der Histon H1 Familie anzutreffen sind [Medvedkin *et al.*, 1995]. Eine Vorhersage für DNA-Bindedomänen (BindN¹, Abbildung 3.3) gab Hinweise auf eine Histon-ähnliche Domäne im C-terminalen Bereich von PhaM. Mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie konnte bestätigt werden, dass PhaM mit den PHB-Granula kolokalisiert

¹<http://bioinfo.ggc.org/bindn/>

3. Funktionsanalyse neuartiger PHB-Granula-assoziiierter Proteine

Sequence:	MFGQIPDF ⁺ TNGFDF ⁺ MRRLW ⁺ SGSG ⁺ MPAGM ⁺ MPGLQ ⁺ AMT ⁺ PPMDL ⁺ DDLDK ⁺ RIADL ⁺ KAVES ⁺ WLQ
Prediction:	-----+-----++-+++-+++-----+--+-----+-----+-----++
Confidence:	778586562576757466326552258757557354465899999943886927865282
Sequence:	LNTNLLR ⁺ TTIQ ⁺ GLEV ⁺ QRATL ⁺ LVAL ⁺ QTF ⁺ GNALS ⁺ PEAM ⁺ QSAMEN ⁺ VARA ⁺ ANT ⁺ PSAAA ⁺ PER ⁺ DAGA
Prediction:	+++-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Confidence:	724346846736967468576784256367524664375568855545275676746899
Sequence:	DADSGT ⁺ QQE ⁺ PPAA ⁺ ERP ⁺ QAAA ⁺ SD ⁺ TDSAL ⁺ PPNAA ⁺ LWWD ⁺ LLQQ ⁺ QFN ⁺ QIASS ⁺ AAAA ⁺ SIAP ⁺ FGMG
Prediction:	---+---+-----+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
Confidence:	675354424576757435564446388454999579996558436646555637656865
Sequence:	GVGG ⁺ FGTAA ⁺ SPDAAA ⁺ QAAA ⁺ AKPK ⁺ TAPG ⁺ KAAS ⁺ AGT ⁺ GKPA ⁺ ARKA ⁺ PAK ⁺ KAPAK ⁺ KA ⁺ AKAK ⁺ PAR
Prediction:	-----+---+---+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
Confidence:	675625545645778275448286342644293282943599242792427832947349
Sequence:	DAGNGED ⁺ NGK ⁺ NGG ⁺ NNG ⁺ ANG ⁺ SSAA
Prediction:	+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
Confidence:	26756452553223324528724

Abbildung 3.3.: BindN-Vorhersage an der DNA-Bindung beteiligter Aminosäuren von PhaM. An der Bindung beteiligte Aminosäuren sind mit „+“ und in rot markiert, nicht beteiligte Aminosäuren mit „-“ und in grün. Die Präzision der Vorhersage (Confidence) ist von 0 (sehr gering) bis 9 (sehr hoch) angegeben. Die Sensitivität der Methode wurde auf 80 % eingestellt.

vorliegt und diese sich in großer Nähe zum Nukleoid befinden (Abbildung 2 in Pfeiffer *et al.* [2011]). Durch einen „Electrophoretic Gel Mobility Shift Assay“ (EMSA) wurde ferner nachgewiesen, dass PhaM (mittels His-Tag gereinigt) auch *in vitro* in der Lage ist unspezifisch mit DNA zu wechselwirken (Abbildung 3 in Pfeiffer *et al.* [2011]).

Der N-terminale Teil von PhaM ist hingegen vermutlich für die Wechselwirkung mit den PHB-Granula und/oder der PHB-Synthase verantwortlich. In allen 20 mit der PHB-Synthase als Köder im Two-Hybrid identifizierten Klonen, welche Teile des *phaM* Gens beinhalteten, war der Aminosäurebereich 123 bis 196 (von 263 Aminosäuren in PhaM) vorhanden. Mit PhaM als Köder identifizierte Klone mit der PHB-Synthase als Beute deckten hingegen immer den Aminosäurebereich 60 bis 184 ab (von 589 Aminosäuren in PhaC1). Hieraus lässt sich ableiten, dass diese Bereiche beider Proteine für ihre Wechselwirkung von zentraler Bedeutung sind. Für die PHB-Synthase konnte vormalig gezeigt werden, dass der C-Terminus des Proteins vermutlich für die Bindung an PHB verantwortlich ist, während der N-terminale Bereich, welcher für eine Protein-Wechselwirkung

mit PhaM nötig scheint, entbehrlich für die katalytische Aktivität des Enzyms ist [Jahns und Rehm, 2009; Rehm, 2003; Rehm *et al.*, 2002].

3.2.1.3. Mikroskopische Untersuchungen der $\Delta phaM$ -Mutante

Um die Auswirkungen des Fehlens von PhaM und PhaP5 auf die intrazelluläre Lokalisierung und Verteilung der PHB-Granula während der Zellteilung zu untersuchen, wurden das *phaM*- und *phaP5*-Gen in *R. eutropha* mittels des *sacB* Knock-Out-Systems [Lenz und Friedrich, 1998] deletiert. Während für die *phaP5*-Deletionsmutante in den durchgeführten Mikroskopieexperimenten kein signifikanter Einfluss der Deletion auf Lokalisierung, Größe und Anzahl der PHB-Granula festgestellt werden konnte, zeigte die *phaM*-Deletionsmutante einen eindeutigen Phänotyp [Pfeiffer *et al.*, 2011]. Zellen der *phaM*-Deletionsmutante waren noch in der Lage PHB-Granula zu bilden. Die Deletion von *phaM* führte jedoch zu signifikanten Veränderungen in Bezug auf Anzahl und Größe der gebildeten PHB-Granula. Die Auswirkungen sind in Abbildung 3.4 gezeigt (siehe zudem Abbildung 5 in Pfeiffer *et al.* [2011] und Abbildung 5 in Wahl *et al.* [2012]). Zellen der $\Delta phaM$ -Mutante bildeten meist nur ein bis maximal drei PHB-Granula, welche einen weit größeren Durchmesser als die des Wildtyps aufwiesen. Der überwiegende Anteil der Zellen des Wildtyps besaß hingegen unter identischen Bedingungen zwischen zwei und sechs Granula. Ein ähnlicher Phänotyp wurde für eine $\Delta phaP1$ -Mutante beschrieben [Pötter *et al.*, 2005]. Ein indirekter Effekt des Fehlens von PhaM auf die Expression des Hauptphasins (PhaP1) konnte jedoch nicht gefunden werden [Pfeiffer *et al.*, 2011].

Zellen der $\Delta phaM$ -Mutante waren zudem in der Verteilung der PHB-Granula auf die Tochterzellen beeinträchtigt. Im Vergleich zum Wildtyp war die Anzahl PHB-freier Zellen drastisch erhöht. So waren 2 h nach Transfer zu PHB-permissiven Bedingungen 35 % der Zellen der $\Delta phaM$ -Mutante ohne PHB-Granula, nach 4 h noch 24 % (Abbildung 5 in [Pfeiffer *et al.*, 2011]). Zudem war in Zellen, welche sich gerade in der letzten Phase der Zellteilung befanden, häufig nur in einer der Tochterzellen ein PHB-Granulum vorhanden. Der Phänotyp der $\Delta phaM$ -Mutante konnte durch Bereitstellung von *phaM*

in trans (unter Kontrolle des konstitutiven PhaC-Promotors) komplementiert werden. Zellen der komplementierten Deletionsmutante bildeten wieder mehrere kleine Granula, welche meist in Clustern in der Zellmitte lokalisiert waren, vergleichbar mit dem Phänotyp der Überexpression von PhaM im Wildtyp. Der Anteil PHB-freier Zellen war zudem wieder vergleichbar mit dem des Wildtyps.

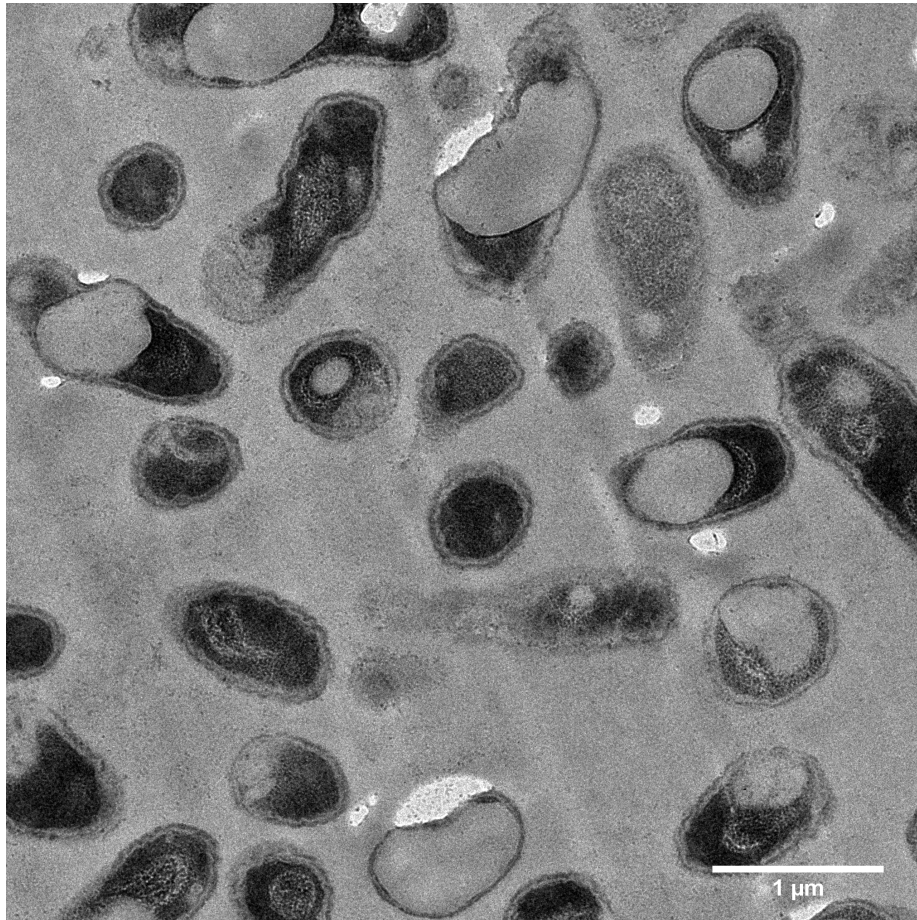


Abbildung 3.4.: Auswirkungen der Deletion des *phaM* Gens in *R. eutropha*. Zellen der Deletionsmutante wurden hierzu nach 5 h Kultivierung unter PHB-permissiven Bedingungen im Elektronenmikroskop betrachtet. Zellen der Deletionsmutante bilden nur wenige PHB-Granula, welche einen weit größeren Durchmesser als die des Wildtyps aufwiesen. Ferner ist die Verteilung der PHB-Granula auf die Tochterzellen beeinträchtigt, was sich in einem hohen Anteil PHB-freier Zellen äußert.

3.3. Modell zur Verteilung der PHB-Granula

Basierend auf den oben genannten Ergebnissen wurde ein Modell zur Steuerung der PHB-Granula Verteilung entwickelt (Abbildung 3.5). Insbesondere PhaM ist hierbei von zentraler Bedeutung, da es in der Lage ist an DNA (Nukleoid) und an PHB zu binden und so vermutlich PHB-Granula physisch mit dem Nukleoid verknüpft. Damit kann offenbar gewährleistet werden, dass diese im Zuge der Nukleoid- bzw. Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt werden. Ob PhaM hierbei direkt in der Lage ist an PHB zu binden oder dies über Wechselwirkungen mit anderen Proteinen (PhaC1, PhaP5) geschieht ist bislang unklar. Die gravierenden Einflüsse einer PhaM-Überexpression auf das Oberfläche/Volumen Verhältnis der PHB-Granula lassen allerdings eine direkte Bindung von PhaM an die PHB-Granula vermuten. Vermutlich kommt es bei einer Überexpression von PhaM nicht zu einer gleichwertigen Erhöhung der Anzahl an mit PhaM interagierenden Proteinen auf den PHB-Granula.

Die postulierte Funktion von PhaM wird durch die Beobachtungen an einer *phaM*-Deletionsmutante untermauert, welche Defekte in der gleichmäßigen Aufteilung der PHB-Granula auf die Tochterzellen aufweist. Diese äußern sich in einem erhöhten Anteil PHB-freier Zellen sowie einer verringerten Anzahl der PHB-Granula, welche einen weit größeren Durchmesser als die des Wildtyps aufweisen. Auch die bei einer Überexpression von PhaM beobachteten Phänomene wie eine verstärkte Zellelongation sowie ein verlangsamtes Wachstum [Pfeiffer *et al.*, 2011], lassen darauf schließen, dass eine bestimmte regulierte Kopienzahl von PhaM wichtig ist, um ein für die Zelle ökonomisches Oberfläche/Volumen Verhältnis der PHB-Granula zu erreichen und eine optimale Verteilung der PHB-Granula während der Zellteilung zu gewährleisten.

In *Pseudomonas putida* wurde ebenfalls kürzlich ein Protein (PhaF) mit ähnlicher Funktion wie PhaM beschrieben. Der Phänotyp der *phaF*-Deletionsmutante ist vergleichbar mit dem der Δ *phaM*-Mutante [Galán *et al.*, 2011]. PhaF hat ebenfalls die Fähigkeit sowohl an DNA als auch an PHB-Granula zu binden. Es ist so vermutlich ebenso an der

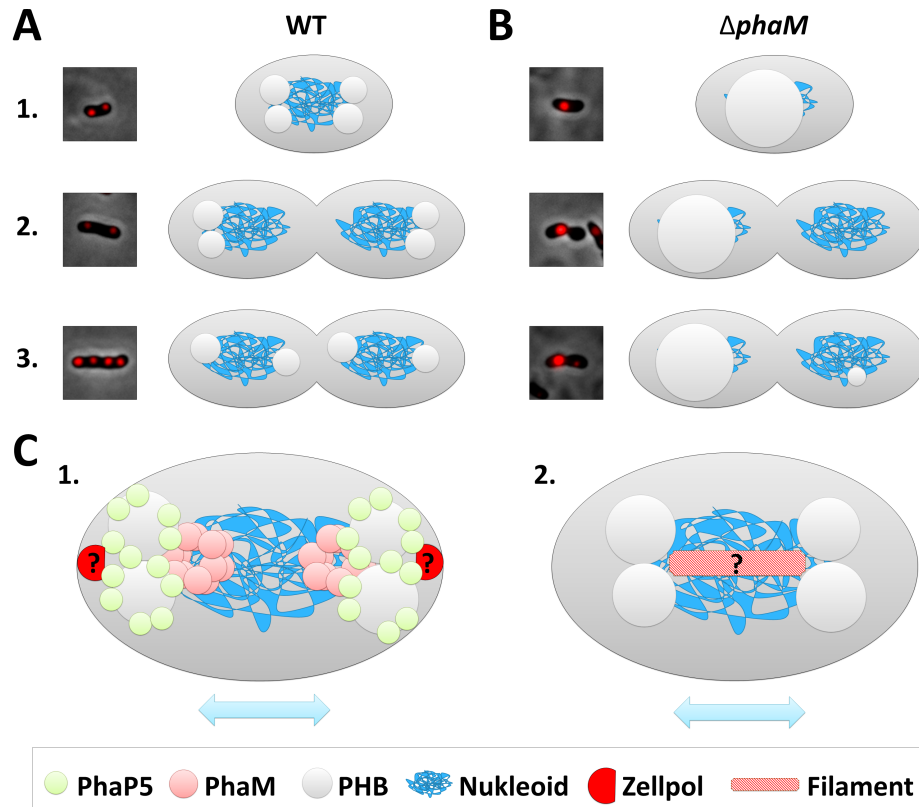


Abbildung 3.5.: Modell zur Verteilung der PHB-Granula während der Zellteilung in *R. eutropha* H16. (A) Durch eine Verankerung der PHB-Granula über PhaM am Nukleoid wird gewährleistet, dass diese im Zuge der Nukleoid- bzw. Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt werden (1./2.). Nach vollzogener Chromosomensegregation sorgt möglicherweise ein noch unbekannter Mechanismus dafür, dass PHB-Granula wieder gleichermaßen zu beiden Seiten des Nukleoids angeordnet werden (siehe dazu auch (C)) (3.). Dieser Prozess kann sowohl vor als auch erst nach einer endgültigen Teilung beider Zellen ablaufen. Eine Neusynthese von PHB wäre hierfür vermutlich zu langsam. (B) In einer *phaM*-Deletionmutante ist das Oberfläche/Volumen-Verhältnis der PHB-Granula, die Anordnung am Nukleoid sowie deren Aufteilung dereguliert. Zellen der Deletionsmutante bilden meist nur ein sehr großes PHB-Granulum, welches mehr oder weniger zufällig an eine der Tochterzellen weitergegeben wird (1./2.). Dies führt zu einem hohen Anteil PHB-freier Zellen. In den Tochterzellen kann es aufgrund der Neusynthese von PHB zum Auftreten kleiner PHB-Granula kommen (3.). (C) Für eine Neupositionierung vorhandener PHB-Granula nach vollzogener Chromosomensegregation können bisher nur verschiedene Mechanismen vermutet werden: Möglicherweise trägt das Phasin PhaP5 zu einer Neuordnung der PHB-Granula bei, indem es direkt oder indirekt an den Zellpolen lokalisiert wird (1.). Denkbar wäre auch ein aktiver Prozess (unter ATP oder GTP-Verbrauch), welcher zu einer äquidistanten Positionierung der PHB-Granula auf dem Nukleoid führt. Dieser könnte unter Beteiligung dynamischer Filamente ablaufen (Push- oder Pull-Mechanismus, (2.)).

räumlichen Verteilung von PHB-Granula in der Zelle und bei der Zellteilung beteiligt [Galán *et al.*, 2011; Prieto *et al.*, 1999]. Auch aus *Rhodococcus opacus* ist ein ähnliches Protein (TadA) bekannt, welchem möglicherweise eine analoge Funktion bei der Steuerung der Lokalisierung von „Lipid-Bodies“ zukommt [MacEachran *et al.*, 2010]. PhaM, PhaF und TadA haben einen charakteristischen hohen Anteil an C-terminalen Alaninen, Prolinen und Lysinen gemeinsam und sind damit den Histon H1-ähnlichen DNA-bindenden Proteinen zuzurechnen [Medvedkin *et al.*, 1995]. PhaM, PhaF und TadA steuern die Lokalisierung verschiedener Speichergranula (PHB, PHA_{MCL} beziehungsweise Lipid-Bodies). Da sie ferner deutliche Unterschiede in den nicht DNA-bindenden Bereichen aufweisen, ist unklar, inwieweit sie einem gemeinsamen Vorläufer abstammen oder ob sie in der Lage wären ein Fehlen des jeweiligen anderen Proteins funktionell zu komplementieren. Für PhaF wurde bisher zudem nicht nachgewiesen, ob dieses im Stande ist mit anderen Proteinen des PHA_{MCL}-Stoffwechsels zu interagieren. Für Histon H1-ähnliche Proteine konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese nicht nur unspezifisch mit DNA wechselwirken sondern auch in der Lage sind spezifisch die Expression einzelner Gene zu beeinflussen [Dorman und Deighan, 2003]. So reguliert beispielsweise das Histon H1-ähnliche Protein AlgP die Alginatbildung in *Pseudomonas aeruginosa* [Deretic *et al.*, 1992; Deretic und Konyecsni, 1990; Medvedkin *et al.*, 1995]. Auch für PhaF wurde eine solche Funktion beschrieben [Prieto *et al.*, 1999]. Ob PhaM in *R. eutropha* analoge Funktionen übernimmt wurde bisher nicht untersucht. Als weiteres Protein welches sowohl an PHB als auch an DNA bindet, wurde der Transkriptionsregulator PhaR beschrieben [Pötter *et al.*, 2002, 2005; Pötter und Steinbüchel, 2005]. Ob PhaR allerdings zu einer funktionellen Verknüpfung der Granula mit dem Nukleoid im Zuge der Chromosomensegregation beiträgt ist unklar. Da PhaR vermutlich nur spezifisch an bestimmte Bereiche der DNA bindet [Pötter *et al.*, 2002, 2005] scheint dies weniger wahrscheinlich.

