

**Funktionale und strukturelle Charakterisierung von Polyphosphat  
und Polyphosphat-assoziierten Proteinen im  $\beta$ -Proteobakterium  
*Ralstonia eutropha* H16**

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

vorgelegt von  
**Hanna Rosigkeit**  
aus Kiel

|                             |                                   |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| Hauptberichter:             | Prof. Dr. Dieter Jendrossek       |
| Mitberichter:               | Prof. Dr. Martin Siemann-Herzberg |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 11. November 2022                 |

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart

2022



## Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation, abgesehen von ausdrücklich gekennzeichneten Ratschlägen oder Mitarbeiten, von mir selbstständig verfasst wurde.

Stuttgart, den

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Rosigkeit H., Kneißle L., Obruča S., Jendrossek D.** (2021) The Multiple Roles of Polyphosphate in *R. eutropha* and Other Bacteria. *Microbial Physiology*;31:163-177.

Die Versuche wurden von mir selbstständig geplant und durchgeführt in Absprache mit meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Dieter Jendrossek. Einige Wachstumsversuche, Polyphosphatquantifizierungen und PHB-Quantifizierungen wurden von Lea Kneißle im Rahmen ihrer von mir betreuten Bachelorarbeit und als wissenschaftliche Hilfskraft durchgeführt.

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| Abürzungsverzeichnis . . . . .                                  | 8         |
| Zusammenfassung . . . . .                                       | 10        |
| Abstract . . . . .  | 12        |
| <b>1 Einleitung</b>   | <b>14</b> |
| 1.1 Bakterielle Mikrokompartimente und Speicherstoffe . . . . . | 14        |
| 1.1.1 Polyphosphat . . . . .                                    | 15        |
| 1.1.1.1 Metabolische Enzyme von PolyP . . . . .                 | 16        |
| 1.1.1.2 Phosphatosom . . . . .                                  | 17        |
| 1.1.1.3 CHAD Proteine . . . . .                                 | 18        |
| 1.1.1.4 Funktion von PolyP . . . . .                            | 19        |
| 1.1.1.5 PolyP in bakteriellen Stressantworten . . . . .         | 20        |
| 1.1.1.6 Methoden der PolyP Analyse . . . . .                    | 21        |
| 1.1.2 Polyhydroxybutyrat . . . . .                              | 23        |
| 1.2 Stickstoffstoffwechsel und Glutaminsynthetasen . . . . .    | 23        |
| 1.3 Zielsetzung . . . . .                                       | 27        |
| <b>2 Material und Methoden</b>                                  | <b>29</b> |
| 2.1 Organismen, Plasmide und Primer . . . . .                   | 29        |
| 2.2 Nährmedien . . . . .  | 34        |
| 2.2.1 Komplexmedien . . . . .                                   | 34        |
| 2.2.2 Mineralmedien . . . . .                                   | 34        |
| 2.2.3 Antibiotika . . . . .                                     | 36        |
| 2.3 Zellkultivierung . . . . .                                  | 36        |
| 2.3.1 Stammhaltung und Konservierung . . . . .                  | 36        |
| 2.3.2 Kultivierung von <i>E. coli</i> . . . . .                 | 37        |
| 2.3.3 Kultivierung von <i>R. eutropha</i> . . . . .             | 37        |
| 2.3.4 Zellzahlbestimmung mit Neubauer Zählkammer . . . . .      | 37        |
| 2.3.5 Kultivierungsassay auf festem Medium . . . . .            | 37        |
| 2.3.6 Hitzestresstest bei konstanter Temperatur . . . . .       | 38        |
| 2.3.7 Hitzestresstest bei Hitzeschock . . . . .                 | 38        |
| 2.3.8 Oxidativer Stresstest . . . . .                           | 39        |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.3.9   | Motilitätsassay . . . . .  | 39 |
| 2.4     | Molekularbiologische Methoden . . . . .                          | 40 |
| 2.4.1   | Behandlung von Geräten und Lösungen . . . . .                    | 40 |
| 2.4.2   | Präparation von genomischer DNA aus <i>R. eutropha</i> . . . . . | 40 |
| 2.4.3   | Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> . . . . .          | 40 |
| 2.4.4   | Isolierung von RNA aus <i>R. eutropha</i> . . . . .              | 41 |
| 2.4.5   | Reverse Transkription . . . . .                                  | 41 |
| 2.4.6   | Polymerasekettenreaktion . . . . .                               | 42 |
| 2.4.7   | Quantitative Echtzeit-PCR . . . . .                              | 44 |
| 2.4.8   | Agarosegelelektrophorese . . . . .                               | 44 |
| 2.4.9   | Präparation von DNA aus Agarosegel . . . . .                     | 45 |
| 2.4.10  | Reinigung von PCR Produkten und verdauter DNA . . . . .          | 45 |
| 2.4.11  | Restriktionsverdau . . . . .                                     | 45 |
| 2.4.12  | Ligation von DNA Fragmenten . . . . .                            | 45 |
| 2.4.13  | Klonierung . . . . .   | 46 |
| 2.4.14  | Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration mit NanoDrop . . . . .  | 46 |
| 2.4.15  | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen . . . . .          | 46 |
| 2.4.16  | Transformation . . . . .   | 47 |
| 2.4.17  | Sequenzierung . . . . .  | 47 |
| 2.4.18  | Elektroporation von <i>R. eutropha</i> . . . . .                 | 47 |
| 2.5     | Analytische Methoden . . . . .                                   | 48 |
| 2.5.1   | Fluoreszenzmikroskopie . . . . .                                 | 48 |
| 2.5.2   | PolyP Extraktion und Quantifizierung . . . . .                   | 49 |
| 2.5.2.1 | PolyP Extraktion . . . . .                                       | 49 |
| 2.5.2.2 | PolyP Quantifizierung mit Malachitgrünassay . . . . .            | 49 |
| 2.5.2.3 | PolyP Quantifizierung mit Antimon-Ascorbat Assay . . . . .       | 50 |
| 2.5.2.4 | PolyP Kettenkonzentrationsassay . . . . .                        | 51 |
| 2.5.3   | Gaschromatographie . . . . .                                     | 54 |
| 2.5.4   | Durchflusszytometrie . . . . .                                   | 55 |
| 2.5.5   | Proteinstrukturanalyse mit SEC-MALS . . . . .                    | 56 |
| 2.5.6   | Raman-Mikrospektroskopie . . . . .                               | 56 |
| 2.5.7   | <sup>31</sup> Phospho-Kernspinresonanzspektroskopie . . . . .    | 57 |
| 2.5.8   | Lipidanalyse . . . . .   | 58 |
| 2.5.9   | Proteomanalyse . . . . .   | 58 |
| 2.6     | Biochemische Methoden . . . . .                                  | 59 |
| 2.6.1   | Proteinreinigung mit Histidin-tag . . . . .                      | 59 |
| 2.6.2   | Proteinreinigung mit strep-tag . . . . .                         | 60 |
| 2.6.3   | Bestimmung der Proteinkonzentration mit BCA . . . . .            | 61 |
| 2.6.4   | Polyacrylamidgelelektrophorese für Proteinanalyse . . . . .      | 61 |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.6.5    | Färbung von SDS-PA-Gelen mit colloidalem Coomassie . . . . .   | 62        |
| 2.6.6    | Silberfärbung von SDS-PA-Gelen . . . . .   | 63        |
| 2.6.7    | Polyacrylamid-Gelelektrophorese für PolyP . . . . .  | 64        |
| 2.6.8    | Färbung von PolyP-PA-Gelen mit Toluidinblau . . . . .  | 64        |
| 2.6.9    | Bakterielles Adenylatcyclase <i>two hybrid</i> System . . . . .  | 65        |
| 2.6.10   | $\beta$ -Galaktosidase Assay (Miller-Assay) . . . . .  | 66        |
| 2.6.11   | Isolation von PolyP Granula . . . . .  | 67        |
| 2.6.12   | Protein-Pulldown . . . . .   | 68        |
| 2.6.13   | Enzymaktivitätsassay für Glutaminsynthetase . . . . .  | 69        |
| 2.7      | Immunologische Methoden . . . . .  | 71        |
| 2.7.1    | Proteintransfer auf eine PVDF-Membran (Western Blot) . . . . .   | 71        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b>  | <b>74</b> |
| 3.1      | Funktion von PolyP . . . . .   | 74        |
| 3.1.1    | PolyP Metabolismus in <i>R. eutropha</i> in NB Medium . . . . .  | 74        |
| 3.1.1.1  | Kultivierbarkeit von <i>R. eutropha</i> Zellen aus der stationären Phase . . . . .                             | 77        |
| 3.1.2    | PolyP Metabolismus bei Phosphatlimitierung und Phosphatmangel in <i>R. eutropha</i> . . . . .                  | 78        |
| 3.1.2.1  | Wachstum und PolyP Metabolismus bei Phosphatlimitierung . . . . .  | 79        |
| 3.1.2.2  | Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von <i>R. eutropha</i> bei Phosphatlimitierung . . . . .                | 82        |
| 3.1.2.3  | Wachstum und PolyP Metabolismus von <i>R. eutropha</i> bei Phosphatmangel . . . . .                            | 83        |
| 3.1.2.4  | Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von <i>R. eutropha</i> bei Phosphatmangel . . . . .                     | 88        |
| 3.1.2.5  | Untersuchung des PHB Stoffwechsels von <i>R. eutropha</i> bei Phosphatlimitierung und Phosphatmangel . . . . . | 90        |
| 3.1.2.6  | PolyP Metabolismus in der <i>R. eutropha</i> $\Delta$ <i>phaC1</i> Mutante                                     | 92        |
| 3.1.2.7  | Wachstum und PolyP Metabolismus bei Aminosäuremangel   | 99        |
| 3.1.2.8  | Kultivierbarkeit von Zellen aus der stationären Phase bei Aminosäuremangel . . . . .                           | 100       |
| 3.1.2.9  | PHB-Metabolismus von <i>R. eutropha</i> bei Aminosäuremangel   | 101       |
| 3.1.2.10 | Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von <i>R. eutropha</i> bei Aminosäuremangel . . . . .                   | 102       |
| 3.1.3    | Untersuchung der Hitzetoleranz in Abhängigkeit von PolyP . . . . .   | 106       |
| 3.1.3.1  | Hitzetoleranz in <i>R. eutropha</i> . . . . .  | 106       |
| 3.1.3.2  | Hitzetoleranz in <i>E. coli</i> . . . . .  | 110       |

|          |  |     |
|----------|--|-----|
| 3.1.4    | Untersuchung der Toleranz von oxidativem Stress in Abhängigkeit von PolyP . . . . .                                | 113 |
| 3.1.4.1  | Toleranz gegenüber Oxidantien in <i>R. eutropha</i> . . . . .  | 113 |
| 3.1.4.2  | Toleranz gegenüber Oxidantien in <i>E. coli</i> . . . . .  | 119 |
| 3.1.5    | Untersuchung des Einflusses von PolyP auf die Motilität in <i>R. eutropha</i> . . . . .                            | 123 |
| 3.2      | Identifizierung und Charakterisierung PolyP-assoziiierter Proteine . . . . .                                       | 124 |
| 3.2.1    | Proteomanalyse neuer PolyP-assoziiierter Proteine . . . . .  | 125 |
| 3.2.1.1  | Identifizierung PolyP gebundener Proteine mittels Pulldown   | 125 |
| 3.2.1.2  | Lokalisationsstudien der potentiellen PolyP assoziierten Proteine . . . . .  | 130 |
| 3.2.2    | Charakterisierung der CHAD-Proteine PptA und PptB . . . . .  | 132 |
| 3.2.2.1  | Untersuchung der Expressionsmuster von PptA und PptB   | 132 |
| 3.2.2.2  | Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der CHAD-Proteine   | 133 |
| 3.2.2.3  | Expression und Reinigung von rekombinantem PptA . . .  | 134 |
| 3.2.2.4  | Untersuchung der Quartärstruktur von strep-PptA mittels Gelfiltration . . . . .                                    | 137 |
| 3.2.2.5  | PolyP Metabolismus in <i>R. eutropha</i> $\Delta pptA$ in Komplexmedium . . . . .                                  | 141 |
| 3.2.2.6  | PolyP Metabolismus in <i>R. eutropha</i> $\Delta pptA$ bei Aminosäuremangel . . . . .                              | 144 |
| 3.2.2.7  | Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der <i>R. eutropha</i> $\Delta pptA$ Mutante bei Aminosäuremangel . . . . . | 146 |
| 3.2.2.8  | Untersuchung von <i>R. eutropha</i> $\Delta pptA$ und $\Delta pptA \Delta pptB$ bei Phosphatmangel . . . . .       | 148 |
| 3.2.2.9  | Gerichtete Protein-Interaktionsstudien der CHAD-Proteine mit bac2hybrid . . . . .                                  | 151 |
| 3.2.2.10 | Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der GlnA1 in <i>R. eutropha</i> $\Delta pptA$ . . . . .                     | 153 |
| 3.2.3    | Untersuchung der Glutaminsynthetase GlnA1 in <i>R. eutropha</i> . . . . .  | 154 |
| 3.2.3.1  | Expression und Reinigung rekombinanter GlnA1 . . . . .   | 154 |
| 3.2.3.2  | Untersuchung der Quartärstruktur von GlnA1 . . . . .   | 155 |
| 3.2.3.3  | Test der enzymatischen Aktivität von GlnA1 . . . . .   | 160 |
| 3.2.3.4  | Protein-Interaktionsstudien von GlnA1 durch einen Pull-down und bac2hybrid . . . . .                               | 163 |
| 3.3      | Strukturanalyse von PolyP und <i>R. eutropha</i> Zellen . . . . .  | 169 |
| 3.3.1    | Untersuchung der chemischen Zusammensetzung von <i>R. eutropha</i> durch Raman-Mikrospektroskopie . . . . .        | 169 |
| 3.3.2    | Phospholipidanalyse von <i>R. eutropha</i> WT und der $\Delta ppk-all$ Mutante                                     | 178 |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 3.4      | Strukturanalyse von PolyP . . . . .  | 179        |
| 3.4.1    | Abschätzung von PolyP Kettenlängen im PolyP Gel . . . . .                                  | 180        |
| 3.4.2    | Bestimmung der PolyP Kettenlänge mittels Kettenkonzentrations-<br>assay . . . . .          | 181        |
| 3.4.3    | Strukturanalyse von PolyP mit <sup>31</sup> P-NMR . . . . .                                | 185        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion</b>  | <b>191</b> |
| 4.1      | PolyP Stoffwechsel in <i>R. eutropha</i> und die <i>stringent response</i> . . . . .       | 191        |
| 4.2      | PolyP als Phosphatspeicher und Zusammenhang mit dem Kohlenstoffspei-<br>cher PHB . . . . . | 194        |
| 4.3      | Toleranz von <i>R. eutropha</i> gegen Hitzestress und oxidativen Stress . . . . .          | 197        |
| 4.4      | Struktur der CHAD-Proteine in <i>R. eutropha</i> . . . . .                                 | 201        |
| 4.5      | Funktion der CHAD Proteine und PolyP assoziierte Proteine . . . . .                        | 207        |
| 4.6      | Die Struktur und Funktion der GlnA1 in <i>R. eutropha</i> . . . . .                        | 213        |
| 4.7      | Zelluläre Struktur von <i>R. eutropha</i> mit Bezug auf PolyP und PptA . . . . .           | 219        |
| 4.8      | Struktur von PolyP in <i>R. eutropha</i> . . . . .   | 222        |
| 4.9      | Ausblick . . . . .   | 226        |
|          | <b>Literatur</b>   | <b>228</b> |
| <b>5</b> | <b>Anhang</b>  | <b>240</b> |
|          | Danksagung . . . . .   | 319        |



## Abkürzungsverzeichnis

|                   |   |
|-------------------|---|
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure                                  |
| RNA               | Ribonukleinsäure  |
| PolyP             | Polyphosphat  |
| PHB               | Poly-(3-hydroxybutyrat)                                 |
| LB                | Luria broth   |
| NB                | Nutrient broth  |
| dNTP              | Didesoxynukleosidtriphosphat                            |
| ATP               | Adenosintriphosphat                                     |
| ADP               | Adenosindiphosphat                                      |
| AMP               | Adenosinmonophosphat                                    |
| DAPI              | 4',6-Diamidin-2-phenylindol                             |
| OD <sub>600</sub> | Optische Dichte bei 600 nm                              |
| A <sub>280</sub>  | Absorption bei 280 nm                                   |
| ü. N.             | über Nacht  |
| rpm               | Runden pro Minute                                       |
| MOPS              | 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure                       |
| EDTA              | Ethylendiamintetraessigsäure                            |
| PI                | Propidiumiodid  |
| Tris              | Tris-(hydroxymethyl)aminomethan                         |
| MSM               | Mineralsalzmedium                                       |
| cdw               | <i>cell dry weight</i> (Zelltrockenmasse)               |
| WT                | Wildtyp   |
| KO                | <i>knockout</i> (=Gendeletion)                          |
| R <sup>Kan</sup>  | Kanamycinresistenz                                      |
| R <sup>Amp</sup>  | Ampicillinresistenz                                     |
| R <sup>Cm</sup>   | Chloramphenicolresistenz                                |
| R <sup>Tet</sup>  | Tetracyclinresistenz                                    |
| Frk               | Fruktose  |
| ppGpp             | Guanosintetraphosphat                                   |
| pppGpp            | Guanosinpentaphosphat                                   |
| ROS               | reaktive Sauerstoffspezies                              |
| AU                | <i>arbitrary units</i> (willkürlich gewählte Einheiten) |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|         |   |
|---------|---|
| BCIP    | 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat   |
| NTB     | Nitrotetrazolium Blau Chlorid   |
| DMF     | Dimethylformamid  |
| PVDF    | Polyvinylidenfluorid  |
| BSA     | Bovines Serumalbumin  |
| AP      | Alkalische Phosphatase  |
| AS      | Ammoniumpersulfat   |
| DTT     | Dithiothreitol  |
| SDS     | Natriumdodecylsulfat  |
| X-Gal   | 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid                                      |
| IPTG    | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid  |
| ONPG    | o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktosid  |
| NTA     | Nitrilotriessigsäure  |
| LS      | Lichtstreuung   |
| SEC     | <i>size exclusion chromatography</i> (Größenausschlusschromatographie)                      |
| MALS    | <i>multi angle static light scattering</i><br>(Lichtstreuung in einer Vielzahl von Winkeln) |
| MW      | Molekulargewicht  |
| NADH    | Nikotinamidadenindinukleotid  |
| PK      | Pyruvatkinase   |
| LDH     | Laktatdehydrogenase   |
| LC      | <i>liquid chromatography</i> (Flüssigchromatographie)                                       |
| MS      | Massenspektrometrie   |
| DSMZ    | Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen                                     |
| APS     | Adenosin-5'-phosphosulfat   |
| TEMED   | Tetramethylethyldiamin  |
| PA      | Polyacrylamid   |
| PEP     | Phosphoenolpyruvat  |
| NMR     | Kernspinresonanzspektroskopie ( <i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i> )            |
| ppm     | <i>parts per million</i> Stück pro Million  |
| PPK     | Polyphosphatkinase  |
| PPX     | Exopolyphosphatase  |
| Ntr     | <i>Nitrogen-related</i> (stickstoffabhängig)  |
| ExpPASy | Expert Protein Analysis System  |

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion und Struktur des Biopolymers Polyphosphat (PolyP) sowie PolyP assoziierte Proteine im  $\beta$ -Proteobakterium *Ralstonia eutropha* H16 und deren Wechselwirkungen mit anderen zellulären Strukturen und Prozessen untersucht.

Der PolyP Metabolismus wurde unter verschiedenen Bedingungen untersucht. In Komplexmedium und aminosäurefreiem, definiertem Mineralsalzmedium mit Phosphat im Überschuss akkumulierte *R. eutropha* PolyP in der stationären Phase bis zu  $190 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$ , das in der späten stationären Phase wieder abgebaut wurde. Bei Phosphatmangel wurde PolyP konsumiert zugunsten weiteren Wachstums. Zur Aufklärung der Funktion von PolyP in *R. eutropha* wurde eine PolyP-freie siebenfache Deletionsmutante der *ppks* untersucht. Diese  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante unterlag dem WT im Wachstum unter Phosphatlimitierung. In *R. eutropha* dient PolyP im Wesentlichen als Phosphatspeicher. Im Einklang mit dem fehlenden Phosphatdepot bestand die Zellmembran der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante in geringerem Maß aus Phosphatidylethanolamin als der WT. Die in Bakterien häufig beobachtete chaperonartige Funktion von PolyP mit Überlebensvorteilen bei proteinschädigendem Stress wie Hitzestress oder oxidativem Stress wurde für *R. eutropha* nicht gefunden. Ebenso hatte es keinen Einfluss auf die Motilität oder die Anpassung an Aminosäuremangel, bei der die potentiell PolyP abhängige *stringent response* als zellulärer Adaptionsprozess abläuft.

Die  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante wies eine verringerte PHB Akkumulation unter Phosphatmangel auf, während eine PHB-freie  $\Delta phaC1$  Mutante bei Phosphatmangel PolyP nur verzögert mobilisierte. Die Ergebnisse sprechen für einen Zusammenhang zwischen dem PolyP- und PHB-Metabolismus.

Es wurden mehrere potentielle PolyP assoziierte Proteine identifiziert, darunter die konservierten, hypothetischen Proteine H16\_B0702, H16\_B0177, H16\_B1984 und H16\_A1273 sowie eine GTP-Cyclohydrolase (H16\_B1967) und Guanylatcyclase (H16\_A0953). Die Assoziation des CHAD Proteins PptA an PolyP und die spezifische Bindung zwischen PptA und der GlnA1 wurden bestätigt. GlnA1 ist eine funktionale Typ-I Glutaminsynthetase, jedoch wurde keine Regulation der Enzymaktivität durch PptA festgestellt. Die GlnA1 interagierte in vivo auch mit dem phosphatmangelinduzierten Protein PhoH und der Lon Protease, die potentiell mit PolyP im Komplex aktiv ist. Zusätzlich fehlten in einem Pulldown mit eYFP-GlnA1 als Köder bei der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante die zwei aktivitätsregulierenden Proteine PII und PII Uridylyltransferase (UTase) als Interaktionspartner.

Dies sind mehrere Hinweise für eine Schnittstelle zwischen dem Phosphat- und Stickstoffstoffwechsel.

Die Quartärstrukturaufklärung von PptA ergab widersprüchliche Ergebnisse: In einem in vivo Protein-Protein-Interaktionsassay wurde keine Tendenz zur Oligomerisierung festgestellt, während in der Gelfiltration von isoliertem PptA neben Monomeren auch Dimere, Tetramere und Oktamere identifiziert wurden. Die beiden CHAD-Proteine PptA und PptB wurden in der stationären Phase exprimiert simultan zur PolyP Synthese, PptB stärker als PptA. Eine Bindung von PptB an das PolyP Granulum konnte nicht festgestellt werden. Die Untersuchung von *R. eutropha*  $\Delta pptA$  zeigte einen ähnlichen PolyP Metabolismus wie der WT, allerdings mit einem geringfügigen Defizit in der PolyP Akkumulation in der stationären Phase in Komplex- und Mineralsalzmedium. In Letzterem war der Anteil an Zellen mit zwei Granula pro Zelle gegenüber einem Granulum erhöht. Der Anteil an Zellen ohne Granulum oder mit drei Granula pro Zelle war wiederum vergleichbar mit dem WT. Bei Phosphatmangel wurde PolyP in dieser Mutante schneller konsumiert als im WT, ohne Einfluss auf das Wachstum. Es gab mehrere Hinweise auf eine Interaktion von PptA mit RNA bzw. ein Zusammenhang mit der Transkription und Translation.

Die Strukturaufklärung von PolyP ergab kurze, lineare Kettenlängen von im Mittel 8-10 Phosphatresten bis zu langen Ketten von über 100 Phosphatresten. Auch zyklisches PolyP wurde identifiziert.

Zusammengefasst sind die wichtigsten Ergebnisse:

1. *R. eutropha* akkumuliert PolyP in der stationären Phase. Dieses dient als Phosphatspeicher.
2. Bei Phosphatmangel ist in der  $\Delta ppk-all$  Mutante die PHB Akkumulation reduziert, in der  $\Delta phaC1$  Mutante dagegen die PolyP Mobilisierung. Der Biopolymerstoffwechsel von PolyP und PHB hängt zusammen.
3. PptA bindet spezifisch an PolyP, aber nicht PptB. *R. eutropha*  $\Delta pptA$  akkumuliert PolyP schlechter in der stationären Phase und bildet in aminosäurefreiem Medium vermehrt zwei Granula pro Zelle.
4. PptA interagiert mit der aktiven Glutaminsynthetase GlnA1, die wiederum mit der Lon Protease und PhoH interagiert.
5. PolyP liegt in *R. eutropha* linear und zyklisch vor, mit unterschiedlichen Kettenlängen von 8-10 sowie über 100 Phosphatresten.

## Abstract

In this study, the function and structure of the biopolymer polyphosphate (polyP) and polyP associated proteins and their interactions with other cellular structures and processes was investigated in the  $\beta$ -proteobacterium *R. eutropha* H16.

The polyP metabolism was elucidated under different conditions. In complex medium and amino acid deficient defined mineral salts medium with phosphate in excess, *R. eutropha* accumulated polyP in the stationary growth phase with up to  $190 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$ , before degrading it in the late stationary phase. Upon phosphate starvation, polyP was consumed to allow further growth. To identify the function of polyP in *R. eutropha*, a deletion strain of the seven *ppks* was investigated. This  $\Delta ppk\text{-all}$  mutant showed poor growth under phosphate limitation. A substantial function of polyP in *R. eutropha* is phosphate storage. In accordance, the  $\Delta ppk\text{-all}$  mutant had a lower amount of phosphatidylethanolamine than the WT. The well known chaperone-like function of polyP in bacteria with protecting effects under protein-damaging stress like heat or oxidative stress could not be confirmed for *R. eutropha*. Furthermore, it did not effect motility or the adaptation to amino acid starvation, which is a typical trigger for the potentially polyP-dependent stringent response.

The  $\Delta ppk\text{-all}$  mutant showed a diminished accumulation of PHB under phosphate limitation, while the PHB-free  $\Delta phaC1$  mutant mobilised polyP faster during phosphate starvation. These results suggest a connection between the metabolisms of the two biopolymers.

There were various polyP-associated proteins identified, among others the conserved hypothetical proteins H16\_B0702, H16\_B0177, H16\_B1984 and H16\_A1273 as well as GTP-cyclohydrolase (H16\_B1967) and guanylate cyclase (H16\_A0953). The association of the CHAD protein PptA to the polyP granule was confirmed as well as the specific interaction between PptA and GlnA1. GlnA1 turned out to be a functional type-I glutamine synthetase, but no regulation of its activity was caused by PptA. GlnA1 interacted in vivo with the phosphate starvation-inducible protein PhoH and the potentially polyP-dependent Lon protease. Additionally, in a pulldown in *R. eutropha*  $\Delta ppk\text{-all}$  cell lysate with eYFP-GlnA1 as a bait, the two regulatory proteins for GlnA1 activity PII and PII uridylyltransferase were lacking as interaction partners. These hints suggest a linkage between the phosphate and nitrogen metabolism.

The quaternary structure of PptA revealed ambiguous results: An in vivo protein-protein interaction assay suggested monomeric PptA, while size exclusion chromatography iden-

tified, beside monomers, also dimers, tetramers and octamers. The two CHAD genes *pptA* and *pptB* were expressed in the stationary phase simultaneously to polyP accumulation. *pptB* expression occurred at a higher level than *pptA*, but an association of PptB to the polyP granule could not be determined. The investigation of a  $\Delta pptA$  mutant strain revealed a polyP metabolism similar to the WT, but with a minor deficit in polyP accumulation in the stationary phase in complex media or defined mineral salts medium. In the latter, there was an increased portion of cells with two granules and less with one granule per cell compared to the WT, whereas the portions of cells without granules or three granules was comparable. Under phosphate limitation, polyP was consumed more quickly than in the WT, without influencing the growth rate. There were also several hints towards a connection of PptA with RNA or rather transcription and translation. The structure determination of polyP revealed short linear chains of 8-10 phosphate residues as well as cyclic polyP using  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy. Contrary, in an enzymatic chain length determination assay, a mean chain length of 97 phosphate residues in the WT and 283 phosphate residues in a  $\Delta pptA\Delta pptB$  mutant was measured, respectively. The latter results were supported by polyP gel electrophoresis with low migration of isolated polyP in the gel, suggesting chain lengths  $> 100$  by comparison with a synthetic polyP standard. In summary, these are the most striking results:

1. *R. eutropha* accumulates PolyP in the stationary phase. It serves as a phosphate storage.
2. Under phosphate deprivation, a  $\Delta ppk$ -all mutant accumulates reduced amounts of PHB, in a  $\Delta phaC1$  mutant the polyP accumulation is reduced. There is a connection between the metabolism of polyP and PHB.
3. PptA binds specifically to polyP, but not PptB. *R. eutropha*  $\Delta pptA$  accumulates polyP at lower rates in the stationary phase and has a higher tendency to form two granules per cell in amino acid free medium.
4. PptA interacts with the active glutamine synthetase GlnA1, which in turn interacts with Lon protease und PhoH.
5. The structure of polyP is linear or cyclic in *R. eutropha*, with various chain lengths from 8-10 as well as over 100 phosphate residues.

# 1 Einleitung

Bakterien besiedeln Habitate rund um den Globus und gestalten die Erde als einen Ort voller vielfältiger, faszinierender Lebensformen. Dabei sind freilebende Bakterien ständig fluktuierenden Umweltbedingungen und abiotischen Stressfaktoren ausgesetzt wie Hitze bzw. Kälte, Trockenheit, elektromagnetischer Strahlung, pH- und Osmolaritätsveränderungen oder schwankender Nährstoffverfügbarkeit. Um diese Umgebungsparameter zu stabilisieren oder auszuhalten und ihre Überlebenschancen zu erhöhen, haben Bakterien verschiedene Überdauerungsmechanismen und intrazelluläre Speicher angelegt. In den Speichern werden die essentiellen Nährstoffe Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor, Schwefel und Eisen gebunden, teilweise als Polymer in Form von z.B. Polyhydroxybutyrat, Polyphosphat oder Cyanophycin. Diese Speicherpolymere können auch Kompartimente oder supramolekulare Komplexe in der Zelle bilden.

## 1.1 Bakterielle Mikrokompartimente und Speicherstoffe

Bakterielle Zellen grenzen sich gegenüber der Umwelt durch eine Lipiddoppelschicht ab. Der Stoffwechsel von Bakterien im Inneren der Zelle besteht aus einer Vielzahl chemischer Reaktionen, die jeweils unter spezifischen Bedingungen ablaufen. Die zellulären Strukturen sind hochgradig organisiert, um verschiedene Reaktionsräume zu schaffen, wodurch Stoffwechselprozesse reguliert und simultan ablaufen können. Ein Beispiel dafür sind die Carboxysomen in autotrophen Organismen wie Cyanobakterien. Sie bilden ein abgeschlossenes Mikrokompartiment, in dem die Enzyme für die CO<sub>2</sub> Fixierung vorliegen sowie eine Anreicherung des Substrats CO<sub>2</sub>, um optimale Reaktionsbedingungen zu schaffen (MacCready & Vecchiarelli, 2021). Weitere bakterielle Mikrokompartimente sind Anammoxosomen, in denen Ammonium mit Nitrit zu Stickstoff oxidiert wird in einem Anaerobe-Ammonium-Oxidation-Prozess (Anammox-Prozess). Dieses Kompartiment ist von einer Lipidschicht aus Ladderanen umgeben, um die Zelle vor dem hochreaktiven Zwischenprodukt Hydrazin zu schützen (van Niftrik *et al.*, 2004). Magnetotaktische Bakterien nutzen Magnetosomen, bestehend aus magnetischem Magnetit (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) oder Greigit (Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>) und umhüllt von einer Lipidschicht, zur Ausrichtung am Erdmagnetfeld (Uebe & Schüler, 2016). Für die Photosynthese bilden Cyanobakterien Phycobilisomen aus Proteinen mit Tetrapyrrolfarbstoffen als sensitive Lichtsammelkomplexe an der Zellmembran. Andere photosynthetische Bakterien wie *Chlorobium tepidum* bilden Chlorosomen. Dies sind chlorophyllhaltige, mit einer Monolipidschicht umhüllte Vesikel an der Cytoplasmamembran.

In den beiden  $\alpha$ -Proteobakterien *Agrobacterium tumefaciens* und *Rhodospirillum rubrum* existieren Acidocalcisomen, die ansonsten in Eukaryoten wie Trypanosomen vorkommen (Docampo & Moreno, 2011; Seufferheld *et al.*, 2003). Dies sind mit einer Lipidschicht umgebene Kompartimente mit niedrigem pH-Wert, die mit Calcium und anderen Kationen angereichert sind und, zumindest in Eukaryoten, auch Polyphosphat (PolyP) enthalten (Docampo 2011, Frank 2020a). *A. tumefaciens* besitzt unabhängig vom Acidocalcisom auch PolyP Granula (Frank & Jendrossek, 2020).

Zusätzlich haben Bakterien Speicherstrukturen wie Polyhydroxybutyrat (PHB) als organischen Kohlenstoffspeicher, das von einer Proteinhülle umgeben ist und ebenfalls ein Mikrokompartiment darstellt, das Carbonosom (Bresan *et al.*, 2016; Jendrossek & Pfeiffer, 2014). Als Phosphatspeicher dient PolyP (Kornberg *et al.*, 1999, S. 144), das mit Proteinen assoziiert ein weiteres Mikrokompartiment darstellt und als Phosphatosom bezeichnet wird (Tumlirsch & Jendrossek, 2017). PolyP akkumulierende Organismen spielen eine wichtige Rolle bei der Behandlung von Abwasser, dem *Enhanced Biological Phosphate Removal* (EBPR)-Prozess (Lin *et al.*, 2015). Daneben gibt es als Stickstoffspeicher Cyanophycin, das aus Arginin und Lysin besteht. Als Eisenspeicher dienen Proteine wie Ferritin mit hoher Bindekapazität von  $\text{Fe}^{2+}$ , welches in freier Form toxisch für die Zelle wäre (Andrews, 1998).

Der in dieser Arbeit verwendete Modellorganismus *R. eutropha* H16 bildet sowohl PHB als auch PolyP. Es ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges  $\beta$ -Proteobakterium mit zwei Chromosomen (A und B) sowie ein Megaplasmid (pHG1) (Pohlmann *et al.*, 2007). *R. eutropha* ist peritrich mit Flagellen versehen und lebt in Süßwasser (Aragno *et al.*, 1977; Raberg *et al.*, 2008). Der Stoffwechsel kann chemolithoautotroph sein, indem es nur mit  $\text{CO}_2$  als Kohlenstoffquelle und  $\text{H}_2$  als Elektronendonator unter aeroben Bedingungen Energie schöpft, weshalb es als Knallgasbakterium bezeichnet wird (Pohlmann *et al.*, 2007). Industriell bedeutsam ist *R. eutropha* durch seine Fähigkeit, das Biopolymer PHB mit bis zu 90 % des Zelltrockengewichts zu synthetisieren, das als biologisch abbaubarer Rohstoff Verwendung findet (Jendrossek & Pfeiffer, 2014; Pohlmann *et al.*, 2007). Daher wurden die Grundlagen des PHB Stoffwechsels in *R. eutropha* und industrielle Anwendungen von PHB bereits detailliert untersucht (Jendrossek & Pfeiffer, 2014; Pötter & Steinbüchel, 2006; Reinecke & Steinbüchel, 2009). Daneben besitzt *R. eutropha* auch Polyphosphat (Doi *et al.*, 1989; Tumlirsch *et al.*, 2015), das lange Zeit im Schatten von PHB kaum Gegenstand der Forschung war.

### 1.1.1 Polyphosphat

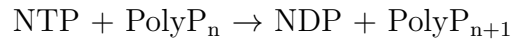
Das Biopolymer Polyphosphat (PolyP) besteht aus ortho-Phosphat, das über energiereiche Phosphoanhydridbindungen polymerisiert (I. S. Kulaev & Vagabov, 1983) und kann



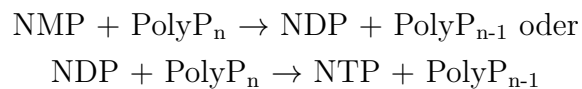
linear, verzweigt (Ultraphosphat) oder zyklisch (Metaphosphat) vorliegen (Dürr-Mayer *et al.*, 2021; S. Kulaev *et al.*, 2004). Die Kettenlänge von linearem PolyP kann dabei zwischen zwei bzw. drei und über 1000 Phosphatresten liegen (I. S. Kulaev & Vagabov, 1983). Erstmals wurde PolyP in *Spirillum volutans* von Liebermann, 1888 gefunden und daher Volutin-Granula genannt. Seitdem wurde PolyP in einer Vielzahl an Organismen der drei Domänen des Lebens entdeckt (Xie & Jakob, 2019).

### 1.1.1.1 Metabolische Enzyme von PolyP

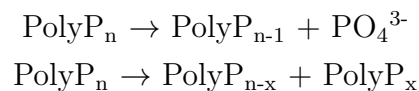
Die PolyP Synthese erfolgt in Bakterien durch Polyphosphatkinasen (PPK), von denen es zwei strukturell nicht verwandte Enzyme gibt. Die PPK1 besteht aus vier Domänen, N(-terminal), H(ead), C1 und C2 und bildet ein etwa 80 kDa großes Molekül (Zhu *et al.*, 2005). Die PPK2 besitzt mit rund 35-40 kDa ein etwa halb so großes Molekulargewicht wie PPK1 und hat eine PPK2 Domäne (Zhang *et al.*, 2002). Die PPKs katalysieren die PolyP Synthese unter Verwendung des  $\gamma$ -Phosphats verschiedener Nukleosidtriphosphate (NTPs) oder zum Abbau von PolyP mit Nukleosidmonophosphaten (NMPs) oder -diphosphaten (NDPs). Bei den PPK2 werden bezüglich der Substratspezifität drei Subtypen unterschieden, die 1. NDPs nutzen, 2. NMPs oder 3. beide (Neville *et al.*, 2022). PPK1 und PPK2 können die Reaktion prinzipiell in beide Richtungen katalysieren (Frank *et al.*, 2020; Hildenbrand *et al.*, 2020), doch PPK1 bevorzugt in vivo tendenziell die Synthese von PolyP



die PPK2 den Abbau von PolyP (Neville *et al.*, 2022).



PolyP kann weiterhin von der Exopolyphosphatase PPX unter Abspaltung terminaler Phosphatreste oder der Endopolyphosphatase PPN mit Spaltung innerhalb der Phosphatkette abgebaut werden (Brown & Kornberg, 2008; Rao *et al.*, 2009).



Darüber hinaus können einige PPKs Nukleotide oligophosphorylieren (Frank *et al.*, 2020; Hildenbrand *et al.*, 2020; Mordhorst *et al.*, 2019). PPKs können in vitro verschiedene NTPs als Substrate und unterschiedliche divalente Kationen zur de novo Granulasynthese nutzen ohne Verwendung eines Oligophosphatprimers (Frank *et al.*, 2020; Hildenbrand *et al.*, 2020).

In Bakterien können beide Typen von PPKs einzeln oder in Kombination vorkommen (Rao *et al.*, 2009). *R. eutropha* hat sieben PPKs, zwei PPK1 sowie fünf PPK2 (Tumlirsch *et al.*, 2015), von denen alle in vitro eine Kinaseaktivität aufweisen (Hildenbrand *et al.*, 2020; unveröffentlichte Daten). Ob PPKs Ultra- oder Metaphosphate metabolisieren, ist noch ungeklärt (Neville *et al.*, 2022).

### 1.1.1.2 Phosphatosom

In *R. eutropha* bildet PolyP Granula, die mit dem Polyanionen bindenden Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) markiert werden können und nach DAPI-spezifischer Anregung mit einer DAPI-PolyP-spezifischen Wellenlänge Fluoreszenz emittieren. Die meist ein bis drei Granula befinden sich üblicherweise in der Zellmitte bzw. gleichmäßig entlang der Längsachse verteilt (Tumlirsch & Jendrossek, 2017), wie in Abbildung 1.1 gezeigt ist.

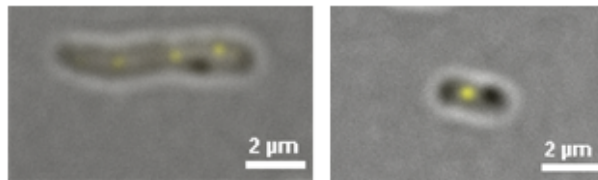


Abb. 1.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *R. eutropha* H16 mit DAPI-gefärbten PolyP Granula. *R. eutropha* H16 wurde in Komplexmedium bei 30 °C schüttelnd kultiviert. Die Zellen wurden nach 9 h (links) in der exponentiellen Phase und 24 h (rechts) in der stationären Phase mit DAPI gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Der Maßstab beträgt 2 µm.

Das PolyP Granulum mit einer Größe von rund 100-200 nm (Kornberg *et al.*, 1999) ist mit verschiedenen Proteinen assoziiert, ohne eine umgebende Lipidschicht (siehe Abb. 1.2) (Tumlirsch & Jendrossek, 2017). Dazu gehören die PPK1a, PPK2c, PPK2d und PPK2e, die beiden *Conserved Histidine  $\alpha$ -Helical Domain* (CHAD)-Proteine PptA und PptB, die als Phosine bezeichnet werden, und mehrere uncharakterisierte Proteine. Zusammen bilden die Bestandteile das Mikrokompartment Phosphatosom (Tumlirsch & Jendrossek, 2017).

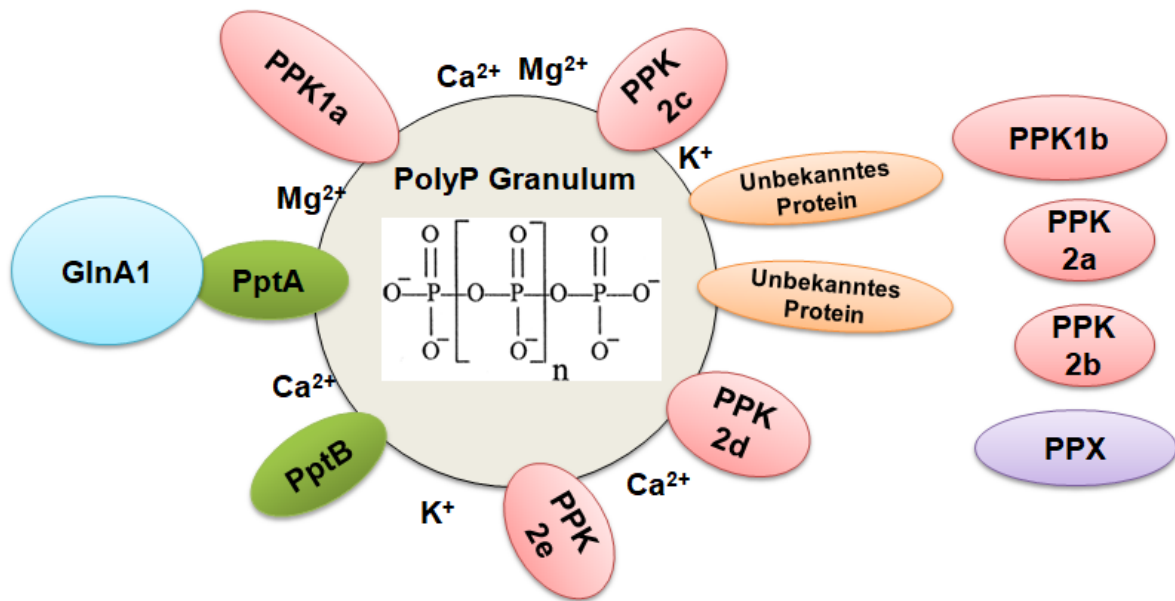


Abb. 1.2: Schema des Phosphatosoms von *R. eutropha*. Granuläres PolyP (grau) mit der Strukturformel (Kornberg 2004) ist mit Gegenionen und verschiedenen Proteinen (Ovale) assoziiert. Von den sieben PPKs (rot) sind PPK1a, PPK2c, PPK2d und PPK2e gebunden, während PPK1b, PPK2a und PPK2b sowie die PPX (violett) im Cytoplasma vorliegen. Die beiden CHAD Proteine PptA und PptB (grün) liegen ebenfalls am PolyP Granulum sowie weitere unbekannte oder nicht charakterisierte Proteine (orange). PptA interagiert mit der GlnA1 (blau) (modifiziert nach Tumlirsch und Jendrossek, 2017 und Brown und Kornberg, 2004).

### 1.1.1.3 CHAD Proteine

Die *Conserved Histidine  $\alpha$ -Helical Domain* (CHAD) ist eine spezifische PolyP Bindedomäne (Lorenzo-Orts *et al.*, 2019; Wertén *et al.*, 2019). Proteine, die aufgrund einer Häufung konservierter Aminosäuren als CHAD Protein annotiert sind, finden sich überwiegend in Bakterien und stellen rund 99 % aller bekannten CHAD Proteine dar. Etwa 1 % der CHAD Proteine stammen aus Archaeen und nur 0,1 % aus Eukaryoten (Lorenzo-Orts *et al.*, 2019). CHAD Proteine wurden bereits zu Beginn der 2000er Jahre durch bioinformatische Untersuchungen mit dem Polyphosphat- und Nukleotidstoffwechsel in Verbindung gebracht (Iyer & Aravind, 2002). Im Jahr 2017 erfolgte der biologische Nachweis der *in vivo* Kollokalisierung eines eYFP-markierten CHAD-Proteins aus *R. eutropha* mit dem PolyP Granulum durch Tumlirsch und Jendrossek, 2017. Zwei Jahre später wurde *in vitro* mit verschiedenen rekombinanten, isolierten CHAD Proteinen durch Quantifizierung der Bindungsstärke zwischen dem Protein und PolyP bestätigt, dass es sich um eine spezifische PolyP Bindedomäne handelt. Des Weiteren wurde ausgeschlossen, dass andere Polyanionen wie DNA oder RNA mit CHAD Proteinen interagieren. Einzig Heparin band an PolyP, das jedoch keinen physiologischen Bezug zu Bakterien hat (Lorenzo-Orts *et al.*,

2019; Wertén *et al.*, 2019).

CHAD Motive besitzen konservierte Histidine und Arginine und bestehen aus einer HXX(R/K)XXXXR Sequenz (X = beliebige Aminosäure) (Tumlirsch & Jendrossek, 2017). Einige CHAD Proteine haben zusätzlich Metallbindestellen (Lorenzo-Orts *et al.*, 2019; Wertén *et al.*, 2019). Die Struktur der CHAD Proteine verschiedener Spezies wurde mittels Röntgenkristallographie von Lorenzo-Orts *et al.*, 2019 und Wertén *et al.*, 2019 aufgeklärt. Sie bestehen aus zwei 4- $\alpha$ -Helix-Bündeln mit *up-down-up-down* Topologie. Damit bilden sie eine zentrale Pore mit stark basischer Oberfläche und konservierten Aminosäuren, vornehmlich Arginin und Histidin, die der Bindung von PolyP dienen. Die Röntgenkristallstruktur des CHAD Proteins von *Chlorobium tepidum* ist in Abb. 1.3 gezeigt.

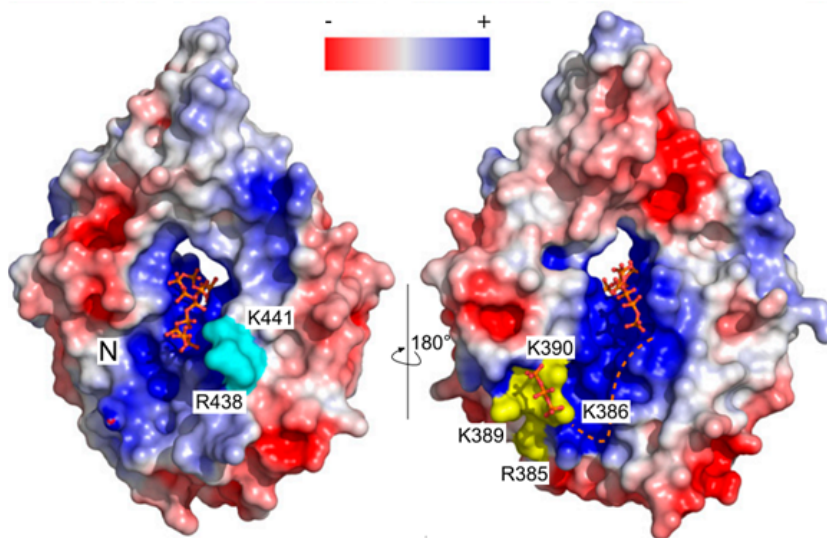


Abb. 1.3: Struktur des CHAD Proteins von *C. tepidum* mit Oberflächenladung. Durch die positiv geladene Pore (blau) führt die PolyP Kette. Zwei seitliche Bindeoberflächen für PolyP sind in gelb und türkis hervorgehoben, die konservierten basischen Aminosäuren im Ein-Buchstabencode angegeben. (Lorenzo-Orts *et al.*, 2019)

#### 1.1.1.4 Funktion von PolyP

Eine enorme Bandbreite an Funktionen werden PolyP in verschiedenen Bakterien zugeschrieben. Es dient als Speicher für Phosphat und Energie (Kornberg *et al.*, 1999), durch die Bindung von Kationen über elektrostatische Wechselwirkungen auch als Chelator von Metallionen und somit als Osmoregulator sowie pH-Puffer (Kornberg *et al.*, 1999). Des Weiteren ist es beteiligt an der Motilität z. B. in *Myxococcus xanthus* oder *Pseudomonas aeruginosa* (Rashid & Kornberg, 2000; Zhang *et al.*, 2005), Virulenz z. B. bei *P. aeruginosa* (Rashid *et al.*, 2000) oder *Proteus mirabilis* (Peng *et al.*, 2016) oder Kompetenz (Kornberg *et al.*, 1999). Des Weiteren ist es beteiligt am Zellzyklusarrest bei Nährstofflimitation in *P. aeruginosa* (Racki *et al.*, 2017), an der *stringent response* nach Aminosäure-

oder Phosphatlimitierung in *E. coli* (Kuroda *et al.*, 1999). Zusätzlich spielt es eine Rolle bei der Adaption an weitere Stressbedingungen wie das Überleben in der stationären Phase in *E. coli* (Rao & Kornberg, 1996), bei der SOS Antwort, die durch DNA Schäden induziert wird (Brown & Kornberg, 2008), Hitzestress (Rao & Kornberg, 1996), Schwermetallionenbelastung (Grillo-Puertas *et al.*, 2014) oder oxidativem Stress in *E. coli* (Gray *et al.*, 2014) oder *P. aeruginosa* (Groitl *et al.*, 2017). Die Schutzwirkung von PolyP beruht zum Einen auf der chaperonartigen Funktion von PolyP, indem das Polyanion beschädigte, fehlgefaltete Proteine bindet und Aggregatbildung vermeidet (Gray *et al.*, 2014). Zum Anderen hat PolyP Funktionen in zellulären Stressantworten wie der *stringent response* (Kornberg *et al.*, 1999).

Die Funktion von PolyP in *R. eutropha* ist bisher unbekannt (Tumlirsch & Jendrossek, 2017).

#### 1.1.1.5 PolyP in bakteriellen Stressantworten

In Bakterien wird für verschiedene Bedingungen jeweils die Expression eines Sets an Genen synchron reguliert. Bei Bakterien, die im Wasser oder Boden leben, sind oft wachstumslimitierende Bedingungen gegeben, sodass diese Bakterien häufig in der stationären Phase sind (Gefen *et al.*, 2014). Diese Phase zeichnet sich aus durch eine Verringerung der Zellgröße mit Tendenz zur kokkoiden Form (Jaishankar & Srivastava, 2017). Die Zellmembran und Zellwand werden stabiler (Mengin-Lecreulx & van Heijenoort, 1985) und ein bei Bakterien hochkonservierter Mechanismus der Stressantwort, die *stringent response*, wird induziert durch die Alarmone Guanosintetra- und Guanosinpentaphosphat (ppGpp bzw. pppGpp, Sammelbezeichnung (p)ppGpp) (Chatterji & Ojha, 2001). Diese haben pleiotrope Effekte durch Bindung an die RNA Polymerase, wodurch deren Promotorspezifität vorgegeben wird. Das führt unter Anderem zu einer negativen Regulation der rRNA Synthese sowie erhöhter Expression von *rpoS*, dem Gen für den  $\sigma$ -Faktor  $\sigma^S$  (Chatterji & Ojha, 2001).  $\sigma$ -Faktoren geben selbst wiederum die Selektivität der RNA-Polymerase für verschiedene Promotoren vor (Hengge-Aronis, 2002). Im Zuge der spezifischen Genexpression bei Stress wird ein Set von Proteinen zur Adaption an die stationäre Phase oder den entsprechenden Stress synthetisiert. In *E. coli* wird auch die Expression der *ppk* durch  $\sigma^S$  angeregt (Macia *et al.*, 2011). Dies ist jedoch nicht (p)ppGpp abhängig sondern durch den *stringent response*-spezifischen Transkriptionsfaktor DksA initiiert (Gray, 2019). Dieser moduliert wie (p)ppGpp die Selektivität der RNA Polymerase, teilweise im Einklang mit (p)ppGpp, teils aber auch gegensätzlich oder unabhängig davon (Magnusson *et al.*, 2007). Diese Befunde liefern starke Hinweise auf eine spezifische Funktion von PolyP bei Stress bzw. in der stationären Phase. In *E. coli* erfolgt die Akkumulation von PolyP in der stationären Phase auch direkt durch (p)ppGpp, indem die Moleküle die PPX inhibieren (Kuroda *et al.*, 1997). PolyP selbst hat wiederum einen Einfluss auf die Transkription

von stationäre Phase assoziierten Genen, z.B. *rpoS* (Brown & Kornberg, 2008). Auch im  $\epsilon$ -Proteobakterium *Helicobacter pylori* ist PolyP als Regulator der Genexpression beschrieben. Dieses Bakterium besiedelt den menschlichen Magen und besitzt nur einen allgemeinen und zwei alternative  $\sigma$ -Faktor. Bei Stress produziert *H. pylori* PolyP, das an den allgemeinen  $\sigma$ -Faktor bindet und dadurch die Spezifität der RNA-Polymerase moduliert (Yang *et al.*, 2010).

Bei der *stringent response* erfolgt neben der ausbleibenden Synthese neuer rRNA auch ein erheblichen Abbau von rRNA (Fessler *et al.*, 2020), wobei der zugrundeliegende Regulationsweg ungeklärt bleibt und eine Beteiligung von PolyP unbekannt ist, sowie gerichteter Abbau von ribosomalen Proteinen. In *E. coli* spielt die ATP-abhängige Lon-Protease dabei die Hauptrolle, indem sie in Assoziation mit langkettigem PolyP (rund 700 Monophosphatreste) ribosomale Proteine degradiert. Dabei dient das PolyP jedoch nicht als ATP-Reservoir. Die durch die Proteolyse gewonnenen Aminosäuren werden für die Synthese der stress-assoziierten Proteine verwendet (Kuroda *et al.*, 2001). Ein weiteres Merkmal der stationären Phase ist ein Arrest der DNA Replikation. Auch hier kann in *E. coli* der PolyP-Lon-Protease Komplex verantwortlich sein, indem er selektiv den Replikationsinitiator DnaA degradiert (Ropelewska *et al.*, 2020) oder die Expression von *dnaA* herunterreguliert wird. In *E. coli* und anderen Bakterien sind damit mehrere Funktionen von PolyP in der stationären Phase und bei Stress detailliert beschrieben.

### 1.1.1.6 Methoden der PolyP Analyse

PolyP kann mit vielerlei Methoden untersucht werden (Christ 2020). Zunächst kann PolyP mit metachromatischen Farbstoffen im Mikroskop detektiert werden, wie die Neisserfärbung mit Methylenblau (Serafim *et al.*, 2002) und Lichtmikroskopie oder Färbung mit dem kationischen Fluoreszenzmarker DAPI. Dieser färbt DNA, RNA und PolyP mit jeweils spezifischer Emission, sodass die drei Polyanionen im Fluoreszenzmikroskop unterschieden werden können. DAPI-PolyP emittiert bei etwa 520 nm (Aschar-Sobbi *et al.*, 2008). Diese Färbemethoden sind jedoch lethal für die betrachteten Zellen. Für Färbungen lebender Zellen wurden die Farbstoffe JC-D7 und JC-D8 konzipiert (Angelova *et al.*, 2014). Mit den mikroskopischen Färbemethoden wird die Lokalisation von granulärem PolyP aufgeklärt (Tumlirsch & Jendrossek, 2017). Auch für Toluidinblau ergibt sich im Komplex mit PolyP ein metachromatischer shift. Damit können Zellen oder Zellysate spektrophotometrisch untersucht werden (Streichan & Schön, 1991). Ein semiquantitativer Nachweis wird über PolyP-Gele erreicht. Dabei wird PolyP im Polyacrylamidgel elektrophoretisch nach seiner Größe aufgetrennt und mit Toluidinblau gefärbt (Clark *et al.*, 1986). Über Vergleich mit synthetischem PolyP mit definierter Kettenlänge oder kommerziell erhältlichen DNA Standards, die üblicherweise als Marker für Agarosegelelektrophorese mit Nukleinsäuren verwendet werden, kann zusätzlich die Kettenlänge abgeschätzt werden (Smith *et al.*,

2018). Zur Quantifizierung von PolyP wird dieses zunächst aus der Zellkultur isoliert mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung (Bru *et al.*, 2016), enzymatisch zu Monophosphat verdaut und letzteres mittels colorimetrischen Assays quantifiziert. Dazu eignen sich ein Malachitgrün-Assay, in dem Phosphat einen farbigen Komplex mit Molybdat und Malachitgrün bildet (Bru *et al.*, 2016) oder ein Antimon-Ascorbat-Assay (Christ & Blank, 2018). Auch eine Bestimmung der Kettenkonzentration ist mit einem fluoreszenzbasierten Assay möglich. Dazu wird PolyP mit der PPX aus *Saccharomyces cerevisiae* (ScPPX) verdaut, wodurch pro PolyP Kette ein Pyrophosphat übrig bleibt. Dieses wird mit einem fluoreszenzbasierten Reporterassay quantifiziert. Aus dem Quotienten der Gesamtphosphatkonzentration und der Kettenkonzentration lässt sich anschließend die mittlere Kettenlänge berechnen (Christ *et al.*, 2019).

Auch chromatographisch lässt sich PolyP analysieren. Mittels Größenausschlusschromatographie oder Anionenaustauschchromatographie lassen sich unterschiedliche Kettenlängen mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC) voneinander trennen im Bereich von 1-75 Phosphatresten (Müssig-Zufika *et al.*, 1994).

Darüber hinaus gibt es spektroskopische Analysen von PolyP mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR (Christ *et al.*, 2020; Dürr-Mayer *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2019) oder Raman-Spektroskopie (Majed *et al.*, 2009; Tarayre *et al.*, 2016). Die  $^{31}\text{P}$ -NMR beruht auf der Detektion von paramagnetischen Kernen, deren magnetische Momente zunächst in einem starken homogenen Magnetfeld ausgerichtet und durch Einstrahlung kernspezifischer Radiowellenfrequenzen ausgelenkt werden. Diese Auslenkung des magnetischen Momentes wird im Verhältnis zum äußeren Magnetfeld in *parts per million* (ppm) angegeben. Das Spektrum der chemischen Verschiebungen ist abhängig von der chemischen Umgebung des betrachteten Phosphorkerns (Friebolin, 2006).

Für PolyP bedeutet dies konkret eine Differenzierung des terminalen Phosphatrestes, des zweiten Phosphatrestes und den mittleren Phosphaten, wobei letztere zwar chemisch minimal unterschiedlich sind, dies im NMR-Spektrum aber nicht aufgelöst werden kann (Christ *et al.*, 2019). Diese Methode ist nicht-invasiv und extrem spezifisch, benötigt jedoch eine hohe Probenkonzentration (Christ *et al.*, 2020).

Die Raman-Spektroskopie ist eine Form der Schwingungsspektroskopie (Hesse *et al.*, 2005). Durch die Wechselwirkung von Molekülen mit elektromagnetischer Strahlung im infraroten und sichtbaren Bereich werden Molekülschwingungen, also periodische Änderungen der Bindungslänge und Bindungswinkel, sowie Rotationen angeregt. 99 % des eingestrahnten Lichts wird elastisch, also unter Energieerhaltung, am Molekül gestreut (Rayleigh-Streuung) und ist für die Raman-Spektroskopie uninteressant. Die Absorption von Teilen des eingestrahnten Lichts ist spezifisch für jede chemische Bindung und abhängig von der Molekülsymmetrie und Form der Anregung. Somit verringert sich die Energie des gestreuten Lichts um die absorbierte Energie im Molekül, was als inelastische Streuung bezeichnet wird und etwa 1 % der Strahlung betrifft. Diese Differenzen werden als

Spektrum mit den Wellenzahlen in  $\text{cm}^{-1}$  angegeben (Binnewies *et al.*, 2011; Hesse *et al.*, 2005).

Bei der Raman-Spektroskopie werden Bakterienzellen mit Licht bestrahlt und dabei die Gesamtheit der inelastischen Streuung an allen Molekülen in der Zelle gemessen. Es ist eine nichtinvasive, nichtdestruktive Methode, die eine hochauflösende chemische Spektralanalyse von Einzelpunktmessungen einer Probe erlaubt (Tao *et al.*, 2016).

### 1.1.2 Polyhydroxybutyrat

PHB dient als Kohlenstoffspeicher bei Nährstofflimitierung mit gleichzeitigem Überangebot an Kohlenstoff (Anderson & Dawes, 1990; Jendrossek & Pfeiffer, 2014). Synthetisiert wird ein Monomer in drei Schritten durch Kondensation zweier Moleküle Acetyl-Coenzym A und anschließender Reduktion zu Hydroxybutyryl-Coenzym A. Dieses Monomer wird dann durch die PHB Synthase PhaC unter Abspaltung von reduziertem Coenzym A polymerisiert, die essentiell für die PHB Synthese ist (Jendrossek & Pfeiffer, 2014).

Das organische, hydrophobe PHB bildet unlösliche Granula im Cytoplasma und ist von einer Vielzahl von Proteinen umgeben, u.a. den PHB Synthasen und Depolymerasen, regulatorischen Proteinen PhaR, den Strukturproteinen PhaP und dem aktivierenden Protein PhaM (Bresan & Jendrossek, 2017; Jendrossek & Pfeiffer, 2014), jedoch keiner Lipidschicht (Bresan *et al.*, 2016). Diese PHB Granula bilden eine organell-ähnliche Struktur, das Carbonosom (Jendrossek, 2009; Jendrossek & Pfeiffer, 2014).

PHB Granula bieten Bakterien, darunter auch *R. eutropha*, neben dem Kohlenstoffspeicher eine Schutzfunktion bei verschiedenen Stressbedingungen (Müller-Santos *et al.*, 2021; Nowroth *et al.*, 2016; Slaninova *et al.*, 2018).

Zur Untersuchung von PHB Granula werden Zellen mit Nilrot gefärbt und die Lokalisation im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Eine Quantifizierung erfolgt durch gleichzeitige Extraktion und saure Methanolyse zu Hydroxyalkanoat-Methylestern. Diese werden anschließend mit Gaschromatographie analysiert (Jüngert *et al.*, 2018; Serafim *et al.*, 2002).

## 1.2 Stickstoffstoffwechsel und Glutaminsynthetasen

Zum Phosphatosom gehört über die Bindung an PptA die annotierte Glutaminsynthetase GlnA1. Dies ist ein Schlüsselenzym im Stickstoffstoffwechsel und katalysiert die Synthese von Glutamin aus Glutamat. Dazu wird zunächst die Carboxylgruppe von Glutamat aktiviert durch Phosphorylierung mit einem  $\gamma$ -Phosphat von ATP. Das Intermediat  $\gamma$ -Glutamylphosphat wird anschließend mit Ammoniak zu Glutamin aminiert (Forchhammer, 2007) (Abb. 1.4).





Abb. 1.4: Reaktionsschema der Glutaminsynthetase

Glutamin ist neben seiner Funktion als proteinergene Aminosäure als Stickstoffdonor an vielen Reaktionen des Sekundärmetabolismus beteiligt und ein Produkt der Ammoniumassimilation (Forchhammer, 2007). Es gibt drei Typen von Glutaminsynthetasen. Typ-I Glutaminsynthetasen kommen ausschließlich in Bakterien vor und sind in vielen Spezies verbreitet (Forchhammer, 2007). Jede Untereinheit bildet einen doppelten Trichter, in dem das aktive Zentrum liegt. Von einer Seite tritt ATP in den Trichter ein, von der anderen Glutamat (Luo *et al.*, 2005). Sie bilden zwei übereinandergestapelte Ringe aus Homohexameren, sodass final ein Homododekamer entsteht (Abb. 1.5) (Joo *et al.*, 2018; Yamashita *et al.*, 1989). Sie werden durch Adenylylierung in ihrer Aktivität reguliert (Kingdon *et al.*, 1967).

Typ-II Glutaminsynthetasen besitzen Ähnlichkeit mit pflanzlichen Glutaminsynthetasen und kommen in einigen Bodenbakterien wie *A. tumefaciens* vor. Zudem wurden weitere Glutaminsynthetasen in einzelnen Spezies entdeckt, die nur geringfügig mit Typ-I und Typ-II verwandt sind und keine klassische Glutaminsynthetaseaktivität besitzen. Dabei werden zwei Gruppen von Enzymen als Typ-III Glutaminsynthetasen zusammengefasst, die unter anderem in einigen *Bacterioides* und *Rhizobia* vertreten sind (Forchhammer, 2007). In *Streptomyces coelicolor* ist GlnIII für den Abbau toxischer Polyamine zuständig (Krysenko *et al.*, 2017).

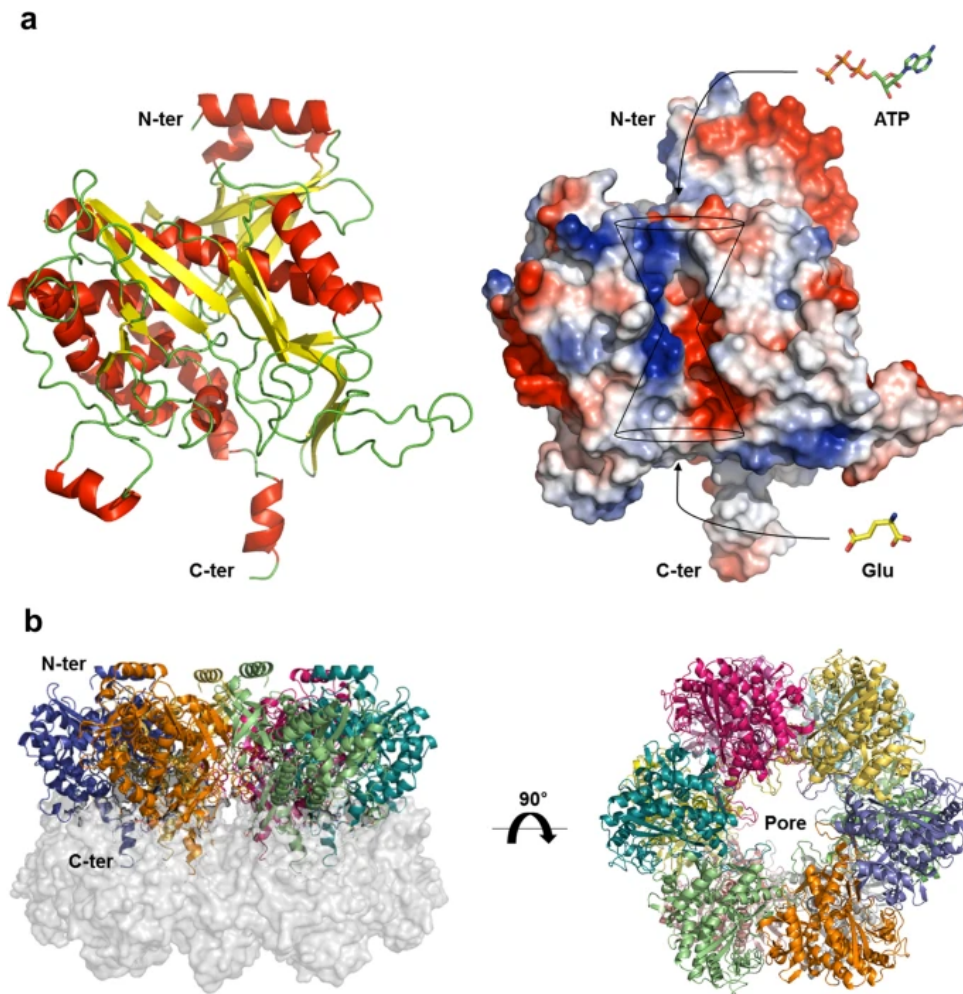


Abb. 1.5: Tertiär- und Quartär-Kristallstruktur der Typ-I Glutaminsynthetase von *H. pylori*.  
 a) Links ist die Tertiärstruktur des Glutaminsynthetase Monomers von *H. pylori* im Bändermodell gezeigt. Rechts ist das Monomer mit der Oberflächenstruktur und Ladungsverteilung (rot = negativ, blau = positiv) gezeigt mit angedeutetem Doppeltrichter, in dem das aktive Zentrum liegt, als Eingang der Substrate ATP und Glutamat.  
 b) Dodekamer der GLutaminsynthetase, links in der Seitenansicht sind zwei gestapelte Hexamerringe, rechts in der Aufsicht der Hexamerring mit Pore sichtbar (Joo *et al.*, 2018).

