

Lokalisation, Speicherung und Synthese
von Polyphosphat in
Agrobacterium tumefaciens C58

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
Celina Hellenbroich (geb. Frank)
aus Heilbronn

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

Mitberichter: Prof. Dr. rer. nat. Stephan Nussberger

Tag der mündlichen Prüfung: 10.09.2021

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart

2021

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

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht (Anhang A1)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung	10
Abstract	11
Kapitel 1 Theoretischer Hintergrund und Zielsetzung	12
1.1 Vorkommen und Funktion von PolyP	12
1.2 Aufbau und Synthese nativer PolyP-Granula	13
1.3 Aufbau und Struktur von Acidocalcisomen	15
1.4 Zielsetzung	18
Kapitel 2 Acidocalcisomen und PolyP-Granula sind unterschiedliche subzelluläre Strukturen in <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
2.1 Färbeprinzip der Fluoreszenzfarbstoffe	19
2.1.1 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI).....	19
2.1.2 LysoSensor™ Green DND-189	20
2.1.3 MitoTracker™ Red FM	20
2.1.4 Nilrot	20
2.1.5 FM1-43 und FM4-64	20
2.2 Isolierung von Acidocalcisomen in <i>A. tumefaciens</i>	22
2.3 Nachweis von Acidocalcisomen durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe	25
2.4 Lokalisierung der Acidocalcisomenmembran durch Phospholipid-bindende Proteine	28
2.5 Lokalisierung der Acidocalcisomen-spezifischen, vakuolären H ⁺ - transportierenden Pyrophosphatase HppA _{At}	30

2.6	Polyphosphatkinasen sind zuständig für die Synthese und Abbau von PolyP und beeinflussen nicht die Bildung der mit HppA _{At} assoziierten Acidocalcisom-ähnlichen Strukturen	35
Kapitel 3	Charakterisierung der Polyphosphatkinasen von <i>A. tumefaciens</i> in vitro	40
3.1	Methoden zur Analyse der Enzymaktivität	40
3.1.1	Aufreinigung der Polyphosphatkinasen von <i>A. tumefaciens</i> durch Nickel-Affinitätschromatographie.....	40
3.1.2	Zusammensetzung der Enzymassays und Messung der PPK _{At} -Aktivitäten	42
3.1.3	Färbung von PolyP-Gelen mit Toluidinblau	43
3.2	Biochemische Charakterisierung der PPK1 _{At}	43
3.3	Biochemische Charakterisierung der PPK2 _{At}	45
3.4	PPK2 _{At} phosphoryliert NDPs mit PolyP als Phosphatdonor und produziert NTPs sowie Nukleosid-Oligophosphate	47
3.5	Identifizierung von Nukleosid-Oligophosphaten mit ZIC-pHILIC MS/MS ..	49
3.6	Die Expression von <i>ppk1</i> _{At} oder <i>ppk2</i> _{At} in einem PolyP-freien Hintergrund... ..	53
Kapitel 4	Subzelluläre Position der PolyP-Granula in Abhängigkeit vom Zellzyklus	55
4.1	Methoden	56
4.1.1	<i>Live cell imaging (time lapse)</i> Experimente	56
4.1.2	Mitomycin C	56
4.1.3	Depletionsmutante <i>A. tumefaciens</i> Δ <i>popZ</i> _{At}	56
4.1.4	GUS-Reportergeren Assay	57
4.2	PPK2 _{At} , aber nicht PPK1 _{At} , liegt immer gebunden an PolyP-Granula in <i>A. tumefaciens</i> vor	58
4.3	PPK1 _{At} ist eng assoziiert mit der PolyP-Granula Bildung.....	61

4.4	PPK1 _{At} und PPK2 _{At} bilden separate PolyP-Granula in <i>R. eutropha</i>	63
4.5	PolyP-Granula zeigen subzelluläre Bewegungen während des Zellwachstums in <i>A. tumefaciens</i>	65
4.6	Beeinflussung der DNA-Migration während des Wachstums hat Auswirkung auf die PolyP-Granula Bewegung	70
4.7	PPK1 _{At} als mögliches Bindeglied zwischen DNA und PolyP-Granulum ...	77
4.8	Die Deletion der <i>ppk1</i> _{At} führt zu Defekten in der Zellmorphologie, einer erhöhten Generationszeit und hat Einfluss auf die Infektionsrate.....	83
Kapitel 5	Vergleichende Betrachtung des PolyP-Stoffwechsels von <i>A. tumefaciens</i> zu anderen Bakterien	88
6. Ausblick	93
7. Literaturverzeichnis	96
Anhang	104
A1	Publikationen.....	104
A2	Sequenzvergleich der PPK1 Aminosäuren von <i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i> und <i>C. crescentus</i>	104
A3	BACTH-Versuch.....	106
A4	Originaldaten der Wachstumsversuche verschiedener <i>A. tumefaciens</i> Stämme	109
A5	Identifizierte Proteine aus dem <i>pull down</i> Experiment.....	110
Erklärung	112
Danksagung	113
Lebenslauf	115

Abkürzungsverzeichnis

3D-SIM	Weiterentwickelte Form der Lichtmikroskopie, engl. 3D <i>Structured Illumination Microscope</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Adaptorprotein
APX	AdenosinXphosphat, X steht entweder für 4 (tetra), 5 (penta), 6 (hexa), 7 (hepta), 8 (octa), 9 (nona) oder 10 (deca)
At.....	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	(relative) arbiträre Einheit, engl. <i>arbitrary units</i>
BACTH	Bakterielles Adenylatzyklase Two-Hybrid System, engl. <i>Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid</i>
BLAST	Programm zur Analyse biologischer Sequenzdaten, engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
CC	zirkuläres Chromosom, engl. <i>Circular Chromosome</i> , Chromosom I in <i>A. tumefaciens</i>
CCr.....	<i>Caulobacter crescentus</i>
CDP	Cytidindiphosphat
cdw.....	Zelltrockengewicht, engl. <i>cellular dry weight</i>
CHAD	Konservierte Domäne in einem Protein, engl. <i>Conserved Histidine α-Helical Domain</i>
CPX.....	CytidinXphosphat, X steht entweder für 4 (tetra), 5 (penta), 6 (hexa), 7 (hepta), 8 (octa), 9 (nona) oder 10 (deca)

C-Terminal	Carboxy-Terminus eines Proteins
CTP.....	Cytidintriphosphat
CYTH.....	Konservierte Domäne eines Proteins, CyaB engl. <i>bacterial class IV adenylyl cyclases and mammalian thiamine triphosphatase</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
dTPX.....	DesoxythymidinXphosphat, X steht entweder für 4 (tetra), 5 (penta), 6 (hexa), 7 (hepta), 8 (octa), 9 (nona) oder 10 (deca)
dsRed2EC	Fluoreszenzprotein, engl. <i>discosoma Red 2 Enhanced</i>
dTDP.....	Desoxythymidindiphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
eYFP	Fluoreszenzprotein, engl. <i>enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>
ESI.....	Elektrospray-Ionisationsmethode
FM.....	Fei-Mao
GDP.....	Guanosindiphosphat
Gln	Glutaminsynthetase
GPX.....	GuanosinXphosphat, X steht entweder für 4 (tetra), 5 (penta), 6 (hexa), 7 (hepta), 8 (octa), 9 (nona) oder 10 (deca)
GTP	Guanosintriphosphat
GUS.....	β -Glucuronidase
H.....	Histidin
H.....	Stunden, engl. <i>hours</i>
HILIC-QQQ-SIM	Hydrophile Interaktionsflüssigkeitschromatographie-Triplequadrupol ausgewählte Ionenüberwachung, engl.

hydrophilic interaction liquid chromatography-triple quadrupole-selected-ion monitoring

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HppA	H ⁺ -Pyrophosphatase
IP3.....	Inositol-3-Phosphat
kDa.....	Masseinheit, Kilodalton
KP	Kryptisches Plasmid
L	Liter
LactC2.....	Protein Lactadherin-C2 (bovin)
LB.....	Für komplexe Nährmedien, engl. <i>Lysogeny Broth</i>
LC.....	Lineares Chromosom, Chromosom II in <i>A. tumefaciens</i>
M	Molar
mAU	Milli-Absorptionseinheit, engl. <i>milli-Absorption Units</i>
Mt	Mutante
mM	Milimolar
min	Minuten
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis, Masse/Ladungszahl des Teilchens
mCherry.....	monomeres Fluoreszenzprotein
MS	Massenspektrometrie
NDP.....	Nukleosiddiphosphat
nm	Nanometer
NMP	Nukleosidmonophosphat

NMR.....	Kernspinresonanzspektroskopie, engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
N-Terminal	Amino-Terminus eines Proteins
NTP.....	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
OP.....	alter Zellpol, engl. <i>Old Pole</i>
PAGE.....	Polyacrylamidgelelektrophorese
ParB.....	Zellteilungsprotein, engl. <i>partitioning protein B</i>
PHB	Poly(3-Hydroxybuttersäure), Poly(3-Hydroxybutyrat)
PodJ.....	Pol-Lokalisationsfaktor, engl. <i>polar organelle development protein</i>
PolyP	Polyphosphat
PopZ	Pol-Organisationsprotein, engl. <i>polar organizing protein</i>
PPase	Pyrophosphatase
PPKs.....	Polyphosphatkinase
Ppt	PolyP assoziiertes Protein, engl. <i>polyP targeting protein</i>
PPX.....	Polyphosphatase
SDS	synthetisches, anionisches Detergens; Sodium-Dodecyl-Sulfate
t.....	Zeit, engl. <i>time</i>
TAE.....	Tris-Acetat-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TMHMM	Programm zur Vorhersage von Transmembranhelices, engl. <i>transmembrane prediction using hidden markov models</i>
TiP	Tumor-induzierendes Plasmid
UDP	Uridindiphosphat

UPX	UridinXphosphat, X steht entweder für 4 (tetra), 5 (penta), 6(hexa), 7 (hepta), 8 (octa), 9 (nona) oder 10 (deca)
UTP	Uridintriphosphat
VTC	vakuolärer Transportkomplex, engl. <i>Vacuolar Transport Complex</i>
UV	Ultraviolett
Wt.....	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
ZIC	zwitterionisch, engl. <i>zwitterionic</i>
Δ	Delta (Gendeletion)
μ	Mikro

Zusammenfassung

Polyphosphat (PolyP) besitzt eine ubiquitäre Verbreitung und erfüllt, je nach Organismus, unterschiedliche und extrem vielfältige Aufgaben. In Prokaryonten liegt PolyP in sogenannten Granula vor, während in einzelligen Eukaryonten, eine Membran das PolyP von dem Cytoplasma abtrennt. Vorangegangene Arbeiten weisen darauf hin, dass sogenannte Acidocalcisomen, eben jene membranumschlossene PolyP-Speicher aus Eukaryonten, auch in dem Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* vorhanden sein könnten. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass sich in *A. tumefaciens*, wie in Bakterien übliche, PolyP-Granula befinden, die nicht von einer Membran umschlossen sind. Im weiteren Verlauf wurde die Synthese von PolyP sowie die Lokalisation der Polyphosphatkinasen (PPKs) und anderer aus der Literatur bekannter, PolyP-assoziiierter Proteine untersucht. Die PPK1_{At} stellte sich hierbei als PolyP-Syntheseenzym heraus. Es folgte eine biochemische Charakterisierung der PPKs *in vitro*, bei der für die PPK2_{At}, neben der Bildung von NDP und NTP, eine oligophosphorylierende Funktion bis hin zu nonaphosphorylierten Nukleosiden entdeckt wurde. Außerdem stellte sich heraus, dass das PolyP-Granulum während des Zellzyklus wanderte und vielleicht durch die PPK1_{At} mit der DNA assoziiert sein könnte. Aufgrund dieser Erkenntnisse konnte ein Modell des PolyP-Granulums und den in dieser Arbeit identifizierten, assoziierten Proteinen erstellt werden. Eine Deletion der *ppk1* hatte zudem Auswirkungen auf die Zellmorphologie, die Infektionsrate von Pflanzenzellen und die Generationszeit von *A. tumefaciens*.

Abstract

Polyphosphate (polyP) is ubiquitously distributed and fulfills extremely various and different tasks among living organisms. In prokaryotes, polyP is stored in granules, whereas in unicellular eukaryotes, polyP is separated from the cytoplasm by membrane structures. Previous work showed that so called acidocalcisomes, those membrane enclosed polyP-storage structures from eukaryotes, could be present in the soil dwelling bacterium *Agrobacterium tumefaciens*. The present work shows that *A. tumefaciens* possesses ordinary polyP-granules, which are not surrounded by a membrane and therefore are usually found in bacteria. Furthermore, the synthesis of polyP, the localization of polyphosphate kinases (PPKs) and other polyP associated proteins, known from literature, were investigated. PPK1_{At} turned out to be the synthesis enzyme for polyP *in vivo*. This investigation was followed by the biochemical characterization of PPKs *in vitro*, which showed the PPK2_{At} synthesis ability for NDPs and NTPs and the oligo-phosphorylating function up to nona-phosphorylated nucleosides. Additionally, it turned out that the polyP-granule shows movement during cell cycle, probably by binding to the DNA via PPK1_{At}. Based on this research, a model of a polyP-granule together with the identified associated proteins could be created. Moreover, a deletion of *ppk1*_{At} had impact on cell morphology, infection rate of plant cells and generation time of *A. tumefaciens*.

Kapitel 1 Theoretischer Hintergrund und Zielsetzung

1.1 Vorkommen und Funktion von PolyP

Anorganisches Polyphosphat (PolyP) besitzt mit seiner linearen Polymerstruktur von zehn zu mehreren hundert Phosphatresten eine universelle Verbreitung. Generell kann zwischen zyklischen, linearen und verzweigten Polyphosphatketten unterschieden werden (Kulaev *et al.* 2005). Verknüpft durch energiereiche Phosphoanhydrit-Bindungen, dient es in Organismen als Energie- und Phosphatquelle oder fungiert durch seine unterstützenden Eigenschaften bei der Proteinfaltung als Chaperon (Gray *et al.*, 2014, Brown und Kornberg, 2004, Rao *et al.*, 2009). Des Weiteren spielt PolyP eine Rolle bei der Virulenz, Stressantwort, Regulation von Enzymaktivitäten, Genexpression, Blutkoagulation, Genregulation und Anpassung der Zellphysiologie an verschiedene Wachstumsphasen (Kornberg *et al.*, 1999, Rashid *et al.*, 2000, Mutch, 2019). PolyP wird entweder abiotisch zum Beispiel durch Vulkanismus oder biotisch durch die Aktivität der Polyphosphatkinasen (PPKs in Prokaryonten) und anderen Enzymen (in Eukaryonten) hergestellt. Paul Ernst 1888 und Victor Babes 1895 entdeckten erstmals unabhängig voneinander granuläre Strukturen in Bakterien, die sogenannten metachromatischen Granula. Die in der Literatur auch unter dem Namen Babes-Ernst Granula zu findenden Einschlusskörper (Durchmesser von 50-200 nm), wurden 1902 von Grimme durch Arbeiten mit *Spirillum volutans* ebenfalls entdeckt und als Volutinkugeln bezeichnet. Erst 50 Jahre später wurde das darin enthaltene PolyP identifiziert (Wiame *et al.*, 1947, Ebel, 1952). Durch seine Rolle im Zellmetabolismus und während der Plasmidaufnahme in *E. coli*, erlangte PolyP wieder an Bedeutung (Reusch und Sadoff, 1988, Kornberg *et al.*, 1956a).

Agrobacterium tumefaciens (*Rhizobium radiobacter*) C58 ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges Bodenbakterium und gehört zu der Alpha-Klasse der Proteobakterien. Seine Fähigkeit, Transfer- oder T-DNA durch das bakterielle Typ IV-Sekretionssystem in Pflanzenzellen zu übertragen, macht ihm zu einem

Modellorganismus und einem wichtigen Werkzeug in der Gentechnik. Bei einer natürlichen Infektion wird die T-DNA dabei in das pflanzliche Genom integriert und mit dessen Expression die Bildung von Tumoren ausgelöst. Die Genprodukte veranlassen die Pflanze außerdem dazu, Opine (*N*-Carboxyethyl-Aminosäuren) zu produzieren, die dem Bakterium als Nahrung dienen (Popelka und Altpeter, 2003, Cheng *et al.*, 1997). Jedoch besitzt *A. tumefaciens* eine überwiegend saprophytische Lebensweise außerhalb der Wirtspflanze (Schroth *et al.*, 1971). PolyP in *A. tumefaciens* wurde bisher kaum studiert, aber es konnte gezeigt werden, dass Phosphatlimitierung eine erhöhte Biofilmbildung und eine Veränderung der Lipidzusammensetzung der Zellmembran zu Folge hat (Danhorn *et al.*, 2004, Geske *et al.*, 2012).

1.2 Aufbau und Synthese nativer PolyP-Granula

In Prokaryonten wird die Synthese und Verwertung von PolyP durch Polyphosphatkinasen (PPKs) und Polyphosphatasen (PPXs) katalysiert. Die erste isolierte PPK aus *E. coli* wurde der Prototyp für die Typ-1 PPKs (PPK1) (Ahn und Kornberg, 1990). In *Pseudomonas aeruginosa* konnte dann eine weitere PPK vom Typ-2 identifiziert werden (Zhang *et al.*, 2002). Insgesamt wurden 7 PPKs (PPK1a, PPK1b, PPK2a, PPK2b PPK2c, PPK2d und PPK2c) in dem Betaproteobakterium *Ralstonia eutropha* H16 (*Cupriavidus necator*) gefunden (Tumlirsch und Jendrossek, 2017, Tumlirsch *et al.*, 2015). *Agrobacterium tumefaciens* besitzt hingegen nur zwei PPKs, PPK1 (atu1144) und PPK2 (atu0418) (Motomura *et al.*, 2014, Wood *et al.*, 2001).

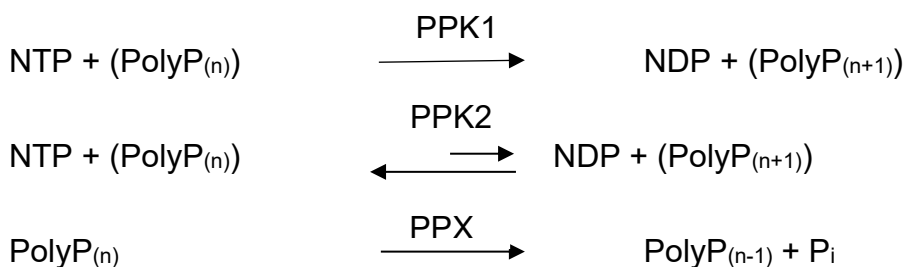


Abbildung 1: Bekannte Reaktion der PolyP Synthese und Degradierung des Biopolymers. Die Polyphosphatkinase (PPK1) synthetisiert PolyP aus NTPs. Die Polyphosphatkinase 2 (PPK2)

hingegen präferiert die Rückreaktion. Die Exopolyphosphatase 1 (PPX1) ist allein für den Abbau zuständig.

PolyP-Granula können von einer Vielzahl an Proteinen umgeben sein. Da in *A. tumefaciens* zu Beginn dieser Arbeit noch keine Informationen über das in den Zellen gespeicherte PolyP vorliegt, dient das Model von *R. eutropha* hier als Beispiel (Abbildung 2). Unter anderem können neben Polyphosphatkinasen auch Polyphosphat assoziierte Proteine (Ppts, *polyP targeting proteins*) an das PolyP-Granulum gebunden sein. Ppts besitzen entweder eine CYTH (CyaB (*bacterial class IV adenylyl cyclases*) and *mammalian thiamine triphosphatase*) Domäne, und/oder ein CHAD (*conserved histidine α -helical domain*) Motiv (Tumlirsch und Jendrossek, 2017, Lorenzo-Orts et al., 2019). Erstere gibt einen Hinweis auf eine Verbindung zu Phosphat- und Nukleotidstoffwechsel, während Letzteres, basierend auf dem hohen Gehalt an Histidin in der Aminosäuresequenz, zweiwertige Metallionen bindet, wie sie im Allgemeinen als Komplexbildner im PolyP-Granulum vorkommen (Iyer und Aravind, 2002). Im Gegensatz zu PptB (B1017), besitzt PptA (A0104) nur ein CHAD Motiv und keine CYTH Domäne, jedoch steht dieses Polyphosphat assoziierte Protein in Verbindung mit der Glutaminsynthetase (Gln) und damit zum Stickstoff-Stoffwechsel. Falls es sich in *A. tumefaciens* um PolyP-Granula handelt, wie sie für gewöhnlich in Bakterien zu finden sind, könnten ähnliche Proteine mit dem PolyP in direkter oder indirekter Verbindung stehen.

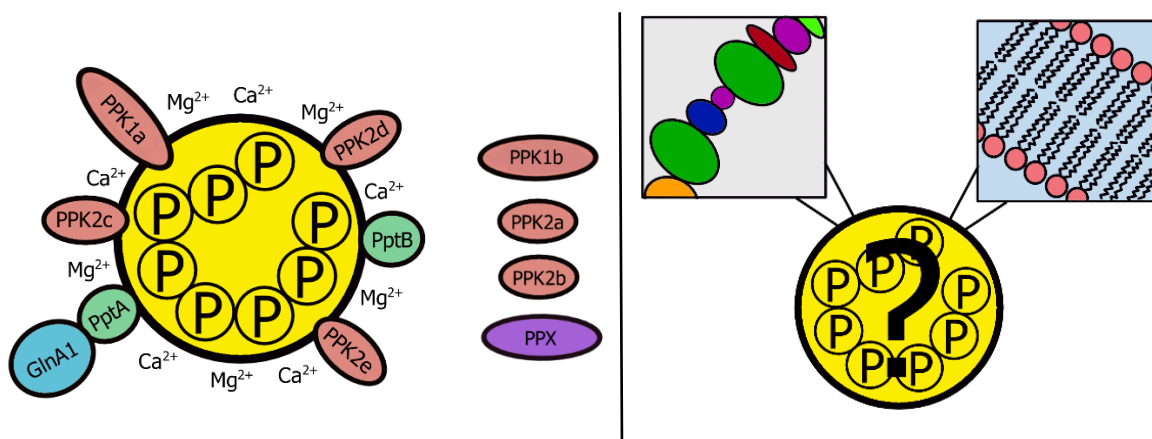


Abbildung 2: Model eines PolyP Granulums von *R. eutropha* (links) im Vergleich zu dem Wissensstand über den PolyP-Speicher in *A. tumefaciens* (rechts). Während für *R. eutropha* bereits mehrere Proteine identifiziert werden konnten, die direkt an das Granulum gebunden oder

indirekt an der PolyP-Synthese und dem Abbau beteiligt sind, ist zu Beginn dieser Arbeit noch nichts über das PolyP in *A. tumefaciens* bekannt. Es ist nicht sicher, ob es entweder mit einer Proteinschicht oder von einer Lipidmembran umgeben ist. Für *R. eutropha* wurden bereits einige Proteine identifiziert, die entweder direkt mit dem PolyP-Granulum assoziiert sind (PPK1a, PPK2c, PPK2d, PPK2e, GlnA1, PptA und PptB) oder löslich (PPK1b, PPK2a, PPK2b und PPX) vorliegen (Tumlirsch und Jendrossek, 2017, Tumlirsch et al., 2015)

1.3 Aufbau und Struktur von Acidocalcisomen

In einigen eukaryotischen Zellen, wie in menschlichen Blutplättchen, der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, oder dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* werden PolyP-Speicher von einer Membran umgeben und aufgrund ihrer sauren, Vakuole-ähnlichen Strukturen, sowie ihrem hohen Anteil an Metallionen (im besonderen Calcium), Acidocalcisomen genannt. Das mit Lysosomen verwandte Organell wurde erstmals in *Trypanosoma brucei*, dem Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit, nachgewiesen und benannt (Vercesi et al., 1994, Docampo et al., 1995). Seitdem wurde gezeigt, dass Acidocalcisomen von Einzellern bis zum Menschen weit verbreitet sind (Docampo und Moreno, 1999, Moreno und Docampo, 2009, Morrissey et al., 2012, Huang et al., 2014, Huang et al., 2011). Umgeben von einer 6-8 nm dicken Membran-Doppelschicht und verschiedenen membrangebundenen Proteinen, speichern Acidocalcisomen neben Kationen und PolyP auch Pyrophosphat (Diphosphat) (Soares Medeiros et al., 2005, Docampo et al., 2005). Eine Vielzahl an Transportern, wie Kationentransporter, Kationenaustauscher, Polyamintransporter und Phosphattransporter sitzen eingebettet in der Membran dieses intrazellulären Organells (Abbildung 3) (Huang und Docampo, 2015, Huang et al., 2011, Huang et al., 2014). Ebenfalls dort zu finden ist der Adapterprotein (AP)-3-Komplex, der unter anderem als wichtiger Vermittler des Vesikeltransports von Membranproteinen zwischen zellulären Kompartimenten wie Golgi Komplex, Endosomen, Lysosomen, und Plasmamembranen fungiert (Boehm und Bonifacino, 2002). Der vakuoläre Transportkomplex (VTC-Komplex) arbeitet in der Acidocalcisomenmembran als endogene vakuoläre PolyP-Polymerase (Hothorn et al., 2009, Rooney et al., 2011). Charakteristisch ist die Gegenwart von membranständigen vakuolären Protonen-Pyrophosphatasen (V-H⁺-PPasen, HppA) und/oder vakuolären Protonen-ATPasen (V-H⁺-ATPasen), die 1986 erstmals in Pflanzen-Vakuolen lokalisiert wurden

(Docampo und Moreno, 1999, Docampo *et al.*, 1995, Luo *et al.*, 2004, Marchesini *et al.*, 2002, Rea und Poole, 1986).

In Prokaryoten fehlte lange der Beweis einer Membran um PolyP speichernde Strukturen. Jedoch wurde 2003 die mögliche Anwesenheit von Acidocalcisomen in *A. tumefaciens* und *Rhodospirillum rubrum* nachgewiesen (Seufferheld *et al.*, 2004, Seufferheld *et al.*, 2003). Des Weiteren zeigten diese Veröffentlichungen die Lokalisation jener V-H⁺-PPase, die bereits in Eukaryonten als Marker für Acidocalcisomen diene. Das durch Immunfluoreszenz markierte Protein bildete Foki an den Polen der Bakterienzellen, jedoch wurde keine direkte Überlagerung mit dem Fluoreszenzkanal des mit DAPI gefärbten PolyPs gezeigt.

Während die Membranen von seltenen intrazellulären Strukturen wie Anammoxosomen von anammoxen (anaerob Ammonium oxidierenden) Bakterien durch leiterförmige Ketten (mit Cyclobutan-Ringen) aus Kohlenstoff-Ringen (Ladderane) aufgebaut sind, sollen Acidocalcisomen, wie Magnetosomen (*Magnetospirillum gryphiswaldense*) von einer Phospholipid-Doppelschicht umgeben sein (Sinninghe Damsté *et al.*, 2002, Lefèvre *et al.*, 2011). Das Acidocalcisom könnte somit das erste Zellorganell sein, das sowohl in prokaryotischen, wie auch in allen eukaryotischen Organismen zu finden ist.

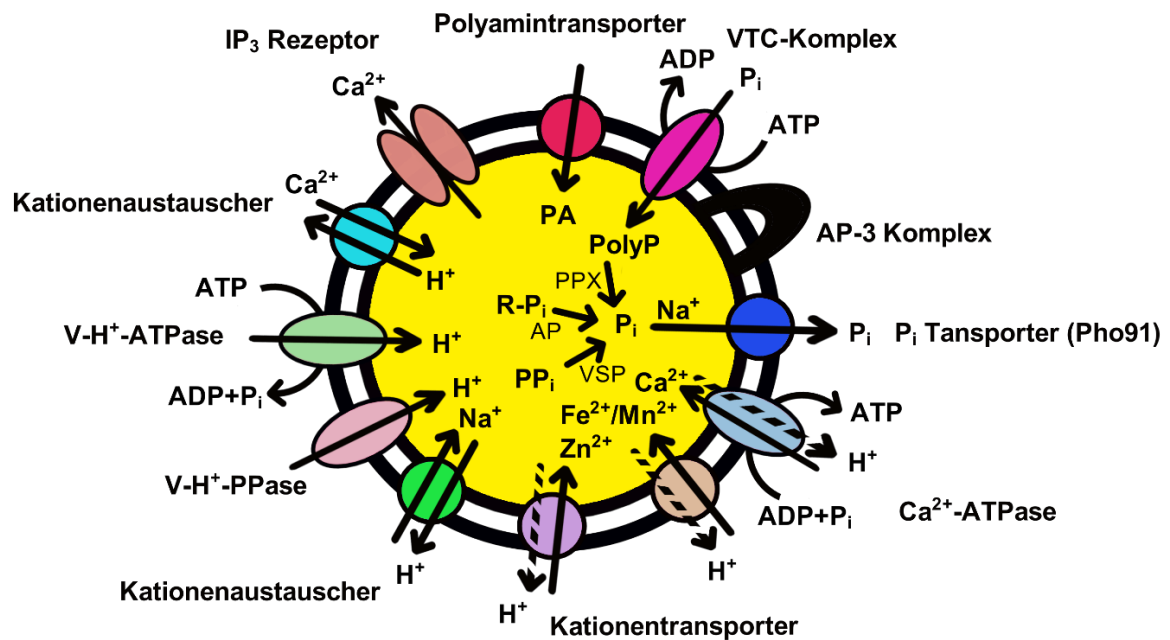


Abbildung 3: Modell eines Acidocalcisoms von *Trypanosoma brucei* (in Anlehnung an Huang et al. 2014). In der Doppelmembran sitzt eine Vielzahl an Kationentransporter, Kationenaustauscher, der vakuoläre Transportkomplex (VTC-Komplex), Phosphattransporter, Inositolpyrophosphat (IP3)-Rezeptoren, Polyamintransporter, Phyrophosphatasen (PPase), ATPasen und der Adaptorprotein (AP)-3-Komplex. Im Inneren des Acidocalcisoms befinden sich die saure Phosphatase (acid phosphatase, AP), die Polyphosphatase (PPX) und die Vakuolen-lösliche Pyrophosphatase (vacuolar soluble pyrophosphatase, VSP) (Huang et al., 2011, Huang und Docampo, 2015, Luo et al., 2004, Vercesi et al., 1994, Cordeiro et al., 2017).

1.4 Zielsetzung

Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass PolyP in Form von Acidocalcisomen in *A. tumefaciens* gespeichert sein könnte. Daher soll in Kapitel 1 dieser Arbeit ebenfalls ein Beweis oder eine Entkräftung dieser Ergebnisse erbracht werden, um zu zeigen, ob PolyP tatsächlich von granulären Proteinen umgeben ist oder sich eine (Doppel)-Lipidschicht darum befinden und es sich daher per Definition um ein Acidocalcisom handelt. Mikroskopische Aufnahmen in Kombination mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, um PolyP und intrazelluläre Organellen anzufärben, sowie Lokalisationsstudien von Acidocalcisom-assoziierten Proteinen sollen hierbei Aufschluss geben. Ebenfalls soll der Versuch, Acidocalcisomen aus *A. tumefaciens* zu isolieren, einen weiteren Einblick auf das Vorhandensein einer Phospholipidschicht liefern. Da ebenfalls noch keine Erkenntnisse über die PPKs in *A. tumefaciens* vorliegen, wird die Aktivität und Spezifität dieser Enzyme *in vivo* und *in vitro* studiert. Einen weiteren Einblick hierzu sollen Lokalisationsstudien mit fluoreszenzmarkierten PPKs liefern. Die Ergebnisse hierzu sind in Kapitel 2 zu finden. Des Weiteren wird in Kapitel 3 mehr auf den zellbiologischen Aspekt der PolyP-Lokalisation eingegangen. Hierzu werden Videoaufnahmen von sich teilenden Zellen analysiert, um herauszufinden, wie sich die Position des PolyP-Granulums während dieses physiologischen Vorgangs verändert. Außerdem ist festzustellen, wie das PolyP-Granulum in der Zelle verankert ist und wie diese Verankerung Einfluss auf die Lokalisation in der Zelle hat.

Zusammenfassend soll die folgende Arbeit die Natur der Hüllschicht um PolyP in *A. tumefaciens* aufdecken und weitere Einblicke in die Synthese, Eigenschaften und Verbreitung der Acidocalcisomen oder gegebenenfalls der PolyP-Granula eröffnen.

Kapitel 2 Acidocalcisomen und PolyP-Granula sind unterschiedliche subzelluläre Strukturen in *Agrobacterium tumefaciens*

Eine Zielsetzung dieser Arbeit ist der Nachweis von Acidocalcisomen in *A. tumefaciens* durch fluoreszenzmikroskopische Methoden sowie durch die Isolierung dieser sauren Organellen durch Dichtegradientenzentrifugation (Frank und Jendrossek, 2020). Um zunächst einmal die Lokalisation des intrazellulären Organells zu bestimmen, wurde die Position der vakuolären H⁺-Pyrophosphatase (*atu1174*) mittels Fluoreszenzmarkierung des Proteins in der Bakterienzelle bestimmt. Zusätzlich kam es zum Einsatz unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe, um entweder die Phospholipidschicht des Acidocalcisoms oder das saure Milieu im Innern des Organells anzufärben. Diese fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit der Position der mit DAPI gefärbten PolyP-Ganula und der fluoreszenzmarkierten Polyphosphatkinasen verglichen. Des Weiteren konnte durch die Deletion der beiden Kinasegene *ppk1* und *ppk2* eine Mutante erstellt werden, die nicht dazu in der Lage ist, PolyP herzustellen. Dieser Stamm wurde ebenfalls auf die Existenz von Acidocalcisomen hin untersucht.

2.1 Färbeprinzip der Fluoreszenzfarbstoffen

2.1.1 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

DAPI lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in der DNA an. Das Absorptionsmaximum bei doppelsträngiger DNA liegt bei einer Wellenlänge von 358 nm (ultraviolett) und das Emissionsmaximum bei 461 nm (blau). Der Farbstoff kann auch an RNA binden. Jedoch ist die Fluoreszenz hier weniger stark und liegt bei 500 nm (Tanious *et al.*, 1992). Aufgrund seiner DNA-interkalierenden Eigenschaft, wird DAPI als zelltoxisch deklariert. Die Bindung an die ebenfalls negativ geladene PolyP-Kette, führt durch einen bathochromatischen Shift zu einer Emission von 525-550 nm (gelb-grün) (Allan und Miller, 1980). Die DAPI-PolyP Interaktion zeigt sich als sehr

spezifisch und entwickelte sich zu einer etablierten Methode, um PolyP in pro- und eukaryotischen Zellen fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen (Ramos *et al.*, 2010, Marchesini *et al.*, 2002, Ruiz *et al.*, 2001, Tumlirsch *et al.*, 2015).

2.1.2 LysoSensor™ Green DND-189

LysoSensor-Farbstoffe sind nicht toxische fluoreszierende pH-Indikatoren, die sich aufgrund ihrer acidotrophischen Eigenschaft in sauren Organellen anlagern (Lin *et al.*, 2001). Durch Protonierung der schwach basischen Seitenkette werden diese fluoreszent. Außerdem besitzen die LysoSensor-Farbstoffe einen pH abhängigen Anstieg der Fluoreszenzintensität bei Ansäuerung.

2.1.3 MitoTracker™ Red FM

MitoTracker ist ein nicht toxischer Farbstoff der sich in lebenden Zellen, durch Nutzung des mitochondrialen Membranpotenzials, in Mitochondrien anlagert. Nach Eintritt in die Zelle wird MitoTracker oxidiert und emittiert Licht bei 644 nm (rot), bei einer Absorption von 581 nm (gelb). Des Weiteren ist der Farbstoff chemisch reaktiv und bindet in Mitochondrien an Thiol-Gruppen (Chazotte, 2011).

2.1.4 Nilrot

Nilrot, auch als Nilblau-Oxazon bezeichnet, ist ein lipophiler, nicht toxischer, fluoreszierender Phenoxazin-Farbstoff und hat ein Emissionsmaximum bei etwa 650 nm (rot), anhängig vom Lösungsmittel. Die Fluoreszenz ist ebenfalls abhängig von der Hydrophobie der Lipide (Greenspan *et al.*, 1985, Tajalli *et al.*, 2008). Nilrot färbt in Zellen PHB-Granula an, die jedoch nicht von einer Lipidschicht umgeben sind (Bresan *et al.*, 2016, Spiekermann *et al.*, 1999, Maslov *et al.*, 2018).

2.1.5 FM1-43 und FM4-64

FM-Farbstoffe werden zur Färbung von Membranen genutzt und zeigen eine Präferenz für die innere Zellmembran (Fishov und Woldringh, 1999). Durch ihre lipophile Eigenschaft tauchen die Fluoreszenzmoleküle in die Membran ein, können

diese aber durch ihre kationische Kopfgruppe nicht durchqueren. In *A. tumefaciens* bildet sich durch das unipolare Wachstum eine sogenannte Hufeisenfärbung aus: Der alte Pol wird hierbei stärker eingefärbt, als der neue Zellpol (Zupan *et al.*, 2013).

2.2 Isolierung von Acidocalcisomen in *A. tumefaciens*

Um zunächst einmal die Existenz der Acidocalcisomen visuell zu überprüfen, wurden *A. tumefaciens* Zellen mit LysoSensor Green DND-189 gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Da das zu untersuchende Zellorganell einen niedrigen pH besitzt, kann es durch Fluoreszenzfarbstoffe wie LysoSensor angefärbt werden. So zeigt dieser Farbstoff durch die protonierte Form unter sauren Bedingungen eine starke Fluoreszenz, wohingegen unter neutralen pH Bedingungen nur eine geringe Fluoreszenz abgegeben wird. Überraschenderweise färbte dieser Farbstoff die Zellmembran von *A. tumefaciens*, jedoch keine intrazellulären Strukturen an (Abb. 4A). Um die Anwesenheit von PolyP zu testen, wurden Bakterienzellen aus unterschiedlichen Wachstumsphasen mit DAPI gefärbt und ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Oft besaßen die *A. tumefaciens* Zellen einen DAPI-PolyP Fokus an einem Zellpol, manchmal auch an beiden und selten noch einen dritten oder vierten, lokalisiert in der Zellmitte (Abbildung 4B). Eine statistische Auswertung der Position der DAPI-PolyP Foki wurde mit dem Analyseprogramm BakStalk® durchgeführt (Hartmann *et al.*, 2018). Das Demogramm in Abbildung 4C zeigt die Ergebnisse dieser Analyse. Die überwiegende Mehrheit der Zellen einer mit DAPI gefärbten Kultur von *A. tumefaciens* besaßen das DAPI-PolyP Fluoreszenzsignal am oder in nächster Nähe zum Zellpol. Eine Messung des PolyP-Gehalts in den Zellen über einen Zeitraum von 48 h ergab zusätzlich ein deutlicheres Bild, ab wann *A. tumefaciens* PolyP synthetisiert (exponentielle Phase), wann es ein stabiles Level erreicht hat (frühe stationäre Phase) und ab wann das Bakterium das aufgebaute PolyP wieder konsumiert (späte stationäre Phase) (Abbildung 4D). Zellen mit deutlicher DAPI-PolyP Färbung und einem hohen intrazellulären PolyP-Gehalt stammen aus der frühen stationären Phase (24 h nach dem Animpfen) und wurden für die Isolierung der Acidocalcisomen nach Seufferheld *et al.* 2004 ausgewählt. Es folgte die Ernte von *A. tumefaciens* zum beschriebenen Zeitpunkt, sowie der Zellaufschluss durch *French press* und entsprechender Enzymbehandlung. Nach der Dichtegradientenzentrifugation (Iodixanol-Gradient) wurde die Probenentnahme aus den aufgetrennten Iodixanol-Phasen für die mikroskopische Analyse sowie für die quantitative Bestimmung der PolyP Konzentration durchgeführt. Letzteres konnte wie bereits zuvor, durch die

Methode der Chloroform/Phenol Aufreinigung und Ethanol-fällung erfolgreich isoliert und nach Hydrolyse zu P_i durch die Exopolyphosphatase von *Saccharomyces cerevisiae* (ScPPX) durch den kolorimetrischen Malachit-grün Assay, die Konzentration in den Proben bestimmt werden. In beiden Fällen war es nicht möglich, eine Anreicherung von PolyP in einer bestimmten Dichtegradientenfraction nachzuweisen (Abbildung 5). Vielmehr wurde in allen Phasen die Gegenwart von PolyP ermittelt. Auch der Versuch, Acidocalcisomen aus einer Mutante mit chromosomal verankerter *eyfp-hppA* Fusion durch die Gradientenzentrifugation in einer Phase anzureichern, schlug fehl. Unter dem Gesichtspunkt, dass die Organellen zu labil sein könnten, um sie erfolgreich zu isolieren, wurde die Entscheidung getroffen, Acidocalcisomen fluoreszenzmikroskopisch in lebenden Zellen zu charakterisieren (siehe 2.3 bis 2.6).