Aus dem in Abbildung 3.5 gezeigten Modell verbleiben offene Fragestellungen. Unklar ist beispielsweise, ob und wie eine äquivalente Anzahl an PHB-Granula zu beiden Seiten des Nukleoids sowie eine erneute Aufteilung der vorhandenen Granula nach erfolgter Chromosomensegregation gewährleistet wird. Es ist anzunehmen, dass eine möglichst

gleichmäßige Aufteilung der PHB-Granula für die Gesamtfitness einer Zellpopulation ökonomisch wichtig ist. Eine Neusynthese von PHB-Granula an den PHB-freien Seiten des Nukleoids wäre hierfür möglicherweise zu langsam. Daher ist ein aktiver Prozess denkbar, welcher eine Aufteilung der PHB-Granula regelt. Für eine Neusynthese spricht allerdings, dass PHB-Granula an der Zellteilungsebene, bei sich in der Teilung befindenden Zellen, im fluoreszenzmikroskopischen Bild oft kleiner sind und eine schwächere Fluoreszenz zeigen, als die zu den Polen hin orientierten Granula. Dies könnte jedoch auch auf einen ablaufenden aktiven Prozess zurückzuführen sein.

Sowohl bei einer hohen Granulazahl (PhaM-Überexpression) als auch im Wildtyp wurde eine nahezu gleichwertige Anzahl an PHB-Granula zu beiden Seiten des Nukleoids beobachtet, während die Zellmitte beziehungsweise das Zentrum des Nukleoids meist frei bleibt [Pfeiffer *et al.*, 2011; Schuth, 2011; Wahl, 2011; Wahl *et al.*, 2012]. Für einen Fehlen von PHB-Granula zur Zellmitte hin könnten Komponenten des bakteriellen Cytoskeletts [Graumann, 2007] (z.B. FtsZ-Ring) oder das Nukleoid selbst verantwortlich sein. Allerdings finden sich zu späteren Zeitpunkten der PHB-Speicherung im Wildtyp, in nur noch wenig teilungsaktiven Zellen, auch PHB-Granula, welche über das Nukleoid verteilt vorliegen. Möglicherweise ist die Bindungsspezifität von PhaM auch über den Packungsgrad des Nukleoids determiniert. Elektronmikroskopischen Aufnahmen des Nukleoids nach zu urteilen liegt in den metabolisch aktiveren Randbereichen des Nukleoids eine geringere Packungsdichte der DNA vor [Hoppert und Mayer, 1999; Robinow und Kellenberger, 1994]. Weitere Arbeiten zeigen, dass bestimmte Histon-ähnliche Proteine eher in diesen Randbereichen anzutreffen sind [Dürrenberger *et al.*, 1988; Kellenberger, 1988].

Von Segregationssystemen für Plasmide mit geringer Kopienzahl („low-copy“) sind Mechanismen bekannt, welche unter Beteiligung der ATPase ParA zu einer gleichmäßigen Anordnung der Plasmide auf dem Nukleoid führen. Damit wird eine gleichmäßige Aufteilung dieser auf Zellen der Folgegenerationen gewährleistet. ParA bildet Filamente auf dem Nukleoid aus, wobei ein oszillierender Mechanismus aus Aufbau- und Zerfall der

Filamente eine äquidistante Anordnung der Plasmide auf dem Nukleoid zur Folge hat [Gerdes *et al.*, 2010; Howard und Gerdes, 2010; Ringgaard *et al.*, 2009]. Auch für die Anordnung von Carboxysomen in Cyanobakterien, welche als CO₂-fixierende Mikrokompartimente fungieren, wurde kürzlich ein ParA-abhängiger Mechanismus vermutet [Iancu *et al.*, 2010; Rae *et al.*, 2012; Savage *et al.*, 2010]. Es konnte gezeigt werden, dass Carboxysomen zusammen mit anderen Speichergranula (Polyphosphat) an einer filamentartigen Struktur angeordnet sind [Iancu *et al.*, 2010]. In einer *parA*-Deletionsmutante ist die Anordnung der Carboxysomen in äquidistanten Abständen gestört [Savage *et al.*, 2010]. Für die Positionierung und Verteilung von Magnetosomen [Katzmann *et al.*, 2011; Lin und Pan, 2011; Ozyamak *et al.*, 2013; Sonkaria *et al.*, 2012], Proteinclustern [Thompson *et al.*, 2006] sowie für weitere Beispiele [Lutkenhaus, 2012] wurden ebenfalls ParA-ähnliche Mechanismen postuliert.

Möglicherweise ist für PHB-Granula ein ähnliches Prinzip für eine Gleichverteilung der Granula am Nukleoid verantwortlich. Für PhaM konnten hochmolekulare lösliche Komplexe nachgewiesen werden [Pfeiffer und Jendrossek, 2013]. Ob PhaM selbst in der Lage ist ATP- oder GTP-abhängig Filamente am Nukleoid auszubilden wurde jedoch bisher nicht untersucht. Das für ParA/MinD-Typ ATPasen typische abgewandelte Walker A Sequenz-Motiv „KGGXXGKT“ mit zwei konservierten Lysininen [Leipe *et al.*, 2002; Lutkenhaus, 2012; Lutkenhaus und Sundaramoorthy, 2003] ist in PhaM nicht vorhanden. PhaM weist jedoch gewisse Ähnlichkeiten zu ParB (ATPase-aktivierendes Protein), FliK (Flagellen Hook Length Control Protein) und FimV (Pilus Assembly Protein) auf (Paralogue zu PhaM in *R. eutropha*). Das Pilus Assemblierungsprotein FimV tauchte zudem als Treffer in der Proteomanalyse sowie bei der Verwendung von PhaM als Köder gegen die Genbank in Two-Hybrid Versuchen auf (siehe Anhang A.2 und A.3). Diese Proteine regulieren alle den Aufbau und Zerfall von Filamenten [Erhardt *et al.*, 2010; Hirano *et al.*, 2005; Macnab, 2003; Mattick, 2002; Minamino *et al.*, 1999, 2009; Semmler *et al.*, 2000; Waters *et al.*, 2007; Wehbi *et al.*, 2011]. ParB, indem es in direkte Wechselwirkung mit ParA tritt und dessen ATPase-Aktivität stimuliert [Gerdes *et al.*, 2010; Howard und Gerdes, 2010; Ringgaard *et al.*, 2009]. Denkbar wäre, dass ParA-ähnliche Proteine in

R. eutropha an einer Verteilung der PHB-Granula mitbeteiligt sind. Diese könnten möglicherweise direkt oder indirekt durch PhaM in ihrer ATPase-Aktivität reguliert werden. Für *R. eutropha* H16 sind derer drei bekannt (PHG374, H16_A3646, H16_B0003) sowie weitere Proteine mit ähnlicher Funktion. Protein-Wechselwirkungen zwischen PhaM und einem dieser Proteine wurden allerdings bisher nicht gefunden.

Als weitere Möglichkeit die gewährleistet, dass PHB-Granula nach vollzogener Zellteilung wieder gleichmäßig an beide Seiten der Zelle gelangen, wurde das ebenfalls identifizierte Phasin PhaP5 vermutet. Dieses ist in der Lage mit PhaM zu interagieren [Pfeiffer und Jendrossek, 2013; Pfeiffer *et al.*, 2011]. Allerdings konnten bisher keine Hinweise gefunden werden, dass eine Deletion von *phaP5* diesen Prozess stört [Pfeiffer und Jendrossek, 2011]. Auch bei einer zusätzlichen Deletion von *phaP5* in der Δ *phaM* oder einer Δ *phaP1-4* Mutante [Pötter *et al.*, 2005], in welchen der Einfluss anderer Phasine minimiert sein sollte, konnte kein gravierend veränderter Phänotyp nach Deletion von *phaP5* festgestellt werden (unveröffentlichte Ergebnisse). Es zeigte sich jedoch, dass bei Überexpression von PhaP5 PHB-Granula nahezu ausschließlich an den Zellpolen aggregiert vorliegen und der Kontakt zum Nukleoid gestört ist. Ob die Lokalisierung der PHB-Granula an den Zellpolen durch eine direkte Affinität von PhaP5 für die Zellpole, möglicherweise durch Wechselwirkung mit anderen am Zellpol lokalisierten Proteinen, oder indirekt durch Störung der Assoziation der PHB-Granula mit dem Nukleoid beruht, ist bislang unklar. Im Two-Hybrid wurden unter anderem Chemotaxis-Proteine identifiziert (H16_B0232, H16_B2044), welche für eine Lokalisierung von PhaP5 zusammen mit anderen Phasinen an den Zellpolen verantwortlich sein könnten. Zwar konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie (eYfp-Markierung) eine Lokalisierung von PhaP5 an den Zellpolen unter Abwesenheit von PHB nachgewiesen werden (Kultivierung der PHB-negativen Mutante *R. eutropha* PHB-4 unter PHB-permissiven Bedingungen, Abbildung 6 in Pfeiffer *et al.* [2011]), allerdings ergab sich der gleiche Befund auch für Fluoreszenzfusionen anderer Phasine [Pfeiffer und Jendrossek, 2012]. Zudem handelte es sich vermutlich um ein Artefakt des Stammes PHB-4, da die Ergebnisse mit einer präzisen PHB-Synthase Gendeletionsmutante (*R. eutropha* H16 Δ *phaC1*) nicht bestätigt werden konnten (Ab-

bildung 3 in Pfeiffer und Jendrossek [2012]). Deshalb ist eher davon auszugehen, dass PhaP5 in PHB-freien Zellen homogen vorliegt und selbst keine direkte Bindungsaffinität für die Zellpole besitzt. Möglicherweise ist PhaP5 sogar teilweise indirekt mit dem Nukleoid assoziiert über Wechselwirkung mit PhaM (Abbildung 2 in [Pfeiffer und Jendrossek, 2013]). Denkbar ist, dass PhaP5 durch direkte Wechselwirkung mit PhaM dessen DNA-Bindeaffinität moduliert. Möglicherweise beruht die Aggregation der Granula an den Zellpolen aber auch auf einem Verdrängungseffekt von PhaM von den Granula bei Überangebot an PhaP5. Eine mit dem Zellzyklus synchronisierte Regulierung der PHB-Granula Positionierung durch PhaP5 basierend auf einer Transkriptionsregulation des *phaP5* Gens erscheint unwahrscheinlich (da zu langsam). Daher müsste vermutlich die Aktivität und Lokalisierung von PhaP5 auf Proteinebene (z.B. durch Phosphorylierung) reguliert werden oder ein weiteres Protein, welches PhaP5 zu den Zellpolen dirigiert, dynamisch an den Zellpolen lokalisiert sein. Die genaue Funktion von PhaP5 ist bisher nicht geklärt. Für ein detaillierteres Modell zur Steuerung der PHB-Granula Verteilung in *R. eutropha* und der daran beteiligten Proteine sind deshalb weitere Arbeiten notwendig.

4 | Lokalisierung der PHB-Synthase - Untersuchungen zum Initiationsort der PHB-Granula

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die Lokalisierung des Schlüsselenzyms der PHB-Speicherung, der PHB-Synthase (PhaC1), untersucht. Hierdurch sollten Hinweise auf den Entstehungsort der PHB-Granula erhalten werden. Für die Biosynthese nativer PHB-Granula *in vivo* wurden verschiedene Modelle propagiert [Stubbe und Tian, 2003]. Während nach dem Mizellen-Modell ein zufälliger Entstehungsort der PHB-Granula denkbar ist, ergibt sich als Konsequenz aus dem „Budding-Modell“, dass PHB-Granula in der frühen Phase ihrer Bildung nahe oder an der Zellmembran lokalisiert sind. Die Vorstellung einer Bildung der Granula an der Zellmembran wird durch fluoreszenzmikroskopische Studien verschiedener Bakterienstämme untermauert. Diese weisen darauf hin, dass PHB-Granula in der frühen Phase ihrer Bildung nicht zufällig verteilt in der Zelle vorliegen, sondern an den Zellpolen und/oder der inneren Seite der Cytoplasmamembran lokalisiert sind [Hermawan und Jendrossek, 2007; Jendrossek, 2005, 2009; Jendrossek *et al.*, 2007; Peters *et al.*, 2007; Peters und Rehm, 2005; Shekhovtsev und Zharikova, 1978]. Voraussetzung für das „Budding-Modell“ wäre eine zumindest transiente Lokalisierung der PHB-Synthase an der Cytoplasmamembran.

Nach anderen Daten findet die Initiation der PHB-Synthese mehr oder weniger in der Mitte der Zellen an bestimmten Strukturen („Mediation Elements“) statt [Stubbe *et al.*,

2005; Tian *et al.*, 2005a,b]. Zwar existieren Veröffentlichungen, welche dafür sprechen, dass die PHB-Synthase in PHB-freien Zellen im Cytoplasma vorliegt und sich zu späteren Zeitpunkten der PHB-Speicherung an der Oberfläche der PHB-Granula befindet [Gerngross *et al.*, 1993; Haywood *et al.*, 1989], allerdings gibt es Zweifel daran, ob es sich hierbei nicht um ein Artefakt aufgrund einer Freisetzung membrangebundener PHB-Synthase während des Zellaufschlusses handelt [Haywood *et al.*, 1989]. Als Argument gegen eine Entstehung der PHB-Granula in der Zellmitte kann ferner angebracht werden, dass die von Beeby *et al.* [2012]; Tian *et al.* [2005a] publizierten Aufnahmen erst 2,5 h nach Induktion der PHB-Synthese gemacht wurden und unter Mediumsbedingungen durchgeführt wurden, welche aufgrund der Stickstofflimitierung keine Zellteilung mehr ermöglichen. Andere Daten belegen, dass eine Bildung von PHB-Granula bereits nach 10 min einsetzt [Hermawan und Jendrossek, 2007; Jendrossek, 2005]. Die subzelluläre Lokalisation des Schlüsselenzyms der PHB-Speicherung, der PHB-Synthase in PHB-freien Zellen bzw. in der frühen Phase der Granulabildung war folglich nicht eindeutig geklärt und sollte in dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten elektronenmikroskopischen Studien zeigten bereits, dass PHB-Granula im Wildtyp bereits in der frühen Phase ihrer Entstehung überwiegend mit dem Nukleoid assoziiert sind [Pfeiffer *et al.*, 2011; Wahl *et al.*, 2012]. Bei den im EM als dunkle Region sichtbaren denaturierten und fixierten Nukleoiden [Eltsov und Zuber, 2006; Hoppert und Mayer, 1999; Robinow und Kellenberger, 1994] handelt es sich vermutlich um die von Tian *et al.* [2005a] postulierten „Mediation Elements“. Die physische Assoziation der PHB-Granula mit dem Nukleoid wird vermutlich durch PhaM (und/oder andere Proteine) vermittelt. PhaM wird möglicherweise durch die direkte Protein-Wechselwirkung mit der PHB-Synthase PhaC1 schon während der Entstehungsphase an die PHB-Granula gebunden [Pfeiffer und Jendrossek, 2013; Pfeiffer *et al.*, 2011]. Eine direkte Assoziation früher PHB-Granula mit der Membran, welche auch bei gleichzeitiger Verknüpfung der Granula mit dem Nukleoid vorliegen könnte, war hingegen selten zu beobachten, kann aber, da es sich nur um sektionelle Dünnschnitte handelt, nicht vollständig ausgeschlossen werden.

In aktuellen Arbeiten von Beeby *et al.* [2012] mittels Kryoelektronentomographie zur PHB-Granulabildung in *R. eutropha*, welche eine dreidimensionale Untersuchung eines nahezu nativen Zustandes von Zellen mit hoher Auflösung ermöglicht, konnte ebenfalls keine Membranassoziation von PHB-Granula festgestellt werden. Die PHB-Granula wurden hingegen überwiegend im Bereich der Zellmitte angeordnet gefunden. Ergebnisse dieser Arbeit deuten zudem darauf hin, dass die Oberflächenschicht der Granula eher einer Proteinhülle als einem Lipid Mono- oder Bilayer entspricht. Dies spricht ebenfalls gegen eine Bildung der Granula an der Cytoplasmamembran („Budding-Modell“). Weiterhin zeigen neuere Transkriptomdaten, dass unter PHB-Produktionsbedingungen in *R. eutropha* Biosynthesewege, welche für die Bereitstellung von Phospholipiden und Membranbausteinen (Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und Cardiolipin) verantwortlich sind, herunterreguliert werden [Beeby *et al.*, 2012; Brigham *et al.*, 2010]. Für eine Abdeckung der PHB-Granula Oberfläche mit einem Lipidmonolayer wäre jedoch ein gesteigerter Bedarf an Phospholipiden zu erwarten. Cho *et al.* [2012] konnten ferner zeigen, dass lösliche Komplexe aus PhaC1, PhaP1 und niedermolekularem PHB in der Zelle vorliegen können.

4.1. Lokalisierung der PHB-Synthase

Die Lokalisation der PHB-Synthase (PhaC1) wurde sowohl in aktiver als auch in inaktiver Form als eYfp-Fusionsprotein unter verschiedenen physiologischen Bedingungen mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Neben einer Wildtyp PhaC1-eYfp-Fusion wurde deshalb auch eine katalytisch inaktive PhaC1-eYfp-Fusion (Austausch des katalytisch aktiven Cystein 319 gegen Alanin) untersucht. Diese ermöglichte eine Lokalisierung der PHB-Synthase in PHB-freien Zellen unter PHB-Speicherungsbedingungen in den PHB-negativen Mutanten *R. eutropha* H16 $\Delta phaC1$ (präzise *phaC1*-Gendelektionsmutante) und *R. eutropha* PHB-4 durch Kultivierung der Stämme unter PHB-Speicherbedingungen.

Zellen der PHB-negativen Mutanten waren nach Komplementation durch die PhaC1-eYfp-Fusion wieder in der Lage PHB-Granula zu bilden. Während die eYfp-Fusion in PHB-freien stationären Zellen (stationäre Phase nach Inkubation für 24 h in NB-Medium) homogen verteilt vorlag, war sie zu den untersuchten Zeitpunkten der PHB-Speicherung an PHB-Granula gebunden (Abbildung 1 in Pfeiffer und Jendrossek [2012]). Eine PhaC1(C319A)-eYfp Fusion war hingegen zu allen untersuchten Zeitpunkten homogen verteilt. Auch in der Initiierungsphase der PHB-Granulabildung (5 min nach Transfer auf PHB-Speichermedium) war keine veränderte Lokalisierung des Proteins festzustellen. Um zu zeigen, dass der vorgenommene Aminosäureaustausch (C319A) keinen Einfluss auf die PHB-Bindungsfähigkeit hat, wurde das Fusionsprotein in den Wildtyp gebracht. Die eYfp-Fusion war weiterhin in der Lage an PHB-Granula zu binden.

Diese erhaltenen Ergebnisse sprechen gegen eine Initiierung der PHB-Synthese an der Cytoplasmamembran. Eine Membranlokalisierung der PHB-Synthase wäre als klar abgrenzbarer Ring um die Zelle sichtbar (vergleiche mit FM4-64 Färbung in Abbildung 1 in [Pfeiffer und Jendrossek, 2012]). Die von Peters *et al.* [2007] gemachten Beobachtungen mittels einer Gfp-PhaC1(C319A)-Fusion in *E. coli*, bei der es zur Ausbildung von Gfp-Foci an den Zellpolen und in der Nähe des Septums kam, lassen sich vermutlich nicht direkt auf *R. eutropha* übertragen. Möglicherweise sind diese Unterschiede auf die unterschiedliche Lokalisierung des Gfp-Fusionspartners (C- bzw. N-terminal) von Peters *et al.* und in dieser Arbeit zurückzuführen. Bekannt ist ferner, dass die PHB-Synthase bei Überexpression in *E. coli* zur Ausbildung von „Inclusion Bodies“ neigt [Steinmann *et al.*, 2010], was die von Peters *et al.* erhaltenen Ergebnisse erklären könnte.