Die Aktivität der Glutaminsynthetase ist im Rahmen der zellulären Stickstoffhomöostase streng reguliert. Dazu nutzen Bakterien kleine regulatorische Proteine, PII (auch GlnB) (Shapiro, 1969) oder das Paralog GlnK (Arcondeguy *et al.*, 2001). Diese interagieren sowohl mit der Glutaminsynthetase direkt als auch mit dem NtrB/NtrC (*nitrogen-related*) Zwei-Komponentensystem, das die Stickstoffhomöostase auch auf transkriptioneller Ebene reguliert. NtrB ist eine Histidin-Kinase, die bei Stickstoffmangel NtrC phosphoryliert, das die Genexpression zugunsten verstärkter Stickstoffaufnahme reguliert. Bei hoher Stickstoffverfügbarkeit induziert PII eine Verringerung der Glutaminsynthetaseaktivität, indem es die Adenylyltransferase stimuliert, die einen konservierten Tyrosinrest

pro Monomer an der GlnA adenylyliert, was zu einer graduellen Drosselung der Aktivität führt (Kingdon *et al.*, 1967; Luo *et al.*, 2005). Bei geringer Stickstoffverfügbarkeit wird PII durch die Uridylyltransferase uridylyliert. Das modifizierte PII bewirkt zum Einen eine Deadenylylierung der Glutaminsynthetase und damit eine Steigerung der Aktivität und zum Anderen stimuliert PII die Aktivierung des NtrB/NtrC (*nitrogen-related*) Zwei-Komponentensystems, infolgedessen die Transkription von Genen z.B. für Stickstofftransporter und die GlnA induziert werden.

### 1.3 Zielsetzung

Das Biopolymer PHB ist in *R. eutropha* bezüglich seiner Struktur und seines Metabolismus gut untersucht, auch aufgrund des industriellen Interesses an PHB als biologisch abbaubarer Plastik (Jendrossek & Pfeiffer, 2014; Reinecke & Steinbüchel, 2009). Im Zuge der Grundlagenforschung am PHB Granulum und den assoziierten Proteinen wurde ein Zusammenhang mit einem weiteren Biopolymer, dem PolyP, aufgedeckt. Ein Phasin interagiert in einem in vivo Protein-Protein Interaktionsassay mit dem putativen Phosphattransportregulator PhaX. Die Deletion von *phaX* führte zu einer enormen Akkumulation von granulärem PolyP und gleichzeitig einem veränderten PHB Stoffwechsel (Tumlirsch *et al.*, 2015). Infolge dieser Entdeckung wurde PolyP in *R. eutropha* intensiv untersucht: Es wurden sieben *ppk* Gene im Genom identifiziert (Tumlirsch *et al.*, 2015) und die Enzyme umfassend bezüglich ihrer Lokalisation und Funktion charakterisiert (Hildenbrand *et al.*, 2020; Tumlirsch, 2017; Tumlirsch & Jendrossek, 2017). Auch wurde der PolyP Metabolismus qualitativ mittels Fluoreszenzmikroskopie DAPI-gefärbter Zellkulturen verfolgt (Tumlirsch, 2017). Des Weiteren wurden Proteine identifiziert, die an das PolyP Granulum binden und als Phosine bezeichnet werden. Dazu gehören einige der PPKs, zwei Proteine mit der PolyP Bindedomäne CHAD (Lorenzo-Orts *et al.*, 2019; Tumlirsch, 2017; Werten *et al.*, 2019), Proteine mit unbekannter Funktion und indirekt über das CHAD-Protein PptA eine annotierte Glutaminsynthetase GlnA1 (siehe Abb. 1.2 in Abschnitt 1.1.1.2) (Tumlirsch, 2017).

In der vorliegenden Arbeit soll der PolyP Metabolismus in *R. eutropha* detailliert untersucht werden, indem der PolyP Gehalt in den Zellen im Verlauf der Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen mit einem colorimetrischen Assay quantifiziert wird. Dies soll auch Aufschluss geben über die Funktion von PolyP in *R. eutropha*, die bisher völlig unbekannt ist. Dies ist besonders von Bedeutung, da in anderen Bakterien PolyP eine enorme Bandbreite an Funktionen einnimmt (Albi & Serrano, 2016) und die Aufklärung der Rolle von PolyP ein umfassenderes Verständnis der physiologischen Prozesse erlaubt. PolyP kann beispielsweise das Überleben in der stationären Phase oder die Toleranz von Stressbedingungen wie Nährstofflimitation, Hitze, oxidativen Stress oder Metallbelastung erhöhen (Xie & Jakob, 2019). Auch kann es in der Regulation der Transkription, der Motilität, Biofilmbildung oder Virulenz beteiligt sein (Xie & Jakob, 2019), eine Rolle beim Zellzyklusarrest spielen (Racki *et al.*, 2017) oder als Substrat für PolyP-abhängige Enzyme dienen (Bark *et al.*, 1993). Um die Funktion von PolyP in *R. eutropha* zu untersuchen, soll auch der Phänotyp einer siebenfachen *ppk* Deletionsmutante, der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante, unter verschiedenen Stressbedingungen untersucht werden.

Für weitere Hinweise bezüglich der Funktion von PolyP und eine Einordnung in das Netzwerk intrazellulärer Interaktionen werden die PolyP assoziierten Proteine weiter identifi-

ziert und charakterisiert, insbesondere die beiden CHAD-Proteine PptA und PptB. Auch die GlnA1 soll auf ihre Funktion und Interaktion mit anderen Proteinen getestet werden. Zudem soll der Zusammenhang zwischen PolyP und dem PHB Metabolismus weiter geprüft werden. So werden nicht nur einzelne zelluläre Strukturen besser verstanden, sondern auch eine Einordnung in das zelluläre Netzwerk ermöglicht.

Darüber hinaus soll die Struktur von PolyP untersucht werden in Bezug auf die Kettenlänge und Konfiguration. Die Struktur kann wiederum auch Hinweise auf die Funktion liefern.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismen, Plasmide und Primer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tab. 2.1, die Plasmide in Tab. 2.2 und die Primer in Tab. 2.3 dargestellt. Alle *R. eutropha* Stämme sind *R. eutropha* H16. Alle *E. coli* Stämme sind K-12-Derivate.

Tab. 2.1: Verwendete Mikroorganismen in dieser Arbeit

| Stamm   | Relevante Eigenschaften  | Referenz, SK-Nummer                       |
|---|--|---|
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)pLysS  | Expressionsstamm   | Novagen, SK4512                           |
| <i>E. coli</i> JM109  | Klonierungsstamm<br>Plasmidaufbewahrung                          | DSMZ3423, SK528                           |
| <i>E. coli</i> TOP10  | Klonierungsstamm<br>Transformation                               | Beyer <i>et al.</i> , 2015, SK5931        |
| <i>E. coli</i> BTH101 $\Delta cya$  | KO Adenylatcyclasegen für<br>bac2hybrid                          | Lydia Warth, SK3656                       |
| <i>E. coli</i> LJ110 (W3110)  | Klonierungs- und<br>Expressionsstamm                             | Bachmann, 1972, SK5711                    |
| <i>E. coli</i> LJ110 $\Delta ppk$   | KO der einzigen <i>ppk</i>                                       | Tumlirsch, 2017, SK5721                   |
| <i>R. eutropha</i> H16  | Wildtyp (WT)   | DSMZ428, SK6907                           |
| <i>R. eutropha</i> $\Delta ppk1a$<br>$\Delta ppk1b$ $\Delta ppk2a$ $\Delta ppk2b$<br>$\Delta ppk2c$ $\Delta ppk2d$ $\Delta ppk2e$ | KO aller 7 <i>ppk</i> Gene =<br>$\Delta ppk$ -all Mutante        | Tumlirsch <i>et al.</i> , 2015,<br>SK5908 |
| <i>R. eutropha</i> $\Delta pptA$  | KO <i>pptA</i> (A0104,<br>CHAD-Gen)                              | Tumlirsch, 2017, SK5693                   |
| <i>R. eutropha</i> $\Delta pptA\Delta pptB$   | Doppel-KO der<br>CHAD-Gene                                       | Tumlirsch, 2017, SK5972                   |
| <i>R. eutropha</i> $\Delta phaC1$   | KO <i>phaC1</i><br>(PHB-Synthase)                                | Pfeiffer und Jendrossek,<br>2012, SK6527  |
| <i>R. eutropha</i> <i>eyfp-pptA</i>   | chromosomal integriertes<br><i>eyfp</i> , Fusion mit <i>pptA</i> | Tumlirsch und Jendrossek,<br>2017, SK6364 |

Tab. 2.2: Verwendete Plasmide in dieser Arbeit. Neben den Gennummern sind die in dieser Arbeit verwendeten Kurzbezeichnungen der Genprodukte notiert.

| Plasmid   | Relevante Eigenschaften                                    | Referenz                      |
|---|--|-------------------------------|
| <i>eyfp</i> -Fusionen   |  |                               |
| pBBR1MCS-2  | Klonierungsvektor, breites Wirtsspektrum, R <sup>Kan</sup> | Kovach <i>et al.</i> , 1995   |
| pBBR1MCS-2- <i>P<sub>phaC</sub></i> - <i>eyfp</i> -n1               | N-terminale Genfusion an <i>eyfp phaC</i> -Promotor        | Pfeiffer <i>et al.</i> , 2011 |
| pBBR1MCS-2- <i>P<sub>phaC</sub></i> - <i>eyfp</i> -c1               | C-terminale Genfusion an <i>eyfp phaC</i> -Promotor        | Pfeiffer <i>et al.</i> , 2011 |
| pBBR1MCS-2- <i>P<sub>phaC</sub></i> - <i>eyfp</i> -A2335-c1 (GlnA1) | C-terminale Fusion von A2335 an <i>eyfp phaC</i> -Promotor | Tumlirsch, 2017               |
| pBBR1MCS-2- <i>P<sub>phaC</sub></i> - <i>eyfp</i> -A0104-c1 (PptA)  | C-terminale Fusion von A0104 an <i>eyfp phaC</i> -Promotor | Tumlirsch, 2017               |
| pBBR1MCS-2- <i>P<sub>phaC</sub></i> - <i>eyfp</i> -A3333-n1         | N-terminale Fusion von A3333 an <i>eyfp phaC</i> -Promotor | Diese Studie                  |
| pBBR1MCS-2- <i>P<sub>phaC</sub></i> - <i>eyfp</i> -A3333-c1         | C-terminale Fusion von A3333 an <i>eyfp phaC</i> -Promotor | Diese Studie                  |
| pBBR1MCS-2- <i>P<sub>phaC</sub></i> - <i>eyfp</i> -A3363-c1         | C-terminale Fusion von A3363 an <i>eyfp phaC</i> -Promotor | Diese Studie                  |
| pBBR1MCS-2- <i>P<sub>phaC</sub></i> - <i>eyfp</i> -A0965-n1         | N-terminale Fusion von A0965 an <i>eyfp phaC</i> -Promotor | Diese Studie                  |
| pBBR1MCS-2- <i>P<sub>phaC</sub></i> - <i>eyfp</i> -A1185-n1         | N-terminale Fusion von A1185 an <i>eyfp phaC</i> -Promotor | Diese Studie                  |
| pBBR1MCS-2- <i>P<sub>phaC</sub></i> - <i>eyfp</i> -A1273-n1         | N-terminale Fusion von A1273 an <i>eyfp phaC</i> -Promotor | Diese Studie                  |
| pBBR1MCS-2- <i>P<sub>phaC</sub></i> - <i>eyfp</i> -B1164-n1         | N-terminale Fusion von B1164 an <i>eyfp phaC</i> -Promotor | Tumlirsch, 2017               |
| pBBR1MCS-2- <i>P<sub>phaC</sub></i> - <i>eyfp</i> -B1017-n1 (PptB)  | N-terminale Fusion von B1017 an <i>eyfp phaC</i> -Promotor | Tumlirsch, 2017               |

| Plasmid   | Relevante Eigenschaften   | Referenz                      |
|---|---|-------------------------------|
| <i>DsRed2<sub>EC</sub></i> -Fusionen                                      |   |                               |
| pCM62   | Klonierungsvektor, breites Wirtsspektrum, R <sup>Tet</sup>  | Marx und Lindstrom, 2001      |
| pCM62- <i>P<sub>phaC</sub></i> - <i>DsRed2<sub>EC</sub></i> -A0104 (PptA) | N-terminale Fusion von A0104 an <i>DsRed2<sub>EC</sub></i> , R <sup>Tet</sup>   | Tumlirsch, 2017               |
| <i>mCherry</i> -Fusionen  |   |                               |
| pCM62- <i>P<sub>phaC</sub></i> - <i>mCherry</i> -A2335 (GlnA1)            | N-terminale Fusion von A2335 an mCherry   | Tumlirsch, 2017               |
| Expressionsvektoren   |   |                               |
| pET16b  | Expressionsvektor mit 10x N-terminalem Histidin- <i>tag</i> , R <sup>Amp</sup>  | Novagen                       |
| pET-16b-A2335 (GlnA1)   | Expression His <sub>10</sub> -A2335   | Simone Reinhardt              |
| pMA-RQ-strep- <i>pptA</i>   | Vektor mit codonoptimiertem <i>pptA</i> für Expression des Gens in <i>E. coli</i> , R <sup>Amp</sup>  | Invitrogen                    |
| p4782.1-lcp-nST-TEV   | Expressionsvektor mit N-terminalem strep- <i>tag</i> und TEV-Schnittstelle, R <sup>Kan</sup>  | Birke <i>et al.</i> , 2015    |
| p4782.1::A0104-codonoptimiert (PptA)                                      | Expressionsvektor mit N-terminalem strep- <i>tag</i> und TEV-Schnittstelle für strep- <i>pptA</i> codonoptimiert für Expression in <i>E. coli</i> | Diese Studie                  |
| pASG-IBA105- <i>scPpx1</i>  | Expressionsvektor mit N-terminalem strep- <i>tag</i>  | Christ und Blank, 2018        |
| pASG-IBA103- <i>scIpp</i>   | Expressionsvektor mit N-terminalem strep- <i>tag</i>  | Christ und Blank, 2018        |
| bac2hybrid Konstrukte   |   |                               |
| pKT25   | BACTH Vektor für C-terminale Fusion eines Gens von Interesse an T25-Untereinheit der Adenylatcyclase, R <sup>Kan</sup>                            | Karimova <i>et al.</i> , 2001 |
| pUT18C  | BACTH Vektor für C-terminale Fusion eines Gens von Interesse an T18C-Untereinheit der Adenylatcyclase, R <sup>Amp</sup>                           | Karimova <i>et al.</i> , 2001 |



| Plasmid                   | Relevante Eigenschaften   | Referenz                      |
|---------------------------|---|-------------------------------|
| pKT25-zip                 | BACTH Vektor Positivkontrolle der T25-Untereinheit der Adenylatcyclase, R <sup>Kan</sup>  | Karimova <i>et al.</i> , 2001 |
| pUT18C-zip                | BACTH Vektor Positivkontrolle der T18C-Untereinheit der Adenylatcyclase, R <sup>Amp</sup> | Karimova <i>et al.</i> , 2001 |
| pKT25- <i>pptA</i> -c.o.  | T25-Untereinheit mit <i>pptA</i> codonoptimiert für <i>E. coli</i>                        | Diese Studie                  |
| pUT18C- <i>pptA</i> -c.o. | T18C-Untereinheit mit <i>pptA</i> codonoptimiert für <i>E. coli</i>                       | Diese Studie                  |
| pKT25- <i>pptB</i>        | T25-Untereinheit mit <i>pptB</i>  | Tumlirsch, 2017               |
| pUT18C- <i>pptB</i>       | T18C-Untereinheit mit <i>pptB</i>   | Tumlirsch, 2017               |
| pKT25- <i>glnA1</i>       | T25-Untereinheit mit <i>glnA1</i>   | Anna Schweter                 |
| pUT18C- <i>glnA1</i>      | T18C-Untereinheit mit <i>glnA1</i>  | Anna Schweter                 |
| pKT25- <i>lon</i>         | T25-Untereinheit mit <i>lon</i> -Protease   | Anna Schweter                 |
| pUT18C- <i>lon</i>        | T18C-Untereinheit mit <i>lon</i> -Protease  | Anna Schweter                 |
| pKT25- <i>phoH</i>        | T25-Untereinheit mit <i>phoH</i>  | Anna Schweter                 |
| pUT18C- <i>phoH</i>       | T18C-Untereinheit mit <i>phoH</i>   | Anna Schweter                 |
| pKT25-A1132               | T25-Untereinheit mit A1132  | Diese Studie                  |
| pUT18C-A1132              | T18C-Untereinheit mit A1132   | Diese Studie                  |
| pKT25-A1185               | T25-Untereinheit mit A1185  | Diese Studie                  |
| pKT25-B1164               | T25-Untereinheit mit B1164  | Diese Studie                  |
| pUT18C-B1164              | T18C-Untereinheit mit B1164   | Diese Studie                  |

Tab. 2.3: Verwendete Primer in dieser Arbeit

| Primer                         | Restriktion* | Sequenz                                |
|--------------------------------|--------------|--|
| <i>eyfp</i> -Konstrukte        |              |  |
| <i>eyfp</i> -A3333-n1 fwd      | NdeI         | gggaattccatatgagcctccaatgcggcacg       |
| <i>eyfp</i> -A3333-n1 rev      | HindIII      | cccaagcttgacgttgaacaggaagttcatcac      |
| <i>eyfp</i> -A3333-c1 fwd      | XhoI         | ccgctcgagaaatgagcctccaatgcg            |
| <i>eyfp</i> -A3333-c1 rev      | XmaI         | cccccggttagacgttgaacaggaag             |
| <i>eyfp</i> -A3363-c1 fwd      | EcoRI        | ccggaattcaatgcacggcaactatgcggtg        |
| <i>eyfp</i> -A3363-c1 rev      | BamHI        | cgggatcctcaggcgtcgcaggcgtag            |
| <i>eyfp</i> -A0965-n1 fwd      | EcoRI        | ccggaattcagtgccgcggtgcgcac             |
| <i>eyfp</i> -A0965-n1 rev      | BamHI        | cgggatcccacgcgaaatcagcagccatgtc        |
| <i>eyfp</i> -A1185-n1 fwd      | NdeI         | gggaattccatatgaccaaattcgtcttcgtcaccgg  |
| <i>eyfp</i> -A1185-n1 rev      | HindIII      | cccaagcttcgccccttgcgctgctgg            |
| <i>eyfp</i> -A1273-n1 fwd      | NdeI         | gggaattccatatgacgtcaccactaagccttgcc    |
| <i>eyfp</i> -A1273-n1 rev      | BamHI        | cgggatcctggcgtcaccttgctccag            |
| bac2hybrid                     |              |  |
| <i>pptA</i> codonoptimiert fwd | XbaI         | gctctagagatgcagcgtgaagggtgcaggtc       |
| <i>pptA</i> codonoptimiert rev | KpnI         | ggggtaccttagcttgaccaggcagcg            |
| A1132 fwd                      | XbaI         | gctctagagatgtccgccccccgaaagc           |
| A1132 rev                      | KpnI         | ggggtacctcagaggcgttgctcctcg            |
| A1185 fwd                      | XbaI         | gctctagagatgaccaaattcgtcttcgtcaccgggtg |
| A1185 rev                      | KpnI         | ggggtaccttacgcgcccttgcgctgctg          |
| B1164 fwd                      | XbaI         | gctctagagatgcccgctgcccccg              |
| B1164 rev                      | KpnI         | ggggtacctcaggcgtcggcacgc               |
| qPCR Primer                    |              |  |
| <i>gyrB</i> fwd**              |              | gcctgcaccaccttgctcttc                  |
| <i>gyrB</i> rev**              |              | tgtggatggtgacctggtatct                 |
| <i>pptA</i> fwd                |              | aagcgactgcgctatgtgat                   |
| <i>pptA</i> rev                |              | ctttgaccagcttgcgatgc                   |
| <i>pptB</i> fwd                |              | gtatcgccgcaaagaagctg                   |
| <i>pptB</i> rev                |              | cctctgcaaccgcatatca                    |

\* enthaltene Schnittstelle für Restriktionsenzym

\*\* aus (Jugder *et al.*, 2015)

## 2.2 Nährmedien

Die Mikroorganismen wurden in verschiedenen flüssigen Nährmedien kultiviert. Für feste Nährmedien wurden 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Alle Medien wurden für 20 min bei 121 °C sterilisiert.

Für alle wässrigen Lösungen gilt, dass vollentsalztes H<sub>2</sub>O (VE-H<sub>2</sub>O) verwendet wurde. Ausnahmen sind jeweils extra vermerkt.

### 2.2.1 Komplexmedien

#### Lysogeny broth (LB)

10 g Trypton  
5 g Hefeextrakt  
10 g NaCl  
ad 1 l H<sub>2</sub>O

#### Nutrient broth (NB)

8 g Nutrient broth  
ad 1 l H<sub>2</sub>O

### 2.2.2 Mineralmedien

#### Mineralsalzmedium(MSM) nach Schlegel *et al.* (1961) modifiziert

4,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O  
1,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1,0 g NH<sub>4</sub>Cl  
900 ml H<sub>2</sub>O  
pH 7,0 autoklaviert  
dann Zugabe einzeln sterilisierter Lösungen  
20 ml 20 % (w/v) Fruktose steril filtriert  
1,0 ml MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O (Stammlösung 1000-fach)  
1,0 ml CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (Stammlösung 1000-fach)  
1,0 ml Ammoniumeisen(III)-citrat (Stammlösung  
1000-fach)  
100 µl Spurenelementlösung SL6 (Stammlösung  
10000-fach)  
ad 1 l H<sub>2</sub>O

**1000x Stammlösungen - einzeln angesetzt, autoklaviert**

|        |  |                            |
|--------|--|----------------------------|
| 20,0 g | MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O | ad 100 ml H <sub>2</sub> O |
| 1,0 g  | CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O | ad 100 ml H <sub>2</sub> O |
| 0,5 g  | Ammoniumeisen(III)-citrat              | ad 100 ml H <sub>2</sub> O |

**10000x Spurenelementlösung SL6 nach Pfennig (1974)**

|        |   |
|--------|---|
| 1,0 g  | ZnSO <sub>4</sub>                                     |
| 0,3 g  | MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O                |
| 3,0 g  | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        |
| 2,0 g  | CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O                |
| 0,1 g  | CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O                |
| 0,2 g  | NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O                |
| 0,3 g  | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O |
| ad 1 l | H <sub>2</sub> O                                      |

**Tris-MSM ohne Phosphat (Phosphatmangelmedium)**

|         |  |
|---------|--|
| 6,06 g  | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                                |
| 1,49 g  | KCl  |
| 4,68 g  | NaCl   |
| 1,07 g  | NH <sub>4</sub> Cl   |
| 900 ml  | H <sub>2</sub> O   |
| pH 7,4  | autoklaviert   |
|         | dann Zugabe einzeln sterilisierter Lösungen                    |
| 1,00 ml | MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (Stammlösung 1000-fach) |
| 1,00 ml | CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (Stammlösung 1000-fach) |
| 1,00 ml | Ammoniumeisen(III)-citrat (Stammlösung 1000-fach)              |
| 100 µl  | Spurenelementlösung SL6 (Stammlösung 10000-fach)               |
| 40,0 ml | 20 % (w/v) Fruktose steril filtriert                           |
| ad 1 l  | H <sub>2</sub> O   |

**Tris-MSM mit Phosphat (Phosphatlimitierungsmedium)**

Wie Phosphatmangelmedium, jedoch nur 20 ml 20 % (w/v) Fruktose steril filtriert, dazu 10 ml 2 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Dies ergibt eine finale Phosphatkonzentration von 1,47 mM.

**MOPS-MSM**

4,18 g 3-(N-Morpholinopropan)sulfonsäure (MOPS)  
 0,23 g  $K_2HPO_4$   
 10 ml 20 % (w/v) Fruktose  
 ad 1 l  $H_2O$   
 pH 7,4 steril filtriert

**Phosphatgepufferte Saline (PBS)**

8 g NaCl  
 0,2 g KCl  
 1,42 g  $Na_2HPO_4$   
 0,24 g  $KH_2PO_4$   
 ad 1 l  $H_2O$

**2.2.3 Antibiotika**

| Antibiotikum                  | Stammlösung                 | finale Konzentration |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Ampicillin (Na-Salz) (Amp100) | 100 mg/ml in $H_2O$         | 100 $\mu$ g/ml       |
| Chloramphenicol (Cm34)        | 34 mg/ml in 99 % EtOH       | 34 $\mu$ g/ml        |
| Kanamycinsulfat (Kan50)       | 50 mg/ml in $H_2O$          | 50 $\mu$ g/ml        |
| Kanamycinsulfat (Kan150)      | 150 mg/ml in $H_2O$         | 150 $\mu$ g/ml       |
| Tetracyclin (Tet15)           | 15 mg/ml in 70 % (v/v) EtOH | 15 $\mu$ g/ml        |

**2.3 Zellkultivierung****2.3.1 Stammhaltung und Konservierung**

Für die Lagerung der in Verwendung befindlichen Organismen wurden die Stämme auf Agarplatten mit Nährmedium bei 4-8 °C für bis zu vier Wochen aufbewahrt. Die langfristige Lagerung der Stämme erfolgte bei - 70 °C. Eine dicht gewachsene *E. coli* LB-Kultur wurde 1:1 mit sterilem 86 % Glycerin in Schraubdeckelröhrchen gemischt. Die Rekultivierung erfolgte, indem ein Teil der glycerinhaltigen Zellsuspension mit einer Impföse in 5 ml LB-Medium überführt oder auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert wurde, die Flüssigkultur dabei unter Schütteln.

*R. eutropha* Stämme wurden für die Konservierung von einer frischen NB-Agarplatte mit 1-1,5 ml steriler Lösung aus 10 % (w/v) Skimmilch und 5 % (w/v) meso-Inositol in  $H_2O$  aufgenommen. Darin wurden sterile Filterpapierplättchen mit d=0,5 mm gewendet, die nach Lyophilisierung in Schraubdeckelröhrchen überführt wurden, die mit einer Schicht

getrocknetem Kieselgel gefüllt und mit Glaswolle abgedeckt waren. Für die Reinkultivierung wurde ein Plättchen mit lyophilisierten *R. eutropha* Zellen in NB-Medium bei 30 °C schüttelnd inkubiert.

### 2.3.2 Kultivierung von *E. coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde eine Einzelkolonie des jeweiligen Stammes mit einer Impföse von einer bestehenden Kultur auf LB-Agar in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum im Erlenmeyerkolben oder einem Reagenzglas angeimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 150-180 rpm inkubiert.

### 2.3.3 Kultivierung von *R. eutropha*

Für die Kultivierung von *R. eutropha* wurde eine Einzelkolonie des jeweiligen Stammes mit einer Impföse von einer bestehenden Kultur auf NB-Agar in NB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum im Erlenmeyerkolben oder einem Reagenzglas angeimpft und bei 30 °C im Schüttelinkubator bei 150-180 rpm inkubiert. Für Wachstumsversuche wurden zwei aufeinanderfolgende über Nacht (ü. N.) Vorkulturen angezogen, die erste für 16-20 h aus einer Einzelkolonie, die zweite für 24 h mit 1:10 Volumen der ersten Vorkultur. Damit wurde schließlich die Hauptkultur mit 1:20 bis 1:50 Volumen angeimpft. War die Hauptkultur in MSM, wurde ein Mediumwechsel vor dem Animpfen der Hauptkultur durchgeführt. Dazu wurde die zweite Vorkultur zentrifugiert mit 5087 g für 8-10 min bei 16-18 °C. Das Zellpellet wurde in wenigen ml des Mediums der Hauptkultur resuspendiert, die OD<sub>600</sub> der Zellsuspension spektrophotometrisch bestimmt und die Hauptkultur auf die in den Experimenten erwünschte Start-OD eingestellt.

### 2.3.4 Zellzahlbestimmung mit Neubauer Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl in einer Kultur wurden 10 µl Zellsuspension in eine Neubauer Zählkammer (DHC-N01, Digital Bio, Suwon, Korea) gegeben und die Zellen in 16 kleinen Quadraten mit einem Lichtmikroskop (Objektiv 40x/0,65)(Zeiss) gezählt. Die Zelldichte wurde daraus wie folgt berechnet:

$$\text{Zelldichte } \frac{n \text{ Zellen}}{\text{ml}} = n \text{ (Zellen)} \cdot 16 \text{ Quadrate} \cdot 25 \cdot 10000$$

### 2.3.5 Kultivierungsassay auf festem Medium

Mit den Bakterienstämmen wurden Wachstumsversuche oder Stresstests durchgeführt. Zur Bestimmung der Kultivierbarkeit von Zellen wurden Proben in verschiedenen Stadien des Versuchs entnommen, eine 1:10 Verdünnungsreihe der Zellsuspension in 0,9 % (w/v) NaCl vorbereitet (für *R. eutropha* bei Raumtemperatur (RT), für *E. coli* bei 4 °C) und 2 µl

jedes Verdünnungsschrittes auf eine Agarplatte mit Nährmedium getropft. Diese wurde für einen Tag (*E. coli*) bzw. zwei Tage (*R. eutropha*) bei der Kultivierungstemperatur des Organismus inkubiert.

### 2.3.6 Hitzestresstest bei konstanter Temperatur

Für die Untersuchung des Wachstums von *R. eutropha* bei konstant hoher Temperatur wurden 200 µl NB Medium in einer Mikrotiterplatte mit einer ü. N. NB Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Dabei wurden pro Stamm je sechs technische Replikate auf einer Platte angesetzt. Die äußeren *wells* wurden mit 300 µl H<sub>2</sub>O gefüllt, um Verdunstungseffekte bei den Messungen auszuschließen. Als Negativkontrolle und blank wurden sechs *wells* nur mit 200 µl NB Medium gefüllt. Im Plattenlesegerät (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) wurden die Kulturen bei konstanter Temperatur im Bereich von 30 °C bis 47 °C mit orbitalem Schütteln kultiviert. Die OD<sub>600</sub> wurde spektrophotometrisch im 30 min Intervall für 16-24 h verfolgt. Die OD<sub>600</sub> des Mediums (blank) wurde von den gemessenen OD Werten der Kulturen subtrahiert. Aus den technischen Relikaten wurden Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) berechnet.

### 2.3.7 Hitzestresstest bei Hitzeschock

Für die Untersuchung von *R. eutropha* und *E. coli* bei Hitzeschock wurden ü. N. NB bzw. LB Vorkulturen angezogen. Damit wurde eine NB bzw. LB Hauptkultur 1:20 angeimpft und für 24 h schüttelnd bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, *R. eutropha* bei 5087 g für 8 min bei 16-18 °C, *E. coli* bei 5087 g für 8 min bei 4 °C. Das Zellpellet wurde in 0,9 % NaCl resuspendiert mit einer Zelldichte von 0,2 oder 20. 10 µl Zellsuspension wurden zu 990 µl vorgewärmter 0,9 % NaCl im 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 10 min bzw. 20 min im Thermoshaker (Biometra, Göttingen, Deutschland) bei 55 °C und 450 rpm inkubiert. 100 µl Probe wurden zu den angegebenen Zeitpunkten genommen, für den Kultivierungsassay von 10<sup>0</sup> bis 10<sup>-4</sup> in 0,9 % NaCl verdünnt und auf Agarplatten getropft. Näheres ist in Abschnitt 2.3.5 beschrieben.

Um den PolyP Gehalt in den Hitzeschockkulturen zu messen, wurden die Zellen wie oben beschrieben kultiviert und geerntet, dann auf eine OD<sub>600</sub> von 20 eingestellt und 500 µl zu 50 ml vorgewärmter 0,9 % NaCl in 250 µl Erlenmeyerkolben gegeben, sodass eine finale OD<sub>600</sub> von 0,2 vorlag. Damit war die Zelldichte zwar höher als im Kultivierungsassay, aber auch sichergestellt, dass genug Zellen zur PolyP Quantifizierung vorhanden waren. Die Zellsuspensionen wurden für 10 min bzw. 20 min im Brutschrank auf einem Mikrotiterplattenschüttler (Biometra, Göttingen, Deutschland) bei 55 °C und 200 rpm inkubiert. Danach wurden die Suspensionen sofort in 50 ml Falcons auf Eis überführt und weiter

verarbeitet für die PolyP Extraktion und Quantifizierung wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben.

### 2.3.8 Oxidativer Stresstest

#### Quenching Puffer

4,20 g MOPS  
4,96 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$   
ad 11  $\text{H}_2\text{O}$   
pH 7,4 steril filtriert

Zur Untersuchung von *R. eutropha* und *E. coli* bei oxidativem Stress wurde eine Hauptkultur in MOPS-MSM mit 0,2 % Fruktose bzw. Glukose aus einer NB bzw. LB ü. N. Vorkultur auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,1 angeimpft und für 6 h (exponentielle Phase) oder 24 h (stationäre Phase) kultiviert. Je 10 ml derselben Hauptkultur wurden in einen frischen 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben und mit 100  $\mu\text{l}$  200 mM NaOCl (final 2 mM), 100  $\mu\text{l}$  10 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  (final 100 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oder 100  $\mu\text{l}$  PBS als Kontrolle versetzt. Nach 15 min Inkubation bei 30 °C, 150 rpm wurden 1 ml Proben zentrifugiert mit 2544 *g* für 2 min bei RT, 800  $\mu\text{l}$  Überstand entfernt und die Zellen in 800  $\mu\text{l}$  Quenching Puffer resuspendiert. Diese Proben wurden für die Färbungen mit PI als Viabilitätstest und Quantifizierung der reaktiven Sauerstoffspezies verwendet. Proben von *R. eutropha* wurden im Durchflusssyztometer gemessen (Abschnitt 2.5.4), Proben von *E. coli* mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht, wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben.

Für die PolyP Quantifizierung bei oxidativem Stress wurde die MOPS-MSM Hauptkultur in einem Volumen von 200 ml in 11 Erlenmeyerkolben mit einer Start-OD von 0,3 angeimpft und für 3 h bei 30 °C bzw. 37 °C schüttelnd inkubiert. Danach wurden je 50 ml Kultur in frische Erlenmeyerkolben gegeben, mit 500  $\mu\text{l}$  100 mM (final 1 mM) NaOCl oder 500  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  als Kontrolle versetzt und für 1 h weiter inkubiert. Die Kulturen wurden geerntet mit 5087 *g* für 15 min bei 4 °C. Das Pellet wurde zunächst mit 20 ml Quenching Puffer, dann mit 0,9 % NaCl gewaschen und für die PolyP Extraktion und Quantifizierung lyophilisiert.

### 2.3.9 Motilitätsassay

#### Schwärmagar

8 g NB  
5 g Bacto Agar (Becton Dickinson, Sparks, USA)  
ad 11  $\text{H}_2\text{O}$



### **Schwimmagar**

10 g Trypton  
5 g NaCl  
3 g Standard Agarose (Roth)  
ad 1 l H<sub>2</sub>O

Petrischalen wurden mit je 25 ml sterilisiertem Schwimm- oder Schwärmagar gefüllt. Schwimmagarplatten wurden auf ebenem Untergrund für 1 h ausgehärtet, Schwärmagarplatten für etwa 3 h und dann frisch verwendet.

*R. eutropha* wurde in drei aufeinanderfolgenden 24 h NB Kulturen angezogen bei 100-120 rpm. Mittels Lichtmikroskopie wurde die Beweglichkeit der Zellen in Flüssigkultur bestätigt. Dann wurde die Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 in NB Medium verdünnt und 5 µl mittig auf eine Schwimm- oder Schwärmagarplatte getropft, die bereits im 30 °C warmen Brutraum horizontal lagen und schon für das Auftropfen nicht mehr bewegt wurden. Sie wurden ü. N. inkubiert.

## **2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **2.4.1 Behandlung von Geräten und Lösungen**

Hitzestabile Geräte und Lösungen wurden durch Autoklavieren (121 °C für 20 min) sterilisiert und Nukleasen inaktiviert. Hitzelabiles Material wurde mit 80 % Ethanol gespült, hitzelabile Lösungen steril filtriert (Sarstedt, Filtropur nicht-pyrogen steril-R 0,2 µm).

### **2.4.2 Präparation von genomischer DNA aus *R. eutropha***

Genomische DNA (gDNA) wurde aus einer 5 ml *R. eutropha* ü. N. Kultur in NB Medium isoliert. Zuerst wurde die Kultur geerntet durch Zentrifugation bei 5087 g für 8 min bei 4 °C. Das Zellpellet wurde in 2 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 15000 rpm für 5 min bei 4 °C abgetrennt. Der Überstand mit der gDNA wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

### **2.4.3 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli***

Für die Isolierung von Plasmid DNA (pDNA) aus *E. coli* wurde das innuPREP Plasmid Mini Kit (Analytic Jena, Jena) nach Herstellerangaben verwendet.

#### 2.4.4 Isolierung von RNA aus *R. eutropha*

Alle Arbeiten mit RNA wurden mit Nitrilhandschuhen durchgeführt und einem frischen Kittel an einem extra Arbeitsplatz, der mit RNase away (Thermo Scientific) von RNasen weitgehend befreit war. RNA wurde aus *R. eutropha* Zellen mit dem RNeasy mini kit (Quiagen) isoliert. Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt mit vorgekühlten Lösungen. Je nach Zelldichte wurden 0,5-1 ml Zellsuspension pro Probe genommen und sofort auf Eis gelagert. Es wurde zentrifugiert bei 11000 *g* für 1 min bei 4 °C. Das Zellpellet wurde in 100 µl 0,9 % NaCl und 200 µl RNAlater (Thermo Fisher) resuspendiert und bei -70 °C gelagert. Für die Isolation wurden die Proben auf Eis aufgetaut, das RNAlater entfernt durch Zentrifugation bei 11000 *g* für 15 s bei RT. Das Zellpellet wurde in 500 µl Puffer RLT + 10 µl 2 M Dithiothreitol (DTT) resuspendiert und in ein mit 300-500 µl Glasbeads gefülltes Reaktionsgefäß überführt, das mit Parafilm verschlossen wurde. Die Zellen wurden im Silamat S6 (ivoclar vivadent) zwei Mal für 30 s aufgeschlossen mit 30 s Pause auf Eis. Es wurde zentrifugiert bei 11000 *g* für 15 s bei RT, der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Es folgte der erste DNase-Verdau mit dem RNase-free DNase digestion kit (Quiagen). Dazu wurden 40 µl RDD Puffer + 10 µl DNase zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 250 µl 70 % (v/v) Ethanol zugegeben und auf eine Säule aufgetragen. Es wurde zentrifugiert bei 11000 *g* für 15 s bei RT, der Überstand verworfen. Für den zweiten DNase-Verdau auf der Säule wurde die Säule mit 350 µl Puffer RW1 gewaschen, zentrifugiert bei 11000 *g* für 15 s bei RT. Dann wurden 70 µl RDD Puffer + 10 µl DNase auf die Säule gegeben und für 60-75 min bei RT verdaut. Anschließend wurden 350 µl Puffer RW1 auf die Säule gegeben, für 5 min inkubiert und zentrifugiert bei 11000 *g* für 15 s bei RT. Die Säule wurde in ein frisches Auffanggefäß gesetzt, bevor mit 500 µl Puffer RPE gewaschen wurde mit Zentrifugation bei 11000 *g* für 15 s bei RT. Bei einem zweiten Waschgang mit 500 µl Puffer RPE wurde die Zentrifugation auf 2 min verlängert und die Säule anschließend für 2 min mit offenem Deckel stehen gelassen, um den gesamten Ethanol zu entfernen. Die Säule wurde für den Elutionsschritt in ein Reaktionsgefäß platziert und mit 30 µl H<sub>2</sub>O für 1 min inkubiert. Eluiert wurde durch Zentrifugation bei 11000 *g* für 1 min bei RT. Das Eluat wurde wieder auf die Säule gegeben, nochmals für 1 min bei RT inkubiert und zentrifugiert. Die isolierte RNA wurde bei -70 °C gelagert. Die Konzentration der RNA in der Probe wurde mittels NanoDrop-1000 bestimmt. Für die Qualitätskontrolle wurde ein 1,5 % Agarosegel mit 4 µl RNA + 1 µl Ladepuffer für 45 min bei 110 V aufgetrennt. Es sollten distinkte Banden der 23 S rRNA, 16 S rRNA und 5 S rRNA sichtbar sein.

#### 2.4.5 Reverse Transkription

Durch reverse Transkription mit EpiScript Reverser Transkriptase (Lucigen) wurde RNA in cDNA umgeschrieben, die anschließend mit qPCR analysiert werden konnte.

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| 1 µg RNA                        | x µl   |
| Primer random hexamer (biomers) | 1 µl   |
| RNase-freies H <sub>2</sub> O   | 9-x µl |

Die Komponenten wurden gemixt, kurz zentrifugiert, für 5 min bei 65 °C inkubiert, wie für GC-reiche RNA empfohlen, und auf Eis gekühlt. Dann wurden die folgenden Komponenten zugefügt.

|  |        |
|--|--------|
| RNase-freies H <sub>2</sub> O                | 1 µl   |
| 5x Reaktionspuffer                           | 2,0 µl |
| 100 mM DTT                                   | 2,0 µl |
| RiboLock RNase Inhibitor                     | 0,5 µl |
| dNTP Mix (je 10 mM)                          | 4,0 µl |
| Reverse Transkriptase<br>(Lucigen)(200 U/µl) | 0,5 µl |

Die Ansätze wurden vorsichtig gemixt, kurz zentrifugiert und mit folgendem Programm im Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) inkubiert:

| t [min] | T [°C] |
|---------|--------|
| 10      | 25     |
| 60      | 42     |
| 10      | 70     |

Die cDNA wurde wiederum mit Agarosegelelektrophorese auf ihre Qualität untersucht. Es sollten die Banden der cDNA der vormaligen rRNAs vorhanden sein. Die cDNA wurde bei -70 °C gelagert. Vor Verwendung der cDNA für qPCR wurde diese mit dem DNA Clean & Concentrator-5 Kit (Zymo Research) in 20 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O umgepuffert.

### 2.4.6 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird verwendet, um spezifische DNA-Sequenzen in vitro zu amplifizieren und Modifikationen in Sequenzen einzuführen. Für Kontroll-PCR und Kolonie-PCR wurde eine Taq-Polymerase (Genaxxon bioscience) verwendet, für Klonierungen die PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase (TaKaRa BIO INC.). Letztere ist

## 2. Material und Methoden

nicht nur eine 5'→3' DNA Polymerase, sondern hat zusätzlich eine 3'→5' Exonuklease *proofreading* Aktivität, was eine hohe Korrektheit der Amplifikate sichert. Die verwendeten Primer für die PCR sind in Tab. 2.3 aufgeführt. Der PCR Reaktionsmix und die Thermocycler Programme sind in Tab. 2.4 und Tab. 2.5 dargestellt.

Tab. 2.4: PCR Reaktionsmix

| Taq-Polymerase Mix                  | PrimeSTAR HS DNA Polymerase        |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| ≤ 2 ng Plasmid-DNA                  | ≤ 200 ng <i>template</i> DNA       |
| ≤ 100 ng genomische DNA             |                                    |
| 50 pm Primer fwd                    | 0,2 pm Primer fwd                  |
| 50 pm Primer rev                    | 0,2 pm Primer rev                  |
| 2,5 µl Puffer E + MgCl <sub>2</sub> | 1 µl 10x PS Puffer                 |
| 1 µl dNTP Mix (je 2,5 mM)           | 0,8 µl dNTP Mix (je 2,5 mM)        |
| 0,5 µl Taq DNA Polymerase           | 0,1 µl PrimeSTAR HS DNA Polymerase |
| 1,5 µl DMSO                         | 0,5 µl DMSO                        |
| ad 25 µl H <sub>2</sub> O           | ad 10 µl H <sub>2</sub> O          |

Tab. 2.5: PCR Thermocycler Programm

|               | Taq-Polymerase Mix |          | PrimeSTAR HS DNA Polymerase Mix |          |              |          |
|---------------|--------------------|----------|---------------------------------|----------|--------------|----------|
|               |                    |          | 2-step                          |          | 3-step       |          |
| Denaturierung | 94 °C              | 3 min    | 98 °C                           | 2 min    | 98 °C        | 2 min    |
|               | 30 Zyklen          |          | 30 Zyklen                       |          | 30 Zyklen    |          |
| Denaturierung | 94 °C              | 30 s     | 98 °C                           | 10 s     | 98 °C        | 10 s     |
| Annealing     | 50-<br>68 °C       | 30 s     |                                 |          | 50-<br>70 °C | 5-15 s   |
| Elongation    | 72 °C              | 1 min/kb | 68-70 °C                        | 1 min/kb | 72 °C        | 1 min/kb |
| Elongation    | 72 °C              | 5 min    | 72 °C                           | 5 min    | 72 °C        | 5 min    |
| Lagerung      | 4 °C               | ∞        | 4 °C                            | ∞        | 4 °C         | ∞        |

Für eine optimale Amplifikation wurde die Annealingtemperatur und -zeit der Primer sowie die Elongationszeit individuell angepasst. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel analysiert.

### 2.4.7 Quantitative Echtzeit-PCR

Zur Quantifizierung spezifischer DNA-Abschnitte von in cDNA umgeschriebene mRNA wurde quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Damit wurde die Transkription bestimmter Gene analysiert. Es wurde für jedes Primerpaar ein qPCR-Mastermix hergestellt (Tab. 2.6). In eine weiße Transformer Cap Strip optical flat 96 well plate (Biozym) wurden 9  $\mu\text{l}$  Mastermix in Triplikaten pro cDNA Probe auf Eis vorgelegt und je 1  $\mu\text{l}$  cDNA ( $< 100 \text{ ng}$ ) einzeln pipettiert.

Tab. 2.6: qPCR Reaktionsmix

|                                     |                   |
|-------------------------------------|-------------------|
| 2x S'Green Blue Mix (Thermo Fisher) | 5,0 $\mu\text{l}$ |
| 10 $\mu\text{M}$ Primer fwd         | 0,2 $\mu\text{l}$ |
| 10 $\mu\text{M}$ Primer rev         | 0,2 $\mu\text{l}$ |
| H <sub>2</sub> O                    | 3,6 $\mu\text{l}$ |

Im qTower2.0 (Analytik Jena) wurde folgendes PCR-Programm durchlaufen:

Tab. 2.7: qPCR Programm

|               |          |          |           |
|---------------|----------|----------|-----------|
| Denaturierung | 95 °C    | 2 min    |           |
| Denaturierung | 95 °C    | 5 s      |           |
| Annealing     | 52 °C    | 5 s      | 35 Zyklen |
| Elongation    | 72 °C    | 20 s     |           |
| Elongation    | 72 °C    | 5 min    |           |
| Schmelzkurve  | 60-95 °C | 1 °C/6 s |           |

### 2.4.8 Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe wurde Gelelektrophorese im Agarosegel in horizontalen Gelkammern durchgeführt. Dazu wurde 0,8-1,5 % (w/v) Standard Agarose in TAE-Puffer (50 mM Tris, 50 mM Essigsäure, 2,5 mM EDTA) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und in der Gelkammer mit eingesetztem Kamm ausgehärtet. Die Elektrophoresekammer wurde mit TAE als Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden vor dem Auftragen in die Taschen des Gels 1:6 mit Ladepuffer (New England Biolabs) versetzt. Es wurde für jedes Gel ein DNA Standard appliziert. DNA Proben wurden bei einer Spannung von etwa 130 V für 20-25 min laufen gelassen, RNA Proben bei 140 V für 45 min.

Zum Färben wurde das Gel für 10-20 min in ein Ethidiumbromidbad (10 µg/ml H<sub>2</sub>O) gelegt. Anschließend wurden die DNA Banden mit einem UV-Transilluminator (ULTRA LUM, Ultra Lum Ins., USA) visualisiert.

### 2.4.9 Präparation von DNA aus Agarosegel

Um spezifische DNA aus PCR Proben oder Restriktionsverdau nach Auftrennung im Agarosegel zu isolieren, wurden die gewünschten Banden aus einem ethidiumbromidgefärbten Agarosegel ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Gel and PCR clean-up Kit (Macherey-Nagel) gereinigt.

### 2.4.10 Reinigung von PCR Produkten und verdauter DNA

Für die Verwendung von PCR Produkten oder mit Restriktionsenzymen verdauter DNA für Klonierungen wurden diese, nach Auftrennung im Agarosegel oder direkt aus dem Reaktionsansatz, mit dem NucleoSpin Gel and PCR clean-up Kit (Macherey-Nagel) von dNTPs, Enzymen und Puffern gereinigt.

### 2.4.11 Restriktionsverdau

DNA von PCR Produkten und Plasmiden wurde mit Restriktionsenzymen (New England Biolabs) spezifisch geschnitten. Die Ansätze wurden bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur für 2-4 h inkubiert und die Restriktionsenzyme anschließend hitzeinaktiviert. Die Qualität des Verdau wurde durch Agarosegelelektrophorese geprüft.

---

|                        |          |
|------------------------|----------|
| DNA                    | 1 µg     |
| 10x Restriktionspuffer | 2 µl     |
| Restriktionsenzym 1    | 1 µl     |
| Restriktionsenzym 2    | 1 µl     |
| H <sub>2</sub> O       | ad 20 µl |

---

### 2.4.12 Ligation von DNA Fragmenten

Mit gleichen Restriktionsenzymen verdaute DNA Abschnitte (üblicherweise ein Plasmid und ein PCR Produkt) wurden mit einer T4-DNA-Ligase (NEB) ü. N. bei 16 °C ligiert. Das PCR Produkt wurde im Verhältnis 2:1 oder 3:1 eingesetzt.

|                          |               |
|--------------------------|---------------|
| 10x T4 DNA Ligase Puffer | 1 $\mu$ l     |
| pDNA                     | 50 $\mu$ g    |
| PCR Produkt              | x* $\mu$ g    |
| H <sub>2</sub> O         | ad 10 $\mu$ l |

\* abhängig vom Molekulargewicht des PCR Produkts

### 2.4.13 Klonierung

Für eine Klonierung wurde die DNA von Interesse mit PCR amplifiziert und ggf. durch Überhänge der Primer mit Restriktionsschnittstellen versehen (2.4.6). Das Plasmid und das aus dem Agarosegel gereinigte (2.4.10) PCR Produkt wurden mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut (2.4.11). Die verdauten Produkte wurden wiederum gereinigt und anschließend ligiert (2.4.12). Das Ligationsprodukt wurde in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 transformiert (Abschnitt 2.4.16). Das Klonierungsprodukt wurde mit Kolonie-PCR qualitativ überprüft.

### 2.4.14 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration mit NanoDrop

Die Konzentration und Reinheit der DNA in einer Probe wurde spektrophotometrisch bestimmt. Es wurde mit dem NanoDrop-2000 (ThermoFisher) ein Spektrum von 220-350 nm aufgenommen. Die Konzentration doppelsträngiger DNA ergab sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz durch die Multiplikation der  $A_{260}$  mit  $50 \frac{ng}{\mu l}$  (Extinktionskoeffizient von dsDNA =  $0,02 (\frac{ng}{\mu l})^{-1} \cdot cm^{-1}$ ), die Konzentration einzelsträngiger RNA über Multiplikation mit dem Faktor  $40 \frac{ng}{\mu l}$  (Extinktionskoeffizient von ssRNA =  $0,025 (\frac{ng}{\mu l})^{-1} \cdot cm^{-1}$ ). Der Quotient  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$  war ein Indikator für Verunreinigungen z.B. durch Proteine und sollte  $\geq 1,8$  sein.

### 2.4.15 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden nach der Methode von Chung *et al.*, 1989 hergestellt. Eine *E. coli* Vorkultur wurde in LB ü. N. bei 37 °C inkubiert. Als Hauptkultur wurden 100 ml LB Medium 1:100 mit der Vorkultur angeimpft und für etwa 3 h bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,5 bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden gerettet mit 3000 *g* für 10 min bei 4 °C, das Pellet in 15 ml kaltem 100 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden wiederum zentrifugiert mit 3000 *g* für 10 min bei 4 °C und das Pellet in 2 ml kaltem 100 mM CaCl<sub>2</sub> + 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die

Zellsuspension wurde in 200 µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

### 2.4.16 Transformation

Plasmid-DNA wurde in *E. coli* Zellen mittels Hitzeschock transformiert. Dazu wurde zunächst ein Aliquot kompetenter *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Es wurden etwa 100 ng Plasmid-DNA hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde für 30-45 s bei 42 °C im Heizblock durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen für 2 min auf Eis abgekühlt und 800 µl vorgewärmtes LB Medium zugegeben. Die transformierten Zellen wurden abhängig von der auf dem Plasmid codierten Resistenz für 45-90 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 100 µl Zellsuspension wurde auf LB Agar ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

### 2.4.17 Sequenzierung

Reine DNA klonierter Plasmide wurde durch Sequenzierung bei der Firma LGC Genomics GmbH überprüft. Die ermittelten DNA Sequenzen wurden gegen die Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Datenbank geprüft.

### 2.4.18 Elektroporation von *R. eutropha*

In *R. eutropha* wurde Plasmid-DNA mittels Elektroporation eingebracht nach Tee *et al.*, 2017. Dazu wurden etwa 10 Kolonien von frisch auf NB Agar kultivierten *R. eutropha* mit einer Impföse in 500 µl H<sub>2</sub>O überführt und resuspendiert. Die Zellen wurden zentrifugiert bei 11000 rpm für 1 min bei RT in einer Eppendorf Centrifuge 5430 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Das Pellet wurde in 500 µl kaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fünf Mal mit 500 µl kalter, steril filtrierter 200 mM Saccharose gewaschen und zentrifugiert bei 11000 rpm für 1 min bei RT. Zuletzt wurde das Zellpellet in 100 µl 200 mM Saccharose resuspendiert. Es wurden 100 ng Plasmid-DNA zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde bei einer Spannung von 2,3 kV, Kapazität von 2,5 µF durchgeführt. Der Widerstand wurde auf 100 Ω *low range* und 500 Ω *high range* eingestellt. Nach der Elektroporation wurde die Zellsuspension sofort in 800 µl vorgewärmtes NB Medium transferiert und für 2 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert bei 11000 rpm für 1 min bei RT und der Überstand bis auf 100 µl abgenommen. Das Pellet wurde im restlichen Medium resuspendiert und auf NB Agar ausplattiert. Die Zellen wurden für zwei Tage bei 30 °C inkubiert.



## 2.5 Analytische Methoden

### 2.5.1 Fluoreszenzmikroskopie

Mit Fluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation von DAPI-gefärbtem PolyP oder mit eYFP, mCherry oder DsRed fusionierten Proteinen untersucht, mit Nilrot gefärbte PHB Granula visualisiert sowie Viabilitätstests mit Propidiumiodid (PI) gefärbten Zellen durchgeführt.

10  $\mu\text{l}$  Zellkultur wurden, ggf. nach vorheriger Verdünnung, mit Farbstoff versetzt und auf Eis inkubiert. Die Details der Färbungen sind in Tab. 2.8 dargestellt. Anschließend wurden 3  $\mu\text{l}$  der gefärbten Zellsuspension auf einem 150  $\mu\text{l}$  1 % (w/v) Agarosepad auf einem Glasobjektträger immobilisiert und die kurz angetrockneten Zellen mit einem Deckgläschen abgedeckt.

Tab. 2.8: Parameter der Zellfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen

| Farbstoff                 | Stammlösung   | finale Konzentration        | Inkubationszeit |
|---------------------------|---|-----------------------------|-----------------|
| DAPI                      | 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in $\text{H}_2\text{O}$ | 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$   | 10-15 min       |
| Nilrot                    | 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in DMSO                  | 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$   | 10 min          |
| PI für <i>R. eutropha</i> | 1 $\text{mg}/\text{ml}$ in $\text{H}_2\text{O}$     | 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 5 min           |
| PI für <i>E. coli</i>     | 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in $\text{H}_2\text{O}$ | 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  | 5 min           |

Die Proben wurden mit einem Nikon Ti-E Fluoreszenzmikroskop (MEA53100) mit einem ApoPro Objektiv (100x/1,4 Oil) betrachtet. Es besitzt einen Durchlichtkanal und verschiedene Fluoreszenzfiltersätze, die im Folgenden aufgeführt sind:

| Fluoreszente Struktur      | $\lambda$ Anregung | $\lambda$ Emission |
|----------------------------|--------------------|--------------------|
| DAPI-PolyP                 | 415/20 nm          | 520/60 nm          |
| eYFP                       | 500/24 nm          | 542/27 nm          |
| Nilrot, mCherry, DsRed, PI | 562/40 nm          | 594 nm Langpass    |

Bilder der gefärbten Zellen wurden mit einer Digitalkamera von Hamamatsu Orca Flash 4.0 sCMOS aufgenommen und mit der Nikon imaging software bearbeitet.

## 2.5.2 PolyP Extraktion und Quantifizierung

### 2.5.2.1 PolyP Extraktion

Zur Bestimmung des PolyP Gehalts wurde eine Zellkultur geerntet mit 5087 *g* für 15 min bei 4 °C. Das benötigte Volumen war abhängig von der Zelldichte und ist für jeden Versuch im Ergebnisteil angegeben. Ausreichend für eine Analyse waren z.B. 50 ml einer *R. eutropha* Kultur, die nach einer ü. N. Vorkultur für 24 h in NB Medium kultiviert wurde mit einer finalen OD<sub>600</sub> von etwa 2. Das Pellet wurde für mindestens 4 h bei -20 °C eingefroren und für mindestens 24 h lyophilisiert. Von den lyophilisierten Zellen wurden 2-5 mg auf der Feinwaage eingewogen. PolyP wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung nach Bru *et al.*, 2016 isoliert.

Dafür wurden die lyophilisierten Zellen zunächst in 400 µl AE-Puffer (50 mM Natriumacetat, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 5,3) resuspendiert. Dann wurden 300 µl Phenol und 40 µl 10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) zugegeben, viermal invertiert und für 5 s durch Vortexen homogenisiert. Die Suspension wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert, dann für 1 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 300 µl Chloroform zugegeben, wiederum viermal invertiert und für 5 s durch Vortexen homogenisiert und bei 13000 *g* für 2 min bei RT zentrifugiert. 450 µl der oberen wässrigen Phase wurden in ein frisches Reaktionsgefäß mit 350 µl Chloroform überführt, viermal invertiert und für 5 s durch Vortexen homogenisiert und wiederum bei 13000 *g* für 2 min bei RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben und mit 2 µl RNase A (Stammlösung 10 mg/ml in H<sub>2</sub>O) und 2 µl DNase I (Stammlösung 10 mg/ml in H<sub>2</sub>O) für 1 h bei 37 °C verdaut.

Anschließend wurde der Ansatz für die Ethanol-fällung in 1 ml vorgekühlten 99 % Ethanol mit 40 µl 3 M Natriumacetat pH 5,3 überführt und für mindestens 3 h oder ü. N. bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde bei 13000 *g* für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das PolyP Pellet mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, zentrifugiert bei 13000 *g* für 5 min bei 4 °C und der Überstand wiederum dekantiert. Restlicher Ethanol wurde nach einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 13000 *g* für 1 min bei 4 °C abpipettiert. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und in H<sub>2</sub>O gelöst.

Die Quantifizierung von PolyP wurde hinsichtlich der Konzentration von Monophosphatresten mit colorimetrischen Assays durchgeführt. Dazu wurde das PolyP enzymatisch mit rekombinanter *S. cerevisiae* Exopolyphosphatase (ScPPX) und Pyrophosphatase (ScIPP) verdaut und freies Phosphat quantifiziert.

### 2.5.2.2 PolyP Quantifizierung mit Malachitgrünassay

Als Standard für den Malachitgrünassay wurde KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O in den Konzentrationen 5 µM, 15 µM, 30 µM, 60 µM und 90 µM angesetzt. Für die Messung technischer Triplikate wurden zu 40 µl 5x ScPPX Reaktionspuffer (100 mM Tris, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM

Ammoniumacetat, pH 7,5) und 9  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  150  $\mu\text{l}$  Probenlösung (ggf. verdünnt) oder Standardlösung gegeben. Es wurde mit rekombinant hergestellter ScPPX verdaut, die von Celina Frank (Universität Stuttgart, Institut für Mikrobiologie) in *E. coli* BL21 expriert und gereinigt wurde. Dazu wurden die Proben mit 1  $\mu\text{l}$  ScPPX ( $c=0,6\text{ mg/ml}$ ) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Als blank wurde 1  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  statt ScPPX zugegeben. Je 50  $\mu\text{l}$  der verdauten Probe wurden in eine durchsichtige Mikrotiterplatte mit flachem Boden gegeben. Dann wurden 35  $\mu\text{l}$  Lösung A (2 N HCl und 100 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  im Verhältnis 4:3) zugegeben und 15  $\mu\text{l}$  0,042 % (w/v) Malachitgrün in  $\text{H}_2\text{O}$ . Es wurde für exakt 2 min bei RT inkubiert, die Reaktion dann mit 100  $\mu\text{l}$  7,8 % (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gestoppt. Für 30 min wurde die Farbentwicklung bei RT abgewartet, dann die  $A_{625}$  spektrophotometrisch im Plattenlesegerät bestimmt. Aus den  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Standards wurde eine Kalibriergerade erstellt. Von den enzymatisch verdauten Proben wurde der blank subtrahiert und daraus mittels Kalibriergerade die Phosphatkonzentration in der Probe berechnet.

### 2.5.2.3 PolyP Quantifizierung mit Antimon-Ascorbat Assay

#### Enzymlagerpuffer

20 mM Tris-HCl, pH 7,5  
50 mM KCl  
ad 40 ml  $\text{H}_2\text{O}$   
pH 7,5  
0,1 % BSA  
(w/v)  
50 % (v/v) Glycerin  
ad 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$

#### 100x Verdünnungspuffer

100 mM MOPS  
10 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$   
ad 1 l  $\text{H}_2\text{O}$   
pH 7,0 mit NaOH

Für den Einsatz von 1x Verdünnungspuffer wurden 10 ml 100x Verdünnungspuffer in 990 ml  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt.

### Reaktionspuffer

60 mM Tris  
 15 mM Magnesiumacetat  
 150 mM Ammoniumacetat  
 ad 100 ml H<sub>2</sub>O  
 pH 7,5 mit Essigsäure

### Phosphat-Detektionslösung

600 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 2,4 mM Ammoniummolybdat  
 0,6 mM Kaliumantimontartrat  
 ad 500 ml H<sub>2</sub>O  
 88 mM Ascorbinsäure

Zuerst wurde Kaliumantimontartrat in H<sub>2</sub>O gelöst, dann H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugesetzt und zuletzt Ammoniummolybdat zugegeben. Die Lösung wurde in einer braunen Flasche bei 4 °C gelagert. Die Ascorbinsäure wurde täglich frisch zugesetzt.

### Enzyme

| Enzym | c [U/µl] | Puffer           |
|-------|----------|------------------|
| ScPPX | 11000    | Enzymlagerpuffer |
| ScIPP | 0,013    | Enzymlagerpuffer |

Die Enzyme wurden rekombinant in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS exprimiert und gereinigt wie in Abschnitt 2.6.2 beschrieben.

Für den Antimon-Ascorbat Assay (Sb-Ascorbat Assay) nach Christ und Blank, 2018 wurde als Standard KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1x Verdünnungspuffer in den Konzentrationen 0 µM, 20 µM, 65 µM, 115 µM, 155 µM und 200 µM angesetzt. Pro Einzelmessung wurde in einer durchsichtigen Mikrotiterplatte mit flachem Boden zu 100 µl Probelösung oder Standardlösung 48 µl Reaktionspuffer und je 1 µl ScPPX und ScIPP gegeben. Als blank wurden 50 µl Reaktionspuffer zur Probe gegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C verdaut. Anschließend wurden 50 µl Phosphat-Detektionslösung zur verdauten Probe gegeben und exakt 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die A<sub>882</sub> spektrophotometrisch im Plattenlesegerät bestimmt. Die Berechnung der Phosphatkonzentration in den Proben erfolgte wie beim Malachitgrünassay.

#### 2.5.2.4 PolyP Kettenkonzentrationsassay

Zur Bestimmung der Kettenkonzentration von PolyP in einer Probe wurde ein enzymatischer Assay verwendet von Christ *et al.*, 2019. Dieser beruht darauf, dass beim Verdau von

PolyP mit ScPPX pro PolyP Kette ein unverdauliches Pyrophosphat übrig bleibt. Durch Detektion der Pyrophosphatkonzentration mit einem Fluoreszenzreporterassay über die Bildung von NADPH (Schema siehe Abb. 2.1) wird die Kettenkonzentration bestimmt und durch Division der Monophosphatkonzentration, die mit dem Sb-Ascorbat-Assay nach Verdau mit ScPPX und ScIPP bestimmt wird, durch die Pyrophosphatkonzentration die mittlere Kettenlänge berechnet.

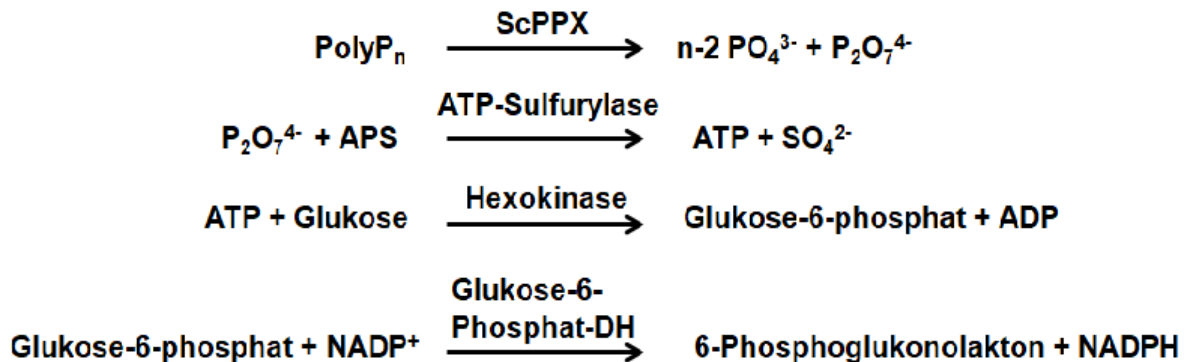


Abb. 2.1: Schema des PolyP Kettenkonzentrationsassays. PolyP wird mit der ScPPX zu Monophosphat und einem Pyrophosphat pro Kette verdaut. Das Pyrophosphat wird über Reporterreaktionen proportional in NADPH umgesetzt. Dessen Bildung wird über seine Fluoreszenz nachgewiesen.

### TMG Puffer

450 mM Tris  
 30 mM Magnesiumacetat  
 12 mM Glukose x H<sub>2</sub>O  
 ad 11 H<sub>2</sub>O  
 pH 7,6 mit Essigsäure

### ATP Sulfurylase Verdünnungspuffer

10 mM Tris  
 50 mM NaCl  
 1,0 ml 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA  
 ad 40 ml H<sub>2</sub>O  
 pH 7,5  
 1,0 ml 10 mM DTT  
 50 % (v/v) Glycerin  
 ad 100 ml H<sub>2</sub>O

**Adenosin-5'-phosphosulfat (APS)**

10,0 mg APS  
 11,7 ml 50 mM MOPS

**NADP<sup>+</sup>**

157,5 mg NADP<sup>+</sup>  
 10,0 ml 50 mM MOPS

**Enzyme**

| Enzym                 | c [U/μl] | Puffer                               | Firma              |
|-----------------------|----------|--------------------------------------|--------------------|
| ATP Sulfurylase       | 0,075    | ATP Sulfurylase<br>Verdünnungspuffer | Bio-Techne         |
| Hexokinase            | 0,075    | Enzymlagerpuffer                     | Boehringer         |
| Glukose-6-phosphat-DH | 0,075    | Enzymlagerpuffer                     | Sigma Aldrich      |
| ScPPX                 | 33000    | Enzymlagerpuffer                     | selbst hergestellt |

**Mastermix**

| Substanz              | V [μl] pro Reaktion |       |
|-----------------------|---------------------|-------|
|                       | Probe               | blank |
| H <sub>2</sub> O      | 11                  | 13    |
| TMG Puffer            | 25                  | 25    |
| APS                   | 5                   | 5     |
| NADP <sup>+</sup>     | 5                   | 5     |
| Hexokinase            | 1                   | 1     |
| Glukose-6-phosphat-DH | 1                   | 1     |
| ATP Sulfurylase       | 1                   | 0     |
| ScPPX                 | 1                   | 0     |

Als Standard wurde ein Vorrat von 1 mM Pyrophosphat in 50 mM MOPS, pH 7,0 vorbereitet. Diese Substanz wurde immer bei - 70 °C gelagert und auf Eis aufgetaut. Für die täglich frischen Verdünnungen in Verdünnungspuffer wurde zunächst eine 1:10 Vorverdünnung pipettiert. Diese wurde im Sb-Ascorbat Assay exakt quantifiziert und auf 100 μM Pyrophosphat eingestellt. Die gravimetrischen Folgeverdünnungen mit einer Feinwaage sind im Folgenden aufgeführt:

**Pyrophosphatstandards**

| Konzentration      | V Stammlösung          | V Verdünnungspuffer |
|--------------------|------------------------|---------------------|
| 10,0 $\mu\text{M}$ | 1 ml 100 $\mu\text{M}$ | 9 ml                |
| 7,5 $\mu\text{M}$  | 3 ml 10 $\mu\text{M}$  | 7 ml                |
| 5,0 $\mu\text{M}$  | 5 ml 10 $\mu\text{M}$  | 5 ml                |
| 2,5 $\mu\text{M}$  | 7 ml 10 $\mu\text{M}$  | 3 ml                |
| 1,0 $\mu\text{M}$  | 1 ml 10 $\mu\text{M}$  | 9 ml                |

In eine schwarze Corning 96 well Platte mit flachem Boden wurden 100  $\mu\text{l}$  Standard von 1  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  in Duplikaten, die Proben zweimal in Triplikaten vorgelegt. Die Proben wurden in mehreren Verdünnungen angesetzt, um in den Konzentrationsbereich des Standards zu fallen. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle eine Stammlösung von 10 mM des aus 10-13 Phosphatresten bestehenden kurzkettigen PolyP Budit7 (Geschenk von Jonas Christ, AG Blank, Institut für angewandte Mikrobiologie, RWTH Aachen) in 50 mM MOPS, pH 7,0 als PolyP Standard eingesetzt. Die Konzentration bezieht sich auf die Monophosphate. Dann wurden 50  $\mu\text{l}$  Mastermix Probe zu den Standards und einem Duplikat Proben gegeben, 50  $\mu\text{l}$  Mastermix blank zu den restlichen Duplikaten einer Probe. Anschließend wurde für 55 min bei RT im Dunklen inkubiert. Im vorgeheizten Plattenlesegerät Synergie H1 (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) wurde bei 25 °C weitere 5 min inkubiert, bevor die Fluoreszenzintensität des NADPH, nicht dessen Absorption, in den Proben bestimmt wurde. Dazu wurde die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen. Es wurde eine automatische Anpassung der Signalverstärkung relativ zur höchsten Fluoreszenzemission bei 10  $\mu\text{M}$  Pyrophosphat gewählt.