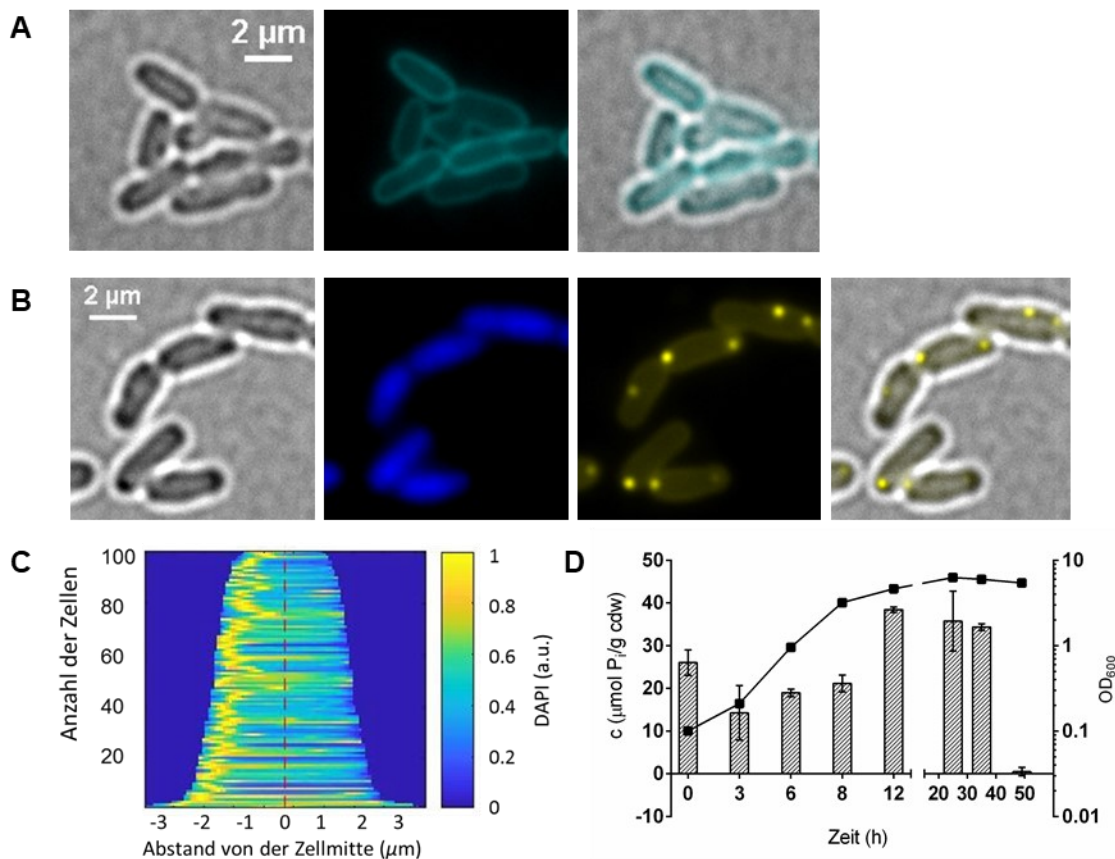


Abbildung 4: Bildung von PolyP in *A. tumefaciens*. (A) Bakterienzellen aus dem exponentiellen Wachstum wurden mit 10 µM LysoSensor Green DND-189 gefärbt (Mitte) und anschließend mit einem CFP-Filter analysiert. Das zusammengeführte Bild (rechts) zeigt eine Überlagerung aus dem CFP- und dem Durchlichtkanal. (B) Zellen aus LB-Kultur wurden in der exponentiellen Phase ihres Wachstums mit 0.5 µg/ml DAPI gefärbt und mikroskopisch im Durchlicht (erstes von links) und fluoreszenzmikroskopisch mit einem DNA-DAPI spezifischen (zweites von links) oder DAPI-PolyP spezifischen (zweites von rechts) Filter untersucht. Das Demogramm (C) zeigt die Lokalisierung der

2.2 Isolierung von Acidocalcisomen in *A. tumefaciens*

DAPI-PolyP Fluoreszenz abhängig von der Zelllänge. Die Intensität der DAPI-Fluoreszenz wird in a. u. ((relative) arbiträre Einheit, *arbitrary units*) dargestellt. (D) Das Wachstum (OD_{600}) und die Menge an intrazellulären PolyP in LB-Medium (gemessen als die gesamte Menge an inorganischem Phosphat in μmol pro Zelltrockengewicht (cdw, *cell dry weight*)) wurden innerhalb verschiedener Wachstumsphasen bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen mit drei technischen Replikaten. Die Standardabweichung der OD-Werte sind zu klein, um sie sichtbar darzustellen.

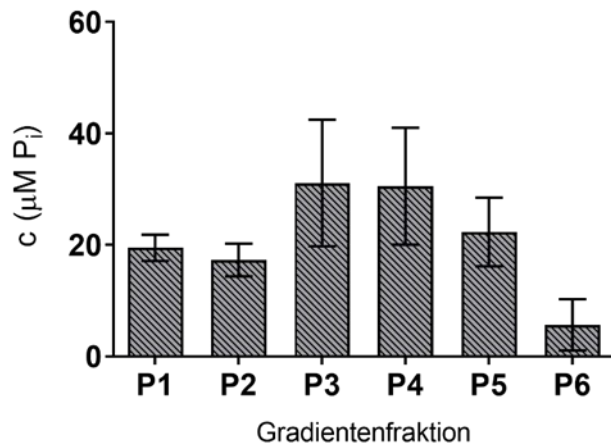


Abbildung 5: Quantifizierung von PolyP in unterschiedlichen Iodixanol-Gradienten nach der Ultrazentrifugation. Das isolierte PolyP wurde mit der Exopolyphosphatase von *Saccharomyces cerevisiae* (ScPPX) verdaut und die Konzentration des freigesetzten Monophosphats (c ($\mu\text{M P}_i$)) mit dem Malachit-grün Assay bestimmt. In allen Fraktionen befand sich PolyP, das nicht bei einer bestimmten Dichte des Gradienten angereichert werden konnte. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei technischen Replikaten.

2.3 Nachweis von Acidocalcisomen durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe

Um herauszufinden, unter welchen Bedingungen und in welcher Wachstumsphase *A. tumefaciens* Acidocalcisomen bildet, wurden alle 3 h Proben aus einer Kultur gezogen und der Gehalt an PolyP bestimmt. Wie schon bei der Färbung mit DAPI, zeigte sich der höchste Gehalt an PolyP in den Zellen in der frühen stationären Phase (Abbildung 4D). Außerdem lässt sich anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sehen, dass die dunklen PolyP-Granula im Durchlicht, bzw. die DAPI-PolyP Foki im entsprechenden Fluoreszenzkanal am häufigsten an den Zellpolen oder in der Nähe der Zellmembran zu finden sind. Da dies nahelegt, dass Acidocalcisomen durch einen Invaginationsprozess der inneren Zellmembran gebildet werden könnten, wurde *A. tumefaciens* bis zu 72 h mit dem Farbstoff FM1-43 oder FM4-64 kultiviert. Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und mit und ohne DAPI-Färbung mikroskopiert. Es konnte zu keinem einzigen Zeitpunkt eine mit FM angefärbte, intrazelluläre Struktur gesehen werden. Die DAPI-Färbung hingegen, zeigte die gewohnten Fluoreszenzfoki von DAPI-PolyP an den Zellpolen (Abbildung 6A). Auch das Färben mit LysoSensor green DND-189 und FM1-43 zeigte eine klare Färbung der Zytoplasmamembran, aber nicht für intrazelluläre Strukturen innerhalb der Zelle (Abbildung 6B). Damit konnte ausgeschlossen werden, dass sich Acidocalcisomen in *A. tumefaciens* durch ein Einstülpen und Abschnüren der inneren Zellmembranen bilden, wie es zum Beispiel bei der Synthese der Magnetosomen in magnetotaktischen Bakterien der Fall ist (Uebe und Schüler, 2016). Gemeinsam mit anderen membranumschlossenen Kompartimenten wie Mitochondrien in eukaryotischen Zellen oder hydrophoben Verbindungen wie PHB, können diese hydrophoben Strukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt werden. Nilrot und MitoTracker sind solche Verbindungen, die häufig für das Anfärben hydrophober Strukturen (PHB und Lipide) und Kompartimente mit elektrochemischem Potenzial, in pro- und eukaryotischen Zellen benutzt werden. Mikroskopische Aufnahmen von *A. tumefaciens* zeigten im Durchlicht dunkle, runde Strukturen, die oft deckungsgleich mit DAPI-PolyP Foki waren. Durch eine Anfärbung mit Nilrot oder MitoTracker Red kam es ebenfalls zur Bildung von Fluoreszenzfoki an den Zellpolen, jedoch zeigte die Überlagerung mit

2.3 Nachweis von Acidocalcisomen durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe

dem DAPI-PolyP Kanal keine Colokalisation mit den durch DAPI angefärbten PolyP-Granula. Um auszuschließen, dass es sich bei den mit Nilrot angefärbten Strukturen um PHB-Granula handelte, wurde durch eine gaschromatographische Analyse der PHB-Gehalt von *A. tumefaciens* Wt und einer PHB-Synthase-Deletionsmutante ($\Delta atu1604$) zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Komplexmedium (LB) bestimmt. In keine der Proben konnte PHB nachgewiesen werden (siehe Anhang Publikation [1], *Suppl. materials, figure 4*). Der Deletionsstamm *A. tumefaciens* $\Delta atu1604$ wurde ebenfalls mit Nilrot angefärbt und zeigte die gleichen angefärbten Strukturen wie der Wt-Stamm. Ein ähnliches Ergebnis erzielte das Färben des Deletionsstamms $\Delta ppk1 \Delta ppk2$, der keine Polyphosphatkinasen mehr besitzt und somit nicht mehr dazu fähig ist, PolyP herzustellen. MitoTracker Red färbte hier, ebenfalls bei Abwesenheit von PolyP, Strukturen innerhalb der Zelle, in Form von fluoreszierenden, runden Foki an. Oft waren diese Strukturen ebenfalls in der Nähe des Zellpols lokalisiert (siehe Anhang Publikation [1], *figure 4*). Somit konnte gezeigt werden, dass die angefärbten intrazellulären Strukturen mit den Fluoreszenzfarbstoffen MitoTracker oder Nilrot kein PolyP enthalten und damit keine Acidocalcisomen sind. Ebenso konnte keine Lipidschicht, um die mit DAPI angefärbten PolyP-Granula, mit diesen Farbstoffen sichtbar gemacht werden. Um was es sich bei den angefärbten Strukturen mit Nilrot und MitoTracker handelt, bleibt unklar.

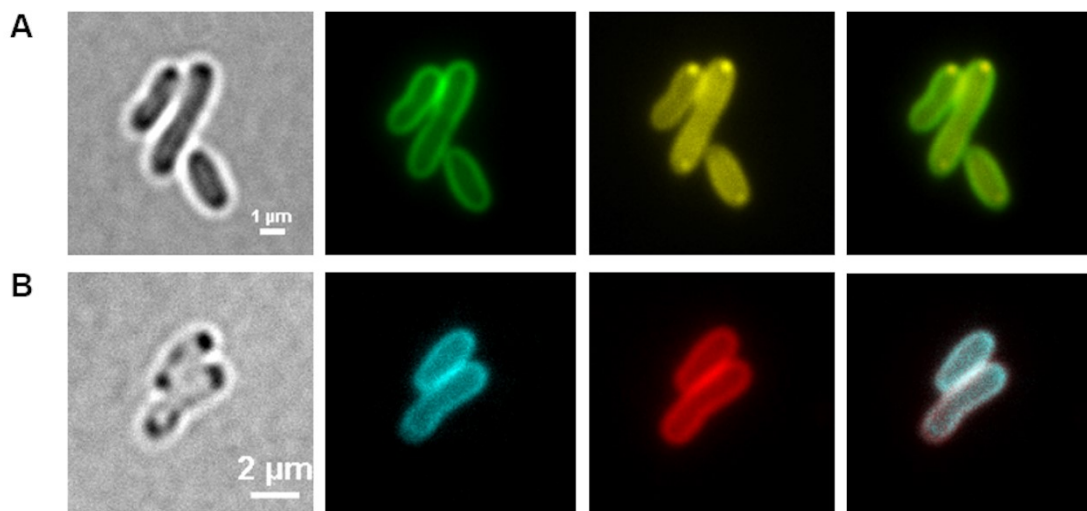


Abbildung 6: Färbung von *A. tumefaciens* mit FM1-43 und DAPI nach 24 h (A) und FM4-64 und LysoSensor green DND-189 nach 48 h (B). (A) Zellen wurden zusammen mit 0,1 µg/ml FM1-43 in LB Medium kultiviert. Proben zur Mikroskopie wurden nach 0, 2, 4, 6, 24, 32, 48, 52, und 72 h nach dem Animpfen gezogen und mit 0,5 µg/ml DAPI gefärbt. Die Abbildungen (von links nach rechts) zeigen Zellen der Durchlichtmikroskopie oder mit Fluoreszenzmikroskopie, mit einem FM1-43 oder DAPI-PolyP spezifischen Filterset. Eine Überlagerung der beiden Kanäle grün und gelb ist ebenfalls

2.3 Nachweis von Acidocalcisomen durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe

dargestellt (erstes von rechts). Das gleiche Ergebnis wurde mit dem Farbstoff FM4-64 erzielt (hier nicht gezeigt), bei dem ein FM4-64-spezifischer Filter genutzt wurde. **(B)** *A. tumefaciens* Wildtypzellen wurden mit 1 μ M Lysosensor green DND-189 und 0,1 μ g/ml FM4-64 gefärbt und mit einem FM4-64-spezifischen oder Lysosensor green-spezifischen Filter analysiert. Alle Experimente wurden mit drei biologischen Replikaten durchgeführt. Es werden nicht alle, sondern nur eine Auswahl an typischen Ergebnissen gezeigt.

2.4 Lokalisierung der Acidocalcisomenmembran durch Phospholipid-bindende Proteine

Da der Nachweis von Acidocalcisomen durch Fluoreszenzfarbstoffe bisher erfolglos blieb, wurde versucht, die Membran dieses intrazellulären Organells durch die Bindung phospholipid-spezifischer Proteine zu detektieren. Die C2-Domäne des Bovin-Lactadherin-Proteins (LactC2) ist in der Lage, an Phosphatidylserine und ähnlichen Membranphospholipiden zu binden (Andersen *et al.*, 1997, Andersen *et al.*, 2000, Del Vecchio und Stahelin, 2018, Yeung *et al.*, 2008). Außerdem zeigte die Veröffentlichung aus der eigenen Arbeitsgruppe (Bresan *et al.*, 2016), dass LactC2 gebunden an ein Fluoreszenzprotein (dsRed2EC-LactC2) dazu in der Lage war, an die Magnetosomenmembran in *Magnetosphaerillum gryphiswaldense* zu binden und diese somit fluoreszenzmikroskopisch zu visualisieren. Da dsRed2EC-LactC2 möglicherweise auch an die Acidocalcisomenmembran in *A. tumefaciens* binden könnte, wurde der Stamm *A. tumefaciens* pBBR1MCS2-*P_{phaC}-dsred2EC-lactC2* erstellt. Das überexprimierte dsRed2EC-LactC2 bildete in der Zelle kappenähnliche Fluoreszenzfoki an den Polen, aber colokalisierte nicht mit gefärbten DAPI-PolyP-Granula (Abbildung 7). Somit konnte kein Hinweis auf die Existenz einer Phospholipidschicht um die mit DAPI anfärbbaren PolyP-Granula erhalten werden. Ob es sich bei der Akkumulierung von dsRed2EC-LactC2 am Zellpol um eine Artefaktbildung handelte oder andere intrazelluläre Strukturen in *A. tumefaciens* angefärbt wurden, bleibt unklar.

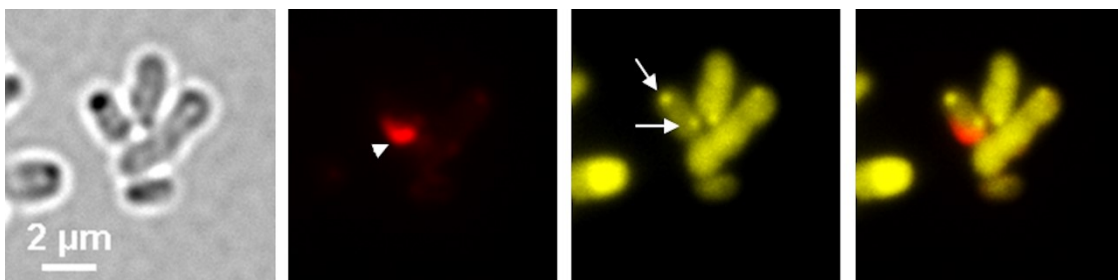


Abbildung 7: *A. tumefaciens* Zellen transformiert mit dem pBBR1MCS2-*P_{phaC}-dsred2EC-lactC2* Plasmid nach einer Kultivierung von 24 h in LB-Medium. Von links nach rechts: Durchlicht, dsRed-Fluoreszenzkanal, DAPI-PolyP Fluoreszenzkanal und Überlagerungsbild beider Fluoreszenzkanäle. Das dsRed2EC-LactC2 Protein bildete ein kappenförmiges Fluoreszenzsignal am Zellpol (Pfeilkopf).

2.4 Lokalisierung der Acidocalcisomenmembran durch Phospholipid-bindende Proteine

Im Vergleich dazu zeigten sich DAPI-PolyP spezifische Foki an beiden Polen (Pfeile). Bei einer Überlagerung der beiden Kanäle zeigte sich keine Colokalisation. Das Experiment wurde mit drei biologischen Replikaten durchgeführt. Ein typisches Ergebnis wird hier gezeigt.

2.5 Lokalisierung der Acidocalcisomen-spezifischen, vakuolären H⁺-transportierenden Pyrophosphatase HppA_{At}

Die vakuoläre H⁺-transportierende Pyrophosphatase (HppA) ist ein charakteristisches Enzym in der Membran von Acidocalcisomen und säuert das Organell an (Huang und Docampo, 2015, Seufferheld *et al.*, 2011, Ruiz *et al.*, 2001, Seufferheld *et al.*, 2004). Das Genom von *A. tumefaciens* enthält ebenfalls ein *hppA*-Gen (*atu1174*), das von dem genomischen Kontext ausgehend, einzeln transkribiert wird. Die Aminosäuresequenz des HppA-Proteins von *A. tumefaciens* zeigt zudem Sequenzähnlichkeiten zu HppA-Proteinen anderer Spezies. So ergab eine BLAST-Analyse eine Identität von 37% mit der HppA von *Trypanosoma cruzi* und eine von 42% mit der HppA von *Arabidopsis thaliana*. In beiden Spezies sitzt das Enzym in intrazellulären Membranstrukturen und ist zuständig für die Aufrechterhaltung eines niedrigen pHs in diesem Organell. Daher wurde angenommen, dass die HppA_{At} in *A. tumefaciens* einer ähnlichen Aufgabe nachgehen könnte. Eine Analyse der voraussagbaren Aminosäuresequenzen der HppA (712 Aminosäuren) mit dem TMHMM Server v. 2.0 (DTU *Bioinformatics*) prognostizierte, dass das 72.5 kDa Protein, ähnlich zu anderen HppAs, 16 Transmembranhelices ausbildet. Daraus lässt sich vermuten, dass das 72.5 kDa HppA-Protein, ähnlich zu der HppA anderer Spezies, in der Membran verankert ist und indirekt die Lokalisierung des Acidocalcisoms angeben kann. Hierfür wurde das Gen der HppA_{At} mit *eyfp* nach der ersten Transmembrandomäne fusioniert und auf dem pBBR1MCS2-Vektorplasmid in *A. tumefaciens* Zellen überexprimiert. Neben der Colokalisation mit der Zellmembran, konnten eYFP-HppA Fluoreszenzfoki an einem Pol der Bakterienzelle beobachtet werden. Eine Färbung dieser Zellen mit DAPI zeigte jedoch keine Überlagerung mit den DAPI-PolyP Foki. Beide Fluoreszenzsignale sind nah nebeneinander, jedoch bei näherer Betrachtung als unterschiedliche Punkte zu identifizieren (Abbildung 9B oben). Auch konnten die Fluoreszenzfoki von eYFP-HppA_{At} und DAPI-PolyP an sich gegenüberliegenden Polen lokalisiert sein (Abbildung 9B unten). Das gleiche Konstrukt in der Deletionsmutante $\Delta ppk1 \Delta ppk2$ zeigte trotz Abwesenheit von DAPI-PolyP

Foki

2.5 Lokalisierung der Acidocalcisomen-spezifischen, vakuolären H⁺-transportierenden Pyrophosphatase HppA_{At}

dieselbe eYFP-HppA_{At} Fluoreszenz wie im Wt. Dies suggeriert, dass die Bildung der eYFP-HppA_{At} Foki unabhängig von der An- oder Abwesenheit von PolyP erfolgte. Um auszuschließen, dass es sich bei der Bildung der eYFP-HppA_{At} Fluoreszenz um eine Artefaktbildung aufgrund der plasmidcodierten Überexpression handelte, wurde ein *A. tumefaciens*-Stamm mit chromosomal integrierter *eyfp-hppA_{At}* erstellt, die das natürliche *hppA_{At}* im Genom ersetzte. Diese Zellen zeigten in der exponentiellen Phase nur eine äußerst schwache Fluoreszenz und bildeten erst in der stationären Phase (24-48 h) Fluoreszenzfoki meistens an einem der Zellpole aus. Zu dieser Wachstumsphase befand sich jedoch fast kein mit DAPI anfärbbares PolyP mehr in den Zellen. Konnte in seltenen Fällen doch ein schwacher DAPI-PolyP Fluoreszenzfokus gefunden werden, überlagerte dieser nicht mit den eYFP-HppA_{At} Foki. Ein zusätzliches Anfärben mit MitoTracker Red, zeigte jedoch Fluoreszenzsignale an den Polen, die mit eYFP-HppA_{At} überlagerten. Folglich könnten dies die gleichen undefinierten Strukturen sein, die bereits zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt werden konnten (siehe 2.3). Das Plasmid pBBR1MCS2-P_{phaC}-*eyfp-hppA_{At}* wurde ebenfalls in den Wildtyp-Stamm von *R. eutropha* H16 und *E. coli* JM109 transformiert. In beiden Aufnahmen zeigte sich eine eYFP-HppA_{At} Fluoreszenz und eine Überlagerung mit der Zellmembran im Durchlicht (Abbildung 9F). Damit konnte ausgeschlossen werden, dass eYFP-HppA_{At} dazu tendiert, mit sich selbst zu aggregieren. Mit welchen intrazellulären Strukturen die polaren Fluoreszenzfoki in *A. tumefaciens* colokalisierten, blieb hingegen unklar. Um mögliche PolyP- oder Acidocalcisom-spezifischen Interaktionspartner der HppA_{At} zu identifizieren, wurde ein *pull down* Experiment durchgeführt, bei dem mit Fluoreszenz markierte Köderproteine (eYFP-HppA_{At}) durch entsprechende magnetische *beads* (Antikörper- und Affinitäts-tag basierte Proteinaufreinigung) isoliert und die Proben massenspektrometrisch untersucht werden (Anhang, A5). Jedoch konnten keine relevanten Interaktionspartner ermittelt werden.

2.5 Lokalisierung der Acidocalcisomen-spezifischen, vakuolären H⁺-transportierenden Pyrophosphatase HppA_{At}

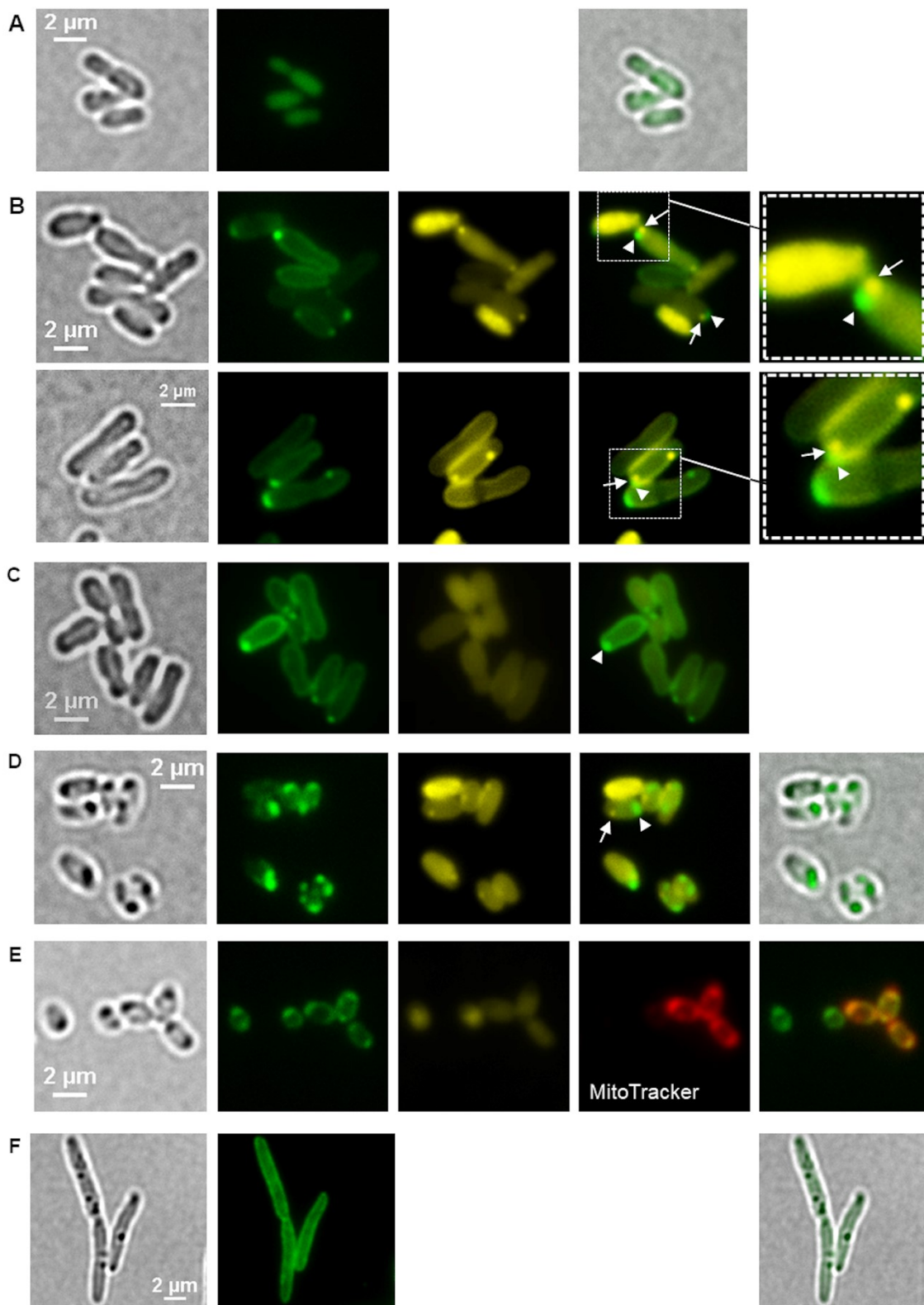


Abbildung 9: Lokalisierung der eYFP-HppA_{At} in *A. tumefaciens*. (A) Die Expression von *eyfp* ohne Fusionsprotein ergab eine homogene Fluoreszenz in den Zellen und zeigte somit, dass es sich bei eYFP um ein lösliches, zytoplasmatisches Protein in *A. tumefaciens* handelt. Es wurden Proben von je drei biologischen Replikaten untersucht. (B) Der Stamm *A. tumefaciens* pBBR1MCS2-*P_{phac}-eyfp*-

2.5 Lokalisierung der Acidocalcisomen-spezifischen, vakuolären H⁺-transportierenden Pyrophosphatase HppA_{At}

hppA_{At} wurde mit DAPI gefärbt und mit Hilfe von Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie in Kombination mit einem eYFP- und DAPI-PolyP spezifischen Filterset (Abbildungen von links nach rechts) untersucht. Das zweite Bild von rechts zeigt eine Überlagerung des eYFP- und DAPI-PolyP-Kanals. Eine Vergrößerung eines bestimmten Bereichs dieser Überlagerung wird in der ersten Abbildung von rechts dargestellt. Der eYFP-HppA_{At} (Pfeilkopf) und der DAPI-PolyP Foki (Pfeil) sind hierbei nebeneinander am Zellpol lokalisiert. Mikroskopiebilder von insgesamt vier biologischen Replikaten wurden analysiert. (C) *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ (Deletionsmutante) transformiert mit pBBR1MCS2-P_{phaC}-*eyfp-hppA_{At}*, zeigte bei Abwesenheit von PolyP weiterhin eYFP-HppA_{At} Foki. Das Experiment wurde mit zwei biologischen Replikaten durchgeführt. (D) zeigt die genomische Integration von *eyfp-hppA_{At}* in *A. tumefaciens* nach einer Kultivierung in LB-Medium nach 48 h (stationäre Phase). Die schwach fluoreszierenden DAPI-PolyP Foki lokalisieren nicht mit den eYFP-HppA_{At} Foki. (E) Eine zusätzliche Färbung mit MitoTracker Red (analysiert mit einem RFP-spezifischen Filter) zeigte bei dem gleichen Konstrukt Fluoreszenzfoki, die mit dem eYFP-HppA_{At} Signal überlappen. (F) Das Einbringen des pBBR1MCS2-P_{phaC}-*eyfp-hppA_{At}* Plasmids in *R. eutropha* führte nur zu einer Färbung der Membran, ohne die Bildung von Fluoreszenzfoki. Proben wurden analysiert in drei (D und E) und zwei (F) biologischen Replikaten.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen (Manfred Rohde, Universität Braunschweig) zeigten neben PolyP-Granula in *A. tumefaciens*, undefinierte intrazelluläre Strukturen, die möglicherweise als Acidocalcisomen angesehen werden könnten (Abbildung 8). Jedoch ist es nicht auszuschließen, dass es sich hier auch um Plasmolyse handeln könnte, die nach einer längeren Kultivierung (48 h) bzw. durch die EM-Präparation auftritt oder es sich um sonstige Präparationsartefakte handelt. Außerdem zeigten sich diese Strukturen extrem selten.

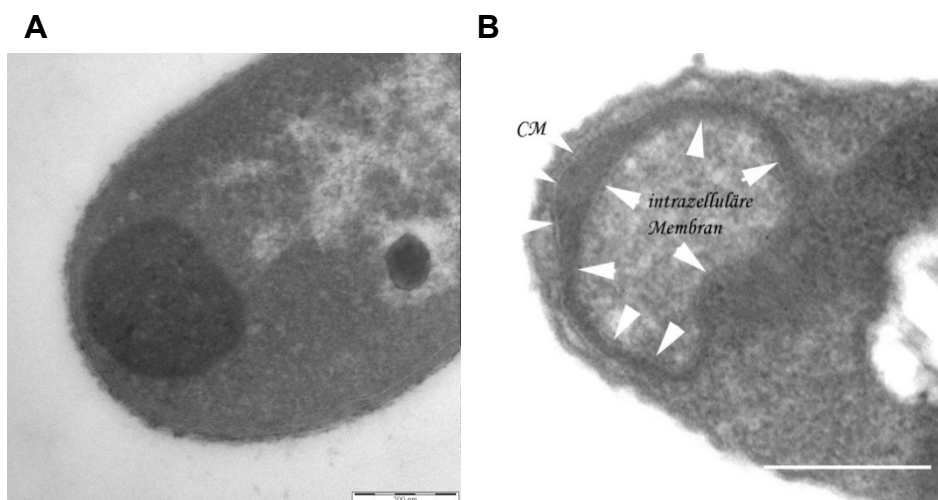


Abbildung 8: TEM-Aufnahmen von Dünnschnitten von *A. tumefaciens* Wt Zellen nach einer Kultivierung in LB-Medium nach 18 h (A) und 48 h (B). (A) zeigt ein PolyP-Granulum am Zellpol

2.5 Lokalisierung der Acidocalcisomen-spezifischen, vakuolären H⁺-transportierenden Pyrophosphatase HppA_{At}

(Pfeil), während bei **(B)** eine unbekannt Membranstruktur zu sehen ist. Ob es sich dabei um auftretende Plasmolyse nach längerer Kultivierung handelt, oder um ein Acidocalcisom, bleibt unklar.

Auch die Deletion von *hppA_{At}* zeigte weder einen Effekt auf das Wachstumsverhalten, noch hatte es Einfluss auf den intrazellulären PolyP-Gehalt oder auf die Bildung von MitoTracker-Foki in *A. tumefaciens*. Eine Überexpression der *ppk1_{At}* (*atu1144*) markiert mit mCherry in der Δ *hppA_{At}* Deletionsmutante bildete elliptisch geformte Fluoreszenzfoki an den Zellpolen. Dies suggeriert, dass das Fehlen der HppA_{At} nicht die Lokalisierung des PolyP produzierenden Enzyms beeinflusst (mehr Details zu den PolyP-Kinasen im nächsten Kapitel).

Somit konnte gezeigt werden, dass PolyP-Granula in *A. tumefaciens* offenbar nicht von einer Membran umgeben sind und daher nicht als Acidocalcisomen bezeichnet werden können. Da DAPI keine kurzkettigen Polyphosphatketten anfärbt, wie sie in Form von Pyrophosphat oft in Acidocalcisomen vorkommen, kann die Existenz von Acidocalcisomen nicht ausgeschlossen werden, zumal Fluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie mögliche intrazellulären Strukturen zeigten. Jedoch suggerieren die Ergebnisse, dass *A. tumefaciens* PolyP-Granula besitzt, wie sie auch in anderen Bakterienspezies zu finden sind. Daher wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Fokus auf die Charakterisierung der PPKs und anderer mit PolyP-assoziierten Proteine gelegt.

2.6 Polyphosphatkinasen sind zuständig für die Synthese und Abbau von PolyP und beeinflussen nicht die Bildung der mit HppA_{At} assoziierten Acidocalcisom-ähnlichen Strukturen

2.6 Polyphosphatkinasen sind zuständig für die Synthese und Abbau von PolyP und beeinflussen nicht die Bildung der mit HppA_{At} assoziierten Acidocalcisom-ähnlichen Strukturen

Wie sich zeigte, sind PolyP-Granula und Acidocalcisomen in *A. tumefaciens* als unterschiedliche Strukturen zu behandeln. PolyP wird in Bakterien normalerweise von den sogenannten Polyphosphatkinasen (PPKs) synthetisiert (Rao *et al.*, 2009). Im *A. tumefaciens* Genom befinden sich zwei Gene für PPKs, *ppk1_{At}* (*atu1144*) und *ppk2_{At}* (*atu0418*). Ersteres gehört zu der Gruppe der Klasse 1 PPKs (80 kDa Proteine mit N, H, C1 und C2 Domäne) und liegt in direkter Nachbarschaft zu *atu1145*, ein Gen, das für die Exopolyphosphatase 1 (PPX1_{At}) codiert. Letztere gehört zu den Klasse 2 PPKs (mit einem PPK2-Motiv, 34 kDa) und liegt neben einem Operon für Phosphattransporter (Pst)-Gene.

Eine Deletion beider *ppks_{At}* ergab einen Stamm, der nicht mehr dazu in der Lage war, PolyP zu bilden. Weder fluoreszenzmikroskopisch durch eine DAPI-Färbung, noch durch die biochemische Methode der PolyP Isolierung und P_i-Quantifizierung, konnte PolyP in *A. tumefaciens* $\Delta ppk1 \Delta ppk2$ nachgewiesen werden (siehe Anhang Publikation [1], *figure 6*). Eine einfache Deletion der *ppk1_{At}* zeigte das gleiche Ergebnis. Wenn jedoch nur die *ppk2_{At}* im Genom von *A. tumefaciens* deletiert wurde, konnte nicht nur immer noch PolyP in den Zellen nachgewiesen werden, es lag sogar in erhöhter Menge vor als im Wt (siehe Anhang Publikation [1], *figure 6C*). Basierend auf diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass PPK1_{At} das Enzym für die Synthese und PPK2_{At} eher zuständig für den Abbau von PolyP *in vivo* sein muss. PPK2_{At} könnte hier, im Gegensatz zu PPK1_{At} für die Aufrechterhaltung eines hinreichend hohen Pools an NTPs zuständig sein.

Um die Abwesenheit von PolyP in der Doppelmutante zu verifizieren, wurde das Gen *pptA* (*A0104*) von *R. eutropha* über ein Plasmid in *A. tumefaciens* eingebracht. PptA gehört zu den Phosinen und zeigt PolyP bindende Eigenschaften durch die konservierte Histidin Alphahelical-Domäne (CHAD). Auch in anderen, Gram-positiven, wie Gram-negativen Bakterien, in Archaeobakterien und Pflanzen sind diese

2.6 Polyphosphatkinasen sind zuständig für die Synthese und Abbau von PolyP und beeinflussen nicht die Bildung der mit HppA_{At} assoziierten Acidocalcisom-ähnlichen Strukturen

Proteine an PolyP gebunden (Lorenzo-Orts et al., 2019, Iyer und Aravind, 2002, Werten et al., 2019, Tumlirsch und Jendrossek, 2017). Die Expression von *eyfp-pptA_{Re}* in *A. tumefaciens* Wt, zeigte eine Colokalisation mit den DAPI-PolyP Fluoreszenzfoki aber eine homogene Fluoreszenz in der Doppelmutante $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ (Abbildung 10). Diese Ergebnisse bestätigen somit ebenfalls die Abwesenheit von PolyP in *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$. Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit dem *A. tumefaciens* eigenen CHAD-Protein (*pptA_{At}*, *atu4492*) erzielt werden, das durch Proteinclusteranalyse (NCBI, BLAST) identifiziert werden konnte (Abbildung 11).