Eine Membranlokalisierung bzw. „Budding-Mechanismus“ kann als Konsequenz aus den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen nicht komplett ausgeschlossen werden, da für eine Lokalisierung/Verankerung des PHB-Synthese-Komplexes in der Zellperipherie auch die gebildete PHB-Polymerkette verantwortlich sein könnte. Das „Budding-Modell“ erscheint aber mit den in dieser Arbeit gewonnen TEM-Daten [Pfeiffer *et al.*, 2011; Wahl *et al.*, 2012] sowie neueren Daten anderer Gruppen [Beeby *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2012]

unwahrscheinlich. Ferner ist eine direkte Interaktion der hydrophoben PHB-Granula mit der Zellmembran nur schwer vorstellbar, da die Oberfläche der Membran durch Phospholipide negativ geladen ist und PHB-Granula in *phaP1*-Deletionsmutanten nicht an die Membran gebunden sind. Dies wäre zu erwarten, wenn ein Großteil der Proteinschicht an der PHB-Oberfläche entfernt wäre und das „nackte“ PHB an die Zellmembran binden würde.

Die Ausbildung erster eYfp-Foci und PHB-Granula war bereits 5 min nach Transfer der Zellen auf PHB-Speichermedium zu beobachten. Diese PHB-Granula befanden sich häufig in der Nähe der Zellpole/Zellperipherie. In fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen kann so aufgrund der geringeren Auflösung und Größe der Zellen zu Beginn der PHB-Bildung leicht der Eindruck peripherer PHB-Granula entstehen und als Bildungs-ort dieser missgedeutet werden. Ein „Budding-Mechanismus“ wurde ebenfalls für die Ausbildung von Lipid-Bodies und Wachsester einschlußkörperchen postuliert. Für diese konnten jedoch deren Vorstufen (Prebodies) sowie der zur Synthese notwendige Enzymkomplex (WS/DGAT = Wachsester-Synthase/Diacylglycerol-Acyltransferase) eindeutig an der Cytoplasmamembran nachgewiesen werden [Wältermann *et al.*, 2005; Wältermann und Steinbüchel, 2005]. Auch für die Bildung von Magnetosomen in magnetotaktischen Bakterien wurde ein „Budding“-ähnlicher Mechanismus vermutet. Allerdings sind diese vermutlich von einem Lipidbilayer umgeben und die Vesikel bleiben mit dem periplasmatischen Raum verbunden [Komeili, 2007; Komeili *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2007; Scheffel *et al.*, 2008, 2006].

Neben der PHB-Synthase PhaC1 wurde auch die Lokalisierung der putativen PHB-Synthase PhaC2 untersucht (Abbildung 1 in Pfeiffer und Jendrossek [2012]). Deren Fusion war katalytisch jedoch nicht aktiv und somit nicht in der Lage den Phänotyp PHB-negativer Mutanten zu komplementieren. Die PhaC2-eYfp-Fusion konnte aber bei Expression in *R. eutropha* H16 an PHB-Granula binden. Western-Blot Experimente zeigten zudem, dass ein Fusionsprotein der erwarteten Größe gebildet wird. Möglicherweise war die Aktivität des Enzyms durch den eYfp-Tag gestört. Peplinski *et al.* [2010] konnten durch Kom-

plementation von *R. eutropha* PHB-4 (allerdings nicht von *R. eutropha* H16 $\Delta phaC1$) sowie in *in vitro* Versuchen eine Aktivität des PhaC2 Enzyms aufzeigen. Generell fraglich bleibt die Funktion von PhaC2, da es nach bisherigem Wissen im Wildtyp nicht signifikant exprimiert wird [Brigham *et al.*, 2010; Peplinski *et al.*, 2010].

4.2. Modell zum Initiationsort der PHB-Granula

Mit den insbesondere in Bezug auf die Wechselwirkung von PhaM mit der PHB-Synthase PhaC1 gewonnenen Erkenntnissen ergeben sich weitere Konsequenzen für den Bildungsort der PHB-Granula *in vivo*, welche sich nicht ausreichend durch das Mizellen-Modell beschreiben lassen. Vielmehr erscheint ein „Scaffold-Modell“ [Cho *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2005a,b] mit dem Nukleoid als Start- und Verankerungspunkt der PHB-Granula als wahrscheinlich. Nach Cho *et al.* ist ein „Scaffold-Modell“ nach der momentanen Datenlage nicht von einem Mizellen-Modell mit einem zufälligen Bildungspunkt der Granula zu unterscheiden. Mittels BiFC konnte jedoch gezeigt werden, dass die PHB-Synthase schon in PHB-leeren Zellen Nukleoid gebunden über PhaM vorliegt (Abbildung 2 in Pfeiffer und Jendrossek [2013]). Die Interaktion beider Proteine wurde zudem zuvor über Two-Hybrid [Pfeiffer *et al.*, 2011] sowie durch Koaffinitätsaufreinigung von PhaM mit Strep-getagtem PhaC1 bestätigt [Cho *et al.*, 2012]. Zwar zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Experimente mit einer eYfp-Fusion der PHB-Synthase eine homogene Verteilung des Proteins unter Abwesenheit von PHB [Pfeiffer und Jendrossek, 2012], allerdings dürfte eine Nukleoid-Assoziation der PHB-Synthase durch die Überexpression des eYfp-Fusionsproteins relativ zu PhaM maskiert gewesen sein. Auch in alten Arbeiten zur Lokalisierung der PHB-Synthase mittels Elektronenmikroskopie und Immunogoldmarkierung ist ein gehäuftes Auffinden der PHB-Synthase am Nukleoid zu erkennen (Abbildung 2a in Gerngross *et al.* [1993]).

Unter Berücksichtigung, dass PhaM und PhaC1 konstitutiv und in vergleichbarer Größenordnung exprimiert werden [Brigham *et al.*, 2012b] ist die Annahme gerechtfertigt,

dass der überwiegende Anteil der PhaC1 Moleküle in PHB-freien Zellen Nukleoid-gebunden über PhaM vorliegt und das Nukleoid somit gewissermaßen den Initiationsort der PHB-Granulabildung sowie eine Art Gerüst zur Verankerung dieser darstellt. Elektronenmikroskopische Studien unserer Arbeitsgruppe [Pfeiffer *et al.*, 2011; Schuth, 2011; Wahl, 2011; Wahl *et al.*, 2012] sowie weitere Arbeiten [Tian *et al.*, 2005a,b] bestätigen zudem, dass PHB-Granula in nahezu allen Phasen von Bildung und Abbau mit dem Nukleoid assoziiert vorliegen. Ein überarbeitetes Modell zur PHB-Granulabildung ist in Abbildung 4.1 dargestellt. PhaM liegt möglicherweise als hochmolekularer Komplex assoziiert mit dem Nukleoid vor [Pfeiffer und Jendrossek, 2013].

Unsicher ist, ob verschiedene Phasine in PHB-leeren Zellen wirklich frei vorliegen oder ebenfalls über verschiedene Proteinwechselwirkungen mit PhaP5 und PhaM mit dem Nukleoid assoziiert sind [Pfeiffer und Jendrossek, 2011; Pfeiffer *et al.*, 2011]. Zwar zeigten eYfp-Fusionen verschiedener Phasine in PHB-freien Zellen meist eine homogene Verteilung [Pfeiffer und Jendrossek, 2012], allerdings konnte zum Teil bei nur schwacher Expression von eYfp-Fusionen eine Lokalisierung ähnlich der eYfp-PhaM-Fusion in PHB-leeren Zellen beobachtet werden (unveröffentlichte Ergebnisse). Diese vermeintliche Nukleoid-Lokalisierung ließ sich jedoch bei Expression der Fusionen in PHB-negativen Mutanten von *R. eutropha* nicht eindeutig bestätigen. Zudem war bei Expression von eYfp-Fusionen diverser Phasine auch häufiger eine Tendenz zur Ausbildung von Inclusion Bodies zu beobachten. Da eine Assoziation von Phasinen mit dem Nukleoid möglicherweise nur indirekt über Wechselwirkungen mit PhaP5/PhaM vermittelt wird und die Anzahl der Bindestellen somit limitiert ist, könnten hier ebenfalls Experimente mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation neue Erkenntnisse bringen. Zumindest im Falle von PhaP5 konnte schon gezeigt werden, dass dieses offenbar ebenfalls über seine Wechselwirkung mit PhaM Nukleoid gebunden vorliegen kann (Abbildung 2 in Pfeiffer und Jendrossek [2013]).

Da Cho *et al.* [2012] lösliche Komplexe aus PhaC1, PhaP1 und niedermolekularem PHB nachweisen konnten, ergibt sich als logische Konsequenz, dass *in vivo* eine PHB-Gra-

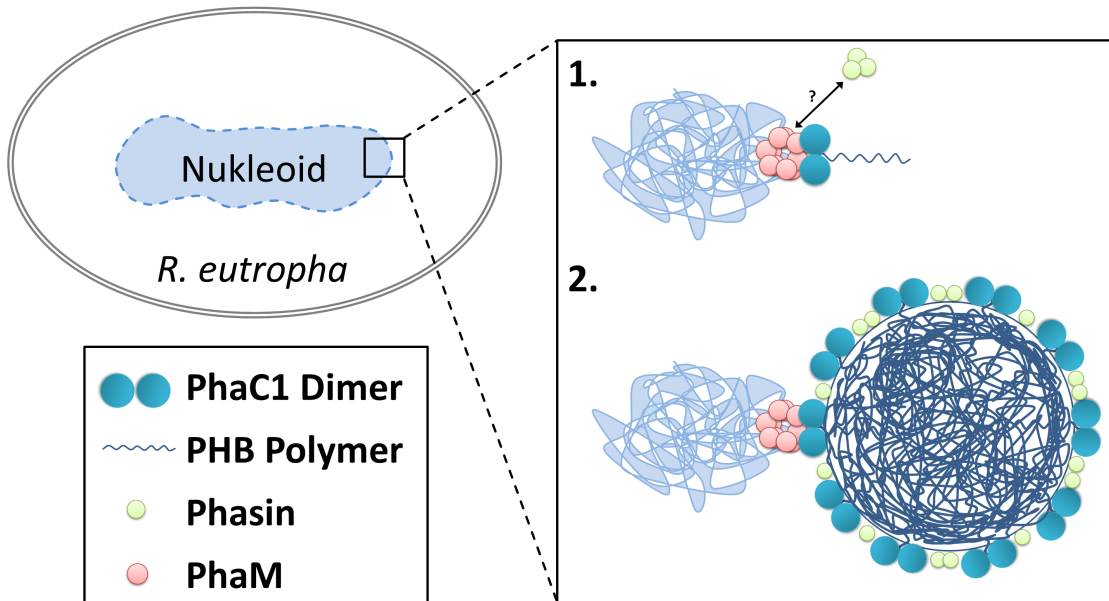


Abbildung 4.1.: Überarbeitetes Modell zur PHB-Granulabildung in *R. eutropha*. Die PHB-Synthase (PhaC1) liegt vermutlich in dimerer Form assoziiert mit einem hochmolekularen Komplex aus PhaM und dem Nukleoid vor. Bei Verfügbarkeit des Substrats (*R*)-3-Hydroxybutyryl-CoA (3HB-CoA) kommt es zur Synthese von PHB-Polymerketten (1.). Der intrazelluläre Level an Phasinen (PhaP) ist zu diesem Zeitpunkt gering. Die Expression der Phasine wird zum Teil über PhaR reprimiert. Phasine liegen entweder frei in Form von oligomeren Komplexen in der Zelle vor oder ebenfalls bereits Nukleoid-assoziiert über Proteinwechselwirkungen mit PhaP5/PhaM. Bei Bildung der PHB-Granula wird die Expression der Phasine (vorallem PhaP1) verstärkt, welche zusammen mit anderen Proteinen (z.B. PHB-Depolymerasen) an die PHB-Granula binden (2.). Möglicherweise können weitere PHB-Synthese Moleküle ebenso an die gebildeten Granula binden und so deren Größenwachstum beschleunigen. Das Nukleoid fungiert als Initiationsort und Verankerungspunkt der PHB-Granula. Die Rolle verschiedener Phasine ist in diesem Modell stark vereinfacht dargestellt.

nulabildung auch frei ohne einen Nukleoid-assoziierten PHB-Synthesekomplex ablaufen kann. Allerdings muss bedacht werden, das bei diesen Experimenten eine vorliegende Nukleoid-Assoziation vermutlich durch den Einsatz von DNasen beim Zellaufschluss zerstört wurde. Auch ist eine *phaM*-Deletionsmutante weiterhin in der Lage PHB zu bilden [Pfeiffer *et al.*, 2011]. Eine PHB-Synthese in *E. coli* ist ferner bei alleiniger Anwesenheit von *phaCAB* möglich [Peoples und Sinskey, 1989; Schubert *et al.*, 1988; Slater *et al.*, 1988] und Arbeiten zur *in vitro* PHB-Granulabildung mittels gereinigter PHB-Synthase [Gerngross und Martin, 1995; Haywood *et al.*, 1989; Hiraishi *et al.*, 2005; Yuan *et al.*,

2001] zeigen, dass eine Initiierung der PHB-Granula Synthese nicht an das Vorliegen eines Nukleoids geknüpft ist. Das Nukleoid stellt aber möglicherweise *in vivo* den Bildungsort per se dar, da durch eine direkte Verknüpfung mit dem Nukleoid eine optimale Auftrennung der PHB-Granula im Zuge der Zellteilung und Chromosomensegregation gewährleistet wird. Die bei Überexpression von PhaM beobachtete Erhöhung der Granulaanzahl [Pfeiffer *et al.*, 2011; Wahl *et al.*, 2012] könnte auch auf die erhöhte Anzahl an Initiationsstellen für die PHB-Synthase am Nukleoid zurückzuführen sein. Dies wird dadurch bekräftigt, dass PhaM in den von Cho *et al.* [2012] isolierten Komplexen aus PhaC1, PhaP1 und niedermolekularem PHB ebenfalls enthalten war.

5 | Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten zahlreiche neue Erkenntnisse über die Steuerung der intrazellulären Lokalisierung sowie zum Bildungsort der PHB-Granula gewonnen werden. Über Two-Hybrid Studien wurde ein neuartiges Protein (PhaM) identifiziert, welches PHB-Granula physisch mit dem Genom (Nukleoid) verknüpft. Damit wird gewährleistet, dass diese im Zuge der Nukleoid- bzw. Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass PhaM mit dem Schlüsselenzym der PHB-Speicherung der PHB-Synthase interagiert und Phasin-artige Eigenschaften besitzt die das Oberfläche/Volumen-Verhältnis der PHB-Granula beeinflussen. Die PHB-Synthase liegt vermutlich ebenfalls Nukleoid-gebunden über PhaM vor. Das Nukleoid stellt somit auch den Initiationsort der PHB-Granula dar. Ferner konnten drei weitere für *R. eutropha* bisher nicht beschriebene Phasine (PhaP5, PhaP6 und PhaP7) identifiziert werden. Diese waren in der Lage *in vivo* ebenfalls an PHB zu binden. Im Falle von PhaP5 wurde außerdem gezeigt, dass PhaP5 unter Überexpressionsbedingungen eine Ablösung der PHB-Granula vom Nukleoid bewirkt und ebenfalls das Oberfläche/Volumen-Verhältnis der PHB-Granula beeinflusst.

Eine detaillierte Beschreibung der Vorgänge während der PHB-Granulabildung und Verteilung der Granula während der Zellteilung ist für fortführende Arbeiten von Interesse. Unklar ist beispielsweise, wie eine äquivalente Anzahl an PHB-Granula zu beiden Seiten des Nukleoids gewährleistet wird. Hierfür wurde in dieser Arbeit unter anderem die Beteiligung des Phasins PhaP5 sowie aktiver Mechanismen diskutiert. Eine Ausweitung der Protein-Interaktionsstudien könnte bei der Identifizierung dynamischer Cytoskelett-

proteine, welche bei der Verteilung der PHB-Granula mitbeteiligt sein könnten, hilfreich sein. Möglicherweise sind auch PhaM selbst oder andere bekannte Granula-assoziierte Proteine in der Lage solche dynamischen Strukturen auszubilden. Auch könnten fluoreszenzmikroskopische Techniken, wie beispielsweise FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching), Aussagen darüber ermöglichen, ob bei der Verteilung der PHB-Granula aktive Transportprozesse beteiligt sind.

Interessant wäre es ferner zu untersuchen, ob PhaM auch in der Lage ist spezifisch als Regulator die Expression einzelner Gene zu beeinflussen. Solche Funktionen wurde bereits für andere Histon-ähnliche Proteine beschrieben. Ein Vergleich der *phaM* Deletionsmutante mit dem Wildtyp auf Transkriptom- oder Proteomebene könnte hier neue Erkenntnisse bringen. Zudem wäre es interessant zu wissen, welche Funktionen die mit *phaM* in einem Operon gelegenen Gene besitzen und ob ein Zusammenhang zum PHB-Metabolismus besteht. Eine in dem Operon gelegene Enoyl-CoA-Hydratase könnte beispielsweise bei der Bereitstellung von Substraten für den PHB-Stoffwechsel beteiligt sein. Auch die genaue Funktion weiterer Phasine, abgesehen von PhaP1, bleibt ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass PhaP2 - PhaP7 ebenfalls *in vivo* an PHB binden. PhaP5 oder andere Phasine sind möglicherweise auch bei der Regulation des PHB-Abbaus beteiligt. In dieser Arbeit wurden zahlreiche Interaktionen zwischen verschiedenen Phasinen sowie zwischen Phasinen und Proteinen welche beispielsweise als Transkriptionsregulatoren fungieren, an der Signaltransduktion beteiligt sind oder die Phosphataufnahme regulieren gefunden. Diese Interaktionen lassen vermuten, dass Phasine auch an regulatorischen Prozessen, welche nicht direkt mit der PHB-Granulabildung in Zusammenhang gebracht werden, beteiligt sind. Auch die Analyse weiterer in dieser Arbeit mittels Two-Hybrid und Proteomanalyse gefundener Proteine könnte neue Erkenntnisse zum PHB-Metabolismus bringen.

Literaturverzeichnis

- ABE, T., T. KOBAYASHI und T. SAITO (2005). *Properties of a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase with high specific activity (PhaZd) in Wautersia eutropha H16*. J Bacteriol, 187(20):6982–6990.
- ALEXEEVA, S., T. W. J. GADELLA, J. VERHEUL, G. S. VERHOEVEN und T. DEN BLAAUWEN (2010). *Direct interactions of early and late assembling division proteins in Escherichia coli cells resolved by FRET*. Mol Microbiol, 77(2):384–398.
- ANDERSON, A. J. und E. A. DAWES (1990). *Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates*. Microbiol Rev, 54(4):450–472.
- ASRAR, J. und K. GRUYS (2002). *Biodegradable polymer (Biopol)*. Biopolymers, 4:53–90.
- ATMAKURI, K., Z. DING und P. J. CHRISTIE (2003). *VirE2, a type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of Agrobacterium tumefaciens*. Mol Microbiol, 49(6):1699–1713.
- BATTESTI, A. und E. BOUVERET (2012). *The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in Escherichia coli*. Methods, 58(4):325–334.
- BEEBY, M., M. CHO, J. STUBBE und G. J. JENSEN (2012). *Growth and localization of polyhydroxybutyrate granules in Ralstonia eutropha*. J Bacteriol, 194(5):1092–1099.
- BOATMAN, E. S. (1964). *Observations on the fine structure of spheroplasts of Rhodospirillum rubrum*. J Cell Biol, 20:297–311.