Die Berechnung der Kettenkonzentration erfolgte über die Subtraktion des blanks von der Probe und Division durch zwei für die Umrechnung in Monophosphat und anschließend eine Umrechnung der Fluoreszenzintensität in die Pyrophosphatkonzentration über die Standardgerade.

$$c(\text{PolyP Ketten}) [\mu\text{M}] = 0,5 \cdot (c(\text{Probe}) - c(\text{blank}))$$

Anschließend wurde die mittlere Kettenlänge berechnet:

$$\text{Mittlere Kettenlänge [n PO}_4^{3-}] = \frac{c(\text{PolyP}) [\mu\text{M}]}{c(\text{PolyP}) \text{ Ketten} [\mu\text{M}]}$$

**2.5.3 Gaschromatographie**

Der zelluläre PHB Gehalt wurde gaschromatographisch ermittelt. Dazu wurde Zellkultur geerntet mit 5087 g für 15 min bei 4 °C. Das Pellet wurde für mindestens 4 h bei -20 °C eingefroren und lyophilisiert. Von den lyophilisierten Zellen wurden 5-10 mg auf einer

Feinwaage in Schraubdeckelröhrchen mit Teflondichtung eingewogen. Damit wurde eine saure Methanolyse nach Jüngert *et al.*, 2018 durchgeführt. Dazu wurde 1 ml Methanol + 15 % (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugegeben sowie 1 ml Chloroform, gemischt und der Ansatz bei 100 °C im Ölbad für 3 h inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf Eis gekühlt, dann 1 ml H<sub>2</sub>O und 1 ml Standardlösung, bestehend aus 0,2 % Methylbenzoat (v/v) in Chloroform, hinzugegeben. Es wurde für 30 s durch Vortexen gemischt. 150 µl der unteren organischen Phase wurde für die Analyse in ein GC-Röhrchen überführt. Im Gaschromatograph Agilent 7890A wurde 1 µl Probe mit der automatisierten Probeauftragung injiziert bei einer Injektortemperatur von 250 °C. Es wurde eine HP-5 Säule (Agilent) für die Trennung der Methylester verwendet mit Helium als Trägergas mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 ml/min. Das Temperaturprogramm für die Trennung ist im Folgenden gezeigt:

| Schritt | Temperatur          | Zeit            |
|---------|---------------------|-----------------|
| 1       | 50 °C               | 2 min           |
| 2       | Erhöhung auf 60 °C  | mit 2 °C / min  |
| 3       | 60 °C               | 5 in            |
| 4       | Erhöhung auf 280 °C | mit 35 °C / min |
| 5       | 280 °C              | 1 min           |

Die Detektion erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor bei 275 °C. Als Standard wurden 2, 4, 6 und 8 mg reines PHB methanolysiert und gaschromatographisch gemessen.

### 2.5.4 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie analysiert Einzelzellen einer Zellsuspension nach verschiedenen Parametern. Zunächst wird die Größe und Granularität der Zellen unterschieden. Zusätzliche Färbungen mit Fluoreszenzfarbstoffen oder fluoreszenzgetagten Antikörpern erlauben die Detektion weiterer zellulärer Eigenschaften wie Präsenz bestimmter Proteine oder intrazellulärer Strukturen sowie lebend-tot-Analysen.

Nach oxidativen Stresstests wurde die erhaltene *R. eutropha* Zellsuspension auf ihre Viabilität und intrazelluläre Level an oxidativen Sauerstoffspezies (ROS) analysiert. Die Proben wurden 1:50 mit PBS verdünnt. Für die Bestimmung der Viabilität wurde 1 ml Zellsuspension mit 2 µg/ml PI (Stammlösung 1 mg/ml in H<sub>2</sub>O) für 15 min im Dunklen bei RT gefärbt. Die Fluoreszenzintensität der Zellen wurde mittels Durchflusszytometer (Cytex NL-2000) durch Anregung bei 530 nm, Emission bei 615 nm gemessen. Es wurden pro Probe 10000 Zellen analysiert. Für die Auswertung wurde eine abgegrenzte Population mit sehr hoher Fluoreszenzintensität als positiv eingestuft, die Population mit geringerer Fluoreszenzintensität als negativ. Für die Messung der ROS-Level wurden die Zellen mit CellROX green (Thermo Fisher) gefärbt. Dies ist ein proteinbasierter Redoxsensor. Die reduzierte Form von CellROX green fluoresziert nicht, während das Molekül bei intrazel-



lulärer Oxidation durch ROS Fluoreszenz auftritt. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Menge des oxidierten CellROX und damit zur Menge an ROS in der Zelle. Die 1:50 verdünnten Zellen wurden für 10 min mit 25  $\mu$ l 10 % (v/v) TritonX-100 in PBS bei RT permeabilisiert. Danach wurde mit 0,25 mM CellROX green (Stammlösung 25 mM in DMSO) für 30 min bei 30 °C im Dunklen gefärbt. Vor der Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, dabei jeweils bei 2656 g für 2 min bei RT zentrifugiert und in PBS resuspendiert. Die Messung der CellROX green Fluoreszenz erfolgte durch Anregung bei 508 nm, Emission bei 525 nm.

### 2.5.5 Proteinstrukturanalyse mit SEC-MALS

Die Strukturanalyse von Proteinen wurde durchgeführt mit *fast protein liquid chromatography* (FPLC) an der ÄKTA pure (Cytiva). Dazu wurde Probe mit gereinigtem Protein zunächst zentrifugiert mit 14800 rpm für 5 min bei 4 °C zum Entfernen von Proteinpräzipitat. Die Proteinlösung wurde dann ggf. mit 2  $\mu$ M PolyP und/oder anderem Protein für 20 min bei RT inkubiert für die Strukturanalyse mit potentiellen Bindungspartnern. Es wurden 500  $\mu$ l Probe über die Größenausschlusschromatographiesäule (SEC) Superose 6 Increase 10/300 GL (V=24 ml) (Cytiva) in Puffer A (siehe Abschnitt 2.6.1) bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5  $\frac{ml}{min}$  aufgetrennt und die  $A_{280}$  des Eluats gemessen. Die Absorption der Probe ist proportional zur Proteinkonzentration. Diese Detektionsmethode von Proteinen stößt daher bei hochmolekularen Proteinen, z.B. Oligomeren, oft an seine Grenzen. Dagegen wird die Lichtstreuung einer Probe stärker mit steigendem Radius des Moleküls. Um ein breites Detektionsspektrum von Proteinen zu erlangen, wurde die  $A_{280}$  Messung um eine *Multi Angle Static Light Scattering* (Lichtstreuung in multiplen Winkeln) (MALS) Messung mit dem MiniDAWN Treos (Wyatt, Santa Barbara, Californien, USA) ergänzt.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts war die Superose 6 Increase 10/300 GL SEC-Säule mit den Proteinstandards Thyroglobulin, Ferritin, Aldolase, Ovalbumin, Conalbumin, Carboanhydrase und Ribonuclease A äquilibriert (durchgeführt von der AG Forchhammer, Universität Tübingen). Aus der Kalibriergeraden (siehe Abb. 3.49)

$$\log_{MW} = -0,2201 V_{Retention} + 8,3776$$

wurde das Retentionsvolumen eines Signals in ein Molekulargewicht umgerechnet.

### 2.5.6 Raman-Mikrospektroskopie

Raman-Mikrospektroskopie ist eine Methode zur hochauflösenden chemischen Spektralanalyse von Einzelpunktmessungen einer Probe, indem alle Raman-aktiven Moleküle in der Probe mit einem Laser angeregt werden. Gemessen wird die Änderung der Wellenlänge des Lichts, die durch inelastische Streuung hervorgerufen wird.

Als Probe wurde ein frisches Zellpellet von *R. eutropha* verwendet. Dazu wurde *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk-all$  Mutante in 20 ml NB Medium + 0,2 % Fruktose in 100 ml Erlenmeyerkolben 1:40 aus einer ü. N. Vorkultur in NB Medium ohne Fruktose angeimpft und bei 30 °C und orbitalem Schütteln bei 160 rpm kultiviert. Nach 5 h oder 24 h wurden 2 ml Probe in ein Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert mit 5976 *g* für 2 min bei RT. Das Zellpellet wurde einmal mit kaltem PBS gewaschen und bis zur Analyse auf Eis gelagert. Als Reinheitskontrolle wurde jede Kultur lichtmikroskopisch auf eine Kontamination getestet sowie auf NB Agarplatten ausgestrichen, für 1 d bei 30 °C inkubiert und die gewachsene Kultur auf ihr homogenes, typisches Aussehen geprüft.

Mit einer Pipettenspitze wurden 10-20  $\mu$ l feuchtes Zellpellet auf ein CaF-Fenster gegeben und bei RT trocknen gelassen. Dann wurde mit einem InVia™ Reflex Raman Mikrospektrometer (Renishaw, Wotton-under-Edge, Großbritannien) bei 20-facher bis 50-facher Vergrößerung pro Probe drei Einzelpunkte ausgewählt, die mit einem Laser der Wellenlänge 532 nm (100 % Leistung = 75 mW) oder 785 nm (100 % Leistung = 140 mW) angeregt wurden. Es wurden je 60 Einzelspektren mit einer Belichtungszeit von 1 s aufgenommen. Mit der Software WiRE erfolgte eine Überlagerung der Einzelspektren, wodurch die spezifischen Signale akkumulierten, während Hintergrundrauschen verringert wurde. Mit einem Savitzky-Golay Filter (Zweite Ordnung, sieben Punkte) wurden die Spektren geglättet. Die Spektren der drei technischen Replikate wurden gemittelt. Anschließend wurden die Signale gegen die Intensität des Phenylalaninsignals bei 1003  $\text{cm}^{-1}$  normalisiert.

Die Messungen erfolgten am *National Institute for Instruments of the Czech Academy of Sciences* in Brno (Tschechien) unter Anleitung von Ota Samek und Martin Kizovský, die auch bei der Auswertung berieten. Die Auswertung erfolgte auf Grundlage von Tabellen aus De Gelder *et al.*, 2007; De Gelder *et al.*, 2009; De Gelder *et al.*, 2008 und Tao *et al.*, 2016 über Raman-Signale in verschiedenen *Ralstonia* Stämmen.

### 2.5.7 <sup>31</sup>P-Phospho-Kernspinresonanzspektroskopie

Es wurden dreimal 600 ml NB Medium in 31 Erlenmeyerkolben 1:20 mit einer Vorkultur von *R. eutropha* WT in NB Medium angeimpft und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, gewaschen und lyophilisiert. Aus 14 x 50 mg lyophilisierter Zellen wurde PolyP mittels Phenol-Chloroform-Extraktion mit Ethanol-fällung isoliert (Details siehe Abschnitt 2.5.2). Für die PolyP Granula Isolation wurden zweimal 400 ml NB Medium in 21 Erlenmeyerkolben 1:20 mit einer Vorkultur von *R. eutropha* WT in NB Medium angeimpft und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Die Granula Isolation erfolgte durch Zentrifugation und Filtration wie in Abschnitt 2.6.11 beschrieben. Nach dem Abspülen des grauen, weichen Pellets wurde das weiße Pellet in 1 ml H<sub>2</sub>O bei 37 °C gelöst. Im Anschluss wurde die Probe zentrifugiert bei 5000 rpm für 1 min bei RT. Der Überstand enthielt die wasserlös-

liche Fraktion, das Pellet die wasserunlösliche Fraktion. Die Proben wurden lyophilisiert und in Kooperation mit Dr. Sabine Willbold, Forschungszentrum Jülich strukturell mit  $^{31}\text{P}$ -Phospho-Kernspinresonanzspektroskopie ( $^{31}\text{P}$ -NMR) untersucht. Dazu wurden die Proben mit 13-40  $\mu\text{mol}$  in 500  $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$  und 8  $\mu\text{l}$   $\text{NaOD}$  gelöst und in einem 600 MHz Spektrometer (Bruker) gemessen. Die Spektren wurden mit einem  $90^\circ$  Puls, 1 s Aquisitionszeit, 15 s Relaxationszeit bei 298 K aufgenommen.

### 2.5.8 Lipidanalyse

Die Lipidanalyse von *R. eutropha* wurde in Kooperation mit der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (Braunschweig, Deutschland) unter der Leitung von Dr. Meina Neumann-Schaal durchgeführt. Es wurden 400 ml NB Medium 1:20 mit einer ü. N. NB Kultur von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante in Triplikaten angeimpft und für 24 h bei  $30^\circ\text{C}$  schüttelnd inkubiert. Geerntet wurde durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$ . Die Pellets wurden mit 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, zentrifugiert mit 5100 rpm für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  und der Überstand abgenommen. Die Pellets wurden lyophilisiert. Aus den lyophilisierten Zellen wurden polare Lipide extrahiert und mittels HPLC analysiert.

### 2.5.9 Proteomanalyse

Zur Identifizierung von Proteinen in einer Probe wurden 20  $\mu\text{l}$  Probe mit 40  $\mu\text{l}$  3x Laemmli-Puffer für 5 min bei  $95^\circ\text{C}$  denaturiert und davon 20  $\mu\text{l}$  etwa 1 cm in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit colloidalem Coomassie. Die Bearbeitung der Proben für die Identifizierung von gereinigtem strep-PptA im Eluat der strep-tag Affinitätschromatographie und die Analyse der Proteine im eYFP-GlnA1 Proteinpulldown wurden an der Core Facility Massenspektrometrie der Universität Hohenheim von der AG Pfannenstiel durch Berit Würtz durchgeführt. Die Analyse der Proteine des PolyP Granula Pulldowns wurde in der Core Facility Proteom Center Tübingen der Universität Tübingen von der AG Macek unter der Leitung von Mirita Franz-Wachtel durchgeführt.

An der Universität Hohenheim wurden die Proben aus dem SDS-Gel ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und mit Acetonitril isoliert. Der Überstand wurde im Vakuum getrocknet und in Methansäure gelöst. Davon wurden 5  $\mu\text{l}$  mittels Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS) analysiert. Die Identifizierung der Peptidfragmente erfolgte mit der Software Scaffold. An der Universität Tübingen wurden die Proben mit Trypsin verdaut und im Proxeon Easy-nLC 1200 (Thermo Scientific) gekoppelt mit QExactive HF-X Massenspektrometer (Thermo Scientific) analysiert. Die Daten wurden mit MaxQuant Software prozessiert und mit einer Proteindatenbank von *R. eutropha* verglichen.

## 2.6 Biochemische Methoden

### 2.6.1 Proteinreinigung mit Histidin-tag

Für die Herstellung von rekombinantem GlnA1 mit zehnfacher Histidin-Markierung (10xHis-GlnA1) wurde *E. coli* BL21 (DE3) pLysS pET16b-*glnA1* in einer 20 ml ü. N. LB-Kultur + Amp100 + Cm34 bei 37°C angezogen. Damit wurden 400 ml LB-Medium + Amp100 + Cm34 in einem 2l Erlenmeyerkolben angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 bei 37°C angezogen. Es wurde mit 0,1 mM IPTG induziert und *10xHis-glnA1* für 6 h bei 30°C, 160 rpm exprimiert. Die Kultur wurde zentrifugiert bei 5000 rpm für 15 min bei 4°C. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer A mit 10 µl DNaseI (10 mg/ml) resuspendiert und mittels French press (Aminco, Silver Spring, Maryland, USA) wurde bei 1000 psi drei Mal aufgeschlossen. Das Lysat wurde ultrazentrifugiert bei 35000 rpm für 45 min bei 4°C. Aus dem Rohextrakt Überstand wurde das His-getaggte GlnA1 mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert.

| <b>Puffer A</b>                        | <b>Puffer A + 0,5 M Imidazol</b>       |
|--|--|
| 300 mM NaCl                            | 300 mM NaCl                            |
| 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
| 5% Glycerin                            | 5% Glycerin                            |
| (v/v)                                  | (v/v)                                  |
| ad 1l H <sub>2</sub> O                 | 500 mM Imidazol                        |
| pH = 8,0                               | ad 1l H <sub>2</sub> O                 |
|  | pH = 8,0                               |

Aus Puffer A und Puffer A + 0,5 M Imidazol wurden Puffer mit verschiedenen Imidazolkonzentrationen hergestellt (Tab. 2.9). Der Rohextrakt Überstand wurde auf eine mit Puffer A + 20 mM Imidazol äquilibrierte Ni-NTA Säule gegeben, unspezifisch gebundene Proteine mit Puffer A + 20-250 mM Imidazol entfernt und schließlich mit Puffer A + 400 mM Imidazol 10xHis-GlnA1 eluiert. Die einzelnen Schritte der Affinitätschromatographie sind in Tab. 2.9 dargestellt.

Tab. 2.9: Schritte der Isolation von 10xHis-GlnA1 mittels Imidazolgradient

| c (Imidazol) | Benötigtes V | V (Puffer A) | V (Puffer A + 0,5 M Imidazol) |
|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|
| 20 mM        | 60 ml        | 57,6 ml      | 2,4 ml                        |
| 50 mM        | 10 ml        | 9,0 ml       | 1,0 ml                        |
| 100 mM       | 2 ml         | 1,6 ml       | 0,4 ml                        |
| 200 mM       | 2 ml         | 1,2 ml       | 0,8 ml                        |
| 250 mM       | 4 ml         | 4,0 ml       | 2,0 ml                        |
| 400 mM       | 4 ml         | 0,8 ml       | 3,2 ml                        |

Die Präsenz von 10xHis-GlnA1 in den Elutionsfraktionen wurde mit SDS-PAGE geprüft.

### 2.6.2 Proteinreinigung mit strep-tag

Über einen strep-tag wurde codonoptimiertes strep-PptA und die Enzyme für den Sb-Ascorbat Assay bzw. Kettenkonzentrationsassay gereinigt. Für die Herstellung von rekombinantem, codonoptimiertem strep-PptA wurde *E. coli* BL21 (DE3) pLysS p4782.1::*strep-pptA* in einer 50 ml ü. N. LB-Kultur + Kan50 + Cm34 bei 37 °C angezogen. Damit wurden 1 l LB-Medium + Amp100 + Cm34 in einem 5 l Erlenmeyerkolben angeimpft und sofort mit 0,1 % Rhamnose induziert. Es wurde für 6 h bei 30 °C, 160 rpm exprimiert.

Für die Synthese und Reinigung von strep-ScPPX und strep-ScIPP wurden jeweils *E. coli* BL21 (DE3) pLysS mit pASG-IBA105-*scPpx1* oder pASG-IBA103-*scIpp* nach einer ü. N. Vorkultur in LB Medium + Amp100 bei 37 °C und 170 rpm 1:20 in 600 ml LB Medium + Amp100 in einem 3 l Erlenmeyerkolben angeimpft und für etwa 2 h bei 37 °C und 170 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 angezogen. Dann wurde die Expression durch den Zusatz von 60 µl Anhydrotetrazyklin (Stammlösung 2 mg/ml in Dimethylformamid) induziert und die Zellen für 3 h bei 30 °C kultiviert.

Die anschließende Proteinisolation erfolgte für alle drei strep-markierten Proteine gleich. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 15 min bei 4 °C. Die Pellets wurden resuspendiert in 1 ml Puffer W mit 2 µl DNaseI (Stammlösung 10 mg/ml) pro 100 ml Kultur. Dann wurde mittels French press (Aminco, Silver Spring, Maryland, USA) bei 1000 psi drei Mal aufgeschlossen. Das Lysat wurde ultrazentrifugiert bei 35000 rpm für 45 min bei 4 °C. Aus dem Rohextrakt Überstand wurde das strep-PptA mittels Strep-Tactin<sup>R</sup> XT Superflow High Capacity Kartusche (V=5 ml) (IBA Lifesciences GmbH, Göttingen, Deutschland) affinitätschromatographisch an der ÄKTA pure (Cytiva, Uppsala, Schweden) isoliert. Die einzelnen Schritte sind in Tab. 2.10 aufgeführt.

| <b>Puffer W</b> |                  | <b>Puffer BXT</b> |                  |
|-----------------|------------------|-------------------|------------------|
| 100 mM          | Tris, pH 8,0     | 100 mM            | Tris, pH 8,0     |
| 150 mM          | NaCl             | 150 mM            | NaCl             |
| 1 mM            | EDTA             | 1 mM              | EDTA             |
| ad 1 l          | H <sub>2</sub> O | 100 mM            | Biotin           |
|                 |                  | ad 1 l            | H <sub>2</sub> O |

Tab. 2.10: Schritte der Isolation der strep-tag Proteine

| <b>Schritt</b>                    | <b>Puffer</b> | <b>Benötigtes V</b> |
|-----------------------------------|---------------|---------------------|
| Auftragen Rohextrakt<br>Überstand |               | 2,5-50 ml           |
| Waschen                           | Puffer W      | 25 ml               |
| Elution                           | Puffer BXT    | 15 ml               |

Die Präsenz der gewünschten, isolierten Proteine in den 2 ml Elutionsfraktionen wurde mit SDS-PAGE geprüft. Die Enzyme ScPPX und ScIPP wurden mit 50 % (v/v) Glycerin bei - 20 °C gelagert.

### 2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mit BCA

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde mit dem Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.6.4 Polyacrylamidgelelektrophorese für Proteinanalyse

Für die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli, 1970 durchgeführt. Die Proben wurden in einem 4,5 % Sammelgel fokussiert und anschließend in einem 12 % Trenngel nach dem Molekulargewicht separiert durch vertikale Elektrophorese in einer Minigelkammer (Biometra, Göttingen, Deutschland). Die Gelgröße betrug 100 x 100 x 1 mm.

Zuerst wurden alle Bestandteile des Trenngels in der dargestellten Reihenfolge zusammengegeben, gut vermischt und mit AS die Polymerisationsreaktion gestartet. Das Trenngel wurde zwischen zwei abgedichtete Glasplatten pipettiert, mit Isopropanol überschichtet und auspolymerisiert. Dann wurde das Isopropanol entfernt, die Bestandteile des Sammelgels frisch zusammengegeben, auf das ausgehärtete Trenngel pipettiert und ein Kamm zur Ausbildung von Taschen für die Probenapplikation eingesetzt. Nach dem Aushärten des Sammelgels wurde das Gel in den Glasplatten in die Minigelkammer eingesetzt und

diese mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Der Kamm wurde entfernt und die Ladetaschen mit SDS-Laufpuffer gespült.

Die Proben wurden mit denaturierendem und reduzierendem 3x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. 10-15 µl Probe wurde in die Ladetasche gegeben und ein BlueStar Prestained Protein Marker (Nippon Genetics Europe, Düren, Deutschland) mitgeführt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel im Sammelgel und 25 mA pro Gel im Trenngel durchgeführt.

#### 4,5 % Sammelgel und 12 % Trenngel

| Substanz                                  | 5 ml Sammelgel | 10 ml Trenngel |
|---|----------------|----------------|
| H <sub>2</sub> O                          | 2,98 ml        | 3,20 ml        |
| 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8                    | 1,25 ml        |                |
| 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8                    |                | 4,00 ml        |
| 10 % (w/v) SDS                            | 0,05 ml        | 0,10 ml        |
| 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (0,8 % (w/v)) | 0,67 ml        | 4,00 ml        |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED)            | 0,005 ml       | 0,01 ml        |
| 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (AS)         | 0,05 ml        | 0,10 ml        |

#### Laemmli-Puffer

15 ml 10 % (w/v) SDS  
 15 ml 86 % (v/v) Glycerin  
 1,5 ml 2-Mercaptoethanol  
 7,5 mg Bromphenolblau  
 ad 50 ml H<sub>2</sub>O

#### SDS-Laufpuffer

12,1 g Tris  
 7,5 g Glycin  
 1,0 g SDS  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O

### 2.6.5 Färbung von SDS-PA-Gelen mit colloidalem Coomassie

Zur Detektion von Proteinen in SDS-PA-Gelen wurden diese nach erfolgter Gelelektrophorese in 20 ml colloidalem Coomassie nach Candiano *et al.* (2004) unter Bewegung bei RT für mindestens 2 h oder ü. N. gefärbt. Das Gel wurde anschließend zum Entfärben mehrfach mit H<sub>2</sub>O gewaschen.

### Colloidales Coomassie

100 ml H<sub>2</sub>O  
118 ml 85 % (v/v) Phosphorsäure  
100 g Ammoniumsulfat  
unter Rühren auflösen  
1,2 g Coomassie Brilliant Blue G-250  
unter Rühren auflösen  
ad 800 ml H<sub>2</sub>O  
ad 1 l Methanol

### 2.6.6 Silberfärbung von SDS-PA-Gelen

Mit Silberfärbung wurden Proteine hochsensitiv in SDS-PA-Gelen detektiert.

#### Fixierlösung

200 ml Methanol  
182 ml 37 % (v/v)  
Formaldehyd  
ad 500 ml H<sub>2</sub>O

#### Natriumthiosulfatlösung

200 mg Natriumthiosulfat  
ad 1 l H<sub>2</sub>O

#### Silbernitratlösung

1 g Silbernitrat  
ad 1 l H<sub>2</sub>O

#### Stoplösung

18,6 g Na<sub>2</sub>EDTA  
ad 1 l H<sub>2</sub>O

#### Entwicklerlösung

30 g Natriumcarbonat  
500 µl 37 % (v/v)  
Formaldehyd  
800 µl 0,02 % (w/v)  
Natriumthiosulfat  
ad 1 l H<sub>2</sub>O

Das SDS-PA-Gel wurde unter Bewegung für 15 min in Fixierlösung inkubiert. Dann wurde zweimal für 5 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde das Gel für 1 min in Natriumthiosulfatlösung gelegt und dreimal für 20 s mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Danach erfolgte die Silberfärbung für 10 min in Silbernitratlösung und wiederum dreimal Waschen für 20 s mit H<sub>2</sub>O. Dann wurde das Gel in Entwicklerlösung gelegt, bis die Proteinbanden in gewünschter Intensität sichtbar waren. Zum Beenden der Reaktion wurde das Gel sofort in Stoplösung überführt.



### 2.6.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese für PolyP

Die Auftrennung von PolyP nach der Größe des Polymers erfolgte mit kontinuierlicher Polyacrylamidgelelektrophorese. Alle Substanzen für ein 15 % oder 20 % PA-Gel wurden gut gemischt und zwischen zwei dichte Glasplatten pipettiert. Ein Kamm wurde eingesetzt für die Ausbildung von Ladetaschen. Das Gel wurde für mehrere Stunden polymerisiert. Die Größe des Gels betrug 160 x 160 x 2 mm oder 100 x 100 x 1 mm. Das Gel wurde in eine vertikale Gelelektrophoresekammer (Biorad, Düren, Deutschland) gespannt und mit 1x TBE als Laufpuffer gefüllt. Der Kamm wurde entfernt und die Ladetaschen mit Laufpuffer gespült. Die Probe wurde mit 2x orange dye versetzt und 80 µl Probe auf das große Gel bzw. 20 µl Probe auf das kleine Gel pro Ladetasche aufgetragen ohne vorherige Zentrifugation. Zusätzlich wurde ein PolyP Standard von variabler Größe zwischen 50 und 100 Monomeren mit einer Konzentration zwischen 1 und 10 mM beigefügt. Das Gel wurde bei konstant 300 V bei 4 °C für etwa 3 h laufen gelassen.

#### PolyP-Polyacrylamidgel

| Substanz                            | 15 % PA-Gel | 20 % PA-Gel |
|-------------------------------------|-------------|-------------|
| H <sub>2</sub> O                    | 19,4 ml     | 14,9 ml     |
| 40 % Acrylamid/Bisacrylamid<br>19:1 | 14,3 ml     | 19,0 ml     |
| 10x TBE Puffer                      | 3,8 ml      | 3,8 ml      |
| TEMED                               | 0,02 ml     | 0,02 ml     |
| 10 % (w/v) AS                       | 0,20 ml     | 0,20 ml     |

#### 10x TBE Puffer

890 mM Tris  
890 mM Borsäure  
20 mM Na<sub>2</sub>EDTA  
ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,6

#### Orange dye

10 mM Tris-HCl, pH 7,0  
30 % (v/v) Glycerin  
1 mM Na<sub>2</sub>EDTA  
0,1 % Orange G  
(w/v)  
ad 20 ml H<sub>2</sub>O

### 2.6.8 Färbung von PolyP-PA-Gelen mit Toluidinblau

Die Detektion von PolyP in PA-Gelen erfolgte durch Färbung mit 0,15 % (w/v) Toluidinblaulösung für 10 min bei RT unter Schwenken. Danach wurde mehrfach mit H<sub>2</sub>O gewaschen, bis das Gel entfärbt war.

**Toluidinblaulösung**

|        |                     |
|--------|---------------------|
| 1,5 g  | Toluidinblau        |
| 200 ml | Methanol            |
| 20 ml  | 98 % (v/v) Glycerin |
| ad 1 l | H <sub>2</sub> O    |

**2.6.9 Bakteriellens Adenylatcyclase *two hybrid* System**

Mit dem bakteriellen Adenylatcyclase *two hybrid* System (bac2hybrid) wurden in vivo Protein-Protein-Interaktionsstudien durchgeführt nach Karimova *et al.*, 1998. Dazu wurden zwei Gene von Interesse jeweils fusioniert mit dem T25 Fragment oder dem T18 Fragment der *E. coli* Adenylatcyclase in den Vektoren pKT25 und pUT18C. Diese wurden in *E. coli* BTH 101, einem Deletionsstamm ohne Adenylatcyclase, kotransformiert und exprimiert. Bei Interaktion der Proteine von Interesse wurden die beiden Fragmente der Adenylatcyclase komplementiert und die Zelle erlangte die Fähigkeit zur cAMP-Synthese. Die cAMP Level der *E. coli* BTH 101 pUT18C-*GenA* pKT25-*GenB* wurde über die Verstoffwechslung von Maltose und 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (X-Gal) geprüft.

Nur unter Anwesenheit von cAMP wird das *lac*-Operon exprimiert. Als Substrat der  $\beta$ -Galactosidase, dem Genprodukt von *lacZ*, werden Maltose und X-Gal, ein Laktoseanalog, verstoffwechselt. Auf MacConkey-Agar mit Maltose wird das Medium bei Verstoffwechslung des Zuckers angesäuert, was über den pH-Indikator Neutralrot zu Rotfärbung der Kolonien führt. Auf LB-X-Gal-Agar wird X-Gal in Galaktose und 4-Chlor-3-Brom-Indigo hydrolysiert. Letzteres färbt die Kolonie blau.

**Stammlösungen**

|            |             |
|------------|-------------|
| Thiamin    | 0,5 % (w/v) |
| Ampicillin | 100 mg/ml   |
| Kanamycin  | 50 mg/ml    |
| IPTG       | 1 M         |
| X-Gal      | 2 % in DMF  |

**5x M-63 Medium**

|        |   |
|--------|---|
| 10 g   | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |
| 68 g   | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 |
| 2,5 mg | FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O          |
| ad 1 l | H <sub>2</sub> O, pH 7,0                        |

**MacConkey Agar**

|        |                  |
|--------|------------------|
| 40 g   | MacConkey Agar   |
| ad 1 l | H <sub>2</sub> O |
|        | autoklaviert     |
| 10 g   | Maltose          |
| 1,0 ml | Ampicillin       |
| 1,0 ml | Kanamycin        |

**LB-X-Gal-IPTG Agar**

|        |                  |
|--------|------------------|
| 15 g   | Agar             |
| ad 1 l | H <sub>2</sub> O |
|        | autoklaviert     |
| 0,5 ml | IPTG             |
| 2,0 ml | X-Gal            |
| 1,0 ml | Ampicillin       |
| 1,0 ml | Kanamycin        |

### M-63 Agar

|             |                   |
|-------------|-------------------|
| 15,0 g      | Agar              |
| 800 ml      | H <sub>2</sub> O  |
|             | autoklaviert      |
| 200 ml      | 5x M-63 Medium    |
| 0,2 g       | MgSO <sub>4</sub> |
| 0,2 % (w/v) | Maltose           |
| 1,0 ml      | Thiamin           |
| 1,0 ml      | Ampicillin        |
| 1,0 ml      | Kanamycin         |
| 0,5 ml      | IPTG              |
| 2,0 ml      | X-Gal             |

Die mit pUT18C-*GenA* und pKT25-*GenB* kotransformierten *E. coli* BTH 101 wurden auf LB-X-Gal-IPTG-Agar ausplattiert und für 2 d bei 30 °C inkubiert. Pro Plasmidkombination wurden vier repräsentative Kolonien in 1 ml LB-Medium + Amp100 + Kan50 + 0,5 mM IPTG in einer *deep-well* Platte angeimpft. Diese wurde mit gaspermeablem Film abgedeckt und ü. N. bei 30 °C, 120 rpm inkubiert.

Je 1 µl Kultur von jedem Ansatz wurde auf eine trockene MacConkey- und LB-X-Gal-IPTG-Agarplatte aufgetropft und bei 30 °C inkubiert. Nach 24 h und 48 h wurde die Färbung der Kolonien dokumentiert.

#### 2.6.10 $\beta$ -Galaktosidase Assay (Miller-Assay)

Als indirekte, quantitative Bestimmung des cAMP-Spiegels beim bac2hybrid in *E. coli* BTH 101 pUTC-*GenA* pKT25-*GenB*, wurde die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase mit dem Miller-Assay für Mikrotiterplatten gemessen. Die ü. N. Kultur der *E. coli* BTH 101 pUT18C-*GenA* pKT25-*GenB* in LB-Amp100-Kan50-0,5 mM IPTG Medium aus Abschnitt 2.6.9 wurden für den colorimetrischen  $\beta$ -Galactosidase Assay 1:5 mit 0,9 % NaCl in einer Mikrotiterplatte verdünnt und die OD<sub>600</sub> im Plattenlesegerät bestimmt. Als blank dienten 40 µl LB Medium + 160 µl 0,9 % NaCl. In einer *deep well* Platte wurden 920 µl Z-Puffer mit 2-Mercaptoethanol vorgelegt, dann 100 µl der verdünnten Zellkultur zugegeben. Zum Permeabilisieren wurden 20 µl Toluol zugefügt, die *deep well* Platte mit einem Papiertuch abgedeckt und die Zellen für 40 min bei 37 °C inkubiert. Von den permeabilisierten Zellen wurden 150 µl in eine Mikrotiterplatte überführt und für 20 min im Plattenlesegerät bei 28 °C auf eine konstante Temperatur vorgeheizt. Dann wurden 30 µl ONPG-Lösung zugefügt und die A<sub>420</sub> für 40 min mit einem Messintervall von 2 min bei 28 °C verfolgt. In Anwesenheit von  $\beta$ -Galactosidase wird ONPG zu Galaktose und o-Nitrophenol gespalten. Letzteres absorbiert bei 420 nm.

Zusätzlich wurde zur Umrechnung der Messdaten aus der Mikrotiterplatte in Messwerte eines Küvettenspektrophotometers eine Verdünnungsreihe einer Zellkultur und der ONPG-Lösung sowohl in einer Mikrotiterplatte im Plattenlesegerät als auch in einer Küvette im Spektrophotometer gemessen. Dazu wurde von der Zellsuspension wie der ONPG-Lösung eine Verdünnungsreihe in H<sub>2</sub>O von 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 und anschließend in 1:2 Verdünnungsschritten bis 1:15 hergestellt.

Die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase wurde wie folgt basierend auf der modifizierten Millergleichung nach Thibodeau *et al.* (2004) berechnet: Zunächst wurden die Messwerte der OD<sub>600</sub> der Verdünnungsreihen der Zellsuspension in der Mikrotiterplatte und Küvette gegeneinander aufgetragen und die Steigung der Geraden ermittelt (Korrekturfaktor 2, KF2). Ebenso wurde mit den Werten der A<sub>420</sub> der ONPG-Verdünnungsreihe verfahren und die Steigung bestimmt (Korrekturfaktor 1, KF1).

$$\beta\text{-Galactosidase Aktivität} = \frac{v_{420} \cdot 1000 \cdot KF1}{OD_{600} \cdot KF2 \cdot V}$$

v<sub>420</sub>: Reaktionsgeschwindigkeit, Steigung der A<sub>420</sub>/min

KF1: Korrekturfaktor A<sub>420</sub>

KF2: Korrekturfaktor OD<sub>600</sub>

V: Eingesetztes Volumen an Zellen = 0,15 ml

#### Z-Puffer

16,10 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

5,50 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O

0,75 g KCl

246 mg MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

ad 11 H<sub>2</sub>O, pH 7,0

2,7 ml 2-Mercaptoethanol (frisch)

#### ONPG-Lösung

4 mg/ml o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktosid

(ONPG) in Z-Puffer

### 2.6.11 Isolation von PolyP Granula

PolyP Granula aus einer *R. eutropha* Kultur wurden isoliert nach einem modifizierten Protokoll von Tumlirsch, 2017 und Streichan und Schön, 1991. Mit einer ü. N. Vorkultur von *R. eutropha* wurden 400 ml NB Medium in einem 2l Erlenmeyerkolben 1:20 angeimpft und für 24 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden geerntet durch Zentrifugation bei 8000 rpm für 15 min bei 4 °C. Das Zellpellet wurde mit 5 ml 0,25 M Saccharose gewaschen und in einem 50 ml Falcon zentrifugiert bei 5087 g für 10 min bei 4 °C. Die Zellen wurden in 5 ml 0,25 M Saccharose resuspendiert, je 10  $\mu$ l DNaseI (c=10 mg/ml) und RNase (c=10 mg/ml) zugegeben und dreimal mit der French press bei 1000 psi abgeschlossen. Das Zelllysate wurde in einem 50 ml Falcon zentrifugiert bei 3000 g für 10 min bei 4 °C, um verbliebene Zellen und große Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde durch einen 0,2  $\mu$ m Filter filtriert. Das noch etwas trübe Filtrat wurde ultrazentrifugiert

bei 10000 rpm für 30 min bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet bestand aus einem weichen graubraunen Rand und einem weißlichen Kern. Mit 1 ml H<sub>2</sub>O wurde der graubraune Rand vorsichtig suspendiert, abgenommen und verworfen. Mit 1 ml H<sub>2</sub>O wurde das feste, weiße PolyP enthaltende Pellet bei 37 °C gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es wurde zentrifugiert bei 11000 g für 1 min bei RT, der Überstand verworfen und das Pellet mit den PolyP Granula in 200 µl H<sub>2</sub>O bei 37 °C gelöst. Die Lagerung erfolgte bei - 20 °C

### 2.6.12 Protein-Pulldown

Mit Antikörpern gegen eYFP wurde eYFP-GlnA1 als Köder aus *R. eutropha* Zellysaten isoliert zusammen mit allen Proteinen, die mit GlnA1 in Wechselwirkung treten. Die Proteine wurden dann mit LC-MS an der Universität Hohenheim, AG Pfannenstiel analysiert.

Aus einer ü. N. Vorkultur in NB Medium + Kan150 von *R. eutropha* WT,  $\Delta ppk$ -*all* und  $\Delta pptA$  mit pBBR1MCS-2-P<sub>PhaC</sub>-*eyfp-glnA1* wurden 20 ml Schlegel-MSM + 0,2 % Fruktose + Kan150 angeimpft und für 24 h bei 30 °C schüttelnd kultiviert. Damit wurden die Hauptkulturen in 200 ml Schlegel-MSM + 0,8 % Fruktose + Kan150 auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 30 °C schüttelnd kultiviert. Bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 4 wurden die Zellen geerntet durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 20 min bei 4 °C. Die weiteren Arbeiten wurden auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt in Protein LoBind Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

#### **Pulldown-Puffer**

|           |                       |
|-----------|-----------------------|
| 25 mM     | Natriumphosphatpuffer |
| 5 % (v/v) | Glycerin              |
| 50 mM     | NaCl                  |
| 5 mM      | MgSO <sub>4</sub>     |
| 5 mM      | KCl                   |
| 20 mM     | Imidazol              |
|           | pH 7,5                |

Das Zellpellet wurde in 2 ml Pulldown-Puffer resuspendiert und dreimal mit der French press bei 750 psi aufgeschlossen. 20 µl magnetische Kugeln GFP-Trap<sup>R</sup> mit eYFP-Bindeaffinität (Chromotek, Planegg-Martinsried, Deutschland) wurden dreimal mit 500 µl Pulldown Puffer äquilibriert. Dann wurden 500 µl Zellysate mit 20 µl magnetischen Kugeln für 1 h auf Eis schüttelnd inkubiert. Währenddessen wurde die Lösung mehrmals mit einer Pipette resuspendiert, um die Kugeln gleichmäßig zu verteilen. Anschließend wurde das Zellysate entfernt und die Kugeln fünfmal mit 500 µl Pulldown-Puffer gewaschen. Mit dem

letzten Waschschrift wurden die Kugeln in ein frisches Protein LoBind Tube überführt. Es wurden 40 µl 2,5 % (w/v) SDS und 3x Laemmli-Puffer zu den Kugeln gegeben und die Proteine durch Denaturierung für 5 min bei 95 °C von den Kugeln gelöst. Die Kugeln wurden mit einem Magneten abgetrennt und die Proteinlösung in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die gesamte Probe wurde in einem 12 % SDS-PA-Gel bis etwa 1 cm Laufstrecke aufgetrennt bei konstanter Stromstärke von 20 mA. Die Proteinbanden wurden mit colloidalem Coomassie gefärbt. Die Analyse der Proteine erfolgte wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben.

### 2.6.13 Enzymaktivitätsassay für Glutaminsynthetase

Die Glutaminsynthetase-Enzymaktivität eines Proteins wurde mit einem in vitro Assay getestet. Dabei wurde die Umwandlung von Glutamat in Glutamin gekoppelt an zwei Reporterreaktionen (Abb. 2.2) spektrophotometrisch bei einer Absorption von 340 nm verfolgt. Hier absorbiert  $\beta$ -NADH (Nikotinamidadeninukleotid), das im Verlauf der Reporterreaktionen zu  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> oxidiert wird, das bei dieser Wellenlänge nicht absorbiert. Bei aktiver Glutaminsynthetase mit Umwandlung von Glutamat zu Glutamin nahm proportional zur Enzymaktivität die  $A_{340}$  ab.

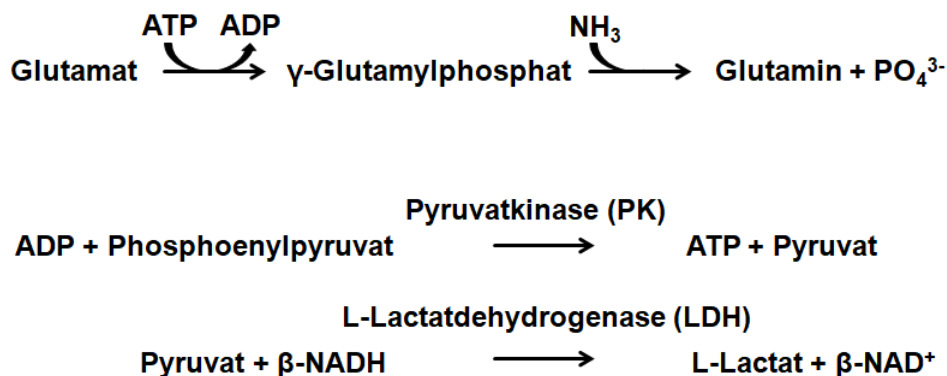


Abb. 2.2: Reaktionsschemata der Glutaminsynthese aus Glutamat durch die Glutaminsynthetase und nachgeschaltete Reporterreaktionen zur indirekten Messung der Glutaminsynthese durch spektrophotometrische Verfolgung der Absorption von  $\beta$ -NADH bei 340 nm.

#### Imidazolpuffer

1,7 g Imidazol  
 ad 250 ml H<sub>2</sub>O  
 pH 7,1 bei 30 °C

#### Na-Glutamat Lösung

14,04 g L-Glutaminsäure,  
 Mononatriumsalz  
 ad 25 ml H<sub>2</sub>O

**ATP Lösung**

0,689 g ATP, Dinatriumsalz  
ad 5 ml H<sub>2</sub>O

**Phosphoenolpyruvat Lösung**

68,6 mg Phosphoenolpyruvat  
(PEP), Trinatriumsalz  
ad 10 ml H<sub>2</sub>O

**MgCl<sub>2</sub> Lösung**

9,15 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
ad 50 ml H<sub>2</sub>O

**KCl Lösung**

3,73 g KCl  
ad 50 ml H<sub>2</sub>O

**NH<sub>4</sub>Cl Lösung**

3,21 g NH<sub>4</sub>Cl  
ad 50 ml H<sub>2</sub>O

**β-NADH Lösung**

8,5 mg β-NADH  
Dinatriumsalz  
ad 1 ml Imidazolpuffer

**Enzyme**

| Enzym        | Stammlösung | Eingesetzte Lösung | Hersteller         |
|--------------|-------------|--------------------|--------------------|
| PK           | 1884 U/ml   | 612,3 U/ml         | Sigma Aldrich      |
| LDH          | 5500 U/ml   | 1787,5 U/ml        | Sigma Aldrich      |
| 10xHis-GlnA1 |             | 670 µg/ml          | selbst hergestellt |

Zunächst wurde ein Reaktionsmastermix aus den vorbereiteten Lösungen angesetzt und der pH-Wert auf 7,1 bei 30 °C eingestellt. Anschließend wurden in zwei 1 ml Plastikküvetten der Reaktionsmix, PEP und β-NADH gegeben. Dabei diente eine Küvette als blank, die andere für die Enzymaktivitätsmessung (Probe). Die Lösung wurde gut gemischt mit einem Spatel, dann auf eine konstante Temperatur bei 30 °C im Spektrophotometer gebracht. Die A<sub>340</sub> wurde verfolgt, bis eine konstante Absorption gemessen wurde. Dann wurden die Enzyme PK, LDH und 10xHis-GlnA1 in 100 mM Imidazolpuffer verdünnt und in den angegebenen Mengen zugegeben und ggf. eine konstante Absorption abgewartet. Zuletzt wurde die Reaktion durch Zugabe von 11,3 µl 3 M Na-Glutamatlösung gestartet. Für den blank wurde das gleiche Volumen H<sub>2</sub>O zugegeben. Die A<sub>340</sub> wurde gemessen, bis keine Absorptionsänderung mehr verzeichnet wurde.

### Reaktionsmastermix

|          |                    |
|----------|--------------------|
| 20,60 ml | H <sub>2</sub> O   |
| 17,20 ml | Imidazolpuffer     |
| 1,80 ml  | ATP                |
| 3,55 ml  | MgCl <sub>2</sub>  |
| 0,90 ml  | KCl                |
| 1,80 ml  | NH <sub>4</sub> Cl |

### Abfolge der Zugabe

|         |          |                    |
|---------|----------|--------------------|
| Probe   | blank    |                    |
| 0,9 ml  | 0,911 ml | Reaktionsmastermix |
| 33,0 µl | 33,0 µl  | PEP                |
| 20,0 µl | 20,0 µl  | β-NADH             |
| <hr/>   |          |                    |
| 1,0 µl  | 1,0 µl   | PK                 |
| 1,0 µl  | 1,0 µl   | LDH                |
| 1,0 µl  | 1,0 µl   | 10xHis-GlnA1       |
| <hr/>   |          |                    |
| 11,3 µl |          | Glutamat           |

Es wurde die lineare Steigung der Absorptionsänderung beim Ansatz der Probe und des blank bestimmt. Damit wurde die Enzymaktivität wie folgt berechnet:

$$\text{Aktivität [U/ml]} = \frac{\Delta A_{340}/\text{minProbe} - \Delta A_{340}/\text{minblank} \cdot V \cdot 15}{\epsilon_{\text{NADH}} \cdot V_{\text{Enzym}}}$$

V: Reaktionsvolumen, 1 ml

15: Faktor für Umwandlung in Einheit Units (Menge an umgesetztem Substrat in 15 min)

$\epsilon_{\text{NADH}}$ : Extinktionskoeffizient von β-NADH bei 340 nm, 6,3 mM<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>

$V_{\text{Enzym}}$ : 0,001 ml

Für eine Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde die Aktivität durch die Masse an eingesetztem 10xHis-GlnA1 dividiert.

## 2.7 Immunologische Methoden

### 2.7.1 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran (Western Blot)

Für den immunologischen Nachweis bestimmter Proteinstrukturen werden Proteine auf eine Membran übertragen, mit spezifischen Antikörpern markiert und über enzymatische Reaktionen mit Farbentwicklung detektiert.



**Transferpuffer**

25 mM Tris  
 192 mM Glycin  
 15 % (v/v) Methanol  
 ad 3 l H<sub>2</sub>O

**TBS-Puffer**

100 mM Tris  
 150 mM NaCl  
 ad 2 l H<sub>2</sub>O, pH 7,5

**TBS-T-Puffer**

0,1 % Tween 20  
 1 l TBS

**Reaktionspuffer**

100 mM Tris  
 100 mM NaCl  
 5 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
 ad 100 ml H<sub>2</sub>O, pH 9,0

**Blockierungspuffer His-tag**

5 % (w/v) Magermilchpulver  
 100 ml TBS-T

**Blockierungspuffer strep-tag**

3 % (w/v) Bovines Serumalbumin (BSA)  
 100 ml TBS-T

**Reaktionslösung**

Stammlösungen:

100 mg/ml Nitrotetrazolium Blau Chlorid (NTB) in 70% Dimethylformamid (DMF)  
 50 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat Toluidinsalz (BCIP) in DMF

---

40 µl NTB Lösung  
 33 µl BCIP Lösung  
 20 ml Reaktionspuffer

Zum Nachweis rekombinanter Proteine mit His-tag oder strep-tag wurde ein Western Blot mit unserem Übertragungsverfahren durchgeführt. Zunächst wurde die Probe durch denaturierende 12 % SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Für den Proteintransfer wurde das Gel für 15-30 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Transfermembran Polyvinylidenfluorid (PVDF) Western Blotting Membrane (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) wurde vorbehandelt, indem sie für 1 s in Methanol, dann für 1 min in H<sub>2</sub>O eingelegt und anschließend für 10-15 min in Transferpuffer äquilibriert wurde. Danach wurde die PVDF Membran auf dem SDS-Gel platziert, beidseitig zuerst mit Whatman Papier, dann mit einem Kunstfasertuch, beides mit Transferpuffer getränkt,

umgeben und in eine Kassette in die Trans-Blot Apparatur (Biorad Laboratories Inc., USA) eingebaut, sodass die PVDF Membran zum Pluspol, das SDS-Gel zum Minuspol ausgerichtet war. Die Trans Blot Zelle wurde mit Transferpuffer gefüllt und ein Kühlakku zugegeben. Der Transfer der Proteine auf die PVDF Membran erfolgte für 1 h bei 100 V bei RT.

Für den immunologischen Nachweis von His-tag Proteinen wurde die PVDF Membran zweimal für 10 min mit TBS-Puffer gewaschen und anschließend für 1 h mit 20 ml Blockierungspuffer für His-tag-Detektion inkubiert.

Dann wurden 10 ml primäre  $\alpha$ -6xHis-tag-Antikörperlösung (Sigma Aldrich) für 3 h bei RT oder ü. N. bei 4 °C inkubiert. Die Details aller verwendeten Antikörper sind der Tab. 2.11 zu entnehmen. Es wurde viermal für 15 min mit 20 ml TBS-T gewaschen, dann wurde für 1 h bei RT mit 10 ml sekundärer  $\alpha$ -Maus-IgG-AP-Antikörperlösung (Sigma Aldrich) inkubiert. Danach wurde wieder viermal für 15 min mit 20 ml TBS-T und zweimal mit 20 ml TBS für 10 min gewaschen. Die Detektion erfolgte über eine Farbreaktion der an den sekundären Antikörper gekoppelten Alkalischen Phosphatase (AP) mit NTB und BCIP. Die PVDF Membran wurde in 20 ml Reaktionspuffer gelegt, dann 40  $\mu$ l NTB-Lösung und 33  $\mu$ l BCIP-Lösung zugegeben. Die Reaktion erfolgte im Dunklen bei RT, bis die gewünschte Farbtintensität nach etwa 7 min erreicht war. Die Reaktion wurde durch Waschen mit H<sub>2</sub>O beendet.

Für den immunologischen Nachweis von strep-tag Proteinen wurde die PVDF Membran für 1 h oder ü. N. in Blockierungspuffer für strep-tag-Detektion inkubiert, danach dreimal für 5 min mit 20 ml TBS-T gewaschen. Anschließend wurde das Strep-Tactin<sup>R</sup> Alkalische Phosphatase Konjugat (IBA Lifesciences GmbH) in 10 ml TBS-T zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde je zweimal mit 20 ml TBS-T und TBS für 1 min gewaschen, bevor die Membran in 20 ml Reaktionspuffer gelegt wurde. Es wurde NTB und BCIP für die chromogene Detektion zugegeben wie für His-tag Proteine beschrieben.

Tab. 2.11: Spezifikationen der Antikörper für Western Blot

| Zielstruktur | Klassifizierung     | Verdünnung | Puffer                     |
|--------------|---------------------|------------|----------------------------|
| 6xHis-tag    | Maus IgG            | 1:1000     | Blockierungspuffer His-tag |
| Maus IgG     | Ziege polyklonal+AP | 1:40000    | TBS-T                      |
| Strep-tag    | Streptavidin +AP    | 1:4000     | TBS-T                      |

## 3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der funktionalen und strukturellen Untersuchung von PolyP in *R. eutropha* sind in drei Abschnitte gegliedert dargestellt.

1. Aufklärung der Funktion von PolyP durch Untersuchung von *R. eutropha* Wildtyp (WT) und der PolyP-freien  $\Delta ppk\text{-}all$  Mutante unter verschiedenen Wachstums- und Stressbedingungen.
2. Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen, die an das PolyP Granulum binden oder mit PolyP-gebundenen Proteinen interagieren zur Bestimmung von zellulären Prozessen, an denen diese Proteine beteiligt sind.
3. Untersuchung der Struktur von PolyP sowie der strukturelle Vergleich PolyP-haltiger und PolyP-freier *R. eutropha* Zellen.

### 3.1 Funktion von PolyP

Die Funktionen von PolyP in Bakterien sind sehr vielfältig und umfassen unter anderem Funktionen als Speicher von Phosphat und Kationen oder Überlebensvorteile bei Stress. Dieser Arbeit vorangegangene Untersuchungen von Tony Tumlirsch konnten jedoch keinen Phänotyp für die PolyP-freie  $\Delta ppk\text{-}all$  Mutante aufdecken (Tumlirsch, 2017). Somit bleibt die Frage, zu welchem Zweck *R. eutropha* den energetischen Aufwand betreibt, PolyP zu synthetisieren.

#### 3.1.1 PolyP Metabolismus in *R. eutropha* in NB Medium

Zuerst wurde der PolyP-Stoffwechsel in *R. eutropha* in Komplexmedium (NB) untersucht, welches Phosphat im Überschuss und alle Aminosäuren beinhaltet. Dazu wurde das Wachstum von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk\text{-}all$  Mutante in NB spektrophotometrisch verfolgt und der PolyP Gehalt der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten mittels colorimetrischer Assays quantifiziert (Abb. 3.1).

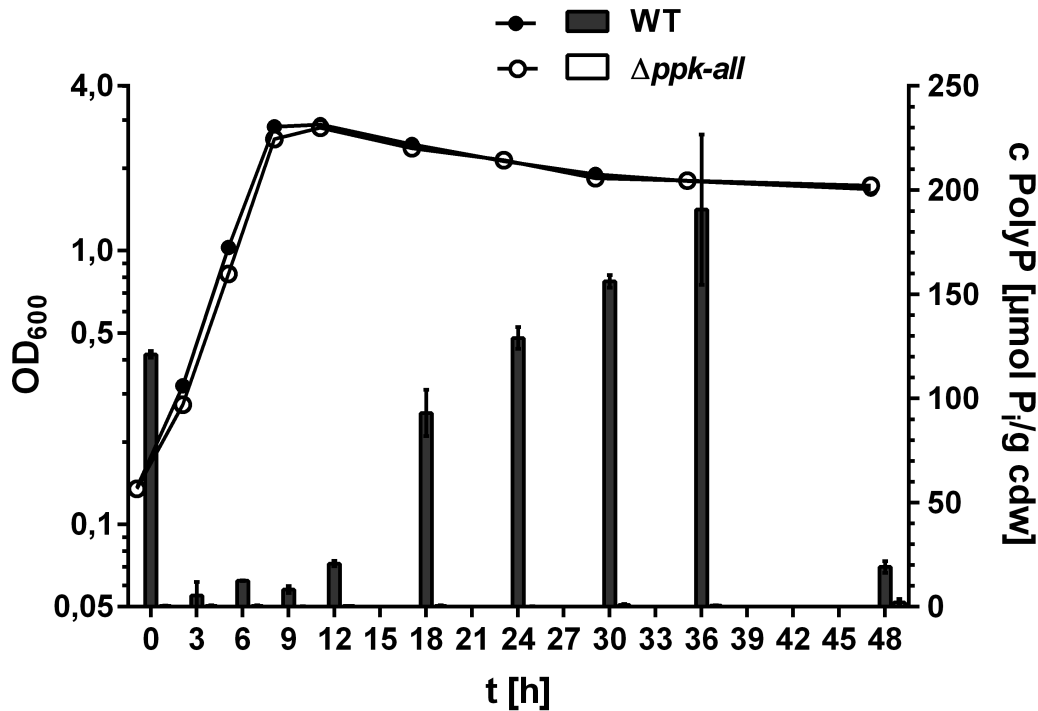


Abb. 3.1: PolyP-Gehalt von *R. eutropha* WT und  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante in NB Medium. Für jeden Probezeitpunkt wurden 50 ml NB Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 2,5 ml ü. N. Vorkultur angeimpft und bei 30 °C, 140 rpm inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 50 ml Kultur geerntet. Aus den lyophilisierten Zellpellets wurde PolyP mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert und enzymatisch mit ScPPX verdaut. Der Phosphatgehalt in Form von Monophosphat wurde mittels Sb-Ascorbatassay colorimetrisch ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte mit SD aus biologischen Triplikaten mit je drei technischen Triplikaten.

Für jeden Messpunkt der PolyP Quantifizierung wurde ein separater Erlenmeyerkolben mit 50 ml Kultur verwendet, von dem zunächst die OD<sub>600</sub> gemessen und anschließend aus derselben Kultur der PolyP Gehalt bestimmt wurde, um zu gewährleisten, dass sich die Kultur bis zum jeweiligen Erntezeitpunkt störungsfrei entwickeln konnte und eine Volumenänderung von 400 ml zwischen dem ersten und letzten Probezeitpunkt vermieden wurde. Alle neun Kulturen wurden aus einer gemeinsamen Vorkultur angeimpft, die auch den Erntezeitpunkt  $t_0$  darstellt. *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante zeigten ein vergleichbares Wachstum in NB Medium, wie auch bei Tony Tumlirsch gezeigt. Sie wuchsen nach einer kurzen lag-Phase exponentiell, erreichten eine maximale OD von etwa 2,8 nach  $t=9$  h Inkubation und gingen dann in die stationäre Phase über.

Zu Beginn des Wachstumsversuchs lag im WT rund  $121 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  aus der Vorkultur vor, die sich mit etwa 18 h Inkubation in NB Medium in der stationären Phase befunden hatte. Der WT baute dieses innerhalb von 3 h ab, sodass er in der exponentiellen Phase sehr wenig PolyP im Bereich von  $0\text{-}12 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  Zelltrockenmasse besaß. Im Verlauf der

stationären Phase akkumulierte *R. eutropha* WT PolyP bis  $190 \pm 36 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  Zelltro-  
ckenmasse bei  $t=36$  h. Der Aufbau verlief zwischen  $t=18$  h und  $t=36$  h linear mit einer  
Syntheserate von etwa  $5,4 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{h}\cdot\text{g cdw}}$  während in der späten stationären Phase bei  $t=48$  h  
PolyP wieder größtenteils abgebaut war. In der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante wurde dem Genotyp  
entsprechend zu keinem Zeitpunkt PolyP detektiert, was sich jedoch nicht auf das Wachs-  
tum in NB auswirkte, also keine offensichtlichen, wichtigen physiologischen Funktionen  
beeinflusste.

Zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums in NB Medium wurde Zellsuspension von  
*R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante mit DAPI gefärbt und die Zellmorphologie  
sowie das Vorkommen und die Lokalisation von PolyP Granula fluoreszenzmikroskopisch  
untersucht. Aus Abb. 3.2 ist ersichtlich, dass sowohl *R. eutropha* WT auch  $\Delta ppk\text{-all}$  in der  
exponentiellen Phase lange Stäbchen von 4-8  $\mu\text{m}$  waren, in der stationären Phase deutlich  
verkürzt mit etwa 2  $\mu\text{m}$ . Im WT waren ab  $t=9$  h 1-2 Granula sichtbar, die meist mittig  
entlang der Längsachse positioniert waren. In der späten stationären Phase bei  $t=48$  h  
besaßen die Zellen keine PolyP Granula mehr. Die  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante war dagegen frei  
von PolyP Granula. Die Visualisierung der PolyP Granula passte zum Ergebnis der PolyP  
Quantifizierung.

An dieser Stelle stellt sich die Frage, warum *R. eutropha* PolyP in der stationären Phase  
akkumuliert und zu welchem Zweck es in der späten stationären Phase wieder abgebaut  
wird.

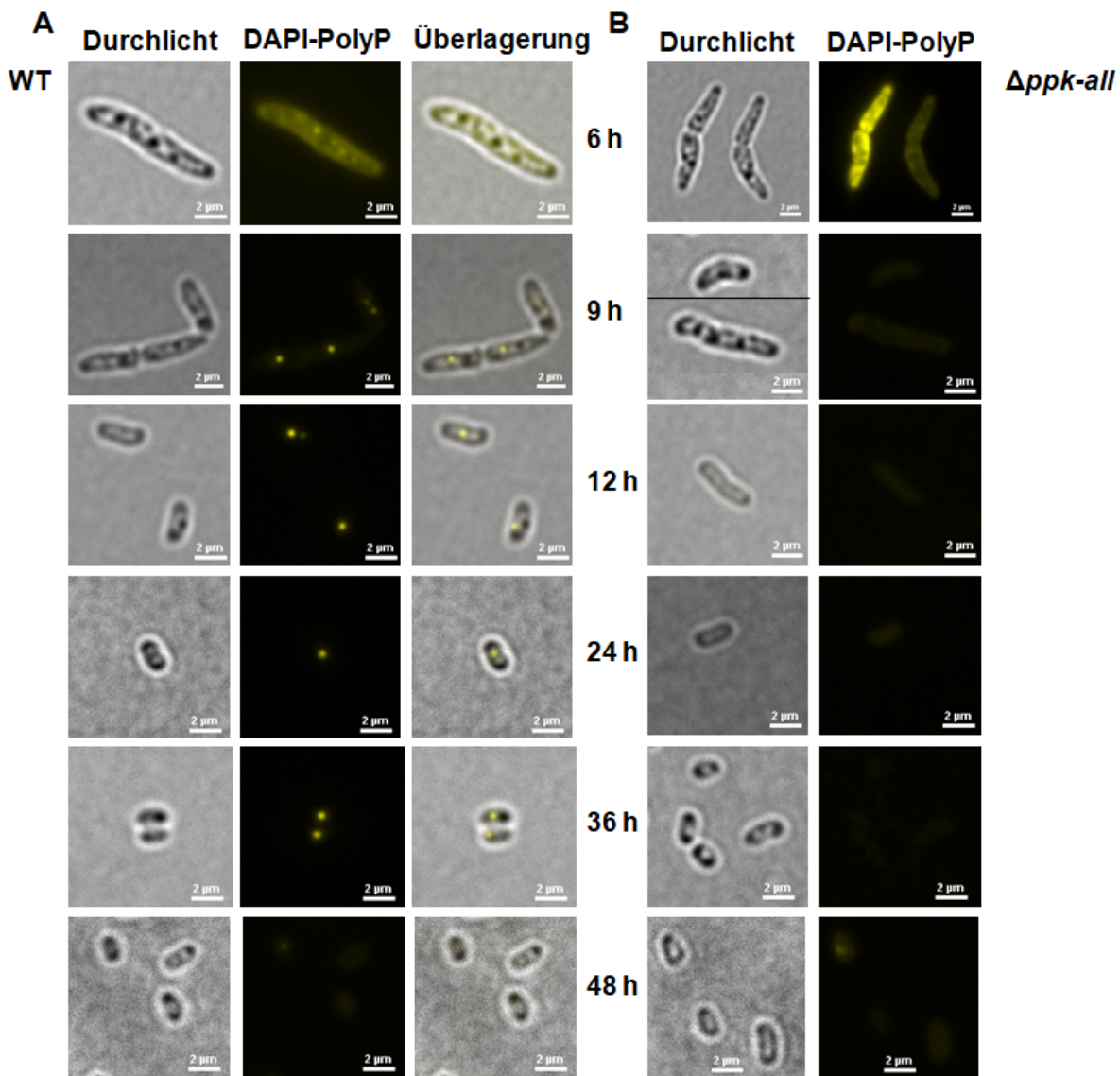


Abb. 3.2: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk-all$  Mutante in NB Medium. 10  $\mu\text{l}$  Kultur von A) *R. eutropha* WT und B) der  $\Delta ppk-all$  Mutante wurden mit 5  $\mu\text{g/ml}$  DAPI für 10-15 min auf Eis inkubiert und 3  $\mu\text{l}$  gefärbte Zellen auf einem 1 % Agarosepad immobilisiert. Es wurden jeweils für den Probezeitpunkt repräsentative Zellen ausgewählt. Der Maßstab beträgt 2  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.1.1 Kultivierbarkeit von *R. eutropha* Zellen aus der stationären Phase

*R. eutropha* produzierte in der stationären Phase große Mengen PolyP. Die  $\Delta ppk-all$  Mutante ohne diese Fähigkeit zur PolyP Akkumulierung wuchs jedoch ebenso gut wie der WT.

In der stationären Phase sind Bakterien Stress ausgesetzt bedingt durch eine hohe Zelldichte, Nährstofflimitation oder Abgabe von Stoffwechselprodukten, die zu Veränderungen der Umweltbedingungen wie pH-Schwankungen führen oder toxisch wirken. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Synthese von PolyP einen Einfluss auf die Viabilität und Teil-

lungsfähigkeit der Zellen in der stationären Phase hat. Dazu wurde die Kultivierbarkeit von stationäre Phase Zellen von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk-all$  Mutante verglichen. Die Kultivierbarkeit ist bedingt durch die Viabilität der Zellen, da nur lebende Zellen sich potentiell vermehren können, und die Teilungsfähigkeit, denn es gibt Zustände, in denen Zellen zwar leben, aber nicht in der Lage sind sich zu teilen, genannt *viable-but-not-culturable* Zustand (VBNC) (Nowroth *et al.*, 2016). Somit liefert die Kultivierbarkeit mehrere Hinweise auf den physiologischen Zustand der Zellkultur. Es wurden *R. eutropha* Kulturen nach 24 h und 48 h Wachstum in NB Medium in einer 1:10 Verdünnungsreihe in 0,9 % NaCl verdünnt und auf NB-Agarplatten aufgetragen (Abb. 3.3).