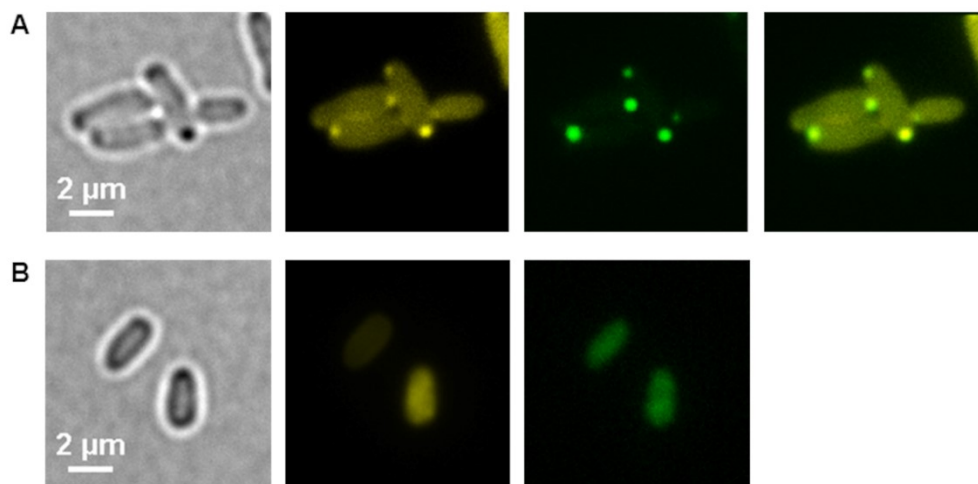


Abbildung 10: Expression von *eyfp-pptA_{Re}* von *R. eutropha* in *A. tumefaciens*. Die Stämme *A. tumefaciens* Wt und *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ (Deletionsmutante) wurden mit dem pBBR1MCS2-*P_{phaC}-eyfp-pptA_{Re}* Plasmid transformiert. (A) Im Wt colokalisieren die eYFP-PptA_{Re} mit den DAPI-PolyP Foki. (B) Wenn kein PolyP vorhanden ist (Deletionsmutante) liegt *eyfp-pptA_{Re}* homogen in der Zelle vor.

2.6 Polyphosphatkinasen sind zuständig für die Synthese und Abbau von PolyP und beeinflussen nicht die Bildung der mit HppA_{At} assoziierten Acidocalcisom-ähnlichen Strukturen

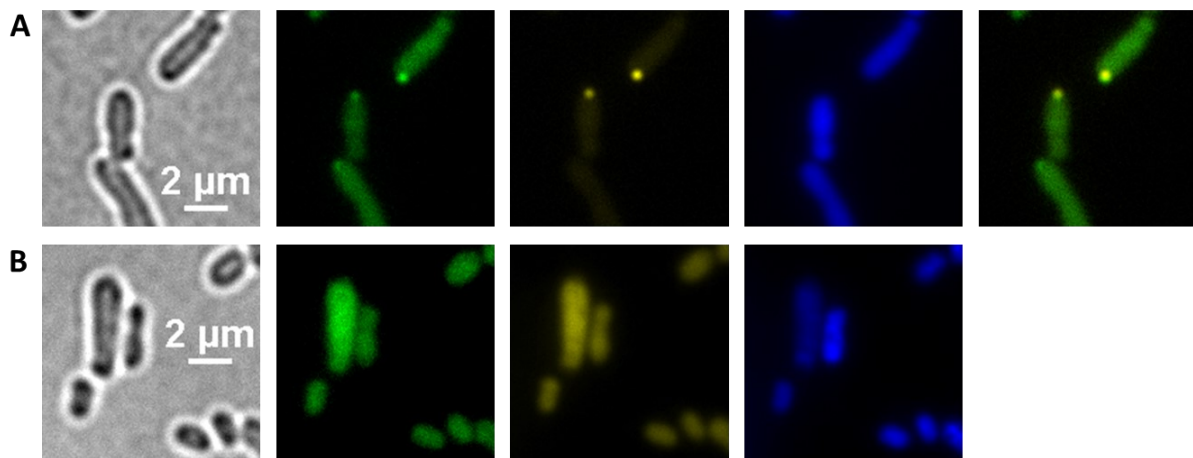


Abbildung 11: Expression von *eyfp-pptA_{At}* in *A. tumefaciens* Zellen. (A) Der Stamm *A. tumefaciens* Wt wurde mit dem Plasmid pBBR1MCS2-*P_{phaC}-eyfp-pptA_{At}* transformiert. Die eYFP-PptA_{At} Foki überlappen mit den DAPI-PolyP Signalen (Abbildung rechts). (B) zeigt das gleiche Konstrukt in *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ (Deletionsmutante) exprimiert. Ohne die Anwesenheit von DAPI-PolyP Foki liegt die Fluoreszenz von eYFP-PptA_{At} homogen vor.

Um mehr über die Lokalisation der PPKs in der Bakterienzelle herauszufinden, wurden die entsprechenden Gene über eine Linker-Sequenz mit unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen fusioniert und in *A. tumefaciens* überexprimiert. PPK1_{At}-mCherry zeigte eine Lokalisierung am Zellpol in Form eines elliptisch-geformten Fluoreszenzfokus. Oft, aber nicht immer befand es sich in nächster Nähe zu einem mit DAPI gefärbten PolyP-Granulum. Das Protein colokalisierte nicht mit dem PolyP, sondern saß vielmehr auf dem Granulum auf (Abbildung 12A). Die Überexpression von eYFP-PPK2_{At} hingegen, zeigte eine deutliche Colokalisation der eYFP-Fluoreszenz mit den DAPI-PolyP Foki (Abbildung 12B). Es konnte kein DAPI-PolyP Fokus gefunden werden, der nicht mit einem eYFP-PPK2_{At}-Fokus überlagert.

2.6 Polyphosphatkinasen sind zuständig für die Synthese und Abbau von PolyP und beeinflussen nicht die Bildung der mit HppA_{At} assoziierten Acidocalcisom-ähnlichen Strukturen

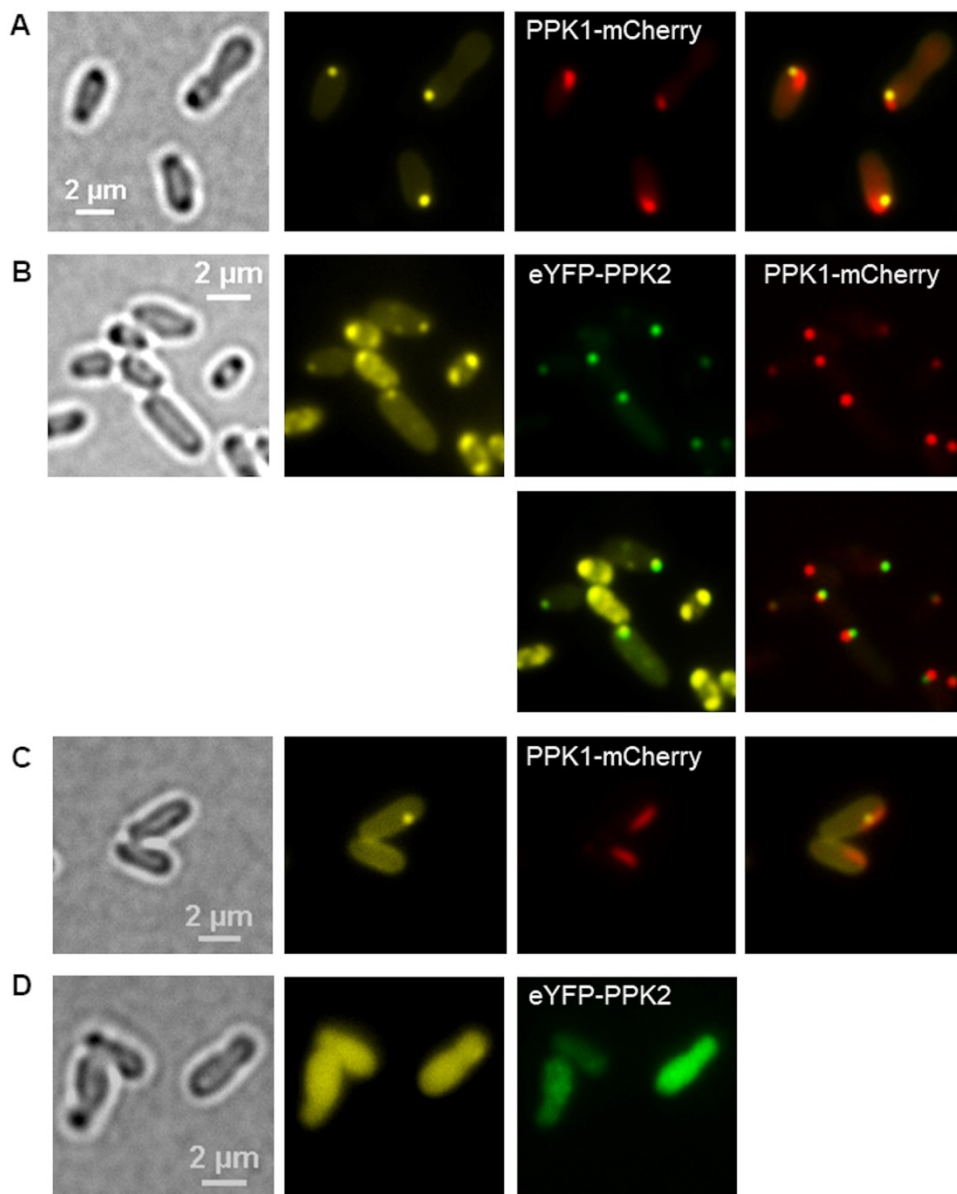


Abbildung 12: Lokalisierung von PPK1_{At} und PPK2_{At} in *A. tumefaciens*. *A. tumefaciens* Zellen, kultiviert in LB-Medium, wurden mit dem Plasmid pBBR1MCS2-P_{phaC}-ppk1_{At}-mcherry (**A**) transformiert und mit DAPI gefärbt. (Fluoreszenz)-mikroskopische Aufnahmen vom Durchlicht (links), vom DAPI-PolyP-Kanal (zweites von links) und mCherry-Kanal (zweites von rechts) wurden durchgeführt. Eine Überlagerung des DAPI-PolyP- und mCherry-Kanals zeigt keine Colokalisierung, aber eine Anlagerung der beiden Foki. In (**B**) werden *A. tumefaciens* Zellen mit einem chromosomal integrierten ppk1_{At}-mCherry Gen und dem Plasmid pBBR1MCS2-P_{phaC}-eyfp-ppk2_{At} dargestellt. Durch das zelleigene Expressionslevel zeigten sich bei PPK1_{At}-mCherry nun runde Fluoreszenzfoki (rechts oben). eYFP-PPK2_{At} bildete Foki, die mit DAPI-PolyP Signalen überlappen (zweites von rechts unten). (**C**) und (**D**) zeigen jeweils die Deletionsmutante *A. tumefaciens* $\Delta ppk1 \Delta ppk2$ die entweder mit dem pBBR1MCS2-P_{phaC}-ppk1_{At}-mcherry Plasmid (**C**) oder dem pBBR1MCS2-P_{phaC}-eyfp-ppk2_{At} Plasmid (**D**) transformiert wurde. Während PPK1_{At}-mCherry in Abwesenheit von PPK2_{At} in der Lage ist PolyP herzustellen (zweites Bild von links), bildete eYFP-PPK2_{At} ohne PPK1_{At} eine homogene Fluoreszenz

2.6 Polyphosphatkinasen sind zuständig für die Synthese und Abbau von PolyP und beeinflussen nicht die Bildung der mit HppA_{At} assoziierten Acidocalcisom-ähnlichen Strukturen

in der Zelle. eYFP-PPK2_{At} war somit nicht in der Lage, die Bildung von DAPI-PolyP Granula zu komplementieren.

Wurden diese Konstrukte nun in der Deletionsmutante $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ exprimiert, bildete nur PPK1_{At}-mCherry Foki wie im Wt und konnte durch DAPI-Färbung detektierbares PolyP bilden. PPK1_{At}-mChery ist somit funktional und wurde nicht durch den Fluoreszenzprotein-Tag in seiner PolyP-Synthesefunktion behindert. eYFP-PPK2_{At} zeigte im $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ Hintergrund hingegen eine homogene Fluoreszenz und schien in der Abwesenheit von PolyP keinen weiteren, in der Zelle verankerten Bindungspartner zu besitzen. Auch lässt sich hier erneut zeigen, dass PPK1_{At} und nicht PPK2_{At} das PolyP *in vivo* synthetisiert. Eine chromosomale Integration von *ppk1_{At}-mcherry* im Wt Stamm ergab statt einer elliptischen, eine globuläre Bildung der mCherry-Fluoreszenz und bestätigte den Verdacht, dass es sich bei den elliptischen Fluoreszenzfoki um einen Effekt der Überexpression handelte. Nichtsdestotrotz verhielt sich die chromosomale Integration von *ppk1_{At}-mCherry* wie die Überexpression und colokalisierte nicht direkt mit den DAPI-PolyP Foki, sondern saß seitlich davon am Zellpol (Abbildung 12B).

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die PPK1_{At} in *A. tumefaciens* für die Synthese von PolyP verantwortlich ist und in Form eines Protein-Klusters am Zellpol, in direkter Nähe zum PolyP-Granulum sitzt. PPK2_{At} ist hingegen in *A. tumefaciens* nicht in der Lage, PolyP zu synthetisieren und vermutlich für die Aufrechterhaltung des Nukleotidstoffwechsels zuständig. Außerdem lag das Protein bei Anwesenheit von PolyP in *A. tumefaciens* immer am PolyP-Granulum gebunden vor.

Kapitel 3 Charakterisierung der Polyphosphatkinasen von *A. tumefaciens* *in vitro*

In Prokaryonten sind zwei Typen von Polyphosphatkinasen (PPKs) bekannt. PPKs vom Typ 1 (PPK1) katalysieren die reversible Bildung von PolyP aus ATP. Sie besitzen eine molekulare Masse von ~80 kDa und bestehen aus einer N-terminalen Domäne (N), einer Kopf-Domäne (K) und zwei C-terminalen Domänen (C1 und C2) (Ahn und Kornberg, 1990, Zhu *et al.*, 2005). Erstmals beschrieben wurde die Kinase aus *E. coli* und stellt den Prototyp der Typ 1-PPKs da.

Eine andere weit verbreitete PPK vom Typ 2 (PPK2), besitzt hingegen nur etwa die Hälfte der Masse (~40 kDa) und zeigt keine Sequenzähnlichkeiten zur PPK1. In *Pseudomonas aeruginosa* katalysiert die PPK2 die GTP Synthese aus GDP und PolyP. Die PPK2 wird in 3 Untergruppen, je nach Substratspezifikation, unterteilt: Nukleosid di-Phosphate (Subtyp 1), Nukleoside Monophosphate (Subtyp 2) oder beide (Subtyp 3) (Motomura *et al.*, 2014). Wie bereits in Kapitel 2 aufgeführt, besitzt *A. tumefaciens* eine Typ 1 (PPK1_{At}) und eine Typ 2 PPK (PPK2_{At}). Nur PPK1_{At} hat sich *in vivo* essentiell für die Bildung von PolyP-Granula gezeigt (siehe Kapitel 2, Abschnitt 2.6). Um festzulegen, welche Substratspezifität die PolyP-Kinasen von *A. tumefaciens* besitzen und zu welcher Untergruppe die PPK2_{At} gehört, wurden beide PPKs aufgereinigt und bezüglich ihrer biochemischen Eigenschaften charakterisiert.

3.1 Methoden zur Analyse der Enzymaktivität

3.1.1 Aufreinigung der Polyphosphatkinasen von *A. tumefaciens* durch Nickel-Affinitätschromatographie

Beide Polyphosphatkinasegene (*ppk1_{At}* und *ppk2_{At}*) wurden mit der PCR amplifiziert und in Vektoren kloniert, durch die eine Hexa-Histidin-kodierende Sequenz (den sogenannten His₆-Tag) C oder N-Terminal fusioniert werden kann (pET22b oder pET28a). Proteinmotive mit diesem His₆-Tag können an Materialien mit Nickel-Chelaten binden. Diese Eigenschaft macht sich die Nickel-Affinitätschromatographie

zu nutze. Hier wird Sepharose verwendet, die Ni²⁺ gebunden an Nitrilotriessigsäure (NTA) enthält. Für die Isolierung der Fusionsproteine, interagiert Ni²⁺ im Austausch gegen Wasser mit zwei His-Resten. Nach mehreren Waschschrinen, um ungebundene Proteine zu entfernen, wird das gebundene Protein mit Imidazol-Gradienten eluiert. Diese Chemikalie bindet an die Ni²⁺-NTA und verdrängt kompetitiv das Fusionsprotein. Im Falle der *A. tumefaciens* PPKs wurden die Enzyme mit 250 mM Imidazol von der Säule gewaschen. Die Genexpression erfolgte mit *E. coli* BL21 Zellen, deren aufgeschlossenes, lösliches Zellextrakt auf die NTA-Säulen gegeben wurde.

Die Reinheit dieser eluierten Fraktionen konnte mit dem Auftragen auf ein Polyacrylamidgel und anschließender Färbung mit kolloidalen Coomassie kontrolliert werden. PPK1_{At}-His (84.9 kDa einschließlich *linker*-Sequenz) zeigte eine starke Anreicherung, während His-PPK2_{At} mit 36.2 kDa (einschließlich *linker*-Sequenz) fast homogen vorlag. Die aufgereinigten Enzyme (1-4 mg/ml) wurden im Elutionspuffer (250 mM Imidazol, 300 mM NaCl und 50 mM NaH₂PO₄) auf Eis bei 5°C gelagert.

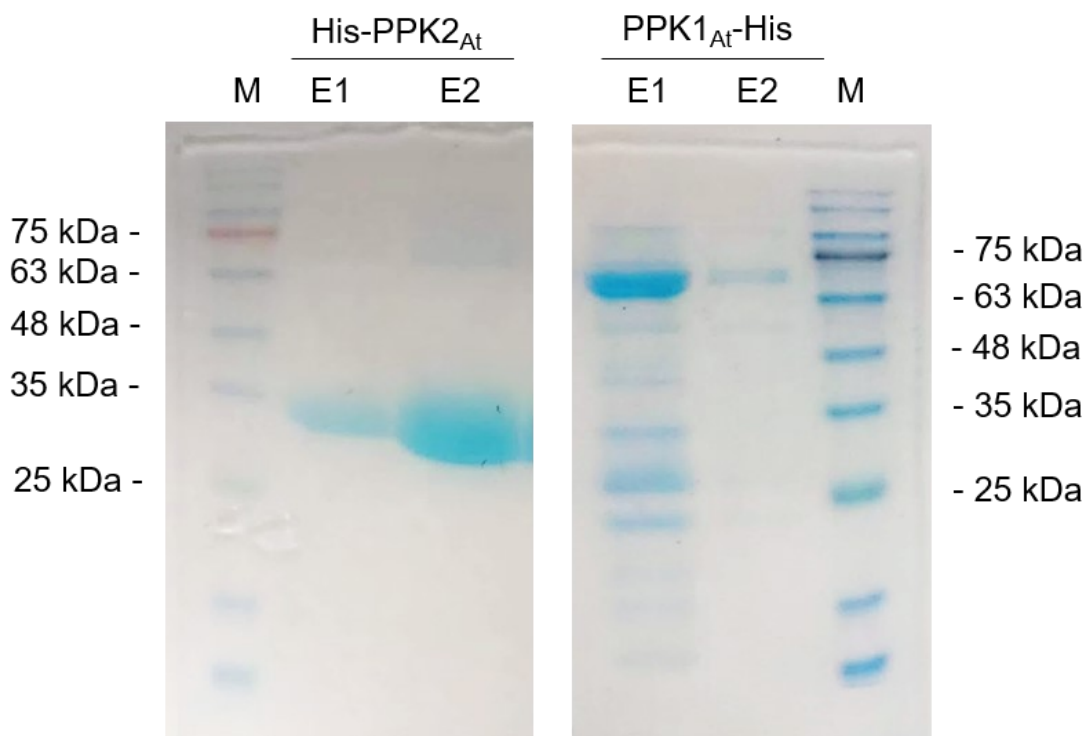


Abbildung 13: 12% SDS-Polyacrylamidgel von His-PPK2_{At} (links, 36.2 kDa mit Linker-Sequenz) und PPK1_{At}-His (rechts, 84.9 kDa mit Linker-Sequenz), gefärbt mit kolloidalem Coomassie. M, Markerproteine; E, Elutionsstufe. Beide Proteine wanderten etwas weiter als nach der molekularen Masse eigentlich zu erwarten wäre. Für His-PPK2_{At} zeigte sich eine einzelne homogene Bande, während die Aufreinigung der PPK1_{At}-His nach der Elution noch kontaminierendes Protein enthielt.

Beide PPKs zeigten ein etwas längeres Laufverhalten, als eigentlich durch die Proteinmasse vorherzusehen war.

3.1.2 Zusammensetzung der Enzymassays und Messung der PPK_{At}-Aktivitäten

Die Proben enthielten 1 μ M Enzym, 2 mM NTPs (Reaktionsrichtung PolyP-Aufbau) oder 2mM NDPs + 9 mM PolyP (Reaktionsrichtung PolyP-Abbau), 2 mM MnCl₂ (wenn nicht anders angegeben) und 0.1 M Tris-HCl Puffer (pH 7–8) und wurden zwischen 30 min und 48 h bei 30°C inkubiert. Die Synthese von oligophosphorylierten Nukleosiden im Fall der PPK2_{At}, erfolgte mit 15 mM NTPs, bzw. 2 mM NDPs (oder dTDP, da TDP nicht verfügbar) und einer Inkubationszeit von 24 h. Nach dem Abstoppen der Reaktion bei 95°C für 3 min wurden die Proben entweder direkt gemessen oder bei -20°C gelagert. Nach einer Zentrifugation bei 13 000 g für 3 min, um das präzipitierte Protein von der wässrigen Phase abzutrennen, erfolgte die Analyse der Produkte mittels phaseninvertierter *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)-Säule (ISAspher 100–5 C18 BDS 250 \times 4.0-mm Säule) in Verbindung mit einer HPLC-Anlage (Infinity, Agilent) und einer Detektionswellenlänge von 254 nm. Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Proben bei 20 000 g, 15 min bei 4°C zentrifugiert und anschließend durch Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert. Die Messungen erfolgten durch ein Agilent 1200 HPLC System, gekoppelt mit Agilent 6410B Triplequadropol Massenspektrometer (MS-QQQ). Zur Erzeugung des Aerosols und der Ionisierung des Analyts wurde die Elektrospray-Ionisationsmethode (ESI) verwendet, um anschließend die Ionen nach dem Masse-Ladungsverhältnis (m/z) im Analysator durch ein Wechselfeld zwischen den Quadropol-Stäben zu selektieren. Die chromatographische Trennung der Nukleosidphosphate erfolgte in einer polymer basierenden zwitterionischen hydrophilen Interaktionschromatographie (ZIC-pHILIC) und alkaliner mobilen Phase (Feith *et al.*, 2019, Teleki *et al.*, 2015). Anlagensteuerung, sowie die Datenanalyse erfolgte mit der kommerziellen MassHunter B.07.00 Software. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Attila Teleki aus dem Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart durchgeführt.

3.1.3 Färbung von PolyP-Gelen mit Toluidinblau

Das enzymatisch hergestellte PolyP durch die PPKs von *A. tumefaciens* wurde elektrophoretisch in einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach (Losito et al., 2009) mit Toluidinblau gefärbt. Der blaue, kationische Farbstoff bindet an die negative Ladung des PolyP-Moleküls und färbt sich violett. Ein synthetisch hergestellter PolyP-Standard mit ≈ 100 P_i-Einheiten im Durchschnitt (Geschenk von A. Saidari) wurde als Positivkontrolle verwendet.

3.2 Biochemische Charakterisierung der PPK1_{At}

Um die Substratspezifität von PPK1_{At} zu analysieren, wurde das Enzym mit ATP, GTP, CTP, dTTP oder UTP für 30 min inkubiert und anschließend die Nukleotidzusammensetzung mittels HPLC analysiert. Das Ergebnis zeigte eine nur geringe Abnahme des NTP-Peaks bzw. eine geringe Zunahme an NDPs (siehe Anhang Publikation [2], *figure 1*). Überraschenderweise konnte nur eine geringe Aktivität der PPK1_{At} detektiert werden, wenn 2 mM der NTPs eingesetzt wurde. Startete man die Reaktion hingegen mit einer höheren Konzentration der NTPs (15 mM) und einer längeren Inkubationszeit von 24 h, wurde eine PolyP-formierende Aktivität indirekt durch Abbau der NTPs zu NDPs gemessen. Die höchste Aktivität zeigte sich hier mit den Purinen, ATP und GTP. Einen direkten Nachweis des entstandenen PolyPs, wurde mit Polyacrylamidegelen erbracht, die mit dem PolyP-färbenden Farbstoff Toluidinblau inkubiert wurden. Jedoch konnte nur für GTP als Substrat eine schwach sichtbare PolyP-Bande nachgewiesen werden (siehe Anhang Publikation [2], *Online Resource 3*). Wahrscheinlich waren die PolyP-Konzentrationen der anderen Nukleotide zu niedrig, um sie durch die Toluidinblaufärbung detektieren zu können.

Auch die Aktivität der PPK1_{At} in Richtung NTP-Synthese mit den Ausgangssubstanzen PolyP und NDP wurde diesbezüglich untersucht. Für die Umwandlung von ADP zu ATP, konnte eine Aktivität von 0,037 μmol gebildetes ATP/min/mg (mit einer Inkubationszeit von 5 min) errechnet werden. Jedoch wurden für die übrigen Nukleotide (GDP, CDP, UDP oder dTDP) nur sehr geringe Aktivitäten detektiert. Nur bei einer Inkubationszeit ab 6 h konnte auch für die übrigen NDPs eine Enzymaktivität gemessen werden. Aber es wurde nie die Entstehung von

Adenosintetraphosphat (AP₄), wie bereits zuvor für die PPK2_{CR_e} von *R. eutropha* oder Adenosinpentaphosphat (AP₅) in einer anderen Studie über die PPK2_{M_x} von *Myxococcus xanthus* nachgewiesen (Mordhorst *et al.*, 2019, Hildenbrand *et al.*, 2020).

Des Weiteren zeigten zusätzliche Experimente mit PPK1_{At} eindeutige Aktivitäten mit Ca²⁺ oder Mn²⁺ als Cofaktor. Die Enzymaktivität mit Mg²⁺ war überraschenderweise niedrig und keine Aktivität konnte in Abwesenheit zweiwertiger Kationen gemessen werden. Auch ergaben die Enzymassays mit Nukleosidmonophosphaten und PolyP als eingesetztes Substrat und einer Inkubationszeit von bis zu 24 h, keine Kinaseaktivitäten.

Abschließend kann gesagt werden, dass es sich bei der PPK1_{At} um eine typische Type 1-PPK mit einer Präferenz (oder hohe Affinität) für Adenin-Nukleotide mit einer Nukleotid-dikinase-Aktivität handelt (Rao *et al.*, 2009, Frank *et al.*, 2020).

3.3 Biochemische Charakterisierung der PPK2_{At}

Die aufgereinigte PPK2_{At} war nicht in der Lage NMPs weder in Ab-, noch Anwesenheit von PolyP als Phosphatdonor zu phosphorylieren und kann daher in die Untergruppe 1 der PPK2-Klassifizierung von Motomura *et al.* eingeordnet werden (Motomura *et al.*, 2014). Jedoch katalysierte das Enzym die Bildung von PolyP ausgehend von ATP und anderen NTPs als Edukte. Messungen bestätigten eine Abnahme von ATP (NTP), einhergehend mit einer Zunahme von ADP (NDP) nach einer Inkubationszeit von 30 min (siehe Anhang Publikation [2], *Online Resource 4*). Ein zusätzliches Auftragen des PPK2 Enzym-Assays auf ein Acrylamidgel und anschließender gelelektrophoretischen Auftrennung der Reaktionsprodukte, zeigte nach der Toluidinblaufärbung starke gefärbte, pinkfarbene Schmierbanden an PolyP (Abbildung 14). Da das gefärbte PolyP sich am Taschenanfang befand, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um die Bildung von langkettigen PolyP-Molekülen durch die PPK2_{At} handelte. Diese Enzymreaktion lief unter der Anwesenheit von Mn²⁺ ab. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich, wenn dieses Metallion durch andere divalente Kation wie Mg²⁺ oder Ca²⁺ ersetzt wurde. Keine Aktivität konnte hingegen mit monovalenten Ionen wie Na⁺ oder Ka⁺ gemessen werden. Eine geringe Enzymaktivität erbrachte die Verwendung von Co²⁺ als Cofaktor.

Zusätzlich erzielte die Inkubation von PPK2_{At} mit GTP oder UTP anstelle von ATP ähnliche Ergebnisse. Wurde hingegen CTP oder dTTP als Substrat verwendet und der Assay für 30 min inkubiert, zeigte sich keine Bildung der entsprechenden NDP-Peaks im Chromatogramm und damit keine Aktivität des Enzyms. Nur durch eine verlängerte Inkubationszeit für dTTP (2 h) und CTP (24 h), konnte auch hier die Entstehung von PolyP durch Toluidinblaufärbung nachgewiesen werden. Interessanterweise verschwanden die PolyP-Toluidinblausignale für die Substrate GTP, dTTP und UTP, die nach 30 min, bzw. 2 h gut sichtbar waren, nach längerer Inkubationszeit (24 h) vollständig. Stattdessen tauchten im Chromatogramm zusätzliche Peaks mit längeren Retentionszeiten auf. Hierbei könnte es sich um Nukleosidphosphate mit mehr als drei Phosphatresten handeln (Abbildung 15). Dies lässt vermuten, dass PolyP hier als ein Intermediat gebildet und als Substrat für die Bildung von Guanosin-, desoxy-Thymidin-, oder Uridin-Oligophosphaten, ausgehend von GTP, dTTP und UTP verwendet wurde (siehe nächstes Kapitel für mehr Details).

Bei ATP und CTP als Ausgangssubstrat, blieb hingegen das PolyP-Toluidinblausignal auch nach einer Inkubationszeit des Enzym-Assays von 48 h immer noch bestehen und keine Synthese von zusätzlichen Peaks (außer vermutlich für NP4) konnte durch HPLC und UV-vis Detektion nachgewiesen werden.

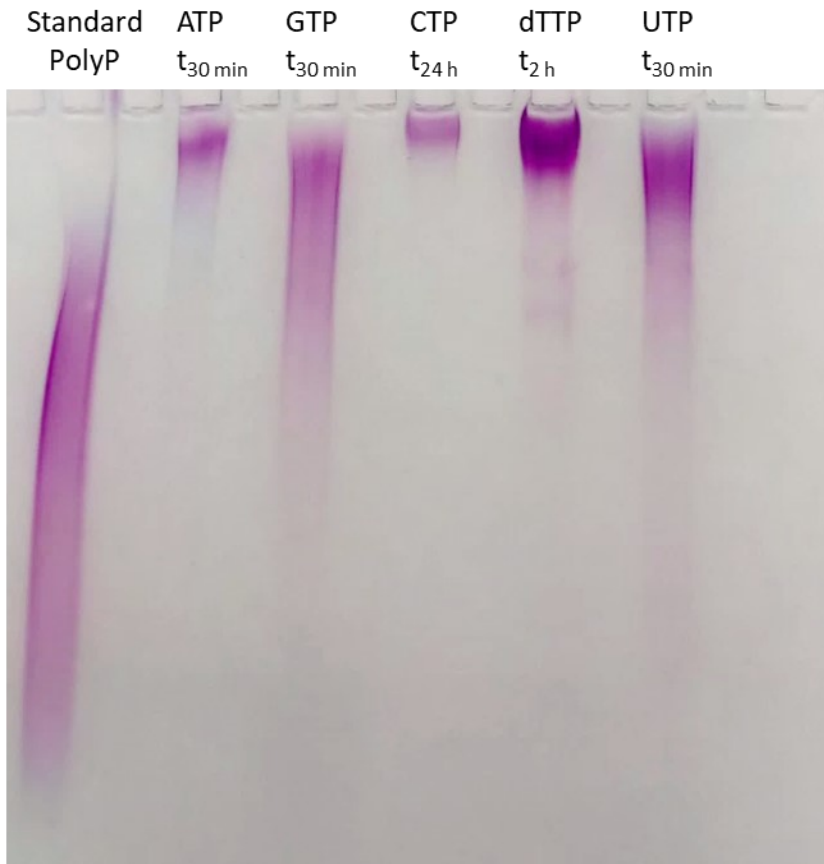


Abbildung 14: Separierung von PPK2_{At} produziertem PolyP mit PAGE und anschließender Toluidinblaufärbung. Die Proben wurden in folgender Reihenfolge von links nach rechts aufgetragen: PolyP Standard (durchschnittliche Kettenlänge ≈ 100 P_i Einheiten, entsprechen 9 mM P_i) (Position 1), Produkte ausgehend von 15 mM ATP nach 30 min (Position 3), GTP nach 30 min (Position 4), CTP nach 24 h (Position 5), dTTP nach 2 h (Position 6) oder UTP nach 30 min (Position 7), Kontrollen ohne NTP (Position 2) oder ohne PPK2_{At} (Position 8). Die hier sichtbaren Produkte wurden erst nach unterschiedlichen Inkubationszeiten der Enzymassays je nach eingesetztem Nukleotid erreicht.

3.4 PPK2_{At} phosphoryliert NDPs mit PolyP als Phosphatdonor und produziert NTPs sowie Nukleosid-Oligophosphate

Da Versuche mit NTPs als Substrat für PPKs in Verbindung mit längeren Inkubationszeiten, das Auftauchen mehrerer HPLC Signale zeigten, die als die Bildung von oligophosphorylierten Nukleosiden interpretiert werden können, ergab sich folgende Fragestellung: Werden diese durch PPK2_{At} synthetisierten, oligophosphorylierten Nukleoside auch durch NDPs in der Gegenwart von PolyP gebildet? Die Analyse durch die HPLC zeigte eine eindeutige Reduzierung der eingesetzten NDP Konzentrationen (ADP, GDP, CDP, dTDP oder UDP) innerhalb 24 h und eine Erhöhung des entsprechenden NTPs (Abbildung 15A). Zusätzliche Peaks im HPLC Chromatogramm mit einer höheren Retentionszeit als die entstandenen NTPs tauchten erneut für alle getesteten NDPs auf. Die Entstehung von Nukleosidtetraphosphat (NP4) sowie Nukleosidpentaphosphat (NP5) wurde bereits für andere PPK2 Enzyme gezeigt, jedoch tauchten im Fall der PPK2_{At} für GDP, CDP, dTDP und UDP noch weitere Peaks und damit Substanzen mit einer noch höheren Retentionszeiten auf (Mordhorst *et al.*, 2019, Hildenbrand *et al.*, 2020, Ogawa *et al.*, 2019). Ein Beispiel hierfür liefert Abbildung 15B für die Reaktion von GDP und PolyP. Schlussfolgert man, dass jedem dieser Peaks, der eine höhere Retentionszeit als der NTP-Peak besitzt, einem Molekül zuzuordnen ist, dass um jeweils eine Phosphatgruppe erweitert wurde, bedeutet das, dass PPK2_{At} dazu in der Lage ist, die Bildung von Guanosin oligophosphaten (GP4-GP8), Cytosin oligophosphaten (CP4-CP8), desoxy-Thymidin oligophosphaten (TP4-TP8) und Uridin oligophosphaten (UP4-UP7) zu katalysieren. Die Retentionszeiten dieser Peaks stimmten mit denen aus der Reaktion mit GTP, dTTP oder UTP überein (siehe 4.3). Nukleoside mit mehr als 5 Phosphatresten wurden bisher noch nicht beschrieben, und somit ist auch die biologische Funktion dieser Moleküle noch ungeklärt. Außerdem könnte es interessant sein zu testen, ob diese Produkte auch *in vivo* entstehen.

3.4 PPK2_{At} phosphoryliert NDPs mit PolyP als Phosphatdonor und produziert NTPs sowie Nukleosid-Oligophosphate

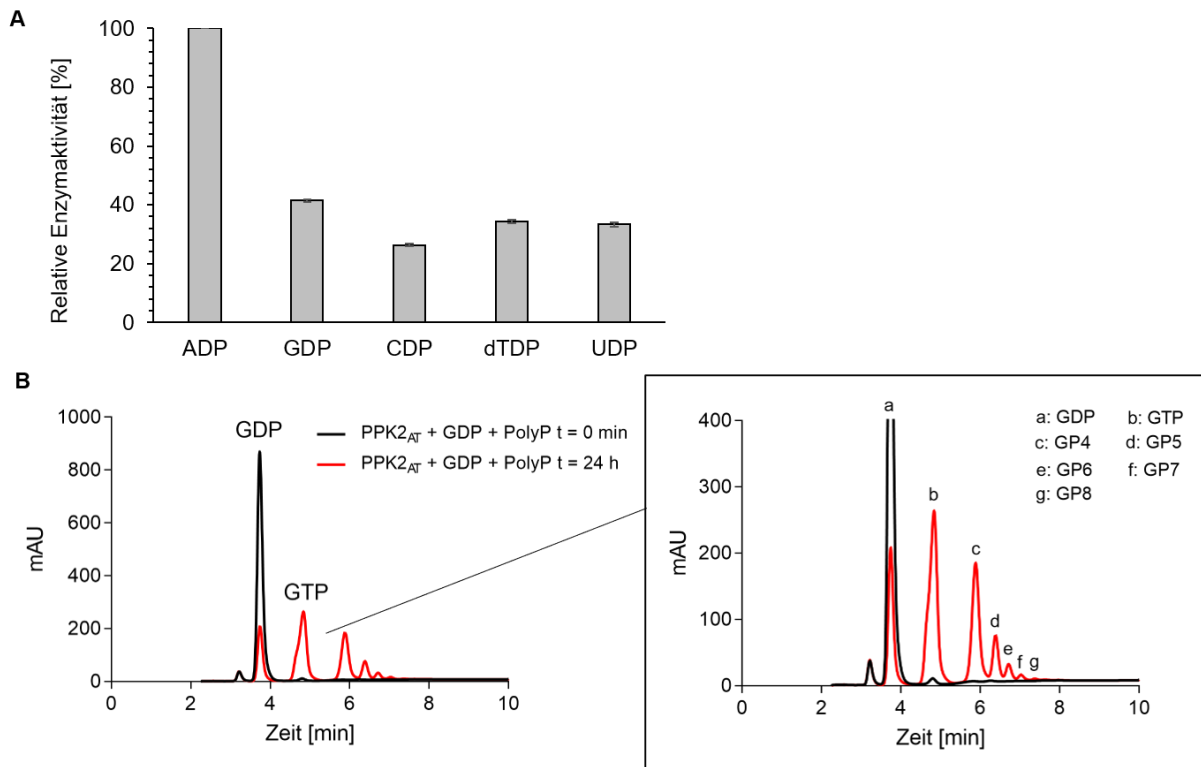


Abbildung 15 (A): Substratspezifität der PPK2_{At}. Gezeigt wird die relative Enzymaktivität (%) der PPK2_{At} in NTP-Syntheserichtung mit 2 mM NDP, 9 mM PolyP (P_i Konzentration) und Mn²⁺ als Cofaktor nach 30 min Inkubation bei 30°C. Die höchste Aktivität wurde für ADP zusammen mit PolyP gemessen (0,097 µmol ADP/min/mg) und zum Vergleich der Enzymaktivität gegenüber den übrigen Substraten auf 100% gesetzt. Der Assay wurde in Triplikaten angesetzt und gemessen. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen. **(B) Bildung von oligophosphorylierten Nukleosiden durch PPK2_{At}.** Edukte und Produkte der durch PPK2_{At} katalysierten Reaktion nach 24 h Inkubation mit GDP und PolyP wurden mit der HPLC analysiert. Die linke Graphik zeigt die Absorption von Guanosin-Nukleotiden vor (0 min, schwarz) und nach der Zugabe von PPK2_{At} (24 h, rot, mAU (*milli-absorption units*) bei 254 nm). Die rechte Graphik stellt eine Vergrößerung der linken Graphik da und zeigt noch einmal deutlicher die Gegenwart mehrerer zusätzlicher Peaks, die oligophosphorylierten Guanosin-Nukleotiden (GP4-GP8) zuzuordnen sind.