- BOWIEN, B. und H. G. SCHLEGEL (1981). *Physiology and biochemistry of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria*. Annu Rev Microbiol, 35:405–452.
- BRIGHAM, C. J., C. F. BUDDE, J. W. HOLDER, Q. ZENG, A. E. MAHAN, C. RHA und A. J. SINSKEY (2010). *Elucidation of beta-oxidation pathways in Ralstonia eutropha H16 by examination of global gene expression*. J Bacteriol, 192(20):5454–5464.
- BRIGHAM, C. J., E. N. REIMER, C. RHA und A. J. SINSKEY (2012a). *Examination of PHB Depolymerases in Ralstonia eutropha: Further Elucidation of the Roles of Enzymes in PHB Homeostasis*. AMB Express, 2(1):26.
- BRIGHAM, C. J., D. R. SPETH, C. RHA und A. J. SINSKEY (2012b). *Whole-Genome Microarray and Gene Deletion Studies Reveal Regulation of the Polyhydroxyalkanoate Production Cycle by the Stringent Response in Ralstonia eutropha H16*. Appl Environ Microbiol, 78(22):8033–8044.
- BURDON, K. L. (1946). *Fatty Material in Bacteria and Fungi Revealed by Staining Dried, Fixed Slide Preparations*. J Bacteriol, 52(6):665–678.
- BYROM, D. (1992). *Production of poly-beta-hydroxybutyrate:poly-beta-hydroxyvalerate copolymers*. FEMS Microbiol. Rev., 103:247–250.
- CHAPMAN, G. B. (1956). *Electron microscopy of ultra-thin sections of bacteria. II. Sporulation of Bacillus megaterium and Bacillus cereus*. J Bacteriol, 71(3):348–355.
- CHEN, H.-J., S.-C. PAN und G.-C. SHAW (2009). *Identification and characterization of a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from Bacillus megaterium*. Appl Environ Microbiol, 75(16):5290–5299.
- CHO, M., C. J. BRIGHAM, A. J. SINSKEY und J. STUBBE (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., S. C. YOON und R. W. LENZ (1999). *Production of poly(3-hydroxybutyric acid-co-4-hydroxybutyric acid) and poly(4-hydroxybutyric acid) without subsequent degradation by Hydrogenophaga pseudoflava*. Appl Environ Microbiol, 65(4):1570–1577.
- CLAESSEN, D., R. EMMINS, L. W. HAMOEN, R. A. DANIEL, J. ERRINGTON und D. H. EDWARDS (2008). *Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 68(4):1029–1046.
- CLARKE, L. und J. CARBON (1976). *A colony bank containing synthetic Col El hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome*. Cell, 9(1):91–99.
- COHEN-BAZIRE, G. und R. KUNISAWA (1963). *The fine structure of Rhodospirillum rubrum*. J Cell Biol, 16:401–419.
- COMMICHAU, F. M., F. M. ROTHE, C. HERZBERG, E. WAGNER, D. HELLWIG, M. LEHNIK-HABRINK, E. HAMMER, U. VÖLKER und J. STÜLKE (2009). *Novel activities of glycolytic enzymes in Bacillus subtilis: interactions with essential proteins involved in mRNA processing*. Mol Cell Proteomics, 8(6):1350–1360.
- CRAMM, R. (2009). *Genomic view of energy metabolism in Ralstonia eutropha H16*. J Mol Microbiol Biotechnol, 16(1-2):38–52.
- DAVIS, D., M. DOUDOROFF und R. STANIER (1969). *Proposal to reject the genus Hydrogenomonas: Taxonomic implications*. Int J Syst Bacteriol, 19(4):375–390.
- DAWES, E. (1976). *Endogenous metabolism and the survival of starved prokaryotes*. In T. G. R. Gray und J. Postgate, Herausgeber, *The survival of vegetative microbes*. Cambridge University Press, Seiten 19–53.
- DE EUGENIO, L. I., B. GALÁN, I. F. ESCAPA, B. MAESTRO, J. M. SANZ, J. L. GARCÍA und M. A. PRIETO (2010). *The PhaD regulator controls the simultaneous expression of the pha genes involved in polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in Pseudomonas putida KT2442*. Environ Microbiol, 12(6):1591–1603.

- DE PAZ, H. D., F. J. SANGARI, S. BOLLAND, J. M. GARCÍA-LOBO, C. DEHIO, F. DE LA CRUZ und M. LLOSA (2005). *Functional interactions between type IV secretion systems involved in DNA transfer and virulence*. *Microbiology*, 151(Pt 11):3505–3516.
- DEANE, C. M., L. SALWINSKI, I. XENARIOS und D. EISENBERG (2002). *Protein interactions: two methods for assessment of the reliability of high throughput observations*. *Mol Cell Proteomics*, 1(5):349–356.
- DENNIS, D., V. SEIN, E. MARTINEZ und B. AUGUSTINE (2008). *PhaP is involved in the formation of a network on the surface of polyhydroxyalkanoate inclusions in Cupriavidus necator H16*. *J Bacteriol*, 190(2):555–563.
- DERETIC, V., N. S. HIBLER und S. C. HOLT (1992). *Immunocytochemical analysis of AlgP (Hp1), a histonelike element participating in control of mucoidy in Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 174(3):824–831.
- DERETIC, V. und W. M. KONYECSNI (1990). *A procaryotic regulatory factor with a histone H1-like carboxy-terminal domain: clonal variation of repeats within algP, a gene involved in regulation of mucoidy in Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 172(10):5544–5554.
- DMITROVA, M., G. YOUNÈS-CAUET, P. OERTEL-BUCHHEIT, D. PORTE, M. SCHNARR und M. GRANGER-SCHNARR (1998). *A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 257(2):205–212.
- DORMAN, C. J. und P. DEIGHAN (2003). *Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria*. *Curr Opin Genet Dev*, 13(2):179–184.
- DOVE, S. L. und A. HOCHSCHILD (2004). *A bacterial two-hybrid system based on transcription activation*. *Methods Mol Biol*, 261:231–246.
- DÜRRENBERGER, M., M. A. BJORNSTI, T. UETZ, J. A. HOBOT und E. KELLENBERGER (1988). *Intracellular location of the histonelike protein HU in Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 170(10):4757–4768.

- DUNLOP, W. F. und A. W. ROBARDS (1973). *Ultrastructural study of poly-beta-hydroxybutyrate granules from Bacillus cereus*. J Bacteriol, 114(3):1271–1280.
- ELTSOV, M. und B. ZUBER (2006). *Transmission electron microscopy of the bacterial nucleoid*. J Struct Biol, 156(2):246–254.
- ERHARDT, M., T. HIRANO, Y. SU, K. PAUL, D. H. WEE, S. MIZUNO, S.-I. AIZAWA und K. T. HUGHES (2010). *The role of the FliK molecular ruler in hook-length control in Salmonella enterica*. Mol Microbiol, 75(5):1272–1284.
- FIELDS, S. und O. SONG (1989). *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 340(6230):245–246.
- FINN, R. D., J. MISTRY, J. TATE, P. COGGILL, A. HEGER, J. E. POLLINGTON, O. L. GAVIN, P. GUNASEKARAN, G. CERIC, K. FORSLUND, L. HOLM, E. L. L. SONNHAMMER, S. R. EDDY und A. BATEMAN (2010). *The Pfam protein families database*. Nucleic Acids Res, 38(suppl 1):D211–D222.
- FULLER, R. C., J. P. O'DONNELL, J. SAULNIER, T. E. REDLINGER, J. FOSTER und R. W. LENZ (2006). *The supramolecular architecture of the polyhydroxyalkanoate inclusions in Pseudomonas oleovorans*. FEMS Microbiology Letters, 103(2–4):279–288.
- GALÁN, B., N. DINJASKI, B. MAESTRO, L. I. DE EUGENIO, I. F. ESCAPA, J. M. SANZ, J. L. GARCÍA und M. A. PRIETO (2011). *Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in Pseudomonas putida KT2442*. Mol Microbiol, 79(2):402–418.
- GAO, D., A. MAEHARA, T. YAMANE und S. UEDA (2001). *Identification of the intracellular polyhydroxyalkanoate depolymerase gene of Paracoccus denitrificans and some properties of the gene product*. FEMS Microbiol Lett, 196(2):159–164.
- GEBAUER, B. (2009). *Das Abbauverhalten des PHB-Granulumkomplexes aus Ralstonia eutropha: Charakterisierung mit Hilfe neu entwickelter Methoden*. Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart.

- GENSER, K. F., G. RENNER und H. SCHWAB (1998). *Molecular cloning, sequencing and expression in Escherichia coli of the poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis genes from Alcaligenes latus DSM1124*. J Biotechnol, 64(2-3):125–135.
- GERDES, K., M. HOWARD und F. SZARDENINGS (2010). *Pushing and pulling in prokaryotic DNA segregation*. Cell, 141(6):927–942.
- GERNGROSS, T. U. und D. P. MARTIN (1995). *Enzyme-catalyzed synthesis of poly[(R)-(-)-3-hydroxybutyrate]: formation of macroscopic granules in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 92(14):6279–6283.
- GERNGROSS, T. U., P. REILLY, J. STUBBE, A. J. SINSKEY und O. P. PEOPLES (1993). *Immunocytochemical analysis of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthase in Alcaligenes eutrophus H16: localization of the synthase enzyme at the surface of PHB granules*. J Bacteriol, 175(16):5289–5293.
- GRAUMANN, P. L. (2007). *Cytoskeletal elements in bacteria*. Annu Rev Microbiol, 61:589–618.
- GREENFIELD, D., A. L. MCEVOY, H. SHROFF, G. E. CROOKS, N. S. WINGREEN, E. BETZIG und J. LIPHARDT (2009). *Self-organization of the Escherichia coli chemotaxis network imaged with super-resolution light microscopy*. PLoS Biol, 7(6):e1000137.
- GRIEBEL, R., Z. SMITH und J. M. MERRICK (1968). *Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. I. Purification, composition, and properties of native poly-beta-hydroxybutyrate granules from Bacillus megaterium*. Biochemistry, 7(10):3676–3681.
- GRIEBEL, R. J. und J. M. MERRICK (1971). *Metabolism of polyhydroxybutyrate: effect of mild alkaline extraction on native polyhydroxybutyrate granules*. J Bacteriol, 108(2):782–789.
- HANDRICK, R. (2003). *Neuartige Poly(3-Hydroxybutyrat) Depolymerasen aus Paucimonas lemoignei und Rhodospirillum rubrum*. Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart.

- HANDRICK, R., S. REINHARDT und D. JENDROSSEK (2000). *Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in Ralstonia eutropha*. J Bacteriol, 182(20):5916–5918.
- HANDRICK, R., S. REINHARDT, P. KIMMIG und D. JENDROSSEK (2004a). *The intracellular poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase of Rhodospirillum rubrum is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases*. J Bacteriol, 186(21):7243–7253.
- HANDRICK, R., S. REINHARDT, D. SCHULTHEISS, T. REICHART, D. SCHÜLER, V. JENDROSSEK und D. JENDROSSEK (2004b). *Unraveling the function of the Rhodospirillum rubrum activator of polyhydroxybutyrate (PHB) degradation: the activator is a PHB-granule-bound protein (phasin)*. J Bacteriol, 186(8):2466–2475.
- HANDRICK, R., U. TECHNOW, T. REICHART, S. REINHARDT, T. SANDER und D. JENDROSSEK (2004c). *The activator of the Rhodospirillum rubrum PHB depolymerase is a polypeptide that is extremely resistant to high temperature (121 degrees C) and other physical or chemical stresses*. FEMS Microbiol Lett, 230(2):265–274.
- HAYWOOD, G., A. ANDERSON, L. CHU und A. DAWES (1988a). *Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol Lett, 52:91–96.
- HAYWOOD, G., A. ANDERSON, L. CHU und A. DAWES (1988b). *The role of NADH- and NADPH linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol Lett, 52:259–264.
- HAYWOOD, G., A. ANDERSON und E. DAWES (1989). *The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiology Letters, 57:1–6.
- HERMAWAN, S. und D. JENDROSSEK (2007). *Microscopical investigation of poly(3-hydroxybutyrate) granule formation in Azotobacter vinelandii*. FEMS Microbiol Lett, 266(1):60–64.

- HIRAISHI, T., Y. KIKKAWA, M. FUJITA, Y. M. NORMI, M. KANESATO, T. TSUGE, K. SUDESH, M. MAEDA und Y. DOI (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.
- HIRANO, T., S. SHIBATA, K. OHNISHI, T. TANI und S.-I. AIZAWA (2005). *N-terminal signal region of FliK is dispensable for length control of the flagellar hook*. *Mol Microbiol*, 56(2):346–360.
- HÄNISCH, J., M. WÄLTERMANN, H. ROBENEK und A. STEINBÜCHEL (2006). *The Ralstonia eutropha H16 phasin PhaP1 is targeted to intracellular triacylglycerol inclusions in Rhodococcus opacus PD630 and Mycobacterium smegmatis mc2155, and provides an anchor to target other proteins*. *Microbiology*, 152(Pt 11):3271–3280.
- HOFFMANN, N. und B. H. A. REHM (2004). *Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in Pseudomonas putida and Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*, 237(1):1–7.
- HOPPERT, M. und F. MAYER (1999). *Principles of macromolecular organization and cell function in bacteria and archaea*. *Cell Biochem Biophys*, 31(3):247–284.
- HOROWITZ, D. M. und J. K. M. SANDERS (1995). *Biomimetic, amorphous granules of polyhydroxyalkanoates: composition, mobility, and stabilization in vitro by proteins*. *Can. J. Microbiol.*, 41(13):115–123.
- HOWARD, M. und K. GERDES (2010). *What is the mechanism of ParA-mediated DNA movement?* *Mol Microbiol*, 78(1):9–12.
- HU, J. C., M. G. KORNACKER und A. HOCHSCHILD (2000). *Escherichia coli one- and two-hybrid systems for the analysis and identification of protein-protein interactions*. *Methods*, 20(1):80–94.
- HUANG, R. und R. N. REUSCH (1996). *Poly(3-hydroxybutyrate) is associated with specific proteins in the cytoplasm and membranes of Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 271(36):22196–22202.

- HUSSON, R. N. (2006). *Leaving on the lights: host-specific derepression of Mycobacterium tuberculosis gene expression by anti-sigma factor gene mutations*. Mol Microbiol, 62(5):1217–1219.
- IANCU, C. V., D. M. MORRIS, Z. DOU, S. HEINHORST, G. C. CANNON und G. J. JENSEN (2010). *Organization, structure, and assembly of alpha-carboxysomes determined by electron cryotomography of intact cells*. J Mol Biol, 396(1):105–117.
- IWATA-REUYL, D., S. K. MATH, S. B. DESAI und C. D. POULTER (2003). *Bacterial phytoene synthase: molecular cloning, expression, and characterization of Erwinia herbicola phytoene synthase*. Biochemistry, 42(11):3359–3365.
- JAHNS, A. C. und B. H. A. REHM (2009). *Tolerance of the Ralstonia eutropha class I polyhydroxyalkanoate synthase for translational fusions to its C terminus reveals a new mode of functional display*. Appl Environ Microbiol, 75(17):5461–5466.
- JENDROSSEK, D. (2005). *Fluorescence microscopical investigation of poly(3-hydroxybutyrate) granule formation in bacteria*. Biomacromolecules, 6(2):598–603.
- JENDROSSEK, D. (2009). *Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes)*. J Bacteriol, 191(10):3195–3202.
- JENDROSSEK, D. und R. HANDRICK (2001). *Diversität bakterieller PHB-Depolymerasen am Beispiel von Paucimonas gen. nov. lemoignei comb. nov.* Biospektrum, 6:521–526.
- JENDROSSEK, D. und R. HANDRICK (2002). *Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates*. Annu Rev Microbiol, 56:403–432.
- JENDROSSEK, D., O. SELCHOW und M. HOPPERT (2007). *Poly(3-hydroxybutyrate) granules at the early stages of formation are localized close to the cytoplasmic membrane in Caryophanon latum*. Appl Environ Microbiol, 73(2):586–593.
- JENSEN, T. E. und L. M. SICKO (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., T. J. KAPPOCK, T. FRICK, A. J. SINSKEY und J. STUBBE (2000). *Lipases provide a new mechanistic model for polyhydroxybutyrate (PHB) synthases: characterization of the functional residues in Chromatium vinosum PHB synthase*. *Biochemistry*, 39(14):3927–3936.
- JONES, B. L. und J. W. PORTER (1985). *Enzymatic synthesis of phytoene*. *Methods Enzymol*, 110:209–220.
- KADDOR, C. und A. STEINBÜCHEL (2011a). *Effects of homologous phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system proteins on carbohydrate uptake and poly(3-Hydroxybutyrate) accumulation in Ralstonia eutropha H16*. *Appl Environ Microbiol*, 77(11):3582–3590.
- KADDOR, C. und A. STEINBÜCHEL (2011b). *Implications of various phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system mutations on glycerol utilization and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation in Ralstonia eutropha H16*. *AMB Express*, 1(1):16.
- KADDOR, C., B. VOIGT, M. HECKER und A. STEINBÜCHEL (2012). *Impact of the core components of the phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system, HPr and EI, on differential protein expression in Ralstonia eutropha H16*. *J Proteome Res*, 11(7):3624–3636.
- KALTWASSER, H. (1962). *Die Rolle der Polyphosphate im Phosphatstoffwechsel eines Knallgasbakteriums (Hydrogenomonas Stamm 20)*. *Archiv für Mikrobiologie*, 41(3):282–306.
- KARIMOVA, G., N. DAUTIN und D. LADANT (2005). *Interaction network among Escherichia coli membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis*. *J Bacteriol*, 187(7):2233–2243.
- KARIMOVA, G., J. PIDOUX, A. ULLMANN und D. LADANT (1998). *A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(10):5752–5756.

- KARIMOVA, G., C. ROBICHON und D. LADANT (2009). *Characterization of YmgF, a 72-residue inner membrane protein that associates with the Escherichia coli cell division machinery*. J Bacteriol, 191(1):333–346.
- KARIMOVA, G., A. ULLMANN und D. LADANT (2000). *Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin as a tool to analyze molecular interactions in a bacterial two-hybrid system*. Int J Med Microbiol, 290(4-5):441–445.
- KARIMOVA, G., A. ULLMANN und D. LADANT (2001). *Protein-protein interaction between Bacillus stearothermophilus tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system*. J Mol Microbiol Biotechnol, 3(1):73–82.
- KATZMANN, E., F. D. MÜLLER, C. LANG, M. MESSERER, M. WINKLHOFFER, J. M. PLITZKO und D. SCHÜLER (2011). *Magnetosome chains are recruited to cellular division sites and split by asymmetric septation*. Mol Microbiol, 82(6):1316–1329.
- KELLENBERGER, E. (1988). *About the organisation of condensed and decondensed non-eukaryotic DNA and the concept of vegetative DNA (a critical review)*. Biophys Chem, 29(1-2):51–62.
- KERPPOLA, T. K. (2006). *Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells*. Nat Protoc, 1(3):1278–1286.
- KERPPOLA, T. K. (2008a). *Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells*. Annu Rev Biophys, 37:465–487.
- KERPPOLA, T. K. (2008b). *Bimolecular fluorescence complementation: visualization of molecular interactions in living cells*. Methods Cell Biol, 85:431–470.
- KERPPOLA, T. K. (2009). *Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation*. Chem Soc Rev, 38(10):2876–2886.