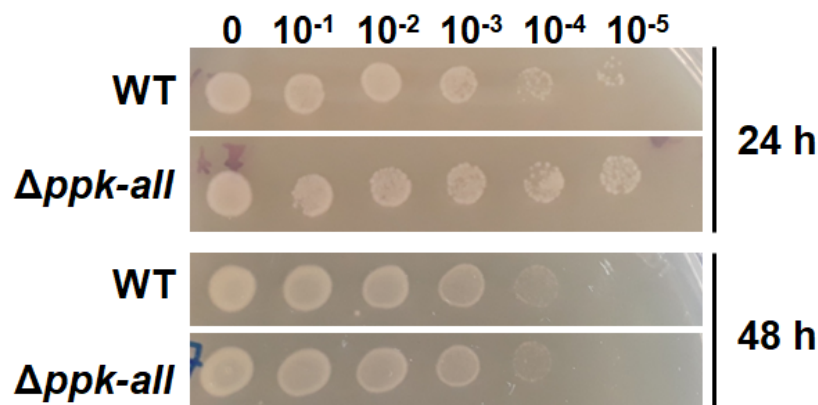


Abb. 3.3: Kultivierung von Zellen aus der stationären Phase von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk-all$  Mutante in NB Medium. Nach 24 h und 48 h Kultivierung von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk-all$  Mutante in NB bei 30 °C, 140 rpm wurde von den Kulturen eine 1:10 Verdünnungsreihe in 0,9 % NaCl hergestellt und je 2  $\mu$ l von jeder Verdünnung auf eine NB-Agarplatte getropft. Die Zellen wurden ü. N. bei 30 °C inkubiert.

Beide *R. eutropha* Stämme hatten in der mittleren stationären Phase bei  $t=24$  h koloniebildende Einheiten in der Größenordnung von  $10^5$  in 2  $\mu$ l Kultur, in der späten stationären Phase bei  $t=48$  h nur noch  $10^4$ , sie nahmen also um eine Zehnerpotenz ab, jedoch in vergleichbarem Maß in *R. eutropha* WT und der Mutante.

Zusammengefasst hatte das in der stationären Phase in NB Medium akkumulierte PolyP bei *R. eutropha* keinen Einfluss auf das allgemeine Wachstum sowie die Kultivierbarkeit, worin die Viabilität der Zellen und ihre Teilungsfähigkeit eingeschlossen ist.

### 3.1.2 PolyP Metabolismus bei Phosphatlimitierung und Phosphatmangel in *R. eutropha*

In einigen Bakterien wird PolyP als Phosphatspeicher genutzt. Im folgenden Unterkapitel wurde diese Funktion in *R. eutropha* geprüft. Dazu wurden *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk-all$  Mutante in Tris-gepuffertem Mineralsalzmedium (Tris-MSM) + 0,4 % Fruktose entweder mit 0,02 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  für Wachstum unter Phosphatlimitierung oder ohne zu-

gesetztes Phosphat für Wachstum bei Phosphatmangel kultiviert. In der NB Vorkultur akkumulierte *R. eutropha* WT PolyP, sodass dieser Stamm mit PolyP-haltigen Zellen in die Phosphatmangelversuche startete und sich in diesem Aspekt von der  $\Delta ppk$ -all Mutante unterschied. Um einen Übertrag von Phosphat aus dem NB Medium in das Tris-MSM der Hauptkultur zu minimieren, wurde vor dem Animpfen der Hauptkultur ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurde die Vorkultur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Tris-MSM resuspendiert und damit die Hauptkultur angeimpft. Das Wachstum der beiden Stämme wurde spektrophotometrisch verfolgt und der PolyP Gehalt der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten mittels colorimetrischer Assays quantifiziert.

### 3.1.2.1 Wachstum und PolyP Metabolismus bei Phosphatlimitierung

Das Wachstum von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk$ -all Mutante in Tris-MSM unter Phosphatlimitierung mit 0,02 % Phosphat ist in Abb. 3.4 dargestellt.

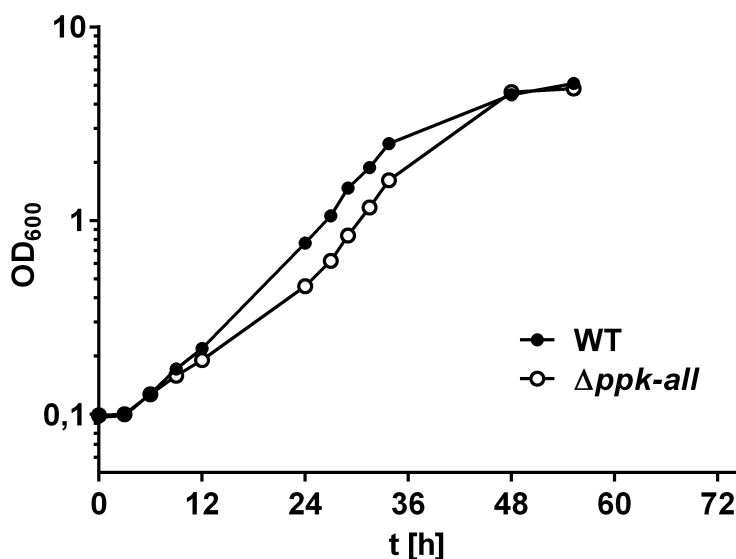


Abb. 3.4: Wachstum von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk$ -all Mutante in Tris-MSM + 0,4 % Fruktose + 0,02 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Es wurden zwei aufeinanderfolgende ü. N. Vorkulturen von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk$ -all Mutante in NB angeimpft, die zweite Vorkultur wurde zentrifugiert bei 5000 rpm, 8 min, 16 °C und das Pellet in Tris-MSM resuspendiert. Mit dieser Zellsuspension wurden 100 ml Tris-MSM + 0,4 % Fruktose + 0,02 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 500 ml Erlenmeyerkolben auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,1 eingestellt und bei 30 °C, 140 rpm kultiviert. Dargestellt ist ein einzelner Versuch.

Im Gegensatz zum Wachstum in NB Medium (Abb. 3.1) befanden sich die Zellen in Tris-MSM mit 0,02 % Phosphat für etwa 3 h in einer lag-Phase, um ihren Stoffwechsel auf das aminosäurefreie MSM umzustellen. In der anschließenden exponentiellen Phase



wuchs der WT zwischen 12 h und 24 h etwas schneller als die  $\Delta ppk-all$  Mutante und ging ab  $t=36$  h in die stationäre Phase über. Die  $\Delta ppk-all$  Mutante folgte etwas später in die stationäre Phase, erreichte aber bis  $t=48$  h die gleiche  $OD_{600}$  von rund 4,5 wie der WT. Hier zeigte sich erstmals ein geringfügiger Wachstumsnachteil der  $\Delta ppk-all$  Mutante gegenüber dem WT. In drei biologischen Replikaten wurde das verzögerte Wachstum der  $\Delta ppk-all$  Mutante festgestellt, die absoluten Werte der OD-Messungen variierten in der Höhe der maximalen  $OD_{600}$  und dem Zeitraum der exponentiellen Phase.

Daraufhin wurde geklärt, ob Phosphat der limitierende Nährstoff für das Wachstum in Tris-MSM + 0,4 % Fruktose + 0,02 %  $KH_2PO_4$  war und somit verantwortlich für den Phänotyp der  $\Delta ppk-all$  Mutante und den PolyP Verlust. Die Kulturen wurden wiederum bis zum Beginn der stationären Phase bei  $t=48$  h inkubiert, dann jeweils die Hälfte der Kultur in einen frischen Erlenmeyerkolben überführt und entweder mit 0,02 %  $KH_2PO_4$  oder 0,4 % Fruktose supplementiert für die weitere Kultivierung.

Die Messwerte des Wachstums von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk-all$  Mutante in Tris-MSM mit zusätzlichem Phosphat oder zusätzlicher Fruktose nach 48 h Inkubation sind Tab. 3.1 zu entnehmen. Die gesamten Wachstumskurven sind in Abb. Anhang 5.1 abgebildet.

Tab. 3.1:  $OD_{600}$  von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk-all$  Mutante in Tris-MSM + 0,4 % Fruktose + 0,02 %  $KH_2PO_4$  vor (48 h) Zugabe und nach (146 h) Zugabe von zusätzlichen 0,02 %  $KH_2PO_4$  (+ $P_i$ ) oder 0,4 % Fruktose (+Frk)

| t [h] | WT+ $P_i$ | WT+Frk | $\Delta ppk-all+P_i$ | $\Delta ppk-all+Frk$ |
|-------|-----------|--------|----------------------|----------------------|
| 48    | 3,02      |        | 2,95                 |                      |
| 146   | 8,05      | 6,34   | 7,59                 | 5,62                 |

Sowohl der Phosphat- als auch der Fruktosezusatz bewirkte eine Steigerung der  $OD_{600}$ . Die Zusätze regten das Wachstum der beiden Stämme wieder an, wobei die Phosphat-Supplementierung ein stärkeres Wachstum hervorrief. Darüber hinaus kann der Zusatz, insbesondere von Fruktose, auch die PHB-Produktion angeregt haben, was ebenfalls in einer Erhöhung der  $OD_{600}$  resultiert. Der WT erreichte mit beiden Zusätzen eine höhere  $OD_{600}$  als die  $\Delta ppk-all$  Mutante. Daraus lässt sich schließen, dass sowohl Phosphat als auch die C-Quelle Fruktose im Tris-MSM limitierend waren, jedoch konnte *R. eutropha* mit zusätzlicher Phosphatgabe länger wachsen als mit zusätzlicher C-Quelle.

Um zu testen, ob die Fähigkeit, PolyP zu speichern, bei dem Wachstumsdefizit eine Rolle spielt, wurde der PolyP Gehalt in den Zellen im Verlauf des Wachstums gemessen (Abb.3.5).

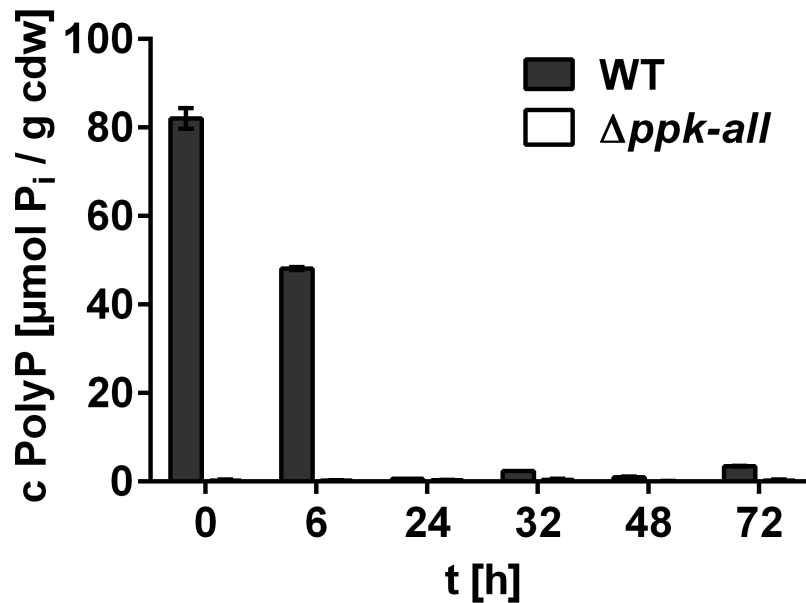


Abb. 3.5: PolyP Gehalt von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk$ -all Mutante in Tris-MSM + 0,4 % Fruktose + 0,02 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Es wurden zwei aufeinanderfolgende ü.N. Vorkulturen von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk$ -all Mutante in NB angeimpft, die zweite Vorkultur wurde zentrifugiert bei 5000 rpm, 8 min, 16 °C und das Pellet in Tris-MSM resuspendiert. Mit dieser Zellsuspension wurden 100 ml Tris-MSM + 0,4 % Fruktose + 0,02 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 500 ml Erlenmeyerkolben auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,1 eingestellt und bei 30 °C, 140 rpm kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 50-100 ml Kultur geerntet. Aus den lyophilisierten Zellpellets wurde PolyP mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert und enzymatisch mit ScPPX verdaut. Der Phosphatgehalt in Form von Monophosphat wurde mittels Malachitgrün-Assay colorimetrisch ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus einem Versuch mit je drei technischen Replikaten.

Der PolyP Gehalt der *R. eutropha* WT Zellen von  $80 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  bei  $t_0$  aus der NB Vorkultur wurde innerhalb von 24 h verbraucht analog zur PolyP Mobilisation in NB Medium in der exponentiellen Phase. Im gleichen Zeitraum war das Wachstum des WT stärker als bei der Mutante. Aus diesem Befund kann man schließen, dass *R. eutropha* WT unter phosphatlimitierenden Bedingungen durch PolyP als Speicherpolymer einen Wachstumsvorteil hat, weil er zusätzlich auf eigene Phosphatreserven zurückgreifen konnte, während die  $\Delta ppk$ -all Mutante ausschließlich auf das begrenzt vorhandene Phosphat aus der Umgebung angewiesen war. In der stationären Phase bei  $t=48$  h bzw.  $t=72$  h akkumulierte der WT kein PolyP, vermutlich, weil hierfür kein Phosphat zur Verfügung stand.

### 3.1.2.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *R. eutropha* bei Phosphatlimitierung

Zusätzlich wurde das PolyP in *R. eutropha* zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums mit DAPI gefärbt und die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie auf ihre Morphologie und PolyP-DAPI-Fluoreszenz untersucht.

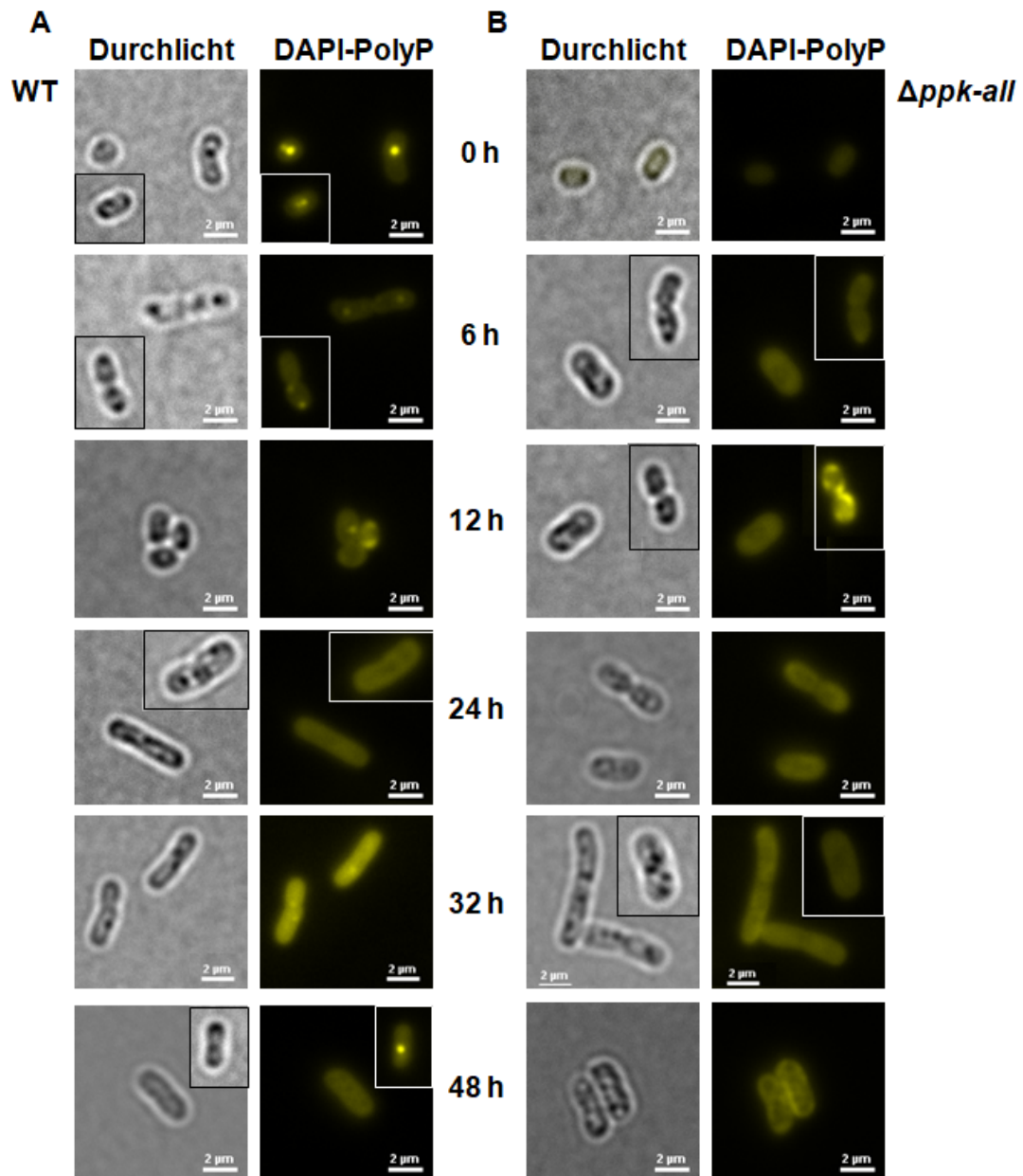


Abb. 3.6: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk-all$  Mutante in Tris-MSM + 0,4 % Fruktose + 0,02 %  $KH_2PO_4$ . 10  $\mu$ l Kultur von A) *R. eutropha* WT und B) der  $\Delta ppk-all$  Mutante wurden mit 5  $\mu$ g/ml DAPI für 10-15 min auf Eis inkubiert und 3  $\mu$ l gefärbte Zellen auf einem 1 % Agarosepad immobilisiert. Es wurden jeweils für den Probezeitpunkt repräsentative Zellen ausgewählt, wenn nicht anders im Text beschrieben. Der Maßstab beträgt 2  $\mu$ m.

Wie Abb. 3.6 zeigt, hatte der *R. eutropha* WT zu Beginn des Wachstumsversuchs meist ein PolyP Granulum pro Zelle. Ab  $t=24$  h waren nur noch PolyP-freie Zellen zu finden. Die in  $t=48$  h abgebildete Zelle mit PolyP Granulum stellte eine Ausnahme dar. Da diese spezielle Zelle zudem etwas kürzer und schmaler war als die anderen Zellen, ist zu vermuten, dass die dargestellte Zelle seit der frühen Wachstumsphase metabolisch inaktiv oder tot war und deshalb kein PolyP abgebaut wurde. Allgemein entwickelten sich die Zellen von kurzen Stäbchen zu Beginn des Versuchs zu langen Stäbchen in der exponentiellen Wachstumsphase und verkürzten sich wieder in der stationären Phase, was ein typisches Wachstumsverhalten bei *R. eutropha* darstellt. Das Wachstum der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante war gleich gestaltet, jedoch wurden zu keinem Zeitpunkt PolyP Granula detektiert.

### 3.1.2.3 Wachstum und PolyP Metabolismus von *R. eutropha* bei Phosphatmangel

Nachdem die *R. eutropha*  $\Delta ppk$ -*all* Mutante in Tris-MSM mit Phosphatlimitierung ein geringfügiges Wachstumsdefizit zeigte, wurde untersucht, wie sich die Mutante bei Kultivierung unter Phosphatmangel in Tris-MSM ohne zugesetztes Phosphat verhält. Um sicherzugehen, dass die C-Quelle nicht limitierend war, wurde der Fruktoseanteil im Tris-MSM auf 0,8 % verdoppelt.

*R. eutropha* wuchs auch in Tris-MSM ohne Phosphatzusatz (Abb. 3.7), jedoch deutlich vermindert im Vergleich zum Wachstum mit 0,02 % Phosphat (Abb. 3.4). In der WT Kultur stieg die  $OD_{600}$  in den ersten 24 h am stärksten und nahm dann nur noch langsam zu, während die  $\Delta ppk$ -*all* Mutante bereits nach 12 h das Wachstum stark reduzierte. Sie hatte über den gesamten Messzeitraum eine geringere  $OD_{600}$  mit einer finalen  $OD_{600}$  bei  $t=144$  h von 0,64 zu 1,04 im WT. Das Wachstumsdefizit der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante wurde in drei biologischen Replikaten nachgewiesen, die absoluten Werte der OD-Messungen variierten in der Höhe der maximalen  $OD_{600}$ .

In diesem Phosphatmangelmedium wurde ein deutlicher Wachstumsnachteil der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante sichtbar. Eine Zugabe von 0,02 %  $KH_2PO_4$  nach 144 h, als beide Stämme lange in der stationären Phase waren, führte zu raschem Wiedereinstieg ins Wachstum bei beiden Stämmen. Dies beweist, dass Phosphat der für das Wachstum limitierende Nährstoff war und frisches Phosphat aus der Umgebung auch nach längerer Hungerphase von beiden Stämmen aufgenommen und in erneutes Wachstum investiert wurde.

Die OD-Messung wird in der Mikrobiologie häufig zur Verfolgung des Wachstums einer Kultur verwendet. Die OD wird durch mehrere Faktoren beeinflusst, wie z.B. die Größe der Zellen, die Anzahl der Zellen, aber auch die Anwesenheit intrazellulärer PHB Granula erhöht die OD. Zum Zeitpunkt  $t=72$  h wurde die Zelldichte der Kulturen mittels Neubauerzählkammer bestimmt (siehe Tab. 3.2). Es wurden jeweils sechzehn Quadrate von

zwei technischen Replikaten ausgezählt und damit die Zelldichte in der Kultur berechnet. Tatsächlich war die Zellzahl pro ml Kultur in *R. eutropha*  $\Delta ppk$ -all Mutante um 23 % niedriger als im WT. Somit korrelierte die geringere OD<sub>600</sub> der  $\Delta ppk$ -all Mutante mit einer geringeren Zelldichte.

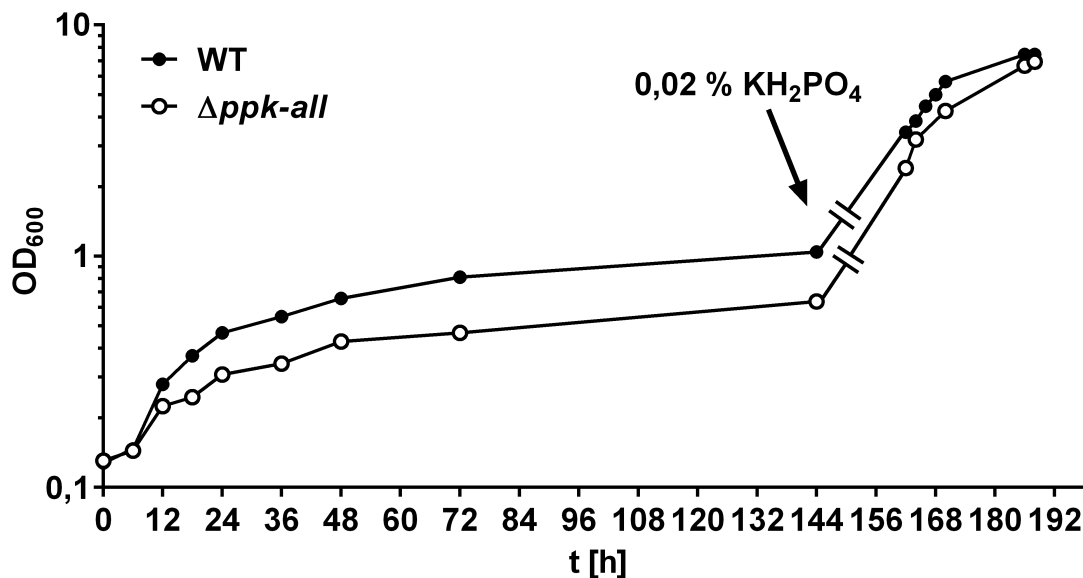


Abb. 3.7: Wachstum von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk$ -all Mutante in Tris-MSM + 0,8 % Fruktose ohne Phosphatzusatz. Es wurden zwei aufeinanderfolgende ü. N. Vorkulturen von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk$ -all Mutante in NB angeimpft, die zweite Vorkultur wurde zentrifugiert bei 5000 rpm, 8 min, 16 °C und das Pellet in Tris-MSM resuspendiert. Mit dieser Zellsuspension wurden 200 ml Tris-MSM + 0,8 % Fruktose in 1 l Erlenmeyerkolben auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt und bei 30 °C, 150 rpm kultiviert. Dargestellt ist ein einzelner Versuch.

Tab. 3.2: Vergleich der Zelldichte in den Kulturen von *R. eutropha* WT und  $\Delta ppk$ -all in Tris-MSM ohne Phosphat nach 72 h.

| Stamm             | n Zellen / ml                         |
|-------------------|---------------------------------------|
| WT                | $1,33 \cdot 10^8 \pm 2,88 \cdot 10^5$ |
| $\Delta ppk$ -all | $1,02 \cdot 10^8 \pm 3,75 \cdot 10^5$ |

Es blieb die Frage, ob die  $\Delta ppk$ -all Mutante ohne die Fähigkeit PolyP zu speichern auch ein quantifizierbares Defizit beim erneuten Anwachsen hat. Um dies zu klären, wurden *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk$ -all Mutante nach 144 h Inkubation bei Phosphatmangel in frisches NB Medium überimpft, auf eine Start-OD<sub>600</sub> von 0,1, sodass in beiden Kulturen etwa gleich viele Zellen vorlagen. Das Wachstum der phosphatgehungerten *R. eutropha* Zellen in NB Medium ist in Abb. 3.8 dargestellt und zeigt, dass beide Stämme im Gegensatz

zu Zellen aus einer NB Vorkultur eine lag-Phase von 4 h hatten und danach gleich schnell wuchsen. Das vergleichbare Wachstum phosphatgehungerter *R. eutropha* Kulturen in NB Medium wurde in zwei biologischen Replikaten nachgewiesen mit leichten Unterschieden der absoluten OD<sub>600</sub> Werte.

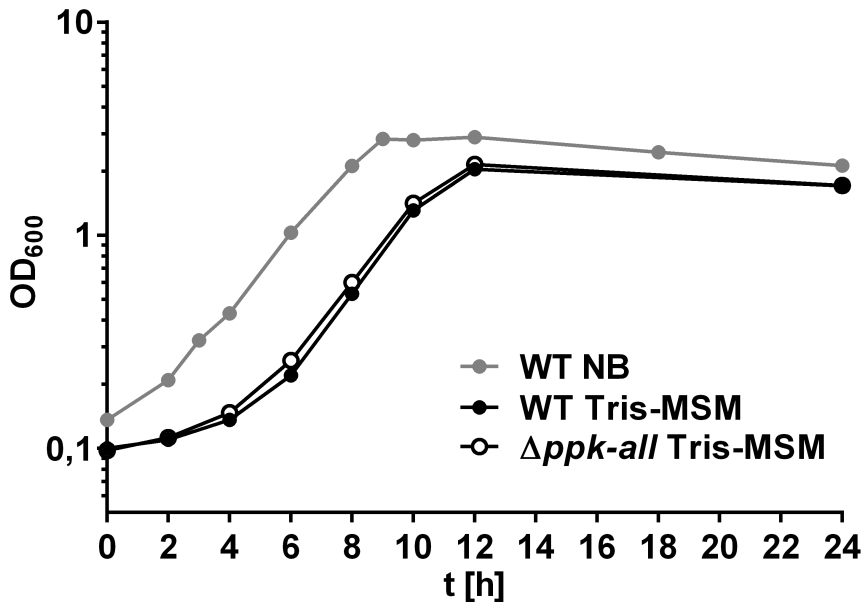


Abb. 3.8: Wachstum von *R. eutropha* WT und  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante in NB Medium nach 144 h Kultivierung unter Phosphatmangel. Nachdem *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante für 144 h in Tris-MSM + 0,4 % Fruktose kultiviert worden waren, wurden 20 ml NB Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben mit diesen Kulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 30 °C, 150 rpm kultiviert. Dargestellt ist ein einzelner Versuch.

Einerseits bedeutet dies, dass in beiden phosphatgehungernten Kulturen ähnlich viele lebende und noch teilungsfähige Zellen vorlagen. Andererseits deutet es darauf hin, dass sowohl *R. eutropha* WT als auch die  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante aus der Umgebung aufgenommene Phosphat direkt für Wachstumsprozesse einsetzten.

Um das Wachstumsverhalten von *R. eutropha* unter Phosphatmangel in Verbindung zu setzen mit dem PolyP Metabolismus, wurde der PolyP Gehalt während des Wachstums in Tris-MSM ohne Phosphat sowie bei erneuter Verfügbarkeit von Phosphat nach längerem Phosphatmangel quantifiziert.

In Abb. 3.9 A und B sind zwei biologische Replikate der PolyP Quantifizierung aus unterschiedlichen Wachstumsversuchen zu sehen. Es wurde deutlich, dass wie bei Phosphatlimitierung (Abb. 3.5) das PolyP in *R. eutropha* WT aus der NB Vorkultur innerhalb von 24 h aufgebraucht wurde. Zeitgleich zur Erschöpfung des PolyP Gehalts kam auch das Wachstum in *R. eutropha* WT zum Erliegen, während die PolyP-freie  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante schon früher ihr Wachstum einstellen musste. Dies spricht dafür, dass PolyP als

Phosphatspeicher dient, der bei Phosphatmangel konsumiert wird und das Zellwachstum positiv beeinflusst. Des Weiteren zeigte sich, dass *R. eutropha* WT auch bei Zugabe von Phosphat ins Medium (Abb.3.9 A) keinen Phosphatspeicher anlegte, weder in der exponentiellen Phase 22 h nach Phosphatzugabe (t=166 h) noch bei Eintritt in die stationäre Phase nach 48 h (t=192 h).

In den beiden biologischen Replikaten lagen unterschiedliche Startbedingungen bezüglich des PolyP Gehaltes vor, weshalb eine Mittelwertbildung nicht sinnvoll war. In Versuch A starteten die *R. eutropha* WT Zellen mit  $82 \pm 2 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$ , während in Versuch B nur  $59 \pm 4 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  aus der Vorkultur vorlagen. Trotz dieser Unterschiede an Phosphatspeicher wurde das gesamte PolyP innerhalb von 24 h verbraucht. In Kultur A wurde PolyP in den ersten 12 h linear abgebaut mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von  $4,5 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{h}\cdot\text{g cdw}}$  (R=0,9967), anschließend verlangsamte sich der Abbau etwas. In Versuch B dagegen war der PolyP Abbau über 24 h hinweg linear mit einer geringeren Abbaurrate von  $2,4 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{h}\cdot\text{g cdw}}$  (R=0,9892).

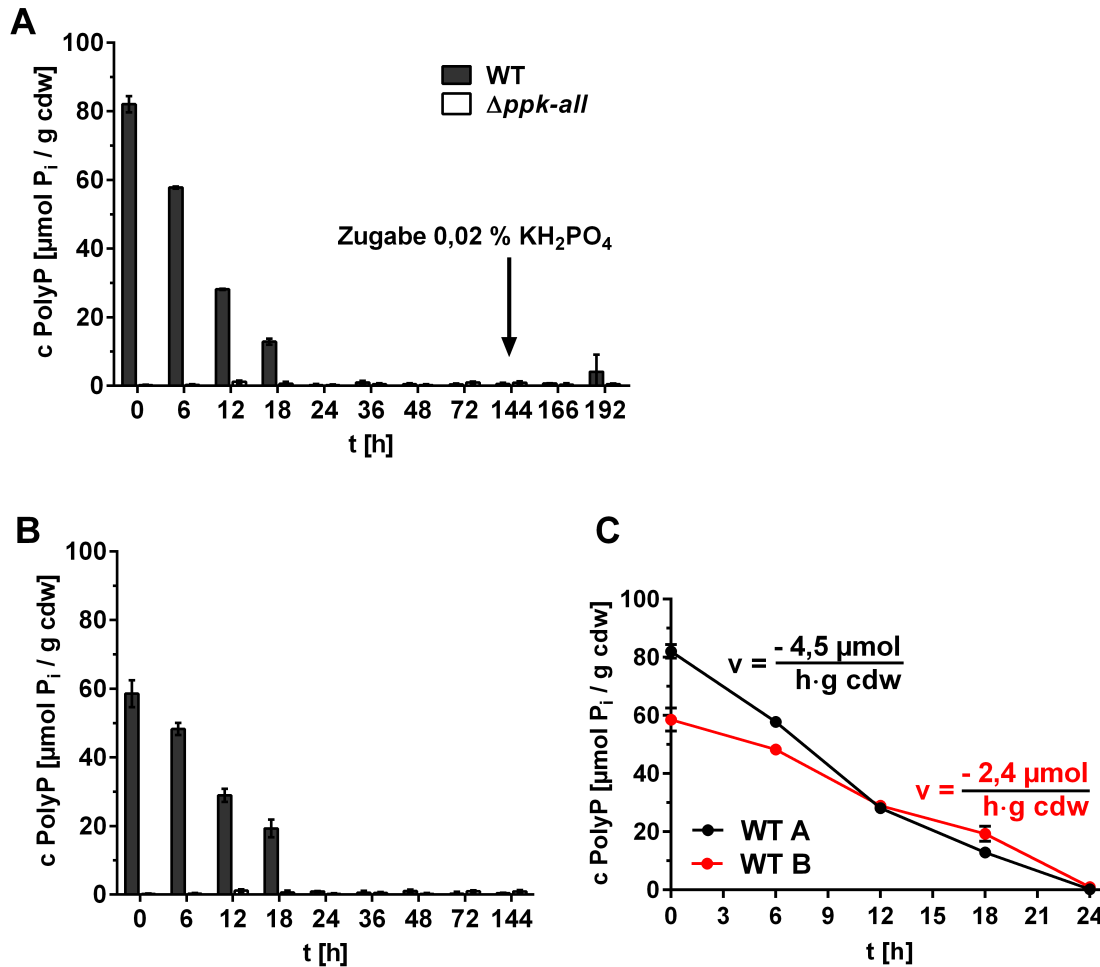


Abb. 3.9: PolyP Gehalt von *R. eutropha* WT und  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante in Tris-MSM + 0,8 % Fruktose ohne Phosphatzusatz. Es wurden zwei aufeinanderfolgende ü. N. Vorkulturen von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante in NB angeimpft, die zweite Vorkultur wurde zentrifugiert bei 5000 rpm, 8 min, 16 °C und das Pellet in Tris-MSM resuspendiert. Mit dieser Zellsuspension wurden 200 ml Tris-MSM + 0,8 % Fruktose in 1 l Erlenmeyerkolben auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt und bei 30 °C, 150 rpm kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 200 ml Kultur (6-144 h) bzw. 50 ml Kultur (0 h, 166 h, 192 h) geerntet. Nach 144 h wurde die Kultur mit 0,02 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> supplementiert. Die Zeitpunkte 166 h und 192 h stellen den PolyP Gehalt in der exponentiellen Phase bzw. zu Beginn der stationären Phase nach Phosphatzugabe dar. Aus den lyophilisierten Zellpellets wurde PolyP mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert und enzymatisch mit ScPPX verdaut. Der Phosphatgehalt in Form von Monophosphat wurde mittels Malachitgrün-Assay colorimetrisch ermittelt. Dargestellt sind A) biologisches Replik 1 und B) biologisches Replik 2, jeweils der Mittelwert aus einem Versuch mit je drei technischen Replikaten. C) Vergleich der der Abbaugeschwindigkeit von PolyP der Versuche in A) und B).



### 3.1.2.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *R. eutropha* bei Phosphatmangel

Wiederum wurden mit DAPI gefärbte Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 3.10). Sowohl für *R. eutropha* WT als auch die  $\Delta ppk-all$  Mutante galt, dass die Zellen im Verlauf der Kultivierung schrumpften. Zu Beginn des Versuchs hatten die kurzen Stäbchen des WT eine Länge von 2,4  $\mu\text{m}$ , die  $\Delta ppk-all$  Mutante 1,7-3,4  $\mu\text{m}$ , was üblich ist für Zellen in der stationären Phase der Vorkultur. Statt zu langen Stäbchen zu wachsen, nahm die Länge der Zellen weiter ab bis 1,7-1,8  $\mu\text{m}$  bei  $t=72\text{ h}$  in beiden Stämmen. Zudem nahmen sie eine ungewöhnliche, kokkoide Form an. Nichtsdestotrotz waren etliche Zellen in der Kultur noch lebendig und teilungsfähig, demonstriert durch die Wiederaufnahme des Wachstums nach Phosphatzugabe (Abb. 3.7). Eine quantitative Auswertung der DAPI-PolyP Signale der Fluoreszenzmikroskopiebilder (Abb. 3.11) ergab, dass der größte Teil der *R. eutropha* WT Zellen mit 59 % zu Beginn des Versuches ein PolyP Granulum hatten. Der Anteil an granulohaltigen Zellen in der Kultur nahm bei fortschreitender Kultivierung ab, im Einklang mit der Verringerung des quantitativ bestimmten PolyP Gehalts (Abb. 3.9) und der gezeigten Zellen der Fluoreszenzmikroskopie in Abb. 3.10. Dennoch waren selbst nach  $t=72\text{ h}$ , als das Wachstum bereits stagnierte, noch 20 % Zellen mit PolyP Granulum vorhanden. Eine quantitative Darstellung der *R. eutropha* WT Zellen in Bezug auf die Anzahl der vorhandenen PolyP Granula findet sich in Abb. 3.11. Bemerkenswert ist auch, dass bei Phosphatmangel die Granula oft an der Zellmembran lokalisiert waren und ein kleiner Anteil an Zellen drei oder vier Granula hatte. Ein Beispiel für eine derartige Granulaverteilung in einer *R. eutropha* WT Zelle ist in Abb. 3.10 bei  $t=72\text{ h}$  zu sehen. Diese DAPI-gefärbten granulären Strukturen, die später als  $t=24\text{ h}$  in den Mikroskopiebildern zu sehen waren, konnten in der PolyP Quantifizierung jedoch nicht mehr als signifikante Menge detektiert werden.

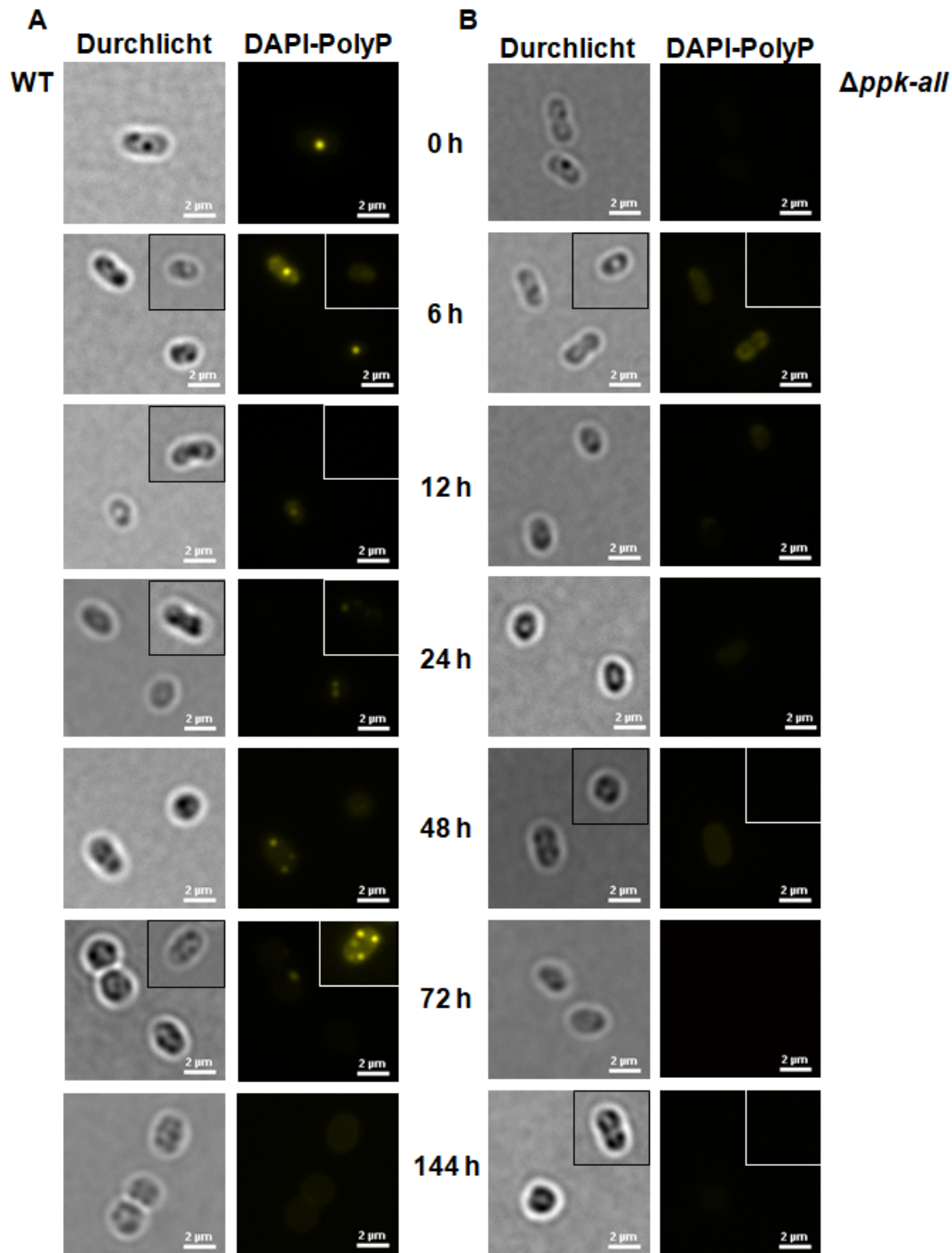


Abb. 3.10: Fluoreszenzmikroskopie von *R. eutropha* WT und  $\Delta ppk-all$  Mutante in Tris-MSM bei Kultivierung unter Phosphatmangel. 10  $\mu l$  Kultur von *R. eutropha* WT und  $\Delta ppk-all$  Mutante in Tris-MSM + 0,8 % Fruktose wurden mit 5  $\mu g/ml$  DAPI für 10-15 min auf Eis inkubiert und 3  $\mu l$  gefärbte Zellen auf einem 1 % Agarosepad immobilisiert. Gezeigt sind für jeden Zeitpunkt typische Zellen eines einzelnen Versuchs, der repräsentativ für zwei unabhängige Versuche ist, sofern im Text nicht auf Ausnahmen hingewiesen ist. Der Maßstab beträgt 2  $\mu m$ .

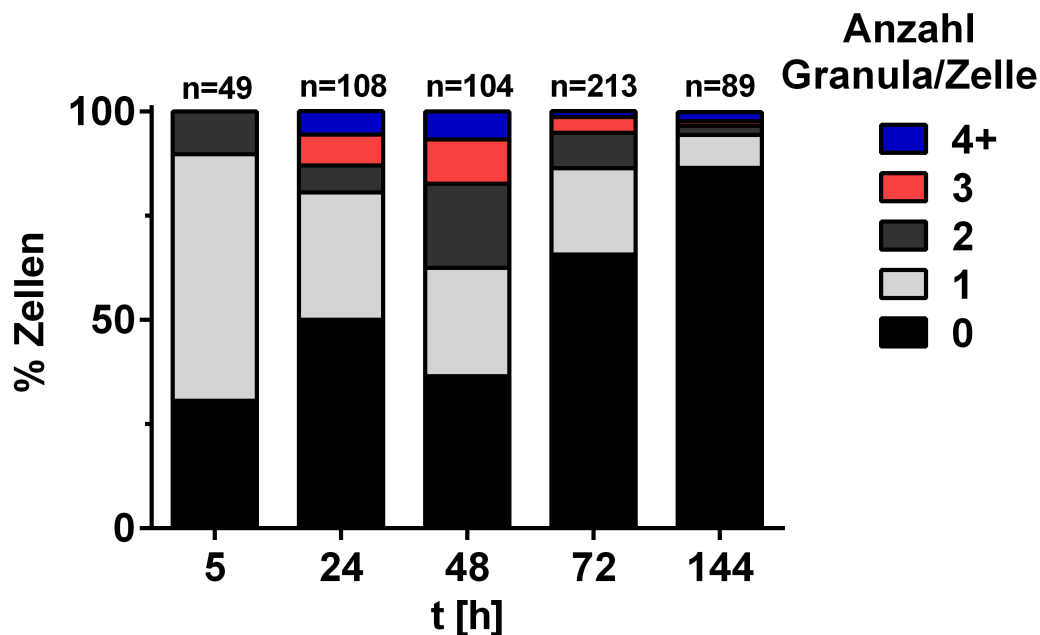


Abb. 3.11: Verteilung der Anzahl von PolyP Granula pro Zelle in *R. eutropha* WT bei Kultivierung in Tris-MSM ohne Phosphat. Die Fluoreszenzmikroskopiebilder wurden ausgewertet nach Anzahl der DAPI-gefärbten PolyP Granula in den einzelnen Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung. Dargestellt ist der Anteil an Zellen mit 0, 1, 2, 3 oder mehr (4+) Granula an der Gesamtkultur.

### 3.1.2.5 Untersuchung des PHB Stoffwechsels von *R. eutropha* bei Phosphatlimitierung und Phosphatmangel

Die Kultivierung in Tris-MSM mit ausreichender Menge an C-Quelle, aber Limitierung eines anderen wachstumsrelevanten Nährstoffs, hier Phosphat, bedingt eine Anregung der PHB Akkumulierung in *R. eutropha* (Anderson & Dawes, 1990). In früheren Arbeiten dieser Gruppe wurden bereits Hinweise gefunden, dass der PolyP und PHB Stoffwechsel zusammenhängen können (Tumlirsch *et al.*, 2015). Außerdem hat PHB einen Einfluss auf die  $OD_{600}$ , sodass eine PHB Quantifizierung der Kulturen in Tris-MSM angeraten war, um zu differenzieren, inwiefern die gemessene  $OD_{600}$  von der Zelldichte und somit dem Wachstum oder dem PHB Gehalt abhing. Zunächst wurde der PHB Gehalt in *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk-all$  Mutante in Tris-MSM mit (Abb. 3.12) und ohne (Abb. 3.13) Phosphatzusatz bestimmt.

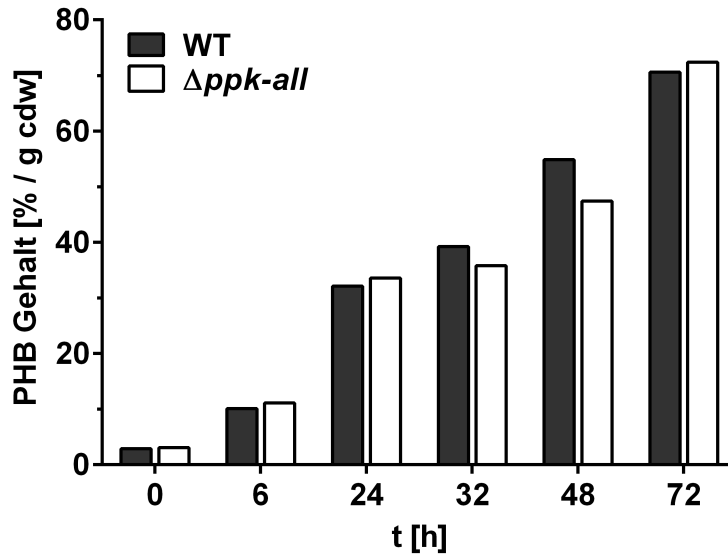


Abb. 3.12: Quantifizierung des PHB Gehalts von *R. eutropha* WT und  $\Delta ppk-all$  Mutante Kulturen in Tris-MSM + 0,4 % Fruktose + 0,02 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 50-200 ml Kultur geerntet. Das PHB in den lyophilisierten Zellen wurde mittels saurer Methanolyse in 3-Hydroxybutyrat Methylester gespalten. Die Quantifizierung erfolgte mit Gaschromatographie. Die Messwerte stellen eine Einzelmessung dar.

Der PHB Gehalt der *R. eutropha* WT und  $\Delta ppk-all$  Zellen stieg von  $3 \frac{\%PHB}{g\ cdw}$  im Verlauf der Kultivierung in Tris-MSM + 0,4 % Fruktose + 0,02 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  stetig auf bis zu rund  $70 \frac{\%PHB}{g\ cdw}$  in der stationären Phase. Die PHB Akkumulierung spricht dafür, dass genug Fruktose als C-Quelle vorhanden war, während Phosphat limitierend war, was sich mit dem Befund aus Abschnitt 3.1.2.1 deckt, dass nach Erreichen der stationären Phase Phosphatzugabe das Wachstum stärker förderte als Fruktosezugabe. Der PHB Gehalt war in der späten exponentiellen Phase bei  $t=32$  h und Eintritt in die stationäre Phase bei  $t=48$  h in der  $\Delta ppk-all$  Mutante um 8 % bzw. 15 % verringert. Dies könnte ein Hinweis sein auf einen veränderten PHB Metabolismus in der Mutante. Jedoch handelt es sich nur um eine Einzelmessung ohne Reproduktion. Außerdem war das Wachstum in der  $\Delta ppk-all$  Mutante bei  $t=32$  h leicht verzögert, was auch eine Verzögerung im PHB Aufbau bewirken kann. Generell konnte die  $\Delta ppk-all$  Mutante unter Phosphatlimitierung ebenso viel PHB aufbauen wie der WT. In Tris-MSM + 0,8 % Fruktose ohne Phosphatzusatz (Abb. 3.13) fand ebenfalls eine PHB Akkumulierung in *R. eutropha* statt. Jedoch war der PHB Gehalt verglichen mit dem der Zellen in Tris-MSM mit Phosphat reduziert, z.B. bei  $t=72$  h statt etwa  $70 \frac{\%PHB}{g\ cdw}$  mit Phosphat auf  $60 \frac{\%PHB}{g\ cdw}$  im WT bzw.  $49 \frac{\%PHB}{g\ cdw}$  in der  $\Delta ppk-all$  Mutante ohne Phosphat, obwohl mehr Fruktose als C-Quelle zur Verfügung stand.

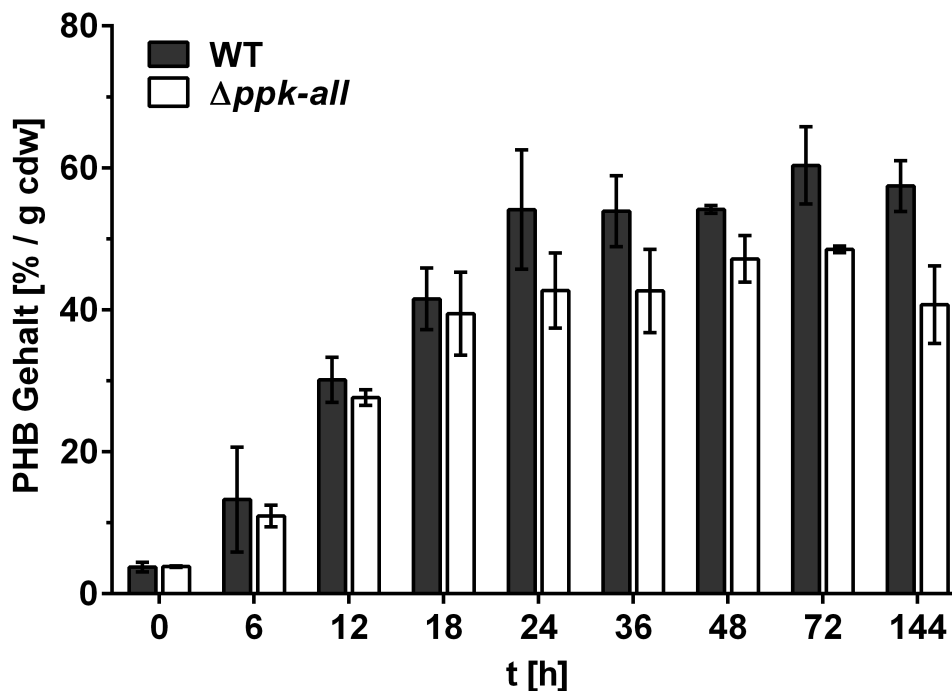


Abb. 3.13: Quantifizierung des PHB Gehalts von *R. eutropha* WT und  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante Kulturen in Tris-MSM ohne Phosphat. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 50-200 ml Kultur geerntet. Das PHB in den lyophilisierten Zellen wurde mittels saurer Methanolyse in 3-Hydroxybutyrat Methylester gespalten. Die Quantifizierung erfolgte mit Gaschromatographie. Die Messwerte stellen Mittelwerte aus biologischen Duplikaten mit SD dar.

Von  $4 \frac{\%PHB}{g\ cdw}$  steigerte sich der PHB Gehalt in beiden Stämmen bis  $t=24\ h$  auf  $54 \frac{\%PHB}{g\ cdw}$  im WT bzw.  $42 \frac{\%PHB}{g\ cdw}$  in der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante und blieb dann annähernd konstant mit leichten Schwankungen. Hier zeigte sich eine reproduzierbare Veränderung im PHB Stoffwechsel in der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante, die zwischen  $t=24\ h$  und  $t=144\ h$  zwischen 13 % und 28 % weniger PHB als der WT akkumulierte. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass ein Zusammenhang zwischen dem PolyP und PHB Stoffwechsel besteht.

### 3.1.2.6 PolyP Metabolismus in der *R. eutropha* $\Delta phaC1$ Mutante

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass PolyP-freie Zellen bei Phosphatmangel einen verringerten PHB Gehalt hatten, wurde der Zusammenhang zwischen den Stoffwechselaktivitäten der beiden Biopolymere weiter untersucht. Dazu wurde im folgenden Abschnitt die *R. eutropha*  $\Delta phaC1$  Mutante, die kein PHB produzieren kann, auf ihren PolyP Stoffwechsel untersucht.

Zunächst erfolgte die Kultivierung dieser Mutante in NB Medium. Die spektrophotometrische Messung des Wachstums der *R. eutropha*  $\Delta phaC1$  Mutante in NB Medium ist in

Abb. 3.14 dargestellt und zeigt, dass die Mutante ein ähnliches Wachstumsverhalten hatte wie der WT. Sie erreichte in diesem Versuch nach 8 h die stationäre Phase und damit etwa 1 h früher als der WT. Außerdem war ihre  $OD_{600}$  ab der stationären Phase geringfügig niedriger als beim WT.

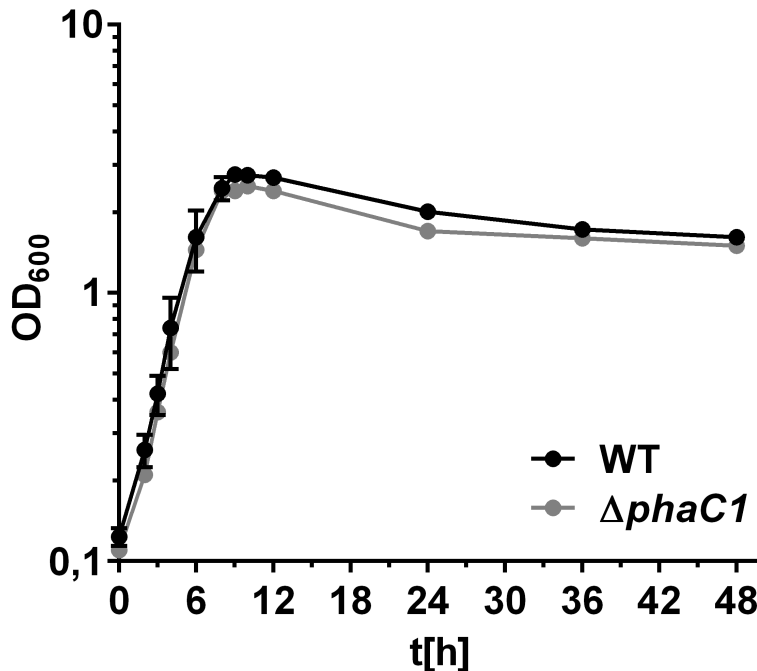


Abb. 3.14: Wachstum von *R. eutropha* WT und der  $\Delta phaC1$  Mutante in NB Medium. 50 ml NB Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben wurden mit 2,5 ml ü. N. Vorkultur von *R. eutropha* WT (schwarz) und der  $\Delta phaC1$  Mutant (grau) angeimpft und bei 30 °C, 140 rpm inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die  $OD_{600}$  über einen Zeitraum von 48 h gemessen. Gezeigt ist eine Einzelmessung mit technischen Duplikaten der  $\Delta phaC1$  Mutante und der Mittelwert mit SD eines biologischen Duplikates mit technischen Duplikaten beim WT.

Die Quantifizierung des PolyP Gehalts der *R. eutropha*  $\Delta phaC1$  Mutante (Abb.3.15) ergab, dass die Mutante wie der WT PolyP aus der Vorkultur in der exponentiellen Phase abbaute und in der stationären Phase neues PolyP akkumulierte. Da der Eintritt in die stationäre Phase schon nach 8 h erfolgte, in der Grafik markiert mit einem Pfeil, war auch schon bei  $t=9$  h ein Anstieg des PolyP Gehalts messbar, während dieser beim WT erst bei  $t=12$  h verzeichnet wurde nach Eintritt in die stationäre Phase bei  $t=9$  h. Die Mutante baute PolyP bis zu einem Maximum von  $90 \pm 5 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{h}\cdot\text{g cdw}}$  bei  $t=24$  h auf und verringerte bis  $t=30$  h ihren PolyP Speicher auf  $26 \pm 17 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{h}\cdot\text{g cdw}}$ . Dieser Wert blieb dann konstant. Der WT dagegen baute deutlich länger PolyP auf bis zu einem Maximum von  $191 \pm 36 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{h}\cdot\text{g cdw}}$ , bevor der Abbau startete. Somit hatte die *R. eutropha*  $\Delta phaC1$  Mutante in

NB eine kürzere Zeitspanne zur Synthese von PolyP in der stationären Phase und baute insgesamt weniger PolyP auf als der WT.

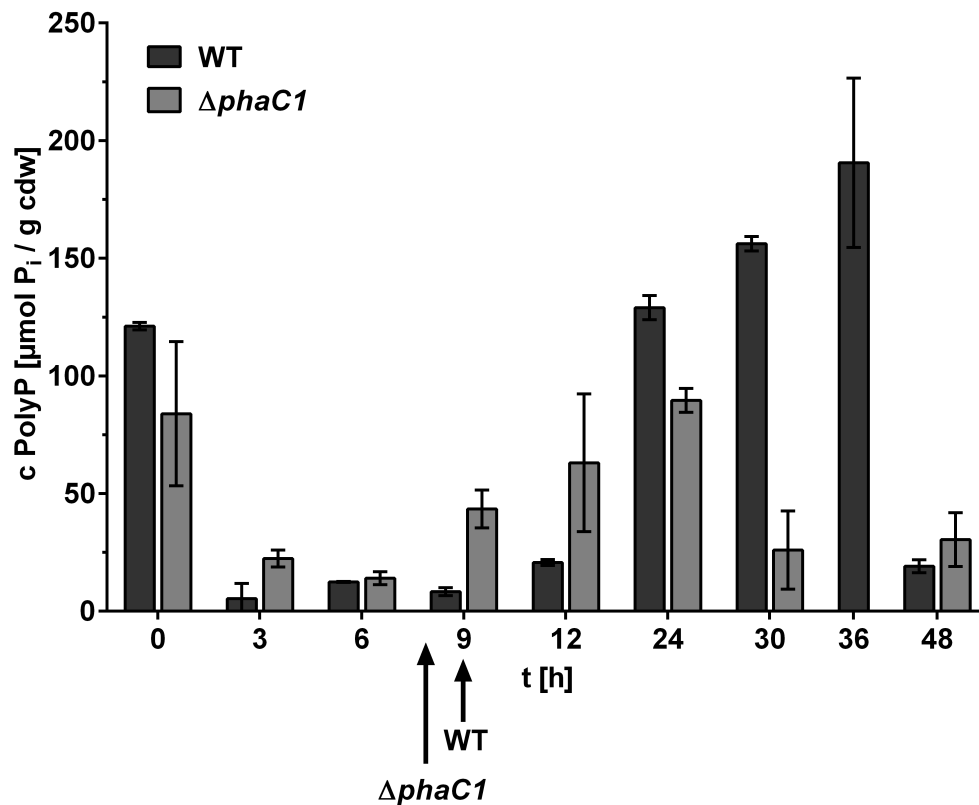


Abb. 3.15: PolyP Gehalt von *R. eutropha* WT und  $\Delta phaC1$  in NB Medium. Für jeden Probezeitpunkt wurden 50 ml NB Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 2,5 ml ü. N. Vorkultur angeimpft und bei 30 °C, 140 rpm inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 50 ml Kultur geerntet. Aus den lyophilisierten Zellpellets wurde PolyP mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert und enzymatisch mit ScPPX verdaut. Der Phosphatgehalt in Form von Monophosphat wurde mittels Sb-Ascorbatassay colorimetrisch ermittelt. Mit Pfeilen ist für beide Stämme der jeweilige Eintrittszeitpunkt in die stationäre Phase markiert. Gezeigt sind Mittelwerte mit SD aus biologischen Duplikaten mit je drei technischen Triplikaten.

Daraufhin wurde untersucht, wie sich die *R. eutropha*  $\Delta phaC1$  Mutante bei Phosphatlimitierung oder Phosphatmangel im Wachstum und PolyP Stoffwechsel verhielt.

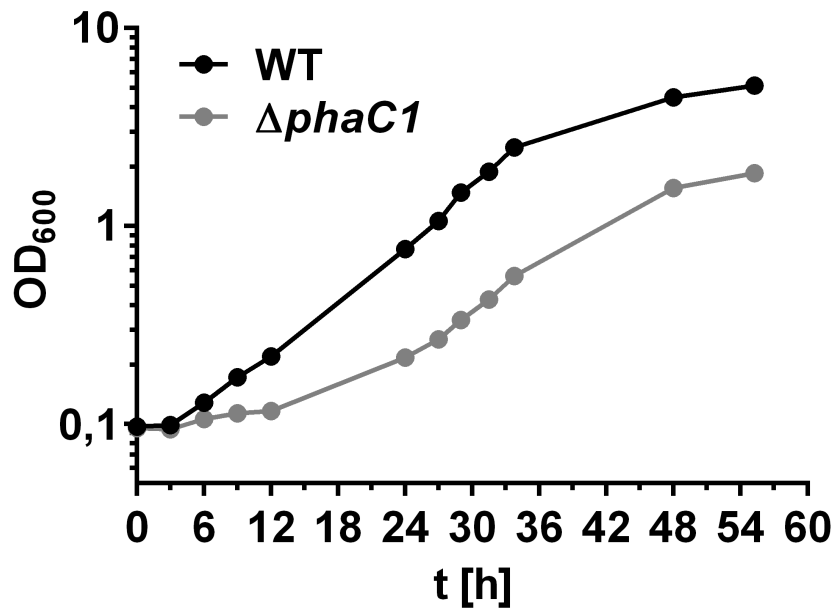


Abb. 3.16: Wachstum von *R. eutropha* WT und  $\Delta phaC1$  in Tris-MSM mit Phosphat. 100 ml Tris-MSM + 0,4 % Fruktose + 0,02 %  $KH_2PO_4$  in 500 ml Erlenmeyerkolben wurden mit *R. eutropha* WT oder  $\Delta phaC1$  aus einer ü.N. NB Vorkultur mit Mediumwechsel auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 angeimpft und bei 30 °C, 150 rpm kultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte technischer Duplikate eines einzelnen Versuchs.

Wie aus Abb. 3.16 ersichtlich, blieb die *R. eutropha*  $\Delta phaC1$  Mutante bei Wachstum in Tris-MSM + 0,4% Fruktose + 0,02 % Phosphat für 12 h in einer lag-Phase und benötigte etwa viermal so lang für das Anwachsen im neuen Medium wie der WT. Insgesamt stieg die OD langsamer und erreichte schon bei einer niedrigen  $OD_{600}$  von 1,85 die stationäre Phase im Gegensatz zum WT mit einer  $OD_{600}$  von 5,12. Hier muss berücksichtigt werden, dass der hohe Anteil an PHB von 70 % im WT einen Teil der Gesamt-OD ausmachte, während bei der  $\Delta phaC1$  Mutante ausschließlich die Zelldichte und Zellgröße die OD ausmachte. Somit sind die Werte für das Wachstum nicht exakt vergleichbar. Die  $\Delta phaC1$  Mutante wuchs in Tris-MSM + 0,4% Fruktose + 0,02 % Phosphat schlechter als der WT. Die Quantifizierung des PolyP Gehalts (Abb. 3.17) deckte auf, dass die  $\Delta phaC1$  Mutante ihren PolyP Speicher in den ersten 6 h der Kultivierung nicht mobilisierte, während der WT seinen Speicher bereits in den ersten 6 h auf etwa die Hälfte reduzierte. Erst ab  $t=24$  h war in der Mutante eine Reduktion des PolyPs messbar, jedoch wurden in der  $\Delta phaC1$  Mutante das PolyP selbst bis zum Eintritt in die stationäre Phase nicht vollständig mobilisiert, während der WT bereits bei  $t=24$  h kein detektierbares PolyP mehr enthielt. Ungewöhnlich war bei der  $\Delta phaC1$ , dass bei Phosphatlimitierung der interne Phosphatspeicher nur teilweise mobilisiert wurde und somit das Wachstumspotential nicht ausgeschöpft wurde.



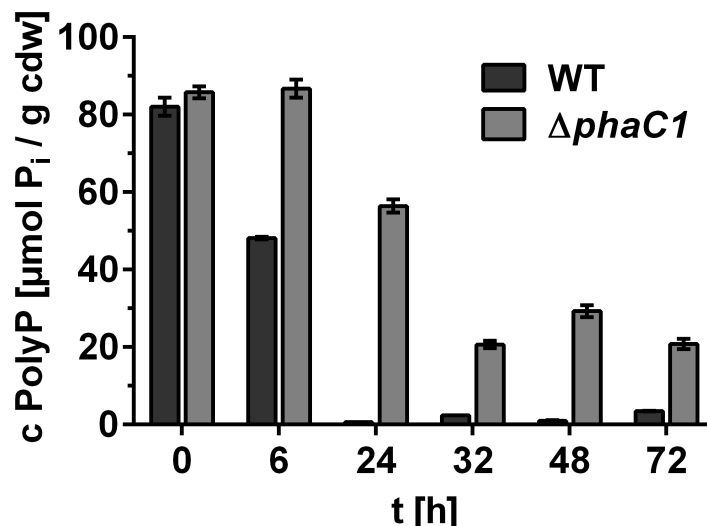


Abb. 3.17: PolyP Quantifizierung von *R. eutropha* WT und  $\Delta phaC1$  in Tris-MSM mit Phosphat. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 50-100 ml *R. eutropha* WT oder  $\Delta phaC1$  Kultur in Tris-MSM + 0,4 % Fruktose + 0,02 %  $KH_2PO_4$  geerntet. Die Quantifizierung des Monophosphats nach enzymatischem Verdau des isolierten PolyPs erfolgte mittels Malachitgrün Assay. Dargestellt sind Mittelwert und SD eines Versuchs mit drei technischen Replikaten.

Unter Phosphatmangelbedingungen in Tris-MSM + 0,8 % Fruktose ohne Phosphatzusatz zeigte sich ein ähnlicher Phänotyp der  $\Delta phaC1$  Mutante wie bei Phosphatlimitierung. Das Wachstum (Abb. 3.18) war sehr gering, die  $OD_{600}$  blieb noch hinter der der  $\Delta ppk-all$  Mutante zurück. Dies mag wiederum dem Umstand geschuldet sein, dass die  $\Delta ppk-all$  Mutante bis zu  $45 \frac{\% PHB}{g\ cdw}$  aufbaute (siehe Abb. 3.13) und somit die  $OD$  zusätzlich erhöhte. Bei Zugabe von 0,02 % Phosphat nach 248 h Kultivierung wuchs die  $\Delta phaC1$  Mutante wieder an, in vergleichbarem Maß wie die  $\Delta ppk-all$  Mutante. Sie beendete ihr Wachstum früher als die PolyP-freie Mutante bei  $t=267$  h. Die PHB-freie Mutante nutzte also ebenfalls Phosphat aus dem Medium, investierte aber weniger in Wachstum als der WT.

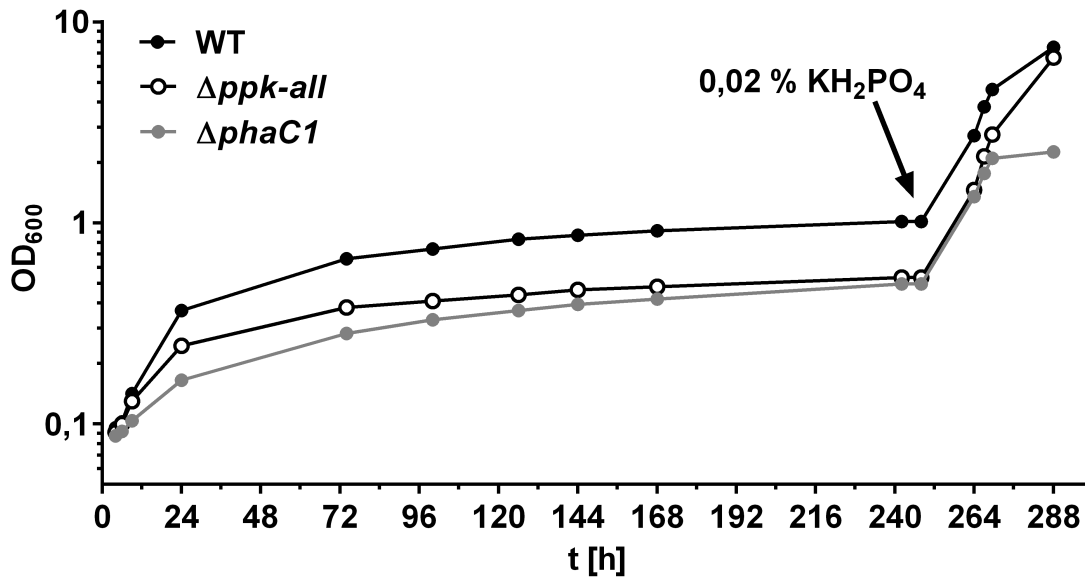


Abb. 3.18: Wachstum von *R. eutropha* WT und  $\Delta phaC1$  in Tris-MSM ohne Phosphat. 200 ml Tris-MSM + 0,8 % Fruktose in 1 l Erlenmeyerkolben wurden mit *R. eutropha* WT oder  $\Delta phaC1$  aus einer ü. N. NB Vorkultur mit Mediumwechsel auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 30 °C, 150 rpm kultiviert. Nach t=248 h wurden 0,02 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> zugegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte technischer Duplikate eines einzelnen Versuchs.