3.5 Identifizierung von Nukleosid-Oligophosphaten mit ZIC-pHILIC MS/MS

Um zu zeigen, dass es sich bei den Reaktionsprodukten der PPK2_{At} tatsächlich um oligophosphorylierte Nukleoside handelte, wurden diese mittels HPLC-MS/MS analysiert (Atilla Teleki, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart). Auch hier erschienen wieder mehrere Peaks mit einer höheren Retentionszeit als die eingesetzten NTPs. Diese konnten mit ZIC-pHILIC-MS/MS ihrer Masse zugeordnet werden, bei der es sich per Peak immer um eine Zunahme von 80 *m/z units* handelte. Dies entspricht der Masse einer Phosphateinheit von PolyP und somit auch perfekt der erwarteten Masse der Guanosin Tetra-, Penta-, Hexa-, Hepta- und Octaphosphaten wie im Beispiel weiter oben gezeigt. Der MS-Detektor konnte sogar Moleküle erfassen, deren *m/z* Werte Guanosin Nonaphosphaten (GP9) und Guanosin Decaphosphaten (GP10) entsprachen, die jedoch ein schlechtes Signal-zu-Rauschverhältnis besaßen. Dadurch konnte keine verlässliche Identifikation von GP9 und GP10 gewährleistet werden. Die Konzentrationen dieser höheren phosphorylierten Nukleoside waren ebenfalls zu gering, um sie mittels HPLC UV-vis zu detektieren. Ähnliche Ergebnisse erzielte die Analyse der Reaktionsprodukte der PPK2_{At} mit anderen Nukleotiden (ATP, GTP, CTP, dTTP und UTP). Auch hier konnten *m/z* Signale bis zu octaphosphorylierte Nukleoside gemessen werden (Tabelle 1). Im Fall von ATP sogar bis zu nonaphosphorylierte Nukleoside. PPK2_{At} ist also in der Lage, mehrere Phosphateinheiten von PolyP auf NDPs zu übertragen und bis zu nonaphosphorylierte Nukleoside zu produzieren. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass bei weiterer Optimierung der Assayparameter und/oder der MS Detektionsparameter hier eventuell noch mehr Phosphateinheiten, über nonaphosphorylierte Nukleoside hinaus, gemessen werden können. Eine Übersicht über die charakterisierten Eigenschaften der PPKs wird in Tabelle 2 dargestellt. Im Vergleich zu der PPK1 von *E. coli*, kann *A. tumefaciens* mit seinen beiden PPKs ein breiteres Spektrum an möglichen Substraten abdecken und oligophosphorylierte Nukleoside über NP5 hinaus synthetisieren (Ahn und Kornberg, 1990, Akiyama et al., 1992, Kornberg et al., 1956b)

3.5 Identifizierung von Nucleosid-Oligophosphaten mit ZIC-pHILIC MS/MS

Tabelle 1: Ergebnisse und Parameter der HILIC-QQQ-MS/MS Messungen von verschiedenen Nucleotidspezies in den PPK2_{At} Assays und Standardmixturen.

Nucleotide		MS/MS Parameter (SIM)			HILIC-QQQ-SIM Ergebnisse				HPLC Ergebnisse
Abk,	Summenformel	ESI	Präkursor		PPK2 _{At} Assay		100 µM Standard-Mix		PPK2 _{At} Assay
		Polarität	Spezies	m/z [u]	Fläche [Cts]	t _R * [min]	Fläche [Cts]	t _R * [min]	t _R * [min]
GMP	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₈ P	[-]	[M-H]-	362	1,89E+07	17,63	6,82E+07	17,59	3,1
GDP	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₁ P ₂	[-]	[M-H]-	442	6,43E+08	19,27	1,73E+08	19,33	3,3
GTP	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₄ P ₃	[-]	[M-H]-	522	4,64E+08	20,64	1,58E+08	20,76	4,0
GP4	C ₁₀ H ₁₇ N ₅ O ₁₇ P ₄	[-]	[M-H]-	602	2,39E+08	22,16			4,5
GP5	C ₁₀ H ₁₈ N ₅ O ₂₀ P ₅	[-]	[M-H]-	682	3,55E+07	23,82			5,2
GP6	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O ₂₃ P ₆	[-]	[M-H]-	762	5,49E+06	25,32			5,8
GP7	C ₁₀ H ₂₀ N ₅ O ₂₆ P ₇	[-]	[M-H]-	842	5,84E+05	26,84			6,3
GP8	C ₁₀ H ₂₁ N ₅ O ₂₉ P ₈	[-]	[M-H]-	922	7,31E+04	27,97			6,7
dTMP	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₈ P	[-]	[M-H]-	321	< LOD**	na***	1,66E+08	14,10	4,6
dTDP	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₁ P ₂	[-]	[M-H]-	401	6,76E+05	16,36	2,47E+08	16,35	5,5
dTTP	C ₁₀ H ₁₇ N ₅ O ₁₄ P ₃	[-]	[M-H]-	481	2,21E+07	18,04	1,84E+08	17,86	6,1
dTP4	C ₁₀ H ₁₈ N ₅ O ₁₇ P ₄	[-]	[M-H]-	561	4,94E+08	20,89			6,9
dTP5	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O ₂₀ P ₅	[-]	[M-H]-	641	1,08E+08	22,58			7,3
dTP6	C ₁₀ H ₂₀ N ₅ O ₂₃ P ₆	[-]	[M-H]-	721	5,99E+07	24,10			7,5
dTP7	C ₁₀ H ₂₁ N ₅ O ₂₆ P ₇	[-]	[M-H]-	801	2,03E+07	25,49			7,7
dTP8	C ₁₀ H ₂₂ N ₅ O ₂₉ P ₈	[-]	[M-H]-	881	7,33E+06	26,76			7,9
AMP	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	[-]	[M-H]-	346	1,67E+08	15,09	1,36E+08	15,09	4,7
ADP	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂	[-]	[M-H]-	426	4,63E+08	16,69	1,76E+08	16,90	6,4
ATP	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	[-]	[M-H]-	506	1,02E+09	18,44	1,85E+08	18,32	7,8
AP4	C ₁₀ H ₁₇ N ₅ O ₁₆ P ₄	[-]	[M-H]-	586	2,75E+08	19,96			8,2
AP5	C ₁₀ H ₁₈ N ₅ O ₁₉ P ₅	[-]	[M-H]-	666	1,60E+08	22,26			na
AP6	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O ₂₂ P ₆	[-]	[M-H]-	746	8,38E+06	23,61			na
AP7	C ₁₀ H ₂₀ N ₅ O ₂₅ P ₇	[-]	[M-H]-	826	2,08E+06	24,82			na

3.5 Identifizierung von Nucleosid-Oligophosphaten mit ZIC-pHILIC MS/MS

AP8	C ₁₀ H ₂₁ N ₅ O ₂₈ P ₈	[-]	[M-H]-	906	3,22E+05	26,10			na
AP9	C ₁₀ H ₂₂ N ₅ O ₃₁ P ₉	[-]	[M-H]-	986	1,47E+05	27,27			na
UMP	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₉ P	[-]	[M-H]-	323	1,59E+06	16,23	1,08E+08	16,23	2,9
UDP	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₁₂ P ₂	[-]	[M-H]-	403	2,27E+07	17,92	1,98E+08	18,15	3,1
UTP	C ₉ H ₁₅ N ₂ O ₁₅ P ₃	[-]	[M-H]-	483	1,69E+07	19,27	2,35E+08	19,57	3,8
UP4	C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₁₈ P ₄	[-]	[M-H]-	563	1,27E+07	20,98			4,4
UP5	C ₉ H ₁₇ N ₂ O ₂₁ P ₅	[-]	[M-H]-	643	1,91E+06	22,56			5,2
UP6	C ₉ H ₁₈ N ₂ O ₂₄ P ₆	[-]	[M-H]-	723	2,16E+05	24,10			5,9
UP7	C ₉ H ₁₉ N ₂ O ₂₇ P ₇	[-]	[M-H]-	803	5,75E+03	26,04			6,4
UP8	C ₉ H ₂₀ N ₂ O ₃₀ P ₈	[-]	[M-H]-	883	4,78E+03	27,12			6,8
CMP	C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₈ P	[-]	[M-H]-	322	3,36E+07	16,90	8,69E+07	16,95	2,6
CDP	C ₉ H ₁₅ N ₃ O ₁₁ P ₂	[-]	[M-H]-	402	6,04E+08	18,42	1,35E+08	18,63	3,0
CTP	C ₉ H ₁₆ N ₃ O ₁₄ P ₃	[-]	[M-H]-	482	6,97E+08	19,89	1,21E+08	20,00	3,7
CP4	C ₉ H ₁₇ N ₃ O ₁₇ P ₄	[-]	[M-H]-	562	7,24E+07	21,64			na
CP5	C ₉ H ₁₈ N ₃ O ₂₀ P ₅	[-]	[M-H]-	642	1,50E+06	23,25			na
CP6	C ₉ H ₁₉ N ₃ O ₂₃ P ₆	[-]	[M-H]-	722	4,64E+04	24,78			na
CP7	C ₉ H ₂₀ N ₃ O ₂₆ P ₇	[-]	[M-H]-	802	< LOD**	na			na
CP8	C ₉ H ₂₁ N ₃ O ₂₉ P ₈	[-]	[M-H]-	882	< LOD**	na			na

*Retentionszeit der Nucleotide, **Detektionslimit, *** not available/nicht verfügbar

3.5 Identifizierung von Nucleosid-Oligophosphaten mit ZIC-pHILIC MS/MS

Tabelle 2: Übersicht über die charakterisierten Eigenschaften der PPKs von *A. tumefaciens* im Vergleich zu der PPK1_{Ec} von *E. coli*. Teilweise wurde eine starke (+++), mittlere (++) oder geringe (+) Enzymaktivität festgestellt.

	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>	
	PPK1 _{Ec}	PPK1 _{At}	PPK2 _{At}
PolyP-Synthese-Richtung aus NTPs	Ja	Möglich (+)	Ja (+++)
NTP-Synthese-Richtung aus PolyP und NDPs	Ja	Ja (+++)	Ja (+++)
pH Optimum	pH 7.5	pH 7.5-8	pH 7.5-10
Verwertung NTPs	ATP > GTP	ATP > GTP > CTP, UTP und dTTP	ATP > GTP > dTTP > CTP, UTP
Verwertung NDPs	ADP > GDP, TDP > UDP, CDP	UDP > ADP, CDP > GDP > dTDP	ADP > GDP > dTDP, UDP > CDP
Phosphorylierung von NMPs mit PolyP	Nein	Nein	Nein
Bildung von Oligophosphaten (>NTP)	Nein	Nein	Ja (NP4-NP9)
Co-Faktoren	Mn ²⁺ , Mg ²⁺	Ca ²⁺ >Mn ²⁺ > Mg ²⁺	Mn ²⁺ = Mg ²⁺ > Ca ²⁺ > Co ²⁺

3.6 Die Expression von *ppk1_{At}* oder *ppk2_{At}* in einem PolyP-freien Hintergrund

Um die Funktion der PPKs in *A. tumefaciens* auch *in vivo* zu studieren, wurde die Expression der einzelnen, mit Fluoreszenzproteinen markierten Enzyme, in einem PolyP-freien Hintergrund getestet. Die Stämme *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ und *R. eutropha* $\Delta ppk-all$ (Deletion von allen 7 *ppks* und damit keine PolyP in den Zellen (Abbildung 16a)) zeigten dabei teilweise unterschiedliche Ergebnisse. Die Expression von *ppk1_{At}-mcherry* führte in *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ und *R. eutropha* $\Delta ppk-all$ wieder zur Bildung von PolyP-Granula. Dies zeigt, dass PPK1_{At} *in vivo* dazu Fähig ist, PolyP in beiden Stämmen zu synthetisieren. Dass *in vitro* diese Aktivität nicht gesehen werden konnte, da die Aktivität diesbezüglich zu niedrig war, um ausreichend synthetisiertes PolyP mit Toluidinblau anzufärben (siehe 3.2), kann daher an noch nicht ausgereiften Assaybedingungen liegen. Die charakteristische elliptische Form des PPK1_{At}-mCherry Fokus war besonders deutlich im *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ Deletionsstamm zu sehen. In *R. eutropha* $\Delta ppk-all$ lag das Signal fast, mit Ausnahme an der Position der PolyP-Granula, homogen vor (Abbildung 16b). Das kann daran liegen, dass die Menge an PolyP in den Zellen dazu führte, dass eine genaue Lokalisation des mCherry-Signals nicht mehr ersichtlich war. Es ist ebenfalls anzumerken, dass in diesem Stamm die PolyP-Granula in der Mitte der Zelle angeordnet sind, und nicht wie bei *A. tumefaciens* üblich, in der Nähe des Zellpols.

Überraschenderweise war eYFP-PPK2_{At} allein nicht dazu in der Lage in dem Deletionsstamm *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ PolyP zu synthetisieren, was an der homogenen eYFP-PPK2_{At} Fluoreszenz und der Abwesenheit von DAPI-PolyP Foki in den Zellen zu sehen war. In *R. eutropha* $\Delta ppk-all$ jedoch, kam es durch eYFP-PPK2_{At} zur Bildung von PolyP an den Zellpolen (Abbildung 16c). Die DAPI-PolyP Foki erscheinen jedoch unförmiger als im Vergleich zu den DAPI-PolyP Foki von PPK1_{At}-mCherry. Die eYFP-PPK2_{At} Foki colokalisieren mit den DAPI-PolyP Foki wie beim *A. tumefaciens* Wt Stamm, in dem das gleiche Konstrukt bereits exprimiert wurde (siehe 3.7). Eventuell bindet eine aktive PPK2_{At} hier an andere Zellpol assoziierte Proteine oder Strukturen, die diese Lokalisation ermöglichen. Das zelluläre Milieu,

3.6 Die Expression von *ppk1_{At}* oder *ppk2_{At}* in einem PolyP-freien Hintergrund

beispielsweise im Bezug auf den Nukleotidstoffwechsel, könnte in den beiden Organismen unterschiedlich vorliegen, was somit die Aktivität der Enzyme beeinflussen kann. Die Position der durch PPK1_{At}-mCherry gebildeten PolyP-Granula, die mit der Position des Nukleoids in *R. eutropha* übereinstimmte, könnte ein Hinweis darauf sein, dass PPK1_{At} die PolyP-Granula am bakteriellen Chromosom verankert. Zusammenfassend kann jedoch gesagt werden, dass beide PPKs prinzipiell in der Lage sind, PolyP zu synthetisieren.

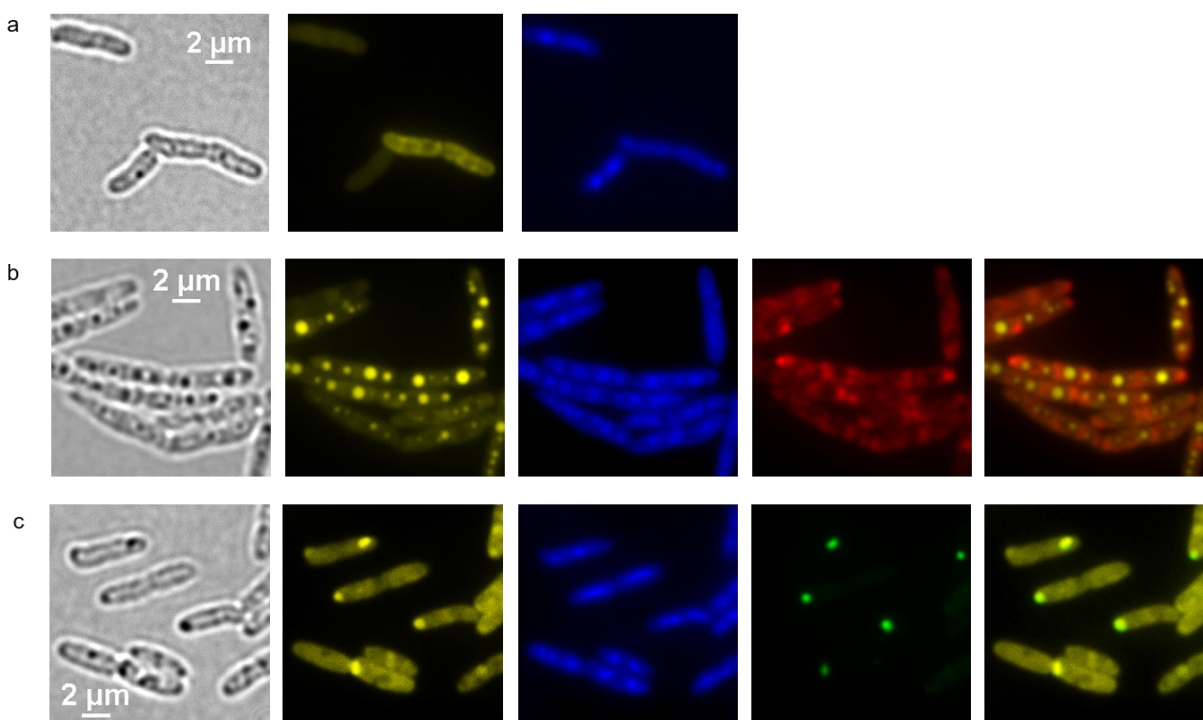


Abbildung 16: Expression von *ppk1_{At}* und *ppk2_{At}* in *R. eutropha*. Zellen kultiviert in NB-Medium wurden mit DAPI gefärbt und (fluoreszenz-)mikroskopisch analysiert. (a) *R. eutropha* Δppk -all (PolyP-freie Mutante). Von links nach rechts: Durchlicht, DAPI-PolyP Kanal und DAPI-DNA Kanal. (b) *R. eutropha* Δppk -all transformiert mit dem pBBR1MCS2-*P_{phaC}-ppk1_{At}-mCherry* Plasmid zeigte mehrere mit DAPI gefärbte PolyP-Granula die über die gesamte Zelllänge verteilt sind, während das PPK1-mCherry Signal in der gesamten Zelle vorliegt. Von links nach rechts: Durchlicht, DAPI-PolyP Kanal, DAPI-DNA Kanal, mCherry-Kanal, Überlagerung von DAPI-PolyP und mCherry-Kanal. (c) Aufnahmen von *R. eutropha* Δppk -all pBBR1MCS2-*P_{phaC}-eyfp-ppk2_{At}* zeigen eine Bildung von eYFP-PPK2_{At} Fluoreszenzfoki an den Zellpolen, die mit den DAPI gefärbten PolyP-Granula überlagern.

Kapitel 4 Subzelluläre Position der PolyP-Granula in Abhängigkeit vom Zellzyklus

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt werden konnte, formt *A. tumefaciens* ein PolyP-Granulum jeweils an einem oder beiden Zellpolen, aber niemals nebeneinander. Die PPK1_{At} zeigte sich *in vivo* als Syntheseezym für PolyP und befand sich ebenfalls am Pol, in nächster Nähe zum Granulum, während PPK2_{At} wichtig für die Aufstockung des NTP Pools von NDPs und PolyP war (Frank und Jendrossek, 2020, Frank *et al.*, 2020). PPK2_{At} colokalisierte immer mit den DAPI-PolyP Foki und kann als Alternative zur zelltoxischen DAPI-Färbung dienen, um durch *time lapse* Experimente die Lokalisation des PolyP-Granulums während des Zellwachstums zu verfolgen. Auch soll in diesem Abschnitt gezeigt werden, ob nicht nur die Expression von *ppk1_{At}-mcherry*, sondern auch die der inaktiven *ppk1(H450A)_{At}-mcherry* Variante, in einem $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ Hintergrund immer noch Fluoreszenzfoki bildet, oder ob das Fusionsprotein, wie bei der eYFP-PPK2_{At}-Fluoreszenz, in Abwesenheit von PolyP homogen vorliegt. *Time lapse* Experimente sollen zeigen, inwieweit das polare Wachstum von *A. tumefaciens* und der im Rahmen der Zellteilung wechselnde Wachstumspol einen Einfluss auf die Lokalisation der PolyP-Granula besitzen. Da der Wachstumspol alterniert, ändern sich höchstwahrscheinlich auch die Lokalisation zellpolspezifischer Proteine. PolyP, sowie die PPK1_{At} sind häufig am alten Pol lokalisiert und könnten ebenfalls unter dem Einfluss dieses Vorgangs stehen. Auch eine Bindung an die DNA wäre ein möglicher Einflussfaktor für die Lokalisierung der PolyP-Granula oder der PPK1_{At} in der Zelle. Die Expression von eYFP-PPK2_{At} in einer $\Delta popZ_{At}$ Depletionsmutante und Inkubation mit dem Zytostatikum Mitomycin C soll außerdem zeigen, ob eine Störung der Zellpolorganisation bzw. eine Inhibierung der DNA-Segregation und Transkription Einfluss auf die Bildung und Lokalisation des PolyP-Granulums haben könnte.

4.1 Methoden

4.1.1 *Live cell imaging (time lapse)* Experimente

Um Videos wachsender und sich teilender Zellen sowohl im Durchlicht als auch in verschiedenen Fluoreszenzkanälen aufzunehmen, wurden entweder 3 μ l mit LB verdünnte Zellen (1:10) einer 24 h-Kultur (zwei Vorkulturen) oder einer unverdünnten 4 h alten Kultur auf ein LB-Agar-Pad gegeben. Nach dem Antrocknen erfolgte das Einbetten des Agar-Pads in die Vertiefung einer 35x10 mm Petrischale (ThermoFischer, Nunc™). Versiegelt wurde das Agar-Pad am Rand mit einer 1%igen Agaroselösung in 1X TAE-Puffer. Für die Aufnahmen wurde die Petrieschale in eine Inkubationskammer bei 30°C inkubiert.

4.1.2 Mitomycin C

Mitomycin C ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Zytostatika mit einer hohen unspezifischen Toxizität. Durch diese Eigenschaft ist es nicht zur antibiotischen Behandlung bakterieller Infektionen geeignet. Mitomycin C besitzt eine Urethan- sowie Chinongruppe, einen Aziridin-Ring und eine Methoxygruppe. Nach dem Abspalten der Methoxygruppe, sowie der Urethan-Seitenkette und der Öffnung des Aziridin-Rings, kann jede dieser drei Teilstrukturen kovalente Bindungen mit der DNA eingehen. Dadurch kommt es zu einem *cross-linking* der DNA und einer Inhibierung der Transkription und Segregation. Eine Freisetzung von Peroxidradikalen bewirkt zudem DNA-Strangbrüche (Tomasz, 1995).

4.1.3 Depletionsmutante *A. tumefaciens* $\Delta popZ_{At}$

In der Depletionsmutante $\Delta popZ_{At}$ (Bereitgestellt von Pamela Brown, *Missouri University*, USA) wurde $popZ_{At}$ durch eine mit IPTG induzierbare, $popZ_{At}$ -Genkassette mit dem Resistenzgen für Spectinomycin ersetzt. Die Genkassette befindet sich unter der Kontrolle eines *lac* Promotors.

4.1.4 GUS-Reportergeren Assay

Das GUS-Reportersystem (GUS: β -Glucuronidase) wurde dazu verwendet, um eine erfolgreiche Infektion von *Arabidopsis thaliana* Pflanzenzellen durch *A. tumefaciens* nachzuweisen. Hierbei wurde ein Ti-Vektorplasmid verwendet, bei dem die T-DNA durch *uidA* von *Escherichia coli* (Gen der β -Glucuronidase) ersetzt wird. Kommt es dann zu einer erfolgreichen Infektion durch das Typ-IV-Sekretionssystem, wird die Fremd-DNA in das Pflanzengenom integriert. Die infizierten *A. thaliana* Keimlinge wurden für 6 h bei 37°C mit 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronid (X-Gluc) histochemisch gefärbt. Das Enzym β -Glucuronidase hydrolysiert hierbei X-Gluc zu 5,5'-Dibromo-4,4'-dichloro-Indigo (diX-Indigo). diX-Indigo färbt die Keimlinge blau (Wu *et al.*, 2014). Der Assay wurde von Kooperationspartnern von der Universität Bochum, der Fakultät für Biologie und Biotechnologie, von der Arbeitsgruppe von Franz Narberhaus durchgeführt.

4.2 PPK2_{At}, aber nicht PPK1_{At}, liegt immer gebunden an PolyP-Granula in *A. tumefaciens* vor

Eine Überexpression einer *eyfp-ppk2_{At}* (oder *mcherry-ppk2_{At}*) Fusion in *A. tumefaciens* führte zu einer Bildung von Zellpol-lokalisierten Fluoreszenzfoki. Eine Färbung mit DAPI und anschließender Fluoreszenzmikroskopie bei einer DAPI-PolyP spezifischen Wellenlänge zeigte, dass 70%, 29% und 0,8% der Zellen entweder einen, zwei oder drei PolyP-Granula besaßen, die immer mit eYFP-PPK2_{At} (oder mCherry-PPK2_{At}) Foki überlagerten. Dies bestätigte noch einmal die Beobachtung, dass PPK2_{At} ein PolyP assoziiertes Protein ist und dass die Expression von *eyfp-ppk2_{At}* für die Lokalisation und für die Verfolgung der PolyP-Granula Synthese verwendet werden kann. Diese Gegebenheit erlaubte die PolyP-Granula Lokalisierung in lebenden Zellen für *time lapse* Experimente, während der Einsatz von zelltoxischer DAPI-Färbung vermieden werden konnte.

Zellen mit nur einem PolyP-Granulum hatten diesen generell am alten Zellpol lokalisiert (old pole, OP), was durch die Expression von *eyfp-popZ_{At}* und kombinierter DAPI-PolyP Färbung gezeigt werden konnte (Abbildung 23). eYFP-PopZ_{At} ist in *A. tumefaciens* immer am Wachstumspol lokalisiert (growth pole, GP) (Grangeon *et al.*, 2015).

Das polare Organisationsprotein Z (PopZ) ist wichtig für die Chromosomensegregation in *A. tumefaciens* und verankert das Zentromer von mindestens einem Chromosom (Chromosom I) am Zellpol (Ehrle *et al.*, 2017). *A. tumefaciens* besitzt neben dem zirkulären Chromosom I (CC) noch ein lineares Chromosom II (LC), ein kryptisches Plasmid (KP) und ein Ti-Plasmid (TiP) (Allardet-Servent *et al.*, 1994). eYFP-PopZ_{At} (am GP) und DAPI-PolyP (am OP) waren dementsprechend an gegenüberliegenden Zellpolen positioniert. Zellen von *A. tumefaciens* Wt mit mehr als nur einem PolyP-Granulum hatten das zweite nie am gleichen Pol lokalisiert. Formte sich ein zweites PolyP-Granulum, war es überwiegend am gegenüberliegenden Zellpol, oder selten zwischen den Zellpolen zusehen. Abbildung 17 zeigt den Abstand der eYFP-PPK2_{At} Foki (PolyP-Granula) zum alten Pol in Relation zur Zelllänge. Es zeigte sich, dass kurze Zellen (< 4 µm)

4.2 PPK2_{At}, aber nicht PPK1_{At}, liegt immer gebunden an PolyP-Granula in *A. tumefaciens* vor

nur ein PolyP-Granulum am alten Pol und hingegen längere Zellen (> 4 µm), tendenziell zwei PolyP-Granula an gegenüberliegenden oder zwischen den Polen besaßen.

Keine eYFP-PPK2_{At} Foki konnten gefunden werden, wenn *eyfp-ppk2_{At}* in einem PolyP freien Hintergrund ($\Delta ppk1_{At}$, $\Delta ppk2_{At}$ Doppelmutante) exprimiert wurde. Stattdessen fand sich lösliche eYFP-PPK2_{At} Fluoreszenz in den Zellen, die einherging mit fehlenden DAPI-PolyP Foki nach einer DAPI-Färbung. Diese Ergebnisse bestätigen vorangegangene Beobachtungen, dass PPK2_{At} nicht die Bildung von PolyP katalysiert (siehe 2.6). Die biochemische Charakterisierung von PPK2_{At} im vorherigen Kapitel legt ebenfalls nahe, dass dieses Enzym wichtig für das Auffüllen des NTP-Reservoirs durch den Abbau von zuvor akkumuliertem PolyP sein könnte (siehe 3.3).

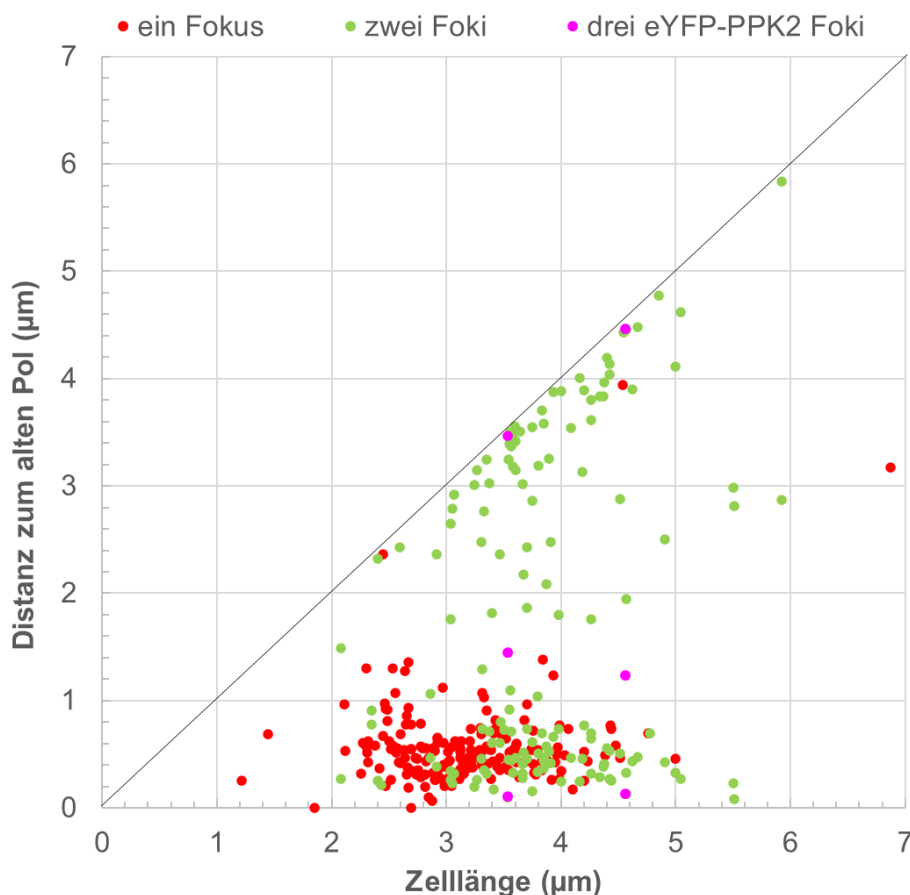


Abbildung 17: Verteilung von eYFP-PPK2_{At} Foki in *A. tumefaciens*-Zellen. Die Distanz des Fluoreszenzfoki zum alten Pol in Relation zur Zelllänge zeigt die Position der PolyP-Granula an. Während kleine Zellen (> 4 µm) nur ein Granulum am alten Pol besaßen (70,4%), hatten größere

4.2 *PPK2_{At}*, aber nicht *PPK1_{At}*, liegt immer gebunden an PolyP-Granula in *A. tumefaciens* vor

Zellen (< 4 µm) zwei (28,8%) oder sogar drei (0,8%) Granula. Der zweite, oder dritte Fluoreszenzfokus sitzt dabei entweder in der Mitte oder nahe des Wachstumspols. Es wurden n = 257 Zellen von *A. tumefaciens* pBBR1MCS2-*P_{phaC}-eyfp-ppk2_{At}* analysiert und mit der Software ImageJ in Kombination mit ObjectJ ausgewertet.

4.3 PPK1_{At} ist eng assoziiert mit der PolyP-Granula Bildung

A. tumefaciens-Mutanten mit Deletion der *ppk1_{At}* oder beider *ppks* (aber nicht mit nur der Deletion für *ppk2_{At}*) waren nicht mehr dazu in der Lage, PolyP-Granula zu bilden. Das bedeutet, dass PPK1_{At} für die Bildung von PolyP in der Zelle essentiell ist. Um mehr über die Lokalisierung der PPK1_{At} zu erfahren, wurde *ppk1_{At}* mit einer mCherry oder eYFP-Fusion in *A. tumefaciens* exprimiert. Wie bereits in Kapitel 2 gezeigt (siehe Abbildung 12A & C) führte die Plasmid-generierte Überexpression von *ppk1_{At}-mCherry* zu einer Bildung von bis zu ca. 0,5 µm langen, spindelförmigen Fluoreszenzsignalen, die vermutlich Aggregate von PPK1_{At}-mCherry Proteinen repräsentieren. Diese Form der Fluoreszenz verschwindet jedoch bei einer chromosomalen Integration von *ppk1_{At}-mCherry*, die die eigene *ppk1_{At}* im *A. tumefaciens*-Genom ersetzt. Bei diesem Stamm bildeten sich runde Fluoreszenzfoki, die eng neben dem PolyP-Granulum/eYFP-PPK2_{At} Signal sitzen (Abbildung 12B). daraus zeigte sich, dass die spindelförmige Fluoreszenz von PPK1_{At}-mCherry durch die Überexpression entsteht. Nichtsdestotrotz lag bei beiden Konstrukten das PPK1_{At}-mCherry Signal entweder in nächster Nähe zum DAPI-PolyP Fokus oder allein am Zellpol vor. Eine direkte Colokalisation mit DAPI-PolyP konnte nicht beobachtet werden.

Eine Expression von *ppk1_{At}-mCherry* und *eyfp-ppk2_{At}* zusammen in *A. tumefaciens* zeigte, dass beide Fluoreszenzsignale der Fusionsproteine eng nebeneinander, aber nicht colokalisiert vorlagen. Während eYFP-PPK2_{At} genau mit den DAPI-PolyP Signalen überlagerte, sah es bei der PPK1_{At}-mCherry so aus, als würden diese sich an eine Seite der eYFP-PPK2_{At}-Foki anlagern. Aufnahmen mit 3D-SIM (*three-dimensional structured illumination microscopy*, Abbildung 18 von Daniel Peiffer, Universität Bayreuth) bestätigten diese Interpretation und zeigten außerdem, dass das Protein eYFP-PPK2_{At} die Oberfläche des PolyP-Granulums ummantelt. Das spindelförmige PPK1_{At}-mCherry-Signal sitzt hier direkt seitlich an dem, von eYFP-PPK2_{At} umrandeten, Granulum an. Jedoch lagen auch eYFP-PPK2_{At}-Foki vor, an denen keine PPK1_{At}-mCherry Signal gebunden war. Auch in anderen Aufnahmen (Abbildung 19) gab es PPK1_{At}-mCherry Foki, die nicht in nächster Nähe zu einem DAPI-PolyP Signal vorlagen. Es könnte sich hierbei um ein Reifungsphänomen

handeln, bei dem das frisch synthetisierte PolyP-Granulum irgendwann vom PPK1_{At}-mCherry Protein getrennt wird.

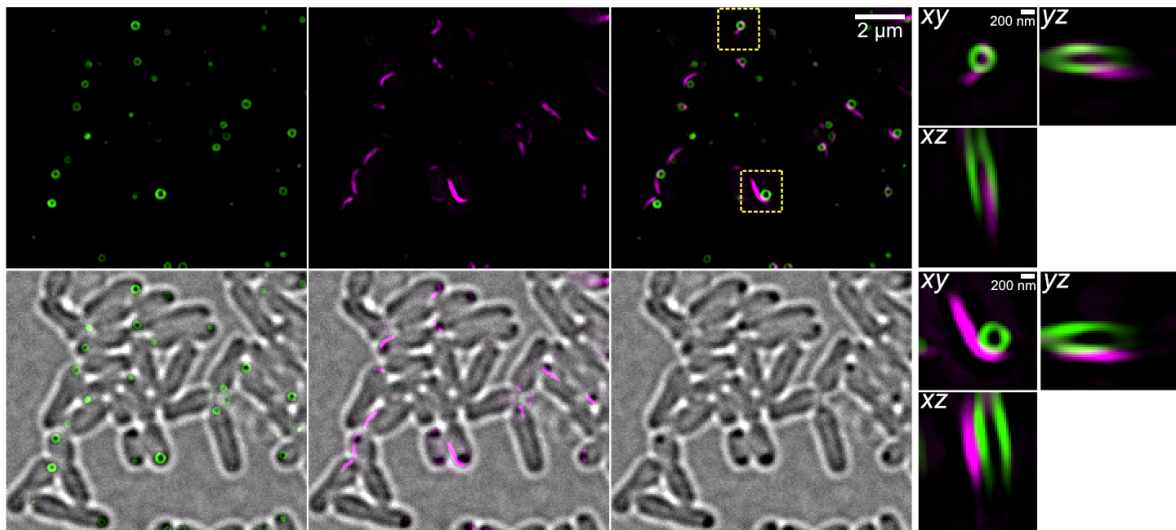


Abbildung 18: 3D-SIM Aufnahmen des Stamms *A. tumefaciens* ptrC-P_{lac}-eyfp-ppk2_{At} pBBR1MCS2-P_{phaC}-ppk1_{At}-mCherry. Die ersten drei Abbildungen von links zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (oben) und die Überlagerung mit dem Durchlichtkanal (unten erstes und zweites Bild von links), bzw. die Aufnahme des Durchlichtkanals allein (unten drittes Bild von links). eYFP-PPK2_{At} wird in grün und PPK1_{At}-mCherry-Signal in violett dargestellt. Vergrößerte Aufnahmen mit Rotation der xyz-Achse (rechts) veranschaulichen die Bindung von PPK1_{At}-mCherry an die von eYFP-PPK2_{At} ummantelte Struktur.