- KLEPP, L. I., M. SORIA, F. C. BLANCO, M. V. BIANCO, M. P. SANTANGELO, A. A. CATALDI und F. BIGI (2009). *Identification of two proteins that interact with the Ery virulence factor from Mycobacterium tuberculosis by using the bacterial two-hybrid system*. BMC Mol Biol, 10:3.
- KLICKSTEIN, L. B. und R. L. NEVE (2001). *Ligation of linkers or adapters to double-stranded cDNA*. Curr Protoc Mol Biol, Chapter 5:Unit5.6.
- KNOLL, M., T. HAMM, F. WAGNER, V. MARTINEZ und J. PLEISS (2009). *The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases*. BMC Bioinformatics, 10(1):89.
- KOBAYASHI, T. und T. SAITO (2003). *Catalytic triad of intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase (PhaZ1) in Ralstonia eutropha H16*. J Biosci Bioeng, 96(5):487–492.
- KOBAYASHI, T., M. SHIRAKI, T. ABE, A. SUGIYAMA und T. SAITO (2003). *Purification and properties of an intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase (PhaZ2) in Ralstonia eutropha H16 and its identification as a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase*. J Bacteriol, 185(12):3485–3490.
- KOBAYASHI, T., K. UCHINO, T. ABE, Y. YAMAZAKI und T. SAITO (2005). *Novel intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase in Wautersia eutropha H16*. J Bacteriol, 187(15):5129–5135.
- KOMEILI, A. (2007). *Molecular mechanisms of magnetosome formation*. Annu Rev Biochem, 76:351–366.
- KOMEILI, A., Z. LI, D. K. NEWMAN und G. J. JENSEN (2006). *Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK*. Science, 311(5758):242–245.
- KORNACKER, M. G., B. REMSBURG und R. MENZEL (1998). *Gene activation by the AraC protein can be inhibited by DNA looping between AraC and a LexA repressor*

- that interacts with AraC: possible applications as a two-hybrid system.* Mol Microbiol, 30(3):615–624.
- KOSTECKI, J. S., H. LI, R. J. TURNER und M. P. DELISA (2010). *Visualizing interactions along the Escherichia coli twin-arginine translocation pathway using protein fragment complementation.* PLoS One, 5(2):e9225.
- KOVACH, M. E., P. H. ELZER, D. S. HILL, G. T. ROBERTSON, M. A. FARRIS, R. M. ROOP und K. M. PETERSON (1995). *Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes.* Gene, 166(1):175–176.
- KUCHTA, K., L. CHI, H. FUCHS, M. PÖTTER und A. STEINBÜCHEL (2007). *Studies on the influence of phasins on accumulation and degradation of PHB and nanostructure of PHB granules in ralstonia eutropha H16.* Biomacromolecules, 8(2):657–662.
- LADANT, D. und G. KARIMOVA (2000). *Genetic systems for analyzing protein-protein interactions in bacteria.* Res Microbiol, 151(9):711–720.
- LALLO, G. D., P. GHELARDINI und L. PAOLOZZI (1999). *Two-hybrid assay: construction of an Escherichia coli system to quantify homodimerization ability in vivo.* Microbiology, 145 (Pt 6):1485–1490.
- LAWRENCE, A. G., J. SCHOENHEIT, A. HE, J. TIAN, P. LIU, J. STUBBE und A. J. SINSKEY (2005). *Transcriptional analysis of Ralstonia eutropha genes related to poly-(R)-3-hydroxybutyrate homeostasis during batch fermentation.* Appl Microbiol Biotechnol, 68(5):663–672.
- LEE, T.-R., J.-S. LIN, S.-S. WANG und G.-C. SHAW (2004). *PhaQ, a new class of poly-beta-hydroxybutyrate (phb)-responsive repressor, regulates phaQ and phaP (phasin) expression in Bacillus megaterium through interaction with PHB.* J Bacteriol, 186(10):3015–3021.
- LEGRAIN, P. und L. SELIG (2000). *Genome-wide protein interaction maps using two-hybrid systems.* FEBS Lett, 480(1):32–36.

- LEIPE, D. D., Y. I. WOLF, E. V. KOONIN und L. ARAVIND (2002). *Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases*. J Mol Biol, 317(1):41–72.
- LENARCIC, R., S. HALBEDEL, L. VISSER, M. SHAW, L. J. WU, J. ERRINGTON, D. MARENDUZZO und L. W. HAMOEN (2009). *Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes*. EMBO J, 28(15):2272–2282.
- LENZ, O. und B. FRIEDRICH (1998). *A novel multicomponent regulatory system mediates H₂ sensing in Alcaligenes eutrophus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 95(21):12474–12479.
- LEUPRECHT, D. (2012). *Untersuchung des intrazellulären PHB-Abbaus von Ralstonia eutropha H16 durch Fluoreszenzmikroskopie und Two-Hybrid-Analyse*. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart.
- LIEBERGESELL, M., B. SCHMIDT und A. STEINBÜCHEL (1992). *Isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in Chromatium vinosum D*. FEMS Microbiol Lett, 78(2-3):227–232.
- LIEBERGESELL, M., K. SONOMOTO, M. MADKOUR, F. MAYER und A. STEINBÜCHEL (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*. Eur J Biochem, 226(1):71–80.
- LIN, W. und Y. PAN (2011). *Snapping magnetosome chains by asymmetric cell division in magnetotactic bacteria*. Mol Microbiol, 82(6):1301–1304.
- LÜTTMANN, D., R. HEERMANN, B. ZIMMER, A. HILLMANN, I. S. RAMPP, K. JUNG und B. GÖRKE (2009). *Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA(Ntr) in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 72(4):978–994.
- LUNDGREN, D. G., R. M. PFISTER und J. M. MERRICK (1964). *Structure of poly-beta-hydroxybutyric acid granules*. J Gen Microbiol, 34:441–446.

- LUTKENHAUS, J. (2012). *The ParA/MinD family puts things in their place*. Trends Microbiol, 20(9):411–418.
- LUTKENHAUS, J. und M. SUNDARAMOORTHY (2003). *MinD and role of the deviant Walker A motif, dimerization and membrane binding in oscillation*. Mol Microbiol, 48(2):295–303.
- MAC EACHRAN, D. P., M. E. PROPHETE und A. J. SINSKEY (2010). *The Rhodococcus opacus PD630 heparin-binding hemagglutinin homolog TadA mediates lipid body formation*. Appl Environ Microbiol, 76(21):7217–7225.
- MACNAB, R. M. (2003). *How bacteria assemble flagella*. Annu Rev Microbiol, 57:77–100.
- MADISON, L. L. und G. W. HUISMAN (1999). *Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic*. Microbiol Mol Biol Rev, 63(1):21–53.
- MAEHARA, A., Y. DOI, T. NISHIYAMA, Y. TAKAGI, S. UEDA, H. NAKANO und T. YAMANE (2001). *PhaR, a protein of unknown function conserved among short-chain-length polyhydroxyalkanoic acids producing bacteria, is a DNA-binding protein and represses Paracoccus denitrificans phaP expression in vitro*. FEMS Microbiol Lett, 200(1):9–15.
- MAEHARA, A., S. TAGUCHI, T. NISHIYAMA, T. YAMANE und Y. DOI (2002). *A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA*. J Bacteriol, 184(14):3992–4002.
- MAEHARA, A., S. UEDA, H. NAKANO und T. YAMANE (1999). *Analyses of a polyhydroxyalkanoic acid granule-associated 16-kilodalton protein and its putative regulator in the pha locus of Paracoccus denitrificans*. J Bacteriol, 181(9):2914–2921.
- MAGLIERY, T. J., C. G. M. WILSON, W. PAN, D. MISHLER, I. GHOSH, A. D. HAMILTON und L. REGAN (2005). *Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism*. J Am Chem Soc, 127(1):146–157.

- MARTINS, J. L., C. N. KEIM, M. FARINA, B. KACHAR und U. LINS (2007). *Deep-etching electron microscopy of cells of Magnetospirillum magnetotacticum: evidence for filamentous structures connecting the magnetosome chain to the cell surface*. Curr Microbiol, 54(1):1–4.
- MARX, C. J. und M. E. LIDSTROM (2001). *Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria*. Microbiology, 147(Pt 8):2065–2075.
- MATSUMOTO, K., H. MATSUSAKI, K. TAGUCHI, M. SEKI und Y. DOI (2002). *Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates inclusions and their associated proteins in Pseudomonas sp. 61-3*. Biomacromolecules, 3(4):787–792.
- MATTICK, J. S. (2002). *Type IV pili and twitching motility*. Annu Rev Microbiol, 56:289–314.
- MAYER, F. (1992). *Structural aspects of poly-beta-hydroxybutyrate granules*. FEMS Microbiol. Rev., 103:265–268.
- MAYER, F. und M. HOPPERT (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*. J. Basic Microbiol., 37:45–52.
- MAYER, F., M. H. MADKOUR, U. PIPER-FÜRST, R. WIECZOREK, M. LIEBERGESELL und A. STEINBÜCHEL (1996). *Electron microscopic observations on the macromolecular organization of the boundary layer of bacterial PHA inclusion bodies*. J. Gen. Appl. Microbiol., 42:445–455.
- MCCOOL, G. J. und M. C. CANNON (1999). *Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in Bacillus megaterium*. J Bacteriol, 181(2):585–592.
- MCCOOL, G. J. und M. C. CANNON (2001). *PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in Bacillus megaterium*. J Bacteriol, 183(14):4235–4243.

- MEDVEDKIN, V. N., E. A. PERMYAKOV, L. V. KLIMENKO, Y. V. MITIN, N. MATSUSHIMA, S. NAKAYAMA und R. H. KRETSINGER (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 Eng, 8(1):63–70.
- MERRICK, J. M. und M. DOUDOROFF (1964). *Depolymerisation of poly-beta-hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system.* J Bacteriol, 88:60–71.
- MERRICK, J. M., D. G. LUNDGREN und R. M. PFISTER (1965). *Morphological changes in poly-beta-hydroxybutyrate granules associated with decreased susceptibility to enzymatic hydrolysis.* J Bacteriol, 89:234–239.
- MINAMINO, T., B. GONZÁLEZ-PEDRAJO, K. YAMAGUCHI, S. I. AIZAWA und R. M. MACNAB (1999). *FliK, the protein responsible for flagellar hook length control in Salmonella, is exported during hook assembly.* Mol Microbiol, 34(2):295–304.
- MINAMINO, T., N. MORIYA, T. HIRANO, K. T. HUGHES und K. NAMBA (2009). *Interaction of FliK with the bacterial flagellar hook is required for efficient export specificity switching.* Mol Microbiol, 74(1):239–251.
- MÜLLER, H. und D. SEEBACH (1993). *Poly(hydroxyfettsäureester), eine fünfte Klasse von physiologisch bedeutsamen organischen Biopolymeren?* Angew Chem, 105:483–509.
- NEUMANN, L., F. SPINOZZI, R. SINIBALDI, F. RUSTICHELLI, M. PÖTTER und A. STEINBÜCHEL (2008). *Binding of the major phasin, PhaP1, from Ralstonia eutropha H16 to poly(3-hydroxybutyrate) granules.* J Bacteriol, 190(8):2911–2919.
- OEDING, V. und H. G. SCHLEGEL (1973). *Beta-ketothiolase from Hydrogenomonas eutropha H16 and its significance in the regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism.* Biochem J, 134(1):239–248.
- OSTLE, A. G. und J. G. HOLT (1982). *Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate.* Appl Environ Microbiol, 44(1):238–241.

- OZYAMAK, E., J. KOLLMAN, D. A. AGARD und A. KOMEILI (2013). *The Bacterial Actin MamK: IN VITRO ASSEMBLY BEHAVIOR AND FILAMENT ARCHITECTURE*. J Biol Chem, 288(6):4265–4277.
- PAGE, W. J. und O. KNOSP (1989). *Hyperproduction of Poly-beta-Hydroxybutyrate during Exponential Growth of Azotobacter vinelandii UWD*. Appl Environ Microbiol, 55(6):1334–1339.
- PARASHAR, A., K. R. COLVIN, D. R. D. BIGNELL und B. K. LESKIW (2009). *BldG and SCO3548 interact antagonistically to control key developmental processes in Streptomyces coelicolor*. J Bacteriol, 191(8):2541–2550.
- PEOPLES, O. P. und A. J. SINSKEY (1989). *Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in Alcaligenes eutrophus H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC)*. J Biol Chem, 264(26):15298–15303.
- PEPLINSKI, K., A. EHRENREICH, C. DÖRING, M. BÖMEKE, F. REINECKE, C. HUTMACHER und A. STEINBÜCHEL (2010). *Genome-wide transcriptome analyses of the 'Knallgas' bacterium Ralstonia eutropha H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism*. Microbiology, 156(Pt 7):2136–2152.
- PETERS, V., D. BECHER und B. H. A. REHM (2007). *The inherent property of polyhydroxyalkanoate synthase to form spherical PHA granules at the cell poles: the core region is required for polar localization*. J Biotechnol, 132(3):238–245.
- PETERS, V. und B. H. A. REHM (2005). *In vivo monitoring of PHA granule formation using GFP-labeled PHA synthases*. FEMS Microbiol Lett, 248(1):93–100.
- PFEIFFER, D. und D. JENDROSSEK (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(Pt 10):2795–2807.
- PFEIFFER, D. und D. JENDROSSEK (2012). *Localization of Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Granule-Associated Proteins during PHB Granule Formation and Identificati-*

- on of Two New Phasins, *PhaP6* and *PhaP7*, in *Ralstonia eutropha* H16. *J Bacteriol*, 194(21):5909–5921.
- PFEIFFER, D. und D. JENDROSSEK (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*. *Appl Environ Microbiol*, 79(9):2989–2999.
- PFEIFFER, D., A. WAHL und D. JENDROSSEK (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*. *Mol Microbiol*, 82(4):936–951.
- PHIZICKY, E. M. und S. FIELDS (1995). *Protein-protein interactions: methods for detection and analysis*. *Microbiol Rev*, 59(1):94–123.
- POHLMANN, A., W. F. FRICKE, F. REINECKE, B. KUSIAN, H. LIESEGANG, R. CRAMM, T. EITINGER, C. EWERING, M. PÖTTER, E. SCHWARTZ, A. STRITTMATTER, I. VOSS, G. GOTTSCHALK, A. STEINBÜCHEL, B. FRIEDRICH und B. BOWIEN (2006). *Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas"bacterium *Ralstonia eutropha* H16*. *Nat Biotechnol*, 24(10):1257–1262.
- PREUSTING, H., A. J. KINGMA und B. WITHOLD (1991). *Physiology and polyester formation of *Pseudomonas oleovorans* in continuous two-liquid-phase cultures*. *Enzyme Microb. Technol.*, 13:770–779.
- PRIETO, M. A., B. BÜHLER, K. JUNG, B. WITHOLT und B. KESSLER (1999). **PhaF*, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPO1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes*. *J Bacteriol*, 181(3):858–868.
- PÖTTER, M., M. H. MADKOUR, F. MAYER und A. STEINBÜCHEL (2002). *Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16*. *Microbiology*, 148(Pt 8):2413–2426.

- PÖTTER, M., H. MÜLLER, F. REINECKE, R. WIECZOREK, F. FRICKE, B. BOWIEN, B. FRIEDRICH und A. STEINBÜCHEL (2004). *The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in Ralstonia eutropha*. Microbiology, 150(Pt 7):2301–2311.
- PÖTTER, M., H. MÜLLER und A. STEINBÜCHEL (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(Pt 3):825–833.
- PÖTTER, M. und A. STEINBÜCHEL (2005). *Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation*. Biomacromolecules, 6(2):552–560.
- PÖTTER, M. und A. STEINBÜCHEL (2006). *Biogenesis and Structure of Polyhydroxyalkanoate Granules*. In *Inclusions in Prokaryotes*, Springer-Verlag Berlin / Heidelberg, Band 1 von *Microbiology Monographs*, Seiten 109–136.
- RABERG, M., C. KADDOR, B. KUSIAN, G. STAHLHUT, R. BUDINOVA, N. KOLEV, B. BOWIEN und A. STEINBÜCHEL (2012). *Impact of each individual component of the mutated PTS(Nag) on glucose uptake and phosphorylation in Ralstonia eutropha G+1*. Appl Microbiol Biotechnol, 95(3):735–744.
- RAE, B. D., B. M. LONG, M. R. BADGER und G. D. PRICE (2012). *Structural determinants of the outer shell of β -carboxysomes in Synechococcus elongatus PCC 7942: roles for CcmK2, K3-K4, CcmO, and CcmL*. PLoS One, 7(8):e43871.
- REHM, B. H. A. (2003). *Polyester synthases: natural catalysts for plastics*. Biochem J, 376(Pt 1):15–33.
- REHM, B. H. A. (2006). *Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases*. Biotechnol Lett, 28(4):207–213.
- REHM, B. H. A., R. V. ANTONIO, P. SPIEKERMANN, A. A. AMARA und A. STEINBÜCHEL (2002). *Molecular characterization of the poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synt-*

- hase from Ralstonia eutropha: in vitro evolution, site-specific mutagenesis and development of a PHB synthase protein model.* Biochim Biophys Acta, 1594(1):178–190.
- REPASKE, R. (1962). *Nutritional requirements for Hydrogenomonas eutropha.* J Bacteriol, 83:418–422.
- REPASKE, R. und A. C. REPASKE (1976). *Quantitative requirements for exponential growth of Alcaligenes eutrophus.* Appl Environ Microbiol, 32(4):585–591.
- REUSCH, R. N., R. HUANG und L. L. BRAMBLE (1995). *Poly- β -hydroxybutyrate/polyphosphate complexes form voltage-activated Ca^{2+} channels in the plasma membranes of Escherichia coli.* Biophys J, 69(3):754–766.
- REUSCH, R. N. und H. L. SADOFF (1988). *Putative structure and functions of a poly- β -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 85(12):4176–4180.
- RINGGAARD, S., J. LÖWE und K. GERDES (2007). *Centromere pairing by a plasmid-encoded type I ParB protein.* J Biol Chem, 282(38):28216–28225.
- RINGGAARD, S., K. SCHIRNER, B. M. DAVIS und M. K. WALDOR (2011). *A family of ParA-like ATPases promotes cell pole maturation by facilitating polar localization of chemotaxis proteins.* Genes Dev, 25(14):1544–1555.
- RINGGAARD, S., J. VAN ZON, M. HOWARD und K. GERDES (2009). *Movement and equipositioning of plasmids by ParA filament disassembly.* Proc Natl Acad Sci U S A, 106(46):19369–19374.
- RITCHIE, G. A. und E. A. DAWES (1969). *The non-involvement of *cyl*-carrier protein in poly- β -hydroxybutyric acid biosynthesis in Azotobacter beijerinckii.* Biochem J, 112(5):803–805.
- ROBINOW, C. und E. KELLENBERGER (1994). *The bacterial nucleoid revisited.* Microbiol Rev, 58(2):211–232.