Die PolyP Quantifizierung (Abb. 3.19) offenbarte wiederum eine eingeschränkte Mobilisierung des PolyPs in der *R. eutropha*  $\Delta phaC1$  Mutante. Bis t=18 h blieb der PolyP Gehalt bei 40-50  $\frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  und wurde anschließend bis t=48 h abgebaut. Bei Supplementierung der phosphatgehungerten Kultur mit 0,02 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurde das Wachstum in der  $\Delta phaC1$  Mutante zunächst angeregt, stagnierte dann aber bereits bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 2, während der WT und die  $\Delta ppk-all$  Mutante bis zu einer OD<sub>600</sub> von 7,5 bzw. 6,6 weiterwuchsen. Dafür baute sie ihren PolyP Gehalt innerhalb von 40 h wieder auf  $45 \pm 3 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  auf, was der gleichen Menge wie zu Beginn des Wachstumsversuchs entsprach. *R. eutropha* WT dagegen nutzte das frisch verfügbare Phosphat für Wachstum, ohne PolyP aufzubauen. Dies wurde auch mittels Fluoreszenzmikroskopie DAPI-gefärbter Zellen dieser Kultur bestätigt (Abb. 3.20).

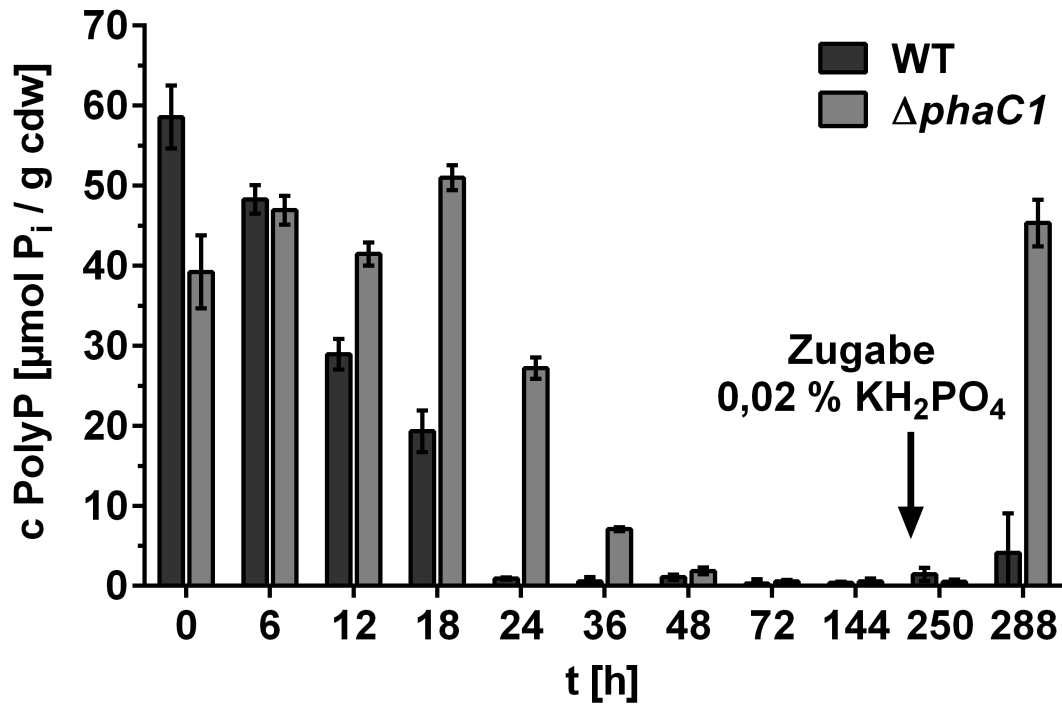


Abb. 3.19: PolyP Quantifizierung von *R. eutropha* WT und  $\Delta phaC1$  in Tris-MSM ohne Phosphat. 200 ml Tris-MSM + 0,8 % Fruktose in 1 l Erlenmeyerkolben wurden mit *R. eutropha* WT oder  $\Delta phaC1$  aus einer ü.N. NB Vorkultur mit Mediumwechsel auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 angeimpft und bei 30 °C, 150 rpm kultiviert. Nach  $t=248$  h wurden 0,02 %  $KH_2PO_4$  zugegeben. PolyP wurde aus lyophilisierten Zellen extrahiert und enzymatisch zu Monophosphat verdaut. Dieses wurde mit Malachitgrünassay quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SD technischer Triplikate eines einzelnen Versuchs.

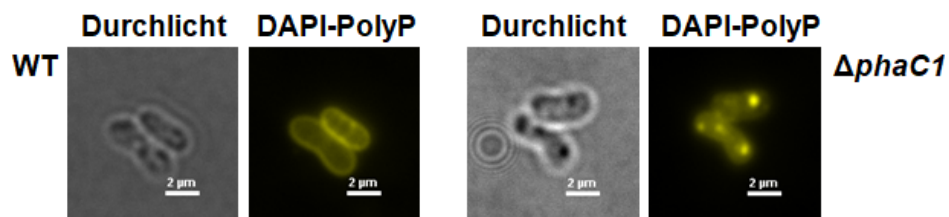


Abb. 3.20: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *R. eutropha* WT und  $\Delta phaC1$  nach Phosphatzugabe zu phosphatgehungerten Kulturen. 200 ml Tris-MSM + 0,8 % Fruktose in 1 l Erlenmeyerkolben wurden mit *R. eutropha* WT (links) oder  $\Delta phaC1$  (rechts) aus einer ü.N. NB Vorkultur mit Mediumwechsel auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 angeimpft und bei 30 °C, 150 rpm kultiviert. Nach  $t=248$  h wurden 0,02 %  $KH_2PO_4$  zugegeben. 10  $\mu$ l Kultur wurde mit 5  $\mu$ g/ml DAPI für 10-15 min auf Eis gefärbt. Die Bilder zeigen repräsentative Zellen bei  $t=288$  h.

Die  $\Delta phaC1$  Mutante wuchs in NB Medium ähnlich stark wie der WT, akkumulierte jedoch über einen kürzeren Zeitraum in der frühen stationären Phase PolyP und da-

mit auch eine geringere Gesamtmenge. Das Wachstum unter Phosphatlimitierung und Phosphatmangel war generell eingeschränkt in der  $\Delta phaC1$  Mutante. Sie mobilisierte in Tris-MSM ihre Phosphatvorräte verzögert und zulasten des Wachstums. Frisch verfügbares Phosphat wurde nur wenig in erneutes Wachstum investiert, dafür der PolyP Speicher wieder aufgebaut, während der WT das verfügbare Phosphat für starkes Wachstum ohne PolyP Synthese nutzte. Somit hat die PHB-freie  $\Delta phaC1$  Mutante einen veränderten PolyP Stoffwechsel.

### 3.1.2.7 Wachstum und PolyP Metabolismus bei Aminosäuremangel

Im folgenden Versuch wurde die Frage geklärt, ob PolyP in *R. eutropha* die Anpassung an Aminosäuremangel beeinflusst. Das Wachstum und der PolyP Metabolismus von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk-all$  Mutante wurde in aminosäurefreiem, phosphatgepuffertem Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose mit 0,1 %  $NH_4Cl$  als N-Quelle verfolgt.

Wie schon bei Tumlirsch, 2017 gezeigt, wuchsen *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk-all$  Mutante in dem Schlegel-MSM in gleichem Maß (Abb. Anhang 5.2). Das Wachstum war langsamer als in NB Medium, da alle benötigten Aminosäuren eigenständig synthetisiert werden mussten. Beide Stämme gingen zwischen 12-24 h in die stationäre Phase über bei einer  $OD_{600}$  von etwa 2. Anschließend fiel die OD leicht auf 1,7 bei  $t=30$  h und blieb dann annähernd konstant. Dies ist eine niedrige  $OD_{600}$  im Vergleich zu Jüngert, 2018 und Tumlirsch, 2017. Möglicherweise war die C-Quelle limitierend, da nur 0,4 % Fruktose statt 2 % Fruktose verwendet wurde.

Die Quantifizierung des PolyP Gehalts in den Schlegel-MSM Kulturen (Abb. 3.21) zeigte einen Abbau des zu Beginn des Wachstumsversuchs vorhandenen PolyP bis  $t=12$  h auf  $6 \frac{\mu mol \text{ PolyP}}{g \text{ cdw}}$  und einen stetigen Aufbau in der stationären Phase ab  $t=24$  h bis  $t=72$  h mit einem finalen PolyP Gehalt von  $57 \pm 1 \frac{\mu mol \text{ PolyP}}{g \text{ cdw}}$ . Damit verhielt sich der PolyP Metabolismus der in Schlegel-MSM gewachsenen Kultur wie in NB Medium und nicht wie in Tris-MSM mit Phosphatlimitierung, wo keine PolyP Akkumulation in der stationären Phase stattfand.

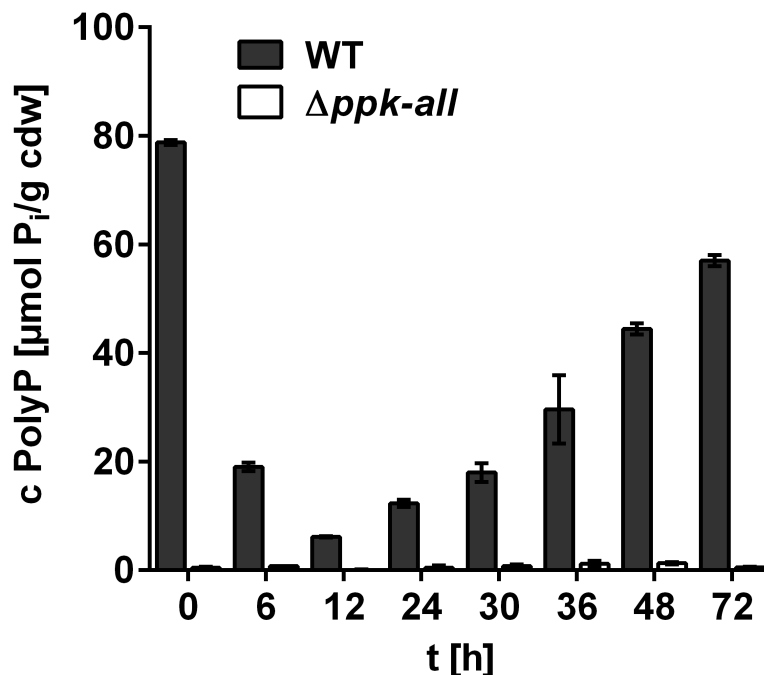


Abb. 3.21: PolyP Gehalt von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk$ -all Mutante in Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose. *R. eutropha* WT und  $\Delta ppk$ -all Mutante wurden in 200 ml Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 50-150 ml Kultur geerntet. Aus den lyophilisierten Zellpellets wurde PolyP mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert und enzymatisch mit ScPPX verdaut. Der Phosphatgehalt in Form von Monophosphat wurde mittels Sb-Ascorbatassay colorimetrisch ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte mit SD von drei technischen Triplikaten eines einzelnen Versuchs.

### 3.1.2.8 Kultivierbarkeit von Zellen aus der stationären Phase bei Aminosäuremangel

Auf die Adaption von *R. eutropha* an Aminosäuremangel hatte PolyP keinen Einfluss, der sich phänotypisch über das Wachstum manifestierte. Daraufhin sollte geklärt werden, ob das in der stationären Phase in *R. eutropha* WT gebildete PolyP einen Einfluss auf die Viabilität und Teilungsfähigkeit der Zellen hatte. Dazu wurde wie in Abschnitt 3.1.1.1 die Kultivierbarkeit mittels Auftropfen einer Verdünnungsreihe von stationäre Phase Zellen bei  $t=48$  h auf NB Agarplatten getestet. Aus Abb. 3.22 ist zu entnehmen, dass *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk$ -all Mutante aus der stationären Phase in Schlegel-MSM in gleichem Maß koloniebildende Einheiten vorwiesen.

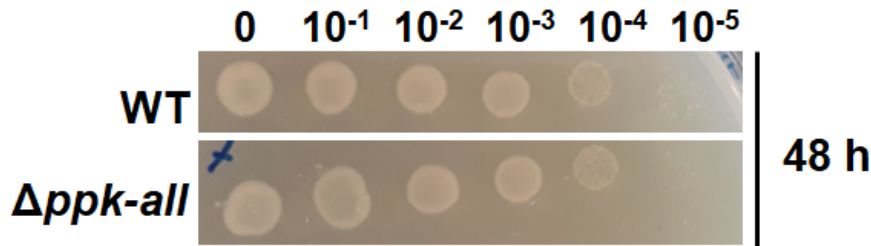


Abb. 3.22: Kultivierbarkeit von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante. Kultivierung von Zellen aus der stationären Phase von *R. eutropha* WT und  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante in Schlegel-MSM. Nach 48 h Kultivierung von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante in Schlegel-MSM bei 30 °C, 140 rpm wurde von den Kulturen eine 1:10 Verdünnungsreihe in 0,9 % NaCl hergestellt und je 2  $\mu$ l von jeder Verdünnung auf eine NB-Agarplatte getropft. Die Zellen wurden ü. N. bei 30 °C inkubiert.

### 3.1.2.9 PHB-Metabolismus von *R. eutropha* bei Aminosäuremangel

Die Kultivierung von *R. eutropha* in Schlegel-MSM stellte wiederum Bedingungen für PHB Akkumulierung dar. Um zu untersuchen, ob die  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante bei Aminosäuremangel einen veränderten PHB Aufbau aufwies, wie bei Phosphatmangel, wurde PHB zu verschiedenen Zeiten des Wachstums quantifiziert (Abb. 3.23).

Der PHB Gehalt steigerte sich in beiden Stämmen während der Kultivierung in Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose in *R. eutropha* WT von  $4 \frac{\% \text{ PHB}}{\text{g cdw}}$  bzw. in der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante von  $1 \frac{\% \text{ PHB}}{\text{g cdw}}$  auf ein Maximum von  $40 \frac{\% \text{ PHB}}{\text{g cdw}}$  in beiden Stämmen bei  $t=30$  h und nahm dann im Laufe der stationären Phase bis  $t=72$  h auf  $30 \frac{\% \text{ PHB}}{\text{g cdw}}$  bzw.  $27 \frac{\% \text{ PHB}}{\text{g cdw}}$  ab. In der exponentiellen Phase bei  $t=6$  h bzw.  $t=12$  h hatte der WT 25 % bzw. 15 % mehr PHB pro g Zelltrockenmasse, während zu Beginn der stationären Phase bei  $t=24$  h die  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante 16 % mehr PHB pro g Zelltrockenmasse hatte. Nach den Schwankungen im PHB Gehalt zwischen den beiden Stämmen in der exponentiellen Phase blieb der PHB Gehalt ähnlich in der stationären Phase.

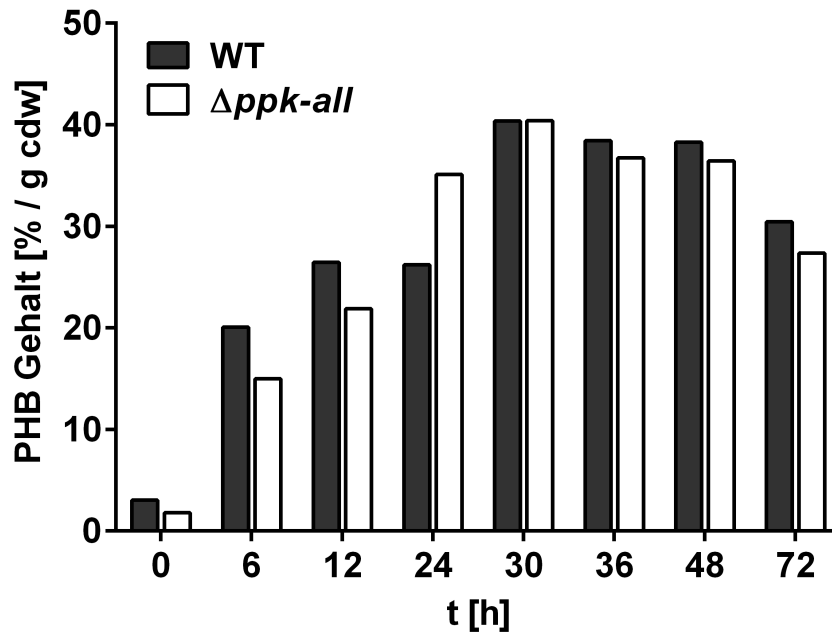


Abb. 3.23: PHB Quantifizierung von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk-all$  Mutante in Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 50-150 ml Kultur geerntet. Das PHB in den lyophilisierten Zellen wurde mittels saurer Methanolyse in 3-Hydroxybutyrat Methylester gespalten. Die Quantifizierung erfolgte mit Gaschromatographie. Dargestellt ist die Einzelmessung eines Versuches.

### 3.1.2.10 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *R. eutropha* bei Aminosäuremangel

Ergänzend zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens sowie des PolyP und PHB Gehalts wurden die Schlegel-MSM Kulturen von *R. eutropha* WT (Abb. 3.24) und der  $\Delta ppk-all$  Mutante (Abb. Anhang 5.3) fluoreszenzmikroskopisch auf die Morphologie sowie Lokalisation von PolyP und PHB untersucht.

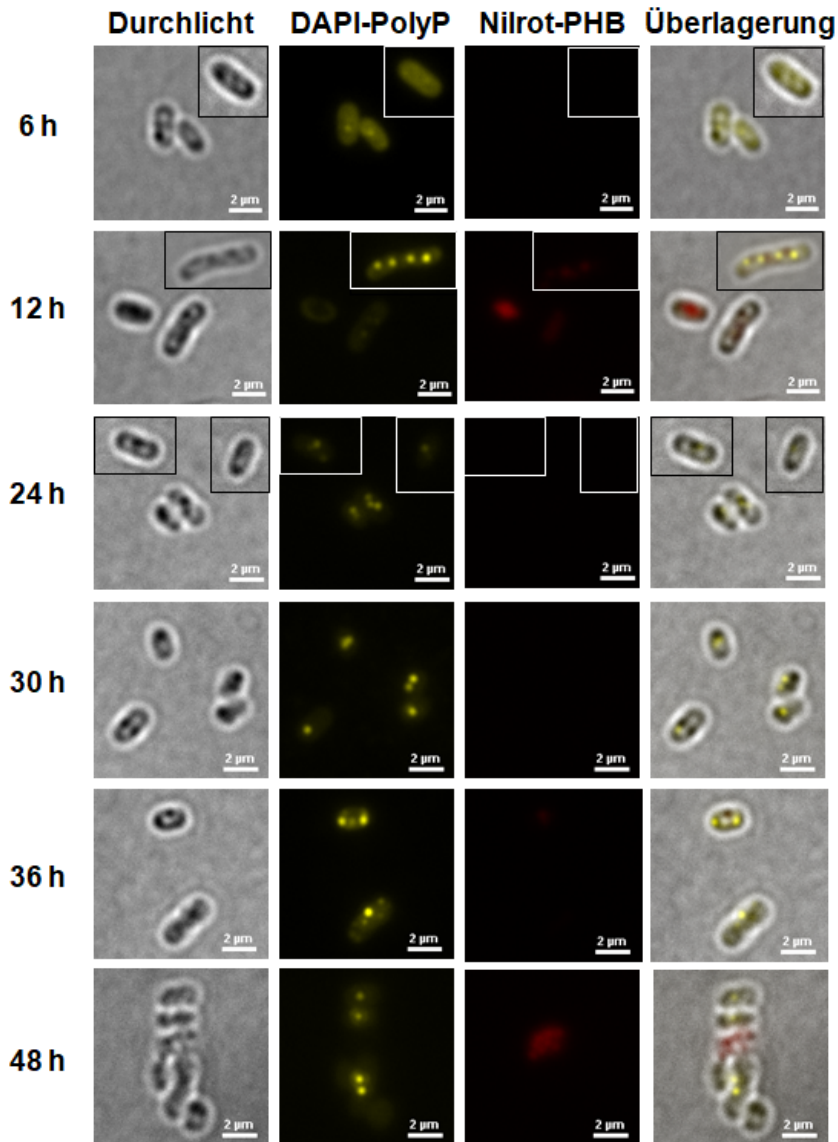


Abb. 3.24: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *R. eutropha* WT in Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose. 10 µl Kultur wurden mit 5 µg/ml DAPI und 2 µg/ml Nilrot für 10 min auf Eis inkubiert. Die dargestellten Aufnahmen zeigen typische Zellen für diesen Zeitpunkt, wenn nicht anders im Text beschrieben. Der Maßstab beträgt 2 µm.

Bei *R. eutropha* WT waren die Zellen zu Beginn der exponentiellen Phase ( $t=6$  h) kurze Stäbchen wie auch in der stationären Phase. Nur in der fortgeschrittenen exponentiellen Phase, hier bei  $t=12$  h gezeigt, waren die Zellen verlängert. In der exponentiellen Phase bei  $t=6$  h und  $t=12$  h waren nur wenige Zellen mit PolyP vorhanden, zudem waren diese meist nur schwach sichtbar. Eine Ausnahme ist bei  $t=12$  h abgebildet. Es fanden sich in der exponentiellen Phase selten auch Zellen mit mehreren PolyP Granula mit teilweise hoher Fluoreszenzintensität. In der stationären Phase dagegen ab  $t=24$  h waren üblicherweise in den Zellen DAPI-gefärbte PolyP Granula sichtbar. Auffallend war die erhöhte Anzahl an PolyP Granula pro Zelle (Abb. 3.25). In einer NB Kultur besaß zwei Drittel



der *R. eutropha* WT Zellen (66 %) ein - meist mittiges - PolyP Granulum, 33 % war frei von granulärem PolyP und nur 1 % der Zellen hatten zwei Granula. In Schlegel-MSM waren, trotz der geringen Zellgröße, 16 % Zellen mit 2 Granula und 9 % mit drei oder mehr Granula in einer Zelle, die mittig nah nebeneinander oder auch am Zellrand zu finden waren. Den überwiegenden Teil mit 52 % machten die Zellen mit einem Granulum aus, während ohne granuläres PolyP nur 24 % waren. Allgemein deckte sich die Detektion der DAPI-gefärbten PolyP Granula in der stationären Phase mit der PolyP Quantifizierung (Abb. 3.21).

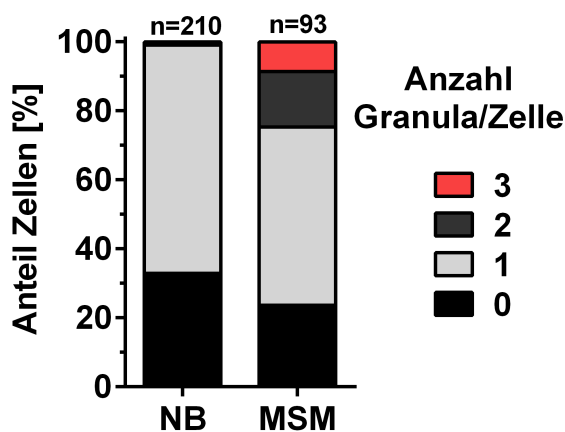


Abb. 3.25: Anteile der Granulaanzahl pro Zelle in *R. eutropha* WT Kulturen in NB oder Schlegel-MSM. Fluoreszenzmikroskopiebilder von DAPI-gefärbten *R. eutropha* WT bei  $t=24$  h in NB Medium oder Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose wurden nach der Anzahl der Granula pro Zelle ausgezählt.

Mit Nilrot gefärbtes PHB wurde in unterschiedlichem Maß zu den verschiedenen Zeitpunkten detektiert, im WT insbesondere bei  $t=48$  h. Hier fiel auf, dass meist in den PolyP-freien Zellen PHB Granula angefärbt waren. Zu den anderen Zeitpunkten war PHB nur schwach oder gar nicht gefärbt, obwohl bei der PHB Quantifizierung in diesem Zeitraum PHB detektiert wurde. Bei  $t=12$  h und  $t=36$  h waren jeweils Zellen sichtbar mit PHB Granula, die teilweise auch PolyP besaßen. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der  $\Delta ppk-all$  Mutante ergab, dass die Mutante morphologisch dem WT entsprach (Abb. Anhang 5.3). Es wurden entsprechend dem Phänotyp keine PolyP Granula detektiert. PHB wurde wiederum nur bei einigen Zeitpunkten detektiert, bei  $t=12$  h und  $t=36$  h. Hier zeigte sich, wie im WT, dass nur einige der Zellen mit Nilrot gefärbt waren. Es ist zu vermuten, dass die Nilrotfärbungen schlecht funktioniert haben und zu wenig PHB detektiert wurde.

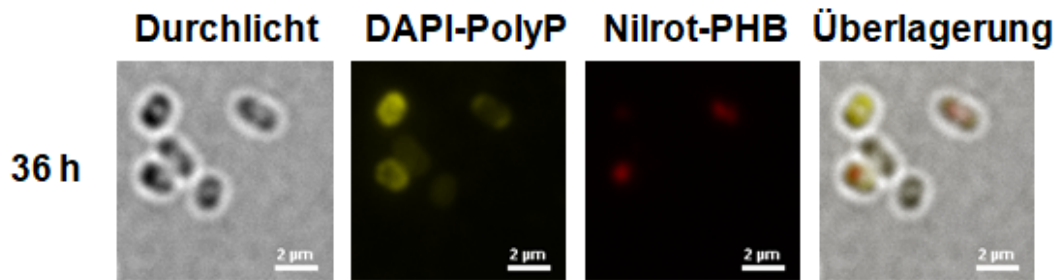


Abb. 3.26: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der *R. eutropha*  $\Delta ppk$ -*all* Mutante in Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose. 10  $\mu$ l Kultur wurden mit 5  $\mu$ g/ml DAPI und 2  $\mu$ g/ml Nilrot für 10 min auf Eis inkubiert. Die dargestellten Aufnahmen zeigen typische Zellen für  $t=36$  h. Der Maßstab beträgt 2  $\mu$ m.

Die Versuche mit *R. eutropha* in Schlegel-MSM ergaben, dass das Fehlen von PolyP keinen Einfluss auf das Wachstum bei Aminosäuremangel bzw. die Kultivierbarkeit von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante hatte. Der PolyP Metabolismus bei Aminosäuremangel war ähnlich wie der PolyP Metabolismus in Komplexmedium. Jedoch war die Anzahl der PolyP Granula pro Zelle in der stationären Phase in Schlegel-MSM erhöht, der PolyP Gehalt dagegen etwas niedriger als in NB Medium. PHB wurde im WT und der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante in ähnlichem Maß aufgebaut, in der exponentiellen Phase gab es allerdings unterschiedlich schnellen und schwankenden Aufbau. Die Ergebnisse gaben Hinweise, dass Aminosäuremangel den PolyP Metabolismus bezüglich der Granulaverteilung beeinflusste. In *R. eutropha* führt Aminosäuremangel zu einer Induktion der *stringent response* mit Ausschüttung der Alarmone (p)ppGpp durch SpoT (Jüngert, 2018; Jüngert *et al.*, 2017). Jedoch hatte das Fehlen von PolyP keinen Einfluss auf die *stringent response* im Rahmen der untersuchten Parameter.

*R. eutropha* wurde verschiedenen Wachstumsbedingungen ausgesetzt und das Verhalten in Bezug auf PolyP untersucht. Es stellte sich heraus, dass der WT in Komplexmedium (NB) und aminosäurefreiem Medium (Schlegel-MSM) PolyP zu Beginn der exponentiellen Phase konsumierte und in der stationären Phase aufbaute. In phosphatlimitiertem Medium (Tris-MSM + 0,02 % Phosphat) und Phosphatmangelmedium (Tris-MSM ohne Phosphat) wurde Phosphat zugunsten des Wachstums konsumiert. Hier zeigte sich eine Funktion von PolyP als Phosphatspeicher, der einen Wachstumsvorteil unter Phosphatmangel gegenüber PolyP-freien Zellen brachte. Die PHB Akkumulierung war in PolyP-freien Zellen in Phosphatmangelmedium reduziert. Weitere Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem PolyP und PHB Metabolismus erbrachte die Untersuchung der PHB-freien  $\Delta phaC1$  Mutante, die bei Phosphatlimitierung und -mangel PolyP schlechter mobilisierte als der WT und phosphatgehungerte Zellen bei Phosphatangebot zur Speicherung großer Mengen PolyP neigte.

Nachdem PolyP als Phosphatspeicher in *R. eutropha* identifiziert war, wurde im Folgenden untersucht, ob es auch bei anderen Stressbedingungen vorteilhaft ist. PolyP hat chaperon-artige Eigenschaften, indem es fehlgefaltete Proteine bindet und somit toxische Proteinaggregation verhindert (Gray *et al.*, 2014). Dadurch kann PolyP unter verschiedenen Stressbedingungen, die eine Schädigung und damit Strukturverlust von Proteinen verursachen, Überlebensvorteile bringen.

### **3.1.3 Untersuchung der Hitzetoleranz in Abhängigkeit von PolyP**

#### **3.1.3.1 Hitzetoleranz in *R. eutropha***

Eine typische Stressbedingung für Bakterien, bei der vor allem Proteine geschädigt und die Eigenschaften von Lipidmembranen verändert werden, ist Hitze. Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, ob PolyP in *R. eutropha* einen Vorteil bei Hitzestress verschafft. Zuerst wurde spektrophotometrisch verfolgt, wie verschieden hohe konstante Temperaturen sich auf das Wachstum von *R. eutropha* auswirkten (Abb. 3.27).

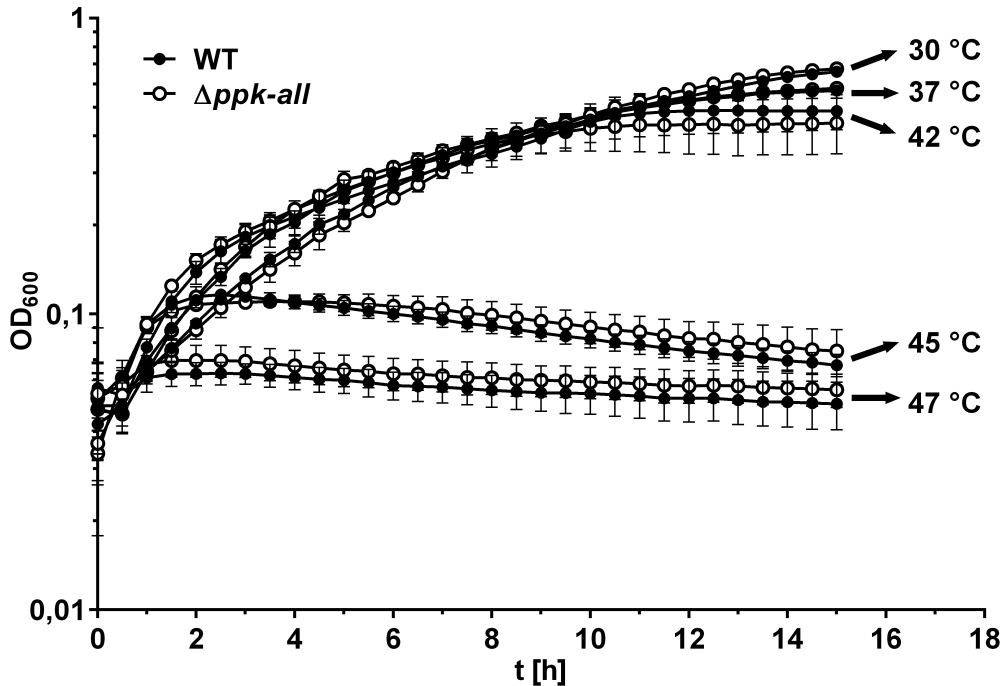


Abb. 3.27: Wachstum von *R. eutropha* WT und  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante bei verschiedenen Temperaturen. Aus einer ü. N. NB Vorkultur wurden *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante in 200  $\mu\text{l}$  NB in einer Mikrotiterplatte auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und das Wachstum bei den angegebenen Temperaturen spektrophotometrisch im Plattenlesegerät verfolgt. Die Messwerte stellen den Mittelwert und SD von sechs technischen Replikaten dar.

Aus Abb. 3.27 ist zu entnehmen, dass *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante jeweils das gleiche Wachstum bei einer Kultivierungstemperatur zeigten. Zwischen 30 °C, der optimalen Wachstumstemperatur von *R. eutropha*, bis 42 °C fand ein ordentliches Wachstum statt, während 45 °C und 47 °C zu hohe Temperaturen für Wachstum darstellten. Somit lag das Temperaturmaximum für das Wachstum von *R. eutropha* bei etwa 42 °C. PolyP konnte die Hitzetoleranz bei permanent hohen Temperaturen in *R. eutropha* nicht verbessern.

Eine weitere Form des Hitzestresses ist ein kurzer Hitzeschock weit oberhalb der tolerierbaren Maximaltemperatur. Um zu prüfen, ob PolyP bei Hitzeschock einen Überlebensvorteil bringt, wurde eine 24 h NB Kultur von *R. eutropha* in 0,9 % NaCl oder NB Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 oder 0,002 eingestellt und für 10 min bei 55 °C im Brutschrank bei 450 rpm auf einem Thermoshaker inkubiert. Von diesen gestressten Kulturen wurde zur Überprüfung der Kultivierbarkeit eine 1:10 Verdünnungsreihe in 0,9 % NaCl auf eine NB Agarplatte getropft (Abb. 3.28) sowie eine PolyP Quantifizierung (Abb. 3.29) durchgeführt.

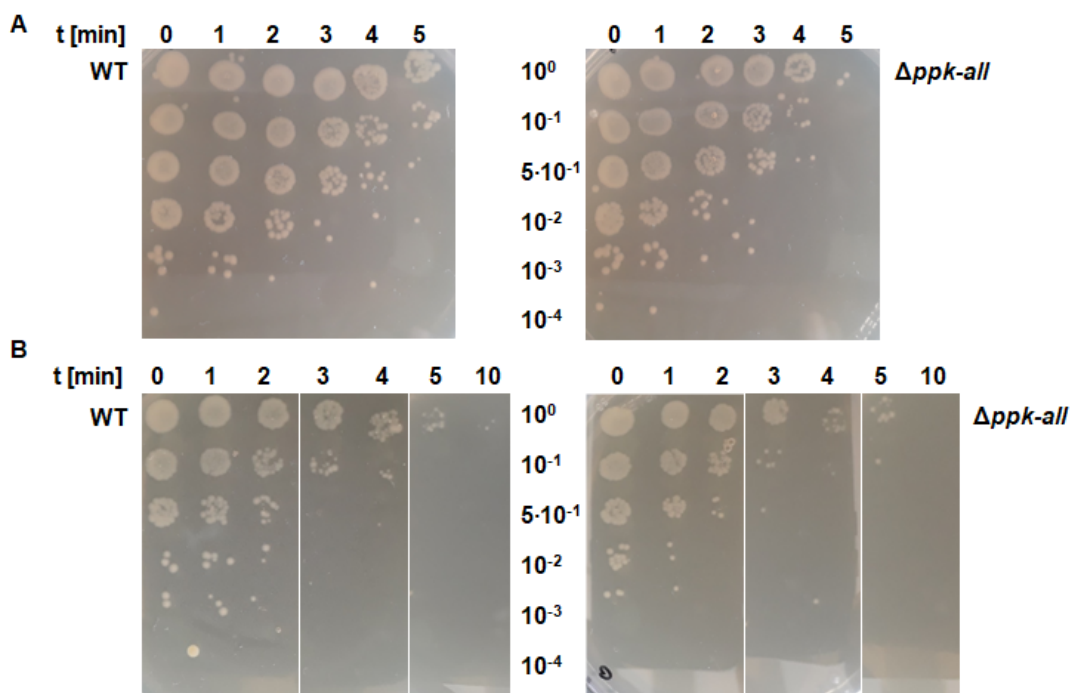


Abb. 3.28: Kultivierbarkeit von *R. eutropha* WT und  $\Delta ppk-all$  Mutante nach 10 min Hitzeschock bei 55 °C. Eine 24 h NB Kultur von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk-all$  Mutante wurde auf eine  $OD_{600}$  von 0,002 in 1 ml A) 0,9 % vorgeheiztem NaCl oder B) NB Medium suspendiert und für 10 min bei 55 °C, 450 rpm im Thermoshaker inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und je 2  $\mu$ l einer 1:10 Verdünnungsreihe in 0,9 % NaCl auf eine NB Agarplatte getropft. Diese wurde ü. N. bei 30 °C inkubiert. Dargestellt ist jeweils ein einzelner Versuch, der repräsentativ für drei biologische Replikate (A) bzw. zwei biologische Replikate (B) ist.

*R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk-all$  Mutante wiesen nach einem Hitzeschock in 0,9 % NaCl (Abb. 3.28 A) oder NB Medium (Abb. 3.28 B) eine Abnahme von kultivierbaren Zellen in Abhängigkeit von der Zeit auf. In beiden Stämmen reduzierte sich die Kultivierbarkeit in der gleichen Größenordnung. Damit wurde kein Einfluss von PolyP auf das Überleben bzw. die Kultivierbarkeit bei Hitzestress nachgewiesen.

Die Quantifizierung von PolyP vor dem Hitzeschock ( $t_0$ ) und nach 10 min bei 55 °C in 0,9 % NaCl oder NB Medium (Abb. 3.29 A) ergab eine geringfügige Zunahme von PolyP um 8 % nach dem Hitzestress. In einem biologischen Replikat hingegen (Abb. 3.29 B) nahm der PolyP Gehalt nach dem Hitzestress um 28 % ab. Durch die PolyP Quantifizierung konnte man keinen klaren Einfluss des Hitzeschocks auf den PolyP Gehalt feststellen.

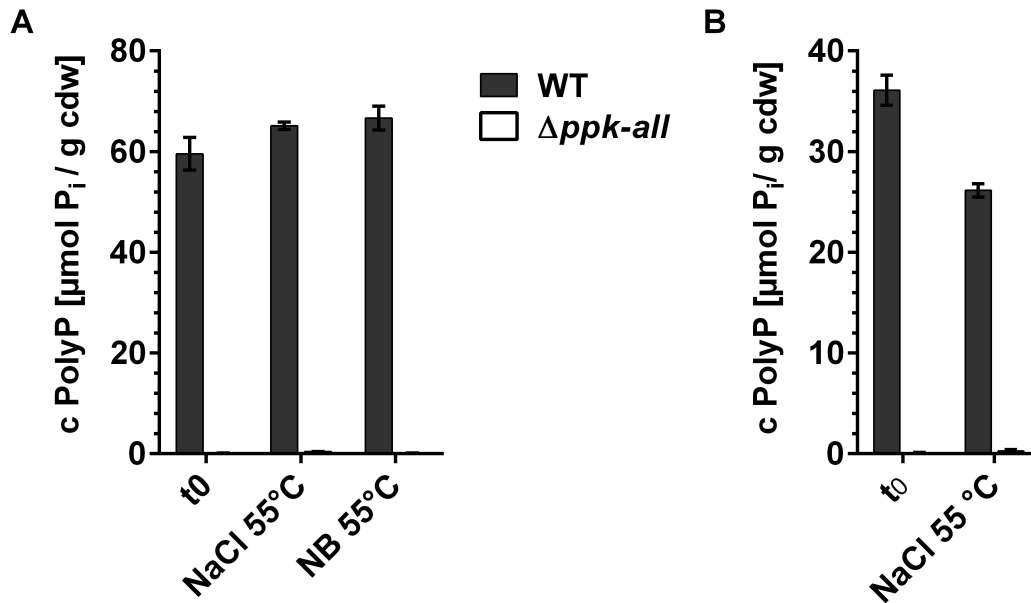


Abb. 3.29: Quantifizierung des PolyP Gehalts von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante bei einem 10 min Hitzeschock bei 55 °C. Der PolyP Gehalt einer 50 ml *R. eutropha* Kultur in einem 250 ml Erlenmeyerkolben wurde vor dem Hitzeschock ( $t_0$ ) und nach 10 min Inkubation bei 55 °C, 450 rpm im Brutschrank auf einem Mikrotiterplatenschüttler in 0,9 % vorgeheiztem NaCl oder vorgeheiztem NB Medium quantifiziert mittels Sb-Ascorbat-Assay. A) und B) zeigen jeweils einen Einzelversuch. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD von drei technischen Replikaten.

Zusätzlich wurde *R. eutropha* nach einem Hitzeschock mit DAPI gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Abb. 3.30). *R. eutropha* zeigte keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen nach 10 min Hitzestress. Dies zeigt, dass bei den gewählten Stressbedingungen sowohl im WT als auch der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante die zelluläre Integrität erhalten blieb. Trotzdem waren nach 10 min in beiden Stämmen keine kolonieformenden Einheiten mehr vorhanden (Abb. 3.28). Dies spricht dafür, dass die Zellen durch Hitze inaktiviert wurden, ohne die Zellen zu lysieren. In *R. eutropha* WT wurden sowohl vor als auch nach dem Hitzeschock PolyP Granula detektiert, was qualitativ die PolyP Quantifizierung (Abb. 3.29) bestätigte.

Die Ergebnisse der Untersuchung von *R. eutropha* bei erhöhter Temperatur oder Hitzeschock liefern keinen Hinweis auf eine Beteiligung von PolyP an der Toleranz von Hitzestress.

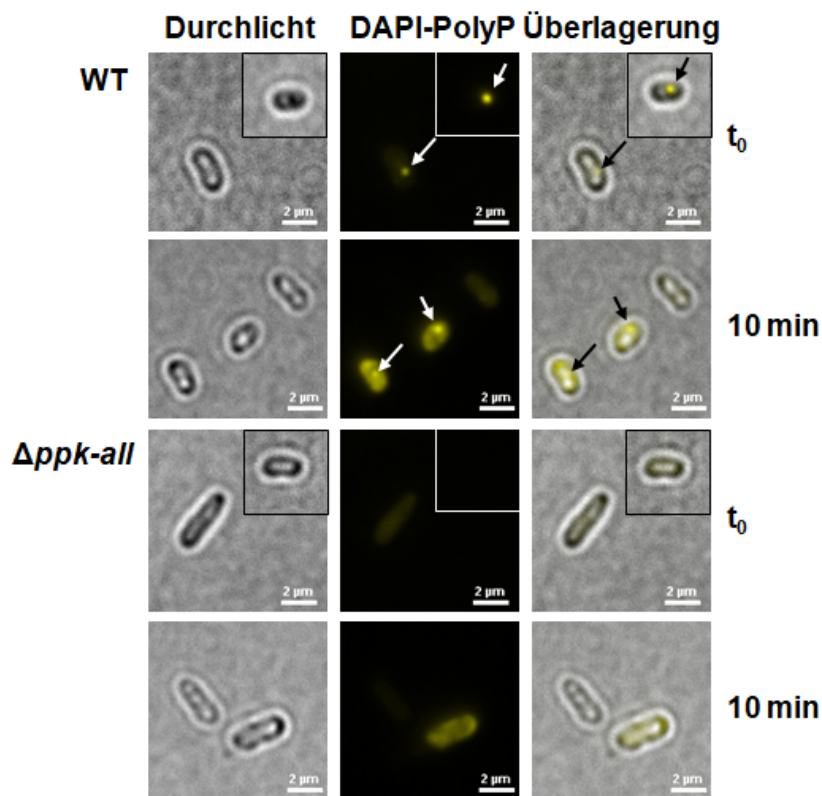


Abb. 3.30: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante bei einem Hitzeschock. Vor und direkt nach einem 10 minütigen Hitzeschock bei 55 °C in 0,9 % NaCl wurden *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante mit 5  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  DAPI gefärbt. Pfeile weisen auf die PolyP Granula. Dargestellt sind typische Zellen eines Versuchs, die repräsentativ für zwei unabhängige Versuche sind. Der Maßstab beträgt 2  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.3.2 Hitzetoleranz in *E. coli*

Der bestuntersuchte Organismus in Bezug auf den Zusammenhang zwischen Stress und PolyP ist *E. coli*. In diesem Bakterium wurde bereits nachgewiesen, dass PolyP unter verschiedenen Stressbedingungen, u.A. Hitzestress, zur Verbesserung der Überlebensfähigkeit führt (Brown & Kornberg, 2004; Rao & Kornberg, 1996).

Zur Validierung der Methode zur Untersuchung von Hitzestresstoleranz in *R. eutropha* wurden die Hitzestresstests in *E. coli* wiederholt. Zudem wurde erstmals in *E. coli* der PolyP Gehalt und die Struktur von PolyP sowie die Zellmorphologie bei Hitzestress untersucht, ergänzend zu dem bereits bekannten Phänomen, dass die Toleranz gegenüber Hitze durch PolyP steigt (Rao & Kornberg, 1996). Die Versuche mit *E. coli* wurden analog zu den Versuchen in *R. eutropha* in Abschnitt 3.1.3.1 durchgeführt.

*E. coli* hat als Kommensale des Menschen sein Temperaturoptimum bei 37 °C, der menschlichen Kernkörpertemperatur, im Gegensatz zu *R. eutropha* mit 30 °C als Süßwasserbakterium. Aufgrund der unterschiedlichen Temperaturoptima wurde in *E. coli* der Hitzeschock

bei 55 °C auf bis zu 20 min erhöht.

Während eines Hitzeschocks blieb in einer Kultur mit einer finalen OD<sub>600</sub> von 0,002 (Abb. 3.31 A) bei *E. coli* WT die Menge an kultivierbaren Zellen in den ersten 5 min konstant und nahm ab t=10 min ab bis bei t=20 min keine kultivierbaren Zellen mehr vorhanden waren. In der  $\Delta ppk$  Mutante war schon ab t=2 min die Menge an kultivierbaren Zellen deutlich reduziert. Bei einer Kultur mit finaler OD<sub>600</sub> von 0,2 (Abb. 3.31 B) wies der WT innerhalb von 20 min keinen temperaturbedingten Kultivierbarkeitsverlust auf. Die  $\Delta ppk$  Mutante zeigte ab t=20 min eine Reduktion an kultivierbaren Zellen.

Zusammengefasst wurde in *E. coli* bei Hitzestress eine geringere Kultivierbarkeit der PolyP-freien  $\Delta ppk$  Mutante festgestellt, wie bei Rao und Kornberg, 1996 beschrieben. Unter gleichen Versuchsbedingungen war hingegen bei *R. eutropha* keine Abhängigkeit von PolyP auf die Kultivierbarkeit zu finden. Des Weiteren beeinflusste in *E. coli* die Zelldichte die Sensitivität auf Hitzestress.

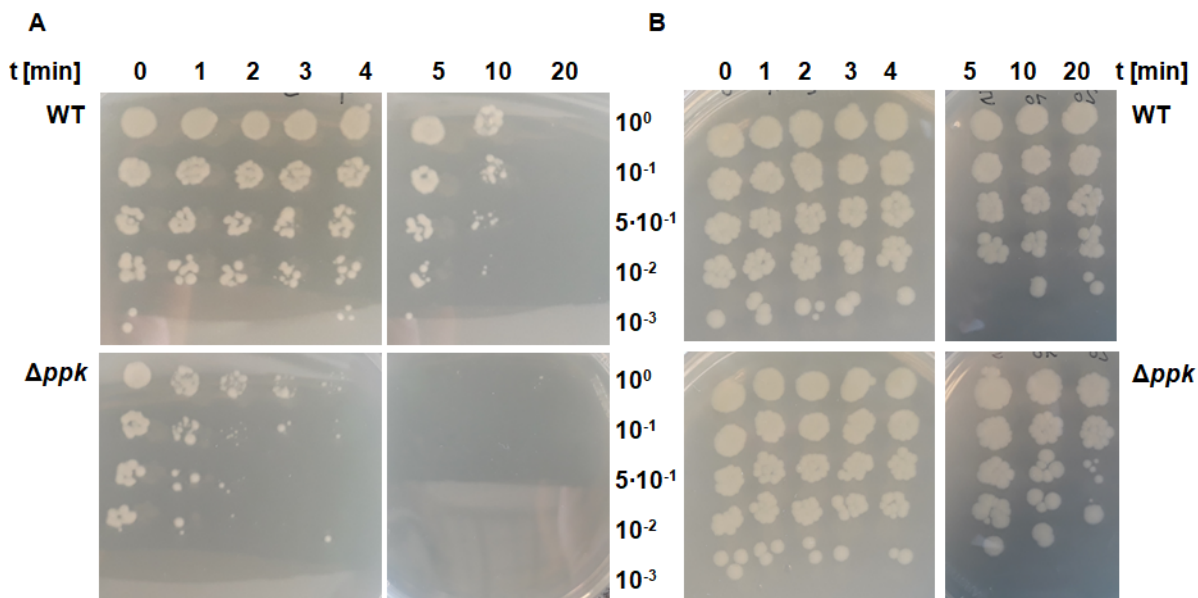


Abb. 3.31: Kultivierbarkeit von *E. coli* WT und der  $\Delta ppk$  Mutante nach 20 min Hitzeschock bei 55 °C. Eine 24 h LB Kultur von *E. coli* WT und der  $\Delta ppk$  Mutante wurde auf eine OD<sub>600</sub> von A) 0,002 oder B) 0,2 in 1 ml 0,9 % vorgeheiztem NaCl suspendiert und für 20 min bei 55 °C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben der gestressten Kultur genommen, von denen je 2  $\mu$ l einer 1:10 Verdünnungsreihe in 0,9 % NaCl auf eine LB Agarplatte getropft und ü. N. bei 37 °C inkubiert wurde. Dargestellt ist jeweils ein einzelner Versuch, der A) repräsentativ für drei biologische Replikate ist. B) ist ein Einzelversuch.

Die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung von DAPI-gefärbten *E. coli* Kulturen (Abb. 3.32) zeigte, dass sowohl im WT als auch der  $\Delta ppk$  Mutante bei Kultivierung in LB kein granuläres PolyP vorlag. Nach 20 min Hitzestress waren in beiden Stämmen DAPI-



gefärbte Strukturen sichtbar, die vorwiegend entlang der Zellmembran lokalisiert waren.

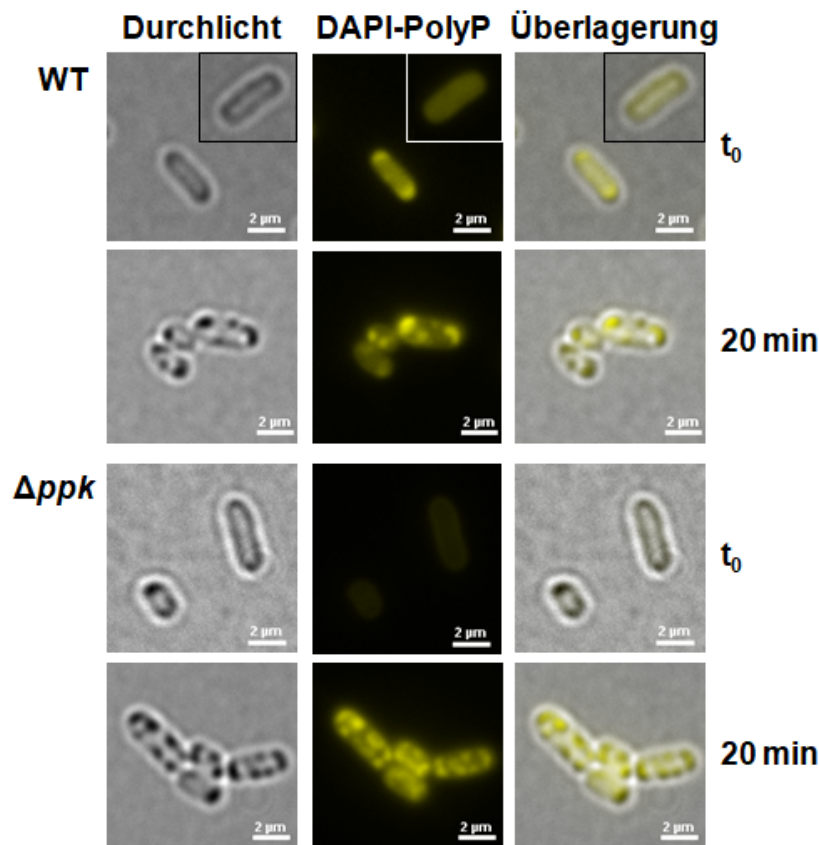


Abb. 3.32: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *E. coli* WT und der  $\Delta ppk$  Mutante bei einem Hitzeschock. Vor und direkt nach einem 20 minütigen Hitzeschock bei 55 °C in 0,9 % NaCl wurden *E. coli* WT und die  $\Delta ppk$  Mutante mit 5  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  DAPI gefärbt. Dargestellt sind typische Zellen eines Versuchs, die repräsentativ für zwei unabhängige Versuche sind. Der Maßstab beträgt 2  $\mu\text{m}$ .

Die PolyP Quantifizierung (Abb.3.33) ergab, dass *E. coli*, im Gegensatz zu *R. eutropha*, unter den Kultivierungsbedingungen in LB Medium zu Beginn des Versuchs kein detektierbares PolyP hatte und synthetisierte auch während des Hitzestresses keine nennenswerten Mengen PolyP. Sämtliche Phosphatkonzentrationen in den analysierten Proben lagen unterhalb des Sensitivitätsbereichs des Quantifizierungsassays von 5  $\mu\text{M}$  und lassen somit nur die Aussage zu, dass in *E. coli* in An- und Abwesenheit von Hitzestress nur sehr wenig PolyP in den Zellen vorlag.

Aus diesen Untersuchungen ergeben sich drei Erkenntnisse. Erstens reagierte die  $\Delta ppk$  Mutante bei Hitzestress sensitiver, obwohl weder im WT noch der  $\Delta ppk$  Mutante PolyP nachweisbar war. Zweitens stellten die nach 20 min Hitzeschock mit DAPI gefärbten und bei DAPI-PolyP-spezifischer Wellenlänge detektierten Strukturen kein PolyP dar. Diesen Umstand, dass die DAPI-PolyP Färbung unspezifisch ist, sollte man bei Interpretation von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen generell berücksichtigen. Drittens akkumu-

lierte *E. coli* in der stationären Phase in LB Medium kein PolyP, weder granuläres noch lösliches.

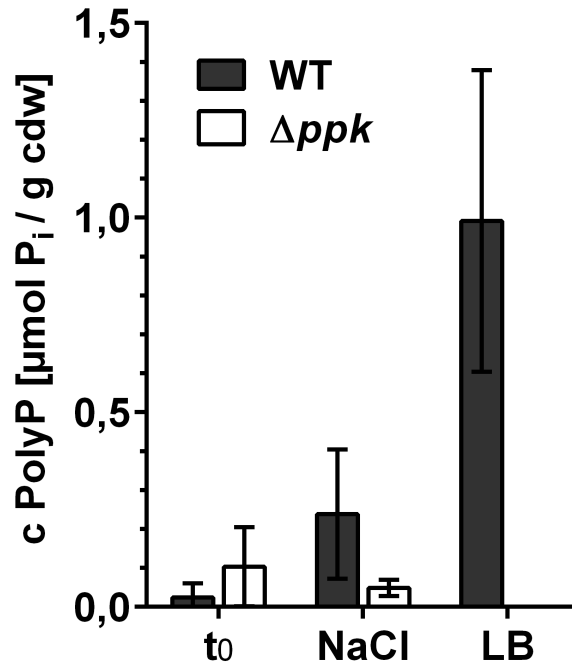


Abb. 3.33: Quantifizierung des PolyP Gehalts von *E. coli* WT und der  $\Delta ppk$  Mutante bei einem 20 min Hitzeschock bei 55 °C. Der PolyP Gehalt einer 50 ml *E. coli* Kultur wurde vor dem Hitzeschock ( $t_0$ ) und nach 20 min Inkubation bei 55 °C, 450 rpm in 0,9 % vorgeheiztem NaCl oder vorgeheiztem LB Medium quantifiziert mittels Sb-Ascorbat-Assay. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD von drei technischen Replikaten eines Einzelversuchs (LB) bzw. von biologischen Duplikaten (NaCl). Alle Proben enthielten nur rund  $\frac{1}{10}$  bis  $\frac{1}{100}$  des PolyP Gehalts von *R. eutropha*.

Das hier aus Literaturdaten reproduzierte Ergebnis, dass *E. coli*  $\Delta ppk$  unter den gewählten Versuchsbedingungen für Hitzestress sensitiver war als der WT, ist eine Bekräftigung, dass die Versuchsergebnisse diesbezüglich bei *R. eutropha* belastbar sind.

### 3.1.4 Untersuchung der Toleranz von oxidativem Stress in Abhängigkeit von PolyP

#### 3.1.4.1 Toleranz gegenüber Oxidantien in *R. eutropha*

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass PolyP in *R. eutropha* die Sensitivität gegenüber Hitzestress nicht beeinflusst, wurde oxidativer Stress als ein weiterer, in anderen Bakterien wie *P. aeruginosa* (Groitl *et al.*, 2017) oder *E. coli* (Gray *et al.*, 2014) gut untersuchter

Stressfaktor, untersucht.

*R. eutropha* wurde in MOPS-MSM + 0,2 % Fruktose kultiviert, dessen Bestandteile von oxidativen Agenzien nicht beeinträchtigt werden. Zellen im exponentiellen Wachstum oder in der stationären Phase wurden mit Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oder Hypochlorit (HOCl) mit Konzentrationen im sublethalen Bereich behandelt. Von den gestressten Zellen wurde die Viabilität (Abb. 3.34) bestimmt, sowie eine Quantifizierung des PolyP Gehalts (Abb. 3.35) und der Menge der generierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Abb. 3.36) vorgenommen. Zusätzlich wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch betrachtet (Abb. 3.37). Zuerst wurde quantifiziert, inwiefern *R. eutropha* WT in MOPS-MSM + 0,2 % Fruktose in den verschiedenen Wachstumsphasen überhaupt PolyP besaß und sich so von der  $\Delta ppk-all$  Mutante unterschied. Abb. 5.4 im Anhang zeigt, dass der WT zu Beginn der Kultivierung ( $t_0$ ) PolyP aus der ü. N. NB Vorkultur besaß, das im Laufe der Kultivierung in MOPS-MSM teilweise abgebaut wurde. In der exponentiellen Phase bei  $t=6$  h bzw. in der stationären Phase bei  $t=24$  h wurde ein PolyP Gehalt von  $13 \pm 3 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  bzw.  $18 \pm 2 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  nachgewiesen. Die Viabilität von *R. eutropha* bei oxidativem Stress wurde mittels PI-Färbung bestimmt. PI ist ein Farbstoff, der nur in Zellen mit gestörtem Membranpotential eindringt, also tote oder sterbende Zellen anfärbt. Die Färbung von *R. eutropha* Kulturen nach 15 min oxidativem Stress durch 2 mM HOCl oder 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist in Abb. 3.34 dargestellt.

Bei *R. eutropha* Kulturen in der exponentiellen Phase nach 6 h Wachstum (Abb. 3.34 A) lag der Anteil PI-positiver, also toter Zellen, in der Kontrolle und bei Behandlung mit 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 1-2 %, während bei Behandlung mit 2 mM HOCl der Anteil PI-positiver Zellen auf  $25 \pm 6$  % stieg. Dies galt gleichermaßen für *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk-all$  Mutante.

Bei oxidativem Stress in Kulturen der stationären Phase bei  $t=24$  h (Abb. 3.34 B) waren in *R. eutropha* WT in der Kontrolle bereits  $11 \pm 3$  % der Zellen PI-positiv. Dieser Anteil stieg bei Behandlung mit 2 mM HOCl auf  $40 \pm 10$  % bzw. mit 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf  $17 \pm 9$  %. In der  $\Delta ppk-all$  Mutante dagegen waren in der Kontrolle wie bei der exponentiell wachsenden Kultur fast alle Zellen lebendig, ebenso wie bei der Behandlung mit 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nur bei Behandlung mit 2 mM HOCl stieg der Anteil toter Zellen auf  $43 \pm 10$  %. Damit verringerte sich bei beiden *R. eutropha* Stämmen die Viabilität bei Behandlung mit 2 mM HOCl in gleichem Maße. In der stationären Phase waren sie sensitiver als in der exponentiellen. Der WT hatte in der stationären Phase auch eine reduzierte Viabilität bei Behandlung mit 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, die sich allerdings im gleichen Bereich befand wie die Kontrollzellen und daher nicht als ursächlich dem oxidativen Stress zugeordnet wurde. Es gab bei oxidativem Stress keine Veränderung der Viabilität bei der  $\Delta ppk-all$  Mutante.

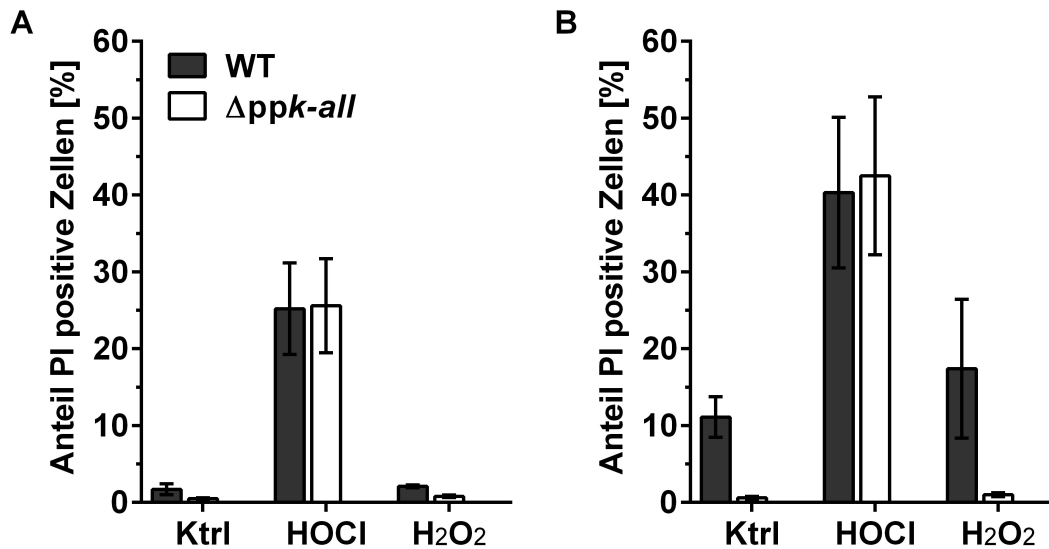


Abb. 3.34: Bestimmung der Viabilität von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante bei oxidativem Stress. In MOPS-MSM + 0,2 % Fruktose kultivierte *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante wurden A) in der exponentiellen Phase nach 6 h oder B) in der stationären Phase nach 24 h Kultivierung für 15 min mit 2 mM HOCl oder 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. Als Kontrolle (Ktrl) wurden Zellen mit PBS behandelt. Die Zellen wurden mit PI gefärbt und die Fluoreszenzintensität von 10000 Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte PI-positiver Zellen in Relation zur gesamten Zellzahl mit SD von A) zwei biologischen Replikaten bzw. B) drei biologischen Replikaten.

Daraufhin wurde geprüft, ob sich der PolyP Gehalt in den WT Zellen bei oxidativem Stress veränderte. Es wurde nur HOCl als Oxidationsmittel verwendet, da nur hierfür ein Einfluss auf die Viabilität gemessen wurde. *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante wurden aus einer ü. N. NB Vorkultur in MOPS-MSM + 0,2 % Fruktose überimpft auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 und für 3 h schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde 1 mM HOCl oder PBS als Kontrolle zugegeben. Nach 1 h wurden die Zellen geerntet und der PolyP Gehalt bestimmt. Die Konzentration an HOCl wurde halbiert verglichen mit dem Viabilitätstest, um einen höheren Anteil metabolisch aktiver Zellen zu erreichen und einen potentiellen Einfluss des oxidativen Stresses auf die Kultur messen zu können.

Der PolyP Gehalt änderte sich bei *R. eutropha* WT während der Behandlung mit 1 mM HOCl für 1 h nicht. In den mit PBS behandelten Kontrollansätzen verringerte sich der PolyP Gehalt minimal. Die  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante besaß zu keinem Zeitpunkt detektierbares PolyP. Der oxidative Stress hatte somit keinen Einfluss auf den PolyP Gehalt in *R. eutropha*.

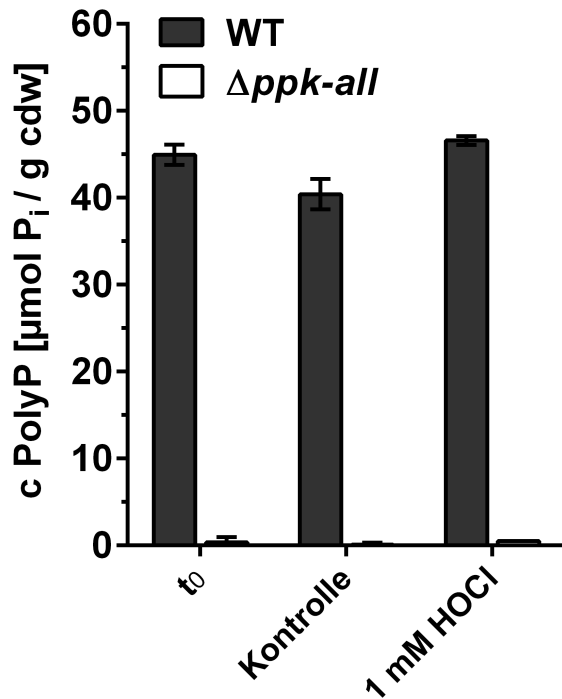


Abb. 3.35: PolyP-Quantifizierung von *R. eutropha* bei oxidativem Stress durch HOCl. *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante wurden in MOPS-MSM + 0,2 % Fruktose auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,3 aus einer ü. N. NB Vorkultur angeimpft und für 3 h bei 30 °C und 140 rpm inkubiert. Es wurde 1 mM HOCl oder PBS (Kontrolle) für 1 h zugegeben, dann 50 ml Kultur geerntet, aus den lyophilisierten Zellen das PolyP mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung isoliert und mit ScPPX enzymatisch verdaut zu Monophosphat. Der Phosphatgehalt wurde mit dem Sb-Ascorbat-Assay quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SD aus zwei biologischen Replikaten.

Es gab bei oxidativem Stress keine Änderung des PolyP Gehalts im WT und auch keinen Unterschied in der Viabilität bei PolyP-freien Zellen. Möglich ist jedoch, dass der oxidative Stress Zellschäden verursachte, ohne zum Tod der Zellen zu führen. Dabei könnte das im WT vorhandene PolyP eine schützende Rolle spielen. Im Folgenden wurde geprüft, ob PolyP-freie Zellen bei oxidativem Stress ein erhöhtes Maß an ROS bildeten, das in diesem Fall zwar nicht die Viabilität beeinträchtigte, aber unter Umständen eine Beeinträchtigung zellulärer Prozesse nach sich zog, die bisher nicht im Einzelnen betrachtet wurden. Das Maß an intrazellulären ROS wurde gemessen, indem die Proben mit CellROX green gefärbt wurden. Dieser Farbstoff ist in seiner reduzierten Form membrangängig, wird bei Anwesenheit von ROS intrazellulär oxidiert, wodurch er sowohl fluoresziert als auch außerstande ist, die Zelle wieder zu verlassen. Somit korreliert die Stärke der Fluoreszenzintensität mit der Menge an ROS in der Zelle.

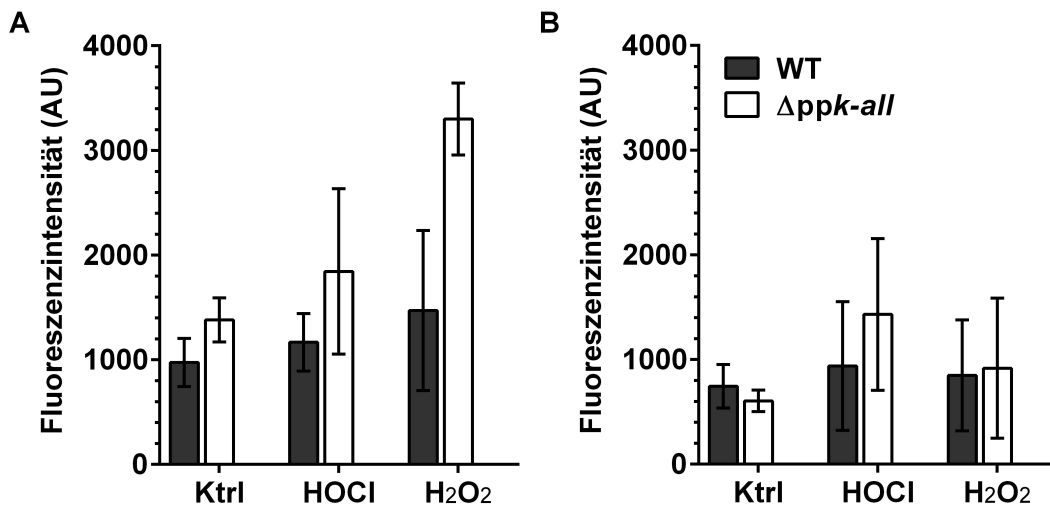


Abb. 3.36: Messung der oxidativen Sauerstoffspezies in *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk-all$  Mutante bei oxidativem Stress. In MOPS-MSM + 0,2 % Fruktose kultivierte *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk-all$  Mutante wurden A) in der exponentiellen Phase nach 6 h oder B) in der stationären Phase nach 24 h Kultivierung für 15 min mit 2 mM HOCl oder 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. Als Kontrolle (Ktrl) wurden Zellen mit PBS behandelt. Die Zellen wurden mit CellROX green gefärbt und die Fluoreszenzintensität von 10000 Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SD der Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten (AU) von A) zwei biologischen Replikaten bzw. B) drei biologischen Replikaten.