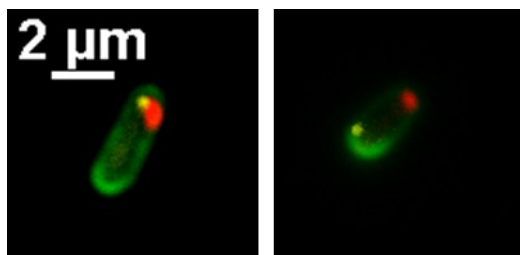


Abbildung 19: *A. tumefaciens* pBBR1MCS2-P_{phaC}-ppk1_{At}-mcherry wurde in LB-Medium kultiviert und mit DAPI, sowie mit FM1-43 gefärbt. Die Bilder zeigen die Überlagerungen aller drei Fluoreszenzkanäle und wurden mit spezifischen Filtersets für mCherry, FM1-43 und DAPI-PolyP aufgenommen. Da FM1-43 den alten Pol in *A. tumefaciens* stärker anfärbt, kann daraus Rückschluss gezogen werden, an welchem Pol das PolyP-Granulums lokalisiert ist. Die erste Abbildung zeigt den DAPI-PolyP Foki am Wachstumspol, wo er in nächster Nähe zum PPK1_{At}-mCherry Foki lokalisiert ist. Bei der zweiten Abbildung sind DAPI-PolyP und PPK1_{At}-mCherry Foki voneinander getrennt, wobei sich das PolyP am alten Zellpol aufhält. Die Zellen wurden nach zwei Vorkulturen 1:10 in die Hauptkultur überimpft und bei 30°C mit 50 µg/ml Kanamycin für 24 h kultiviert.

4.4 PPK1_{At} und PPK2_{At} bilden separate PolyP-Granula in *R. eutropha*

Wie bereits in Kapitel 3, Abbildung 16 gezeigt, war PPK2_{At} in der Lage, PolyP in der Deletionsmutante *R. eutropha* $\Delta ppk\text{-all}$, aber nicht in *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ zu synthetisieren (Kapitel 2, Abbildung 12). Gründe hierfür können vielseitig sein und beispielsweise mit unterschiedlichen Metabolitkonzentrationen in den Zellen zusammenhängen. Die *in vitro* Aktivität der PPK2_{At} zeigte deutlich, dass das Enzym auch in der Lage ist PolyP zu synthetisieren (siehe 3.3). Im Gegensatz zu *A. tumefaciens*, ummantelten die eYFP-PPK2_{At} Proteine in *R. eutropha* nicht das PolyP-Granulum, sondern sitzen, ähnlich der PPK1_{At}-mCherry, seitlich an den DAPI-PolyP Foki an. Jedoch neigte eYFP-PPK2_{At} nicht zu der starken Oligomerisierung und Schweifbildung wie PPK1_{At}-mCherry, aber die seitliche Position der PPKs relativ zum PolyP-Granulum scheint hier Hand in Hand mit der PolyP-Syntheseaktivität zu gehen. Interessanterweise bilden die PPKs von *A. tumefaciens* in *R. eutropha* in der Regel keine gemeinsamen PolyP-Granula, sondern synthetisieren es jeweils separat in der Zelle (Abbildung 20). Auch das steht im Gegensatz zu der Lokalisation beider PPKs in *A. tumefaciens*, wo diese oft in direkter Nachbarschaft zueinander anzutreffen sind (Kapitel 3, Abbildung 18).

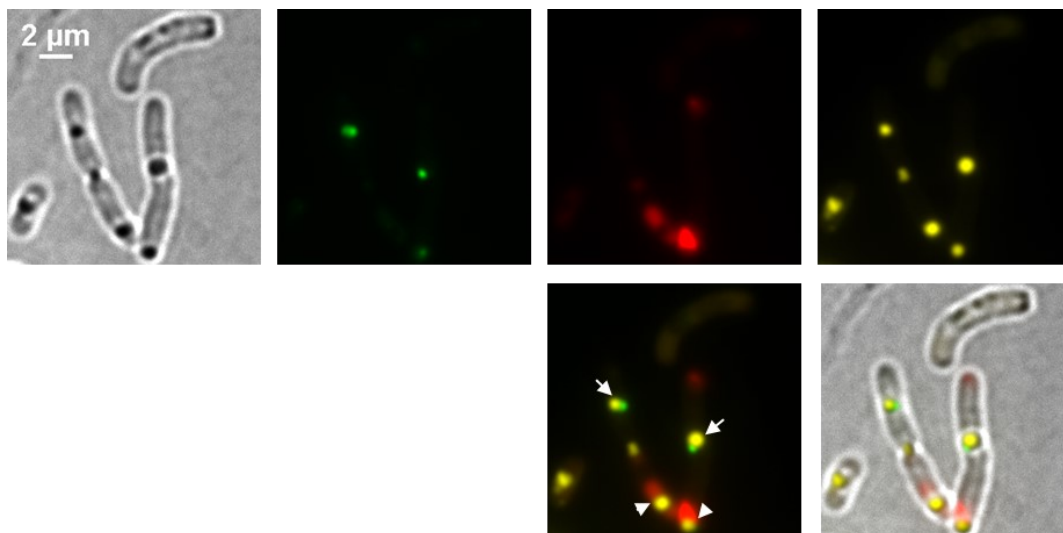


Abbildung 20: *R. eutropha* $\Delta ppk\text{-all}$ (PolyP-freie Mutante) transformiert mit den beiden Plasmiden pBBR1MCS2-P_{ppk1}-ppk1_{At}-mcherry und ptrC-P_{lac}-eyfp-ppk2_{At}. Kultivierung erfolgte in NB-Medium bei 30°C und zwei Vorkulturen mit anschließender DAPI-Färbung. Die Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch mit einem spezifischen eYFP-Filter (zweites von links), spezifischen mCherry-Filter (zweites von rechts oben), einem spezifischen DAPI-PolyP Filterset (rechts oben) und im Durchlicht (links) analysiert. Im Überlagerungsbild aller drei Fluoreszenzkanäle (zweites von rechts unten) zeigen sich DAPI-PolyP Foki entweder in Kontakt mit dem eYFP-PPK2_{At} Signal (weiße Pfeile)

4.4 *PPK1_{At}* und *PPK2_{At}* bilden separate *PolyP*-Granula in *R. eutropha*

oder in nächster Nähe zum *PPK1_{At}*-mCherry Signal (weiße Pfeilköpfe). Dass beide PPKs mit ihren entsprechenden Fluoreszenzproteinen am gleichen DAPI-PolyP Foki lokalisiert sind, war nur selten zu sehen. Das Experiment wurde in drei biologischen Replikaten durchgeführt.

4.5 PolyP-Granula zeigen subzelluläre Bewegungen während des Zellwachstums in *A. tumefaciens*

A. tumefaciens Zellen wachsen asymmetrisch am Wachstumspol (growth pole, GP), und nach der Zellteilung wird der vorherige GP der alte Pol (old pole, OP), während die neuen Pole der Tochterzellen die neuen GPs darstellen. Um herauszufinden, wo und wann neue PolyP-Granula in der Zelle entstehen und um eine mögliche Bewegung des PolyP-Granulums zu verfolgen, wurden *live cell imaging* Experimente mit dem Stamm *A. tumefaciens* pBBR1MCS2-*P_{phaC}-eyfp-ppk2_{At}* durchgeführt. Die Markierung des PolyPs in der Zelle durch eYFP-PPK2_{At} wurde bereits in Kapitel 2 (Abbildung 12) und 4 (Abbildung 18) behandelt und stellt eine Alternative zu dem zelltoxischen Farbstoff DAPI dar. Ausgewählte Bilder dieses *time lapse* Experiments werden in Abbildung 21 gezeigt (siehe auch Video 1). Im Durchlicht (Bilderreihe oben) ist das Wachstum der Zellen vom Zeitpunkt des Beginns (0 min) bis 170 min zu sehen. Zwei sich gerade im letzten Stadium der Teilung befindlichen Zellen begannen sich hier erneut zu teilen. Während dieses Vorgangs bildeten sich neue eYFP-PPK2_{At} Foki an den neuen Zellpolen (Bilderreihe eYFP-Kanal Mitte), jedoch begann zeitgleich der bereits vorhandene eYFP-PPK2_{At} Foki am alten Pol innerhalb der Zelle zu wandern. Die somit gezeigte Bewegung des PolyP-Granulums begann am alten Zellpol und endet am neuen GP der Mutterzelle, bzw. am Septum der sich teilenden Zelle (Bilderreihe Überlagerung unten). In überwiegenden Fällen verblieb das Granulum dabei in der Mutterzelle, während sich am OP der Tochterzelle bereits ein neues PolyP-Granulum gebildet hatte.

4.5 PolyP-Granula zeigen subzelluläre Bewegungen während des Zellwachstums in

A. tumefaciens

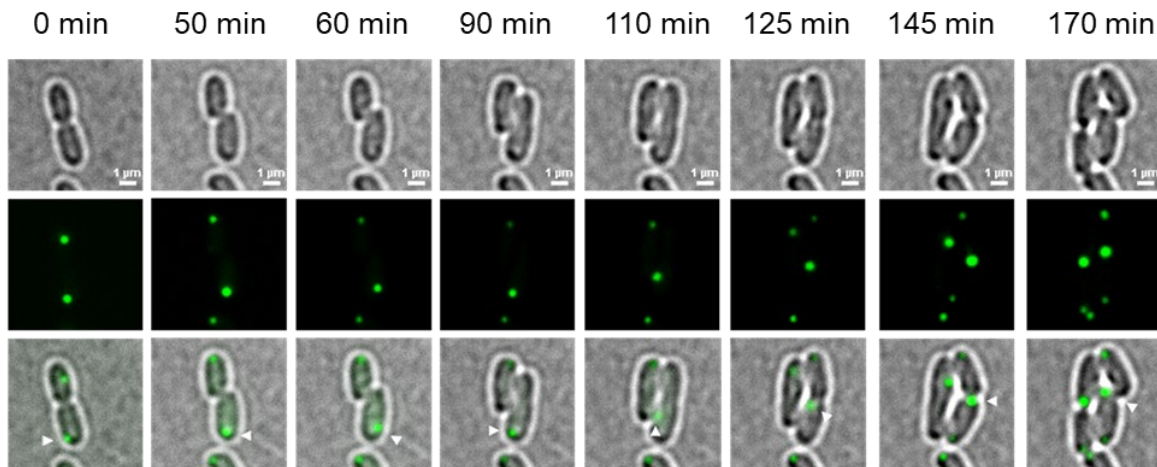


Abbildung 21: Ausschnitte aus dem *time lapse* Experiment ($t = \text{min}$) von *A. tumefaciens* pBBR1MCS2-P_{phaC}-eyfp-ppk2_{At}. Die Zellen wurden auf einem LB-Agar-Pad bei 30°C kultiviert und mit einem eYFP-spezifischen Filterset fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Von oben nach unten: Durchlicht, eYFP-Kanal und Überlagerung von Durchlicht und eYFP-Kanal. Der weiße Pfeilkopf verfolgt die Wanderbewegung des eYFP-PPK2_{At} Fokus, repräsentativ für die Position des PolyP-Granulums, in der Zelle. Die Aufnahme der Einzelbilder erfolgte alle 4 min.

<https://bwsyncandshare.kit.edu/s/wb3qqZNo2LgTG2R>

Video 1: *Time lapse* Experiment von *A. tumefaciens* pBBR1MCS2-P_{phaC}-eyfp-ppk2_{At}. Zu sehen ist eine Überlagerung des eYFP- (grün) und des Durchlichtkanals (grau). Die Zellen wurden mit zwei LB-Vorkulturen angezogen und nach 24 h 1:10 in die Hauptkultur (LB-Medium) überführt. 3 µl mit LB verdünnte Zellen (1:10) einer 24 h-Kultur wurde auf ein LB-Agar-Pad mit entsprechendem Antibiotikum (plasmidcodierte Antibiotikaresistenz, pBBR: Kanamycin 50 µg/ml,) gegeben und bei 30°C kultiviert. Die Aufnahme der Einzelbilder erfolgte alle 4 min über einen Zeitraum von 220 min.

Eine mögliche Erklärung für die Migration des PolyP-Granulums während dem Zellwachstum und der Teilung könnte die Bindung an eines der genetischen Elemente (LC, CC, KP und TiP, siehe 4.3 für Details) in *A. tumefaciens* sein, die sich während diesen Prozessen replizieren und segregieren. Die Wanderung des eYFP-PPK2_{At} Signals vom alten Pol (OP) zum Septum wurde innerhalb von 35-45 Minuten durchgeführt. Dies deckt sich ungefähr mit den Beobachtungen von Robalino-Espinosa *et al.*, 2020, die zeigten, dass sich das lineare (LC) und zirkuläre Chromosom (CC) von *A. tumefaciens* innerhalb von 40 min in der Mutterzelle replizieren und segregieren (Robalino-Espinosa *et al.*, 2020). Jedoch konnte eine Wanderbewegung nur in 29% der Zellen im *life imaging* ($n = 54$) beobachtet werden. In 71% der Fälle zeigte sich kein Wanderverhalten, und das eYFP-PPK2_{At} Signal verblieb während der Zellteilung am alten Pol (OP) (Abbildung 22). Eine mögliche Hypothese hierzu könnte das Verhalten von PPK1_{At}-mCherry liefern. Wie bereits

4.5 PolyP-Granula zeigen subzelluläre Bewegungen während des Zellwachstums in *A. tumefaciens*

aufgeführt, ist PPK1_{At} das Enzym für die PolyP-Synthese in *A. tumefaciens*. Eine Änderung der Aminosäuresequenz in der Autophosphorylierungsseite des aktiven Zentrums des Enzyms von einem Histidin zu einem Alanin zeigte bereits für die PPK1_{Ec} aus *E. coli* bzw. für die PPK1_{Ccr} aus *Caulobacter crescentus* eine Inaktivierung der PolyP-Syntheseaktivität (Kumble *et al.*, 1996, Henry und Crosson, 2013, Boutte *et al.*, 2012). Falls PPK1_{At} in seiner inaktiven Form dazu in der Lage ist, Fluoreszenzfoki an der gleichen Stelle zu bilden bzw. eine Wanderbewegung zu zeigen, obwohl kein PolyP vorhanden ist, muss das Enzym an einem Molekül bzw. an einer Struktur gebunden sein, dass diese Lokalisierung verursacht. Bei einem Vergleich der Aminosäuresequenz der jeweiligen PPKs konnte das Histidin an der Stelle 450 für die PPK1_{At} als Autophosphorylierungsseite identifiziert werden (siehe Anhang A2). Bindet die PPK1_{At} an DNA und PolyP, könnte die fehlende Wanderbewegung im überwiegenden Teil der Zellen (71%) durch das Abdiffundieren der PolyP-Granula von der PPK1_{At} erklärt werden (Alterungsprozess). Wie bereits aufgeführt, konnten PPK1_{At}-mCherry Foki in *A. tumefaciens* vom DAPI-polyP Signal getrennt vorliegen. Auf diese Hypothese wird in Abschnitt 4.7 weiter eingegangen. Ob eine Inhibierung der Chromosomensegregation Einfluss auf die PolyP-Granulabewegung haben könnte, wird im nachfolgenden Abschnitt (4.5) behandelt.

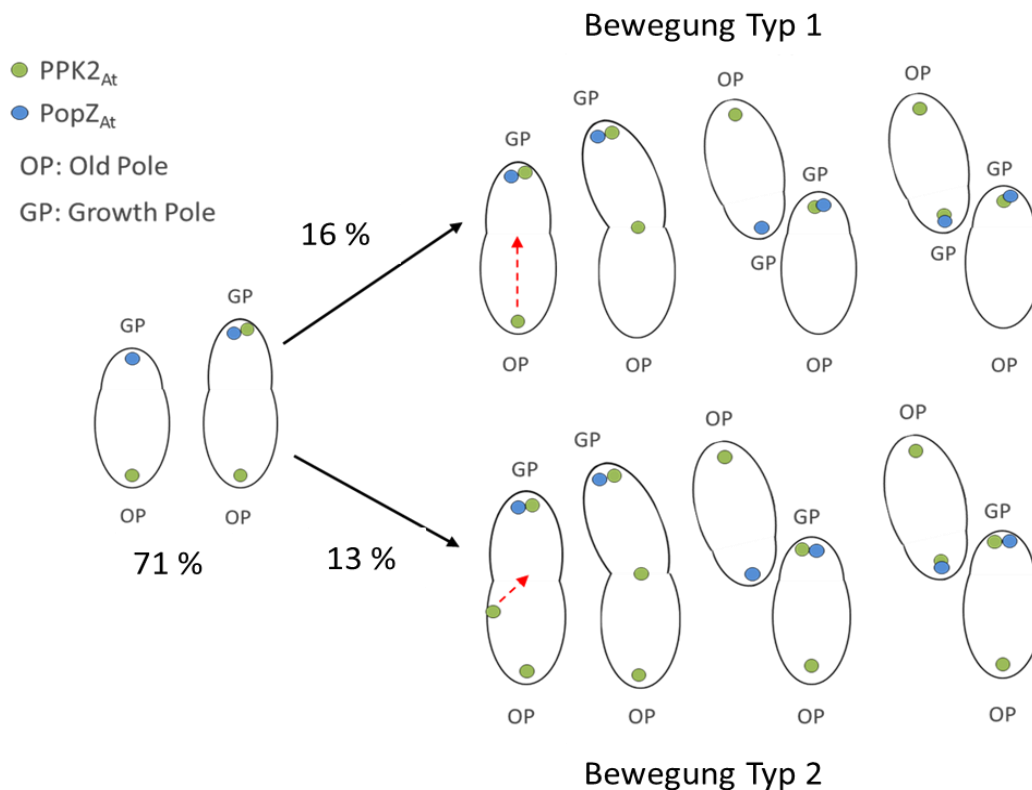


Abbildung 22: Schemata der Wanderbewegung von PPK2_{At}/PolyP in Vergleich zur Position von PopZ_{At} (Lokalisiert am Wachstumspol (GP)). In 71% der aufgenommenen Zellen (n = 54) wurde keine Bewegung des Granulums beobachtet, es bildete sich hingegen nur ein neues Granulum am gegenüberliegenden Wachstumspol (GP). Bei 29% der *A. tumefaciens* pBBR1MCS2-*P_{phaC}-eyfp-ppk2_{At}* Zellen ist eine Migration zu beobachten, die jedoch entweder vom alten Pol (OP) zum Septum (neuer Wachstumspol (GP)) stattfindet (16%), oder in Form eines dritten PolyP-Granulums in der Mitte der alten Zelle zum Septum erfolgen kann (13%).

Wenn beide PPKs von *A. tumefaciens* in *R. eutropha* Δppk -all synthetisiert wurden, zeigte sich in *time lapse* Experimenten weder von PPK1_{At}-mCherry (siehe Abschnitt 4.7 für mehr Details) noch von eYFP-PPK2_{At} eine Wanderbewegung, wie sie für eYFP-PPK2_{At} in *A. tumefaciens* pBBR1MCS2-*P_{phaC}-eyfp-ppk2_{At}*, beobachtet werden konnte (Video 2). Während PPK1_{At}-mCherry während des Wachstums in *R. eutropha* Δppk -all am Zellpol verharrete, bewegte der eYFP-PPK2_{At} Fluoreszenzfoki sich in manchen Zellen synchron mit der Elongation der Zelle mit.

<https://bwsyncandshare.kit.edu/s/t4gdYPGTyoi44RN>

Video 2: Wachstum von *R. eutropha* Δppk -all (PolyP-freie Mutante) pBBR1MCS2-*P_{ppk1}-ppk1_{At}-mcherry* und *ptrC-P_{lac}-eyfp-ppk2_{At}*. Im *time lapse* Versuch werden überlagerte Aufnahmen aller drei Fluoreszenzkanäle (eYFP, mCherry und Durchlicht) gezeigt. Die Zellen wurden mit zwei LB-

4.5 *PolyP-Granula zeigen subzelluläre Bewegungen während des Zellwachstums in*

A. tumefaciens

Vorkulturen angezogen und nach 24 h 1:10 in die Hauptkultur (LB-Medium) überführt. 3 µl einer unverdünnten 4 h alten Kultur wurde auf ein LB-Agar-Pad mit entsprechendem Antibiotikum (plasmidcodierte Antibiotikaresistenz, pBBR: Kanamycin 50 µg/ml, ptrC: Spectinomycin 300 µg/ml oder Streptomycin 100 µg/ml) gegeben und bei 30°C inkubiert. Die Einzelbilder wurden alle 4 min über einen Zeitraum von 200 min aufgenommen.

4.6 Beeinflussung der DNA-Migration während des Wachstums hat Auswirkung auf die PolyP-Granula Bewegung

Es wurde bereits gezeigt, dass PolyP-Granula bei *Pseudomonas aeruginosa* in der Nukleoidregion gebildet werden und außerdem eine Rolle bei der Terminierung des Zellzyklus durch die Hemmung der Reinitialisierung der DNA-Replikation spielen (Racki *et al.*, 2017). Außerdem ist in *C. crescentus* die DNA-Replikation und die Nukleoidsegregation ein Faktor für die Positionierung der PolyP-Granula (Henry und Crosson, 2013, Boutte *et al.*, 2012). Um zu überprüfen, ob die DNA-Migration während des Zellzyklus die Bewegung des PolyP-Granulums verursachen könnte, wurde der Depletionsstamm *A. tumefaciens* $\Delta popZ_{At}$ (zur Verfügung gestellt von Pamela Brown, *Missouri University*, USA) für weitere Experimente herangezogen. Die eingefügte Genkassette von *popZ_{At}* unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors wird durch Zugabe von IPTG exprimiert. Der Stamm ist dadurch für die Vorkultivierung (mit IPTG) genetisch deutlich stabiler. Für die *life cell imaging* Experimente wurde *A. tumefaciens* $\Delta popZ_{At}$ ohne die Zugabe von IPTG kultiviert, damit die Zellen an *PopZ_{At}* verarmen und in der Folge eine entsprechend fehlende Verankerung der DNA am Zellpol besaßen. Oft bildeten diese Zellen mehr als zwei Zellpole aus, und es kam durch fehlerhafte Teilung zum Abschnüren von Minizellen, die jedoch noch mit DAPI anfärbbare DNA enthielten, sich aber nicht mehr teilen konnten (Abbildung 23). An den zusätzlichen Zellpolen waren auch DAPI-PolyP Foki bzw. eYFP-PPK2_{At} Foki lokalisiert. Das deutet daraufhin, dass die Position der PolyP-Granula abhängig von der Definition des Zellpols ist. *Time lapse* Experimente mit dem Stamm *A. tumefaciens* $\Delta popZ_{At}$ pBBR1MCS2-P_{phaC}-*eyfp-ppk2_{At}* zeigten innerhalb von 20 min nach Start des Experiments eine starke Oszillation des eYFP-PPK2_{At} Fokus in der abgeschnürten Minizelle (Abbildung 24, Video 3). Auch in den übrigen Zellen war eine Wanderbewegung zu sehen, jedoch erschien diese ungerichtet und beschränkte sich auf die Nähe zum Zellpol. Da im $\Delta popZ_{At}$ Depletionsstamm eine Chromosomenreplikation noch möglich ist, jedoch durch die Abwesenheit von *PopZ_{At}* keine Verankerung der vervielfältigten DNA-Elemente mehr stattfinden kann, könnte die Bewegungen des eYFP-PPK2_{At} Fokus im $\Delta popZ_{At}$ Depletionsstamm indirekt durch die Segregationssysteme (ParABS-System für das CC, repABC-Kassette für

4.6 Beeinflussung der DNA-Migration während des Wachstums hat Auswirkung auf die PolyP-Granula Bewegung

LC, KP and TiP) verursacht werden. In einer Veröffentlichung der Arbeitsgruppe von G. R. Bowman zeigte eine $\Delta popZ_{At}$ Depletionsmutante mit Überexpression von *eyfp-parB*, einen eYFP-ParB Fokus am Zellpol, jedoch befand sich der zweite eYFP-ParB Fokus, von der sich zu verlagernden Kopie des Chromosoms I (CC) zum neuen Pol, zufällig lokalisiert im Zytoplasma. Der alte Pol besitzt also einen Andockmechanismus für $ParB_{At}$, unabhängig von $PopZ_{At}$ (Ehrle *et al.*, 2017). Dabei handelt es sich um $PodJ_{At}$, ein Protein, das den alten Pol identifiziert und wichtig für die Lokalisation des CCs und LCs am alten Pol ist (Robalino-Espinosa *et al.*, 2020). Jedoch wird $PopZ_{At}$, sowohl als $PodJ_{At}$ an den Zellpolen immer wieder neu auf und abgebaut (Grangeon *et al.*, 2015). Somit können diese Proteine nicht direkt für die Wanderung des PolyP-Granulums verantwortlich sein. Die Bewegung des PolyP-Granulums ist in verzweigten Zellen der $\Delta popZ_{At}$ Depletionsmutante eingeschränkt, aber da sich ein neues PolyP-Granulum auch in der $\Delta popZ_{At}$ Depletionsmutante am Wachstumspol bildet, findet die Lokalisation am neuen Pol wahrscheinlich unabhängig von $PopZ_{At}$ statt. Die Wanderung des PolyP-Granulums erfolgte im Wt vom alten Pol zum Septum bzw. zum neuen Wachstumspol der Mutterzelle. In der Depletionsmutante $popZ_{At}$ konnte diese Bewegung hingegen nicht beobachtet werden.

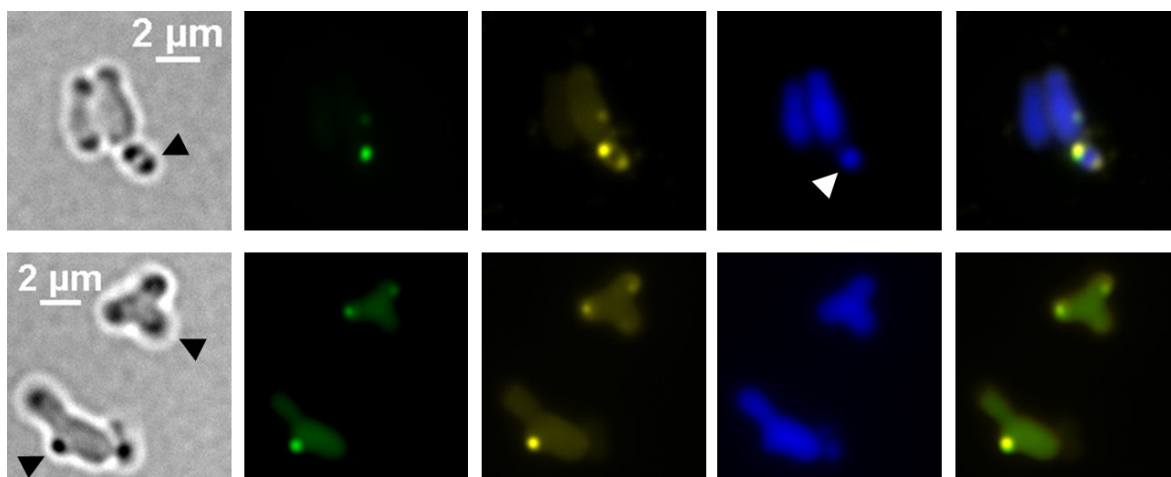


Abbildung 23: *A. tumefaciens* $\Delta popZ_{At}$ Depletionsstamm mit $pBBR1MCS2-P_{phaC}-eyfp-ppk2_{At}$, gefärbt mit DAPI. Durch die Abwesenheit von $PopZ_{At}$, bilden die Zellen Wachstumsdefekte (mehrere Zellpole und die Synthese von Minizellen) aus (Durchlicht, schwarzer Pfeilkopf). Die Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch mit eYFP, DAPI-PolyP und DAPI-DNA spezifischen Filtersets analysiert. eYFP-PPK2_{At} Foki (zweites Bild von links) und DAPI-PolyP Foki (drittes Bild von links) colokalisieren (Überlagerungsbilder rechts). Die DAPI-DNA Aufnahmen (zweite von rechts) zeigen eine homogene Fluoreszenz, die auch in der abgeschnürten Minizelle (weißer Pfeilkopf) zu sehen ist. Nach zwei

4.6 Beeinflussung der DNA-Migration während des Wachstums hat Auswirkung auf die PolyP-Granula Bewegung

Vorkulturen wurden die Zellen 1:10 in die Hauptkultur überimpft und für 24 h bei 30°C in LB-Medium mit Kanamycin (50 µg/ml) inkubiert.

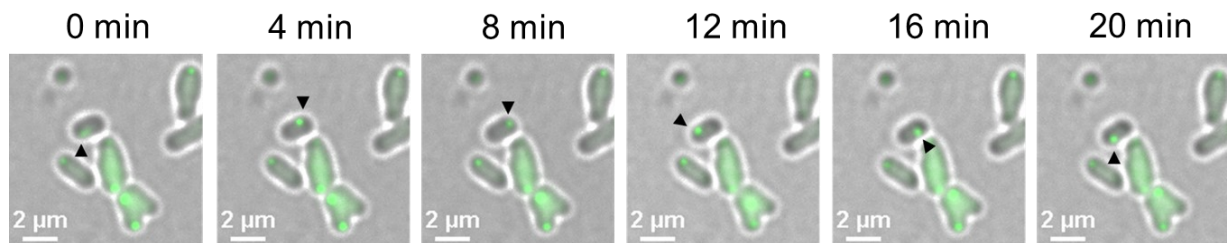


Abbildung 24: Ausschnitte aus dem *time lapse* Experiment mit *A. tumefaciens* $\Delta popZ_{At}$ Depletionsstamm mit $pBBR1MCS2-P_{phaC}-eyfp-ppk2_{At}$. Der schwarze Pfeilkopf verfolgt die oszillierende Bewegung des eYFP-PPK2_{At} Fokus in der Zelle. Die Zellen wurden nur in den beiden Vorkulturen in Gegenwart von 0.5 mM IPTG bei 30°C kultiviert. 3 µl mit LB verdünnte Zellen (1:10) einer 24 h-Kultur wurden auf ein LB-Agar-Pad mit Kanamycin (50 µg/ml) gegeben. Die Bilder zeigen eine Überlagerung aus dem Durchlicht (grau) und dem eYFP-Kanal (grün). Die Aufnahme der Einzelbilder erfolgte alle 4 min.

<https://bwsyncandshare.kit.edu/s/QL3gHKTSBZRM5fF>

Video 3: *Time lapse* Experiment mit *A. tumefaciens* $\Delta popZ_{At}$ Depletionsstamm mit $pBBR1MCS2-P_{phaC}-eyfp-ppk2_{At}$. Zu sehen ist eine Überlagerung des eYFP- (grün) und des Durchlichtkanals (grau). Die Aufnahme der Einzelbilder erfolgte alle 4 min über einen Zeitraum von 220 min. Die Zellen wurden nur in den beiden Vorkulturen in Gegenwart von 0.5 mM IPTG kultiviert. 3 µl mit LB verdünnte Zellen (1:10) einer 24 h-Kultur wurden auf ein LB-Agar-Pad mit Kanamycin (50 µg/ml) gegeben und bei 30°C inkubiert.

Mitomycin C interkaliert mit doppelsträngiger DNA. Durch dieses *cross-linking* kommt es zu einer Unterbindung der Replikation bzw. der Transkription und damit auch zur Inhibierung der DNA-Migration. Um festzustellen, ob dies Einfluss auf die Wanderung des PolyP-Granulums besitzt, wurde ein *time lapse* Experiment mit dem *A. tumefaciens* Stamm $ptrC-P_{lac}-eyfp-ppk2_{At}$ durchgeführt. Die Zellen wurden zuvor für 12 h in 2 µg/ml Mitomycin C inkubiert und auf ein Agar-Pad mit LB, entsprechendem Antibiotikum und IPTG, zum Induzieren der *eyfp-ppk2_{At}* Expression durch den *lac*-Promotor, gegeben. Das Zytostatikum verursachte eine starke Verzweigung der Zellen, die mehrere Zellpole besaßen und ebenfalls, wie die $\Delta popZ_{At}$ Depletionsmutante, Minizellen abschnürten (Abbildungen 25).

4.6 Beeinflussung der DNA-Migration während des Wachstums hat Auswirkung auf die PolyP-Granula Bewegung

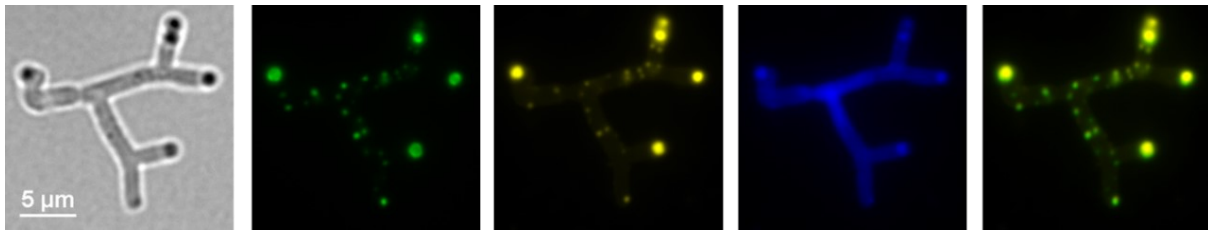


Abbildung 25: *A. tumefaciens* ptrC- P_{lac} -eyfp-ppk2_{At} gefärbt mit DAPI und für 12 h kultiviert mit 2 µg/ml Mitomycin C in LB-Medium. Von links nach rechts: Durchlicht, eYFP-PPK2_{At} (grün), DAPI-PolyP (gelb), DAPI-DNA (blau) und Überlagerung des eYFP und DAPI-PolyP Signals. Anmerkung: Das Fluoreszenzsignal für DAPI-PolyP ist so stark, dass es in den DAPI-DNA Kanal überstrahlt. Nach zwei Vorkulturen, wurde die Hauptkultur 1:10 angeimpft und bei 30°C mit Streptomycin (100 µg/ml) unter kontinuierlichem schütteln inkubiert.

Um die Bewegung der DNA in der Zelle genauer zu verfolgen, wurde *mCherry-parB_{At}* (oder *parB_{At}-eyfp*) in *A. tumefaciens* exprimiert. ParB ist Teil des *parABS*-Systems für die Chromosomensegregation und ein DNA bindendes Protein. Zusammen mit der ATPase, ParA und der *parS*-Sequenz ist ParB zuständig für die akkurate Aufteilung des CCs zwischen Mutter- und Tochterzelle. ParB bindet an die *parS*-Sequenz. Dieser ParB-*parS* Komplex bindet an ATP gebundenes ParA, was dessen ATPase Aktivität stimuliert und die Dissoziation von der DNA verursacht. Dieser Vorgang induziert die Wanderung der replizierten DNA in die Tochterzelle (Surtees und Funnell, 2003, Robalino-Espinosa *et al.*, 2020). Der Stamm *A. tumefaciens* pBBR1MCS2- P_{phaC} -*parB_{At}-eyfp* zeigte in Abwesenheit von Mitomycin C die erwartete Bewegung des ParB_{At}-eYFP Fokis im *time lapse* Experiment (Abbildung 26). Wenn die gleichen Zellen jedoch vorher für 12 h mit 2 µg/ml Mitomycin C kultiviert worden sind, ist die Wanderung des ParB_{At}-eYFP Fokis inhibiert, obwohl die Zellelongation noch weiter voranschreitet. Auch bildeten die Zellen ein abnormales Längenwachstum aus und besaßen mehrere Zellpole (Abbildung 27).

4.6 Beeinflussung der DNA-Migration während des Wachstums hat Auswirkung auf die PolyP-Granula Bewegung

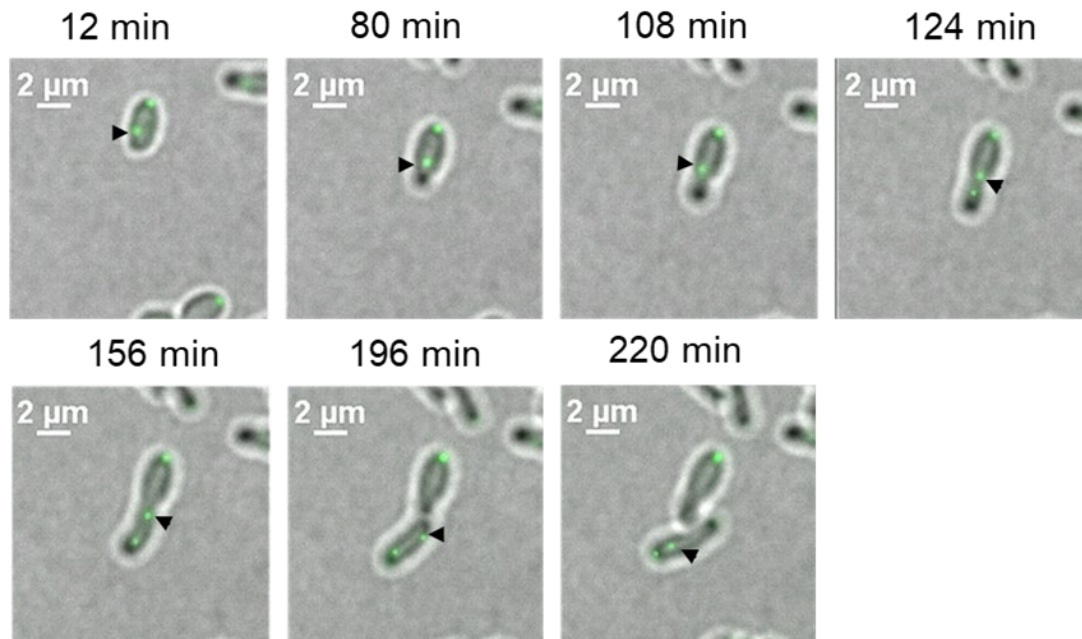


Abbildung 26: Ausgewählte Ausschnitte aus einem time lapse Experiment ($t = \text{min}$) mit *A. tumefaciens* pBBR1MCS2- P_{phaC} - $parB_{At}$ -*eyfp*. Eine Kultivierung der Zellen erfolgte 12 h in LB - Medium (zwei Vorkulturen) bei 30°C mit entsprechendem Antibiotikum (Kanamycin 50µg/ml), bevor sie auf ein LB-Agar-Pad aufgetragen wurden. Aufnahmen erfolgten alle 4 min. Die Bilder zeigen eine Überlagerung des eYFP- und des Durchlichtkanals.