- RUST, M., S. BORCHERT, E. NIEHUS, S. A. KUEHNE, E. GRIPP, A. BAJCETA, J. L. MCMURRY, S. SUERBAUM, K. T. HUGHES und C. JOSENHANS (2009). *The Helicobacter pylori anti-sigma factor FlgM is predominantly cytoplasmic and cooperates with the flagellar basal body protein FlhA*. J Bacteriol, 191(15):4824–4834.
- SAÏD-SALIM, B., S. MOSTOWY, A. S. KRISTOF und M. A. BEHR (2006). *Mutations in Mycobacterium tuberculosis Rv0444c, the gene encoding anti-SigK, explain high level expression of MPB70 and MPB83 in Mycobacterium bovis*. Mol Microbiol, 62(5):1251–1263.
- SAEGUSA, H., M. SHIRAKI, C. KANAI und T. SAITO (2001). *Cloning of an intracellular Poly[D(-)-3-Hydroxybutyrate] depolymerase gene from Ralstonia eutropha H16 and characterization of the gene product*. J Bacteriol, 183(1):94–100.
- SAEGUSA, H., M. SHIRAKI und T. SAITO (2002). *Cloning of an intracellular D(-)-3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase gene from Ralstonia eutropha H16 and identification of the active site serine residue by site-directed mutagenesis*. J Biosci Bioeng, 94(2):106–112.
- SAITO, T., H. SAEGUSA, Y. MIYATA und T. FUKUI (1992). *Intracellular degradation of poly(3-hydroxybutyrate) granules of Zoogloea ramigera I-16-M*. FEMS Microbiol Rev, 9(2-4):333–338.
- SAVAGE, D. F., B. AFONSO, A. H. CHEN und P. A. SILVER (2010). *Spatially ordered dynamics of the bacterial carbon fixation machinery*. Science, 327(5970):1258–1261.
- SCANDOLA, M., M. FORCARETE und G. FRISONI (1998). *Simple kinetic model for the heterogeneous enzymatic hydrolysis of natural poly(3-hydroxybutyrate)*. Macromolecules, 31:3846–3851.
- SCHEFFEL, A., A. GÄRDES, K. GRÜNBERG, G. WANNER und D. SCHÜLER (2008). *The major magnetosome proteins MamGFDC are not essential for magnetite biomineralization in Magnetospirillum gryphiswaldense but regulate the size of magnetosome crystals*. J Bacteriol, 190(1):377–386.

- SCHEFFEL, A., M. GRUSKA, D. FAIVRE, A. LINAROUDIS, J. M. PLITZKO und D. SCHÜLER (2006). *An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria*. *Nature*, 440(7080):110–114.
- SCHEMBRI, M. A., R. C. BAYLY und J. K. DAVIES (1995). *Phosphate concentration regulates transcription of the Acinetobacter polyhydroxyalkanoic acid biosynthetic genes*. *J Bacteriol*, 177(15):4501–4507.
- SCHLEGEL, H., H. KALTWASSER und G. GOTTSCHALK (1961). *Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxidierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen*. *Archiv für Mikrobiologie*, 38:209–222.
- SCHUBERT, P., A. STEINBÜCHEL und H. G. SCHLEGEL (1988). *Cloning of the Alcaligenes eutrophus genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 170(12):5837–5847.
- SCHULTHEISS, D., R. HANDRICK, D. JENDROSSEK, M. HANZLIK und D. SCHÜLER (2005). *The presumptive magnetosome protein Mms16 is a poly(3-hydroxybutyrate) granule-bound protein (phasin) in Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J Bacteriol*, 187(7):2416–2425.
- SCHUSTER, E. und H. G. SCHLEGEL (1967). *Chemolithotrophes Wachstum von Hydrogenomonas H16 im Chemostat mit elektrolytischer Knallgaserzeugung*. *Archiv für Mikrobiologie*, 58(4):380–409.
- SCHUTH, N. (2011). *Untersuchungen zur Funktion von Proteinen im PHB-Stoffwechsel von Ralstonia eutropha mittels Elektronenmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie und Gaschromatographie*. Studienarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart.
- SCHWARTZ, E., A. HENNE, R. CRAMM, T. EITINGER, B. FRIEDRICH und G. GOTTSCHALK (2003). *Complete nucleotide sequence of pHG1: a Ralstonia eutropha H16 megaplasmid encoding key enzymes of H(2)-based itioautotrophy and anaerobiosis*. *J Mol Biol*, 332(2):369–383.

- SEMMLER, A. B., C. B. WHITCHURCH, A. J. LEECH und J. S. MATTICK (2000). *Identification of a novel gene, fimV, involved in twitching motility in Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology, 146 (Pt 6):1321–1332.
- SEO, M.-C., H.-D. SHIN und Y.-H. LEE (2003). *Functional role of granule-associated genes, phaP and phaR, in poly-beta-hydroxybutyrate biosynthesis in recombinant E. coli harboring phbCAB operon*. Biotechnol Lett, 25(15):1243–1249.
- SEREBRIISKII, I. G. und E. A. GOLEMIS (2001). *Two-hybrid system and false positives. Approaches to detection and elimination*. Methods Mol Biol, 177:123–134.
- SHEKHOVTSEV, V. P. und G. G. ZHARIKOVA (1978). *Cytomorphology of the lipid inclusions of Caryophanon during its growth on an agarized medium*. Mikrobiologiia, 47(4):733–738.
- SKLAR, J. G., H. MAKINOSHIMA, J. S. SCHNEIDER und M. S. GLICKMAN (2010). *M. tuberculosis intramembrane protease Rip1 controls transcription through three anti-sigma factor substrates*. Mol Microbiol, 77(3):605–617.
- SLATER, S. C., W. H. VOIGE und D. E. DENNIS (1988). *Cloning and expression in Escherichia coli of the Alcaligenes eutrophus H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway*. J Bacteriol, 170(10):4431–4436.
- SONKARIA, S., G. FUENTES, C. VERMA, R. NARANG, V. KHARE, A. FISCHER und D. FAIVRE (2012). *Insight into the assembly properties and functional organisation of the magnetotactic bacterial actin-like homolog, MamK*. PLoS One, 7(5):e34189.
- SONNHAMMER, E. L., S. R. EDDY und R. DURBIN (1997). *Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments*. Proteins, 28(3):405–420.
- SOUFO, H. J. D. und P. L. GRAUMANN (2006). *Dynamic localization and interaction with other Bacillus subtilis actin-like proteins are important for the function of MreB*. Mol Microbiol, 62(5):1340–1356.

- SRINIVASAN, S., G. C. BARNARD und T. U. GERNGROSS (2002). *A novel high-cell-density protein expression system based on Ralstonia eutropha*. Appl Environ Microbiol, 68(12):5925–5932.
- STEINBÜCHEL, A. (1991). *Polyhydroxyalkanoic acids. NATO AEW: novel materials from biological sources*. Byrom D (ed) Biomaterials. MacMillan, London, 1:123–213.
- STEINBÜCHEL, A., K. AERTS, W. BABEL, C. FOLLNER, M. LIEBERGESELL, M. H. MADKOUR, F. MAYER, U. PIEPER-FURST, A. PRIES und H. E. VALENTIN (1995). *Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions*. Can J Microbiol, 41 Suppl 1:94–105.
- STEINBÜCHEL, A. und H. E. VALENTIN (1995). *Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids*. FEMS Microbiology Letters, 128:219–228.
- STEINMANN, B., A. CHRISTMANN, T. HEISELER, J. FRITZ und H. KOLMAR (2010). *In vivo enzyme immobilization by inclusion body display*. Appl Environ Microbiol, 76(16):5563–5569.
- STUART, B. S., R. LENZ und R. C. FULLER (1995). *The ordered macromolecular surface of polyester inclusion bodies in Pseudomonas oleovorans*. Can. J. Microbiol., 41:84–93.
- STUART, E. S., A. TEHRANI, H. E. VALENTIN, D. DENNIS, R. W. LENZ und R. C. FULLER (1998). *Protein organization on the PHA inclusion cytoplasmic boundary*. J Biotechnol, 64(2-3):137–144.
- STUBBE, J. und J. TIAN (2003). *Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of PHA synthase*. Nat Prod Rep, 20(5):445–457.
- STUBBE, J., J. TIAN, A. HE, A. J. SINSKEY, A. G. LAWRENCE und P. LIU (2005). *Nontemplate-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm*. Annu Rev Biochem, 74:433–480.

- STYNEN, B., H. TOURNU, J. TAVERNIER und P. VAN DIJCK (2012). *Diversity in genetic in vivo methods for protein-protein interaction studies: from the yeast two-hybrid system to the mammalian split-luciferase system*. Microbiol Mol Biol Rev, 76(2):331–382.
- SUDESH, K., Z. GAN, A. MAEHARAC und Y. DOI (2002a). *Surface structure, morphology and stability of polyhydroxyalkanoate inclusions characterised by atomic force microscopy*. Polymer Degradation and Stability, 77:77–85.
- SUDESH, K., Z. GAN, K. MATSUMOT und Y. DOI (2002b). *Direct observation of polyhydroxyalkanoate chains by atomic force microscopy*. Ultramicroscopy, 91(1-4):157–164.
- SUZUKI, T., T. YAMANE und S. SHIMIZU (1986a). *Kinetics and effect of nitrogen source feeding on production of poly-beta-hydroxybutyric acid by fed-batch culture*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24:366–369.
- SUZUKI, T., T. YAMANE und S. SHIMIZU (1986b). *Mass production of poly-beta-hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 23:322–329.
- SUZUKI, T., T. YAMANE und S. SHIMIZU (1986c). *Mass production of poly-beta-hydroxybutyric acid by fed-batch culture with controlled carbon/nitrogen feeding*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24:370–374.
- SZNAJDER, A. und D. JENDROSSEK (2011). *Biochemical characterization of a new type of intracellular PHB depolymerase from Rhodospirillum rubrum with high hydrolytic activity on native PHB granules*. Appl Microbiol Biotechnol, 89(5):1487–1495.
- TECHNOW, U. (1999). *Isolierung der Substratbindedomäne der extrazellulären PHB-Depolymerase A von Pseudomonas lemoignei aus rekombinanten Escherichia coli und Anreicherung und Charakterisierung des Aktivators im intrazellulären PHB-Abbau von Rhodospirillum rubrum*. Diplomarbeit, Universität Göttingen.
- THOMPSON, S. R., G. H. WADHAMS und J. P. ARMITAGE (2006). *The positioning of cytoplasmic protein clusters in bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 103(21):8209–8214.

- TIAN, J., A. HE, A. G. LAWRENCE, P. LIU, N. WATSON, A. J. SINSKEY und J. STUBBE (2005a). *Analysis of transient polyhydroxybutyrate production in Wautersia eutropha H16 by quantitative Western analysis and transmission electron microscopy*. J Bacteriol, 187(11):3825–3832.
- TIAN, J., A. J. SINSKEY und J. STUBBE (2005b). *Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in Wautersia eutropha H16 by transmission electron microscopy*. J Bacteriol, 187(11):3814–3824.
- TIMM, A. und A. STEINBÜCHEL (1990). *Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by Pseudomonas aeruginosa and other fluorescent pseudomonads*. Appl Environ Microbiol, 56(11):3360–3367.
- TISCHBIEREK, M. (2012). *Funktionsanalyse PHB-assoziiierter Gene in Ralstonia eutropha H16*. Studienarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart.
- TOSO, D. B., A. M. HENSTRA, R. P. GUNSALUS und Z. H. ZHOU (2011). *Structural, mass and elemental analyses of storage granules in methanogenic archaeal cells*. Environ Microbiol, 13(9):2587–2599.
- TSENG, C.-L., H.-J. CHEN und G.-C. SHAW (2006). *Identification and characterization of the Bacillus thuringiensis phaZ gene, encoding new intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase*. J Bacteriol, 188(21):7592–7599.
- UCHINO, K. und T. SAITO (2006). *Thiolysis of poly(3-hydroxybutyrate) with polyhydroxyalkanoate synthase from Ralstonia eutropha*. J Biochem, 139(3):615–621.
- UCHINO, K., T. SAITO, B. GEBAUER und D. JENDROSSEK (2007). *Isolated poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme A (CoA) and degradation of PHB to acetyl-CoA*. J Bacteriol, 189(22):8250–8256.
- UCHINO, K., T. SAITO und D. JENDROSSEK (2008). *Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZa1 is involved in mobilization of accumulated PHB in Ralstonia eutropha H16*. Appl Environ Microbiol, 74(4):1058–1063.

- VAKNIN, A. und H. C. BERG (2004). *Single-cell FRET imaging of phosphatase activity in the Escherichia coli chemotaxis system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(49):17072–17077.
- VANDAMME, P. und T. COENYE (2004). *Taxonomy of the genus Cupriavidus: a tale of lost and found*. Int J Syst Evol Microbiol, 54(Pt 6):2285–2289.
- VANEECHOUTTE, M., P. KÄMPFER, T. DE BAERE, E. FALSEN und G. VERSCHRAE-GEN (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.* Int J Syst Evol Microbiol, 54(Pt 2):317–327.
- WAHL, A. (2011). *Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung des Polyhydroxybuttersäure (PHB)-produzierenden Bakteriums Ralstonia eutropha*. Studienarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart.
- WAHL, A., N. SCHUTH, D. PFEIFFER, S. NUSSBERGER und D. JENDROSSEK (2012). *PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in Ralstonia eutropha*. BMC Microbiol, 12(1):262.
- WANG, W. S. und D. G. LUNDGREN (1969). *Poly-beta-hydroxybutyrate in the chemo-lithotrophic bacterium Ferrobacillus ferrooxidans*. J Bacteriol, 97(2):947–950.
- WANG, Z.-H., P. MA, J. CHEN, J. ZHANG, C.-B. CHEN und G.-Q. CHEN (2011). *A transferable heterogeneous two-hybrid system in Escherichia coli based on polyhydroxyalkanoates synthesis regulatory protein PhaR*. Microb Cell Fact, 10:21.
- WATERS, R. C., P. W. O'TOOLE und K. A. RYAN (2007). *The FliK protein and flagellar hook-length control*. Protein Sci, 16(5):769–780.
- WEHBI, H., E. PORTILLO, H. HARVEY, A. E. SHIMKOFF, E. M. SCHEURWATER, P. L. HOWELL und L. L. BURROWS (2011). *The peptidoglycan-binding protein FimV promotes assembly of the Pseudomonas aeruginosa type IV pilus secretin*. J Bacteriol, 193(2):540–550.

- WIECZOREK, R., A. PRIES, A. STEINBÜCHEL und F. MAYER (1995). *Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in Alcaligenes eutrophus*. J Bacteriol, 177(9):2425–2435.
- WILDE, E. (1962). *Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von Hydrogenomonas eutropha*. Archiv für Mikrobiologie, 43:109–137.
- WILLIAMS, S. und D. MARTIN (2002). *Applications of PHAs in medicine and pharmacy*. Biopolymers, 4:91–127.
- WILLIAMSON, D. H. und J. F. WILKINSON (1958). *The isolation and estimation of the poly-beta-hydroxybutyrate inclusions of Bacillus species*. J Gen Microbiol, 19(1):198–209.
- WÄLTERMANN, M., A. HINZ, H. ROBENEK, D. TROYER, R. REICHELT, U. MALKUS, H.-J. GALLA, R. KALSCHUEUR, T. STÖVEKEN, P. VON LANDENBERG und A. STEINBÜCHEL (2005). *Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up*. Mol Microbiol, 55(3):750–763.
- WÄLTERMANN, M. und A. STEINBÜCHEL (2005). *Neutral lipid bodies in prokaryotes: recent insights into structure, formation, and relationship to eukaryotic lipid depots*. J Bacteriol, 187(11):3607–3619.
- WODZINSKA, J., K. D. S. ANDA, RHOMBERG, A. J. SINSKEY, K. BIEMANN und J. STUBBE (1996). *Polyhydroxybutyrate Synthase: Evidence for Covalent Catalysis*. J. Am. Chem. Soc., 118:6319–6320.
- YABUCHI, E., Y. KOSAKO, I. YANO, H. HOTTA und Y. NISHIUCHI (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.* Microbiol Immunol, 39(11):897–904.

- YAMADA, M., K. YAMASHITA, A. WAKUDA, K. ICHIMURA, A. MAEHARA, M. MAEDA und S. TAGUCHI (2007). *Autoregulator protein PhaR for biosynthesis of polyhydroxybutyrate [P(3HB)] possibly has two separate domains that bind to the target DNA and P(3HB): Functional mapping of amino acid residues responsible for DNA binding.* J Bacteriol, 189(3):1118–1127.
- YAMAICHI, Y., R. BRUCKNER, S. RINGGAARD, A. MÖLL, D. E. CAMERON, A. BRIEGEL, G. J. JENSEN, B. M. DAVIS und M. K. WALDOR (2012). *A multidomain hub anchors the chromosome segregation and chemotactic machinery to the bacterial pole.* Genes Dev, 26(20):2348–2360.
- YORK, G. M., B. H. JUNKER, J. A. STUBBE und A. J. SINSKEY (2001a). *Accumulation of the PhaP phasin of Ralstonia eutropha is dependent on production of polyhydroxybutyrate in cells.* J Bacteriol, 183(14):4217–4226.
- YORK, G. M., J. LUPBERGER, J. TIAN, A. G. LAWRENCE, J. STUBBE und A. J. SINSKEY (2003). *Ralstonia eutropha H16 encodes two and possibly three intracellular Poly[D-(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase genes.* J Bacteriol, 185(13):3788–3794.
- YORK, G. M., J. STUBBE und A. J. SINSKEY (2001b). *New insight into the role of the PhaP phasin of Ralstonia eutropha in promoting synthesis of polyhydroxybutyrate.* J Bacteriol, 183(7):2394–2397.
- YORK, G. M., J. STUBBE und A. J. SINSKEY (2002). *The Ralstonia eutropha PhaR protein couples synthesis of the PhaP phasin to the presence of polyhydroxybutyrate in cells and promotes polyhydroxybutyrate production.* J Bacteriol, 184(1):59–66.
- YUAN, W., Y. JIA, J. TIAN, K. D. SNELL, U. MÜH, A. J. SINSKEY, R. H. LAMBALOT, C. T. WALSH und J. STUBBE (2001). *Class I and III polyhydroxyalkanoate synthases from Ralstonia eutropha and Allochromatium vinosum: characterization and substrate specificity studies.* Arch Biochem Biophys, 394(1):87–98.

ZHANG, S., S. KOLVEK, R. W. LENZ und S. GOODWIN (2003). *Mechanism of the polymerization reaction initiated and catalyzed by the polyhydroxybutyrate synthase of Ralstonia eutropha*. *Biomacromolecules*, 4(3):504–509.

A | Anhang

A.1. Publikationen

[1] Pfeiffer, D. und D. Jendrossek (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(Pt 10):2795-2807.

Received 25 May 2011, Revised 4 July 2011, Accepted 6 July 2011

[doi: 10.1099/mic.0.051508-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.051508-0)

[2] Pfeiffer, D., A. Wahl und D. Jendrossek (2011). *Identification of a multi-functional 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*. Mol Microbiol, 82(4):936-951.

Received 24 July 2011, Accepted 28 September 2011, First published online 24 October 2011

Authors' contributions: D. Pfeiffer performed most experiments, except TEM experiments which were carried out by A. Wahl.

[doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07869.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07869.x)

[3] **Pfeiffer, D. und D. Jendrossek (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.* J Bacteriol, 194(21):5909-5921.

Received 3 May 2012, Accepted 22 August 2012, Published ahead of print 24 August 2012

doi: [10.1128/JB.00779-12](https://doi.org/10.1128/JB.00779-12)

[4] **Wahl, A., N. Schuth, D. Pfeiffer, S. Nussberger und D. Jendrossek (2012).** *PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in Ralstonia eutropha.* BMC Microbiol, 12(1):262.

Received 6 September 2012, Accepted 9 November 2012, Published 16 November 2012

Authors' contributions: N. Schuth and A. Wahl carried out most TEM experiments. D. Pfeiffer constructed the recombinant strains and performed FM experiments. D. Jendrossek designed the experiments and wrote the manuscript. S. Nussberger introduced the coauthors to TEM technology.

doi: [10.1186/1471-2180-12-262](https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-262)

[5] **Pfeiffer, D. und D. Jendrossek (2013).** *Development of a Transferable Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) System for the Investigation of Interactions between Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Granule-associated Proteins in Gramnegative Bacteria.* Appl. Environ. Microbiol. May 2013 79:9 2989-2999.