Die CellROX-Fluoreszenzintensität war bei den *R. eutropha* WT Zellen der exponentiellen Phase (Abb. 3.36 A) in der Kontrolle wie unter den Stressbedingungen ähnlich. In der  $\Delta ppk-all$  Mutante war die Fluoreszenzintensität in der Kontrolle etwas höher als beim WT und nahm bei Behandlung mit 2 mM HOCl geringfügig zu, blieb jedoch im Bereich der Standardabweichung sowohl gegenüber dem WT mit HOCl Behandlung als auch der Kontrolle. Bei Behandlung mit 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dagegen war die Fluoreszenzintensität gegenüber dem WT mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung und der Kontrolle deutlich erhöht. Bei oxidativem Stress der stationäre Phase Zellen (Abb. 3.36 B) blieb in beiden Stämmen die Fluoreszenzintensität der gestressten Zellen auf gleichem Niveau mit der Kontrolle. Für den WT und die  $\Delta ppk-all$  Mutante wurden ähnliche Werte gemessen. Nur bei Behandlung mit HOCl war die Fluoreszenzintensität bei der Mutante minimal erhöht verglichen mit der Kontrolle.

In den PolyP-freien Zellen in der exponentiellen Phase wurden bei oxidativem Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vermehrt ROS erzeugt, in der stationären Phase dagegen bei HOCl, wenn auch nur minimal. Im WT waren die ROS-Level immer ähnlich hoch, unabhängig vom Oxidationsmittel. Allgemein waren die ROS-Level in Zellen der exponentiellen Phase etwas höher als in der stationären, während in der stationären Phase mehr tote Zellen detektiert wurden als in der exponentiellen. Es wurde festgestellt, dass die  $\Delta ppk-all$  Mutante zu den getes-

teten Zeitpunkten unter oxidativem Stress die gleiche Viabilität aufwies wie der WT. Zudem detektierte man vergleichbare ROS-Level bei WT und Mutante bei Zugabe von HOCl. In der exponentiellen Phase bei Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hingegen waren die ROS-Level der Mutante etwa doppelt so hoch wie bei der Kontrolle bzw. dem Level des WT. Hier zeigte sich ein geringfügiger Phänotyp der  $\Delta ppk-all$  Mutante.

Einen Überlebensvorteil brachte PolyP bei oxidativem Stress jedoch nicht. Schließlich wurden die *R. eutropha* Kulturen bei oxidativem Stress fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Aus Abb. 3.37 ist ersichtlich, dass *R. eutropha* WT sowohl vor dem Stresstest ( $t_0$ ) als auch nach 1 h mit HOCl oder PBS als Kontrolle (Ktrl) meist ein PolyP Granulum hatte. Dieser Befund deckte sich mit der PolyP Quantifizierung (Abb. 3.35). Die Zellen waren optisch unauffällig. Auch die  $\Delta ppk-all$  Mutante zeigte keinerlei optische Auffälligkeiten bei oxidativem Stress.

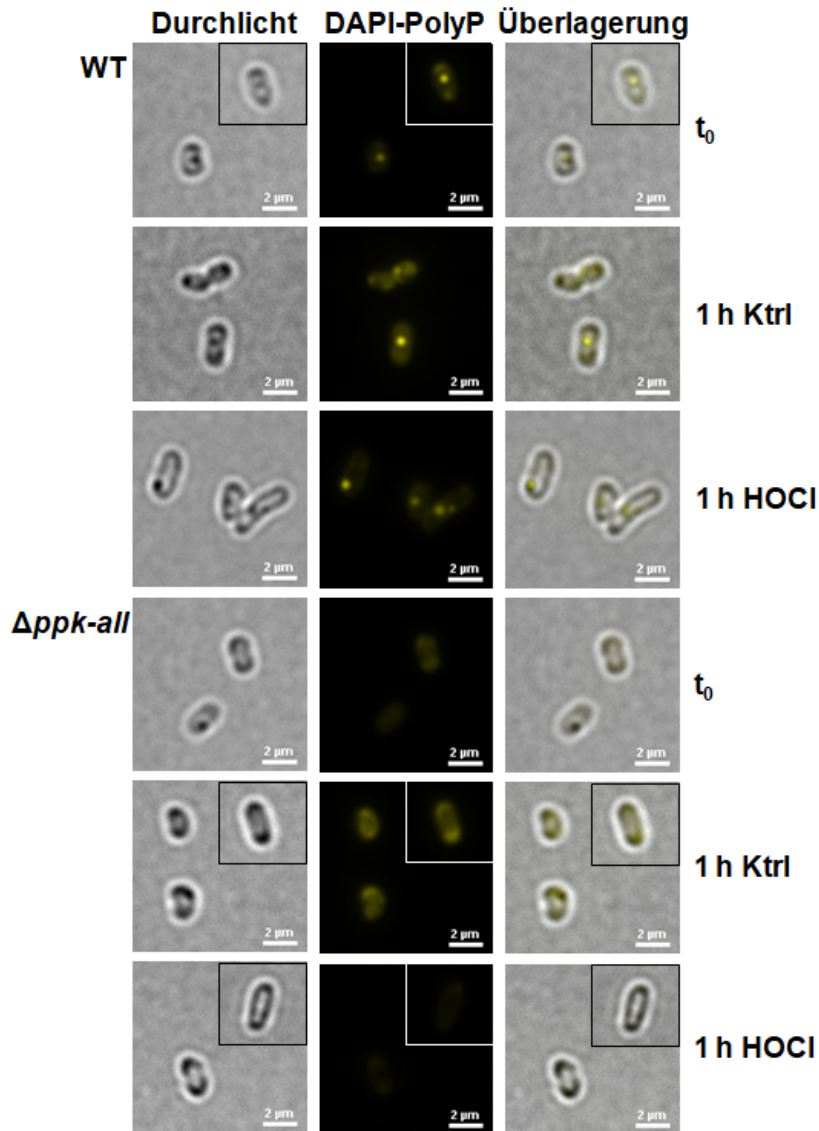


Abb. 3.37: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *R. eutropha* bei oxidativem Stress durch HOCl. *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk-all$  Mutante wurden in MOPS-MSM + 0,2 % Fruktose auf eine  $OD_{600}$  von 0,3 aus einer ü. N. NB Vorkultur angeimpft und für 3 h bei 30 °C und 140 rpm inkubiert. Es wurde 1 mM HOCl oder PBS (Kontrolle) für 1 h zugegeben, dann wurden die Zellen mit 5  $\frac{\mu g}{ml}$  DAPI für 10-15 min gefärbt. Dargestellt sind typische Zellen für die jeweilige Probe, die repräsentativ sind für zwei biologische Replikate. Der Maßstab beträgt 2  $\mu m$ .

### 3.1.4.2 Toleranz gegenüber Oxidantien in *E. coli*

Bei oxidativem Stress in *R. eutropha* wurde kein wesentlicher Zusammenhang zwischen PolyP und Stresstoleranz festgestellt. Daraufhin wurde wiederum geprüft, ob die im vorigen Abschnitt (3.1.4.1) etablierten Experimente in *E. coli* die in der Literatur beschriebenen Phänotypen hervorriefen und damit geeignet waren (Gray *et al.*, 2014; Rao & Kornberg, 1996).



Dazu wurde zuerst mittels PI-Färbung getestet, inwiefern sich eine Behandlung von *E. coli* WT und  $\Delta ppk$  mit HOCl auf deren Viabilität auswirkte. Wie aus Abb. 3.38 A ersichtlich, waren in *E. coli* WT und der  $\Delta ppk$  Mutante in der Kontrolle bei Zugabe von PBS  $5 \pm 1$  % bzw.  $9 \pm 9$  % der Zellen PI-positiv. Der Anteil an PI-positiven Zellen stieg bei Behandlung mit 2 mM HOCl für 15 min im WT nur geringfügig auf  $9 \pm 0,5$  %, in der Mutante jedoch stark auf  $34 \pm 8$  %. Damit wurde erfolgreich reproduziert, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen in *E. coli* die Viabilität bei oxidativem Stress in der Mutante geringer war als beim WT.

Daraufhin wurde untersucht, ob der PolyP Stoffwechsel bei oxidativem Stress beeinflusst wurde. Aus Abb. 3.38 B geht hervor, dass *E. coli* WT bereits vor Zugabe von HOCl einen PolyP Gehalt von  $51 \pm 8 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  hatte, bedingt durch den Wechsel von LB Medium zu MOPS-MSM + 1,32 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  + 0,2 % Glukose mit Aminosäuremangel. Wie in *R. eutropha* sank der PolyP Gehalt leicht in der mit PBS inkubierten Kontrolle, während die Behandlung mit 1 mM HOCl innerhalb von 1 h einen Anstieg des PolyP Gehalts auf  $67 \pm 5 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  bewirkte. Somit initiierte oxidativer Stress durch HOCl eine geringfügige PolyP Akkumulation, die jedoch deutlich geringer ausfiel als die PolyP Akkumulation durch den *nutrient downshift* in MOPS-MSM + 0,2 % Glukose. Die  $\Delta ppk$  Mutante war zu jedem Zeitpunkt PolyP-frei.

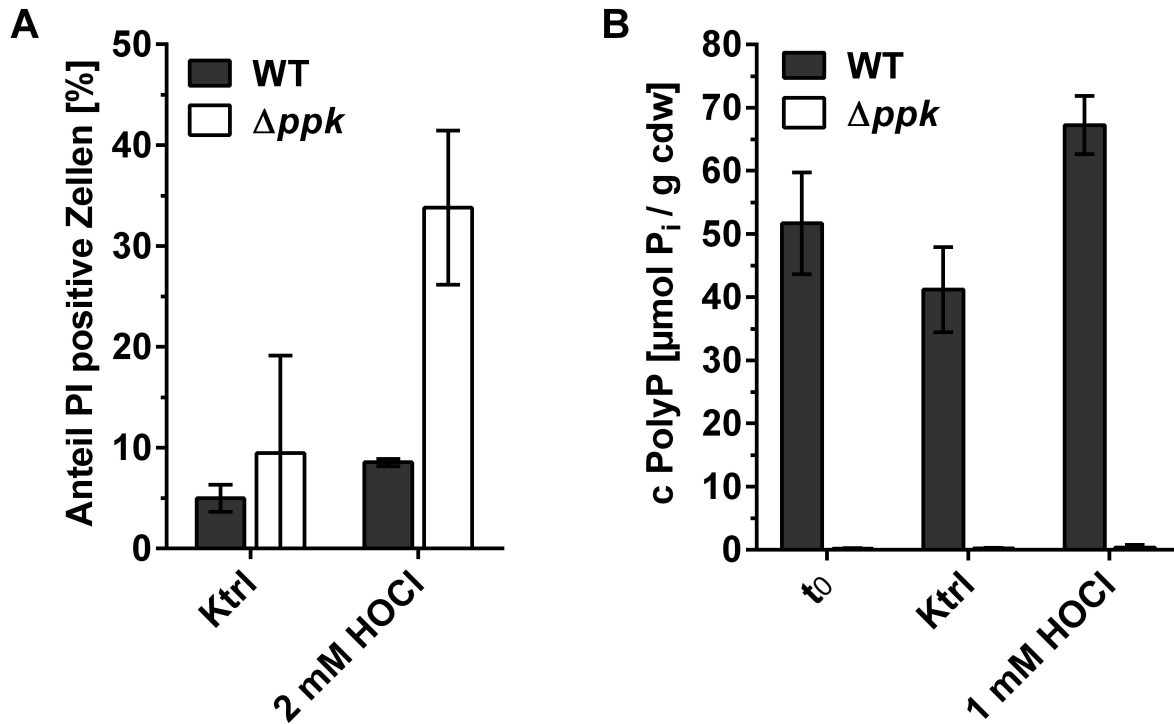


Abb. 3.38: Bestimmung der Viabilität und des PolyP Gehalts von *E. coli* WT und  $\Delta ppk$  bei oxidativem Stress. A) In MOPS-MSM + 0,2 % Glukose kultivierte *E. coli* WT und  $\Delta ppk$  Mutante wurden in der exponentiellen Phase nach 6 h Kultivierung für 15 min mit 2 mM HOCl behandelt, die Kontrolle (Ktrl) mit PBS. Anschließend wurden die Zellen mit PI gefärbt, Fluoreszenzmikroskopiebilder aufgenommen und die PI-positiven und PI-negativen Zellen auf den Bildern ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte PI-positiver Zellen in Relation zur gesamten Zellzahl mit SD von zwei biologischen Replikaten mit  $292 \leq n \leq 606$  Zellen.

B) *E. coli* WT und die  $\Delta ppk$  Mutante wurden in MOPS-MSM + 0,2 % Glukose auf eine  $OD_{600}$  von 0,3 aus einer ü. N. NB Vorkultur angeimpft und für 3 h bei 30 °C und 140 rpm inkubiert. Es wurde 1 mM HOCl oder PBS (Kontrolle) für 1 h zugegeben, dann 50 ml Kultur geerntet, aus den lyophilisierten Zellen das PolyP mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung isoliert und mit ScPPX enzymatisch verdaut zu Monophosphat. Der Phosphatgehalt wurde mit dem Sb-Ascorbat-Assay quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SD aus zwei biologischen Replikaten mit je technischen Triplikaten.

Nachdem detektiert wurde, dass in *E. coli* bei Kultivierung in MOPS-MSM + 0,2 % Glukose bzw. bei Behandlung mit HOCl PolyP (Abb. 3.38) in der gleichen Größenordnung wie in *R. eutropha* (Abb. 3.35) gebildet wurde, blieb unklar, in welcher Form das PolyP in *E. coli* vorhanden und lokalisiert war. Durch Färbung dieser Zellkulturen mit DAPI und Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop (Abb. 3.39) konnte in diesem Zusammenhang erstmals gezeigt werden, dass PolyP in *E. coli* granuläre Strukturen bildete. Meist befand

sich ein Granulum am Zellpol, selten auch an beiden Zellpolen oder mittig. In der  $\Delta ppk$  Mutante waren bei oxidativem Stress üblicherweise keine Strukturen mit DAPI gefärbt im Gegensatz zum Hitzestress (Abb. 3.32).

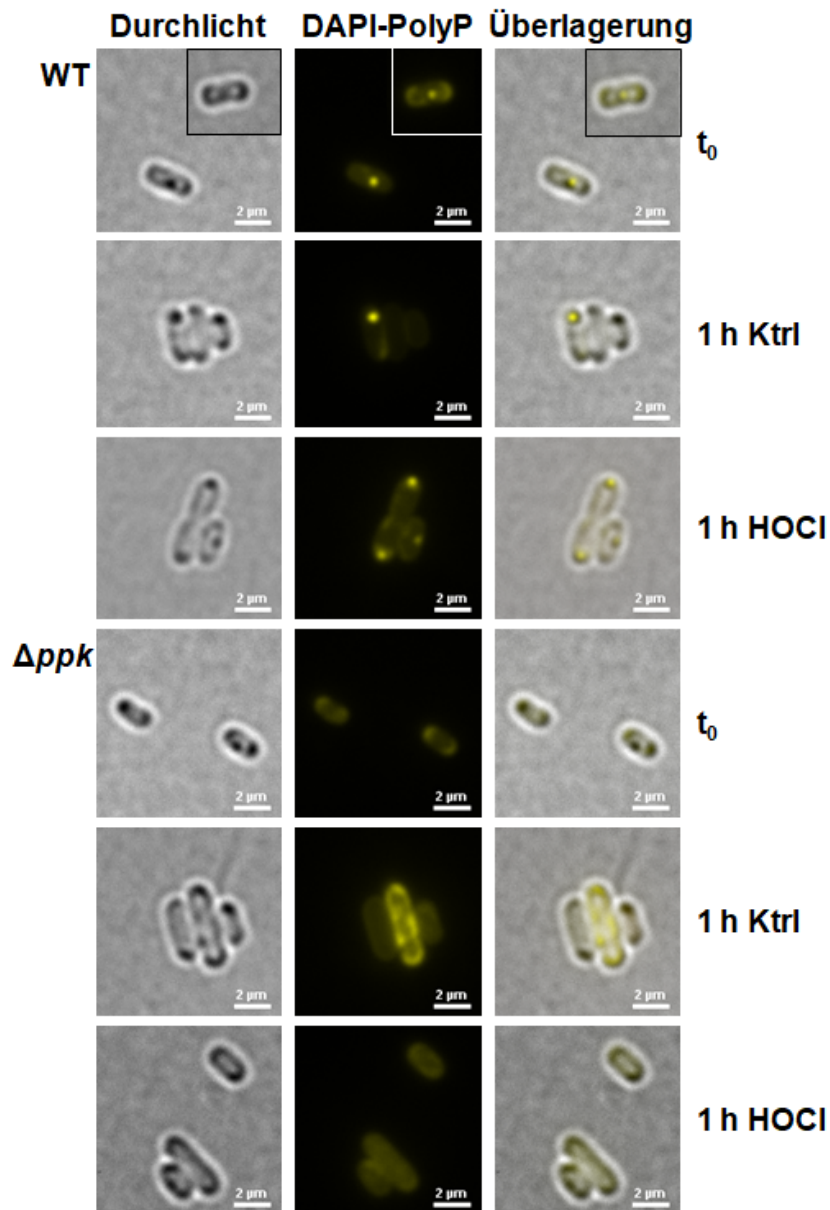


Abb. 3.39: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *E. coli* bei oxidativem Stress durch HOCl. *E. coli* WT und die  $\Delta ppk$  Mutante wurden in MOPS-MSM + 0,2 % Glukose auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 aus einer ü. N. NB Vorkultur angeimpft und für 3 h bei 30 °C und 140 rpm inkubiert. Es wurde 1 mM HOCl oder PBS (Kontrolle) für 1 h zugegeben, dann wurden die Zellen mit 5  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  DAPI für 10-15 min gefärbt. Dargestellt sind typische Zellen für die jeweilige Probe, die repräsentativ sind für zwei biologische Replikate. Der Maßstab beträgt 2 μm.

Die Ergebnisse der Versuche in *E. coli*, dass der WT eine erhöhte Viabilität gegenüber oxidativem Stress besaß als die PolyP-freie Mutante, bestärkten die Schlussfolgerungen

aus den Versuchen mit *R. eutropha*, dass in diesem Organismus tatsächlich kein Zusammenhang zwischen PolyP und der Stresstoleranz gegenüber Oxidationsmittel bestand, abgesehen von einem erhöhten ROS-Level in PolyP-freien Zellen bei Behandlung mit 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, deren Auswirkung auf die Zellen nicht näher bekannt ist. Inwiefern die PolyP Akkumulation für die Stresstoleranz von Bedeutung ist, konnte hier nicht beantwortet werden, da die PolyP Synthese in diesem Versuch in erster Linie aus dem *nutrient downshift* resultierte.

#### **3.1.5 Untersuchung des Einflusses von PolyP auf die Motilität in *R. eutropha***

Motilität bezeichnet die selbstständige Bewegung von Bakterien auf Oberflächen und in Flüssigkeiten z.B. zur Nährstoffsuche oder dem Ausweichen von unerwünschten Substanzen wie Toxinen. In einigen Bakterien ist die Fortbewegung abhängig von PolyP oder dem Phosphatstoffwechsel zugehörigen Proteinen (Rashid *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde getestet, ob das Fehlen von PolyP einen Einfluss auf die Motilität hatte. Dazu wurden *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk-all$  Mutante in NB Medium angezogen, bis hochgradig motile Zellen im Lichtmikroskop beobachtet werden konnten, und in starker Verdünnung auf Schwimm- oder Schwärmplatten aufgetropft. Diese waren horizontal ausgerichtet und wurden erschütterungsarm bei 30 °C für 24 h inkubiert.

Aus Abb. 3.40 ist ersichtlich, dass sich *R. eutropha* auf Schwimmagar kreisförmig ausbreitete, während sich die Kultur auf Schwärmagar in ungleichmäßigen Verästelungen ausbreitete. Es bestand kein Unterschied in der Motilität zwischen *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk-all$  Mutante.

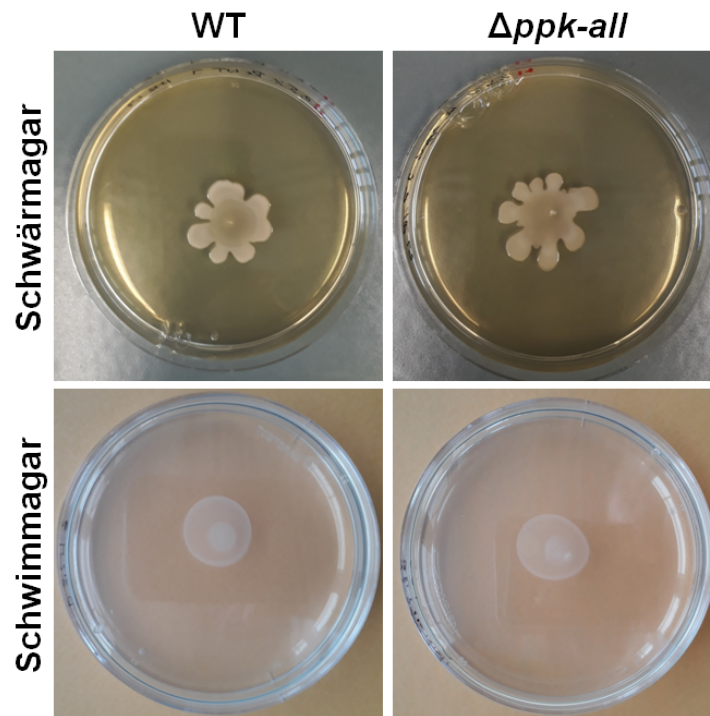


Abb. 3.40: Schwimm- und Schwärmotilität bei *R. eutropha*. *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk$ -*all* Mutante wurden in drei aufeinanderfolgenden NB Kulturen für je 24 h bei 30 °C angezogen. Die OD<sub>600</sub> wurde auf 0,1 eingestellt und 5  $\mu$ l Zellsuspension auf Schwärmagar oder Schwimmagar aufgetropft und für 24 h bei 30 °C horizontal ohne Erschütterungen inkubiert. Die Bilder zeigen einen repräsentativen Versuch von fünf technischen Replikaten.

In *R. eutropha* wurde eine Funktion von PolyP als Phosphatspeicher aufgedeckt, der bei Phosphatmangel einen Wachstumsvorteil gegenüber PolyP-freien Zellen hat. Eine Funktion bei Toleranz gegen Hitze und oxidativen Stress oder bei der Motilität wurde ausgeschlossen. Im folgenden Abschnitt wurde nach Hinweisen für weitere Funktionen von PolyP gesucht. Um herauszufinden, in welche Prozesse dieses Biopolymer involviert ist, wurden Proteine untersucht, die mit PolyP interagieren.

### 3.2 Identifizierung und Charakterisierung PolyP-assoziierter Proteine

PolyP bindet Metallionen, tritt aber auch mit einer Vielzahl von Proteinen in Wechselwirkung. Dazu gehören zum Einen metabolische Enzyme, die PPKs, zum Anderen Proteine mit oft unbekannter Funktion, von denen einige die spezifische PolyP-Bindedomäne CHAD besitzen. In *R. eutropha* wurden bereits die sieben PPKs PPK1a, PPK1b, PPK2a, PPK2b, PPK2c, PPK2d und PPK2e entdeckt, von denen PPK1a, PPK2c, PPK2d und PPK2e an PolyP gebunden vorliegen (Tumlirsch *et al.*, 2015). Zudem wurden die zwei

CHAD-Proteine PptA und PptB sowie einige weitere Proteine mit unbekannter Funktion als PolyP assoziiert identifiziert und teilweise charakterisiert (Tumlirsch, 2017; Tumlirsch & Jendrossek, 2017).

### 3.2.1 Proteomanalyse neuer PolyP-assoziierter Proteine

#### 3.2.1.1 Identifizierung PolyP gebundener Proteine mittels Pulldown

Es wird vermutet, dass neben den bereits bekannten Proteinen weitere PolyP assoziierte Proteine existieren mit potentiell verschiedenen zellulären Funktionen. Die Aufklärung der Identität und Funktion dieser Proteine kann weiteren Aufschluss über die Funktion von PolyP und dessen Rolle in zellulären Netzwerken geben. Zur Identifizierung weiterer spezifischer PolyP assoziierter Proteine wurde ein Pulldown mit isolierten PolyP Granula durchgeführt. Für die Granula Isolation wurden *R. eutropha* WT und die  $\Delta pptA$  Mutante in 400 ml NB Medium für 24 h bei 30 °C kultiviert und geerntet. Darüber hinaus wurde ein Pulldown mit der  $\Delta ppk-all$  Mutante als Negativkontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden mittels French press lysiert und die PolyP Granula im Rohextrakt mittels Zentrifugation und Filtration angereichert nach einem veränderten Protokoll auf Grundlage von Tumlirsch, 2017 und Streichan und Schön, 1991.

Im Protokoll von Tumlirsch wurde der Rohextrakt zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zunächst zweimal mit 10 mM HEPES gewaschen, dann in 10 mM HEPES resuspendiert und filtriert. Das Filtrat wurde ultrazentrifugiert für 35 min bei 35000 rpm bei 4 °C und das entstandene Pellet mit PolyP und Proteinen in 2 % SDS gelöst (Tumlirsch, 2017). Die Schwachstelle an diesem Verfahren ist, dass derselbe Puffer zum Waschen des Pellets und Lösen des PolyPs ist, wodurch mit starken Verlusten zu rechnen ist.

Beim Protokoll von Streichan und Schön, 1991 wurde der Rohextrakt zentrifugiert bei 3000 *g* für 10 min, der Überstand in einem zweiten Schritt bei 10000 *g* für 30 min zentrifugiert und das Pellet in 0,25 M Saccharose resuspendiert.

Im Vergleich besaß die isolierte Fraktion nach dem Protokoll von Streichan und Schön, 1991 eine deutlich größere Menge an DAPI-gefärbten Strukturen (Abb. 3.41 B) als bei der Herstellung nach Tumlirsch, 2017. Daher wurde dieses Protokoll als Grundlage für ein optimiertes Verfahren zur Granulaisolation verwendet und um den Filtrationsschritt aus Tumlirschs Protokoll nach dem ersten Zentrifugationsschritt ergänzt, um die Reinheit zu erhöhen. Das entstandene Pellet durch den letzten Zentrifugationsschritt, gezeigt in Abb. 3.41 A, wurde zunächst mit H<sub>2</sub>O abgespült, um den grauen, weichen Rand zu entfernen (vgl. Abschnitt 2.6.11). Im weißen, schwer wasserlöslichen Pellet lagen PolyP Granula und Proteine angereichert vor.

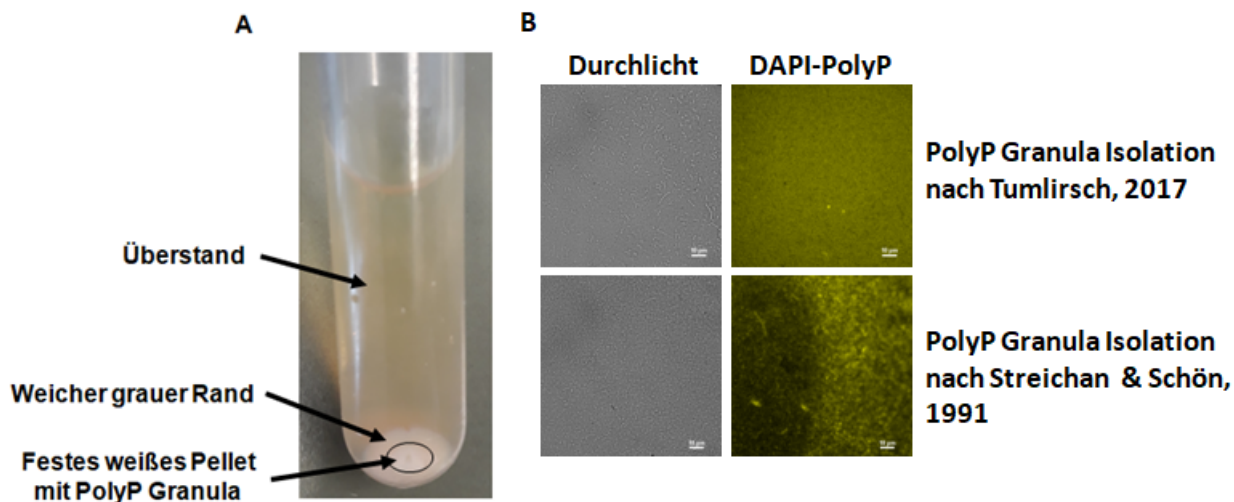


Abb. 3.41: Probe mit angereicherten PolyP Granula aus *R. eutropha* nach verschiedenen Protokollen. A) Optimiertes Protokoll: Eine 400 ml NB Kultur von *R. eutropha* WT wurde für 24 h bei 30 °C kultiviert und geerntet. Die Zellen wurden mittels French press lysiert und Zelltrümmer bei 3000 *g* für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Rohextrakt Überstand wurde filtriert mit einem Filter der Porengröße 0,2 µm. Das Filtrat wurde zentrifugiert bei 10000 rpm für 30 min bei 4 °C. Das resultierende Pellet bestand aus einem weichen, grauen Rand und einem weißen, festen Kern (schwarz umrandet) mit den angereicherten PolyP Granula und Proteinen. Der weiche Rand wurde mit 1 ml H<sub>2</sub>O abgespült. B) Vergleich der ursprünglichen Protokolle: Es wurde eine 400 ml NB Kultur von *R. eutropha* WT für 18 h bei 30 °C kultiviert und geerntet. Aus je 200 ml Kultur wurden PolyP Granula isoliert, nach dem Protokoll von Tummlirsch, 2017 oder dem Protokoll von Streichan und Schön, 1991. Das resultierende PolyP enthaltende Pellet wurde in 100 µl 2 % SDS bzw. 100 µl 0,25 M Saccharose resuspendiert. Davon wurden 10 µl mit 0,5 µl 0,1 mM DAPI für 12 min auf Eis gefärbt und mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Der Maßstab beträgt 10 µm. In beiden Proben waren im Durchlicht granuläre Strukturen sichtbar, in der Präparation nach Streichan und Schön, 1991 waren deutliche PolyP-spezifische DAPI-Fluoreszenzsignale detektierbar, während nach Tummlirsch, 2017 einheitliches Hintergrundsignal detektiert wurde.

Qualitativ nachgewiesen wurde das PolyP aus dem optimierten Protokoll im 15 % PolyP Gel (Abb. 3.42). Von den 200 µl Probe wurden 40 µl auf das Gel aufgetragen. Das verwendete Protokoll führte bei *R. eutropha* WT und der  $\Delta pptA$  Mutante zu einer Anreicherung von PolyP, das im PolyP Gel nur minimal migrierte, also offenbar ein hohes Molekulargewicht hatte. In der  $\Delta ppk-all$  Mutante dagegen wurde wie erwartet kein PolyP detektiert.

Eine quantitative Bestimmung des auf diese Weise isolierten PolyPs war nicht möglich, da ein Verdau mit ScPPX für eine Phosphatbestimmung nicht funktionierte.

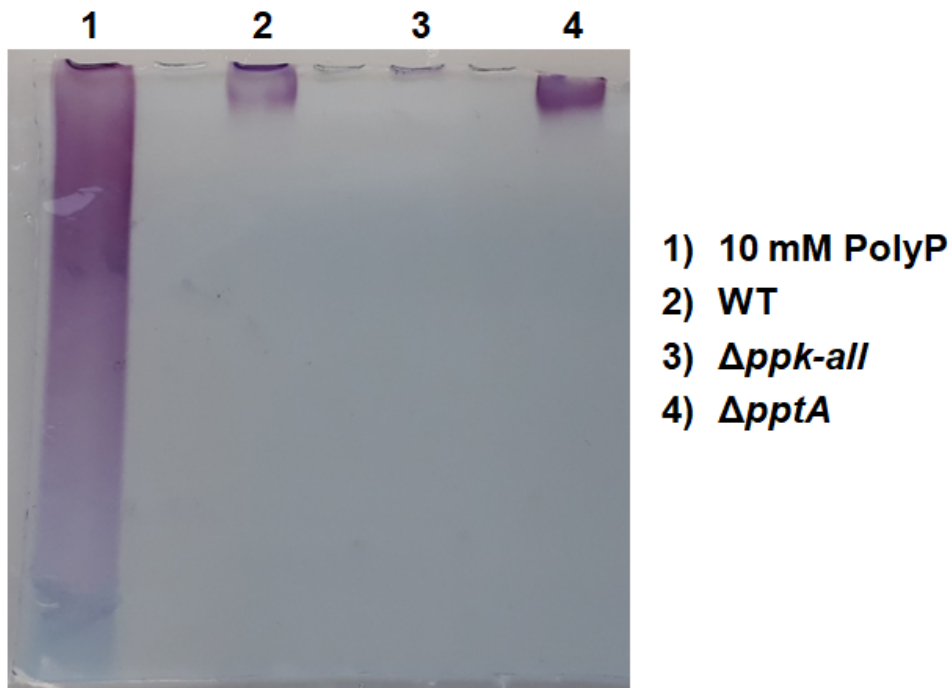


Abb. 3.42: PolyP Gel der PolyP Granula angereicherten Fraktionen. Ein 15 % PolyP Gel wurde beladen mit 40  $\mu$ l Probe + 40  $\mu$ l 2x orange dye. Es wurde in TBE-Puffer für 3 h bei konstant  $V=300$  V bei 4 °C laufen gelassen. Das PolyP wurde mit Toluidinblau gefärbt und das Gel mit  $H_2O$  entfärbt.

Für die Proteomanalyse wurde die PolyP Granula angereicherte Fraktion mit Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert, um die Proteine vom Biopolymer zu trennen. Die Proben wurden danach im SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 3.43).

Daraus ist ersichtlich, dass in der PolyP Granula angereicherten Fraktion viele Proteine im Molekulargewichtsbereich von weniger als 10 kDa bis über 100 kDa vorhanden waren. Dies galt für die PolyP-haltigen Stämme ebenso wie für die  $\Delta ppk-all$  Mutante und zeigt, dass diese Negativkontrolle unerlässlich ist zum Ausschließen falsch positiver Treffer.

Von denselben PolyP Granula angereicherten Fraktionen wurde eine Proteomanalyse durchgeführt. Dazu wurden die Proteine in einem separaten SDS-Gel über eine Laufstrecke von etwa 1 cm aufgetrennt, mit Trypsin verdaut und mit Acetonitril aus dem SDS-Gel isoliert. Die entstandenen Fragmente wurden mittels LC-MS analysiert (durchgeführt vom Proteomcenter der Universität Tübingen, AG Macek). Dabei wurden im WT insgesamt 1081 Proteine identifiziert, in der  $\Delta pptA$  Mutante 1133 und in der  $\Delta ppk-all$  Mutante 1222. Zur Eingrenzung der Daten auf die mit großer Wahrscheinlichkeit PolyP gebundenen Proteine wurden nur Treffer berücksichtigt, bei denen das Peptidfragment zu über 5 % mit der Sequenz des zugeordneten Proteins übereinstimmte. Sehr kurze Peptidsequenzen von 2-6 Aminosäuren sind mit hoher Wahrscheinlichkeit in mehreren Proteinen zu finden, können also mehr als einem Protein zugeordnet werden und sind damit unspezifisch. Zweitens wurden alle Proteine ausgeschlossen, die auch mit über 5 % Sequenzübereinstimmung in



der  $\Delta ppk-all$  Mutante zu finden waren. Die vollständige Liste der Proteomdaten ist im Anhang zu finden.

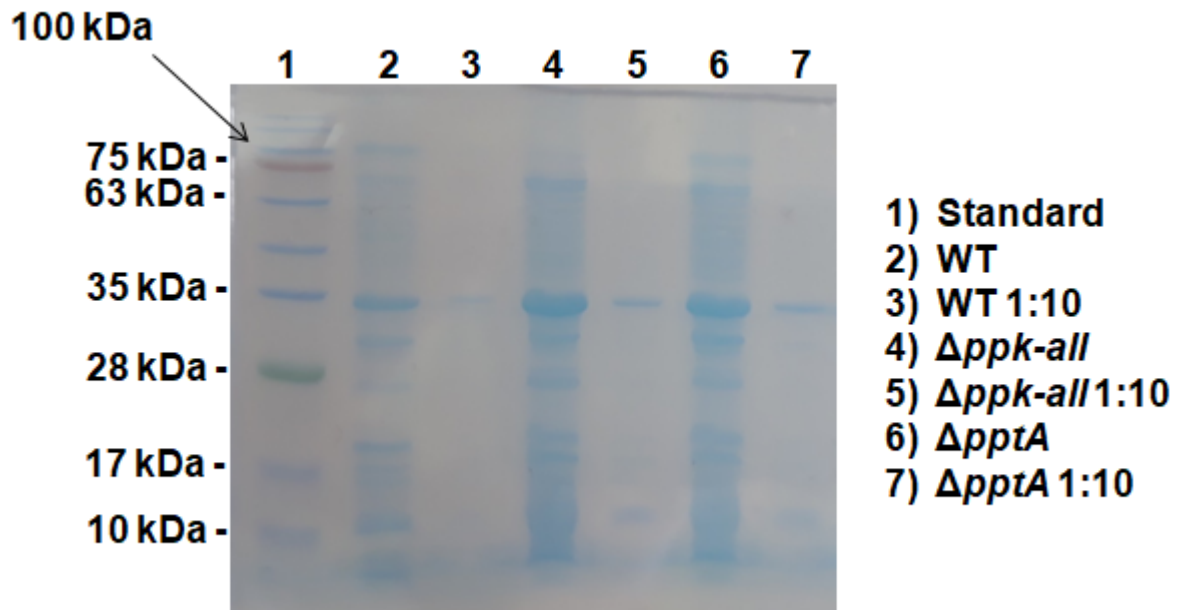


Abb. 3.43: Analyse der Proteine in den PolyP Granula angereicherten Fraktionen mit SDS-PAGE. 10  $\mu$ l Probe bzw. einer 1:10 Verdünnung mit  $H_2O$  der PolyP angereicherten Fraktion wurden mit 20  $\mu$ l 3x Laemmli-Puffer für 5 min bei 95 °C denaturiert. Davon wurden 15  $\mu$ l im 12 % SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt und das Gel mit  $H_2O$  entfärbt.

In den Tabellen 3.3 und 3.4 ist eine Auswahl der Proteine dargestellt, die spezifisch in der PolyP Granula angereicherten Fraktion in *R. eutropha* WT bzw. der  $\Delta pptA$  Mutante gefunden wurden, aber nicht in der  $\Delta ppk-all$  Mutante. Identifiziert wurden Proteine, die mit verschiedenen zellulären Strukturen und Funktionen in Zusammenhang stehen. Es wurden die PPK1a, PPK2c und PPK2d sowie das CHAD-Protein PptA gefunden. Darüber hinaus wurden mehrere Enzyme aus dem Nukleotidstoffwechsel (z.B. Guanylatkinase, GTP-Cyclohydrolase) identifiziert, Proteine, die im Zusammenhang mit der Zellwandsynthese stehen (z.B. D-Ala-D-Ala-Ligase), Proteine aus dem Bereich der Transkription, Translation oder Regulation der Genexpression sowie Proteine mit unbekannter Funktion.

Tab. 3.3: Auswahl identifizierter Proteine in der PolyP Granula angereicherten Fraktion von *R. eutropha* WT. Die Peptide stimmten mit  $\geq 5\%$  der Proteinsequenz überein und kamen in der  $\Delta ppk\text{-}all$  Mutante mit  $< 5\%$  Sequenzübereinstimmung vor.

| n Peptide | Gennummer | Annotation   |
|-----------|-----------|--|
| 4         | A2437     | PPK1a  |
| 3         | A1212     | PPK2c  |
| 2         | A1271     | PPK2d  |
| 6         | A0104     | PptA   |
| 1         | B1967     | GTP Cyclohydrolase   |
| 5         | B0702     | konserviertes hypothetisches Protein                               |
| 4         | A2800     | Uncharakterisiertes Protein involviert in äußere Membran Biogenese |
| 3         | B0177     | konserviertes Protein  |
| 1         | A1984     | konserviertes Protein  |
| 2         | A3271     | D-Ala-D-Ala Ligase   |
| 2         | A3363     | Endo- $\alpha$ -1,4-polygalaktosaminidase Vorläufer                |
| 2         | A0953     | Guanylatkinase   |
| 3         | A3333     | Ribosom-bindende ATPase YchF                                       |
| 6         | A1273     | konserviertes Protein  |
| 4         | A0965     | konserviertes Protein  |

Bei den isolierten Proteinen des PolyP Granula Pulldowns von *R. eutropha*  $\Delta pptA$  wurde zusätzlich zu den PPKs, die bereits im WT auftraten, noch die PPK2a entdeckt. Sämtliche PPKs wurden mit höherer Fragmentanzahl als im WT gefunden. Einige Proteine, wie Endo- $\alpha$ -1,4-Polygalaktosaminidas Vorläufer (A3363), Ribosom-bindende ATPase YchF (A3333) oder Guanylatkinase (A0953) kamen in der Mutante nicht vor. Andere Proteine wie eine GTPase für die Biosynthese der kleinen ribosomalen Untereinheit (A2711), ein LysR Transkriptionsregulator (B1472) oder ein Außenmembran Effluxprotein (A2296) kamen ausschließlich in dieser Mutante vor.

In keiner der untersuchten Proben wurde das zweite CHAD-Protein PptB oder die PPK1b oder PPK2e gefunden.

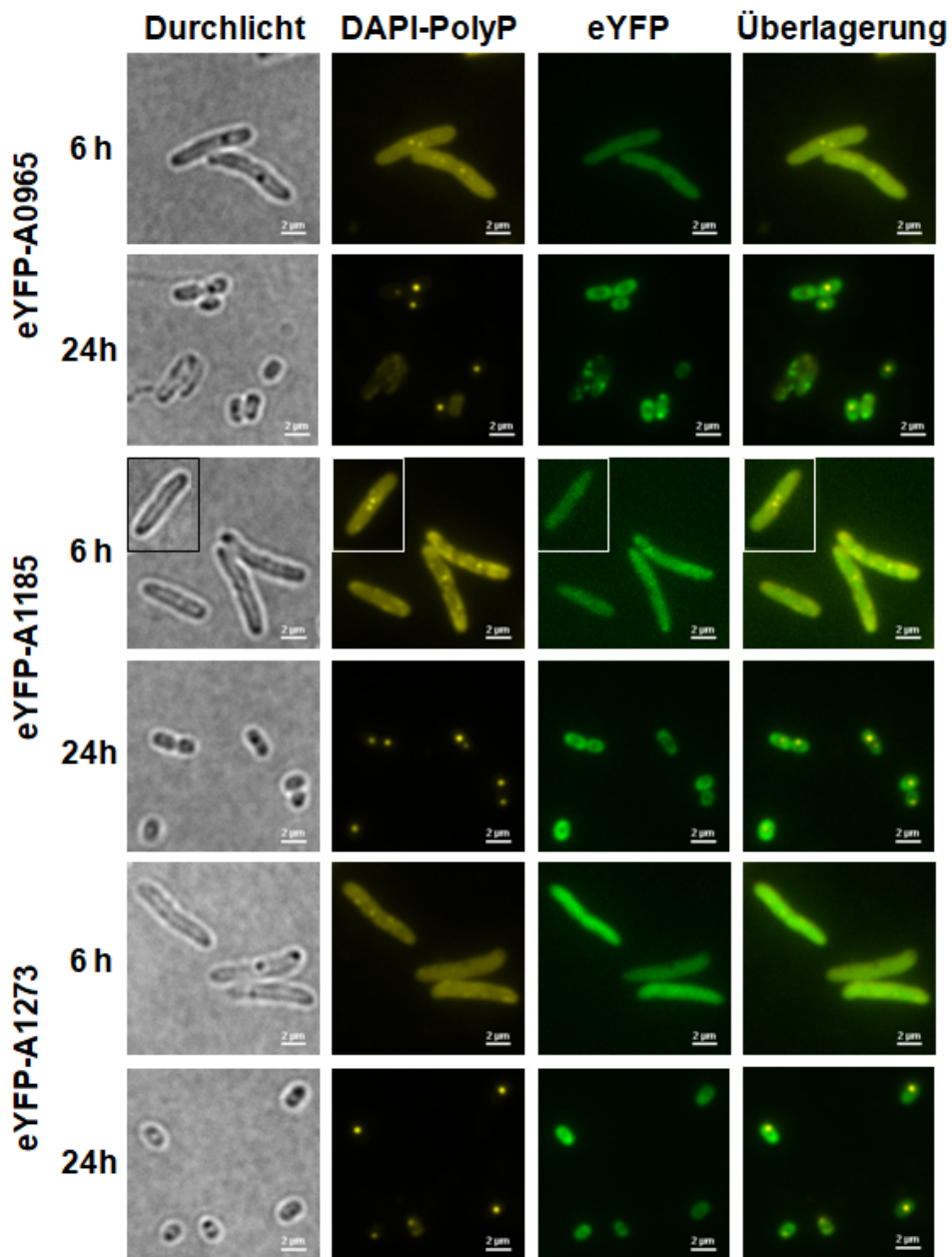
Tab. 3.4: Auswahl identifizierter Proteine in der PolyP Granula angereicherten Fraktion von *R. eutropha*  $\Delta pptA$ . Die Peptide stimmten mit  $\geq 5\%$  der Proteinsequenz überein und kamen in der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante mit  $< 5\%$  Sequenzübereinstimmung vor.

| n Peptide | Gennummer | Annotation   |
|-----------|-----------|--|
| 12        | A2437     | PPK1a  |
| 3         | A0226     | PPK2a  |
| 6         | A1212     | PPK2c  |
| 10        | A1271     | PPK2d  |
| 10        | A2711     | GTPase für Biosynthese der kleinen ribosomalen Untereinheit        |
| 2         | B1967     | GTP Cyclohydrolase   |
| 9         | B0702     | konserviertes hypothetisches Protein                               |
| 6         | A2800     | Uncharakterisiertes Protein involviert in äußere Membran Biogenese |
| 3         | B0177     | konserviertes Protein  |
| 2         | A1984     | konserviertes Protein  |
| 4         | A1273     | konserviertes Protein  |
| 9         | A0965     | konserviertes Protein  |
| 5         | B1472     | Transkriptionsregulator LysR Familie                               |
| 6         | A2296     | Außenmembran Effluxprotein   |

### 3.2.1.2 Lokalisationsstudien der potentiellen PolyP assoziierten Proteine

Eine Auswahl der im vorherigen Abschnitt identifizierten PolyP gebundenen Proteine wurde mit eYFP als Reporter fusioniert und in *R. eutropha* in NB Medium überexprimiert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie der DAPI-gefärbten Zellen wurde überprüft, ob die eYFP-markierten Proteine mit PolyP assoziiert waren.

Aus Abb. 3.44 ist zu entnehmen, dass eYFP-A0965, eYFP-A1185, eYFP-A1273, eYFP-A3333 und eYFP-A3363 jeweils löslich vorlagen in der exponentiellen Phase wie auch stationären Phase auch bei Anwesenheit von PolyP Granula. Es fand keine Kollokalisierung der ausgewählten Proteine mit PolyP statt.



Fortsetzung folgende Seite

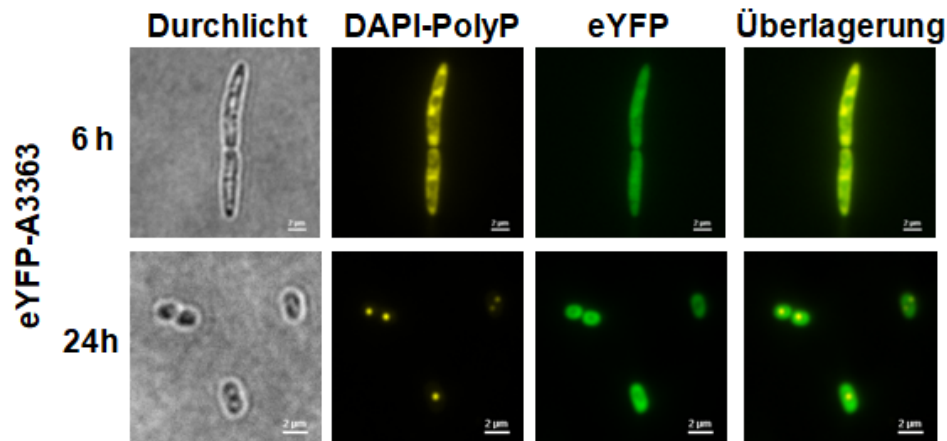


Abb. 3.44: Fluoreszenzmikroskopie potentieller PolyP assoziierter Proteine mittels eYFP-Markierung. In *R. eutropha* WT wurde mit pBBR1MCS-2-P<sub>PhaC</sub>-*eyfp* die angegebenen Gene überexprimiert in einer Kultur in NB Medium bei 30 °C und 140 rpm. Nach 6 h und 24 h wurden 10 µl Probe genommen, ggf. verdünnt mit 0,9 % NaCl und mit DAPI gefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop wurde die DAPI-PolyP Fluoreszenz und eYFP-Fluoreszenz verfolgt. Die dargestellten Zellen sind repräsentativ für den jeweiligen Zeitpunkt. Der Maßstab beträgt 2 µm.

### 3.2.2 Charakterisierung der CHAD-Proteine PptA und PptB

Die Proteine PptA und PptB enthalten die spezifische PolyP-Bindedomäne CHAD (Lorenzo-Orts *et al.*, 2019; Wertén *et al.*, 2019). CHAD-Proteinen wird allgemein eine Funktion im PolyP- und Nukleotidstoffwechsel zugeschrieben (Iyer & Aravind, 2002). Eine Funktion von PptA und PptB ist in *R. eutropha* nicht bekannt. Es wird vermutet, dass diese Proteine am PolyP Stoffwechsel, der Granulaverteilung oder der Kommunikation mit anderen subzellulären Strukturen beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden diese beiden Proteine strukturell und funktional näher untersucht, insbesondere PptA, das ausschließlich aus einem 50 Aminosäuren langen N-Terminus und der CHAD besteht, während PptB neben der CHAD auch eine CYTH Domäne besitzt.

#### 3.2.2.1 Untersuchung der Expressionsmuster von PptA und PptB

In der Proteomanalyse der PolyP Granula aus Zellen nach 24 h Kultivierung in NB Medium wurde das CHAD-Protein PptA, aber nicht PptB gefunden. Es wurde daher zunächst der zeitliche Verlauf und die Stärke der Expression der CHAD-Gene in *R. eutropha* mittels qRT-PCR untersucht. Dazu wurde *R. eutropha* WT in NB Medium kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde durch qRT-PCR quantifiziert mittels  $\Delta\Delta\text{CT}$  Methode relativ zur Expression der *gyrB* (siehe Abschnitt 2.4.7).

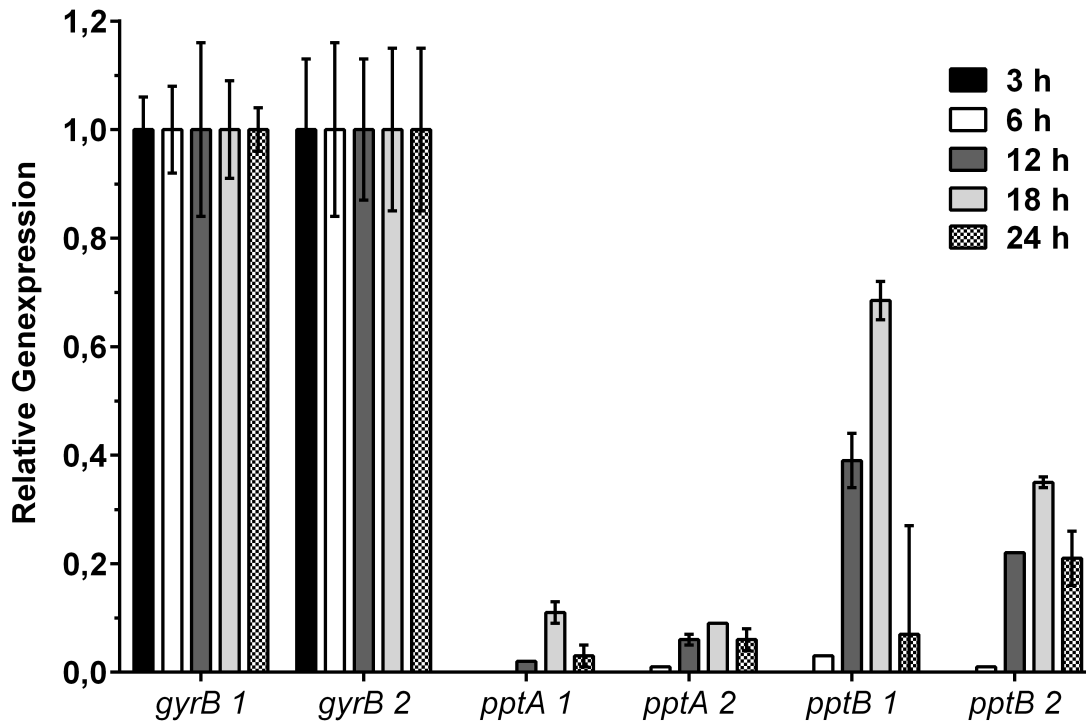


Abb. 3.45: Quantifizierung der Expression von *pptA* und *pptB* in NB Medium in *R. eutropha*. Die mRNA Level von *pptA* und *pptB* bei Kultivierung von *R. eutropha* WT in NB Medium wurden zu den angegebenen Zeitpunkten quantifiziert. Als Referenz diente *gyrB*. Die Datenanalyse erfolgte mit der  $\Delta\Delta\text{CT}$  Methode. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SD von drei technischen Replikaten pro biologischem Replikat. Es wurden zwei biologische Replikate separat dargestellt (1 und 2).

Die detektierten Level der *gyrB* wurden auf 1 normalisiert, die Level der *pptA* und *pptB* entsprechend relativ dazu angegeben. In der frühen bis mittleren exponentiellen Phase bei  $t=3$  h und  $t=6$  h wurden von beiden Genen keine Transkripte bzw. sehr geringe Level bis 5 % relative Expression detektiert. In der frühen stationären Phase bei  $t=12$  h stiegen die mRNA Level und erreichten ihr Maximum bei  $t=18$  h mit etwa 10 % relativer Expression bei *pptA* und 69 % bzw. 35 % relativer Expression bei *pptB*. Anschließend sanken die Level bei  $t=24$  h wieder. Der Verlauf der Expression war in beiden biologischen Replikaten ähnlich, die Werte pro Zeitpunkt unterschieden sich jedoch insbesondere bei *pptB* erheblich. Aus diesem Grund wurden die biologischen Replikate nicht zusammengefasst. Gemeinsam ist den CHAD-Proteinen die Expression in der stationären Phase, wenn auch PolyP Granula üblicherweise vorhanden sind.

### 3.2.2.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der CHAD-Proteine

PptA wurde in der Proteomanalyse der PolyP Granula identifiziert (3.2.1.1) und bereits von Tumlirsch und Jendrossek, 2017 durch Fluoreszenzmarkierung als PolyP-assoziiert

bestätigt. *pptB* wurde zum Zeitpunkt der PolyP Granula Ernte (24 h in NB Medium) exprimiert, war aber im Pulldown nicht enthalten. Laut Tumlrirsch kolokalisiert eYFP-PptB ebenfalls mit PolyP Granula. Hier stehen sich zwei gegensätzliche Ergebnisse gegenüber und es stellt sich die Frage, ob PptB trotz der CHAD nicht an PolyP bindet oder dieses Protein aus anderen Gründen nicht im Pulldown erschien. Um das Ergebnis von Tumlrirsch zu verifizieren, wurde die Lokalisation von eYFP-PptB in *R. eutropha* mittels Fluoreszenzmikroskopie wiederholt.

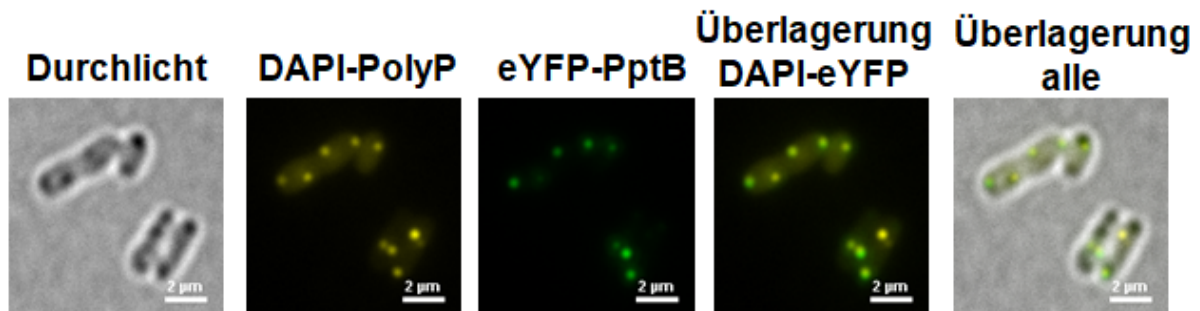


Abb. 3.46: Fluoreszenzmikroskopie von eYFP-PptB in *R. eutropha*. Eine *R. eutropha* WT pBBR1MCS-2-P<sub>PhaC</sub>-*eyfp-pptB* Kultur wurde in NB Medium bei 30 °C und 140 rpm kultiviert. Nach 24 h wurden 10 µl Probe genommen, ggf. verdünnt mit 0,9 % NaCl und mit DAPI gefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop wurde die DAPI-PolyP Fluoreszenz und eYFP-Fluoreszenz verfolgt. Die dargestellten Zellen sind repräsentativ. Der Maßstab beträgt 2 µm.

Bei Überexpression von eYFP-PptB (Abb. 3.46) kolokalisierte das eYFP-Signal mit dem DAPI-PolyP Signal, spricht also für eine Assoziation von PptB mit PolyP Granula. Die Granula wurden dabei von der üblichen Position in der Zellmitte weg an die Zellmembran nahe der Zellpole verlegt. Es gab selten auch Granula ohne PptB. Die hier erhaltenen Befunde stimmen mit denen von Tumlrirsch überein, lassen aber die Frage ungeklärt, warum PptB nicht im Pulldown identifiziert wurde.

### 3.2.2.3 Expression und Reinigung von rekombinantem PptA

Für eine umfassende Untersuchung der Struktur des CHAD-Proteins PptA wurde *pptA* mit einem strep-tag fusioniert, rekombinant in *E. coli* exprimiert und das Protein strep-PptA affinitätschromatographisch isoliert.

*R. eutropha* ist ein Organismus, dessen Genom einen hohen GC-Gehalt von rund 66 % aufweist (Pohlmann *et al.*, 2007). PptA ist darüber hinaus ein Protein mit hohem isoelektrischen Punkt von 11,5, bedingt durch eine große Anzahl an Arginin und Lysin. Die bevorzugte Codonnutzung insbesondere für diese beiden Aminosäuren unterscheidet sich

stark von *E. coli*, dem Organismus, in dem *strep-pptA* rekombinant exprimiert werden sollte, wodurch die Ausbeute von strep-PptA extrem gering ausfiel. Für eine bessere Ausbeute wurde daraufhin *pptA* codonoptimiert für *E. coli* von der Firma Invitrogen synthetisiert (siehe Abschnitt 2.6.2). Alle folgenden Ergebnisse wurden mit codonoptimiertem *strep-pptA* erzielt.

Das codonoptimierte strep-PptA konnte nach Optimierung der Expressionstemperatur und -dauer, der Konzentration des Induktors in geringer, aber detektierbarer Menge aus *E. coli* BL21 über eine Strep-Tactin<sup>R</sup> Säule (IBA) isoliert und gereinigt werden. In Abb. 3.47 ist ein SDS-Gel mit Proben der einzelnen Schritte der Affinitätschromatographie gezeigt.

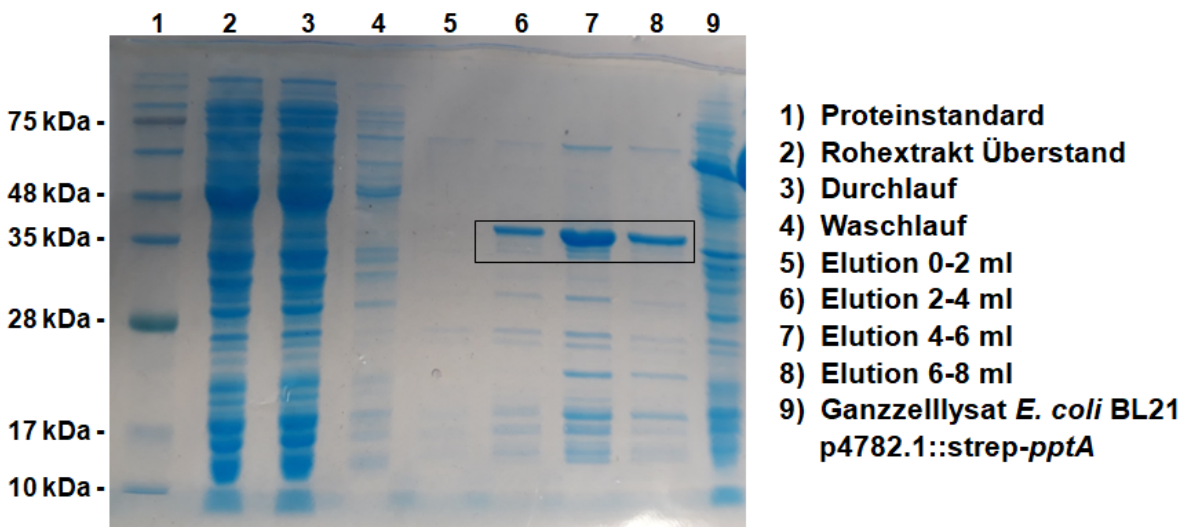


Abb. 3.47: Analyse der Fraktionen der Reinigung von strep-PptA mittels Strep-Tactin<sup>R</sup> Säule durch SDS-PAGE. Codonoptimiertes *strep-pptA* wurde in *E. coli* BL21(DE3)pLysS p4782.1::*strep-pptA* in dreimal 600 ml LB Medium + Kan50 mit 0,1 % Rhamnose induziert und für 6 h exprimiert. Die Zellen wurden geerntet, mit der French press aufgeschlossen (9) und das Ganzzelllysat ultrazentrifugiert. Der Rohextrakt Überstand (2) wurde auf eine Strep-Tactin<sup>R</sup> XT Superflow High Capacity Säule (Säulenvolumen = 5 ml) gegeben, mit Waschpuffer gewaschen (4) und mit Elutionspuffer (100 mM Biotin) in 2 ml Schritten eluiert (5-8). Die Proben wurden, ggf. nach Verdünnung in H<sub>2</sub>O, mit 3x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. 15 µl Probe wurden in einem 12 % SDS-Gel für 30 min bei 25 mA aufgetrennt. Die Proteine wurden mit colloidalem Coomassie gefärbt und das Gel mit H<sub>2</sub>O entfärbt.

Strep-PptA hat ein Molekulargewicht von 37 kDa (Expert Protein Analysis System (ExpASY) Molekulargewichtrechner). Ein Protein mit einer diesem Molekulargewicht entsprechenden Laufverhalten wurde in den Elutionsfraktionen 2-8 ml detektiert (schwarzer Kasten). Daneben beinhalteten diese Fraktionen weitere Proteine, vor allem mit kleinerem Molekulargewicht sowie einem Protein bei etwa 75 kDa. Um zu prüfen, ob tatsächlich



strep-PptA vorlag, wurde mit den eluierten Proben ein Western Blot gegen den strep-tag durchgeführt (Abb. 3.48).

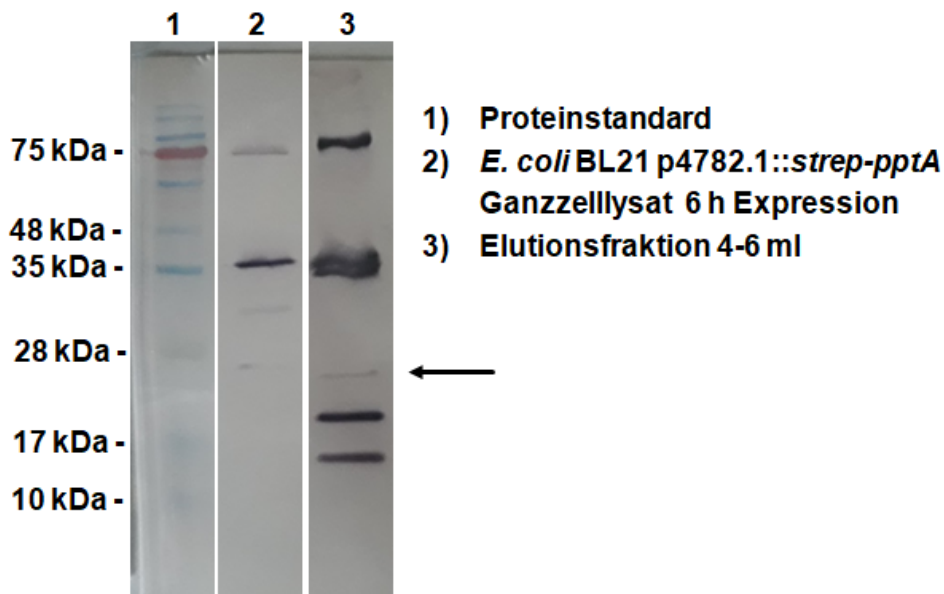


Abb. 3.48: Analyse der Fraktionen der Reinigung von strep-PptA durch Westernblot. Die Proben wurden, ggf. nach Verdünnung, mit 3x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. 15 µl Probe wurde für den Westernblot im 12 % SDS-PA-Gel aufgetrennt. Zur Markierung von strep-PptA wurde ein Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat verwendet, die Detektion erfolgte über eine Reaktion mit NTB und BCIP. Der Pfeil deutet auf das nicht identifizierte Protein.

Für den immunologischen Nachweis des strep-PptA Fusionsproteins wurde Streptavidin verwendet, das an den strep-tag und biotinylierte Proteine bindet, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase für einen colorimetrischen Nachweis über die Umsetzung von BCIP und NTP, wobei ein wasserunlösliches violettes Produkt entsteht. Beim Western Blot in Abb. 3.48 band Streptavidin an verschiedene Proteinbanden im Ganzzellysat des Expressionsstamms *E. coli* BL21(DE3) pLysS mit dem Expressionsplasmid p4782.1::strep-pptA nach 6 h Expression von *strep-pptA* vor der Ernte (Reihe 2) sowie der Elutionsfraktion 4-6 ml (Reihe 3). Im Ganzzellysat (Reihe 2) wurde schwach ein Protein knapp unterhalb der 28 kDa Markierung detektiert, das auch im Zellysat vor Induktion sowie im Expressionsstamm *E. coli* BL21 mit dem Expressionsplasmid p4782.1::strep-lcp nach 6 h Expression zu finden war (Abb. Anhang 5.8). Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um ein biotinyliertes Protein aus *E. coli*, das bei der Reinigung von strep-PptA als Verunreinigung erhalten blieb.

Sowohl im Zellysat des Expressionsstamms als auch in der abgebildeten Elutionsfraktion war eine Proteinbande etwas oberhalb des 35 kDa Standards markiert, was zum Molekulargewicht von strep-PptA mit 37 kDa passt. Zusätzlich gab es eine Bande bei etwa 75 kDa,

was ein strep-PptA Dimer darstellen kann. In der Elutionfraktion waren weiterhin zwei Proteinbanden zwischen 17 und 25 kDa markiert, die Spaltprodukte mit verkürztem C-Terminus sein können, da der strep-tag am N-Terminus detektiert wurde. Ebenso war hier eine Doppelbande bei 37 kDa zu sehen, die das strep-PptA und ein Spaltprodukt mit minimal verkürztem C-Terminus zeigte. Falls PptA mit abgespaltenem N-Terminus vorlag, konnte dieses aufgrund des fehlenden strep-tags nicht detektiert werden und ging während der Reinigung verloren.

Die Gelbanden wurden massenspektrometrisch untersucht, durchgeführt vom Proteomcenter der Universität Hohenheim, wobei verifiziert wurde, dass beide Proteinbanden bei 37 kDa und bei 75 kDa PptA enthielten, während die Bande bei 28 kDa eine Verunreinigung darstellte.