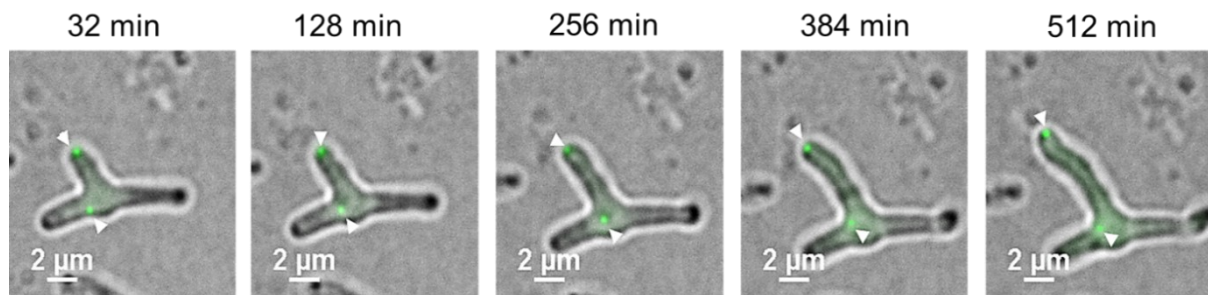


Abbildung 27: Ausgewählte Ausschnitte aus einem time lapse Experiment ($t = \text{min}$) mit *A. tumefaciens* pBBR1MCS2- P_{phaC} - $parB_{At}$ -*eyfp*. Die Zellen wurden zuvor für 12 h in LB-Medium (zwei Vorkulturen) bei 30°C mit 2 µg/ml Mitomycin C und entsprechendem Antibiotikum (Kanamycin 50µg/ml) kultiviert, bevor sie auf ein LB-Agar-Pad mit Antibiotikum aufgetragen wurden. Danach wurden sie bei 30°C inkubiert. Aufnahmen erfolgten alle 4 min. Die Bilder zeigen eine Überlagerung des eYFP- und des Durchlichtkanals. Trotz Wachstum ist nur eine minimale Bewegung des eYFP- $ParB_{At}$ Signals (weißer Pfeilkopf) zu sehen.

Die Expression von $parB_{At}$ -*mCherry* und $eyfp$ - $ppk2_{At}$ in *A. tumefaciens* pBBR1MCS2- P_{phaC} - $parB_{At}$ -*mcherry* $ptrC$ - P_{lac} - $eyfp$ - $ppk2_{At}$ kultiviert mit 2 µg/ml Mitomycin C zeigte ähnliche Ergebnisse wie in Abbildung 27. Der Bewegungsradius des

4.6 Beeinflussung der DNA-Migration während des Wachstums hat Auswirkung auf die PolyP-Granula Bewegung

Fluoreszenzfokus von eYFP-PPK2_{At} wurde deutlich auf einen Bereich an und vor dem Zellpol eingeschränkt und in den Minizellen konnte, ähnlich wie in der $\Delta popZ_{At}$ Depletionsmutante, eine schnelle Oszillation des Fokus festgestellt werden (siehe Abbildung 28). Jedoch zeigte der eYFP-PPK2_{At} Fokus in Gegenwart von Mitomycin C in den elongierten Zellen eine kurze Bewegung vom Zellpol weg und wieder zurück. Eventuell handelte es sich hier um eine noch erfolgreiche Transkription und den Versuch der Segregation mit nur teilweise „verklebter“ DNA durch Mitomycin C. Unklar bleibt jedoch, warum die eYFP-PPK2_{At} Foki wieder zurück zum Zellpol wanderten. Eine unvollständige Segregation könnte auch erklären, warum sich die ParB-mCherry Foki in der Zellmitte befanden. ParB bindet an die ParS-site, die sich in der Nähe des *origin of replication* befindet. Wenn diese sich nicht mehr am Zellpol befindet, wie es bei *A. tumefaciens* üblich wäre, muss von einer teilweise noch durchgeführten Segregation ausgegangen werden, die jedoch nicht abgeschlossen werden konnte. Vielleicht auch durch die Länge der Zelle beeinflusst, konnte ParB_{At}-mCherry nicht zum gegenüberliegenden Pol wandern (siehe Abbildung 27 und Video 4). Mitomycin C beeinflusst somit die Wanderbewegung des PolyP-Granulums (eYFP-PPK2_{At}), sowie der DNA (ParB_{At}-mCherry, bzw. ParB_{At}-eYFP). Jedoch zeigten beide keine synchrone Bewegung, sowohl mit als auch ohne Mitomycin C (Video 4 und 5). Daher kann zumindest ausgeschlossen werden, dass die PolyP-Granula wie ParB_{At} an das Chromosom I (CC) gebunden sind. Jedoch verbleiben noch das LC, KP und das TiP als mögliche Interaktionspartner.

4.6 Beeinflussung der DNA-Migration während des Wachstums hat Auswirkung auf die PolyP-Granula Bewegung

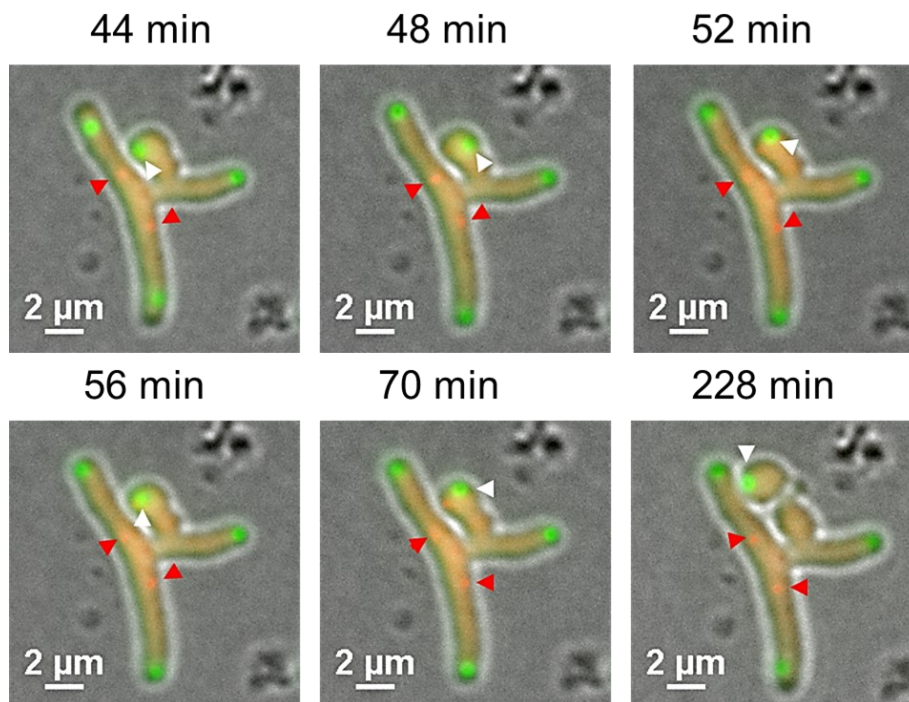


Abbildung 28: Ausgewählte Ausschnitte aus dem time lapse Experiment ($t = \text{min}$) mit *A. tumefaciens* pBBR1MCS2- P_{phaC} - $parB_{At}$ - $mcherry$ ptrC- P_{lac} - $eyfp$ - $ppk2_{At}$. Die Zellen wurden zuvor für 18 h in LB-Medium (zwei Vorkulturen) bei 30°C mit 2 µg/ml Mitomycin C und entsprechenden Antibiotika (plasmidcodiert, pBBR: Kanamycin 50 µg/ml, ptrC: Streptomycin 100 µg/ml) inkubiert. Der weiße Pfeilkopf zeigt auf einen eYFP-PPK2_{At} Fokus, während die roten Pfeilköpfe auf das schwache ParB_{At}-mCherry Signal deuten. Die Bilder zeigen eine Überlagerung des Durchlichtkanals (grau), des eYFP-Kanals (grün) und des mCherry-Kanals (rot). Die Aufnahme der Einzelbilder erfolgte alle 4 min.

<https://bwsyncandshare.kit.edu/s/dfL2z3ZTEX3EY6D>

Video 4: Time lapse Experiment mit *A. tumefaciens* pBBR1MCS2- P_{phaC} - $parB_{At}$ - $mcherry$ ptrC- P_{lac} - $eyfp$ - $ppk2_{At}$. Die Zellen wurden zuvor in zwei Vorkulturen angezogen und dann nach 24 h in die Hauptkultur überimpft. Es folgte eine Inkubation für 18 h in LB-Medium bei 30°C mit 2 µg/ml Mitomycin C und entsprechenden Antibiotika (plasmidcodiert, pBBR: Kanamycin 50 µg/ml, ptrC: Streptomycin 100 µg/ml). Zu sehen ist eine Überlagerung des eYFP- (grün) und des mCherry-Kanals (rot). Die Aufnahme der Einzelbilder erfolgte alle 4 min über einen Zeitraum von 220 min.

<https://bwsyncandshare.kit.edu/s/dHq5iP3iLxiq6W>

Video 5: Time lapse Experiment mit *A. tumefaciens* pBBR1MCS2- P_{phaC} - $parB_{At}$ - $mcherry$ ptrC- P_{lac} - $eyfp$ - $ppk2_{At}$. Zu sehen ist eine Überlagerung des eYFP- (grün), mCherry-Kanal (rot). Die Aufnahme der Einzelbilder erfolgte alle 4 min über einen Zeitraum von 220 min. Nach zwei Vorkulturen wurde die Hauptkultur 1:10 mit Zellen aus der stationären Phase (24h) angeimpft und bei 30°C inkubiert. 3 µl mit LB verdünnte Zellen (1:10) einer 24 h alten Hauptkultur wurden auf ein LB-Agar-Pad mit Kanamycin (50 µg/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) gegeben und bei 30°C kultiviert.

4.7 PPK1_{At} als mögliches Bindeglied zwischen DNA und PolyP-Granulum

Da eYFP-PPK2_{At} im $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ Hintergrund (kein PolyP) als homogene Fluoreszenz vorlag und folglich die Lokalisation abhängig von der Gegenwart von PolyP ist, scheidet die PPK2_{At} als möglicher DNA-Bindepartmenter aus. PPK1_{At}-mCherry hingegen, war im $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ Hintergrund fokussiert. Da das Enzym jedoch für die PolyP-Synthese in *A. tumefaciens* zuständig ist, kann PPK1_{At}-mCherry auch an das PolyP-Granulum gebunden sein, um sich zu lokalisieren. Wie bereits in Abschnitt 4.5 beschrieben, soll hier die Variante PPK1(H450A)_{At} markiert mit mCherry Aufschluss darüber geben, wo das inaktive Enzym ohne die Anwesenheit von PolyP in der Zelle lokalisiert ist und ob noch Fluoreszenzfoki gebildet werden. Abbildung 29 zeigt den Stamm *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ pBBR1MCS2-P_{phaC}-ppk1(H450A)_{At}-mcherry fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Hierbei ist zu sehen, dass in den Zellen auch bei Abwesenheit von PolyP, PPK1(H450A)_{At}-mCherry spezifische Foki gebildet werden. PPK1_{At} muss also noch andere mögliche Bindestellen besitzen, die eine Fokussierung des PPK1(H450A)_{At}-mCherry Signals verursachen. *Time lapse* Experimente mit dem Stamm *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ pBBR1MCS2-P_{phaC}-ppk1(H450A)_{At}-mcherry zeigten genauso eine Wanderung des mCherry Signals wie bei *A. tumefaciens* pBBR1MCS2-P_{phaC}-ppk1_{At}-mcherry (Vergleiche Video 6 mit Abbildung 30 oder Video 7). Es könnte sich hierbei um eine indirekte Bewegung handeln, die durch die Bindung von PPK1_{At} an die DNA zu stande kam.

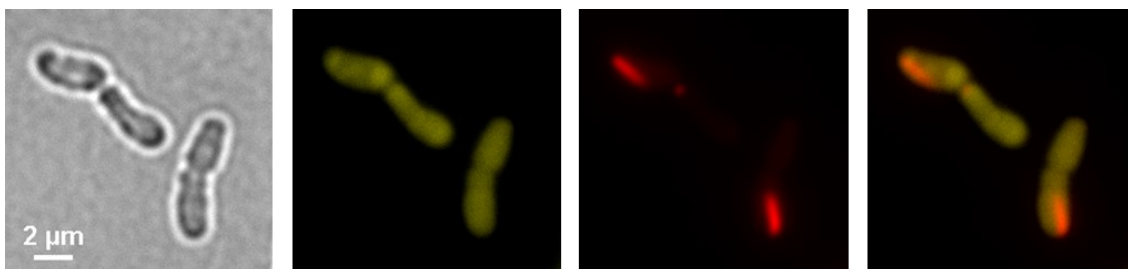


Abbildung 29: *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ pBBR1MCS2-P_{phaC}-ppk1(H450A)_{At}-mcherry kultiviert in LB-Medium bei 30°C. Von rechts nach links: Durchlicht, DAPI-PolyP, PPK1(H450A)_{At}-mCherry, Überlagerung von DAPI-PolyP und mCherry-Kanal. Da kein PolyP in den Zellen vorhanden ist, ist nur die Hintergrundfluoreszenz der mit DAPI gefärbten Zellen zu erkennen. Die Aufnahmen

4.7 PPK1_{At} als mögliches Bindeglied zwischen DNA und PolyP-Granulum

erfolgten mit Durchlicht, DAPI-PolyP und mCherry spezifischen Filtersets. Es wurden drei biologischen Replikate untersucht.

<https://bwsyncandshare.kit.edu/s/CedxNfTXWPM37fN>

Video 6: A. tumefaciens pBBR1MCS2-P_{phaC}-ppk1_{At}-mcherry time lapse Experiment. Es ist eine Überlagerung des mCherry- und des Durchlichtkanals zu sehen. Aufnahmen erfolgten alle 4 min über einen Zeitraum von 180 min. Nach zwei Vorkulturen wurde die Hauptkultur 1:10 mit Zellen aus der exponentiellen Phase (24h) angeimpft und bei 30°C, unter kontinuierlichem schütteln, inkubiert. 3 µl mit LB verdünnte Zellen (1:10) einer 24 h alten Hauptkultur wurden auf ein LB-Agar-Pad mit Kanamycin (50 µg/ml) gegeben und bei 30°C kultiviert.

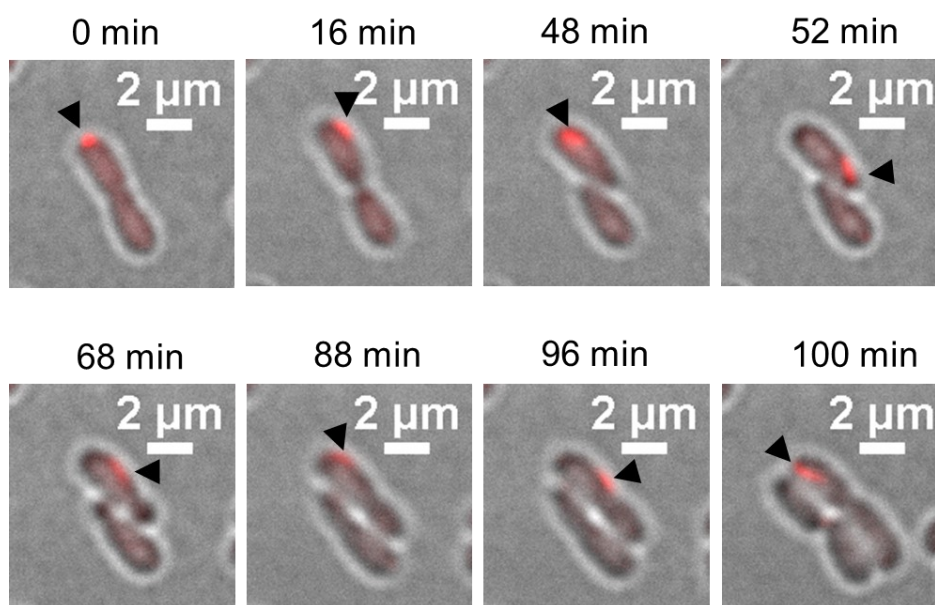


Abbildung 30: Ausgewählte Ausschnitte aus dem time lapse Experiment (t = min) mit A. tumefaciens Δppk1_{At} Δppk2_{At} pBBR1MCS2-P_{ppk1}-ppk1(H450A)_{At}-mcherry. Die Zellen wurden zuvor für 18 h in LB-Medium kultiviert. Danach wurden 3 µl mit LB verdünnte Zellen (1:10) einer 24 h alten Hauptkultur auf ein LB-Agar-Pad mit Kanamycin (50 µg/ml) gegeben und bei 30°C kultiviert. Der schwarze Pfeilkopf folgt der Bewegung des PPK1_{At}-mCherry Fokus. Die Bilder zeigen eine Überlagerung des Durchlichtkanals (grau) und des mCherry-Kanals (rot). Die Aufnahme der Einzelbilder erfolgte alle 4 min.

<https://bwsyncandshare.kit.edu/s/KGWMPc8LEod2eH5>

Video 7: A. tumefaciens Δppk1_{At} Δppk2_{At} pBBR1MCS2-P_{ppk1}-ppk1(H450A)_{At}-mcherry time lapse Experiment. Die Zellen wurden zuvor für 18 h in LB-Medium kultiviert. Danach wurden 3 µl mit LB verdünnte Zellen (1:10) einer 24 h alten Hauptkultur auf ein LB-Agar-Pad mit Kanamycin (50 µg/ml) gegeben und bei 30°C kultiviert. Es ist eine Überlagerung des mCherry- und des Durchlichtkanals zu sehen. Aufnahmen erfolgten alle 4 min über einen Zeitraum von 180 min.

4.7 PPK1_{At} als mögliches Bindeglied zwischen DNA und PolyP-Granulum

Eine genauere Analyse der Position von PPK1_{At}-mCherry im Vergleich zu PPK1(H450A)_{At}-mCherry im PolyP freien Hintergrund von *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At}$ $\Delta ppk2_{At}$ wird in Abbildung 31 dargestellt. Hierbei ist anzumerken, dass die PPK1(H450A)_{At}-mCherry Foki im Gegensatz zu den PPK1_{At}-mCherry Foki in *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At}$ $\Delta ppk2_{At}$ weniger stark an den Zellpolen lokalisiert und dafür mehr in der Zellmitte vorzufinden sind, als die aktive Enzymvariante. Dies könnte an dem fehlenden PolyP-Granulum liegen, das hier eventuell die PPK1_{At} näher am Zellpol positioniert. Wurde PPK1(H450A)_{At}-mCherry hingegen im Wt Hintergrund synthetisiert, liegt die Position des Fluoreszenzsignals wieder mehr gerichtet am Zellpol vor (Abbildung 32) Hier co-oligomerisierte PPK1(H450A)_{At}-mCherry wahrscheinlich mit der Wt-PPK1_{At} und wurde dadurch mit dem PolyP-Granulum assoziiert. Ohne PolyP, scheint die Lokalisation von PPK1(H450A)_{At}-mCherry gestört zu sein.

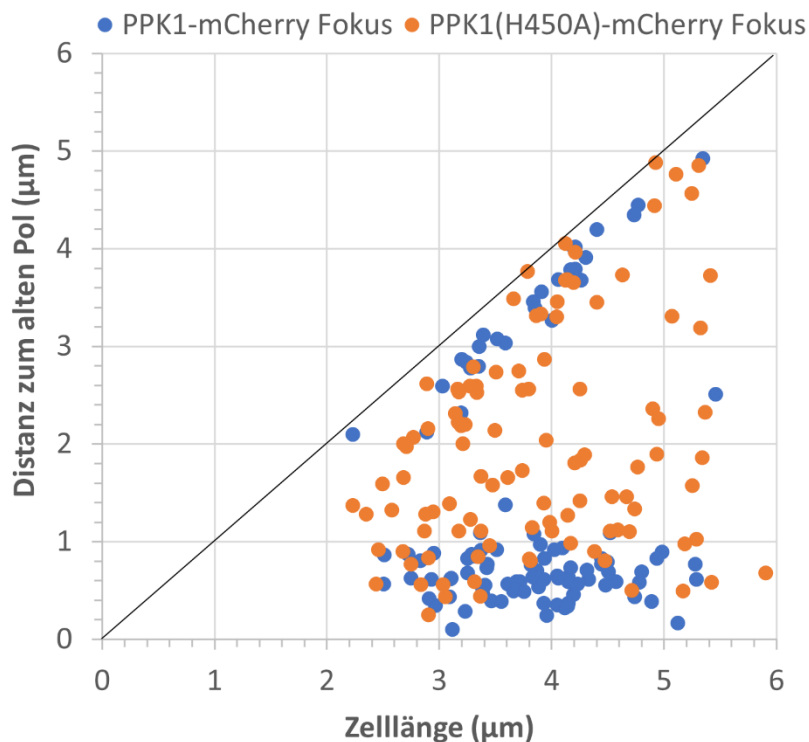


Abbildung 31: Verteilung von PPK1_{At}-mCherry und PPK1(H450A)_{At}-mCherry Foki in *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At}$ $\Delta ppk2_{At}$ Zellen. Die Distanz des Fluoreszenzfoki zum alten Pol in Relation zur Zelllänge zeigt die Position der PPK1_{At}-mCherry (blaue Punkte) bzw. der PPK1(H450A)_{At}-mCherry Foki (orangene Punkte) an. Während die Foki für PPK1_{At}-mCherry an den Zellpolen positioniert sind, lokalisieren die PPK1(H450A)_{At}-mCherry Foki sich auch in der Zellmitte, weiter entfernt vom Pol. Es wurden n = 107 (PPK1_{At}-mCherry) und n = 115 (PPK1(H450A)_{At}-mCherry) Zellen von *A. tumefaciens*

4.7 PPK1_{At} als mögliches Bindeglied zwischen DNA und PolyP-Granulum

$\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ pBBR1MCS2-P_{phaC}-ppk1_{At}-mcherry bzw. pBBR1MCS2-P_{phaC}-ppk1(H450A)_{At}-mcherry analysiert und mit der Software ImageJ in Kombination mit ObjectJ ausgewertet.

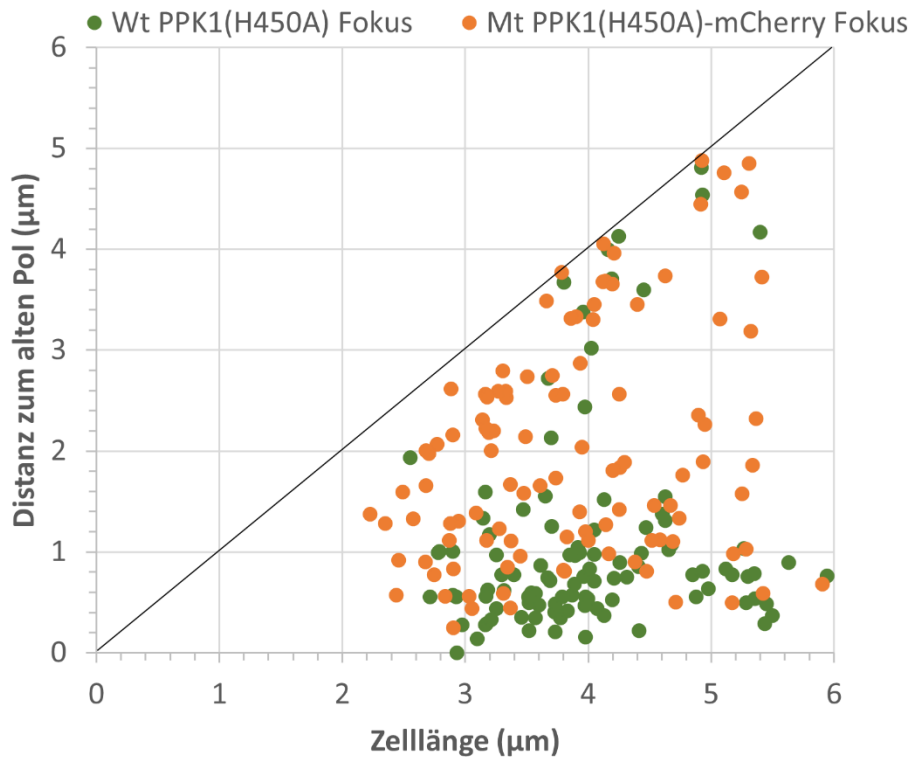


Abbildung 32: Verteilung von PPK1_{At}-mCherry und PPK1(H450A)_{At}-mCherry Foki in *A. tumefaciens* Wt und $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ (Mt, Mutante) Hintergrund. Die Distanz des Fluoreszenzfoki zum alten Pol in Relation zur Zelllänge zeigt die Position der PPK1_{At}-mCherry bzw. der PPK1(H450A)_{At}-mCherry Foki an. In der Doppelmutante $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ befanden sich PPK1(H450A)_{At}-mCherry Foki mehr zufällig verteilt in den Zellen. Es wurden n = 105 (Wt PPK1(H450A)_{At}-mCherry) und n = 115 (Mt PPK1(H450A)_{At}-mCherry) Zellen von *A. tumefaciens* Wt pBBR1MCS2-P_{phaC}-ppk1(H450A)_{At}-mcherry bzw. *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ pBBR1MCS2-P_{phaC}-ppk1(H450A)_{At}-mcherry analysiert und mit der Software ImageJ in Kombination mit ObjectJ ausgewertet.

Um zu testen, wie sich die Wanderung des PPK1(H450A)_{At}-mCherry Fokus bei inhibierter Segregation verhält, wurde der Stamm *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ pBBR1MCS2-P_{ppk1}-ppk1(H450A)_{At}-mcherry vor Beginn des *time lapse* Experiments für 18 h mit 2 µg/ml Mitomycin C in LB-Medium inkubiert. Die Zellen zeigten die charakteristischen Verzweigungen nach der Mitomycinbehandlung und eine inhibierte Wanderung des PPK1(H450A)_{At}-mCherry Fokus (Video 8). Ob PPK1_{At} DNA bindende Eigenschaften besitzt, wurde in einem *mobility shift assay* mit aufgereinigter PPK1_{At}-His untersucht (Abbildung 33A). Mit steigender Konzentration von PPK1_{At}-His stieg auch die Menge an gebundener PPK1_{At}-His an das unspezifische DNA (*eyfp*)-Fragment an, sichtbar durch die verringerte Mobilität des

DNA-Fragments, die durch die DNA-PPK1_{At}-His Bindung entsteht (*shift* von 719 bp zu über 10 000 bp). Da immer noch ungebundene DNA (719 bp) auch bei höheren PPK1_{At}-His Mengen im Assay vorlag, hätte die Konzentration des Enzyms durchaus noch gesteigert werden können. Dies war jedoch aufgrund der geringen Konzentration der PPK_{At}-His nach dem Aufreinigen nicht möglich. Eine Hitzeinaktivierung der Probe zerstörte die Bindung an die DNA wieder. Auch die aufgereinigte His-PPK2_{At} wurde hinsichtlich ihrer DNA-Bindeeigschaft hin untersucht. Es zeigte sich eine durchgängige Affinität zum *eyfp*-Fragment, selbst bei niedrigen Konzentrationen von His-PPK2_{At} (1,5 µM). Jedoch führte eine Hitzeinaktivierung nicht zum Ablösen des Enzyms von der DNA. Es musste sich also bei der Bindung und den zu sehenden *shift* um ein Artefakt handeln (Abbildung 33B). Die Negativkontrolle mit steigender Konzentration an BSA zeigte keinerlei Bindeaffinität zur DNA (Abbildung 33C).

<https://bwsyncandshare.kit.edu/s/LY2zonFypjEEH6Z>

Video 8: *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At}$ $\Delta ppk2_{At}$ pBBR1MCS2-P_{ppk1}-ppk1(H450A)_{At}-mcherry time lapse Experiment. Die Zellen wurden zuvor für 18 h in LB-Medium mit 2 µg/ml Mitomycin C inkubiert. Es ist eine Überlagerung des mCherry- und des Durchlichtkanals zu sehen. Aufnahmen erfolgten alle 4 min über einen Zeitraum von 180 min.

4.7 PPK1_{At} als mögliches Bindeglied zwischen DNA und PolyP-Granulum

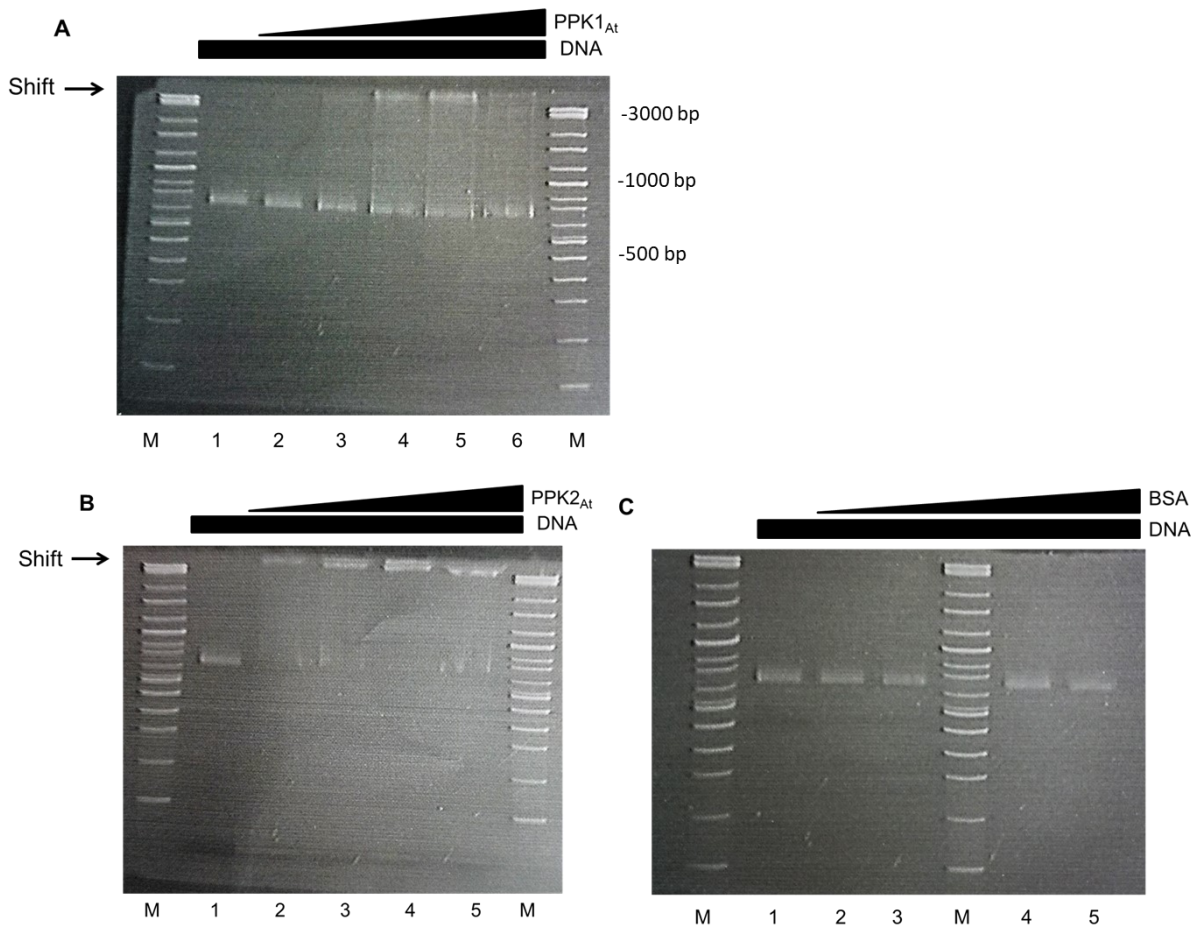


Abbildung 33: Mobility shift assay mit 10%igen nativen Polyacrylamidgelen mit 240 μ M DNA (*eyfp*, 719 bp) und steigende Konzentration der Proteine PPK1_{At}-His, His-PPK2_{At} und BSA. 1 Kb DNA-Leiter (0,1-10 kb) (*Quick load, 2-log DNA ladder, New England BioLabs*) wurde als Marker (M) verwendet. **(A)** PPK1_{At}-His Konzentration von 0 (1), 1,5 (2), 3 (3), 6 (4) und 9 μ M (5) wurden aufgetragen. Bei Probe 6 handelt es sich ebenfalls um 9 μ M PPK1_{At}-His, jedoch erfolgte vor dem Auftragen eine Hitzeinaktivierung bei 95°C für 5 min. **(B)** His-PPK2_{At} Konzentration von 0 (1), 3 (2), 6 (3) und 9 μ M (4) wurden aufgetragen. Bei Probe 5 handelt es sich ebenfalls um 9 μ M His-PPK2_{At}, jedoch erfolgte vor dem Auftragen eine Hitzeinaktivierung bei 95°C für 5 min. **(C)** zeigt die Kontrolle mit 0 (1), 1,5 (2), 3 (3), 6 (4) und 9 μ M (5) BSA. Es erfolgte keine Bindung des Proteins an die DNA. Das Experiment wurde in drei technischen Replikaten durchgeführt und DNA, Protein und Assay-Puffer (0,1 M Tris-HCl pH 8, 2 mM DTT und 5 mM MgCl₂) wurden vor dem Auftragen für 20 min bei RT inkubiert. Nach der Gelelektrophorese bei 30 mA wurden die Gele in EtBr gefärbt und unter UV-Licht betrachtet.

4.8 Die Deletion der *ppk1_{At}* führt zu Defekten in der Zellmorphologie, einer erhöhten Generationszeit und hat Einfluss auf die Infektionsrate

4.8 Die Deletion der *ppk1_{At}* führt zu Defekten in der Zellmorphologie, einer erhöhten Generationszeit und hat Einfluss auf die Infektionsrate

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse unterschiedlicher Deletionsstämme von *A. tumefaciens* zeigten sich morphologische Abweichungen vom Wt (Abbildung 34). Manche der Zellen besaßen mehrere Zellpole bzw. Verzweigungen und schnürten Minizellen ab (Abbildung 34, roter Kasten). Die Gesamtzahl an Zellen wurde bestimmt und die prozentuale Menge an Zellen mit Wachstumsdefekten errechnet. So zeigte die $\Delta ppk1_{At}$ Deletionsmutante kultiviert in LB nach 24 h für insgesamt 71 % der Zellen Wachstumsdefekte, wo hingegen bei der $\Delta ppk2_{At}$ Deletionsmutante 6 % und bei der $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ Doppeldeletionsmutante 12% der Zellen morphologische Auffälligkeiten besaßen. Es wurde versucht diesen Effekt mit der Transformation eines Plasmids mit dem jeweiligen, zuvor deletierten Gen zu komplementieren. Bei *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At}$ pBBR1MCS2-*P_{phaC}-ppk1_{At}-mcherry* und *A. tumefaciens* $\Delta ppk2_{At}$ pBBR1MCS2-*P_{phaC}-eyfp-ppk2_{At}* konnte dadurch wieder größtenteils der Wt-Phänotyp erreicht bzw. die Anzahl an Zellen mit Wachstumsdefekten verringert werden. Bei dem Stamm *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ pBBR1MCS2-*P_{phaC}-ppk1_{At}-mcherry* ptrC-*P_{lac}-eyfp-ppk2_{At}* kam es nicht bzw. nur minimal zu einer Verbesserung durch die Überexpression der beiden PPKs (11% defekte Zellen). Eine Deletion der *ppk2_{At}* schien sich nur geringfügig im Phänotyp bemerkbar zu machen. Auch eine Deletion beider *ppks* hatte nicht denselben Effekt wie die Einzeldelation der *ppk1_{At}*. Es liegt nahe, dass nicht das Fehlen der *ppk1_{At}* für die Zelle problematisch ist, solange auch *ppk2_{At}* deletiert ist. Da PPK2_{At} *in vivo* kein PolyP synthetisiert, sondern für die Aufrechterhaltung des NTP-Pools zuständig ist, kann das Enzym ohne die Anwesenheit von PPK1_{At} (und somit ohne die Anwesenheit von mit DAPI detektierbarem PolyP) dieser Aufgabe nicht nachgehen. Um zu testen, ob die beiden PPKs miteinander interagieren, wurde ein BACTH-Experiment durchgeführt, bei dem unter anderem auch Interaktionen der PPK1_{At} mit PPX1_{At} und PopZ_{At} getestet wurden (Anhang A 3). Hierbei konnte eine schwache Interaktion zwischen PPK1_{At} und PPX1_{At} (die Gene der Enzyme sitzen zusammen in einem Operon) und zwischen PPK1_{At} und PPK2_{At} festgestellt werden. Vielleicht liegt

4.8 Die Deletion der *ppk1_{At}* führt zu Defekten in der Zellmorphologie, einer erhöhten Generationszeit und hat Einfluss auf die Infektionsrate

es an der fehlenden Interaktion der PPK2_{At} mit PPK1_{At}, dass über 70% der *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At}$ Zellen Wachstumsdefekte aufzeigen. Da die Doppelmutante $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ nicht den starken Phänotyp wie bei *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At}$ ausbildet, kann die Begründung hierfür nicht in der Abwesenheit von PolyP liegen. Um weitere mögliche Identifikationspartner der PPKs von *A. tumefaciens* zu identifizieren, wurde auch hier ein *pull down* Experiment mit den durch Fluoreszenz markierten Köderproteinen (PPK1_{At}-mCherry und eYFP-PPK2_{At}) durch entsprechende magnetische *beads* (Antikörper- und Affinitäts-tag basierte Proteinaufreinigung) durchgeführt (Anhang, A5). Jedoch erbrachte die Proteomanalyse dieser Proben keine relevanten Interaktionsergebnisse (wie zum Beispiel PolyP-, Zellpol- oder DNA-assoziierte Proteine).

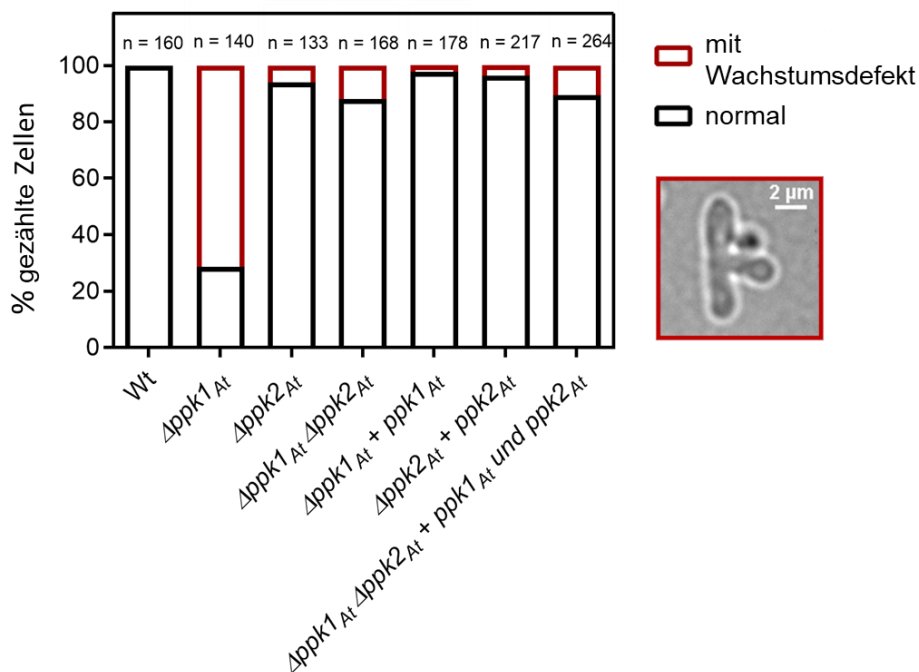


Abbildung 34: Verschiedene Deletionsstämme von *A. tumefaciens* wurden auf Wachstumsdefekte hin untersucht. *A. tumefaciens* $\Delta ppk1$ besaß hierbei besonders viele abnormale Zellen (70%), deren Wachstumsdefekt jedoch durch die Transformation mit dem Plasmid pBBR1MCS2-P_{phaC}-ppk1_{At}-mcherry komplementiert werden konnte. Das Mikroskopiebild einer *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At}$ Zelle aus diesem Experiment im Durchlicht (roter Kasten) zeigt Beispiele für die Art von Wachstumsdefekten, die beobachtet worden sind: Bildung mehrerer Zellpole sowie das Abschnüren von Minizellen. Die verschiedenen Stämme wurden in LB-Medium mit zwei Vorkulturen angezogen und nach 24 h in der Hauptkultur mikroskopiert und gezählt. Es handelt sich dabei um drei biologische Replikate.