Received 21 December 2012, Accepted 19 February 2013, Published ahead of print 22 February 2013

doi: [10.1128/AEM.03965-12](https://doi.org/10.1128/AEM.03965-12)

A.2. Two-Hybrid Ergebnisse

Tabelle A.1.: Identifizierung neuer Interaktionspartner PHB-assoziiierter Proteine mittels einer Genbank. Angegeben sind die im Two-Hybrid gegen die Genbank eingesetzten Köderproteine sowie die jeweilige Anzahl der gefundenen Beuteproteine („Treffer“). Die Ergebnisse sind nach ihrer Gennummer aufsteigend aufgelistet. Die Interaktionsstärke wurde über die Geschwindigkeit des Wiederauwachsens auf Minimalagar abgeschätzt: + = sehr langsames Wachstum und schwache Blaufärbung bis + + + + = rasches Wachstum mit starker Blaufärbung.

Two-Hybrid Ergebnisse Seite 1

Treffer BLAST (Beute)	locus_tag	Interaktionsstärke	Köderprotein									
			Runde 1					Runde 2				
			PhaC1	PhaZa1	PhaR	PhaP1	PhaP2	PhaP3	PhaP4	H16_B1934 (PhaP5)	H16_A0141 (PhaM)	
hypothetical membrane associated protein	H16_A0141	++ bis ++++	20				1			1	5	
uncharacterized conserved protein	H16_A0157	+	1									
NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	H16_A0336	+++++	1									
amidophosphoribosyltransferase	H16_A0339	++	1									
Predicted Zn-dependent peptidase, M16B subfamily	H16_A0364	++					2			1		
predicted GTPase	H16_A0378	+++										
Type IV pilus transmembrane protein PilJ	H16_A0739	+++	1								1	
cytidylate kinase	H16_A0797	+++ bis ++++	1									
predicted exporter of the RND superfamily	H16_A0836	+++	1								1	
protein of unknown function	H16_A0869	+										
conserved hypothetical protein	H16_A0966	+	1									
NTP pyrophosphohydrolase	H16_A1065	+++ bis ++++									1	
Glutathione S-transferase	H16_A1103	+++ bis ++++									1	
endonuclease III protein	H16_A1147	+++++	1									
M23B family peptidase	H16_A1170	+++++	1									
serine acetyltransferase	H16_A1216	+					1					
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	H16_A1287	+++							1			
poly(3-hydroxybutyrate) polymerase	H16_A1437	+++									7	
transcriptional regulator of phasin expression (PhaR)	H16_A1440	++			3							
acyl-CoA dehydrogenase	H16_A1550	+ bis +++					1			2		
transcriptional regulator, Mocr family	H16_A1589	+++									1	
conserved hypothetical protein	H16_A1800	++					1					
transcriptional regulator, NNR like	H16_A1838	++							1			
putative silver efflux P-type ATPase	H16_A1986	+++ bis ++++	2									
short chain dehydrogenase	H16_A2152	++	1									
signal transduction histidine kinase	H16_A2234	+++	1								1	
predicted phosphate transport regulator	H16_A2274	+ bis +++	1				4		2			

Two-Hybrid Ergebnisse Seite 2

Treffer BLAST (Beute)	locus_tag	Interaktionsstärke	Köderprotein					Runde 2		
			PhaC1	PhaZa1	PhaR	PhaP1	PhaP2	PhaP3	PhaP4	H16_B1934 (PhaP5)
Hypothetical protein	H16_A2285	++							1	
Methyl-accepting chemotaxis protein	H16_A2292	+++								1
Transmembrane protein	H16_A2313	++	1							
membrane protease subunit, stomatin/prohibitin homolog	H16_A2357	++++								1
stationary phase survival protein	H16_A2376	+++	1							
DNA polymerase III tau/gamma subunit	H16_A2389	+++ bis ++++								1
glutamyl-tRNA synthetase	H16_A2403	+++++	2							
hypothetical membrane associated protein	H16_A2431	+								1
Hypothetical protein	H16_A2514	+ bis ++								1
hypothetical protein H16_A2605	H16_A2605	++					1			
tfp pilus assembly protein FimV	H16_A2617	+++ bis ++++								1
outer membrane protein (porin)	H16_A2688	+++							2	
DNA-directed RNA polymerase sigma subunit (RpoD)	H16_A2725	+++ bis ++++								1
conserved hypothetical protein	H16_A2798	+++ bis ++++								1
Uncharacterized protein conserved in bacteria	H16_A2924	+++					1			
small-conductance mechano-sensitive channel	H16_A3040	+++++	1							
Trans-hexaprenyltransferase	H16_A3253	+++ bis ++++								1
G3E family GTPase	H16_A3373	+++								
putative membrane protein of unknown function	H16_A3517	+++					2			
transcriptional regulator, AsnC-family	H16_A3677	++								1
acrB7a; cation/multidrug efflux pump	H16_A3716	++								
transcriptional regulator, TetR/AcrR-family	H16_A3728	+++						1		
LysR family transcriptional regulator	H16_B0049	++	1							1
methyl-accepting chemotaxis protein	H16_B0232	+ bis +++						3		
Hypothetical protein	H16_B0246	++								1
Acetyl-CoA C-acyltransferase	H16_B0378	+	1							
LysR family transcriptional regulator	H16_B0535	+++						1		
Acyl-CoA dehydrogenase	H16_B0703	++						1		
6-Carboxyhexanoate-CoA ligase	H16_B0928	+++								1
Hypothetical protein	H16_B0979	+++								1

Treffer BLAST (Beute)	locus_tag	Interaktionsstärke	Köderprotein									
			Runde 1					Runde 2				
			PhaC1	PhaZa1	PhaR	PhaP1	PhaP2	PhaP3	PhaP4	H16_B1934 (PhaP5)	H16_A0141 (PhaM)	
intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase	H16_B1014	++++	1									
transporter of the major facilitator superfamily	H16_B1138	+++										
conserved hypothetical protein	H16_B1405	+++	1									
LysR family transcriptional regulator	H16_B1446	+ bis +++					1					
transcriptional regulator, lclR-family	H16_B1542	+++ bis ++++		2							1	
transcriptional regulator, TetR/AcrR-family	H16_B1594	+										
transcriptional regulator, GntR-family	H16_B1761	+++ bis ++++	1							9		
signal transduction histidine kinase	H16_B1784	+ bis ++					1					
transcriptional regulator	H16_B1787	++					1					
Ferredoxin	H16_B1886	+++ bis ++++									1	
conserved hypothetical protein (Paal_thioesterase)	H16_B1907	+++					1					
hypothetical protein	H16_B1934	++ bis ++++					24			54		
transcriptional regulator, AraC-family	H16_B1996	+++ bis ++++	2								1	
conserved hypothetical protein	H16_B2023	+				1						
methyl-accepting chemotaxis transducer	H16_B2044	+++					7					
Hypothetical protein	H16_B2077	+									1	
Methyl-accepting chemotaxis protein	H16_B2122	++	1									
ABC-type transporter, permease component	H16_B2140	+++										
glutamine synthetase	H16_B2191	++	1									
putative phytoene synthase	H16_B2206	+ bis +++	3									
heme d1 biosynthesis protein (NirG)	H16_B2281	++									1	
RTX toxin exported protein	H16_B2313	+++ bis ++++										
signal transduction histidine kinase	H16_B2347	+ bis ++					1			1		
transcriptional regulator, GntR-family	H16_B2456	++								1		
3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase (fabG)	H16_B2510	+++		1								
histidine protein kinase (hoxJ)	PHG022	+++	1									
hypothetical protein	PHG164	++									1	
phasin PhaP2	PHG202	+++				1					1	
hypothetical protein PHG263	PHG263	+				1						
hypothetical protein	PHG304	+	1									

A.3. Ergebnisse der Proteomanalyse

Tabelle A.2.: Über eine Proteomanalyse an nativen PHB-Granula aus *R. eutropha* H16 nachgewiesene Proteine. Angegeben sind die Gennummer (locus_tag), das Molekulargewicht der identifizierten Proteine sowie die Anzahl der nachgewiesenen Fragmente.

Identifiziertes Protein	locus_tag	MW	Fragmente
aconitate hydratase	H16_A2638	98 kDa	28
phosphoenolpyruvate carboxylase	H16_A2921	112 kDa	28
chaperonin GroEL	H16_A0706	57 kDa	27
ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	H16_A3235	108 kDa	27
ABC transporter periplasmic protein	H16_A0472	33 kDa	22
F0F1 ATP synthase subunit beta	H16_A3637	51 kDa	21
ABC-type transporter, periplasmic component	H16_A3660	43 kDa	20
DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	H16_A3496	156 kDa	20
outer membrane protein (porin)	H16_A3402	41 kDa	19
outer membrane protein (porin)	H16_A0083	39 kDa	19
ABC transporter periplasmic protein	H16_A3030	41 kDa	19
nitrous-oxide reductase	PHG252	70 kDa	19
elongation factor Tu	H16_A3491	43 kDa	18
F0F1 ATP synthase subunit alpha	H16_A3639	55 kDa	18
elongation factor G	H16_A3492	77 kDa	17
ferrisiderophore receptor protein, TonB dependent	PHG126	78 kDa	17
NAD-reducing hydrogenase moiety large subunit	PHG091	55 kDa	16
2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	H16_A2325	106 kDa	16
transketolase	H16_A3147	73 kDa	16
phasin (PHA-granule associated protein)	H16_A1381	20 kDa	15
30S ribosomal protein S1	H16_A0798	62 kDa	15
succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	H16_A2630	65 kDa	14
membrane bound hydrogenase large subunit	PHG002	69 kDa	14
acetyl-CoA acetyltransferase	H16_A1438	41 kDa	13
outer membrane protein (porin)	H16_A3284	40 kDa	13
TRAP-type transporter, periplasmic component	H16_A3688	42 kDa	13
leucyl aminopeptidase	H16_A2990	54 kDa	13
pyruvate dehydrogenase subunit E1	H16_A1374	100 kDa	13

ribulose bisophosphate carboxylase	H16_B1395	54 kDa	13
outer membrane protein or related peptidoglycan-associated (lipo)protein	H16_A0788	23 kDa	12
phasin	PHG202	20 kDa	12
ABC transporter periplasmic protein	H16_A2330	48 kDa	12
flp pilus assembly protein secretin CpaC	H16_A0982	50 kDa	12
TonB-dependent outer membrane receptor	PHG028	80 kDa	12
lipoprotein	H16_B2304	21 kDa	12
phosphopyruvate hydratase	H16_A1188	46 kDa	12
acetylacetyl-CoA reductase	H16_A1439	26 kDa	11
ABC transporter periplasmic protein	H16_A3630	40 kDa	11
ABC-type transporter, periplasmic component	H16_A0935	41 kDa	11
type II citrate synthase	H16_A2627	49 kDa	11
hypothetical protein H16_B2433	H16_B2433	55 kDa	11
methylcitrate synthase	H16_A2636	44 kDa	11
outer membrane protein or related peptidoglycan-associated (lipo)protein	H16_A2828	18 kDa	10
phasin (PHA-granule associated protein)	H16_A2172	20 kDa	10
DNA-directed RNA polymerase subunit beta	H16_A3497	153 kDa	10
Zn-dependent protease with chaperone function	H16_A2221	28 kDa	10
extra-cytoplasmic solute receptor	H16_A3718	33 kDa	10
polynucleotide phosphorylase/polyadenylase	H16_A1045	78 kDa	10
ABC-type transporter, periplasmic component	H16_A1399	34 kDa	10
glutaminase-asparaginase (amidohydrolase)	H16_A1910	40 kDa	10
S-adenosylmethionine synthetase	H16_A0230	42 kDa	10
outer membrane cobalamin receptor, TonB dependent(BtuB)	H16_A2972	67 kDa	10
cytochrome cd1 nitrite reductase (NirS)	H16_B2277	61 kDa	10
Poly(3-hydroxybutyrate) polymerase	H16_A1437	64 kDa	10
50S ribosomal protein L1	H16_A3500	24 kDa	9
NAD(P) transhydrogenase subunit alpha 1	H16_A3128	39 kDa	9
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	H16_B1386, PHG418	36 kDa	9
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	H16_A1499	71 kDa	9

ABC transporter periplasmic protein	H16_A0759	38 kDa	9
F0F1 ATP synthase subunit B	H16_A3641	17 kDa	9
nitric oxide dioxygenase	PHG200	45 kDa	9
metalloregulation DNA-binding stress protein	H16_A3108	18 kDa	8
phasin (PHA-granule associated protein)	H16_B2021	20 kDa	8
extra-cytoplasmic solute receptor	H16_A0198	34 kDa	8
ABC transporter periplasmic protein	H16_A2626	39 kDa	8
DNA-binding protein, histone-like	H16_B1248	16 kDa	8
HoxI	PHG093	19 kDa	8
succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	H16_A2629	27 kDa	8
TRAP-type transporter, periplasmic component	H16_A1328	37 kDa	8
3-hydroxybutyrate dehydrogenase	H16_A1334	27 kDa	8
ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome c1	H16_A3396	28 kDa	8
dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) component of pyruvate dehydrogenase	H16_A1377	62 kDa	8
dihydrolipoamide dehydrogenase	H16_A2323	50 kDa	8
phosphoglycerate kinase	H16_B1385	42 kDa	8
fructose-1,6-bisphosphate aldolase	PHG416	37 kDa	8
alcohol dehydrogenase	H16_A0757	39 kDa	8
ketol-acid reductoisomerase	H16_A1037	36 kDa	8
translocation protein TolB	H16_A2829	49 kDa	8
50S ribosomal protein L5	H16_A3472	20 kDa	8
ribonuclease G and E	H16_A2580	112 kDa	8
ABC-type transporter, periplasmic component	H16_A2383	37 kDa	8
hypothetical protein H16_A0495	H16_A0495	20 kDa	7
succinyl-CoA synthetase subunit beta	H16_A0547	41 kDa	7
outer membrane protein peptidoglycan-associated(lipo)proteins	H16_A2944	22 kDa	7
50S ribosomal protein L6	H16_A3469	19 kDa	7
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	H16_A3146	36 kDa	7
malate dehydrogenase	H16_A2634	35 kDa	7
electron transfer flavoprotein beta-subunit	H16_A0814	27 kDa	7
aromatic amino acid aminotransferase	H16_A1151	43 kDa	7
molecular chaperone DnaK	H16_A3089	70 kDa	7

cell division protein FtsA	H16_A3269	44 kDa	7
DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	H16_A3458	36 kDa	7
glutamate dehydrogenase	H16_A0471	47 kDa	7
cbb3-type cytochrome oxidase, diheme subunit IV	H16_A2316	33 kDa	7
dihydrolipoamide succinyltransferase	H16_A2324	43 kDa	7
M23B subfamily metallopeptidase	H16_A2374	30 kDa	7
ABC-type transporter, periplasmic component	H16_B0061	40 kDa	7
transketolase	H16_B1388	72 kDa	7
LemA like protein	H16_A0733	23 kDa	7
elongation factor Ts	H16_A2054	31 kDa	7
trigger factor	H16_A1482	51 kDa	7
30S ribosomal protein S2	H16_A2055	27 kDa	6
LysM domain/BON superfamily protein	H16_A1040	18 kDa	6
cytochrome c555	H16_A3614	30 kDa	6
hypothetical protein H16_A0496	H16_A0496	20 kDa	6
universal stress protein	H16_A0533	17 kDa	6
lactaldehyde dehydrogenase	H16_A1919	50 kDa	6
aa3-type cytochrome oxidase, subunit II	H16_A0342	45 kDa	6
30S ribosomal protein S3	H16_A3478	30 kDa	6
50S ribosomal protein L4	H16_A3483	23 kDa	6
50S ribosomal protein L10	H16_A3499	18 kDa	6
ABC transporter periplasmic protein	H16_A3298	58 kDa	6
S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	H16_A0244	52 kDa	6
extra-cytoplasmic solute receptor	H16_A0592	34 kDa	6
arylsulfatase A or related enzyme	H16_A1602	64 kDa	6
malic enzyme	H16_A3153	84 kDa	6
ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	H16_A3234	45 kDa	6
NAD-reducing hydrogenase diaphorase moiety large subunit	PHG088	67 kDa	6
Serine protein kinase	H16_B0700	73 kDa	6
gamma-glutamyltransferase 1	H16_A1098	65 kDa	6
phosphoenolpyruvate synthase	H16_A2038	87 kDa	6
malate synthase	H16_A2217	59 kDa	6
glutamine synthetase	H16_A2335	52 kDa	6

HypB1	PHG013	38 kDa	6
bacterioferritin (cytochrome b1)	H16_A0328	18 kDa	6
uncharacterized lipoprotein	H16_A1205	45 kDa	6
30S ribosomal protein S4	H16_A3459	23 kDa	6
hypothetical protein H16_A3121	H16_A3121	21 kDa	6
cytochrome c553	H16_A3451	23 kDa	6
phosphoribulokinase	H16_B1389	33 kDa	6
inosine 5'-monophosphate dehydrogenase	H16_A2030	52 kDa	6
dihydrolipoamide acetyltransferase	H16_A1375	57 kDa	6
membrane protease subunit stomatin/prohibitin-like protein	H16_A2356	34 kDa	6
catalase	H16_A3109	54 kDa	6
ribulose biphosphate carboxylase small chain	H16_B1394, PHG426	16 kDa	5
hypothetical protein H16_A0011	H16_A0011	46 kDa	5
universal stress protein	H16_A1211	16 kDa	5
HU family DNA-binding protein	H16_A3684	10 kDa	5
fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	H16_B1390	40 kDa	5
OmpW family porin	H16_B0080	24 kDa	5
peroxiredoxin	H16_A1460	20 kDa	5
superoxide dismutase	H16_A0610	22 kDa	5
ABC transporter ATPase	H16_A0475	27 kDa	5
succinyl-CoA synthetase subunit alpha	H16_A0548	31 kDa	5
co-chaperonin GroES	H16_A0705	10 kDa	5
50S ribosomal protein L9	H16_A2276	16 kDa	5
ABC-type sugar transporter, periplasmic component	H16_A2498	64 kDa	5
acetoin dehydrogenase E1 component beta-subunit	H16_B0145	36 kDa	5
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase	H16_B1581	88 kDa	5
flp pilus assembly protein CpaB	H16_A0981	36 kDa	5
hypothetical protein H16_B1582	H16_B1582	51 kDa	5
ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit (Rieske Fe-S protein)	H16_A3398	22 kDa	5
hypothetical protein H16_A2820	H16_A2820	12 kDa	5

F0F1 ATP synthase subunit gamma	H16_A3638	32 kDa	5
ATP-dependent Lon protease	H16_A1485	89 kDa	5
beta-hexosaminidase	H16_A2550	38 kDa	5
30S ribosomal protein S5	H16_A3467	18 kDa	5
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	H16_A1514	29 kDa	5
ATP-dependent protease Clp, ATPase subunit	H16_A2249	96 kDa	5
ABC transporter periplasmic protein	H16_A2125	28 kDa	5
F0F1 ATP synthase subunit delta	H16_A3640	19 kDa	5
30S ribosomal protein S6	H16_A2279	14 kDa	5
recombinase A	H16_A0544	38 kDa	5
electron transfer flavoprotein alpha subunit	H16_A0815	31 kDa	5
histone-like protein	PHG287	16 kDa	5
aspartate-semialdehyde dehydrogenase	H16_A2618	41 kDa	5
tfp pilus assembly protein FimV	H16_A2617	98 kDa	5
ATP-dependent protease Clp, ATPase subunit	H16_B1382	102 kDa	5
membrane protease subunit stomatin/prohibitin-like protein	H16_A2357	50 kDa	4
ABC transporter permease	H16_A0473	27 kDa	4
hypothetical protein H16_A3341	H16_A3341	10 kDa	4
50S ribosomal protein L19	H16_A0897	14 kDa	4
Thiol:disulfide interchange protein DsbA	H16_A0161	23 kDa	4
hypothetical protein H16_A0446	H16_A0446	34 kDa	4
phosphogluconate dehydratase	H16_A1178	66 kDa	4
beta alanine-pyruvate transaminase	H16_A0272	47 kDa	4
membrane protease subunits, stomatin/prohibitin homologs	H16_A2036	34 kDa	4
outer membrane protein (porin)	H16_A2378	36 kDa	4
HU family DNA-binding protein	H16_B1235	10 kDa	4
F0F1 ATP synthase subunit epsilon	H16_A3636	15 kDa	4
FtsH endopeptidase	H16_A2447	69 kDa	4
D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (serine-type)	H16_A0302	44 kDa	4
dihydrolipoamide dehydrogenase (E3 component of pyruvate or 2-oxoglutarate DH-complexes)	H16_A3724	50 kDa	4
fructose-1,6-bisphosphate	PHG027	23 kDa	4