#### **3.2.2.4 Untersuchung der Quartärstruktur von strep-PptA mittels Gelfiltration**

Strep-PptA wurde durch Affinitätschromatographie angereichert und lag als Monomer, Dimer und verkürztes Monomer vor mit geringfügiger Verunreinigung durch ein *E. coli* Protein. Die Dimerisierung war überraschend, da die Proben thermisch und chemisch reduziert und denaturiert waren für die SDS-PAGE. Dies sollte auch Protein-Interaktionen unterbinden.

Um die Quartärstruktur von PptA aufzuklären, wurde daraufhin die native Elutionsfraktion mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) nach dem Molekulargewicht weiter aufgetrennt, kombiniert mit Lichtstreuung in einer Vielzahl von Winkeln (*multiangle light scattering*, MALS). In diesem Verfahren wurde zum Einen die Absorption des Proteins bei  $A_{280}$  gemessen, deren Intensität proportional zur Konzentration des Proteins ist und somit bei kleinen Proteinen sensitiv ist, zum Anderen die Lichtstreuung des Proteins, die bei großen Proteinen stärker ist. Dadurch konnten sowohl Proteine mit geringem Molekulargewicht wie Monomere als auch Proteine mit hohem Molekulargewicht bzw. Oligomere detektiert werden. Die verwendete SEC-Säule war mit Standard-Proteinen kalibriert (Abb. 3.49).

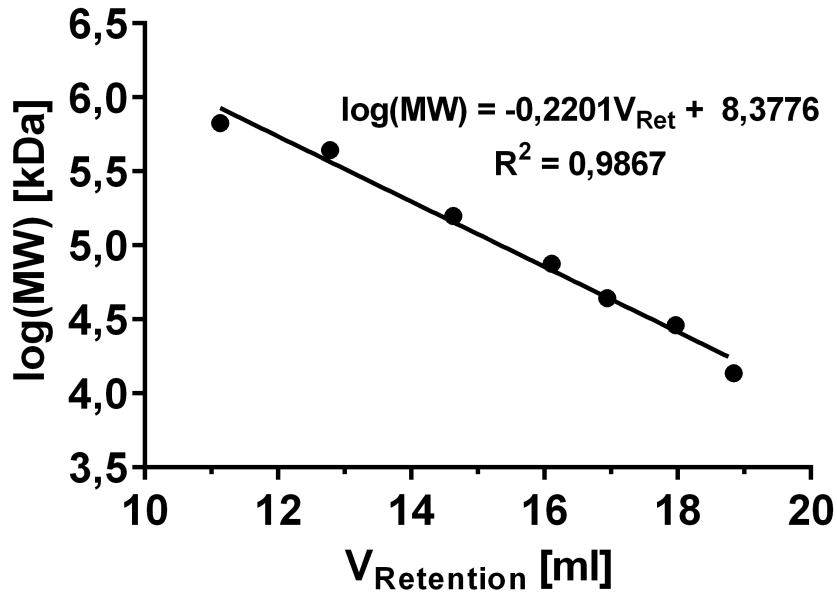


Abb. 3.49: Kalibrierung der Superose 6 Increase 10/300 GL zur Bestimmung des Molekulargewichts mittels FPLC an der ÄKTA pure (GE Healthcare). Es wurden die Kalibrierproteine Thyroglobulin, Ferritin, Aldolase, Ovalbumin, Conalbumin, Carboanhydrase und Ribonuclease A auf die Superose 6 Increase 10/300 GL Säule ( $V=24$  ml) gegeben und mit einer Geschwindigkeit von  $v=0,5$  ml/min aufgetrennt. Durchgeführt von der AG Forchhammer, Universität Tübingen.

Gereinigtes strep-PptA wurde zum Entfernen von Proteinpräzipitat zentrifugiert mit 14800 rpm für 5 min bei  $4^\circ\text{C}$ , dann ggf. mit  $2\ \mu\text{M}$  PolyP für 20 min inkubiert, bevor es auf die FPLC-Säule appliziert wurde. In Abb. 3.50 ist die Intensität der  $A_{280}$  sowie der Lichtstreuung von strep-PptA mit und ohne PolyP abgebildet.

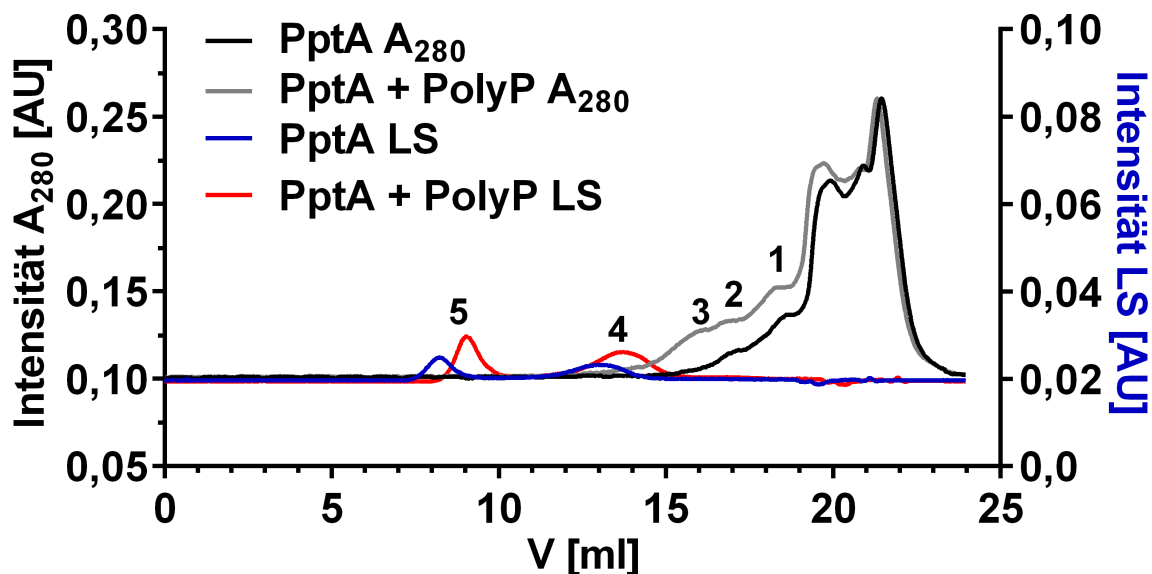


Abb. 3.50: Untersuchung der Quartärstruktur von nativem strep-PptA mit und ohne PolyP über das Molekulargewicht des gereinigten Proteins. Das Molekulargewicht wurde mittels SEC-MALS an der FPLC ÄKTA pure (GE Healthcare) bestimmt. Die Säule Superose 6 Increase 10/300 GL ( $V=24$  ml) wurde mit dem Laufpuffer Puffer A, pH 8,0 äquilibriert. Eine strep-PptA Lösung mit  $c=133$   $\mu\text{g/ml}$  wurde zentrifugiert bei 14800 rpm für 5 min bei  $4^\circ\text{C}$ . Dann wurden falls angegeben mit  $2$   $\mu\text{M}$  PolyP für 20 min inkubiert. Davon wurden  $500$   $\mu\text{l}$  (strep-PptA pur  $66,5$   $\mu\text{g}$ , entspricht  $5,44$   $\mu\text{M}$ ; PptA + PolyP  $65$   $\mu\text{g}$  strep-PptA, entspricht  $5,3$   $\mu\text{M}$ ) mit einer Geschwindigkeit von  $v=0,5$  ml/min auf der Säule aufgetrennt. Detektiert wurden die Lichtstreuung und  $A_{280}$  des Eluats. Die Nummerierung der Peaks bezieht sich auf alle vier Spektren und ist in Tab. 3.5 spezifiziert.

Die Messung der  $A_{280}$  während der Auftrennung der strep-PptA Lösung auf der SEC Säule lieferte Signale zwischen  $16$  ml und  $18,3$  ml Retentionsvolumen, also im Bereich geringen Molekulargewichts. Es gab ein Maximum bei  $18,3$  ml  $V_{\text{Retention}}$  (Peak 1) und  $17,0$  ml (Peak 2). Die Berechnung der Molekulargewichte der strep-PptA Signale über die Kalibriergerade ist in Tab. 3.5 zusammengefasst. Die Strukturvorschläge ergeben sich aus dem vielfachen Molekulargewicht des Moleküls, das als Monomer interpretiert wurde, gerundet auf ganze Zahlen. Peak 1 stellte ein Protein mit einem geringem Molekulargewicht von  $22,7$  kDa dar. Dies war möglicherweise eine Verunreinigung mit dem *E. coli* Protein, das bei der Reinigung mit isoliert wurde, andererseits könnte es ein Spaltprodukt von strep-PptA sein, das auch in den SDS-Gelen (Abb. 3.47) zu sehen waren. Das Protein bei einer Retention von  $17,0$  ml (Peak 2) hatte ein berechnetes Molekulargewicht von  $43,8$  kDa und stellte vermutlich ein strep-PptA Monomer dar. Außerdem waren wohl Moleküle mit sehr geringem Molekulargewicht vorhanden mit einem  $V_{\text{Retention}}$  von  $19$ - $24$  ml, die kleine

Peptide oder andere Substanzen darstellen können. Aufgrund der geringen Ausbeute an rekombinantem strep-PptA wurde auf eine Umpufferung verzichtet, sodass das Protein im Elutionspuffer vorlag und das Biotin nur durch den Laufpuffer verdünnt wurde.

Die LS lieferte zwei Signale, eines bei 8-9 ml (Peak 5) und ein breites Signal mit einem Maximum bei etwa 12,9 ml  $V_{\text{Retention}}$  (Peak 4). Das Signal bei etwa 8 ml deutete auf ein extrem großes Molekül von annähernd 4000 kDa hin, wobei es sich nur um aggregiertes Protein handeln konnte, das für die Analyse unbedeutend war, während das Signal bei 12,9 ml zu einem Protein mit 352 kDa gehörte, also etwa ein strep-PptA Oktamer darstellte. Die Signalintensitäten waren teils sehr gering, insbesondere für die LS, was an der geringen Konzentration von strep-PptA in der Lösung lag und verstärkt wurde durch die Oligomerisierung, da beim Oktamer nur  $\frac{1}{8}$  der Konzentration an Monomer vorlag.

In der Probe war strep-PptA mit stark unterschiedlichen Molekulargewichten vertreten. Es wurden *in vitro* Monomere, Oktamere und ein hochmolekulares Multimer detektiert, das vermutlich aggregiertes Protein darstellte.

Die Quartärstruktur von PptA als PolyP-bindendes Protein könnte durch das Biopolymer beeinflusst werden. Daher wurde auch die Verteilung des Molekulargewichts von strep-PptA in der Probe in Anwesenheit von PolyP gemessen. Aus Abb. 3.50 ist ersichtlich, dass wie bei strep-PptA ohne PolyP mehrere Signale bei der  $A_{280}$  und LS Messung zu finden waren. Peak 1 der  $A_{280}$  korrespondierte mit einem Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 24,2 kDa, Peak 2 eines mit 46,8 kDa, welches ein Monomer darstellen kann. Hier waren die Spektren von strep-PptA mit und ohne PolyP sehr ähnlich. Ein drittes Maximum bei 15,8 ml, das bei strep-PptA ohne PolyP nicht zu sehen war, passt zu einem potentiellen Dimer mit 79,5 kDa.

Die Positionen der LS Signale unterschieden sich leicht von den  $V_{\text{Retention}}$  der Auftrennung der strep-PptA Probe hin zu späterer Elution. Das kann daran liegen, dass PolyP in der Probe vorlag mit einem Einfluss auf die Lichtstreuung, nicht aber in der Referenzmesszelle mit dem Laufpuffer. Peak 5 lag bei 8,82 ml und stellte wohl wiederum aggregiertes Protein dar, während Peak 4 sehr breit war und kein Maximum bestimmt werden konnte. Beispielfhaft wurde das Molekulargewicht bei einem  $V_{\text{Retention}}$  von 13,51 ml und 13,45 ml bestimmt, das Proteine mit einem apparenten Molekulargewicht von 253 kDa bzw. 261 kDa angab. Legt man ein strep-PptA Monomer von 46,8 kDa zugrunde, ergab sich ein Penta- oder Hexamer. Eine potentielle Bindung von PolyP und Addition auf das Molekulargewicht wurde von der Berechnung nicht berücksichtigt.

Wie in Tab. 3.5 zusammengefasst, wurde bei strep-PptA mit PolyP Signale detektiert, die Monomeren, Dimeren, Penta-und/oder Hexameren entsprechen können, während bei reinem strep-PptA Signale für potentielle Mono- und Oktamere zu finden waren. Die Spektren der einzelnen Läufe sind im Anhang abgebildet. Das Eluat wurde in 500  $\mu\text{l}$  Portionen fraktioniert und mit SDS-PAGE sowohl mit Silberfärbung als auch Coomassiefärbung sowie Western Blot auf die Anwesenheit von strep-PptA analysiert. Mit keiner

der Methoden wurde Protein detektiert, vermutlich war die Konzentration in den Proben zu gering.

Tab. 3.5: Zusammenfassung der SEC-Signale und Bestimmung des Molekulargewichts von strep-PptA mit und ohne PolyP

|                           | Peak<br>Nr. | $V_{\text{Retention}}$<br>[ml] | berechnetes<br>MW [kDa] | Strukturvorschlag   |
|---------------------------|-------------|--------------------------------|-------------------------|---------------------|
| <b>strep-PptA</b>         |             |                                |                         |                     |
| A <sub>280</sub>          | 1           | 18,27                          | 22,7                    | Fragment            |
|                           | 2           | 16,97                          | 43,8                    | Monomer             |
| LS                        | 4           | 12,86                          | 352                     | Oktamer             |
|                           | 5           | 8,09                           | 3940                    | 90-mer<br>/Aggregat |
| <b>strep-PptA + PolyP</b> |             |                                |                         |                     |
| A <sub>280</sub>          | 1           | 18,15                          | 24,2                    | Fragment            |
|                           | 2           | 16,84                          | 46,8                    | Monomer             |
|                           | 3           | 15,80                          | 79,5                    | Dimer               |
| LS                        | 4           | 13,51                          | 253                     | Pentamer            |
|                           |             | 13,45                          | 262                     | Hexamer             |
|                           | 5           | 8,82                           | 2740                    | 58-mer<br>/Aggregat |

Es wurden verschiedene Oligomerisierungszustände von strep-PptA in vitro festgestellt. Die Quartärstruktur von strep-PptA konnte in vitro mit diesen Methoden nicht endgültig aufgeklärt werden. Die Präsenz von PolyP führte zu kleineren Oligomeren.

### 3.2.2.5 PolyP Metabolismus in *R. eutropha* $\Delta$ pptA in Komplexmedium

PptA wurde als PolyP assoziiertes Protein mit spezifischer PolyP-Bindedomäne identifiziert. Es wurden zunächst die Ergebnisse von Tumlirsch und Jendrossek, 2017 und Tumlirsch, 2017 verifiziert, indem *R. eutropha* WT mit chromosomal integriertem *eyfp* vor dem *pptA* Gen fluoreszenzmikroskopisch betrachtet wurde (Abb. 3.51). Das unter dem natürlichen Promoter synthetisierte eYFP-PptA lag fokussiert in der Zellmitte vor. Oft kolokalisierten sie mit dem DAPI-PolyP Signal (Abb. 3.51 A), es gab jedoch auch eYFP-PptA Foki in Zellen ohne PolyP Granulum (Abb. 3.51 A) oder PolyP Granula ohne eYFP-PptA (Abb. 3.51 B). Diese verschiedenen Beobachtungen traten unabhängig vom

zeitlichen Verlauf der Kultivierung auf. Die *in vivo* Bindung von eYFP-PptA an PolyP wurde hier bestätigt. Somit hat PptA vermutlich eine Funktion im PolyP Metabolismus.

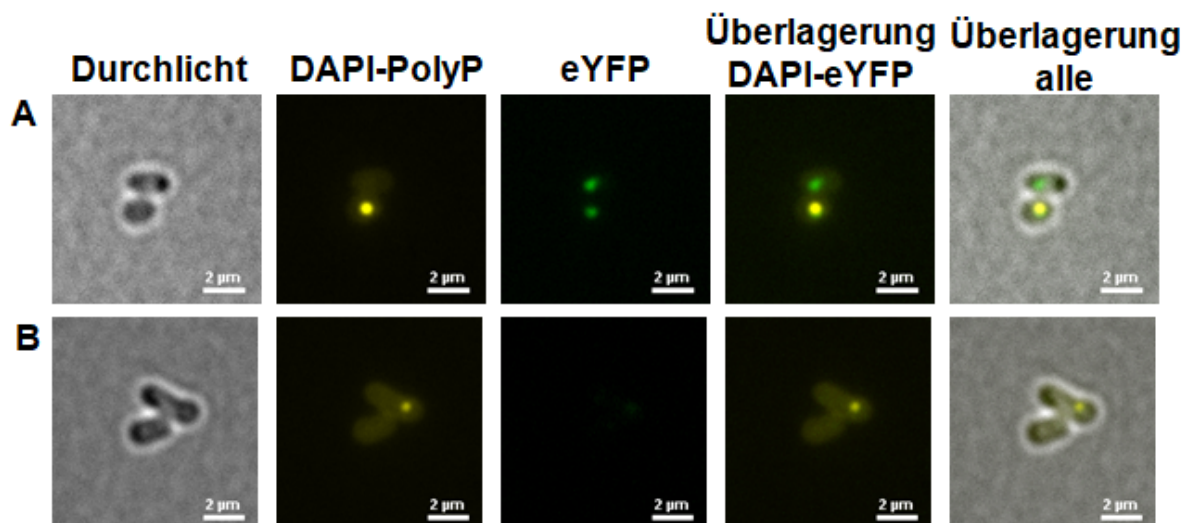


Abb. 3.51: Fluoreszenzmikroskopie von eYFP-PptA in *R. eutropha*. Eine Kultur von *R. eutropha* mit chromosomal integriertem *eyfp-pptA* wurde in NB Medium bei 30 °C und 140 rpm kultiviert. Nach 24 h wurden 10 µl Probe genommen, ggf. verdünnt mit 0,9 % NaCl und mit DAPI gefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop wurde die DAPI-PolyP Fluoreszenz und eYFP-Fluoreszenz verfolgt. Die dargestellten Zellen sind repräsentativ. Der Maßstab beträgt 2 µm.

Für Hinweise auf die genaue Funktion dieses CHAD-Proteins wurde eine *R. eutropha*  $\Delta pptA$  Mutante untersucht auf Veränderungen bei Fehlen von PptA.

Dazu wurde der PolyP Metabolismus in der  $\Delta pptA$  Mutante betrachtet, indem unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen der PolyP Gehalt quantifiziert wurde, um einen detaillierten Verlauf des PolyP Metabolismus zu erhalten. Zunächst wurde der PolyP Metabolismus in der  $\Delta pptA$  Mutante in NB Medium untersucht. Als Referenz wurde der WT mitgeführt.

Das Wachstum der  $\Delta pptA$  Mutante in NB Medium entsprach dem des WT (Abb. Anhang 5.5). Aus Abb. 3.52 ist ersichtlich, dass der PolyP Gehalt aus der Vorkultur innerhalb von 3 h abgebaut wurde und in der gesamten exponentiellen Phase niedrig blieb, vergleichbar mit dem WT. Ab  $t=12$  h stieg der PolyP Gehalt bis  $t=18$  h auf  $119 \pm 13 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  etwas schneller als im WT, stagnierte dann bis  $t=30$  h und erreichte dann sein Maximum mit  $165 \pm 5 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  bei  $t=36$  h. Anschließend erfolgte wie im WT ein Abbau von PolyP bis  $t=48$  h. Allgemein war der PolyP Stoffwechsel in *R. eutropha*  $\Delta pptA$  ähnlich wie im WT, der PolyP Aufbau in der stationären Phase war jedoch ungleichmäßig, während im WT ein stetiger Aufbau stattfand.

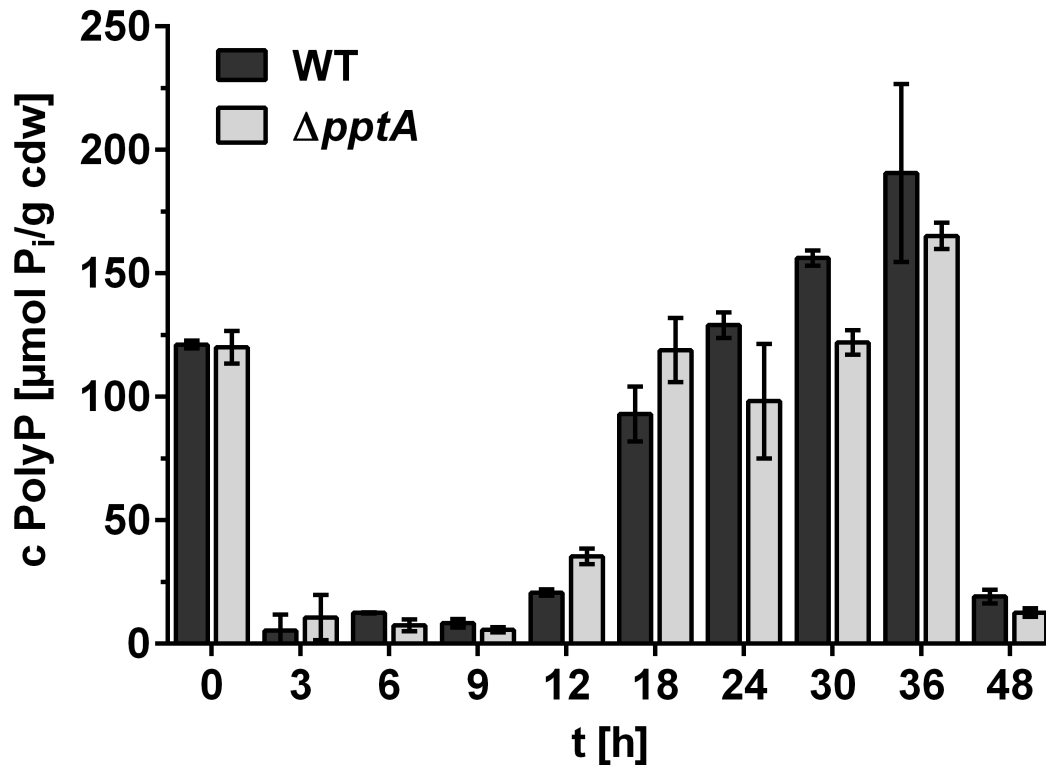


Abb. 3.52: PolyP Quantifizierung der *R. eutropha*  $\Delta pptA$  Mutante und des WT in NB Medium. *R. eutropha*  $\Delta pptA$  wurde nach einer ü. N. NB Vorkultur in 50 ml NB Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Pro Probenzeitpunkt wurde eine 50 ml Kultur durch Zentrifugation geerntet. Isoliertes PolyP aus lyophilisierten Zellen wurde mit der ScPPX verdaut und der Phosphatgehalt in Form von Monophosphat mittels Sb-Ascorbat-Assay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SD aus drei biologischen Replikation mit je drei technischen Replikaten.

Um einen möglichen Einfluss von PptA auf die Lokalisation oder Anzahl der PolyP Granula in der stationären Phase näher zu untersuchen, wurden *R. eutropha*  $\Delta pptA$  Zellen mit DAPI gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht, ob die Mutante bei Kultivierung in NB Medium in der stationären Phase neben der Stagnierung der PolyP Akkumulation weitere Auffälligkeiten bezüglich PolyP Granula zeigte.

*R. eutropha*  $\Delta pptA$  bildete in NB Medium wie der WT mittige PolyP Granula. Die statistische Analyse der Mikroskopiebilder ergab auch ähnliche Anteile an Zellen mit einem oder zwei bzw. ohne Granula (Abb. 3.53). Der Anteil an Zellen mit einem Granulum war in der Mutante mit 62 % zu 67 % im WT ähnlich.

Somit zeigte die  $\Delta pptA$  Mutante in NB Medium einen geringfügigen Phänotyp durch Stagnierung der PolyP Akkumulation in Teilen der stationären Phase.



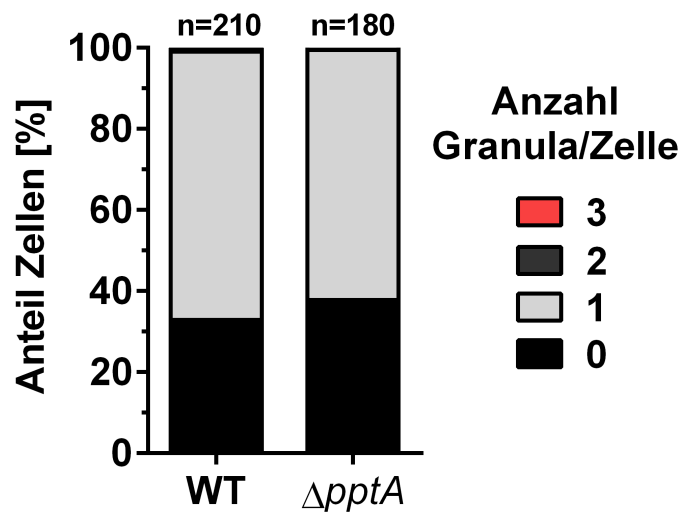


Abb. 3.53: Anzahl der PolyP Granula pro Zelle in der *R. eutropha*  $\Delta pptA$  Mutante in NB Medium. Fluoreszenzmikroskopiebilder von DAPI-gefärbten *R. eutropha*  $\Delta pptA$  bei  $t=24$  h in NB Medium wurden nach der Anzahl der Granula pro Zelle ausgezählt.

### 3.2.2.6 PolyP Metabolismus in *R. eutropha* $\Delta pptA$ bei Aminosäuremangel

Nachdem in Komplexmedium eine etwas ungleichmäßige Zunahme der PolyP Akkumulation in der  $\Delta pptA$  Mutante entdeckt wurde, wurde anschließend überprüft, wie sich die Mutante in Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose verhielt. Aus zwei aufeinanderfolgenden NB Vorkulturen wurde *R. eutropha* WT und die  $\Delta pptA$  Mutante nach Mediumwechsel in Schlegel-MSM kultiviert. Das Wachstum wurde spektrophotometrisch verfolgt (Abb. Anhang 5.6) und der PolyP Gehalt zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (Abb. 3.54). Das Wachstum von *R. eutropha*  $\Delta pptA$  war vergleichbar mit dem WT. Die Quantifizierung von PolyP in Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose zeigte einen geringen PolyP Gehalt in der exponentiellen Phase zwischen 5 und 14  $\frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$ . In der stationären Phase ab 24 h stieg im WT der PolyP Gehalt stetig an mit einer Akkumulationsrate von 1,4  $\frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{h} \cdot \text{g cdw}}$  zwischen 24 und 48 h bis zu einem Maximum von  $57 \pm 1 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  bei  $t=72$  h. In der  $\Delta pptA$  Mutante dagegen stieg der PolyP Gehalt zunächst bis  $t=30$  h wie im WT an, fiel bei  $t=36$  h wieder ab, erreichte bei  $t=48$  h wieder den Level vom 24 h Zeitpunkt von etwa  $20 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  und stieg dann an bis zu einem Maximum von  $49 \pm 1 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  bei  $t=72$  h. Die geringe Detektion bei  $t=36$  h ist womöglich einem Materialverlust bei der Probenpräparation geschuldet. Dennoch ist in der stationären Phase der PolyP Gehalt in der  $\Delta pptA$  Mutante geringer als im WT, ähnlich wie beim Wachstum in NB Medium. Der PolyP Gehalt bei  $t=0$  h in *R. eutropha*  $\Delta pptA$  ist ungewöhnlich niedrig. Vermutlich lagen trotz standardisierter Verfahren in der Vorkultur andere Bedingungen als üblich vor, sodass wenig PolyP in der zweiten NB Vorkultur produziert wurde.

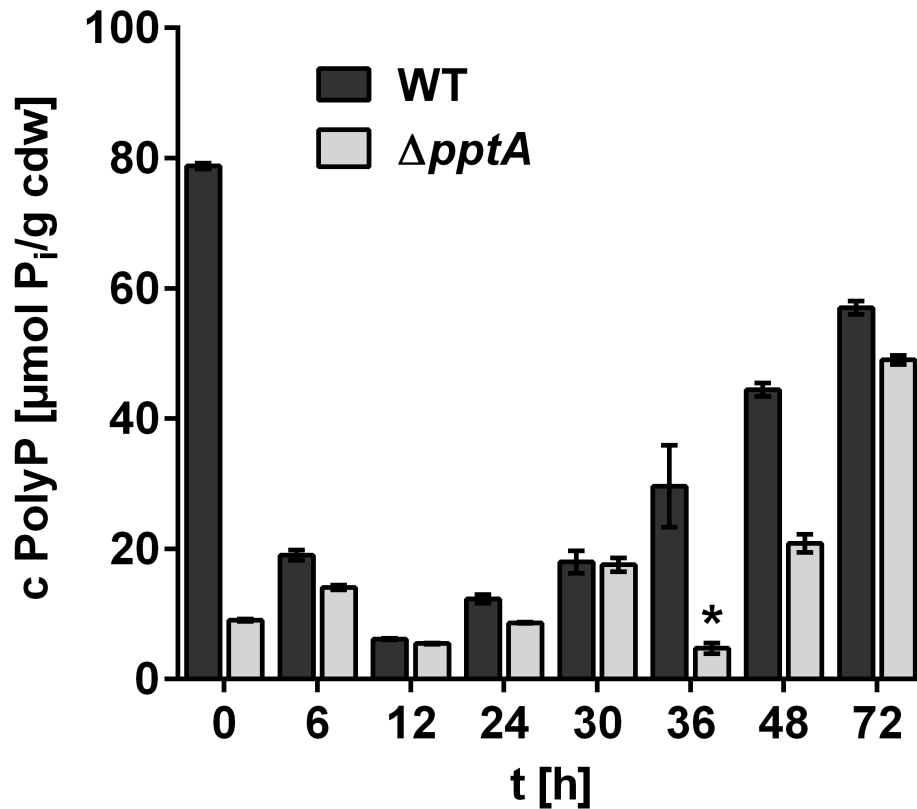


Abb. 3.54: PolyP Gehalt von *R. eutropha* WT und der  $\Delta pptA$  Mutante in Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose. *R. eutropha* WT und  $\Delta pptA$  wurden nach zwei ü. N. NB Vorkulturen in 200 ml Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 50-150 ml Kultur geerntet. Aus den lyophilisierten Zellpellets wurde PolyP mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert und enzymatisch mit ScPPX verdaut. Der Phosphatgehalt in Form von Monophosphat wurde mittels Sb-Ascorbat-Assay colorimetrisch ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte mit SD von drei technischen Triplicaten eines einzelnen Versuchs. \* potentieller Materialverlust während der Präparation.

Die Bedingungen des Wachstums in Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose förderten die Bildung von PHB. Die Quantifizierung von PHB in *R. eutropha*  $\Delta pptA$  ergab einen vergleichbaren PHB Gehalt in *R. eutropha* WT und der  $\Delta pptA$  Mutante (Abb. Anhang 5.7). Er stieg in den ersten 30 h der Kultivierung an bis zu einem Maximum von etwa  $40 \frac{\% PHB}{g cdw}$ . Im Verlauf der stationären Phase wurde PHB wieder geringfügig abgebaut. Bei  $t=12$  h wurde kein PHB in der Mutante detektiert, was wohl an einem Verlust während der Probenpräparation liegt. PptA übte keinen Einfluss auf die Bildung dieses zweiten Bio-polymers aus.

### 3.2.2.7 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der *R. eutropha* $\Delta pptA$ Mutante bei Aminosäuremangel

Die in Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose kultivierte *R. eutropha*  $\Delta pptA$  Mutante wurde mit DAPI gefärbt und mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

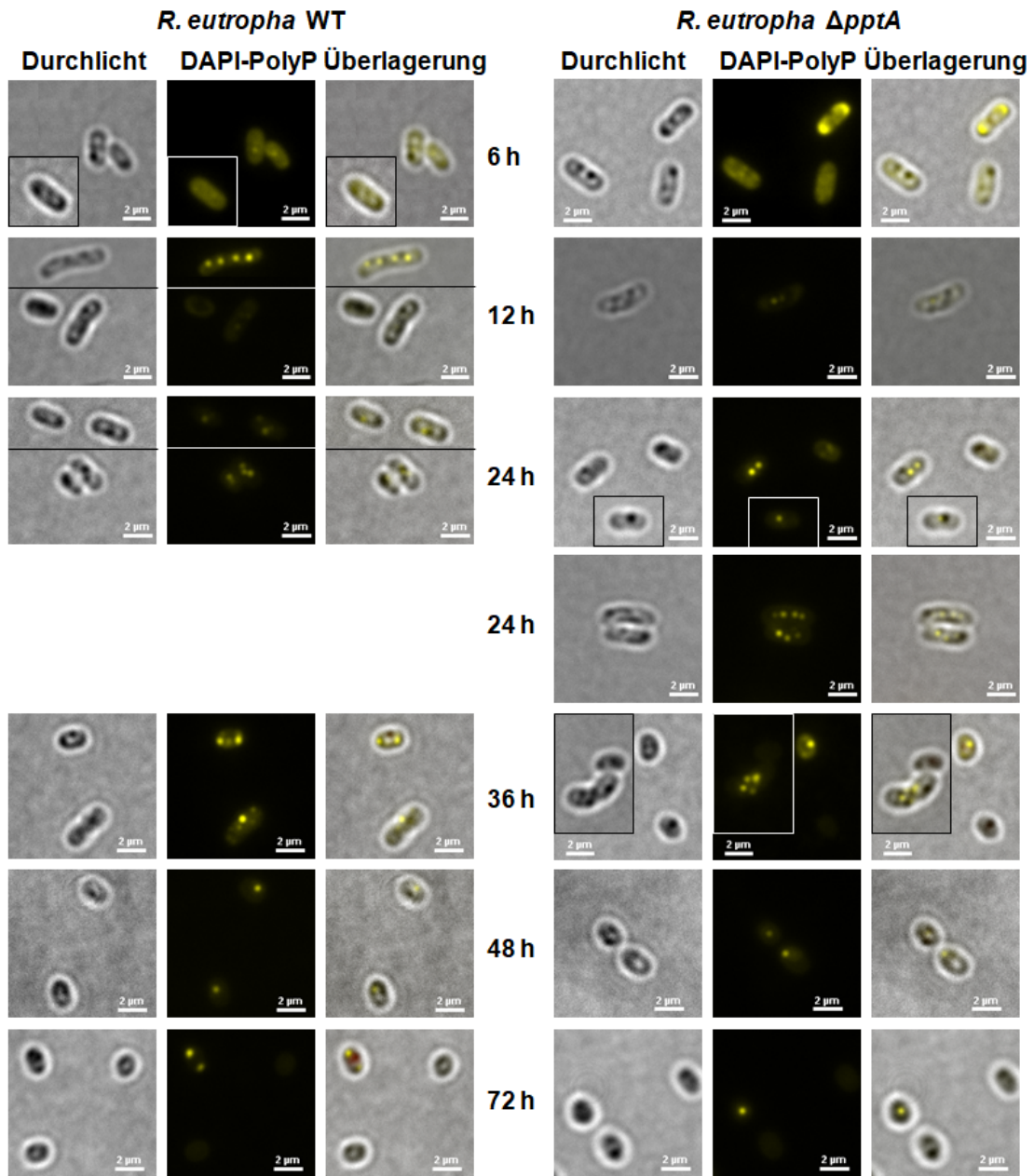


Abb. 3.55: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *R. eutropha* WT und  $\Delta pptA$  in Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose. 10  $\mu\text{l}$  Kultur wurden mit 5  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  DAPI für 10 min auf Eis inkubiert. Die dargestellten Aufnahmen zeigen typische Zellen für diesen Zeitpunkt. Im Bild des WT bei 12 h ist eine Ausnahme gezeigt (im Text beschrieben). Der Maßstab beträgt 2  $\mu\text{m}$ .

Abb. 3.55 zeigt typische *R. eutropha* Zellen mit DAPI-PolyP-Färbung bei Wachstum

in Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose. Sowohl im WT als auch der  $\Delta pptA$  Mutante waren die Zellen in der exponentiellen Phase leicht verlängert mit rund 2-4  $\mu\text{m}$ . Damit waren sie in der exponentiellen Phase kürzer als in NB Medium mit 4-8  $\mu\text{m}$ . In dieser Phase (t=6 h und t=12 h) wurden in beiden Stämmen nur schwache DAPI-PolyP Signale, oft nur eines pro Zelle, detektiert. Die *R. eutropha* WT Zelle mit vier Granula bei t=12h war eine Ausnahme. Ab t=24 h in der stationären Phase lagen die Zellen als sehr kurze Stäbchen mit maximal 2  $\mu\text{m}$  vor. Viele Zellen hatten ein bis drei stark fluoreszierende PolyP Granula, die teils mittig, teils am Zellpol oder seitlich an der Zellmembran lokalisiert waren. Obwohl in *R. eutropha* bei t=72 h der höchste PolyP Gehalt gemessen wurde, waren im Fluoreszenzmikroskop viele Zellen ohne DAPI-Fluoreszenz sichtbar. Es machte den Eindruck, dass in *R. eutropha*  $\Delta pptA$  in der stationären Phase mehr Zellen mit zwei oder mehr Granula vorlagen, während im WT meist ein Granulum pro Zelle detektiert wurde. Um dies genau festzulegen, wurde eine statistische Analyse der Granulazahl pro Zelle in den Kulturen anhand der Fluoreszenzmikroskopiebilder durchgeführt (Abb. 3.56). Eine Tabelle mit den Werten der Analyse befindet sich im Anhang (Tab. 5.1).

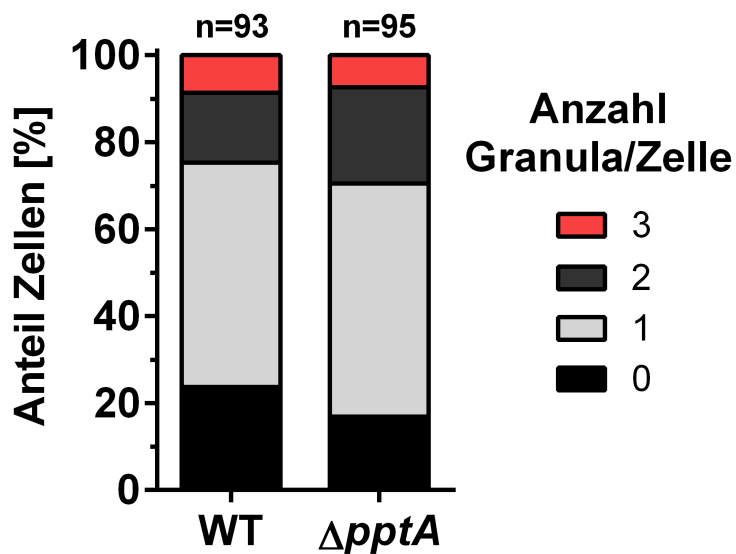


Abb. 3.56: Anzahl der PolyP Granula pro Zelle in der *R. eutropha*  $\Delta pptA$  Mutante in Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose. Fluoreszenzmikroskopiebilder einer DAPI-gefärbten *R. eutropha*  $\Delta pptA$  Kultur bei t=24 h in Schlegel-MSM wurden nach der Anzahl der Granula pro Zelle ausgezählt.

Die statistische Auswertung der Fluoreszenzmikroskopiebilder der 24 h *R. eutropha* Kulturen in Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose ergab, dass im WT und der  $\Delta pptA$  Mutante ein ähnlicher Anteil an Zellen ein Granulum hatte (51,6 % bzw. 53,7 %). Allerdings waren im WT 23,7 % der Zellen frei von Granula, während es in der  $\Delta pptA$  Mutante nur 16,8 % waren. Dafür hatte in dieser Mutante ein Anteil von 22,1 % zwei Granula, wohingegen es

im WT nur 16,1 % der Zellen auf zwei Granula brachten. Der Anteil an Zellen mit drei Granula war wiederum in beiden Stämmen ähnlich (8,6 % im WT zu 7,4 % bei  $\Delta pptA$ ). In aminosäurefreiem MSM wies die *R. eutropha*  $\Delta pptA$  Mutante zwei Unterschiede zum WT auf. Sie akkumulierte weniger PolyP in der stationären Phase und hatte öfter zwei Granula pro Zelle als der WT, was sich jedoch nicht auf das Wachstum auswirkte.

#### **3.2.2.8 Untersuchung von *R. eutropha* $\Delta pptA$ und $\Delta pptA\Delta pptB$ bei Phosphatmangel**

Das Fehlen des CHAD-Proteins PptA hatte in *R. eutropha* mäßige Auswirkungen auf den PolyP Metabolismus, ohne erhebliche Störungen allgemeiner zellulärer Funktionen wie Wachstum oder Anpassung an die stationäre Phase bzw. Aminosäuremangel. Nun sollte getestet werden, ob die CHAD-Proteine eine Rolle bei der Anpassung an Phosphatmangel spielen. *R. eutropha*  $\Delta pptA$  und die  $\Delta pptA\Delta pptB$  Doppelmutante wurden in Tris-MSM + 0,8 % Fruktose ohne Phosphatzusatz nach zwei Vorkulturen in NB Medium mit Mediumwechsel kultiviert. Das Wachstum wurde spektrophotometrisch verfolgt (Abb. 3.57) und der PolyP und PHB Gehalt in den Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert (Abb. 3.58).

Das Wachstum der  $\Delta pptA$  und  $\Delta pptA\Delta pptB$  Doppelmutante war in Phosphatmangelmedium vergleichbar mit dem Wachstum des WT. *R. eutropha*  $\Delta pptA\Delta pptB$  wies eine leicht geringere OD<sub>600</sub> über den gesamten Versuch auf, da bereits die Start-OD geringer ausfiel. In zwei weiteren biologischen Replikaten fielen die absoluten Werte der OD<sub>600</sub> unterschiedlich aus, innerhalb eines Versuchs waren die Wachstumskurven der drei Stämme aber immer ähnlich.

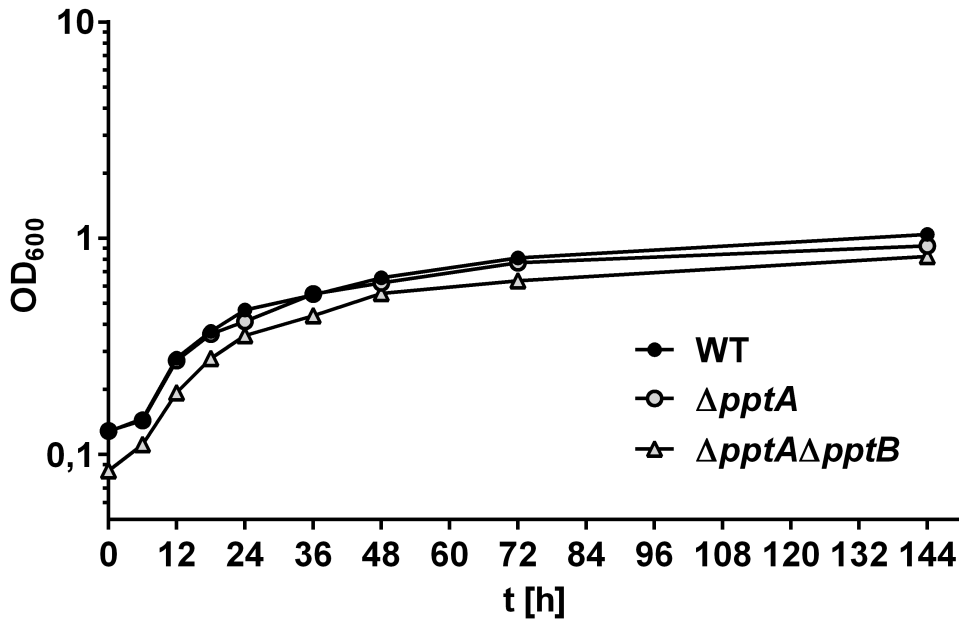


Abb. 3.57: Spektrophotometrische Messung des Wachstums von *R. eutropha* WT,  $\Delta pptA$  und  $\Delta pptA\Delta pptB$  in Tris-MSM + 0,8 % Fruktose ohne Phosphatzusatz. Es wurden zwei aufeinanderfolgende ü. N. Vorkulturen von *R. eutropha* WT,  $\Delta pptA$  und  $\Delta pptA\Delta pptB$  in NB kultiviert. Mit der zweiten Vorkultur wurden nach Mediumwechsel zu Tris-MSM 200 ml Tris-MSM + 0,8 % Fruktose in 1 l Erlenmeyerkolben auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt und bei 30 °C, 150 rpm kultiviert. Die OD<sub>600</sub> wurde in 1 ml Küvetten gemessen. Dargestellt ist eine Einzelmessung.

Der PolyP Gehalt nahm sowohl bei der  $\Delta pptA$  Mutante als auch der  $\Delta pptA\Delta pptB$  Doppelmutante im Verlauf der Kultivierung bei Phosphatmangel ab. Die  $\Delta pptA$  Mutante startete mit einem höheren PolyP Gehalt aus der Vorkultur als der WT. Nach 12 h unter Phosphatmangel war der PolyP Gehalt jedoch nur noch etwa halb so hoch wie im WT und bereits nach 18 h nahezu aufgebraucht, während im WT noch  $19 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  detektiert wurden. Insgesamt brauchte die  $\Delta pptA$  Mutante ihren Phosphatspeicher unter Phosphatmangel schneller auf als der WT.

In der  $\Delta pptA\Delta pptB$  Doppelmutante wurde in den ersten 12 h unter Phosphatmangel kein PolyP abgebaut. Dennoch war das Wachstum vergleichbar mit dem WT. Sie baute ihren Phosphatspeicher langsamer ab als der WT, es wurden sogar bei t=36 h und t=48 h geringe Mengen PolyP detektiert.

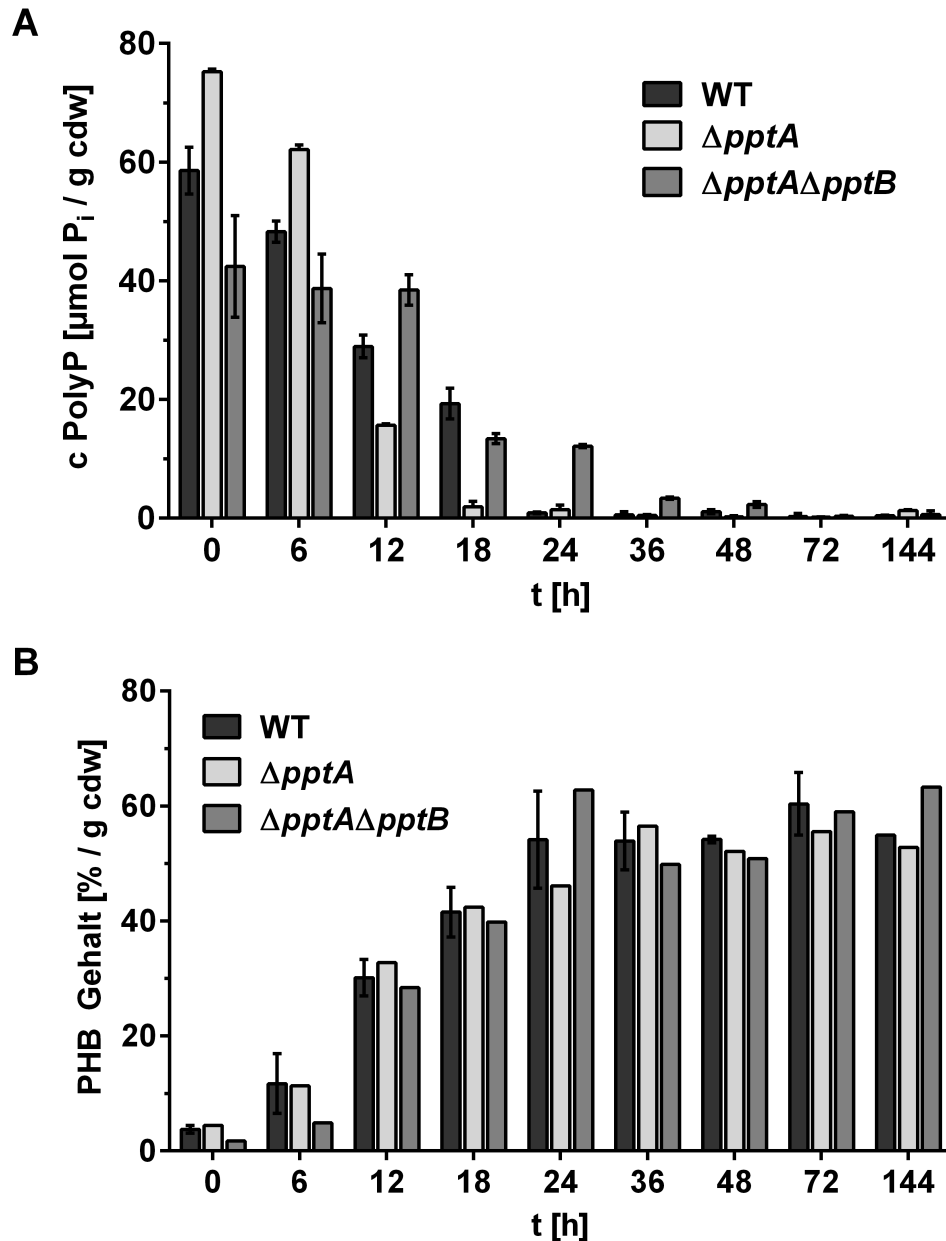


Abb. 3.58: PolyP Gehalt von *R. eutropha* WT,  $\Delta pptA$  und  $\Delta pptA\Delta pptB$  in Tris-MSM + 0,8 % Fruktose ohne Phosphatzusatz. *R. eutropha* WT,  $\Delta pptA$  und  $\Delta pptA\Delta pptB$  wurden in 200 ml Tris-MSM + 0,8 % Fruktose bei 30 °C, 150 rpm kultiviert. Aus den lyophilisierten Zellpellets wurde A) PolyP mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert und enzymatisch mit ScPPX verdaut. Der Phosphatgehalt in Form von Monophosphat wurde mittels Malachitgrün-Assay colorimetrisch ermittelt. Dargestellt sind Mittelwert und SD von einem biologischen Replikate mit drei technischen Replikaten. B) Mittels saurer Methanolyse und anschließender Gaschromatographie wurde der PHB Gehalt der Kulturen bestimmt. Für *R. eutropha* WT ist der Mittelwert mit SD von zwei biologischen Replikaten gezeigt, für die beiden Mutanten lag eine Einzelmessung vor.

Der PHB Gehalt stieg im WT wie in den Mutanten innerhalb der ersten 24 h von 2-4 % bis zum Maximum an und blieb dann bis t=144 h annähernd konstant, beim WT zwischen 54 % und 60 %, bei der  $\Delta pptA$  Mutante zwischen 46 % und 56 % und bei der  $\Delta pptA\Delta pptB$  Doppelmutante zwischen 50 % und 63 % pro g Zelltrockenmasse. Der PHB Gehalt war in den Mutanten bei jedem Messpunkt ähnlich zum WT, aufgrund fehlender Replikate konnten die Abweichungen nicht genau beurteilt werden.

Unter Phosphatmangelbedingungen war die Geschwindigkeit des PolyP Abbaus bei der  $\Delta pptA$  Mutante erhöht, dagegen bei der  $\Delta pptA\Delta pptB$  Mutante verringert. Das Wachstum war dennoch ähnlich wie beim WT wie auch die PHB Akkumulation. Die Deletion eines oder beider CHAD-Gene hatte allenfalls eine geringe Auswirkung auf die PolyP Mobilisation bei Phosphatbedarf.

#### 3.2.2.9 Gerichtete Protein-Interaktionsstudien der CHAD-Proteine mit bac2hybrid

Auf den PolyP Metabolismus hatte eine Deletion der CHAD-Gene einen mäßigen Einfluss bezüglich des zellulären PolyP Gehalts, ohne das Wachstum zu beeinträchtigen.

Um weitere Hinweise auf ihre Funktion zu erhalten, wurden in vivo Protein-Protein-Interaktionsstudien mit PptA und PptB mittels *Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid* System Kit (bac2hybrid) durchgeführt. Beim bac2hybrid wurden zwei Gene von Interesse in *E. coli* BTH 101  $\Delta cya$  exprimiert, eine Deletionsmutante ohne Adenylatcyclase. Die Gene von Interesse waren jeweils fusioniert mit einem N-terminalen bzw. C-terminalen Fragment des Adenylatcyclasegens. Nach erfolgter Proteinsynthese wurden beide Hälften der Adenylatcyclase komplementiert, sofern die beiden Proteine miteinander interagierten. Als Negativkontrolle (Ktrl) wurde das Protein von Interesse mit N-terminalem Fragment gegen das C-terminale Fragment ohne Fusion getestet und anders herum. Zum Nachweis der Adenylatcyclase Komplementierung diente einerseits die Verstoffwechslung von Maltose auf MacConkey Agar mit Rotfärbung des Mediums durch den pH-Indikator Phenolrot aufgrund der Ansäuerung, und andererseits die Verstoffwechslung von X-Gal, einem Lactoseanalog, in M63-Agar mit Blaufärbung des Mediums (Abb. 3.59). Diese Stoffwechselleistung ist nur vorhanden, wenn die Adenylatcyclase aktiv ist und cAMP synthetisiert. Dieses Molekül induziert die Expression von *lacZ*, dem Gen für die  $\beta$ -Galaktosidase. Dieses Enzym nutzt Laktose als Substrat.

Als potentielle Interaktionspartner wurden identifizierte Proteine aus dem PolyP Granula Pulldown gewählt (siehe Abschnitt 3.2.1.1), die in *R. eutropha* WT im Pulldown vorkamen, nicht jedoch in der  $\Delta pptA$  Mutante oder die anderweitig mit dem PolyP Stoffwechsel in Verbindung stehen. PhoH ist als phosphatmangelinduziertes Protein annotiert. Die Lon Protease bildet in anderen Bakterien einen Komplex mit PolyP und dient unter anderem der Proteolyse von ribosomalen Proteinen bei Aminosäuremangel (Kuroda *et al.*, 2001).



### 3. Ergebnisse

Die NAD-Kinase (A1132) nutzt potentiell PolyP als Substrat. Die CTP-Synthase (A1185) wurde im Pulldown stärker in *R. eutropha* WT als der  $\Delta pptA$  Mutante gefunden, weshalb anzunehmen war, dass dieses Protein an PptA bindet. Jedoch wurde die CTP-Synthase im Pulldown auch in der  $\Delta ppk-all$  Mutante detektiert. Für die Expression von *pptA* wurde ein für *E. coli* codonoptimiertes Gen verwendet.

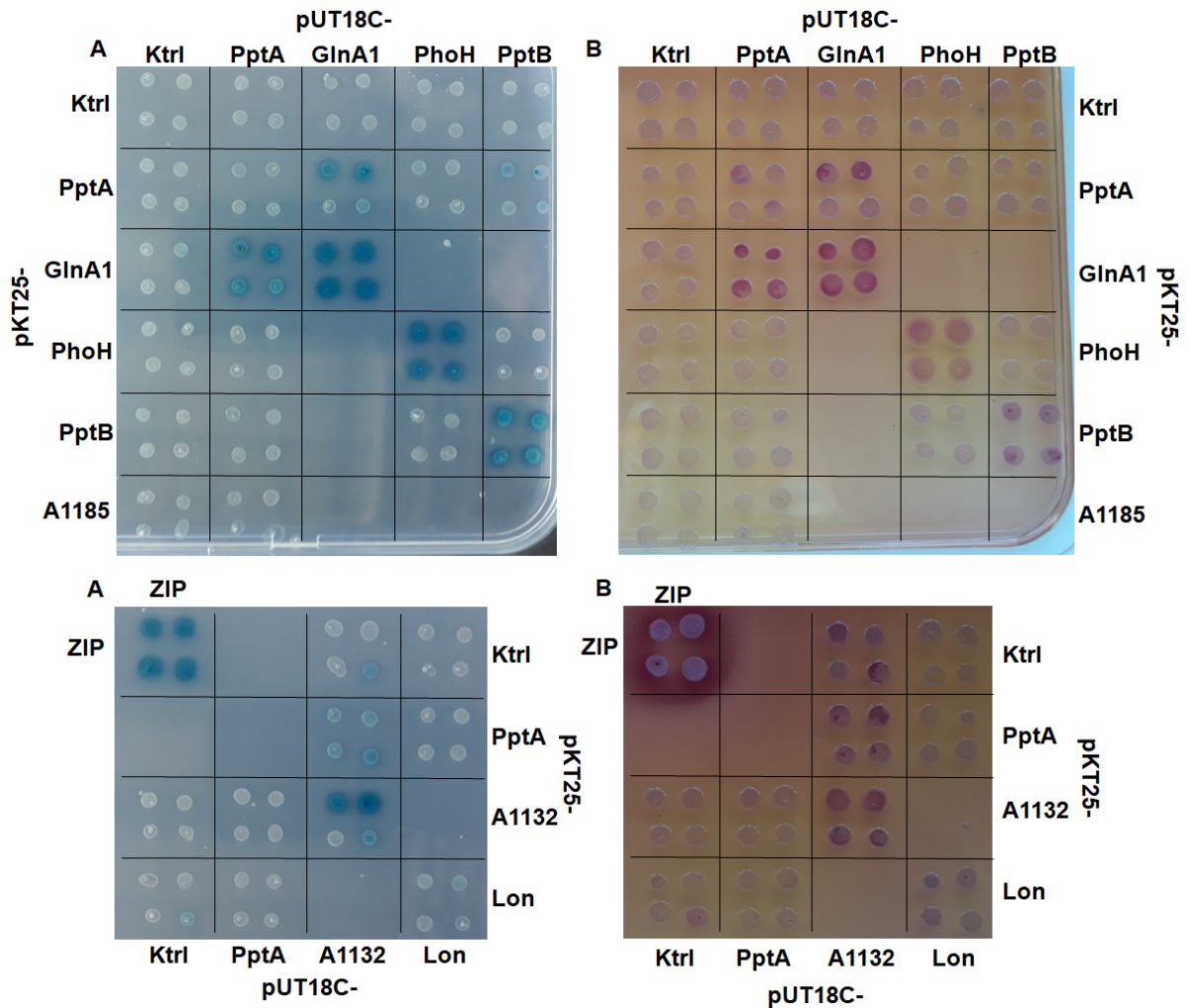


Abb. 3.59: Untersuchung von Proteininteraktionen der CHAD-Proteine von *R. eutropha* in vivo durch bac2hybrid. Die Kombinationen der angegebenen Gene auf den Plasmiden pUT18C und pKT25, bzw. die Positivkontrolle ZIP wurden in *E. coli* BTH 101 kotransformiert. Die Expression fand in einer ü. N. Kultur in LB-Kan50-Amp100-IPTG-Medium bei 30 °C statt. 1 µl Kultur wurde in auf A) M63-X-Gal-Agar oder B) MacConkey-Maltose-Agar aufgetropft und für 2 d bei 30 °C inkubiert. Interaktion der Proteine von Interesse wurde angezeigt durch A) blaue Kolonien bzw. B) rote Kolonien. Es wurden pro Kombination vier biologische Replikate getestet.

Mittels bac2hybrid wurde die Interaktion verschiedener Proteinkombinationen in vivo getestet. Zunächst wurde festgestellt, dass einige Proteine Homodi- oder Oligomere

bildeten. Dazu zählten die GlnA1 (A2335), das phosphatmangelinduzierte Stressprotein PhoH (A0527) und das CHAD-Protein PptB. Die NAD-Kinase (A1132) zeigte nur bei zwei Kolonien eine Interaktion mit sich selbst, wodurch keine klare Aussage bezüglich der Interaktion getätigt werden kann.

Das CHAD-Protein PptA interagiert nicht mit sich selbst, was für das Vorliegen als Monomer *in vivo* spricht.

PptA interagiert in einem biologischen Replikat mit der NAD-Kinase. Jedoch war auch eine Kolonie der Negativkontrolle der NAD-Kinase leicht blau gefärbt. Somit kann es sich hier um einen falsch positiven Befund handeln. PptA interagiert mit GlnA1 in beiden Plasmidkombinationen, jedoch bei der Kombination pUT18C::*glnA1* und pKT25::*pptA* nur bei zwei der Kolonien. Die hier gezeigte Interaktion untermauert Befunde aus vorangegangenen Arbeiten. Im folgenden Abschnitt wurde der Zusammenhang zwischen PptA und der GlnA1 näher untersucht.

#### 3.2.2.10 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der GlnA1 in

##### *R. eutropha* $\Delta$ *pptA*

Über die intrazelluläre Lokalisation von PptA und GlnA1 in *R. eutropha* durch fluoreszenzmikroskopische Studien mit fluoreszierenden Fusionsproteinen wurde bestätigt, dass in *R. eutropha* WT sowohl DsRed-PptA als auch eYFP-GlnA1 am Zellpol kolokalisierten, ggf. zusammen mit dem DAPI-PolyP Signal, wenn die Zelle ein Granulum besaß (Abb. 3.60). In der *R. eutropha*  $\Delta$ *ppk-all* Mutante kolokalisierten PptA und GlnA1 am Zellpol. Dies war ebenso bei Tumlirsch, 2017 beobachtet worden. Bisher war jedoch nicht bekannt, ob die GlnA1 selbst an das PolyP Granulum bindet oder nur in Kombination mit PptA. Daher wurde ergänzend die Lokalisation von eYFP-GlnA1 in der *R. eutropha*  $\Delta$ *pptA* Mutante fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Bei der Deletion von *pptA* lag eYFP-GlnA1 am Zellpol, während das DAPI-PolyP Signal meist mittig auftrat. Damit wurde gezeigt, dass PptA und GlnA1 unabhängig von PolyP miteinander interagierten und die GlnA1 nur über eine Interaktion mit PptA an das PolyP Granulum assoziiert war.

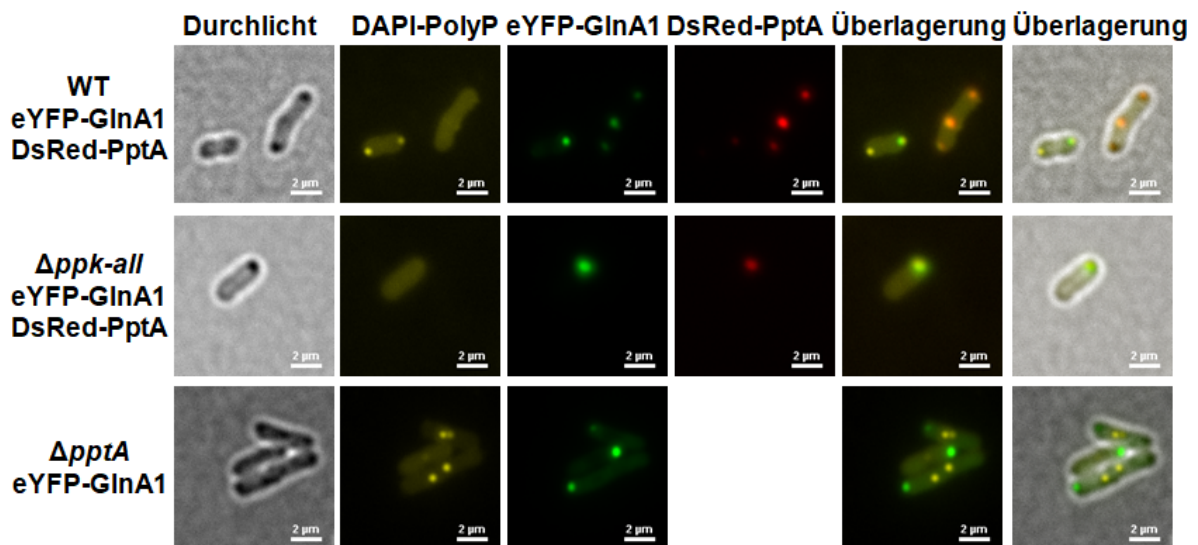


Abb. 3.60: Fluoreszenzmikroskopische Lokalisationsstudien von eYFP-GlnA1 und DsRed-PptA in *R. eutropha* WT, der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante und  $\Delta pptA$ . *R. eutropha* WT und die Mutanten  $\Delta ppk\text{-all}$  und  $\Delta pptA$  mit pBBR1MCS-2- $P_{PhaC}$ -*eyfp-glnA1* und pCM62-*dsRed-pptA* wurden nach einer ü. N. NB Vorkultur für 24 h in NB Medium kultiviert. 10  $\mu$ l Kultur wurden mit 5  $\frac{\mu g}{ml}$  DAPI für 10-15 min auf Eis inkubiert. Die dargestellten Aufnahmen zeigen typische Zellen. Der Maßstab beträgt 2  $\mu$ m.

### 3.2.3 Untersuchung der Glutaminsynthetase GlnA1 in *R. eutropha*

Die GlnA1 bindet über das CHAD-Protein PptA an das PolyP Granulum. Im folgenden Abschnitt wurde die GlnA1 näher untersucht. Es handelt sich um eine annotierte Glutaminsynthetase, ein wichtiges Enzym im Stickstoffstoffwechsel. Zunächst sollte überprüft werden, ob es sich bei der GlnA1 um eine funktionale Glutaminsynthetase handelt.

#### 3.2.3.1 Expression und Reinigung rekombinanter GlnA1

Die *glnA1* von *R. eutropha* wurde in den Expressionsvektor pET16b kloniert, sodass ein Fusionsgen aus einem N-terminalen zehnfachen Histidin-tag gefolgt vom *glnA1*-Gen (10xHis-*glnA1*) entstand. Dieses wurde rekombinant in *E. coli* BL21(DE3) pLysS pET16b::*glnA1* exprimiert und das Protein über eine Ni-NTA-Säule isoliert. Mittels SDS-PAGE wurden die einzelnen Reinigungsschritte auf die Präsenz von 10xHis-GlnA1 getestet (Abb. 3.61).

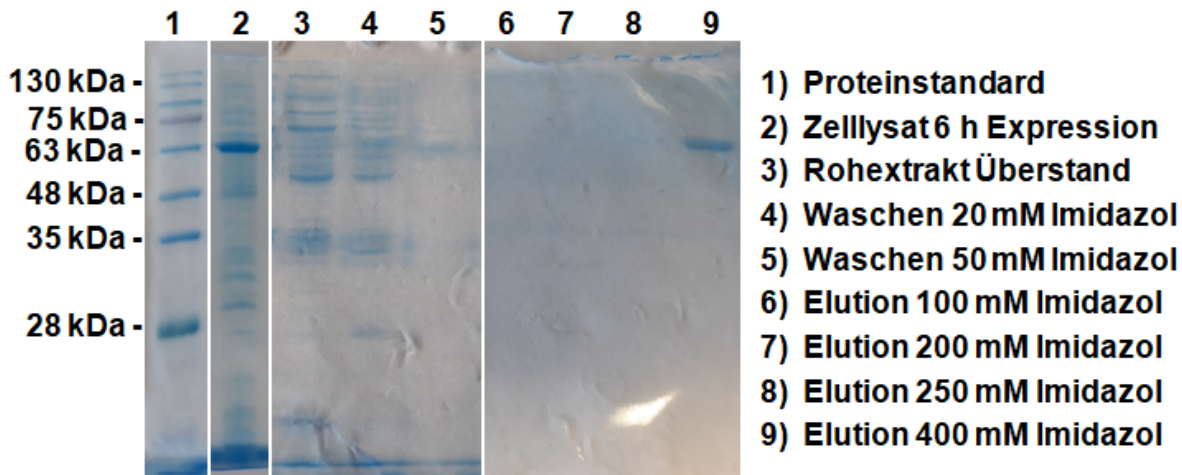


Abb. 3.61: Analyse der Fraktionen der Reinigung von 10xHis-GlnA1 mittels Affinitätschromatographie durch SDS-PAGE. In *E. coli* BL21(DE3) pLysS pET16b::*glnA1* wurde die Überexpression in LB Medium + Amp100 mit 0,1 mM IPTG induziert und für 6 h kultiviert. Die Zellen wurden geerntet (2), mit der French press aufgeschlossen und ultrazentrifugiert. Der Rohextrakt Überstand (3) wurde auf eine Ni-NTA Säule gegeben, mit Waschpuffer gewaschen (4-5) und mit Puffer A mit steigender Konzentration an Imidazol eluiert (6-9). Die Proben wurden, ggf. nach Verdünnung in H<sub>2</sub>O, mit 3x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. 15 µl Probe wurden in einem 12 % SDS-PA-Gel für 30 min bei 25 mA aufgetrennt. Die Proteine wurden mit colloidalem Coomassie gefärbt und das Gel mit H<sub>2</sub>O entfärbt.

Im Zellysat des Expressionsstamms nach 6 h Expression sowie in der Elutionsfraktion mit 400 mM Imidazol war eine Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 63 kDa prominent. Diese stellt His-GlnA1 dar, was mittels Western Blot gegen den His-tag verifiziert wurde (Abb. Anhang 5.9). Mit dem etablierten Expressionsprotokoll wurde 10xHis-GlnA1 in hoher Reinheit mit einer Ausbeute von 1,26  $\frac{mg}{ml}$  aus 800 ml *E. coli* Kultur isoliert.