4.8 Die Deletion der *ppk1_{At}* führt zu Defekten in der Zellmorphologie, einer erhöhten Generationszeit und hat Einfluss auf die Infektionsrate

A. tumefaciens $\Delta ppk1_{At}$ zeigte nicht nur starke morphologische Abweichungen, sondern auch eine erhöhte Generationszeit in der exponentiellen Phase (2-14 h) im Vergleich zum Wt und den Deletionsmutanten $\Delta ppk2_{At}$ und $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ bei Wachstum in 0,5% Glukose-Minimalmedium (Abbildung 35B). In LB-Medium gab es hingegen keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 35A). *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At}$ zeigte in Minimalmedium eine erhöhte Generationszeit von 3,9 h im Vergleich zum Wt mit ca. 3 h. Der Phänotyp zeigte sich durch die Transformation mit dem Plasmid pBBR1MCS2-*P_{phaC}-ppk1_{At}-mcherry* ebenfalls als reversibel. Der Grund hierfür könnte in der fehlerhaften Teilung bzw. in den morphologischen Defekten der $\Delta ppk1_{At}$ Mutante liegen, die das Wachstum in der exponentiellen Phase beeinflusst.

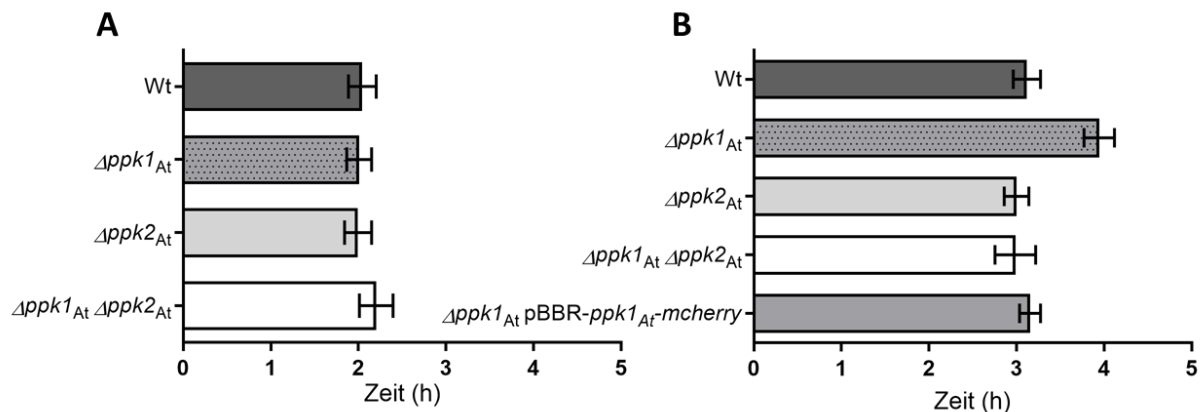


Abbildung 35: Generationszeiten in der (frühen) exponentiellen Phase (2-14 h) verschiedener Deletionsstäme im Vergleich zum Wt in LB-Medium (A) und 0,5% Glukose Minimalmedium (modifiziert nach Schlegel et al., 1961) (B). (A) In LB-Medium zeigten die Stämme keinen Unterschied im Wachstum. (B) Der Stamm *A. tumefaciens* $\Delta ppk1$ zeigte in Minimalmedium eine längere Generationszeit im Vergleich zum Wt und den anderen Deletionsstämen. Dieser Phänotyp ließ sich mit der Transformation des pBBR1MCS2-*P_{phaC}-ppk1_{At}-mcherry* Plasmids komplementieren. Die Wachstumsversuche wurden in einem *plate reader* (BioTek) bei OD₆₀₀ durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von je vier technischen und zwei biologischen Replikaten dar. Die Zellen wurden in einer 96-well Platte mit einem OD₆₀₀ von 0,01 in 200 μ l Medium angeimpft und alle 2 h gemessen. Anmerkung: In dem Wachstumsexperiment hatten die Stämme *A. tumefaciens* $\Delta ppk1$ und *A. tumefaciens* $\Delta ppk2$ zusätzlich noch die PHB-Synthase (*phaC*, *atu1604*) deletiert. Da die *Delta phaC* Kontrolle sich wie der Wt verhielt und kein detektierbares PHB in *A. tumefaciens* zu finden ist (siehe Anhang A1, Publikation [2], *supplemental. materials, figure 4*), wurde dies in der Abbildung vernachlässigt.

Durch eine Kollaboration mit Meriyem Aktas von der Arbeitsgruppe von Franz Narberhaus, der Fakultät für Biologie und Biotechnologie der Universität Bochum konnten verschiedene *A. tumefaciens* Deletionsstäme auf ihre Fähigkeit der

4.8 Die Deletion der *ppk1_{At}* führt zu Defekten in der Zellmorphologie, einer erhöhten Generationszeit und hat Einfluss auf die Infektionsrate

Infektion von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen hin untersucht werden (Abbildung 36). Durch das GUS-Reportersystem (GUS: β -Glucuronidase, siehe 4.1.4 für Details) färben sich die Keimlinge nach erfolgreicher Infektion und Expression der eingeschleusten β -Glucuronidase mittels modifizierter T-DNA blau. Hier zeigte sich, dass die Deletion der *ppk1_{At}* eine deutliche Auswirkung auf die Infektionsfähigkeit von *A. tumefaciens* besitzt. Keiner der Keimlinge besaß eine Blaufärbung und wurde demnach nicht erfolgreich infiziert. Die Infektionsrate von *A. tumefaciens* Δ *ppk2_{At}* war im Gegensatz zum Wt deutlich vermindert, jedoch zeigte die Doppelmutante eine ähnliche Fähigkeit zur Infektion wie der Wt-Stamm. Auch hier wird der Phänotyp nicht durch die Abwesenheit von PolyP verursacht, sondern durch die Abwesenheit der PPKs selbst, die eventuell noch andere Funktionen in der Zelle besitzen, als die der PolyP-Synthese, oder des Abbaus. Vielmehr scheint es so, als würde die fehlende Interaktion der beiden Enzyme hier eine Rolle spielen und PPK2_{At} in Abwesenheit der PPK1_{At} einen negativen Einfluss auf die Zellteilung, die Generationszeit und die Infektionsrate haben. Es bleibt außerdem die Frage offen, ob die *A. tumefaciens* Δ *ppk1_{At}* Zellen überhaupt noch ein Typ IV-Sekretionssystem besitzen, um die T-DNA in die Pflanzenzelle zu schleusen.

4.8 Die Deletion der *ppk1_{At}* führt zu Defekten in der Zellmorphologie, einer erhöhten Generationszeit und hat Einfluss auf die Infektionsrate

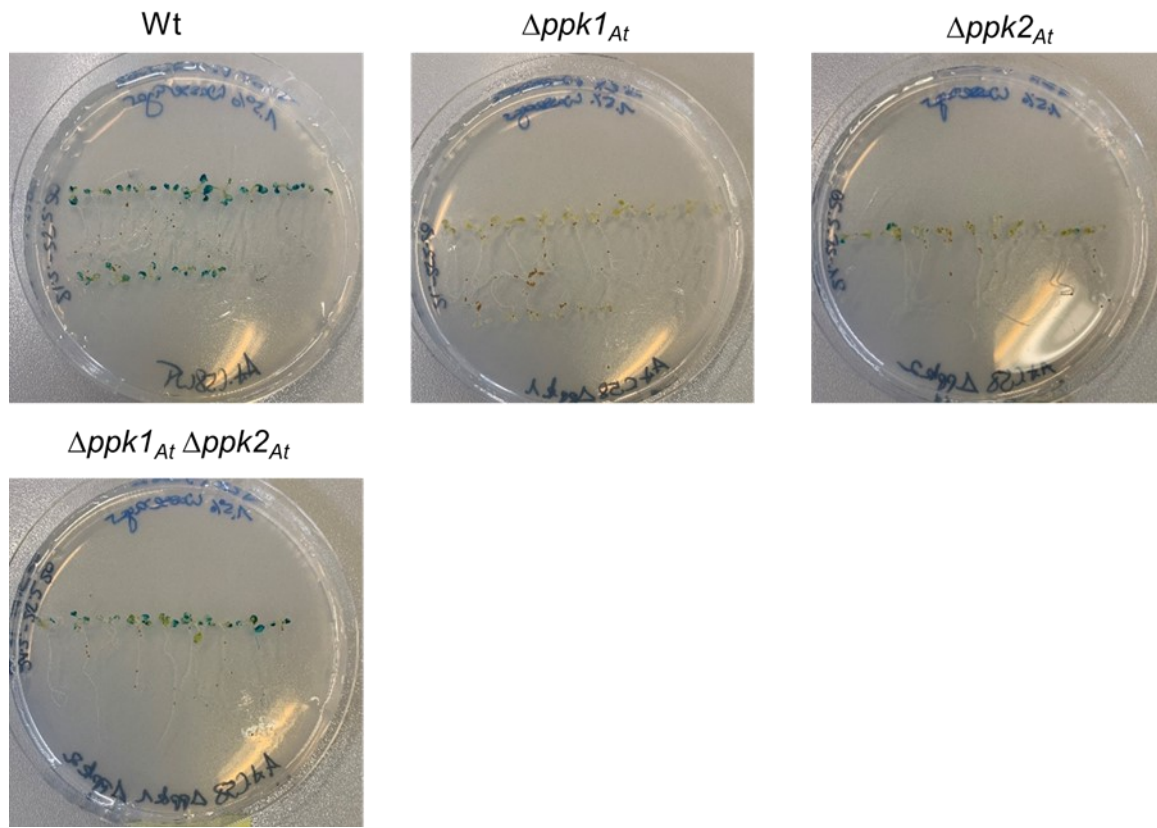


Abbildung 36: GUS-Reportergen Assay von *Arabidopsis thaliana* Setzlingen durch *A. tumefaciens* (nach Wu et al., 2014). Durch das GUS-Reportersystem erschienen die Keimlinge nach erfolgreicher Infektion durch *A. tumefaciens* und anschließender Genexpression der β -Glucuronidase blau (siehe Wt). Die Einzelmutanten für die *ppk1_{At}* und die *ppk2_{At}* Deletion besaßen eine verringerte infektionsrate bei *A. thaliana*, gezeigt durch die fehlende oder verminderte blaue Färbung der Setzlinge. Besonders *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At}$ besaß eine deutlich verschlechterte Infektionsfähigkeit und war nicht mehr in der Lage, seine DNA zu transferieren (siehe fehlende Blaufärbung). Die Doppelmutante *A. tumefaciens* $\Delta ppk1_{At} \Delta ppk2_{At}$ zeigte hingegen eine Blaufärbung vergleichbar mit dem Wt. Das Experiment wurde in zwei biologischen Replikaten durchgeführt.

Kapitel 5 Vergleichende Betrachtung des PolyP-Stoffwechsels von *A. tumefaciens* zu anderen Bakterien

Die Lokalisation des PolyP-Granulums in *A. tumefaciens* könnte mit seiner Funktion als Phosphatspeicher in Verbindung stehen und die Positionierung in der Zelle abhängig von verbrauchenden Prozessen wie beispielsweise der Zellteilung oder der DNA-Replikation sein. Manche Bakterien, die zu den Vertretern der Actinomycetales (*Mycobacterium*, *Corynebacterium*) oder der Alphaproteobakterien wie *A. tumefaciens* (Rhizobiales) gehören, zeichnen sich durch den Einbau von neu synthetisiertem Peptidoglycan an einem oder beiden Zellpolen aus (Howell und Brown, 2016, Brown *et al.*, 2011). Mit DAPI anfärbbare PolyP-Granula, sowie PPK1_{At}-mCherry und eYFP-PPK2_{At} Foki in *A. tumefaciens* waren auch überwiegend am Zellpol lokalisiert und es konnte gezeigt werden, dass neue PolyP Granula überwiegend am Wachstumspol entstanden sind. Eine Positionierung der PolyP Granula am Pol konnte ebenfalls in Actinomycetales wie *Corynebacterium glutamicum* oder *Mycobacterium tuberculosis* festgestellt werden, die ebenfalls wie *A. tumefaciens* polares Zellwachstum besitzen (Pallerla *et al.*, 2005, Talaat, 2012, Letek *et al.*, 2008, Hett und Rubin, 2008). *C. crescentus* hingegen, baut neues Zellwandmaterial entlang der gesamten Zelllänge ein und besitzt PolyP-Granula, die in der Zellmitte lokalisiert sind (Den Blaauwen *et al.*, 2008, Henry und Crosson, 2013). Dies könnte vielleicht ein Hinweis darauf sein, dass die Lokalisation der PolyP-Granula mit der Art des Wachstums und der Neusynthese der Zellwand zusammenhängen könnte. Für *A. tumefaciens* und *C. crescentus* wurde bereits gezeigt, dass sich unter Phosphatmangelbedingungen die Zusammensetzung der Lipidmembran ändert. So adaptieren sich die Bakterien an dieses Milieu, indem sie Phospholipide unter anderem durch Glycolipide, Glycoglycerolipide oder Glycosphingolipide in der Zellmembran ersetzen (Stankeviciute *et al.*, 2019, Geske *et al.*, 2012). Somit könnte die Speicherung von PolyP eng mit der Neusynthese der

Phospholipide verknüpft sein und daher die Lokalisierung des PolyP-Granulums durch den Ort der Zellwandneusynthese beeinflusst werden.

PolyP-Granula könnten auch an das bakterielle Nukleoid gebunden sein und dadurch ihre Position in der Zelle determinieren. Auch die Fähigkeit der PPKs von *A. tumefaciens*, NTPs für die DNA-Replikation oder Transkription zu synthetisieren, würde eine Verbindung zum Nukleoid nahelegen. Wie bereits in Abschnitt 4.6 aufgeführt, wurde bereits publiziert, dass in *C. crescentus* und *P. aeruginosa* auch die DNA-Replikation und Nukleoid-Segregation eine Rolle bei der Positionierung des PolyP Granulums spielt (Henry und Crosson, 2013, Racki *et al.*, 2017). Auch in *R. eutropha* scheint es, als wären PolyP Granula mit dem Nukleoid assoziiert. Mit DAPI gefärbte PolyP-Granula sind in der Zellmitte lokalisiert und colokalisieren mit der DAPI-DNA Fluoreszenz (Tumlirsch und Jendrossek, 2017). In dieser Arbeit wurde ebenfalls gezeigt, dass in *A. tumefaciens* das PolyP-Granulum möglicherweise durch die Bindung an die PPK1_{At} indirekt mit der DNA verbunden sein könnte und zumindest für einen bestimmten Zeitraum mit dem Nukleotid wandert. Da das Wanderverhalten der PolyP-Granula im überwiegenden Teil der Zellen nicht stattfand, könnte diese durch die Ablösung des „gereiften“ PolyP-Granulums von der PPK1_{At} erklärt werden. Auch in *C. crescentus* konnte eine Wanderbewegung der PPK1_{CCr} beobachtet werden, die als Venus-PPK1_{CCr} Fluoreszenzfoki überwiegend mit den PolyP-Granula colokalisierte. Hier zeigten manche Zellen unbewegte Foki, andere bewegten sich vom ersten Viertel der Zelle zum dritten Viertel der Zelle (relativ zur Zelllänge) oder wanderten unregelmäßig und oszillierten zwischen der sich bildenden Mutter und Tochterzelle (Henry und Crosson, 2013). Auch in *A. tumefaciens* konnte, jedoch nur unter bestimmten Bedingungen, eine Oszillation des eYFP-PPK2_{At} Fokus beobachtet werden (Abschnitt 4.6). Wurde in *C. crescentus* das inaktive PPK1_{CCr} Enzym (*venus-ppk1(H434A)*) im Wt Hintergrund exprimiert, co-oligomerisierte das inaktive Enzym mit der WT-PPK1_{CCr} und Venus-PPK1(H434A)_{CCr}. Beide Konstrukte colokalisierten dadurch mit den PolyP-Granula. Wurde *venus-ppk1(H434A)* hingegen in einer PolyP freien Mutante exprimiert, bildete Venus-PPK1(H434A)_{CCr} noch immer Foki, jedoch waren diese zufällig in der Zelle verteilt (Henry und Crosson, 2013). Auch bei *A. tumefaciens* co-oligomerisierte PPK1(H450A)_{At} mit der Wt PPK1_{At} und war deutlich gerichteter lokalisiert als im PolyP-freien Hintergrund (siehe Abschnitt 4.7, Abbildungen 31 und 32). Auch hier

könnte das fehlende PolyP-Granulum wichtig für die Lokalisierung der PPK1_{At} am Zellpol sein, jedoch nicht für die mögliche Bindung an die DNA, wie bereits in Abschnitt 4.7 ausführlich beschrieben wurde. Ob die PolyP-Granula in *A. tumefaciens* wirklich mit der DNA verbunden sind, wird sich nur durch eine eindeutige synchrone Migration mit einem der genetischen Elemente zeigen. Eine Kultivierung der Zellen mit einem Proteinsynthesehemmer (z.B. Chloramphenicol) während dem *time lapse* Experiment, könnte hier kontrollieren, ob eine aktive *de novo* Synthese notwendig für die Wanderung des PolyP-Granulums ist. Es ist hier auch anzumerken, dass die Bindung eines Granulums an die DNA jedoch auch negative Auswirkungen auf die Segregation haben könnte, da die Replikons zusätzlich zur DNA auch noch die Granula transportieren müssten. Auf der anderen Seite konnte bereits für *R. eutropha* gezeigt werden, dass auch PHB-Granula mit dem Nukleoid assoziiert sind und von der Mutter auf die Tochterzelle verteilt werden (Wahl et al., 2012). Des Weiteren würde auch eine Verteilung der PolyP-Granula von der Mutter zur Tochterzelle eine Energiequelle für die neu gebildete Zelle liefern. In *A. tumefaciens* wurde jedoch nur in sehr seltenen Ausnahmefällen eine Übertragung in die Tochterzelle beobachtet. Da die Wanderung nur bis zum Septum stattfand, kam es selten vor, dass das PolyP-Granulum der Mutterzelle zusammen mit der Tochterzelle abgeschnürt wurde. In der Regel behält die Mutterzelle jedoch das gewanderte PolyP-Granulum. PHB-Granula sind jedoch nicht so weit verbreitet wie PolyP-Granula. Ein Bakterium wie beispielsweise *Hyphomonas neptunium*, das zur Zellteilung einen Stiel (engl. *stalk*) entstehen lässt und am anderen Ende davon die Tochterzelle durch Knospung ausbildet, könnten Schwierigkeiten haben, neben dem Genom auch PolyP-Granula durch die schmale Röhre zu transportieren (Moore, 1981, Moore und Hirsch, 1973). Auch Henry und Crosson (2013) schlussfolgerten eine Verteilung der PolyP-Granula von *C. crescentus* von der Mutter- auf die Tochterzelle. In diesem Model zur Bildung und Verteilung der PolyP-Granula in *C. crescentus* wurde ebenfalls gezeigt, dass sich zuerst PPK1_{Cr} in der Zelle lokalisiert und synthetisiertes PolyP dann um das Enzym herum angelagert wird (Henry und Crosson, 2013, Abbildung 6). Das steht jedoch im Widerspruch zu dem Model aus den gesammelten Daten von *A. tumefaciens*, bei dem beschrieben wird, dass sich die PPK1_{At} zeitlich am PolyP-Granulum befindet und PolyP synthetisiert (6. Ausblick,

Abbildung 37, III oder IV). In *C. crescentus* wurde ebenfalls gezeigt, dass die Deletion der letzten 16 Aminosäurereste des C-Terminus der PPK1_{CCr} die Lokalisation des Enzyms in der Zelle beeinflusst (Henry und Crosson, 2013). Die Proteine PPK1_{At} und PPK1_{CCr} sind laut BLAST-Analyse zu 56% identisch und zu 70% positiv (positiv: Anzahl der identischen Aminosäuren und den Aminosäuren mit gleichen chemischen Eigenschaften) (BLAST Analyse, *Global Alignment*). Jedoch stimmen die letzten 16 Aminosäuren hier nur zu 13% überein und sind zu 18% positiv. Ob bei der Deletion der letzten 16 Aminosäurereste der PPK1_{At} von *A. tumefaciens* ebenfalls das gleiche Ergebnis wie für die *C. crescentus* PPK1_{CCr} erwartet werden kann, ist also fraglich.

Die oligophosphorylierende Eigenschaft der PPK2_{At} *in vitro* stellt es als das erste Enzym da, das bis zu nona- oder vielleicht auch bis zu decaphosphorierte Nucleoside herstellen kann. In anderen Organismen wurden hingegen nur bis zu tetraphosphorierte Nucleoside, wie in *R. eutropha* (PPK2_{CRe}/A1212) oder bis zu pentaphosphorierte Nucleoside in *Sinorhizobium meliloti* (PPK2_{Sm}/SMc02148), *Francisella tularensis* (PPK2_{Ft}/FTT1564), *Acinetobacter johnsonii* (PPK2_{Aj}/AjPAP) und *Meiothermus ruber* (PPK2_{Mr}/MrH2468) gebildet (Mordhorst *et al.*, 2019). *In vivo* zeigte sich hingegen PPK1_{At} als PolyP-Synthaseenzym. Ob die PPKs von *A. tumefaciens* hierbei lineares und/oder verzweigtes PolyP herstellen ist noch nicht bekannt. In *Xanthobacter autotrophicus* wurde bereits durch Kernspinresonanzspektroskopie (³¹P-NMR Spektroskopie) gezeigt, dass PolyP-Granula neben linearen, auch verzweigtes PolyP enthalten können (Mandala *et al.*, 2020).

Für *A. tumefaciens* konnten drei Proteine gefunden werden, die mit dem PolyP-Granulum assoziiert sind: PPK1_{At}, PPK2_{At} und PptA_{At}. *Pull down* Experimente konnten hier jedoch keine weiteren PolyP assoziierten Proteine identifizieren (siehe Anhang A5). Es liegt jedoch nahe, dass noch weitere Interaktionspartner existieren, die entweder direkt an das PolyP-Granula gebunden oder löslich im Zytoplasma vorliegen, wie es bereits für *R. eutropha* gezeigt worden ist (siehe Abschnitt 1.2, Abbildung 2). Hier konnte in einem *pull down* Experiment weitere Interaktionspartner,

wie die Glutaminsynthetase für PptA_{Re} oder DNA bindende Proteine für PPK1a_{Re} identifiziert werden (Tumlirsch, 2017).

Das Fehlen von PolyP in *A. tumefaciens* hatte weder Auswirkung auf das Wachstum in unterschiedlichen Medien noch auf die Infektionsfähigkeit. In *Pseudomonas aeruginosa* konnte jedoch gezeigt werden, dass das Fehlen von PolyP Auswirkungen auf die Virulenz, die Biofilm Bildung oder *quorum sensing* hat (Rashid *et al.*, 2000). Außerdem zeigte *Mycobacterium tuberculosis* bei PolyP Mangel ein verringertes Wachstum im Wirt (Singh *et al.*, 2013). Auch in *E. coli* ist PolyP wichtig für das Überleben in der stationären Phase und bei Stress durch verschiedene Umwelteinflüsse (Rao und Kornberg, 1999, Rao *et al.*, 2009). Das liegt nahe, dass für *A. tumefaciens* noch nicht die passenden Stressbedingungen gefunden worden sind, in denen PolyP eine Rolle spielt.

6. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Erkenntnisse über die Synthese und die Lokalisation von PolyP-Granula sowie die Lokalisation der beteiligten Enzyme in *A. tumefaciens* gewonnen werden. Es wurde gezeigt, dass PolyP-Granula in *A. tumefaciens* mit Proteinen assoziiert vorliegen und nicht von einer Membranschicht umgeben sind. Außerdem wurde die PPK1_{At} als PolyP-Synthaseenzym in *A. tumefaciens* identifiziert, während PPK2_{At} zwar ebenfalls die Fähigkeit zur PolyP-Synthese besitzt, diese jedoch in *A. tumefaciens* selbst nicht zum Tragen kommt. Des Weiteren trug die biochemische Charakterisierung der PPKs zu einem besseren Verständnis der NDP und NTP Synthese in der Zelle bei. Außerdem wurde die Funktion der Synthese von Nukleosid-Oligophosphaten der PPK2_{At} bis hin zu nonaphosphorylierten Nukleosiden entdeckt. Durch eine Untersuchung der Lokalisation des PolyP-Granulums während des Zellwachstums, konnte teilweise eine Wanderung beobachtet werden, die eventuell durch die Bindung an die DNA durch die PPK1_{At} stattfindet, die wiederum mit dem PolyP-Granulum verbunden ist. Es wurde auch gezeigt, dass die Deletion der *ppk1*_{At} Auswirkungen auf die Morphologie, die Generationszeit und die Infektionsrate besitzt, was jedoch nicht in Verbindung mit der Abwesenheit von PolyP in *A. tumefaciens* steht. Die verschiedenen Modelle des PolyP-Granulums von *A. tumefaciens* im Verlauf dieser Arbeit werden in Abbildung 37 dargestellt.

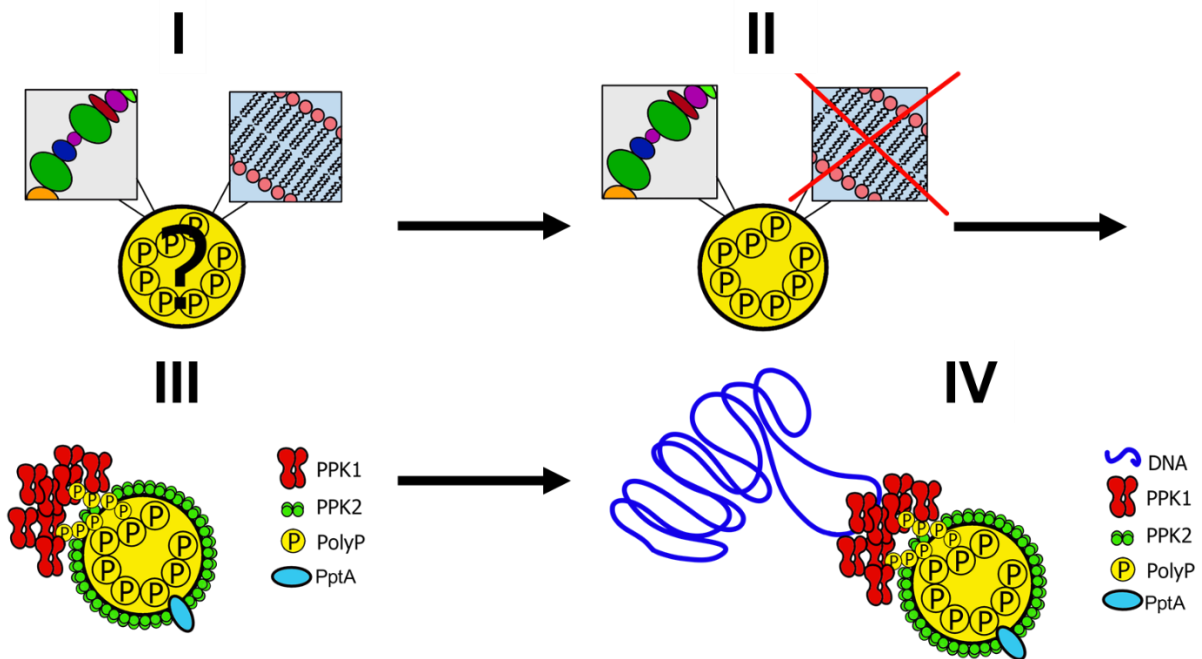


Abbildung 37: Verschiedene Modelle des PolyP-Granulums in *A. tumefaciens* im Verlauf dieser Arbeit. (I) Zu Beginn war es unklar, ob das PolyP-Granulum von einer Membranschicht umgeben ist und daher als Acidocalcisom bezeichnet werden müsste oder es, mit einer Proteinschicht ummantelt ist. (II) In Kapitel 2 wurden Ergebnisse beschrieben, die zeigen, dass das PolyP-Granulum nicht von einer Membran umgeben ist. Es ergab sich ebenfalls, dass die PPK1_{At} das Enzym für die PolyP-Synthese in *A. tumefaciens* ist und die PPK2_{At} immer an PolyP gebunden vorliegt (in der PPK2_{At} Überexpression, wie hier dargestellt, wird das gesamte Granulum umrundet). Des Weiteren bindet das PptA_{At}-Protein ebenfalls an das PolyP-Granulum (III). (IV) Die Bewegung des PolyP-Granulums während dem Zellwachstum könnte womöglich durch die Bindung der PPK1_{At} an die DNA verursacht werden.

Für fortführende Arbeiten wurde hiermit der Grundstein zur Erforschung von PolyP in *A. tumefaciens* gelegt. Um weitere Einblicke in den PolyP Auf- und Abbau zu erlangen, empfiehlt sich zum einen das *ppk* Expressionsniveau durch quantitative Echtzeit-PCR zu untersuchen und mit dem bereits ermittelten Gehalt an PolyP während dem Zellwachstums abzugleichen. Zum anderen könnte ein gemeinsamer Enzymassay von aufgereinigter PPK1(H450A)_{At} und PPK2_{At} Aufschluss darüber geben, ob sich die beiden Enzyme in ihrer Aktivität gegenseitig beeinflussen. Auch ein Wiederholtes *pull down* Experiment könnte weitere Interaktionspartner der PPKs aufzeigen. Die Analyse des intrazellulären NTP-Pools in *A. tumefaciens* vermag Aufschluss darüber zu geben, welche NTPs oder NDP dominieren und ob diese Erkenntnisse mit der gemessenen Affinität der PPKs übereinstimmt. Natürlich müssten hierzu auch die unterschiedlichen Deletionsstämme auf eine veränderte

NTP/NDP Konzentration im Vergleich zum Wt untersucht werden. Es wäre ebenfalls sehr interessant, die Kettenlänge des *in vitro* sowie das *in vivo* erzeugten PolyPs zu bestimmen. Hierfür gibt es bereits eine Methode, die die durchschnittliche Länge der PolyP-Ketten enzymatisch, ohne den Einsatz von ^{31}P NMR bestimmt (Christ und Blank, 2018). Um die Wanderbewegung des PolyP-Granulums weiter zu studieren, würde es sich empfehlen, auch die anderen Genom-Elemente von *A. tumefaciens* mit Fluoreszenzproteinen zu markieren. Nur so kann festgestellt werden, ob das PolyP-Granulum synchron mit dem LC, KP oder TiP wandert oder ob es sich auf andere Weise fortbewegt. Hinsichtlich der verringerten Infektionsrate mancher Deletionsstämme bei *A. thaliana* Keimlingen, könnte ein Nachweis der Virulenzproteine durch entsprechende Antikörper Aufschluss geben, ob das Typ IV-Sekretionssystem in diesen Stämmen noch vorhanden ist und ob die PPKs hierbei eine Rolle spielen könnten. Es konnte kein Phänotyp für das Fehlen von PolyP in *A. tumefaciens* ermittelt werden. Daher wäre es sinnvoll, verschiedene Stresstests (Hitzestress, oxidativer Stress, Kältestress, Nährstofflimitierung) mit der $\Delta ppk1$ $\Delta ppk2$ Doppelmutante durchzuführen. Ob die Speicherung von PolyP möglicherweise mit der Neusynthese der Phospholipide der Zellmembran zusammenhängt, könnte eine Lipidanalyse des Wt im Vergleich zur $\Delta ppk1$ Deletionsmutante von *A. tumefaciens* zeigen.

7. Literaturverzeichnis

- AHN, K. & KORNBERG, A. 1990. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 11734-11739.
- AKIYAMA, M., CROOKE, E. & KORNBERG, A. 1992. The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the ppk gene and membrane location of the protein. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 22556-22561.
- ALLAN, R. A. & MILLER, J. J. 1980. Influence of S-adenosylmethionine on DAPI-induced fluorescence of polyphosphate in the yeast vacuole. *Can J Microbiol*, 26, 912-20.
- ALLARDET-SERVENT, A., MICHAUX-CHARACHON, S., JUMAS-BILAK, E., KARAYAN, L. & RAMUZ, M. 1994. Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *Journal of bacteriology*, 175, 7869-74.
- ANDERSEN, M. H., BERGLUND, L., RASMUSSEN, J. T. & PETERSEN, T. E. 1997. Bovine PAS-6/7 Binds $\alpha V\beta 5$ Integrin and Anionic Phospholipids through Two Domains. *Biochemistry*, 36, 5441-5446.
- ANDERSEN, M. H., GRAVERSEN, H., FEDOSOV, S. N., PETERSEN, T. E. & RASMUSSEN, J. T. 2000. Functional Analyses of Two Cellular Binding Domains of Bovine Lactadherin. *Biochemistry*, 39, 6200-6206.
- BOEHM, M. & BONIFACINO, J. S. 2002. Genetic analyses of adaptin function from yeast to mammals. *Gene*, 286, 175-86.
- BOUTTE, C. C., HENRY, J. T. & CROSSON, S. 2012. ppGpp and Polyphosphate Modulate Cell Cycle Progression in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 194, 28-35.
- BRESAN, S., SZNAJDER, A., HAUF, W., FORCHHAMMER, K., PFEIFFER, D. & JENDROSSEK, D. 2016. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. 6, 26612.
- BROWN, M. R. & KORNBERG, A. 2004. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 16085-7.
- BROWN, P. J., KYSELA, D. T. & BRUN, Y. V. 2011. Polarity and the diversity of growth mechanisms in bacteria. *Semin Cell Dev Biol*, 22, 790-8.
- CHAZOTTE, B. 2011. Labeling mitochondria with MitoTracker dyes. *Cold Spring Harb Protoc*, 2011, 990-2.
- CHENG, M., FRY, J. E., PANG, S., ZHOU, H., HIRONAKA, C. M., DUNCAN, D. R., CONNER, T. W. & WAN, Y. 1997. Genetic Transformation of Wheat Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*, 115, 971-980.
- CHRIST, J. J. & BLANK, L. M. 2018. Enzymatic quantification and length determination of polyphosphate down to a chain length of two. *Analytical Biochemistry*, 548, 82-90.
- CORDEIRO, C. D., SAIARDI, A. & DOCAMPO, R. 2017. The inositol pyrophosphate synthesis pathway in *Trypanosoma brucei* is linked to polyphosphate synthesis in acidocalcisomes. *Molecular Microbiology*, 106, 319-333.

- DANHORN, T., HENTZER, M., GIVSKOV, M., PARSEK, M. R. & FUQUA, C. 2004. Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system. *J Bacteriol*, 186, 4492-501.
- DEL VECCHIO, K. & STAHELIN, R. V. 2018. Investigation of the phosphatidylserine binding properties of the lipid biosensor, Lactadherin C2 (LactC2), in different membrane environments. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 50, 1-10.
- DEN BLAAUWEN, T., DE PEDRO, M. A., NGUYEN-DISTÈCHE, M. & AYALA, J. A. 2008. Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 321-344.
- DOCAMPO, R., DE SOUZA, W., MIRANDA, K., ROHLOFF, P. & MORENO, S. N. 2005. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol*, 3, 251-61.
- DOCAMPO, R. & MORENO, S. N. 1999. Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitol Today*, 15, 443-8.
- DOCAMPO, R., SCOTT, D. A., VERCESI, A. E. & MORENO, S. N. 1995. Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*, 310 (Pt 3), 1005-12.
- EBEL, J. P. 1952. Research on the polyphosphates in various living cells. III. Research on and determination of some polyphosphates in cells of various microorganisms and of higher animals. *Bulletin de la Société de chimie biologique*, 34, 491-497
- EHRLE, H. M., GUIDRY, J. T., IACOVETTO, R., SALISBURY, A. K., SANDIDGE, D. J. & BOWMAN, G. R. 2017. Polar Organizing Protein PopZ Is Required for Chromosome Segregation in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology*, 199, e00111-17.
- FEITH, A., TELEKI, A., GRAF, M., FAVILLI, L. & TAKORS, R. 2019. HILIC-Enabled 13C Metabolomics Strategies: Comparing Quantitative Precision and Spectral Accuracy of QTOF High- and QQQ Low-Resolution Mass Spectrometry. *Metabolites*, 9, 63.
- FISHOV, I. & WOLDRINGH, C. L. 1999. Visualization of membrane domains in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 32, 1166-72.
- FRANK, C. & JENDROSSEK, D. 2020. Acidocalcisomes and Polyphosphate Granules Are Different Subcellular Structures in *Agrobacterium tumefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86, e02759-19.
- FRANK, C., TELEKI, A. & JENDROSSEK, D. 2020. Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* PPKs reveals the formation of oligophosphorylated products up to nucleoside nona-phosphates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 9683-9692.
- GESKE, T., GUTBROD, K., DÖRMANN, P. & HÖLZL, G. 2012. Accumulation of glycolipids and other non-phosphorous lipids in *Agrobacterium tumefaciens* grown under phosphate deprivation. *Glycobiology*, 23.
- GRANGEON, R., ZUPAN, J. R., ANDERSON-FURGESON, J. & ZAMBRYSKI, P. C. 2015. PopZ identifies the new pole, and PodJ identifies the old pole during polar growth in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 11666-71.