50S ribosomal protein L17	H16_A3457	15 kDa	4
electron transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase	H16_A1324	62 kDa	4
serine hydroxymethyltransferase	H16_A2834	45 kDa	4
acetyl-CoA acetyltransferase	H16_A0170	41 kDa	4
N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	H16_A0220	34 kDa	4
beta-ketothiolase	H16_A1445	41 kDa	4
methyl-accepting chemotaxis protein	H16_B0233	65 kDa	4
ribonucleotide reductase, coenzyme B12-dependent	H16_A2390	90 kDa	4
universal stress protein	H16_A2220	16 kDa	4
acyl carrier protein phosphodiesterase	H16_A2290	20 kDa	4
50S ribosomal protein L3	H16_A3484	23 kDa	4
thioredoxin reductase	H16_A2592	40 kDa	4
ABC-type transporter, periplasmic component	H16_A2257	43 kDa	4
acyl-CoA synthetase	H16_A3288	61 kDa	4
transcriptional regulator of phasin expression	H16_A1440	21 kDa	4
C-terminal processing peptidase-3, periplasmic	H16_A0331	58 kDa	4
50S ribosomal protein L14	H16_A3474	13 kDa	4
Type IV pilus twitching motility protein PilT	H16_A3104	38 kDa	4
malonyl-CoA synthase	H16_A2978	62 kDa	4
universal stress protein	H16_A3519	16 kDa	4
aromatic amino acid aminotransferase	H16_B1081	44 kDa	4
aspartyl-tRNA synthetase	H16_A0453	68 kDa	4
hypothetical protein H16_A1459	H16_A1459	18 kDa	4
cytochrome C	PHG253	13 kDa	4
30S ribosomal protein S9	H16_A0483	14 kDa	4
dehydrogenase with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	H16_A0931	27 kDa	4
hypothetical protein H16_A2361	H16_A2361	41 kDa	4
argininosuccinate lyase	H16_A2925	51 kDa	4
trypsin-like serine protease	H16_A2560	52 kDa	4
G3E family GTPase	H16_A0195	41 kDa	4
ABC transporter ATPase	H16_A3661	26 kDa	4

2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-carboxylate N-succinyl-transferase	H16_A2066	30 kDa	4
fructose-1,6-bisphosphate aldolase	H16_A0568	38 kDa	4
30S ribosomal protein S12	H16_A3494	14 kDa	4
isocitrate dehydrogenase	H16_A3056	46 kDa	4
periplasmic or secreted protein	H16_A2977	24 kDa	4
50S ribosomal protein L15	H16_A3465	15 kDa	4
hypothetical protein H16_A1592	H16_A1592	65 kDa	4
extra-cytoplasmic solute receptor	H16_B0766	35 kDa	4
RNA-binding protein	H16_A2449	18 kDa	4
ABC transporter periplasmic protein	H16_A1520	45 kDa	3
branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	H16_B0146	39 kDa	3
hypothetical protein H16_B2202	H16_B2202	21 kDa	3
50S ribosomal protein L2	H16_A3481	30 kDa	3
DNA polymerase III subunit beta	H16_A0002	41 kDa	3
succinate-semialdehyde dehydrogenase (NADP+)	H16_B2057	52 kDa	3
microcin-processing peptidase 2	H16_A1124	51 kDa	3
ubiquinol-cytochrome-c reductase, cytochrome b	H16_A3397	53 kDa	3
fructose-1,6-bisphosphate aldolase	H16_B1384	37 kDa	3
microcin-processing peptidase 1	H16_A2705	49 kDa	3
NADH dehydrogenase subunit C	H16_A1052	23 kDa	3
threonine dehydratase	H16_A0427	57 kDa	3
ribose-phosphate pyrophosphokinase	H16_A0372	34 kDa	3
hypothetical protein H16_A0157	H16_A0157	16 kDa	3
malic enzyme	H16_A1002	83 kDa	3
hypothetical protein H16_A0883	H16_A0883	44 kDa	3
50S ribosomal protein L18	H16_A3468	13 kDa	3
dienelactone hydrolase or related enzyme	H16_A2739	31 kDa	3
pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	H16_A2802	24 kDa	3
cyclopropane fatty acid synthase	H16_A2803	47 kDa	3
hypothetical protein H16_A3448	H16_A3448	15 kDa	3
NAD(P) transhydrogenase subunit beta	H16_A3131	51 kDa	3
short chain dehydrogenase	H16_A0258	30 kDa	3

peptidoglycan binding domain-containing protein	H16_A3701	42 kDa	3
hypothetical protein H16_A2001	H16_A2001	18 kDa	3
enoyl-(acyl carrier protein) reductase	H16_A2410	28 kDa	3
phosphomannomutase	H16_A2885	50 kDa	3
NADH dehydrogenase subunit D	H16_A1053	48 kDa	3
acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit	H16_A3172	50 kDa	3
ABC transporter periplasmic protein	H16_A0772	29 kDa	3
acetoin dehydrogenase E1 component alpha-subunit	H16_B0144	35 kDa	3
ATP-dependent protease Clp, ATPase subunit	H16_A3052	84 kDa	3
hypothetical protein H16_A2637	H16_A2637	19 kDa	3
periplasmic or secreted lipoprotein	H16_A3577	29 kDa	3
flp pilus assembly protein, secretin	H16_B0185	49 kDa	3
rubisco accessory protein CbbX, AAA ATPase	H16_B1393,	35 kDa	3
	PHG425		
inner membrane protein translocase component YidC	H16_A3744	61 kDa	3
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	H16_A1218	18 kDa	3
3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase II	H16_A2565	43 kDa	3
hypothetical protein H16_A2536	H16_A2536	15 kDa	3
ABC-type transporter, permease component	H16_A3658	36 kDa	3
hypothetical protein H16_B2432	H16_B2432	19 kDa	3
Zn-dependent M16B family peptidase	H16_A0364	58 kDa	3
isocitrate dehydrogenase [NADP]	H16_B1931	82 kDa	3
glutathione S-transferase	H16_A1103	23 kDa	3
extra-cytoplasmic solute receptor	H16_A1360	35 kDa	3
UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	H16_A2752	33 kDa	3
extra-cytoplasmic solute receptor	H16_A2980	36 kDa	3
30S ribosomal protein S13	H16_A3461	14 kDa	3
ferrous iron transport protein B	H16_B0084	67 kDa	3
organic hydroperoxide resistance protein	H16_B0157	15 kDa	3
methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	H16_B1191	53 kDa	3
small-conductance mechano-sensitive channel	H16_B1233	31 kDa	3
transcriptional regulator	H16_B1210	32 kDa	3
hypothetical protein PHG228	PHG228	16 kDa	3
30S ribosomal protein S16	H16_A0894	9 kDa	3

DNA uptake lipoprotein	H16_A1433	31 kDa	3
glutathione S-transferase	H16_A1090	26 kDa	3
ribulose-phosphate 3-epimerase	H16_B1391	26 kDa	3
outer membrane protein (porin)	H16_A1004	38 kDa	3
gluconate transporter	H16_B1207	47 kDa	3
cysteine desulfurase	H16_A1158	45 kDa	3
enoyl-CoA hydratase	H16_A0179	28 kDa	3
response regulator	H16_A3117	36 kDa	3
hypothetical protein H16_A3233	H16_A3233	38 kDa	3
transmembrane protein	H16_A2362	24 kDa	3
HypB2	PHG095	35 kDa	3
Sco1/SenC family cytochrome oxidase assembly protein	H16_A0353	22 kDa	3
succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit A	H16_A1331	25 kDa	3
nucleotide-binding protein	H16_A3060	18 kDa	3
hypothetical protein H16_B2071	H16_B2071	141 kDa	3
cation/multidrug efflux system, membrane-fusion component	H16_A3357	43 kDa	3
enoyl-CoA hydratase	H16_A3307	28 kDa	3
GTP-dependent nucleic acid-binding protein EngD	H16_A3333	39 kDa	3
histone H1-like protein (alanine/lysine-rich protein)	H16_A3178	19 kDa	2
cbb3-type cytochrome oxidase, monoheme subunit II	H16_A2318	25 kDa	2
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	H16_B0824	43 kDa	2
intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase	H16_A1150	47 kDa	2
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	H16_A1483	23 kDa	2
fumarate hydratase class I	H16_A2528	55 kDa	2
extra-cytoplasmic solute receptor	H16_B2116	34 kDa	2
50S ribosomal protein L25/general stress protein Ctc	H16_A0371	22 kDa	2
response regulator	H16_A1372	23 kDa	2
FadE2-like Acyl-CoA dehydrogenase (ACAD)	H16_A1091	47 kDa	2
Zinc-binding dehydrogenase	H16_A0933	35 kDa	2
3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	H16_A2567	26 kDa	2

ATPase related to phosphate starvation-inducible protein PhoH	H16_A2270	62 kDa	2
outer membrane protein, surface antigen OMA87	H16_A2047	89 kDa	2
delta-aminolevulinic acid dehydratase	H16_A3453	37 kDa	2
outer membrane efflux protein	H16_A3731	54 kDa	2
ABC-type transporter, periplasmic component	H16_B2502	30 kDa	2
single-stranded DNA-binding protein	H16_A0402	19 kDa	2
50S ribosomal protein L27	H16_A3251	9 kDa	2
fructose-1,6-bisphosphatase	H16_A0999	38 kDa	2
hypothetical protein H16_A2365	H16_A2365	33 kDa	2
phosphate transport regulator	H16_A2274	23 kDa	2
transcription termination factor Rho	H16_A2395	46 kDa	2
ABC transporter ATPase	H16_A3662	29 kDa	2
NADH dehydrogenase subunit G	H16_A1056	84 kDa	2
O-acetylhomoserine sulphydrylase	H16_B2229	45 kDa	2
ABC-type transporter, auxiliary periplasmic component involved in toluene tolerance	H16_A3423	23 kDa	2
response regulator	H16_A3043	23 kDa	2
bd-type quinol oxidase subunit II	H16_B1177	53 kDa	2
ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpX	H16_A1484	47 kDa	2
gamma-glutamyl-cysteine ligase	H16_A0322	48 kDa	2
NAD-reducing hydrogenase diaphorase moiety small subunit	PHG089	26 kDa	2
hypothetical protein H16_A0141	H16_A0141	27 kDa	2
DnaK suppressor protein	H16_A0194	25 kDa	2
50S ribosomal protein L13	H16_A0482	16 kDa	2
hypothetical protein H16_A0946	H16_A0946	17 kDa	2
hypothetical protein H16_A1625	H16_A1625	21 kDa	2
cbb3-type cytochrome oxidase, subunit I	H16_A2319	54 kDa	2
NADPH:quinone oxidoreductase	H16_A2377	34 kDa	2
6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	H16_A2855	18 kDa	2
phosphoribosylaminoimidazole synthetase	H16_A3077	37 kDa	2
hypothetical protein H16_B1934	H16_B1934	16 kDa	2
aspartate kinase	H16_A1225	45 kDa	2

homoserine dehydrogenase	H16_A2266	47 kDa	2
30S ribosomal protein S15	H16_A1044	10 kDa	2
H-NS-like DNA-binding protein	H16_B0227	11 kDa	2
response regulator	H16_A3694	26 kDa	2
adenylosuccinate synthetase	H16_A2354	47 kDa	2
Zn-dependent peptidase	H16_A0365	49 kDa	2
O-linked N-acetylglucosamine transferase OGT	H16_A0376	72 kDa	2
hypothetical protein H16_A0671	H16_A0671	84 kDa	2
hypothetical protein H16_A0977	H16_A0977	12 kDa	2
outer membrane protein and related peptidoglycan-associated (lipo)proteins	H16_A0990	33 kDa	2
Zn-dependent oxidoreductase	H16_A1046	35 kDa	2
triosephosphate isomerase	H16_A1047	25 kDa	2
hypothetical protein H16_A1365	H16_A1365	10 kDa	2
cation/multidrug efflux system, mebrane-fusion component	H16_A1467	39 kDa	2
enoyl-CoA hydratase/Delta(3)-cis-delta(2)-trans-enoyl-CoA isomerase	H16_A1526	75 kDa	2
hypothetical protein H16_A1926	H16_A1926	18 kDa	2
RNA-binding protein Hfq	H16_A2359	9 kDa	2
hypothetical protein H16_A2556	H16_A2556	14 kDa	2
acetyl-CoA carboxylase subunit beta	H16_A2611	32 kDa	2
tryptophan synthase subunit beta	H16_A2614	43 kDa	2
sulfate adenylyltransferase subunit 2	H16_A2996	36 kDa	2
30S ribosomal protein S20	H16_A3065	9 kDa	2
preprotein translocase subunit SecF	H16_A3116	36 kDa	2
adenylosuccinate lyase	H16_A3124	51 kDa	2
acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein subunit	H16_A3171	16 kDa	2
undecaprenyldiphospho-muramoylpentapeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase	H16_A3273	38 kDa	2
large-conductance mechanosensitive channel	H16_A3399	15 kDa	2
transcription antitermination protein NusG	H16_A3502	22 kDa	2
hypothetical protein H16_B0220	H16_B0220	41 kDa	2

hypothetical protein H16_B1405	H16_B1405	18 kDa	2
phosphate acetyltransferase	H16_B1631	32 kDa	2
hypothetical protein H16_B2434	H16_B2434	20 kDa	2
putative lipid carrier protein	H16_B2328	16 kDa	2
ABC transporter periplasmic protein	H16_A2100	57 kDa	2
F0F1 ATP synthase subunit A	H16_A3643	35 kDa	2
regulatory [NiFe] hydrogenase large subunit	PHG021	52 kDa	2
OmpW family porin	H16_A3670	26 kDa	2
ABC-type transporter, periplasmic component involved in toluene tolerance	H16_A3425	18 kDa	2
hypothetical protein H16_A0231	H16_A0231	36 kDa	2
TonB-like protein, links inner and outer membranes	H16_A2532	23 kDa	2
non-heme haloperoxidase	H16_A2213	30 kDa	2
ADP-D-beta-D-heptose 6-epimerase	H16_A0804	37 kDa	2
protein-disulfide isomerase	H16_A3331	27 kDa	2
glycerol-3-phosphate transporter ATP-binding subunit	H16_A2327	40 kDa	2
glutathione synthetase	H16_A0323	35 kDa	2
membrane-bound lytic murein transglycosylase	H16_A3314	41 kDa	2
hypothetical protein H16_A0790	H16_A0790	21 kDa	2
stringent starvation protein A (glutathione S-transferase)	H16_A3395	24 kDa	2
membrane-bound hydrogenase-linked b-type cytochrome	PHG003	28 kDa	2
extra-cytoplasmic solute receptor	H16_B0053	36 kDa	2
dihydroorotase	H16_A2912	48 kDa	2
exoribonuclease R	H16_A2349	101 kDa	2
biopolymer transport protein	H16_A2533	26 kDa	2
membrane-bound [NiFe] hydrogenase small subunit	PHG001	39 kDa	2
50S ribosomal protein L24	H16_A3473	11 kDa	2
general secretion pathway protein G	H16_A3535	17 kDa	2
hydrolase	H16_B1392	27 kDa	2
flp pilus assembly protein CpaB	H16_B0184	33 kDa	2
acyl-CoA synthetase	H16_B0174	55 kDa	2
alanyl-tRNA synthetase	H16_A2769	95 kDa	2

protein-L-isoaspartate carboxylmethyltransferase	H16_A2877	24 kDa	2
aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B	H16_A0108	53 kDa	2
50S ribosomal protein L31 type B	H16_A2397	10 kDa	2
50S ribosomal protein L21	H16_A3252	11 kDa	2
hypothetical protein H16_A0993	H16_A0993	27 kDa	2
ribosome recycling factor	H16_A2052	21 kDa	2
hypothetical protein H16_B2201	H16_B2201	52 kDa	2
DNA polymerase III subunits gamma and tau	H16_A2389	81 kDa	2
peptidase D (Xaa-Pro aminopeptidase)	H16_A0506	51 kDa	2

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Stuttgart, den 20. Februar 2013

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Dieter Jendrossek bedanke ich mich für die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit am Institut für Mikrobiologie sowie für die Hilfestellung und Diskussionsbereitschaft bei zahlreichen Fragestellungen. Speziell bedanken möchte ich mich für die hilfreiche Durchsicht der Arbeit und deren Begutachtung.

Bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer und Prof. Dr. Karl Forchhammer möchte ich mich für die Übernahme der Zweitgutachten meiner Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Georg Sprenger danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können und für die Denkanstösse im Rahmen der Halbjahresberichte und Seminarvorträge.

Mein besonderer Dank gilt Andreas Wahl und Nora Schuth, welche die elektronenmikroskopischen Experimente durchgeführt haben und so entscheidend zum Vorankommen des Projekts beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt ferner Simone Reinhardt für ihre Mithilfe bei molekularbiologischen Arbeiten und bei der Elektronenmikroskopie.

Bei Dominik Rais, Pia Kaufmann, Anna Sznajder, Gabriele Siedenburg und Siska Hermawan bedanke ich mich herzlichst für ihre Mithilfe bei manchen Arbeiten wie Klonierungen, Proteinaufreinigung oder Fluoreszenzmikroskopie.

Bei Georg Schmitt bedanke ich mich für seine Unterstützung und Rat bezüglich aller aufgetretenen Fragen zur Proteinreinigung.

Bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie insbesondere der AG Jendrossek bedanke ich mich für die hilfreiche Unterstützung bei zahlreichen Fragen und für die freundliche Atmosphäre am Institut.

Mein Dank gilt zudem Heiner Böttinger für die Bereitstellung von Maus-Antikörpern sowie Felix Neugart und Margarete Witkowski für die Hilfe bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit bedanke ich mich bei der Landesgraduiertenförderung und bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG).

Bei meiner Freundin Nadine bedanke ich mich für ihre Geduld und Zuwendung, welche sie mir bei der Anfertigung dieser Dissertation entgegengebracht hat, auch wenn ich oft wenig Zeit hatte.

Besonderer Dank gebührt meinen Eltern für die Unterstützung meines Studiums.

Lebenslauf

Daniel Pfeiffer, geboren am 12. 10. 1982 in Aalen

Studium

- seit 05/2009 Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Arbeit bei Prof. Dr. D. Jendrossek am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart
- 04/2009 Abschluss des Diplomstudiengangs „Technische Biologie“
- 05/2008–04/2009 Diplomarbeit bei Prof. Dr. D. Jendrossek: „Biochemische Charakterisierung des intrazellulären PHB-Abbaus bei *Azohydromonas lata*“ am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart
- 03/2007–07/2007 Studienarbeit bei Prof. Dr.-Ing. Dr. h.c. M. Reuss: „Transkriptionsanalyse von *Escherichia coli* K12 unter Glukoselimitierung mittels quantitativer Real-Time PCR“ am Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart
- 10/2005–12/2007 Diplomprüfungen in den Fächern: Biochemie, Technische Biochemie, Mikrobiologie, Bioverfahrenstechnik und Industrielle Genetik
- 12/2004 Vordiplom
- 10/2002 Beginn des Studiums der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart

Schulbildung

- 09/1997–06/2002 Allgemeine Hochschulreife, Theodor-Heuss-Gymnasium Aalen
- 09/1993–07/1997 Uhland-Realschule Aalen
- 09/1988–07/1993 Greutschule Aalen