- GRAY, M. J., WHOLEY, W.-Y., WAGNER, N. O., CREMERS, C. M., MUELLER-SCHICKERT, A., HOCK, N. T., KRIEGER, A. G., SMITH, E. M., BENDER, R. A., BARDWELL, J. C. A. & JAKOB, U. 2014. Polyphosphate is a primordial chaperone. *Molecular cell*, 53, 689-699.
- GREENSPAN, P., MAYER, E. P. & FOWLER, S. D. 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol*, 100, 965-73.
- HARTMANN, R., VAN TEESELING, M. C. F., THANBICHLER, M. & DRESCHER, K. 2018. BacStalk: a comprehensive and interactive image analysis software tool for bacterial cell biology. *bioRxiv*, 360230.
- HENRY, J. T. & CROSSON, S. 2013. Chromosome replication and segregation govern the biogenesis and inheritance of inorganic polyphosphate granules. *Molecular Biology of the Cell*, 24, 3177-3186.
- HETT, E. C. & RUBIN, E. J. 2008. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72, 126-156.
- HILDENBRAND, J. C., TELEKI, A. & JENDROSSEK, D. 2020. A universal polyphosphate kinase: PPK2c of *Ralstonia eutropha* accepts purine and pyrimidine nucleotides including uridine diphosphate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 6659-6667.
- HOTHORN, M., NEUMANN, H., LENHERR, E. D., WEHNER, M., RYBIN, V., HASSA, P. O., UTENWEILER, A., REINHARDT, M., SCHMIDT, A., SEILER, J., LADURNER, A. G., HERRMANN, C., SCHEFFZEK, K. & MAYER, A. 2009. Catalytic Core of a Membrane-Associated Eukaryotic Polyphosphate Polymerase. *Science*, 324, 513.
- HOWELL, M. & BROWN, P. J. B. 2016. Building the bacterial cell wall at the pole. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 53-59.
- HUANG, G. & DOCAMPO, R. 2015. Proteomic analysis of acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei* uncovers their role in phosphate metabolism, cation homeostasis, and calcium signaling. *Communicative & Integrative Biology*, 8, e1017174.
- HUANG, G., FANG, J., SANT'ANNA, C., LI, Z. H., WELLEMS, D. L., ROHLOFF, P. & DOCAMPO, R. 2011. Adaptor protein-3 (AP-3) complex mediates the biogenesis of acidocalcisomes and is essential for growth and virulence of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*, 286, 36619-30.
- HUANG, G., ULRICH, P., STOREY, M., JOHNSON, D., TISCHER, J., TOVAR, J., MORENO, S., ORLANDO, R. & DOCAMPO, R. 2014. Proteomic Analysis of the Acidocalcisome, an Organelle Conserved from Bacteria to Human Cells. *PLoS pathogens*, 10, e1004555.
- IYER, L. M. & ARAVIND, L. 2002. The catalytic domains of thiamine triphosphatase and CyaB-like adenylyl cyclase define a novel superfamily of domains that bind organic phosphates. *BMC Genomics*, 3, 33.
- KORNBERG, A., KORNBERG, S. R. & SIMMS, E. S. 1956a. Metaphosphate synthesis by an enzyme from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 20, 215-27.
- KORNBERG, A., KORNBERG, S. R. & SIMMS, E. S. 1956b. Metaphosphate synthesis by an enzyme from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 20, 215-227.
- KORNBERG, A., RAO, N. N. & AULT-RICHE, D. 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu Rev Biochem*, 68, 89-125.

- KUMBLE, K. D., AHN, K. & KORNBERG, A. 1996. Phosphohistidyl active sites in polyphosphate kinase of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14391-5.
- LEFÈVRE, C. T., ABREU, F., LINS, U. & BAZYLINSKI, D. A. 2011. A Bacterial Backbone: Magnetosomes in Magnetotactic Bacteria. In: RAI, M. & DURAN, N. (eds.) *Metal Nanoparticles in Microbiology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- LETEK, M., FIUZA, M., ORDÓÑEZ, E., VILLADANGOS, A. F., RAMOS, A., MATEOS, L. M. & GIL, J. A. 2008. Cell growth and cell division in the rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94, 99-109.
- LIN, H. J., HERMAN, P., KANG, J. S. & LAKOWICZ, J. R. 2001. Fluorescence lifetime characterization of novel low-pH probes. *Anal Biochem*, 294, 118-25.
- LORENZO-ORTS, L., HOHMANN, U., ZHU, J. & HOTHORN, M. 2019. Molecular characterization of CHAD domains as inorganic polyphosphate-binding modules. *Life Science Alliance*, 2, e201900385.
- LOSITO, O., SZIJGYARTO, Z., RESNICK, A. C. & SAIARDI, A. 2009. Inositol Pyrophosphates and Their Unique Metabolic Complexity: Analysis by Gel Electrophoresis. *PLOS ONE*, 4, e5580.
- LUO, S., ROHLOFF, P., COX, J., UYEMURA, S. A. & DOCAMPO, R. 2004. *Trypanosoma brucei* plasma membrane-type Ca⁽²⁺⁾-ATPase 1 (TbPMC1) and 2 (TbPMC2) genes encode functional Ca⁽²⁺⁾-ATPases localized to the acidocalcisomes and plasma membrane, and essential for Ca⁽²⁺⁾ homeostasis and growth. *J Biol Chem*, 279, 14427-39.
- MANDALA, V. S., LOH, D. M., SHEPARD, S. M., GEESON, M. B., SERGEYEV, I. V., NOCERA, D. G., CUMMINS, C. C. & HONG, M. 2020. Bacterial Phosphate Granules Contain Cyclic Polyphosphates: Evidence from (31)P Solid-State NMR. *Journal of the American Chemical Society*, 142, 18407-18421.
- MARCHESINI, N., RUIZ, F. A., VIEIRA, M. & DOCAMPO, R. 2002. Acidocalcisomes are functionally linked to the contractile vacuole of *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem*, 277, 8146-53.
- MASLOV, I., BOGORODSKIY, A., MISHIN, A., OKHRIMENKO, I., GUSHCHIN, I., KALENOV, S., DENCHER, N. A., FAHLKE, C., BÜLDT, G., GORDELIY, V., GENSCHE, T. & BORSHCHEVSKIY, V. 2018. Efficient non-cytotoxic fluorescent staining of halophiles. *Scientific Reports*, 8, 2549.
- MOORE, R. L. 1981. The Biology of *Hyphomicrobium* and other *Prosthecae*, Budding Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 35, 567-594.
- MOORE, R. L. & HIRSCH, P. 1973. First generation synchrony of isolated *Hyphomicrobium* swarmer populations. *J Bacteriol*, 116, 418-23.
- MORDHORST, S., SINGH, J., MOHR, M. K. F., HINKELMANN, R., KEPPLER, M., JESSEN, H. J. & ANDEXER, J. N. 2019. Several Polyphosphate Kinase 2 Enzymes Catalyse the Production of Adenosine 5'-Polyphosphates. *ChemBioChem*, 20, 1019-1022.
- MORENO, S. & DOCAMPO, R. 2009. *The Role of Acidocalcisomes in Parasitic Protists*.
- MORRISSEY, J. H., CHOI, S. H. & SMITH, S. A. 2012. Polyphosphate: an ancient molecule that links platelets, coagulation, and inflammation. *Blood*, 119, 5972.
- MOTOMURA, K., HIROTA, R., OKADA, M., IKEDA, T., ISHIDA, T. & KURODA, A. 2014. A New Subfamily of Polyphosphate Kinase 2 (Class III PPK2) Catalyzes both Nucleoside Monophosphate Phosphorylation and Nucleoside

- Diphosphate Phosphorylation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 2602-2608.
- MUTCH, N. J. 2019. Regulation of Coagulation by Polyphosphate. *Blood*, 134, SCI-18-SCI-18.
- OGAWA, M., UYEDA, A., HARADA, K., SATO, Y., KATO, Y., WATANABE, H., HONDA, K. & MATSUURA, T. 2019. Class III Polyphosphate Kinase 2 Enzymes Catalyze the Pyrophosphorylation of Adenosine-5'-Monophosphate. *ChemBioChem*, 20, 2961-2967.
- PALLERLA, S. R., KNEBEL, S., POLEN, T., KLAUTH, P., HOLLENDER, J., WENDISCH, V. F. & M SCHOBERTH, S. 2005. Formation of volutin granules in *Corynebacterium glutamicum*.
- PFEIFFER, D. & JENDROSSEK, D. 2011. Interaction between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins as revealed by two-hybrid analysis and identification of a new phasin in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology (Reading)*, 157, 2795-2807.
- PEPELKA, J. & ALTPETER, F. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of rye (*Secale cereale* L.). *Molecular Breeding*, 11, 203-211.
- RACKI, L. R., TOCHEVA, E. I., DIETERLE, M. G., SULLIVAN, M. C., JENSEN, G. J. & NEWMAN, D. K. 2017. Polyphosphate granule biogenesis is temporally and functionally tied to cell cycle exit during starvation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, E2440.
- RAMOS, I. B., MIRANDA, K., ULRICH, P., INGRAM, P., LEFURGEY, A., MACHADO, E. A., DE SOUZA, W. & DOCAMPO, R. 2010. Calcium- and polyphosphate-containing acidocalcisomes in chicken egg yolk. *Biol Cell*, 102, 421-34.
- RAO, N. N., GÓMEZ-GARCÍA, M. R. & KORNBERG, A. 2009. Inorganic Polyphosphate: Essential for Growth and Survival. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 605-647.
- RAO, N. N. & KORNBERG, A. 1999. Inorganic polyphosphate regulates responses of *Escherichia coli* to nutritional stringencies, environmental stresses and survival in the stationary phase. *Prog Mol Subcell Biol*, 23, 183-95.
- RASHID, M. H., RUMBAUGH, K., PASSADOR, L., DAVIES, D. G., HAMOOD, A. N., IGLEWSKI, B. H. & KORNBERG, A. 2000. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 9636-41.
- REA, P. A. & POOLE, R. J. 1986. Chromatographic resolution of h-translocating pyrophosphatase from h-translocating ATPase of higher plant tonoplast. *Plant Physiol*, 81, 126-9.
- REUSCH, R. N. & SADOFF, H. L. 1988. Putative structure and functions of a poly-beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 4176-80.
- ROBALINO-ESPINOSA, J. S., ZUPAN, J. R., CHAVEZ-ARROYO, A. & ZAMBRYSKI, P. 2020. Segregation of four *Agrobacterium tumefaciens* replicons during polar growth: PopZ and PodJ control segregation of essential replicons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117, 26366-26373.
- ROONEY, P. J., AYONG, L., TOBIN, C. M., MORENO, S. N. J. & KNOLL, L. J. 2011. TgVTC2 is involved in polyphosphate accumulation in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 176, 121-126.
- RUIZ, F. A., MARCHESINI, N., SEUFFERHELD, M., GOVINDJEE & DOCAMPO, R. 2001. The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a

- proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. *J Biol Chem*, 276, 46196-203.
- SCHLEGEL, H. G., GOTTSCHALK, G. & VON BARTHA, R. 1961. Formation and utilization of poly-beta-hydroxybutyric acid by Knallgas bacteria (*Hydrogenomonas*). *Nature*, 191, 463-5.
- SCHROTH, M. N., WEINHOLD, A. R., MCCAIN, A. H. & ET AL. 1971. Biology and control of *Agrobacterium tumefaciens*. *Hilgardia*, 40, 537-552.
- SEUFFERHELD, M., KIM, K. M., WHITFIELD, J., VALERIO, A. & CAETANO-ANOLLÉS, G. 2011. Evolution of vacuolar proton pyrophosphatase domains and volutin granules: Clues into the early evolutionary origin of the acidocalcisome.
- SEUFFERHELD, M., LEA, C. R., VIEIRA, M., OLDFIELD, E. & DOCAMPO, R. 2004. The H⁺-pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* Is Predominantly Located in Polyphosphate-rich Acidocalcisomes. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 51193-51202.
- SEUFFERHELD, M., VIEIRA, M. C. F., RUIZ, F. A., RODRIGUES, C. O., MORENO, S. N. J. & DOCAMPO, R. 2003. Identification of Organelles in Bacteria Similar to Acidocalcisomes of Unicellular Eukaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 29971-29978.
- SINGH, R., SINGH, M., ARORA, G., KUMAR, S., TIWARI, P. & KIDWAI, S. 2013. Polyphosphate deficiency in *Mycobacterium tuberculosis* is associated with enhanced drug susceptibility and impaired growth in guinea pigs. *J Bacteriol*, 195, 2839-51.
- SINNINGHE DAMSTÉ, J. S., STROUS, M., RIJPSTRA, W. I. C., HOPMANS, E. C., GEENEVASEN, J. A. J., VAN DUIN, A. C. T., VAN NIFTRIK, L. A. & JETTEN, M. S. M. 2002. Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature*, 419, 708.
- SOARES MEDEIROS, L. C. A., MOREIRA, B. L. M., MIRANDA, K., DE SOUZA, W., PLATTNER, H., HENTSCHEL, J. & BARRABIN, H. 2005. A proton pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Herpetomonas sp.* *Molecular and Biochemical Parasitology*, 140, 175-182.
- SPIEKERMANN, P., REHM, B. H. A., KALSCHEUER, R., BAUMEISTER, D. & STEINBÜCHEL, A. 1999. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives of Microbiology*, 171, 73-80.
- STANKEVICIUTE, G., GUAN, Z., GOLDFINE, H. & KLEIN, E. A. 2019. *Caulobacter crescentus* Adapts to Phosphate Starvation by Synthesizing Anionic Glycoglycerolipids and a Novel Glycosphingolipid. *mBio*, 10, e00107-19.
- SURTEES, J. A. & FUNNELL, B. E. 2003. Plasmid and Chromosome Traffic Control: How ParA and ParB Drive Partition. *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press.
- TAJALLI, H., GILANI, A. G., ZAKERHAMIDI, M. S. & TAJALLI, P. 2008. The photophysical properties of Nile red and Nile blue in ordered anisotropic media. *Dyes and Pigments*, 78, 15-24.
- TALAAT, A. 2012. Single-Cell Elemental Analysis of Bacteria: Quantitative Analysis of Polyphosphates in *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2.
- TANIOUS, F. A., VEAL, J. M., BUCZAK, H., RATMEYER, L. S. & WILSON, W. D. 1992. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA:

- minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry*, 31, 3103-12.
- TELEKI, A., SÁNCHEZ-KOPPER, A. & TAKORS, R. 2015. Alkaline conditions in hydrophilic interaction liquid chromatography for intracellular metabolite quantification using tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 475, 4-13.
- TOMASZ, M. 1995. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem Biol*, 2, 575-9.
- TUMLIRSCH, T. 2017. Identifizierung neuer Proteine des Polyphosphat Granulumkomplexes von *Ralstonia eutropha* H16. 324.
- TUMLIRSCH, T. & JENDROSSEK, D. 2017. Proteins with CHAD Domains (Conserved Histidine α -Helical Domain) Are Attached to Polyphosphate (polyP) Granules in vivo and Constitute a Novel Family of PolyP-Associated Proteins (Phosins). *Applied and Environmental Microbiology*.
- TUMLIRSCH, T., SZNAJDER, A. & JENDROSSEK, D. 2015. Formation of polyphosphate by polyphosphate kinases and its relationship to poly(3-hydroxybutyrate) accumulation in *Ralstonia eutropha* strain H16. *Appl Environ Microbiol*, 81, 8277-93.
- UEBE, R. & SCHÜLER, D. 2016. Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 621-637.
- VERCESI, A. E., MORENO, S. N. & DOCAMPO, R. 1994. Ca²⁺/H⁺ exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J*, 304 (Pt 1), 227-33.
- WAHL, A., SCHUTH, N., PFEIFFER, D., NUSSBERGER, S. & JENDROSSEK, D. 2012. PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*. *BMC Microbiology*, 12, 262.
- WERTEN, S., RUSTMEIER, N. H., GEMMER, M., VIROLLE, M.-J. & HINRICHS, W. 2019. Structural and biochemical analysis of a phosin from *Streptomyces chartreusis* reveals a combined polyphosphate- and metal-binding fold. *FEBS Letters*, 593, 2019-2029.
- WIAME, J. & M. 1947. Etude d'une substance polyphosphorke, basophile et metachroma- tique chez les levures. . *Biochirn. biophys. Acta*, 1.
- WOOD, D. W., SETUBAL, J. C., KAUL, R., MONKS, D. E., KITAJIMA, J. P., OKURA, V. K., ZHOU, Y., CHEN, L., WOOD, G. E., ALMEIDA, N. F., JR., WOO, L., CHEN, Y., PAULSEN, I. T., EISEN, J. A., KARP, P. D., BOVEE, D., SR., CHAPMAN, P., CLENDENNING, J., DEATHERAGE, G., GILLET, W., GRANT, C., KUTYAVIN, T., LEVY, R., LI, M. J., MCCLELLAND, E., PALMIERI, A., RAYMOND, C., ROUSE, G., SAENPHIMMACHAK, C., WU, Z., ROMERO, P., GORDON, D., ZHANG, S., YOO, H., TAO, Y., BIDDLE, P., JUNG, M., KRESPAN, W., PERRY, M., GORDON-KAMM, B., LIAO, L., KIM, S., HENDRICK, C., ZHAO, Z. Y., DOLAN, M., CHUMLEY, F., TINGEY, S. V., TOMB, J. F., GORDON, M. P., OLSON, M. V. & NESTER, E. W. 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294, 2317-23.
- WU, H.-Y., LIU, K.-H., WANG, Y.-C., WU, J.-F., CHIU, W.-L., CHEN, C.-Y., WU, S.-H., SHEEN, J. & LAI, E.-M. 2014. AGROBEST: an efficient *Agrobacterium*-mediated transient expression method for versatile gene function analyses in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Methods*, 10, 19.
- YEUNG, T., GILBERT, G. E., SHI, J., SILVIUS, J., KAPUS, A. & GRINSTEIN, S. 2008. Membrane Phosphatidylserine Regulates Surface Charge and Protein Localization. *Science*, 319, 210-213.

- ZHANG, H., ISHIGE, K. & KORNBERG, A. 2002. A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 16678-16683.
- ZHU, Y., HUANG, W., LEE, S. S. K. & XU, W. 2005. Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis. *EMBO reports*, 6, 681-687.
- ZUPAN, J. R., CAMERON, T. A., ANDERSON-FURGESON, J. & ZAMBRYSKI, P. C. 2013. Dynamic FtsA and FtsZ localization and outer membrane alterations during polar growth and cell division in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 9060.

Anhang

A1 Publikationen

- [1] **FRANK, C. & JENDROSSEK, D. 2020.** Acidocalcisomes and Polyphosphate Granules Are Different Subcellular Structures in *Agrobacterium tumefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86, e02759-19.

[DOI: 10.1128/AEM.02759-19](https://doi.org/10.1128/AEM.02759-19)

- [2] **FRANK, C., TELEKI, A. & JENDROSSEK, D. 2020.** Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* PPKs reveals the formation of oligophosphorylated products up to nucleoside nona-phosphates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 9683-9692.

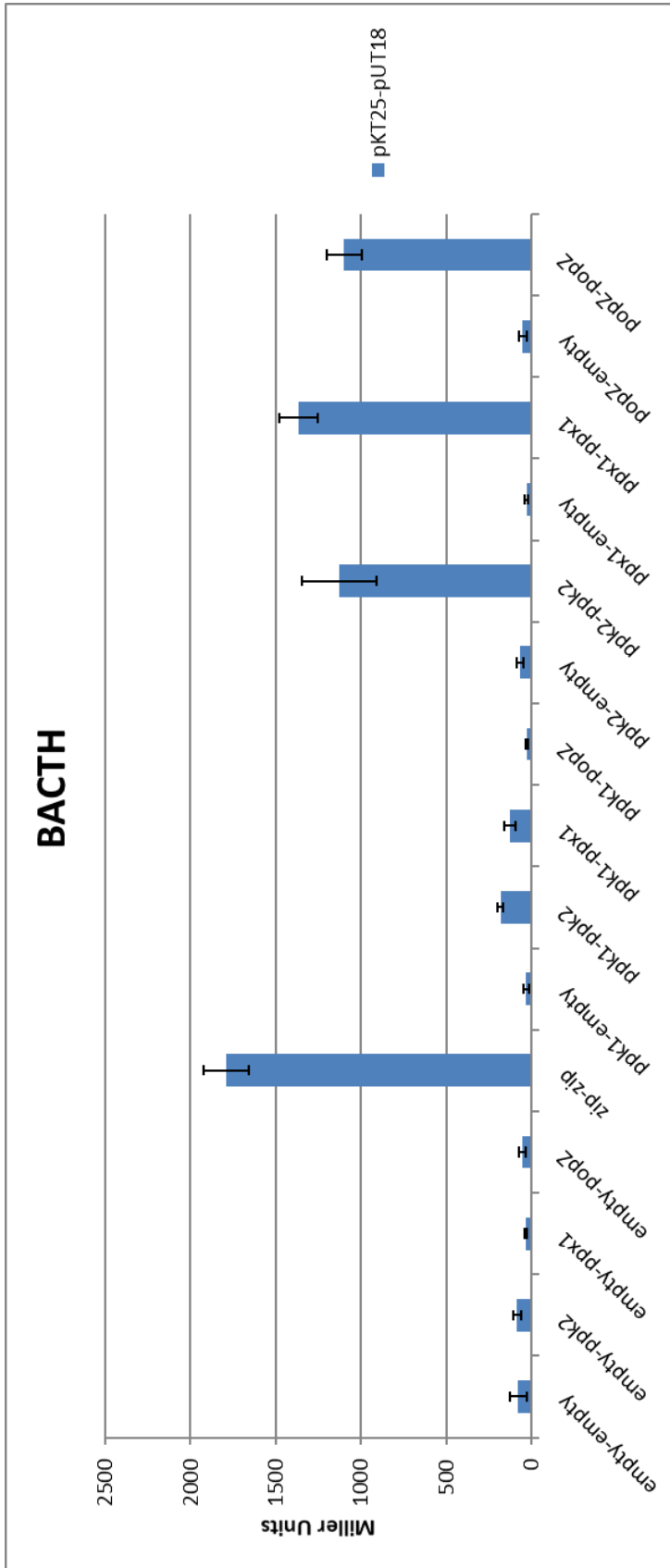
[DOI: 10.1007/s00253-020-10891-7](https://doi.org/10.1007/s00253-020-10891-7)

A2 Sequenzvergleich der PPK1 Aminosäuren von *E. coli*, *A. tumefaciens* und *C. crescentus*

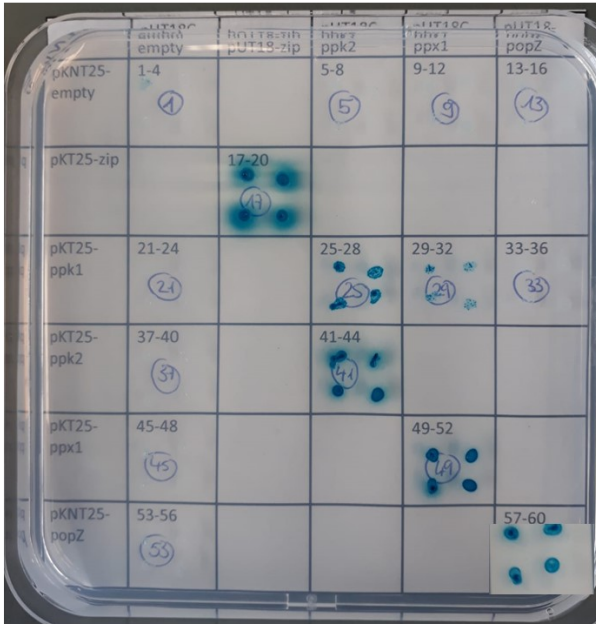


Abbildung A 2: Vergleich der Aminosäuresequenz der PPK1 zwischen *E. coli*, *A. tumefaciens* und *C. crescentus*. Die Autophosphorylierungsseite im aktiven Zentrum des Enzyms ist zwischen den Spezies konserviert. Bei der *E. coli* PPK1 handelt es sich um die Stelle H435, bei der *A. tumefaciens* PPK1 um die Stelle H450 und bei der *C. crescentus* PPK1 um die Stelle H460 (roter Pfeil) (bzw. H434 als weitere Autophosphorylierungsseite der PPK1_{CCR}). Der Sequenzvergleich wurde mit Clustal Omega durchgeführt (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Die gelben Balken geben die Konservierung und Qualität, die schwarzen Balken die Konsensussequenz an. Die Höhen der Balken zeigt den Grad der Übereinstimmung.

A3 BACTH-Versuch

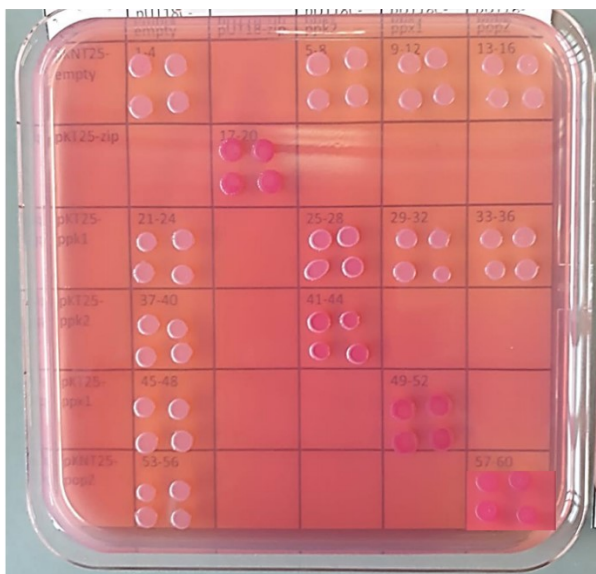


Platte 1



	pUT18C-empty	pUT18-zip	pUT18C-ppk2 _{At}	pUT18C-ppx1 _{At}	pUT18-popZ _{At}
pKNT25-empty	1-4		5-8	9-12	13-16
pKT25-zip		17-20			
pKT25-ppk1 _{At}	21-24		25-28	29-32	33-36
pKT25-ppk2 _{At}	37-40		41-44		
pKT25-ppx1 _{At}	45-48			49-52	
pKNT25-popZ _{At}	53-56				57-60

Platte 2



	pUT18C-empty	pUT18-zip	pUT18C-ppk2 _{At}	pUT18C-ppx1 _{At}	pUT18-popZ _{At}
pKNT25-empty	1-4		5-8	9-12	13-16
pKT25-zip		17-20			
pKT25-ppk1 _{At}	21-24		25-28	29-32	33-36
pKT25-ppk2 _{At}	37-40		41-44		
pKT25-ppx1 _{At}	45-48			49-52	
pKNT25-popZ _{At}	53-56				57-60

Abbildung A3: Ergebnisse des BACTH-Versuchs zwischen verschiedenen möglichen Protein-Interaktionspartnern von *A. tumefaciens* (nach Pfeiffer und Jendrossek, 2011). Eine starke Interaktion konnte für folgende Proteine mit sich selbst gezeigt werden: PPK2_{At}, PPX1_{At} und PopZ_{At}. Eine schwache Interaktion zwischen PPK1_{At} und PPK2_{At} sowie PPK1_{At} und PPX1_{At} war im β -Galaktosidase-Assay (Graphik, blaue Balken), sowie auch im Auftropfstest (Inkubation bei 30°C für 48 h) zu sehen. Die Standardabweichung stellt vier technische Replikate da. Das Experiment wurde in drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Klonierungsvektoren pKT25 und pUT18 enthalten jeweils eine Untereinheit der Adenylatcyclase (von *Bordetella pertussis*). Bei Fusion mit den zu untersuchenden jeweiligen potenziellen Interaktionspartnern, kommt es bei Kontakt dieser Kandidaten auch zum Zusammenschluss der Untereinheiten der Adenylatcyclase. Das dadurch nun aktive Enzym führt zur Expression von *lacZ* in dem *E. coli* Stamm BTH101 (besitzt kein eigenes Gen der Adenylatcyclase). Die Expression von *lacZ* ist durch das Auftauchen blauer Kolonien auf M63-Platten

mit X-Gal (Platte 1) oder violetter Kolonien auf MacConkey Platten mit Lactose (Platte 2) sichtbar. Im β -Galaktosidase-Assay (Graphik) wurden Leervektoren (empty) als Negativkontrolle, sowie die Vektoren mit *zip* als Positivkontrolle mitgeführt. Anmerkung: Bei Platte 1 und 2 wurden die Klone bei Position 57-60 auf separate Platten aufgetropft und hier manuell eingefügt.

A4 Originaldaten der Wachstumsversuche verschiedener *A. tumefaciens* Stämme

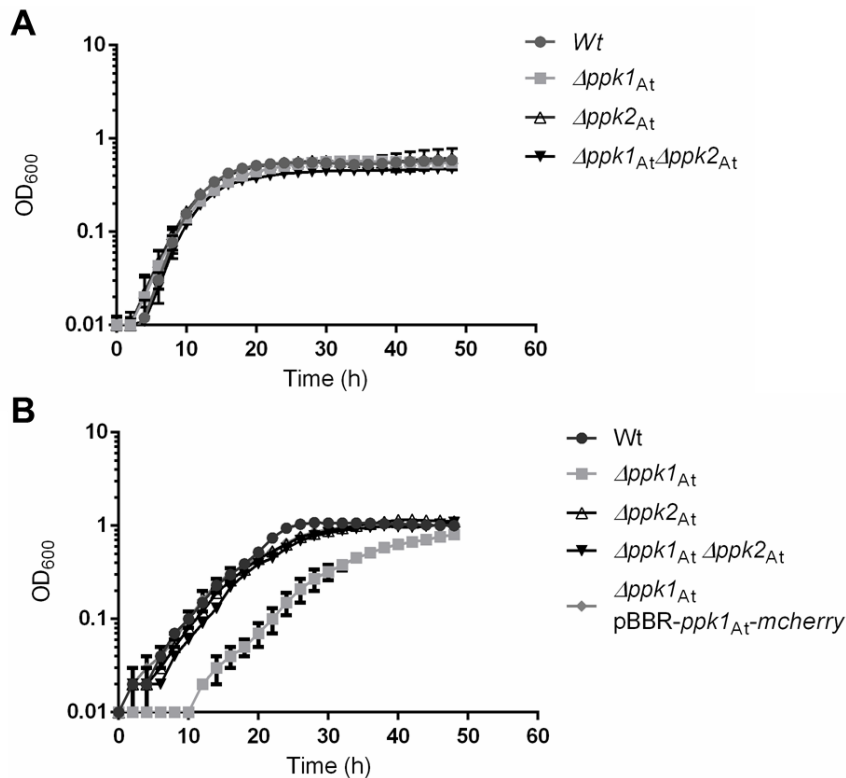


Abbildung A4: Wachstum verschiedener Deletionsstämme im Vergleich zum Wt in LB-Medium (A) und 0,5% Glukose Minimalmedium (modifiziert nach Schlegel *et al.*, 1961) (B). (A) Die Stämme wurden in LB-medium kultiviert und zeigten keinen Unterschied im Wachstumsverhalten. (B) Der Stamm *A. tumefaciens* $\Delta ppk1$ zeigte in Minimalmedium ein verringertes Wachstum im Vergleich zum Wt und den anderen Deletionsstämmen. Mit der Transformation des $pBBR1MCS2-P_{phaC}-ppk1_{At}-mcherry$ Plasmids ließ sich dieser Phänotyp komplementieren. Die Wachstumsversuche wurden in einem *plate reader* (BioTek) bei OD₆₀₀ durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von vier technischen und zwei biologischen Replikaten dar. Die Zellen wurden nach zwei Vorkulturen 24 h nach dem animpfen der 2. Vorkultur in einer 96-well Platte mit einem OD₆₀₀ von 0,01 in 200 μ l Medium angeimpft und alle 2 h gemessen. Anmerkung: In dem Wachstumsexperiment hatten die Stämme *A. tumefaciens* $\Delta ppk1$ und *A. tumefaciens* $\Delta ppk2$ zusätzlich noch die PHB-Synthese (*phaC*, *atu1604*) deletiert. Da die $\Delta phaC$ Kontrolle sich wie der Wt verhielt und kein detektierbares PHB in *A. tumefaciens* zu finden ist (siehe Anhang A1, Publikation [2], *supplemental. materials, figure 4*), wurde dies in der Abbildung vernachlässigt.

A5 Identifizierte Proteine aus dem pull down Experiment

Tabelle A5: Pull down Experiment mit spezifischen beads von ChromoTek (Deutschland) mit spezifischer Bindungsaffinität zu eYFP bzw. mCherry (GFP-Trap®_MA, RFP-Trap®_MA) für Immunopräzipitation von GFP/RFP-Fusionsproteinen aus Säugerzellextrakten. *A. tumefaciens* Wt Zellen, in denen *eyfp-hppA_{At}*, *ppk1_{At}-mcherry* und *eyfp-ppk2_{At}* durch entsprechende Plasmidaufnahme überexprimiert wurde, wurden mit zwei Vorkulturen für 24 h kultiviert, geerntet und mechanisch aufgeschlossen. Es folgte die Inkubation der Zellysate (500 µl) mit den entsprechenden beads für eine Stunde auf Eis auf einem Rotationsschüttler. Mit einem Magneten wurden die beads separiert. Es folgten 5 Waschstschritte mit eigens hergestelltem pull down Puffer (25 mM Natriumphosphatpuffer, 5% Glycerin, 50 mM NaCl, 5 mM MgSO₄, 5 mM KCl, 20 mM Imidazol, pH 7,5) bis die Proben mit 40 µl 2,5% SDS eluiert und 5 min bei 95°C denaturiert wurden. Anschließend wurden die Proben durch das Proteomcenter der Universität Tübingen mit Trypsin verdaut und mit LC-MS/MS analysiert. Zu sehen sind jeweils die ersten 10 Ergebnisse mit der höchsten Peptidanzahl.

Köderprotein: eYFP-HppA _{At}			
Identifiziertes Protein	#	Molekulargewicht	Peptide
outer membrane protein [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK86828.1	39 kDa	10
30S ribosomal protein S1 [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK89327.2	62 kDa	9
ATP synthase alpha chain [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK88345.1	55 kDa	8
ATP synthase beta chain [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK88343.2	51 kDa	8
DNAK Protein [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK85942.1	68 kDa	8
GroEL chaperonin [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK86491.1	58 kDa	7
H ⁺ translocating pyrophosphate synthase [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK86977.2	73 kDa	7
enhanced green fluorescence protein [synthetic construct]	AGB67764.1	27 kDa	5
Dihydropteroate synthase [<i>Agrobacterium tumefaciens</i>]	CDN96141.1	30 kDa	5
formyltetrahydrofolate deformylase [<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4213 (Ach5)]	AHK03625.1	33 kDa	5
Köderprotein: PPK1 _{At} -mCherry			
Identifiziertes Protein	#	Molekulargewicht	Peptide
polyphosphate kinase [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK86947.2	83 kDa	42
outer membrane protein [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK86828.1	39 kDa	10
GroEL chaperonin [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK86491.1	58 kDa	10
ATP synthase alpha chain [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK88345.1	55 kDa	7
Dihydropteroate synthase [<i>Agrobacterium tumefaciens</i>]	CDN96141.1	30 kDa	7
30S ribosomal protein S1 [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK89327.2	62 kDa	6
DNAK Protein [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK85942.1	68 kDa	5
formyltetrahydrofolate deformylase [<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4213 (Ach5)]	AHK03625.1	33 kDa	5

A5 Identifizierte Proteine aus dem pull down Experiment

30S ribosomal protein S2 [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK87166.2	28 kDa	5
group 1 outer membrane protein precursor [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK87173.1	85 kDa	5
Köderprotein: eYFP-PPK2_{At}			
Identifiziertes Protein	#	Molekulargewicht	Peptide
conserved hypothetical protein [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK86232.1	34 kDa	24
GroEL chaperonin [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK86491.1	58 kDa	20
enhanced green fluorescence protein [synthetic construct]	AGB67764.1	27 kDa	10
homospermidine synthase [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK89639.1	54 kDa	7
NptII [Binary vector pORE_E2]	AAS78935.1	29 kDa	6
glutathione S-transferase related protein [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK86935.1	22 kDa	5
polyphosphate kinase [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK86947.2	83 kDa	4
outer membrane protein [<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58]	AAK86828.1	39 kDa	4
Dihydropteroate synthase [<i>Agrobacterium tumefaciens</i>]	CDN96141.1	30 kDa	4
serine hydroxymethyltransferase [<i>Agrobacterium tumefaciens</i>]	OCJ66431.1	45 kDa	4

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 30. April 2021

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dieter Jendrossek für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Arbeit am Institut für Mikrobiologie, sowie für die vielen anregenden und hilfreichen Diskussionen zum Thema. Speziell bedanke ich mich für die hilfreiche Durchsicht der Arbeit und deren Begutachtung.

Bei Herrn Nussberger möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachters meiner Arbeit bedanken.

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

Mein besonderer Dank gilt Manfred Rhode für die TEM-Aufnahmen und Pamela Brown für die *A. tumefaciens* $\Delta popZ_{At}$ Depletionsmutante. Auch danke ich Meriyem Aktas, Franz Narberhaus und Lisa Knoke für den Infektions-Assay meiner *A. tumefaciens* Stämme, sowie für die Hilfe bei der Kultivierung und genetischen Manipulation von *Agrobacterium*.

Daniel Peiffer danke ich für die 3D-SIM Aufnahmen.

Bei Simone Reinhardt, Chiara Brück und Felix Becker bedanke ich mich für die Hilfe bei molekularbiologischen Arbeiten.

Ich bedanke mich ebenfalls bei meiner Bachelorandin Helen Sibold für ihren Einsatz und ihr gewissenhaftes Arbeiten im Rahmen der biochemischen Charakterisierung der PPKs.

Mein Besonderer Dank gilt auch Jakob Birke, Stefanie Schulze, Janina Berg, Hanna Rosigkeit und Jennie Hildenbrand für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und insbesondere bei der AG Jendrossek für die Unterstützung und die freundliche Zusammenarbeit herzlichst bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit bedanke ich mich bei dem Graduiertenkolleg 1708 der Universität Tübingen und bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG).

Auch bedanke ich mich bei Karl Forchhammer und Louisa Wessels-Perelo für die Gedankenanstöße und Organisation im Rahmen des GRKs.

Bei meinem Mann Maximilian bedanke ich mich für die Unterstützung und sein Verständnis für meine Arbeit, sowie für die aufmunternden Worte. Außerdem danke ich ihm und meinen Eltern für die Unterstützung meines Studiums.

Lebenslauf

Studium

- Seit 3/2017 Beginn der Arbeit als PhD und Start der vorliegenden Arbeit bei Prof. Dr. D. Jendrossek am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart
- 10/2015 – 7/2016 Master-Thesis: Potential effectors of HHV-6 reactivation (Abteilung Mikrobiologie, Universität Würzburg, Prof. Dr. Thomas Rudels Labor), Gruppenleiter: Dr. Bhupesh Prusty
- 10/2014 – 10/2016 M.Sc Biologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Deutschland
- 9/2013 – 12/2013 Auslandssemester, Umeå Universität, Schweden
- 4/2014 – 8/2014 Bachelor-Thesis: Das Immunsystem in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Honigbiene *Apis mellifera*- Entwicklung einer Lerneinheit, bei Prof. Dr. Jürgen Tautz, Bienenforschung Universität Würzburg
- 10/2011 – 9/2014 B.Sc. Biologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Deutschland

Schulbildung

- 9/2008 – 6/2011 Agrarbiologisches Gymnasium, Richard-von-Weizäcker Schule Öhringen
- 9/2002 – 7/2008 Realschule Möckmühl
- 9/1998 – 7/2002 Grundschule Züttlingen