### 3.2.3.2 Untersuchung der Quartärstruktur von GlnA1

Laut der Proteindatenbank InterPro (Blum *et al.*, 2021) ist die GlnA1 in *R. eutropha* basierend auf ihrer Primärstruktur eine annotierte Typ-I-Glutaminsynthetase mit konservierten Bereichen für die ATP-Bindestelle und Adenylylierungsstelle. Das Molekulargewicht der hier untersuchten 10xHis-GlnA1 betrug 55 kDa (ExpASy Molekulargewichtrechner). Mittels SEC-MALS wurde die Quartärstruktur der *R. eutropha* GlnA1 mit 10xHis-tag untersucht wie bereits strep-PptA. In Abschnitt 3.2.2.4 sind die Details zur Probenvorbereitung und Säulenkalibrierung nachzulesen. Das Spektrum des LS- und A<sub>280</sub>-Signals ist in Abb. 3.62 gezeigt.

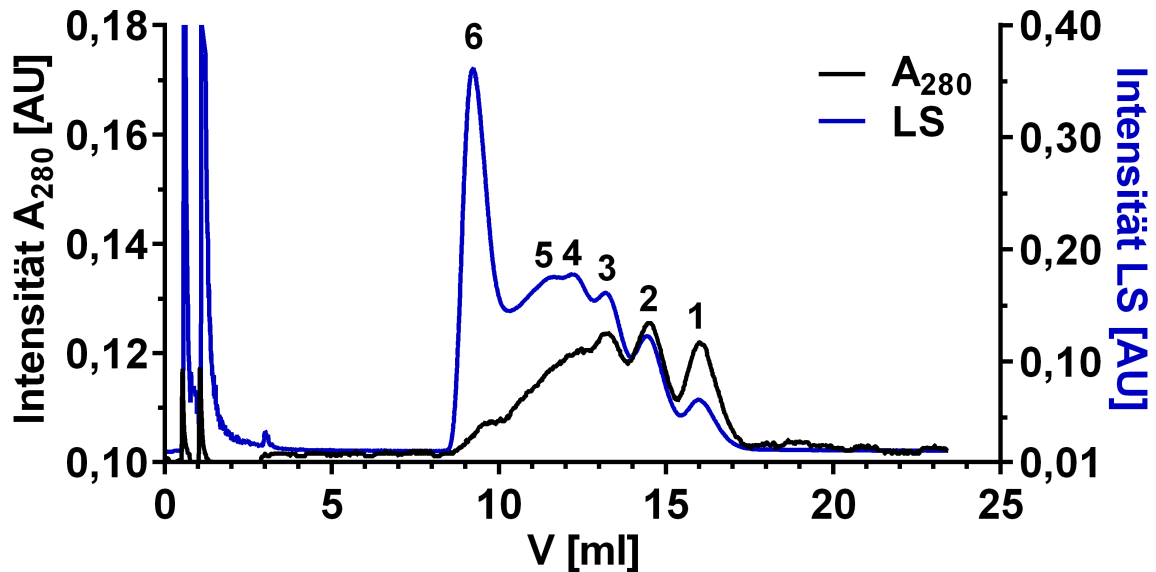


Abb. 3.62: Untersuchung der Quartärstruktur von nativem 10xHis-GlnA1 über das Molekulargewicht des gereinigten Proteins. Das Molekulargewicht wurde mittels SEC-MALS an der FPLC ÄKTA pure (GE Healthcare) bestimmt. Die Säule Superose 6 Increase 10/300 GL ( $V=24$  ml) wurde mit dem Laufpuffer Puffer A, pH 8,0 äquilibriert. Eine 10xHis-GlnA1 Lösung mit  $c=300$   $\mu\text{g/ml}$  wurde zentrifugiert bei 14800 rpm für 5 min bei  $4^\circ\text{C}$ . Davon wurden 500  $\mu\text{l}$  10xHis-GlnA1 (150  $\mu\text{g}$ , entspricht 10,2  $\mu\text{M}$ ) mit einer Geschwindigkeit von  $v=0,5$  ml/min über die Säule gegeben. Detektiert wurden die Lichtstreuung und  $A_{280}$  des Eluats.

Für 10xHis-GlnA1 wurden LS und  $A_{280}$  Signale bei einem  $V_{\text{Retention}}$  zwischen 8,5 und 17,5 ml detektiert. Die Signale zwischen 1-2 ml sind einer Druckerhöhung durch Anpassung der Fließgeschwindigkeit geschuldet und haben für die Strukturanalyse von 10xHis-GlnA1 keine Bedeutung. Es wurden fünf distinkte Signalmaxima parallel bei der Absorption wie auch LS gemessen bei einem  $V_{\text{Retention}}$  von etwa 15,9 ml, 14,4 ml, 13,0 ml, 12,3 ml und 9,4 ml  $V_{\text{Retention}}$ . Diese stellten vermutlich das Monomer (75,5 kDa), Dimer (165 kDa), Tetramer (324 kDa), Hexamer (474 kDa) und ein 26- bis 28-mer (2030 bzw. 2340 kDa) dar (Tab. 3.6). Letzteres könnte ein Dimer zweier Dodekamere sein mit etwas ungenauer Zuordnung eines 24-mers oder aggregiertes Protein. Die berechneten Molekulargewichte nach dem Retentionsvolumen sind jeweils höher als nach der Primärstruktur berechnet. Darauf wird in Abschnitt 4.6 näher eingegangen. Zwischen 9 und 13 ml wurden bei der LS durchgehend Signale ohne konkrete Spitzen gemessen, was für eine polydisperse Probe spricht, die nicht näher aufgelöst werden konnte. In diesem Bereich war Protein mit einem Molekulargewicht passend zum GlnA1-Dodekamer (etwa 906 kDa) vorhanden. Dies entspricht einem Retentionsvolumen von 11,0 ml. Bei der  $A_{280}$  war ein zusätzlicher Peak bei 11,2 ml vorhanden, der mit einem berechneten Molekulargewicht von 833 kDa zu einem

GlnA1-Dekamer passt. Aus Tab. 3.6 sind die berechneten Molekulargewichte und Strukturvorschläge für die Signale zu entnehmen.

Daraufhin wurde das Laufverhalten von 10xHis-GlnA1 und strep-PptA zusammen auf der SEC-Säule untersucht. Mit SEC-MALS ist es generell möglich, über die Ermittlung des Molekulargewichts und Nachweis der Proteine mittels SDS-PAGE, die Stöchiometrie einer Interaktion aufzuklären. Dazu wurden die strep-PptA Lösung und 10xHis-GlnA1 Lösung erst einzeln zentrifugiert, dann vereinigt und für 20 min inkubiert. Diese Mischung wurde anschließend direkt aufgetragen.

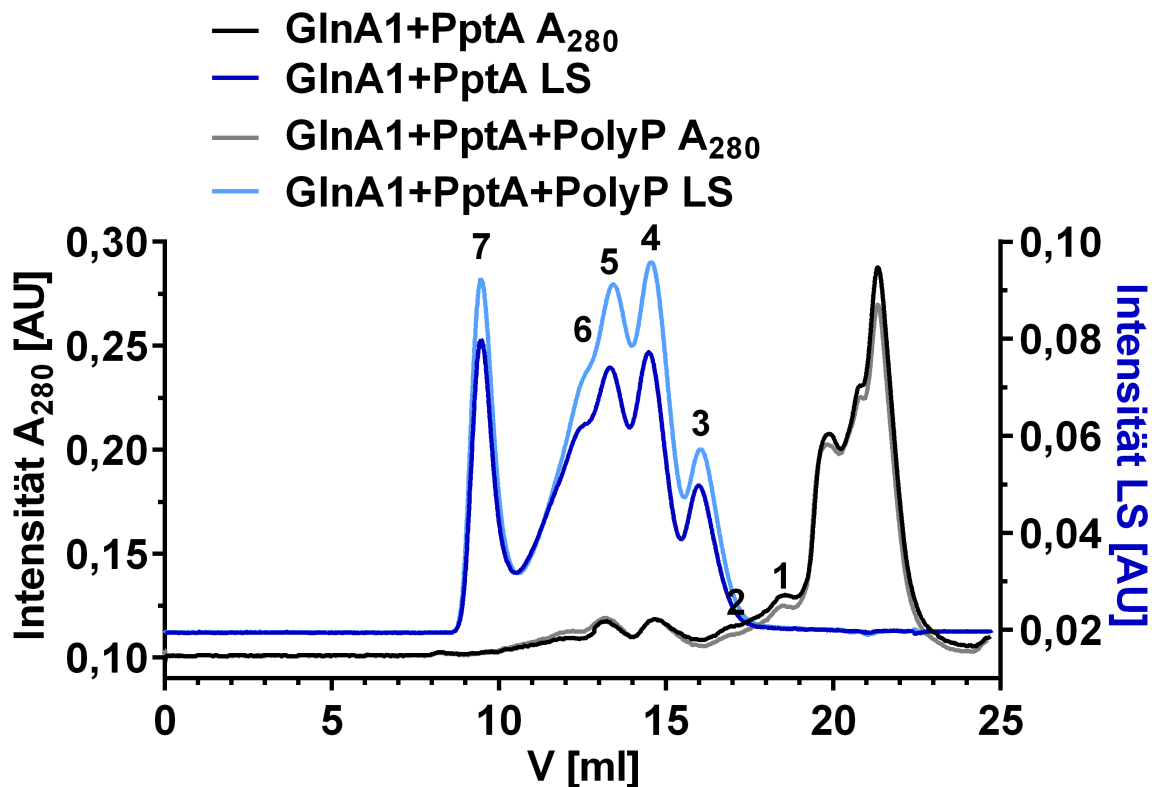


Abb. 3.63: Untersuchung der Quartärstruktur von nativem 10xHis-GlnA1 und strep-PptA über das Molekulargewicht der gereinigten Proteine. Das Molekulargewicht wurde mittels SEC-MALS an der FPLC ÄKTA pure (GE Healthcare) bestimmt. Die Säule Superose 6 Increase 10/300 GL ( $V=24$  ml) wurde mit dem Laufpuffer Puffer A, pH 8,0 äquilibriert. Eine 10xHis-GlnA1 Lösung sowie eine strep-PptA Lösung wurde zentrifugiert bei 14800 rpm für 5 min bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Diese wurden zusammengeführt, sodass  $61,8\ \mu\text{g}$  strep-PptA ( $c=3,23\ \mu\text{M}$ ) und  $66,5\ \mu\text{g}$  10xHis-GlnA1 ( $c=2,41\ \mu\text{M}$ ) vorlagen. Wenn angegeben, wurde des Weiteren  $2\ \mu\text{M}$  PolyP zugegeben und für 20 min inkubiert. Davon wurden  $500\ \mu\text{l}$  mit einer Geschwindigkeit von  $v=0,5\ \text{ml/min}$  über die Säule gegeben. Detektiert wurden die Lichtstreuung und  $A_{280}$  des Eluats.

Die Maxima der LS- und  $A_{280}$  Signale waren ähnlich für 10xHis-GlnA1 ohne strep-PptA (Abb. 3.62) und mit Zugabe von strep-PptA (Abb. 3.63). Die Zugabe von PolyP änderte

die Auftrennung von strep-PptA und 10xHis-GlnA1 in der SEC-Säule nicht. Es gab fünf distinkte Absorptionsmaxima und fünf Maxima bei der Lichtstreuung, die teilweise bei der gleichen  $V_{\text{Retention}}$  lagen. Eine Zuordnung der Proteine zu den Signalen wurde schwierig, da neben den Homooligomeren auch Heterooligomere möglich waren und da 10xHis-GlnA1 etwa das doppelte Molekulargewicht von strep-PptA hat, auch rechnerisch schwer auseinanderzuhalten. Daher sind im Strukturvorschlag nur die Homooligomere aufgeführt. Mit großer Wahrscheinlichkeit wurde jeweils das Monomer von strep-PptA und 10xHis-GlnA1 gefunden aus dem Vergleich der Spektren beider Proteine mit den Spektren der einzelnen Proteine.

Die Spitze des  $A_{280}$  Signals bei etwa 15,7 ml  $V_{\text{Retention}}$ , die das 10xHis-GlnA1 Monomer beinhaltete (Peak 3 beim LS Signal), war bei der Mischung beider Proteine vermutlich vom ansteigenden Signal der strep-PptA Lösung überlagert. Die Koinkubation von strep-PptA und 10xHis-GlnA1 führte zur gleichen Ausbildung von Signalmaxima wie bei den Einzelmessungen. Es konnte mit dieser Methode keine Protein-Protein-Interaktion bestätigt werden. Insbesondere im hochmolekularen Bereich, also bei geringer  $V_{\text{Retention}}$ , wo sich die Ausbildung von Heterooligomeren der beiden Proteine vermuten lässt, war die Auflösung zu gering.

Mittels SDS-PAGE des fraktionierten Eluats bei der Auftrennung der PptA-GlnA1-PolyP Lösung wurde der Proteingehalt pro Fraktion analysiert und den  $A_{280}$  und LS Signalen zugeordnet (Abb. Anhang 5.12). 10xHis-GlnA1 wurde in allen Fraktionen von 10,5 bis 15,5 ml und schwache Spuren bis 17,8 ml  $V_{\text{Retention}}$  gefunden. Dabei wurde das starke Signal oberhalb von 15,5 ml jedoch nicht erklärt. Strep-PptA konnte trotz hochsensitiver Silberfärbung wiederum nicht detektiert werden, sodass nicht bestimmt werden konnte, ob strep-PptA zur Signalintensität beitrug. In der Fraktion bei 17,8 ml war jedoch eine schwache Proteinbande unterhalb von 28 kDa zu sehen und ein sehr schwaches Signal bei 35 kDa. Dies könnte von strep-PptA bzw. dem verkürzten Fragment stammen, was aber nicht belegbar war.

### 3. Ergebnisse

Tab. 3.6: Zusammenfassung der SEC-Signale und Bestimmung des Molekulargewichts von 10xHis-GlnA1 mit und ohne strep-PptA

|                                  | Peak<br>Nr. | V <sub>Retention</sub><br>[ml] | berechnetes<br>MW [kDa] | Strukturvorschlag               |
|----------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| <b>10xHis-GlnA1</b>              |             |                                |                         |                                 |
| A <sub>280</sub>                 | 1           | 15,90                          | 75,5                    | Monomer                         |
|                                  | 2           | 14,36                          | 165                     | Dimer                           |
|                                  | 3           | 13,03                          | 324                     | Tetramer                        |
|                                  | 4           | 12,27                          | 474                     | Hexamer                         |
|                                  | 6           | 9,40                           | 2030                    | 26-mer                          |
|                                  | LS          | 1                              | 15,73                   | 82,1                            |
| 2                                |             | 14,29                          | 171                     | Dimer                           |
| 3                                |             | 12,99                          | 330                     | Tetramer                        |
| 4                                |             | 12,27                          | 475                     | Hexamer                         |
| 5                                |             | 11,16                          | 833                     | Dekamer                         |
| 6                                |             | 9,12                           | 2340                    | 28-mer                          |
| <b>10xHis-GlnA1 + strep-PptA</b> |             |                                |                         |                                 |
| A <sub>280</sub>                 | 1           | 18,27                          | 22,7                    | Fragment                        |
|                                  | 2           | 16,97                          | 43,8                    | PptA-Monomer                    |
|                                  | 4           | 14,43                          | 159                     | PptA-Tetramer, GlnA1-Dimer      |
|                                  | 5           | 12,86                          | 352                     | PptA-Oktamer, GlnA1-Tetramer    |
|                                  | 6           | 12,29                          | 471                     | PptA-Undekamer, GlnA1-Hexamer   |
|                                  | LS          | 3                              | 15,81                   | 79,0                            |
| 4                                |             | 14,34                          | 167                     | PptA-Tetramer, GlnA1-Dimer      |
| 5                                |             | 13,14                          | 306                     | PptA-Pentamer, GlnA1-Tetramer   |
| 6                                |             | 11,88                          | 578                     | PptA-Tridekamer, GlnA1-Heptamer |
| 7                                |             | 9,39                           | 2050                    | PptA-46-mer GlnA1, 26-mer       |

Fortsetzung folgende Seite



|  | Peak<br>Nr. | $V_{\text{Retention}}$<br>[ml] | berechnetes<br>MW [kDa] | Strukturvorschlag              |
|--|-------------|--------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| <b>10xHis-GlnA1 + strep-PptA + PolyP</b> |             |                                |                         |                                |
| A <sub>280</sub>                         | 1           | 18,34                          | 22,0                    | Fragment                       |
|  | 2           | 16,97                          | 43,8                    | PptA-Monomer                   |
|  | 4           | 14,43                          | 159                     | PptA-Tetramer, GlnA1-Dimer     |
|  | 5           | 12,86                          | 352                     | PptA-Oktamer, GlnA1-Tetramer   |
|  | 6           | 12,48                          | 426                     | PptA-Dekamer, GlnA1-Hexamer    |
| LS                                       | 3           | 15,86                          | 76,8                    | PptA-Dimer, GlnA1-Monomer      |
|  | 4           | 14,43                          | 159                     | PptA-Tetramer, GlnA1-Dimer     |
|  | 5           | 13,25                          | 289                     | PptA-Pentamer, GlnA1-Tetramer  |
|  | 6           | 11,88                          | 578                     | PptA-Tridekamer, GlnA1-Oktamer |
|  | 7           | 9,39                           | 2050                    | PptA-47-mer, GlnA1 27-mer      |

### 3.2.3.3 Test der enzymatischen Aktivität von GlnA1

Mit der gereinigten 10xHis-GlnA1 wurde ein *in vitro* Enzymaktivitätsassay der Synthese von Glutamin aus Glutamat durchgeführt. Das Nebenprodukt ADP bei dieser Reaktion kann indirekt verfolgt werden über den Einsatz zweier nachgeschalteter Reporterreaktionen, in deren Verlauf die Umsetzung von  $\beta$ -NADH, das bei 340 nm absorbiert, zu  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> mit abweichendem Absorptionsverhalten spektrophotometrisch gemessen wird. Die Bildung von Glutamin ist in diesem Enzymaktivitätsassay proportional zur Abnahme der  $A_{340}$  von  $\beta$ -NADH. Die Reporterreaktionen sind in Abschnitt 2.6.13 dargestellt.

Der Glutaminsynthetaseaktivitätsassay wurde in mehreren Schritten ausgeführt (Abb. 3.64): Zunächst wurden alle Substrate ausschließlich Glutamat vorgelegt sowie die 10xHis-GlnA1. So wurde das System äquilibriert, ohne eine Reaktion zu starten. Dann erfolgte die Zugabe der Reporterenzyme PK und LDH. Hier wurde bereits eine leichte Abnahme der  $A_{340}$  gemessen durch eine Verunreinigung des zugefügten ATP mit ADP. Es wurde abgewartet, bis die ADP-Verunreinigung enzymatisch umgewandelt war. Dann wurde die Glutaminsynthetaseaktivität gestartet durch Zugabe von Glutamat als letztem Substrat. Aus Abb. 3.64 ist zu entnehmen, dass eine stetige Abnahme der  $A_{340}$  in Anwesenheit aller Substrate und Reporterenzyme stattfand. Es wurde also Glutamat durch die GlnA1 in Glutamin umgewandelt mit anschließender Oxidation von  $\beta$ -NADH zu  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> durch die LDH. Dies beweist, dass GlnA1 aus *R. eutropha* eine aktive Glutaminsynthetase ist.

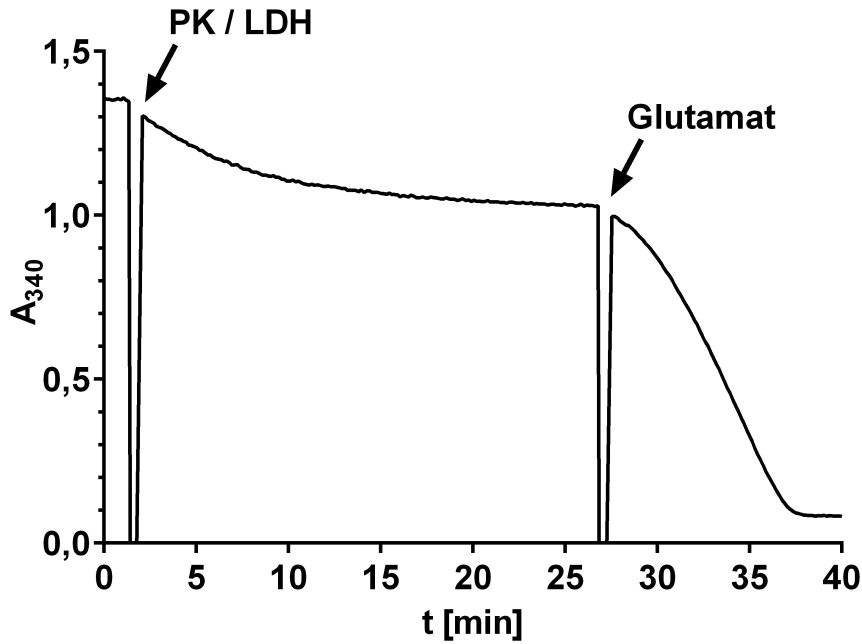


Abb. 3.64: Beispiel der spektrophotometrischen Verfolgung der  $A_{340}$  von  $\beta$ -NADH beim Glutaminsynthetaseaktivitätsassay.

Die Substrate und Enzyme der Reporterreaktionen waren im Überschuss vorhanden, sodass der reaktionsgeschwindigkeitslimitierende Schritt die Glutaminsynthese war. Die Steigung der Absorptionsabnahme ist damit proportional zur Reaktionsgeschwindigkeit der Glutaminsynthese. Nach Zugabe von Glutamat war die Absorptionsabnahme erst gering, da das neue Substrat zum aktiven Zentrum der GlnA1 diffundierte, bevor die Reaktion stattfinden konnte und auch die Reporterreaktionen erst anlaufen mussten, steigerte sich im Laufe der Zeit zu einer linearen Abnahme und flachte am Ende ab, als ein Substrat limitierend wurde.

Aus dem linearen Bereich der Absorptionsabnahme wurde die Reaktionsgeschwindigkeit berechnet und daraus die spezifische Aktivität der GlnA1. Diese betrug unter den Bedingungen des *in vitro* Glutaminsynthetaseassays  $17,2 \pm 2,6 \frac{U}{mg}$  (Abb. 3.65). Glutaminsynthetasen vom Typ I werden durch verschiedene Aminosäuren in ihrer Aktivität gehemmt (Kingdon *et al.*, 1967). Auch die *R. eutropha* 10xHis-GlnA1 verringerte ihre spezifische Aktivität in Anwesenheit von 1 mM Glycin auf  $7,3 \pm 1,7 \frac{U}{mg}$ .

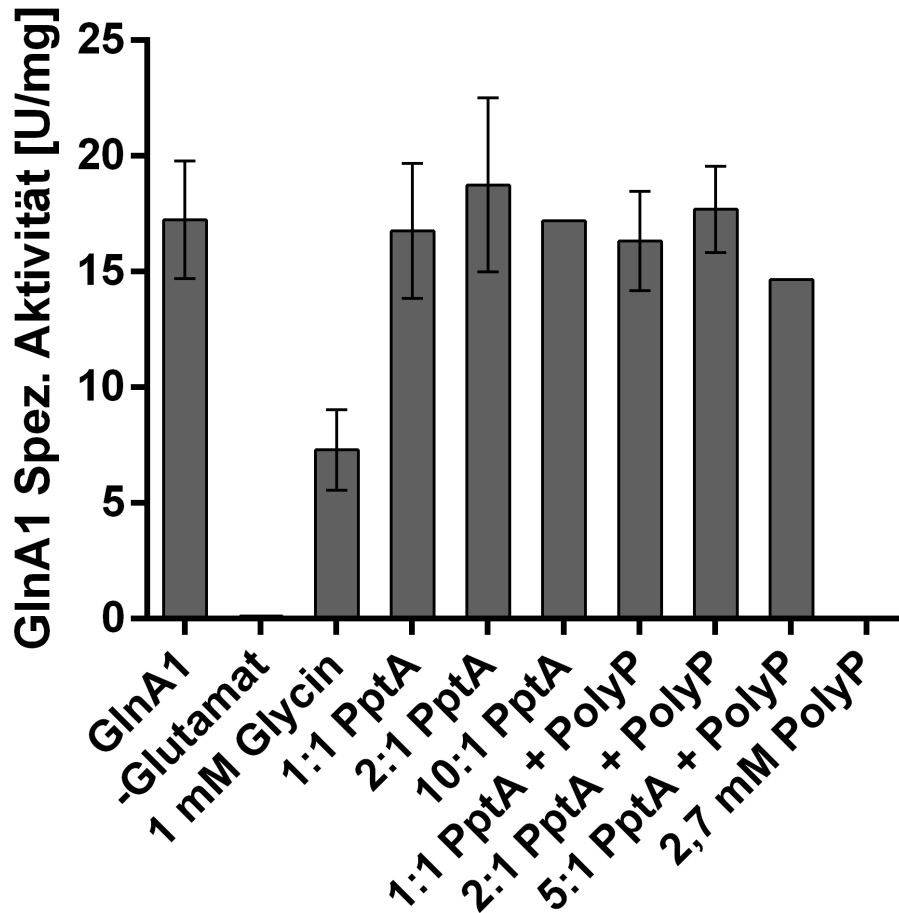


Abb. 3.65: Spezifische Aktivität der 10xHis-GlnA1 im *in vitro* Glutaminsynthetaseaktivitätsassay unter verschiedenen Bedingungen. Die Aktivität der 10xHis-GlnA1 wurde mit 1 mM Glycin, ohne Glutamat oder verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen von strep-PptA mit oder ohne 2,7 mM PolyP im Reaktionsmix bestimmt. Außerdem wurde die Aktivität bei Austausch von ATP durch 2,7 mM PolyP im Reaktionsmastermix gemessen. Dargestellt sind der Mittelwert technischer Triplikate (GlnA1) bzw. technischer Duplikate mit SD oder eine Einzelmessung (10:1 PptA, 5:1 PptA + PolyP).

Daraufhin wurde untersucht, ob die Interaktion von strep-PptA mit GlnA1 ebenfalls die Aktivität von 10xHis-GlnA1 beeinflusste. In Abb. 3.65 ist gezeigt, dass die spezifische Aktivität der 10xHis-GlnA1 bei Zugabe von strep-PptA in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen gleich blieb. *In vivo* bindet PptA neben der GlnA1 auch an PolyP, was deren Struktur zumindest *in vitro* beeinflusste (siehe Abschnitt 3.2.2.4) und daher wichtig für die Funktion von PptA sein kann. Daher wurde die Aktivität der 10x-His-GlnA1 in Anwesenheit von strep-PptA mit PolyP als potentielltem Mediator wiederholt, ohne dass sich eine Änderung der spezifischen Aktivität abzeichnete. Es wurde zudem spekuliert, dass GlnA1 über PptA an PolyP bindet, um das Biopolymer direkt als Phosphatdonor für

die Phosphorylierung der Carboxylgruppe von Glutamat zu verwenden statt ATP. Dafür wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch keine Belege gefunden.

In vitro war die rekombinante 10x-His-GlnA1 von *R. eutropha* enzymatisch aktiv. Somit ist ein Schlüsselenzym des Stickstoffstoffwechsels über PptA an PolyP und den Phosphatstoffwechsel gebunden. Strep-PptA hatte in den gewählten stöchiometrischen Verhältnissen keinen Einfluss auf die Aktivität von 10xHis-GlnA1. Auch konnte die 10xHis-GlnA1 nicht PolyP als Substrat verwenden.

#### **3.2.3.4 Protein-Interaktionsstudien von GlnA1 durch einen Pulldown und bac2hybrid**

Eine Bindung zwischen dem CHAD-Protein PptA und der GlnA1 wurde nachgewiesen, jedoch war keine Funktion dieser Interaktion bekannt. Hier liegt eine potentielle Schnittstelle zwischen dem Stickstoff- und Phosphatstoffwechsel vor. Um die Rolle der GlnA1 neben ihrer Funktion als Glutaminsynthetase, mit besonderem Augenmerk auf den Phosphatstoffwechsel, weiter aufzuklären, wurde ein Protein-Pulldown mit dem Fusionsprotein eYFP-GlnA1 als Köder in *R. eutropha* WT, der  $\Delta ppk\text{-}all$  Mutante und der  $\Delta pptA$  Mutante mit pBBR1MCS-2- $P_{PhaC}$ -*eyfp-glnA1* durchgeführt. Dazu wurde nach Expression von *eyfp-glnA1* in NB Medium ein Zelllysats hergestellt und eYFP-GlnA1 mit den daran gebundenen Proteinen durch magnetische Kugeln mit eYFP-Bindeaffinität isoliert. Die isolierten Proteine wurden etwa 1 cm in der SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.66), mit Trypsin verdaut und die Fragmente mit LC-MS analysiert (durchgeführt von der Core Facility Massenspektrometrie, AG Pfannenstiel, Universität Hohenheim).

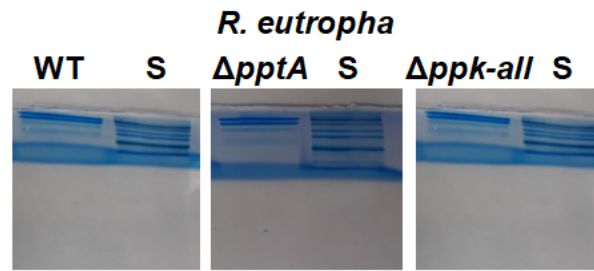


Abb. 3.66: SDS-PAGE der isolierten Proteine im Pulldown mit eYFP-GlnA1 in *R. eutropha* Ganzzelllysaten. *R. eutropha* WT,  $\Delta ppk-all$  und  $\Delta pptA$  mit pBBR1MCS-2- $P_{PhaC}$ -*eyfp-glnA1* wurden nach einer ü. N. Vorkultur in NB Medium + Kan50 und einer 24 h Vorkultur in Schlegel-MSM + 0,2 % Fruktose auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 in 200 ml Schlegel-MSM + 0,8 % Fruktose + Kan50 angeimpft bei 30 °C schüttelnd kultiviert. Bei einer  $OD_{600}$  von 4 wurden die Kulturen geerntet, mit der French press aufgeschlossen und mit magnetischen Kugeln mit eYFP-Bindeaffinität inkubiert. Die magnetischen Kugeln wurden isoliert, gewaschen und die gebundenen Proteine durch Denaturierung abgenommen. Die Proben wurden mit 3x Laemmli-Puffer versetzt und auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen. S = Proteinstandard.

In *R. eutropha* WT wurden 634 verschiedene Proteine identifiziert, in der  $\Delta ppk-all$  Mutante 570 Proteine und in der  $\Delta pptA$  Mutante 518 Proteine. Diese wurden absteigend nach Anzahl der gefundenen Fragmente sortiert. Eine Negativkontrolle nur mit eYFP fehlte, sodass als Anhaltspunkt der Pulldown von Tumlirsch, 2017 verwendet wurde, der unter gleichen Bedingungen mit eYFP als Köder in *R. eutropha* durchgeführt wurde. In Tab. 3.7 ist eine Auswahl GlnA1-gebundener Proteine aufgeführt mit der Nummer der Rangfolge bezüglich Anzahl der Peptidfragmente. Dargestellt sind Proteine mit starkem Bezug zum PolyP- oder Stickstoffstoffwechsel sowie eine Häufung von Proteinen, die mit vielen Fragmenten gefunden wurden und deren Gene benachbart auf Chromosom B vorliegen aus dem Bereich der Peptidsynthese bzw. dem Aminosäurestoffwechsel.

Tab. 3.7: Auswahl identifizierter Proteine im Pulldown eYFP-GlnA1 in *R. eutropha* Zelllysaten.

| Nr. | Protein<br>(Gennummer)                                       | Anzahl Fragmente |               |                  |
|-----|--|------------------|---------------|------------------|
|     |  | WT               | $\Delta pptA$ | $\Delta ppk-all$ |
| 1   | GlnA1 (A2335)  | 103              | 109           | 84               |
| 2   | Nicht-ribosomale Peptidsynthetase (B1687)                    | 71               | 56            | 63               |
| 7   | Nicht-ribosomale Peptidsynthetase (B1685)                    | 32               | 22            | 32               |
| 10  | Lon-Protease (A1485)   | 26               | 26            | 20               |
| 13  | Lysin/Ornithin N-Monooxygenase (B1680)                       | 17               | 13            | 12               |
| 29  | Nicht-ribosomale Peptidsynthetase (B1686)                    | 14               | 10            | 13               |
| 31  | Nicht-ribosomale Peptidsynthetase-verwandtes Protein (B1683) | 16               | 14            | 15               |
| 100 | PhoH-verwandte ATPase (A2270)                                | 7                | 6             | 4                |
| 147 | PptA (A0104)   | 6                | 0             | 8                |
| 154 | PhoH (A0527)   | 1                | 1             | 0                |
| 281 | NtrB (A2333)   | 5                | 2             | 3                |
| 375 | Phosphattransportregulator PhaX (A2274)                      | 3                | 0             | 0                |
| 380 | NtrC (A2332)   | 1                | 2             | 1                |
| 424 | PII Uridylyltransferase (A2057)                              | 2                | 2             | 0                |
| 431 | PII (A0750)  | 2                | 0             | 0                |

Im Protein-Pulldown mit eYFP-GlnA1 als Köder wurden Proteine aus verschiedenen zellulären Funktionsbereichen identifiziert. Darunter waren mehrere Enzyme der Glykolyse, des Aminosäurestoffwechsels, Proteine der Transkription und Translation, Chaperone und Proteasen, der Zellteilung, der Zellwandbiosynthese sowie des Stickstoff- und Phosphatstoffwechsels. Das häufigste Protein war die GlnA1 selbst als Positivkontrolle.

Als bekanntes Protein wurde PptA als Interaktionspartner in *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk-all$  Mutante gefunden. Dies bestätigt einerseits die Bindung von PptA an GlnA1 unabhängig von PolyP und andererseits die Deletion von *pptA*. Zudem wurden NtrB und NtrC identifiziert, die zum Zweikomponentensystem zur Regulation der stickstoffstoffwechselabhängigen Genexpression gehören. Deren Gene A2333 und A2332 liegen benachbart zur *glnA1* (A2335). Auch wurde das die Enzymaktivität regulierende Protein PII sowie die PII Uridylyltransferase identifiziert. Dabei wurde PII nur in *R. eutropha* WT an GlnA1 gebunden gefunden, die PII Uridylyltransferase im WT und der  $\Delta pptA$  Mutante. Ein weiterer Interaktionspartner der GlnA1, der nur in *R. eutropha* WT gefunden wur-

de, ist der putative Phosphattransportregulator PhaX (A2274). Darüber hinaus wurden zwei weitere Proteine im Zusammenhang mit dem Phosphatstoffwechsel als Interaktionspartner der GlnA1 identifiziert, das phosphatmangelinduzierte Protein PhoH, das jedoch nicht in der  $\Delta ppk-all$  Mutante zu finden war, und eine PhoH-verwandte ATPase. Auch die Lon-Protease, die PolyP-abhängig für spezifische Proteindegradation bei Stresssituationen wie der stationären Phase oder als Bestandteil der *stringent response* zuständig ist.

Auffällig war die Identifizierung dreier Nicht-ribosomaler Peptidsynthetasen und einem Peptid-Synthetase-verwandten Protein (B1683, B1685, B1686, B1687) unter den ersten 31 Treffern sortiert nach Fragmentanzahl. Dies macht eine spezifische Interaktion dieser Proteine mit GlnA1 wahrscheinlich. Eine häufig gefundene Lysin/Ornithin N-Monooxygenase (B1680) fiel ebenfalls auf, da sie im Genom nahe der Peptidsynthetasegene liegt und wie diese eine Funktion im Sekundärmetabolismus der Aminosäure- und Peptidsynthese hat. Auf weitere identifizierte Proteine wie Proteasen, Untereinheiten der RNA-Polymerase, ribosomale Proteine und Enzyme des Primär- und Sekundärstoffwechsels wie PHB-assoziierte Proteine wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen. Einige davon sind sehr häufig vorkommende Proteine und könnten falsch positiv sein. Eine vollständige Liste der identifizierten Proteine ist im Anhang in Tab. 5.4 zu finden.

Beim Protein-Pulldown mit eYFP-GlnA1 als Köder wurden potentielle Interaktionspartner der Glutaminsynthetase in *R. eutropha* identifiziert, darunter zwei Proteine zur Regulation der Enzymaktivität, Enzyme des Aminosäurestoffwechsels sowie der Regulation des Stickstoff- und Phosphatstoffwechsels. Das CHAD-Protein PptA wurde als direkter Interaktionspartner ohne Mediation durch PolyP bestätigt.

Von den im eYFP-GlnA1 Pulldown identifizierten Proteinen standen unter anderem PptA, das bereits bekannt war sowie das phosphatmangelinduzierbare Protein PhoH, das auch an das PolyP Granulum bindet, mit dem Phosphatstoffwechsel in Verbindung. Die Interaktion von PhoH mit der GlnA1 wurde mittels bac2hybrid gezielt untersucht. Die Komplementierung der Adenylatcyclase durch Interaktion der Proteine von Interesse wurde über Kultivierung der Zellen auf M63-X-Gal-Agar und MacConkey-Agar (Abb. 3.67) und einen  $\beta$ -Galaktosidaseassay (Abb. 3.68) geprüft.

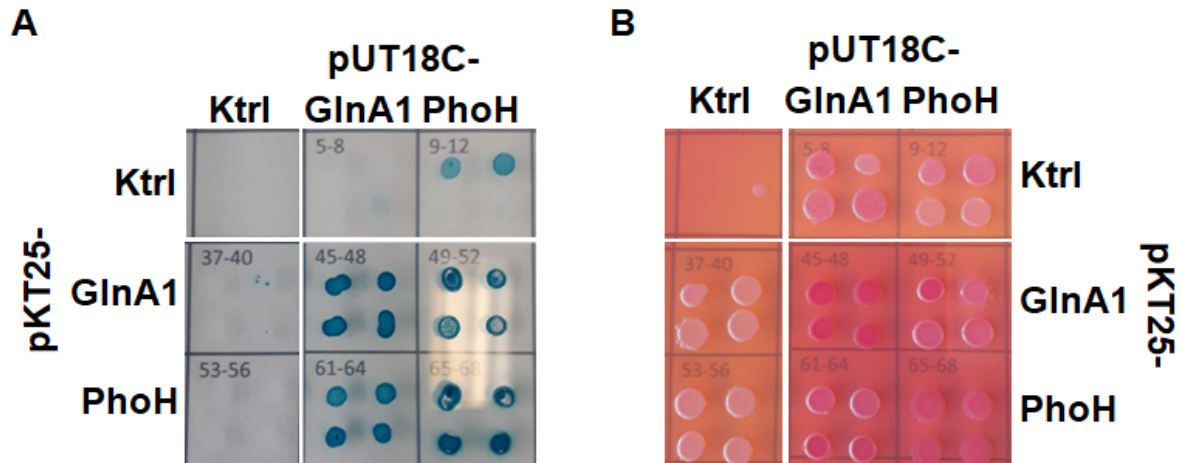


Abb. 3.67: Untersuchung der in vivo Proteininteraktion der GlnA1 mit PhoH von *R. eutropha* durch bac2hybrid Assay. Die Kombinationen der angegebenen Gene auf den Plasmiden pUT18C und pKT25 wurde in *E. coli* BTH 101 kotransformiert. Die Expression fand in einer ü. N. Kultur in LB-Kan50-Amp100-IPTG-Medium bei 30 °C statt. 1 µl Kultur wurde in auf A) M63-X-Gal-Agar oder B) MacConkey-Maltose-Agar aufgetropft und für 2 d bei 30 °C inkubiert. Interaktion der Proteine von Interesse wurde angezeigt durch A) blaue Kolonien bzw. B) rote Kolonien. Es wurden pro Kombination vier biologische Replikate getestet.

Über die Fähigkeit X-Gal (Abb. 3.67 A) und Maltose (Abb. 3.67 B) zu verstoffwechseln wurde die Interaktion von GlnA1 mit sich selbst und mit PhoH sowie PhoH mit sich selbst gezeigt. Allerdings waren auf M63-X-Gal-Agar auch in der Negativkontrolle von PhoH mit C-terminalem Fragment kombiniert mit dem N-terminalen Fragment ohne Fusion zwei Kolonien leicht blau gefärbt.

Der  $\beta$ -Galaktosidaseassay (Abb. 3.68) bestätigte eine Interaktion von GlnA1 und PhoH mit sich selbst, die zu einer starken Induktion der  $\beta$ -Galaktosidase führte, und eine Interaktion zwischen GlnA1 und PhoH, die zu eine etwas geringeren Induktion der  $\beta$ -Galaktosidase führte.

Die funktionale Glutaminsynthetase GlnA1 aus *R. eutropha* interagiert mit PhoH, einem Protein des Phosphatstoffwechsels. In Abschnitt 3.2.2.9 wurde bereits eine Interaktion von GlnA1 mit PptA bestätigt. Weitere Proteine aus dem Phosphatstoffwechsel wurden als potentielle Interaktionspartner der GlnA1 in Abschnitt 3.2.3.4 identifiziert, z.B. der putative Phosphattransportregulator PhaX. Damit scheint in *R. eutropha* eine Schnittstelle zwischen dem Stickstoff- und Phosphatstoffwechsel am PolyP Granulum zu existieren. Zusammengefasst zeigte sich bei der Untersuchung PolyP assoziierter Proteine in *R. eutropha*, dass die CHAD-Proteine, insbesondere untersucht für PptA, einen Einfluss auf den PolyP Metabolismus und die Anzahl der Granula pro Zelle haben können. Deletionen von *pptA* und *pptB* erzielten jedoch nur geringfügige phänotypische Abweichungen vom



WT. Diese Gene *pptA* und *pptB* wurden in NB Medium ab Beginn der stationären Phase zwischen 12 und 24 h Kultivierung exprimiert, *pptB* stärker als *pptA*. Es wurden weitere potentiell an PolyP bindende Proteine identifiziert und eine spezifische Interaktion zwischen PptA und GlnA1, einer aktiven Glutaminsynthetase, bestätigt. Für die GlnA1 wurden weitere Interaktionspartner aus dem Phosphatstoffwechsel entdeckt, darunter PhoH. Sowohl für PptA als auch GlnA1 wurden in vitro mittels SEC-MALS verschiedene Oligomerisierungszustände entdeckt. PptA wies in einer in vivo bac2hybrid Interaktionsstudie dagegen keine Interaktion mit sich selbst auf. Die Quartärstruktur von PptA bleibt somit ungeklärt.

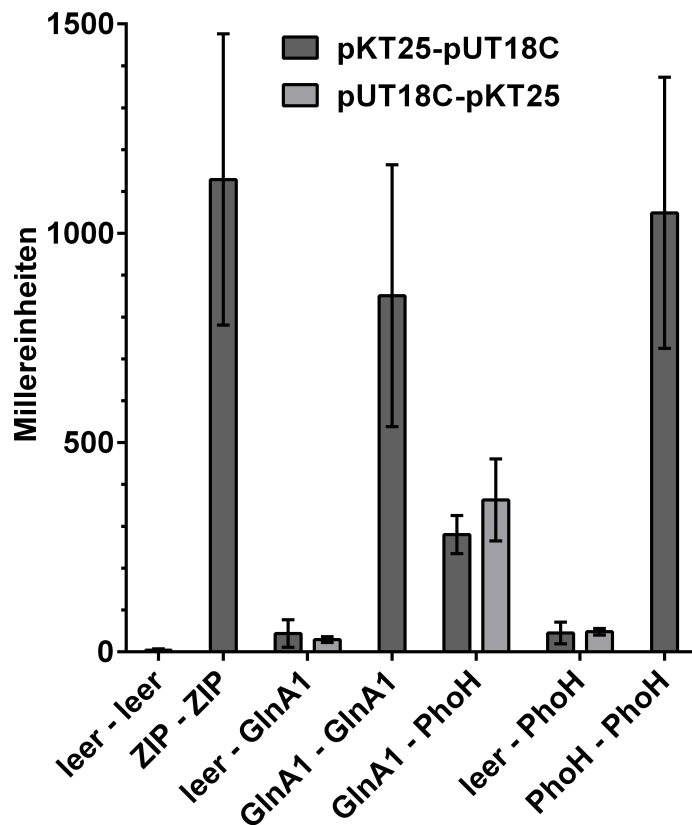


Abb. 3.68:  $\beta$ -Galaktosidaseassay zur Untersuchung von in vivo Proteininteraktionen der GlnA1 von *R. eutropha* durch *bacterial two-hybrid* Assay. Die Kombinationen der angegebenen Gene auf den Plasmiden pUT18C und pKT25 wurden in *E. coli* BTH 101 kotransformiert. Die Expression fand in einer  $\bar{u}$ . N. Kultur in LB-Kan50-Amp100-IPTG-Medium bei 30 °C statt. Die Zellen wurden mit Toluol permeabilisiert und die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase bei Zugabe von ONPG colorimetrisch im Plattenlesegerät verfolgt. Die quantitative Enzymaktivität, beobachtet durch eine Absorptionssteigerung, wurde in Millereinheiten umgerechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SD von vier biologischen Replikaten.

### 3.3 Strukturanalyse von PolyP und *R. eutropha* Zellen

Nachdem der Metabolismus und die Funktion des Biopolymers PolyP in *R. eutropha* unter verschiedenen Bedingungen untersucht und die PolyP assoziierten Proteine bezüglich ihrer Funktion und Struktur geprüft wurden, sollte abschließend die Struktur von PolyP selbst aufgeklärt und die Präsenz und Abundanz der Moleküle in der gesamten Zelle in Abhängigkeit von PolyP betrachtet werden.

#### 3.3.1 Untersuchung der chemischen Zusammensetzung von *R. eutropha* durch Raman-Mikrospektroskopie

Um einen Überblick über den zellulären Gehalt an Molekülen in *R. eutropha* Zellen zu erhalten, wurden Kulturen von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante mit Raman-Mikrospektroskopie untersucht. Dafür wurde eine dicht gewachsene, für 24 h in NB Medium + 0,2 % Fruktose kultivierte Zellkultur auf ein CaF-Fenster getropft, an der Luft getrocknet und mit einem Laser angeregt. Die inelastische Streuung des Lichts an den Molekülen der Zellen wurde spektroskopisch erfasst mit dem inVia™ Reflex Raman Mikrospektroskop (Renishaw, Wotton-under-Edge, Großbritannien). Dabei wurde die Änderung der Wellenzahl in Bezug auf das einfallende Licht des Lasers gemessen. Die Prozessierung der Daten sowie Normalisierung der Spektren auf das konstante Signal von Phenylalanin bei  $1004\text{ cm}^{-1}$  erfolgte mit der Software WiRE. Die Messungen wurden am *National Institute for Instruments of the Czech Academy of Sciences* in Brno (Tschechien) durchgeführt unter der Betreuung von Ota Samek und Martin Kizovský, die auch bei der Auswertung beratend zur Seite standen.

Zuerst wurde geprüft, ob mit der verwendeten Methode das prinzipiell Raman-aktive PolyP überhaupt detektierbar war. Dazu wurde der PolyP Standard S100, der aus rund 100 Monophosphaten bestand, als Feststoff und als 1 M wässrige Lösung im Raman Mikrospektroskop gemessen (Abb. 3.69).

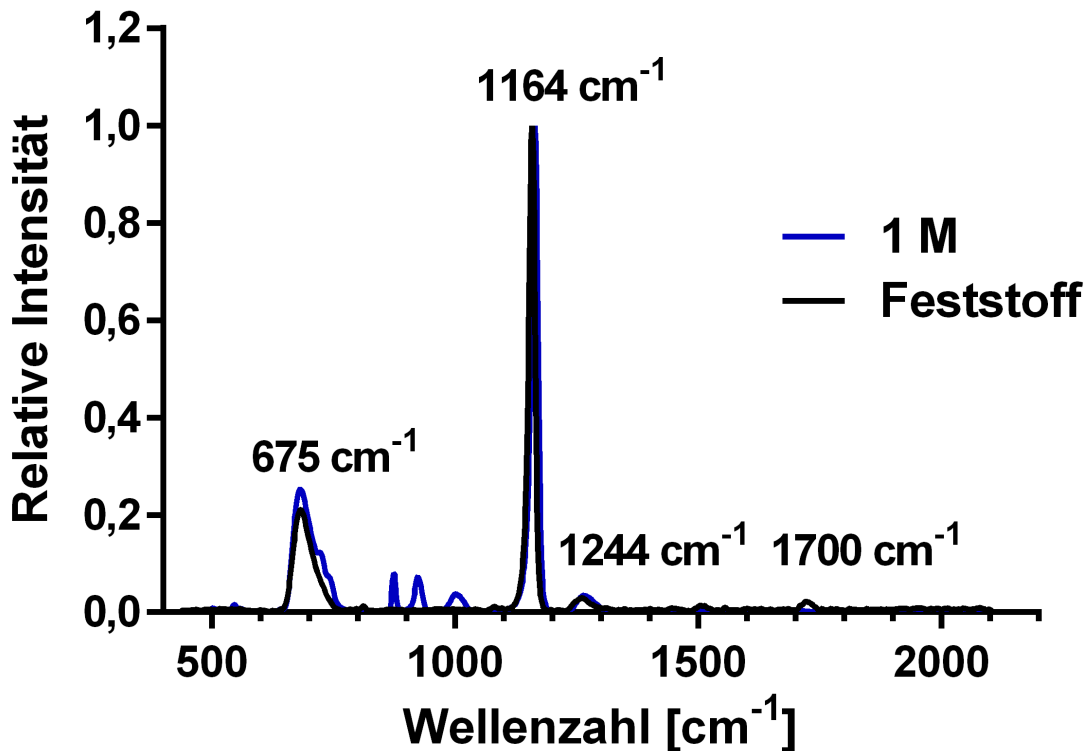


Abb. 3.69: Raman-Spektren von festem PolyP und einer 1 M wässrigen PolyP Lösung bei Anregung mit 532 nm. PolyP bzw. ein Tropfen der 1 M Lösung wurde auf einem CaF<sub>2</sub>-Fenster getrocknet und mit dem InVia<sup>TM</sup> Reflex Raman Mikrospektrometer (Renishaw, Wotton-under-Edge, Großbritannien) mit einer Wellenlänge von 532 nm angeregt. Es wurden 60 Einzelspektren mit einer Belichtungszeit von 1 s aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung und drei technische Replikate gemittelt. Anschließend wurden die Signale gegen die Intensität des stärksten Signals bei 1164 cm<sup>-1</sup> normalisiert.

Mit der verwendeten Methode konnte pures und konzentriertes PolyP in Lösung nachgewiesen werden, insbesondere ein Signal bei 675 cm<sup>-1</sup> und die PO<sub>2</sub><sup>-</sup> Streckschwingung (str.) bei 1164 cm<sup>-1</sup> sowie zwei geringe Signale bei 1244 cm<sup>-1</sup> und 1700 cm<sup>-1</sup>. Bei der wässrigen Lösung wurden zusätzliche Signale zu denen des Feststoffs detektiert bei 872 cm<sup>-1</sup>, 918 cm<sup>-1</sup> und 985 cm<sup>-1</sup>. Bei Anregung mit dem 785 nm Laser wurde ebenfalls ein starkes Signal der PO<sub>2</sub><sup>-</sup> Streckschwingung bei 1163 cm<sup>-1</sup> detektiert, jedoch traten bei dieser Anregungswellenlänge unspezifische Hintergrundsignale auf, sodass sie für diese Probe weniger geeignet war (vgl. Abb. Anhang 5.13).

Daraufhin wurden Raman Spektren von frischen Zellpellets von *R. eutropha* WT,  $\Delta pptA$  und der  $\Delta ppk-all$  Mutante aufgenommen. In Abb. 3.70 ist beispielhaft das Raman-Spektrum von *R. eutropha* WT in der exponentiellen Phase nach 5 h Kultivierung in NB Medium und in der stationären Phase nach 24 h dargestellt bei Anregung mit einem 785 nm Laser. Für Proben mit ganzen Zellen war diese Wellenlänge besser geeignet als 532 nm, da

bei rotem Licht die generierten Spektren mehr spezifische Signale zum Identifizieren der Biomoleküle von Interesse boten, während der Hintergrund bei beiden Anregungswellenlängen ähnlich war. Die Spektren wurden normalisiert auf das Phenylalaninsignal bei  $1004\text{ cm}^{-1}$ . Alle Raman-Spektren sind im Anhang abgebildet.

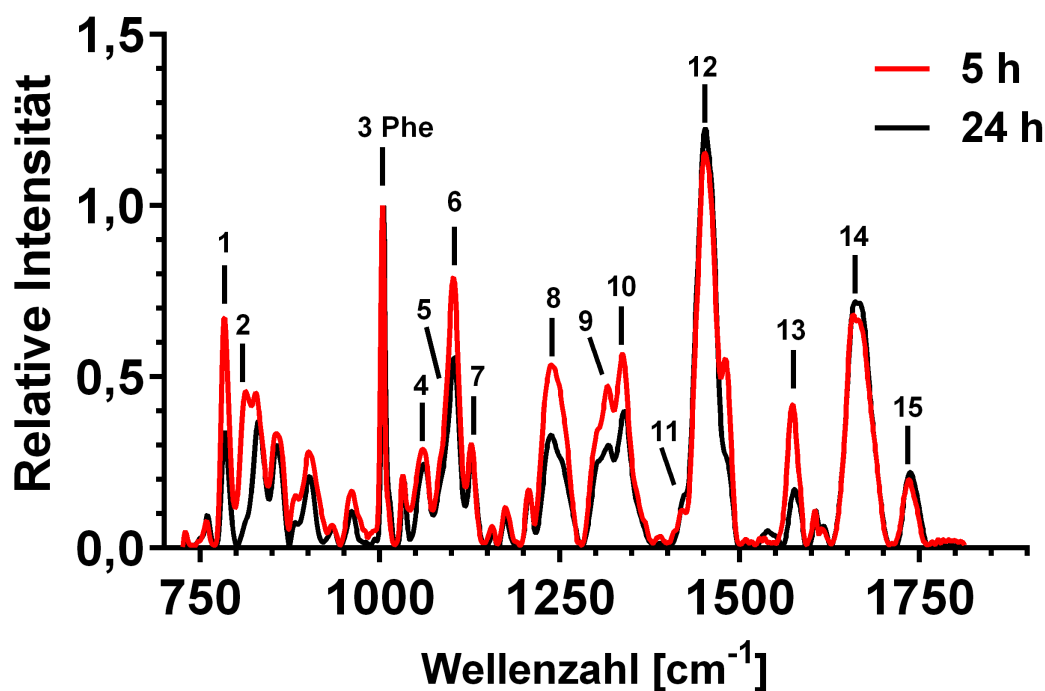


Abb. 3.70: Raman-Spektren von *R. eutropha* WT nach 5 h und 24 h Kultivierung in NB Medium + 0,2 % Fruktose. 2 ml Zellkultur wurde nach 5 h (rot) und 24 h (schwarz) Kultivierung in NB Medium + 0,2 % Fruktose zentrifugiert und einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, das Pellet auf einem CaF-Fenster getrocknet und mit dem InVia™ Reflex Raman Mikrospektrometer (Renishaw, Wotton-under-Edge, Großbritannien) mit einer Wellenlänge von 785 nm angeregt. Es wurden 60 Einzelspektren mit einer Belichtungszeit von 1 s aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung und drei technische Replikate gemittelt. Anschließend wurden die Signale gegen die Intensität des Phenylalaninsignals bei  $1004\text{ cm}^{-1}$  normalisiert.

Der 532 nm Laser und 785 nm Laser regten die Moleküle in *R. eutropha* Zellen auf unterschiedliche Weise an (siehe Abb. Anhang 5.14). Bei Anregung mit 785 nm konnten Signale für bedeutende Biomoleküle gut zugeordnet werden, weshalb im Folgenden mit diesen Spektren weitergearbeitet wurde. Nach Anregung frischer *R. eutropha* Zellpellets mit einem 785 nm Laser wurden im Bereich von  $726\text{ cm}^{-1}$  bis  $1814\text{ cm}^{-1}$  Raman-Signale detektiert. Die Signalintensität bei einer bestimmten Wellenzahl ist spezifisch für eine bestimmte Art der Anregung im Molekül, wie z.B. Streckschwingung von C-C Einfachbindungen, und zusätzlich abhängig von der Konzentration des Stoffes. Dadurch lassen

sich Signale vom gleichen angeregten Molekül in zwei Proben semiquantitativ vergleichen. Bei *R. eutropha* WT traten teilweise Unterschiede in der Signalintensität zwischen Zellen der exponentiellen und stationären Phase auf. Die Zuordnung der Signale zur Art der angeregten Moleküle und wenn möglich Bezug zu zellulären Strukturen mit Angabe der relativen Signalintensität ist in Tab. 3.8 aufgeführt.

Tab. 3.8: Übersicht prägnanter Raman-Signale in *R. eutropha* WT in der exponentiellen (5 h) und stationären Phase (24 h) in NB Medium. (str. = Streckschwingung, (a)sym. = (a)symmetrisch, def. = Deformationsschwingung)

| Signal | Wellenzahl<br>[cm <sup>-1</sup> ] | Herkunft  | relative Intensität |      |
|--------|-----------------------------------|---|---------------------|------|
|        |                                   |   | 5 h                 | 24 h |
| 1      | 783                               | Cytosin, Uracil Ring str. (RNA, DNA)            | 0,67                | 0,33 |
| 2      | 811                               | Phosphodiester (RNA, DNA)                       | 0,43                | 0,07 |
| 3      | 1004                              | Phenylalanin (Referenz)                         | 1,00                | 1,00 |
| 4      | 1054                              | C-O str.  | 0,26                | 0,18 |
| 5      | 1094                              | PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> str. (RNA, DNA)    | 0,32                | 0,34 |
| 6      | 1100                              | C-O-C sym. str.                                 | 0,77                | 0,54 |
| 7      | 1125                              | C-N str. (Proteine)                             | 0,28                | 0,25 |
| 8      | 1233                              | Amid III (Proteine)                             | 0,50                | 0,30 |
| 9      | 1313                              | CH <sub>2</sub> Drehung (Lipide)                | 0,46                | 0,27 |
| 10     | 1335                              | Adenosin  | 0,55                | 0,36 |
| 11     | 1451                              | CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> def. (Lipide) | 1,15                | 1,21 |
| 12     | 1571                              | C-C Guanosin, Adenosin (RNA, DNA)               | 0,40                | 0,13 |
| 13     | 1656                              | Amid I (Protein)                                | 0,69                | 0,67 |
| 14     | 1732                              | C=O str. amorphes PHB                           | 0,18                | 0,19 |

Bei mehreren Signalen von Nukleinsäuren (783 cm<sup>-1</sup>, 811 cm<sup>-1</sup>, 1335 cm<sup>-1</sup>, 1571 cm<sup>-1</sup>) waren die Signalintensitäten der Zellen in der exponentiellen Phase höher als bei den stationären Phase Zellen, während das Signal für das Phosphatrückgrad von RNA und DNA bei 1094 cm<sup>-1</sup> annähernd gleich war. Das Absinken der Signalintensitäten ist erklärbar durch die unterschiedlichen physiologischen Zustände. In der exponentiellen Phase lagen ständig große Mengen an RNA vor, insbesondere rRNA für die Proteinbiosynthese, und es fand DNA Replikation für das Zellwachstum statt, sodass mehr als ein vollständiges Genom pro Zelle vorlag.

Etwas geringer als in der stationären Phase fiel das Signal in der exponentiellen Phase bei  $1451\text{ cm}^{-1}$  aus, das für Lipide steht. Da zu diesem Signal verschiedene Lipide beitragen können, ist ein konkreter Bezug zur zellulären Struktur nicht zu ziehen. Eine Erklärung wäre eine Veränderung der Lipidzusammensetzung in der stationären Phase hin zu Lipiden, die höhere Signalintensitäten hervorrufen oder eine generell höhere Konzentration an Lipiden relativ zum Proteingehalt in der Zelle, da die Intensität immer relativ zu Phenylalanin dargestellt ist.

Ein eindeutiges PolyP Signal im Bereich um  $1165\text{-}1175\text{ cm}^{-1}$  fehlte bei beiden Zeitpunkten (Signalintensität zwischen  $0,013\text{-}0,116$  beim WT bzw.  $0,005\text{-}0,091$  bei der  $\Delta ppk\text{-}all$  Mutante). In der exponentiellen Phase lag vermutlich auch im WT kaum PolyP vor, während in der stationären Phase im WT ein Signal erwartet wurde. Somit musste zusätzlich getestet werden, ob ein PolyP spezifisches Raman-Signal bei der Messung von *R. eutropha* Zellen bei  $785\text{ nm}$  überhaupt auftrat.

Dazu wurde ein *R. eutropha* pBBR1MCS-2- $P_{\text{PhaC}}\text{-}eyfp\text{-}ppk2c$  Überexpressionsstamm analysiert (Abb. 3.71), dessen Phänotyp eine übermäßige Produktion von PolyP Granula ausmacht (Hildenbrand *et al.*, 2019; Tumlirsch, 2017).

Die Raman-Spektren von *R. eutropha* WT und dem *ppk2c* Überexpressionsstamm waren ähnlich, in einigen Bereichen lag die Signalintensität des Überexpressionsstamms geringfügig höher als im WT. Ein Signal bei  $1170\text{ cm}^{-1}$  war mit  $0,28$  relativer Intensität zum WT mit  $0,06$  deutlich erhöht. Dieses Signal deckte sich mit dem Hauptsignal für die  $\text{PO}_2^-$  Streckschwingung des Phosphoesters beim reinen PolyP. Diese Messung validierte die generelle Detektion von PolyP in *R. eutropha* Zellen mit der verwendeten Methode der Raman-Mikrospektroskopie, auch bei Anregung mit  $785\text{ nm}$ , und verdeutlichte, dass bei der Messung von *R. eutropha* WT Zellen kein herausragendes PolyP detektiert wurde.

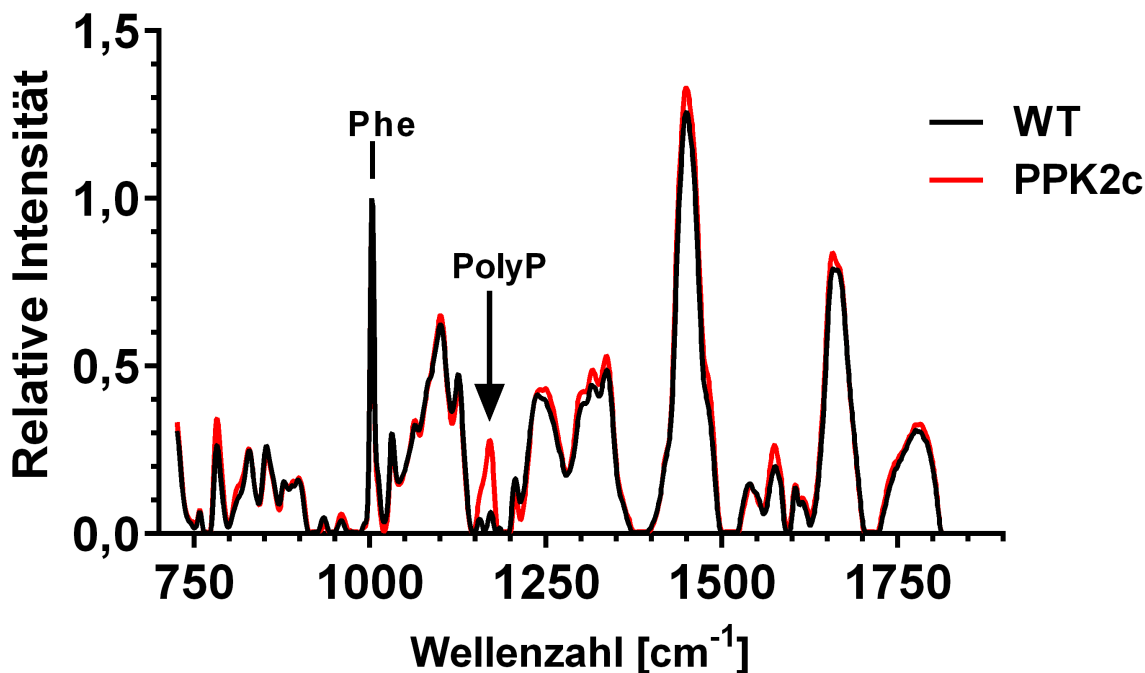


Abb. 3.71: Raman-Spektren von *R. eutropha* WT ohne und mit pBBR1MCS-2-P<sub>PhaC</sub>-*eyfp-ppk2c* nach 24 h Kultivierung in NB Medium bei Anregung mit 785 nm. 2 ml Zellkultur von *R. eutropha* WT (schwarz) und *R. eutropha* mit pBBR1MCS-2-P<sub>PhaC</sub>-*eyfp-ppk2c* (rot, PPK2c) nach 24 h Kultivierung in NB Medium wurde zentrifugiert und einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Pellet wurde auf einem CaF-Fenster getrocknet und mit dem InVia™ Reflex Raman Mikrospektrometer (Renishaw, Wotton-under-Edge, Großbritannien) mit einer Wellenlänge von 785 nm angeregt. Es wurden 60 Einzelspektren mit einer Belichtungszeit von 1 s aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung und drei technische Replikate gemittelt. Anschließend wurden die Signale gegen die Intensität des Phenylalaninsignals bei 1004 cm<sup>-1</sup> normalisiert.

Die Auswertung der Raman-Spektren validierte, dass mit Raman-Mikrospektroskopie ein semiquantitativer Überblick über die vorherrschenden Moleküle in den Zellen zu gewinnen war.

Nun wurden die Raman-Spektren von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante (Abb. 3.72) bzw. der  $\Delta pptA$  (Abb. 3.73) subtrahiert, um Unterschiede in den Signalintensitäten hervorzuheben und auf qualitative oder quantitative Unterschiede in der Zellstruktur zu schließen.

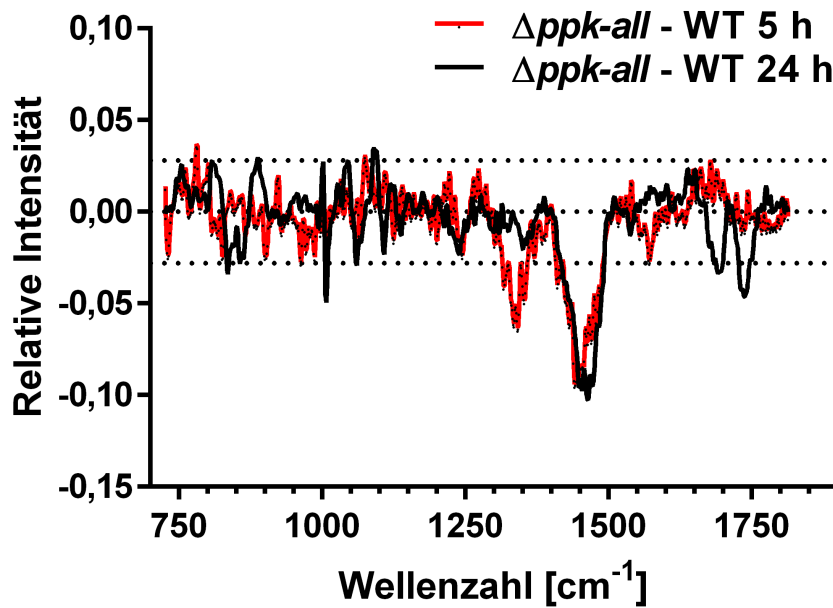


Abb. 3.72: Raman-Differenzspektren von *R. eutropha*  $\Delta ppk\text{-all}$  - WT nach 5 h und 24 h Kultivierung in NB Medium + 0,2 % Fruktose bei Anregung mit 785 nm. Die Signale wurden gegen die Intensität des Phenylalaninsignals bei 1004 cm<sup>-1</sup> normalisiert. Zwei gepunktete Linien markieren den Bereich der doppelten Standardabweichung, die als unspezifische Signalintensität definiert wurde.

Die Raman-Spektren von *R. eutropha* WT Zellen und der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante waren sehr ähnlich mit Abweichungen von meist unter 0,05 der relativen Signalintensität. Als Vergleich lag die durchschnittliche Standardabweichung der relativen Signalintensität der drei technischen Replikate zwischen 0,005 und 0,014. Um spezifische Unterschiede hervorzuheben, wurden nur Signale betrachtet, deren Unterschied mindestens dem doppelten der maximalen Standardabweichung von 0,014 entsprach. Dadurch wurden Signale ausgeschlossen, die aufgrund der Akkumulation der Standardabweichung beider Spektren einen gewissen Unterschied in der Signalintensität erreichten. In Tab. 3.9 sind prominente Signale aufgelistet, deren Intensitätsunterschiede beim WT und der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante über die doppelte Standardabweichung hinausgingen.



Tab. 3.9: Auswahl identifizierter Moleküle im Raman-Differenzspektrum von *R. eutropha*  $\Delta ppk$ -*all* - WT

| Wellenzahl<br>[cm <sup>-1</sup> ] | Intensitätsdifferenz | Substanz                                       |
|-----------------------------------|----------------------|--|
| <b>5 h</b>                        |                      |  |
| 781                               | 0,037                | Ring str. Cytosin, Uracil                      |
| 1075                              | 0,031                | nicht identifiziert                            |
| 1317                              | -0,041               | Lipide   |
| 1334                              | -0,060               | C-N vib. Adenosin,<br>Guanosin                 |
| 1337                              | -0,051               | C-N vib. Protein                               |
| 1440                              | -0,091               | CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> def., Lipide |
| <b>24 h</b>                       |                      |  |
| 834                               | -0,031               | Tyr, PHB                                       |
| 1006                              | -0,045               | nicht identifiziert                            |
| 1074                              | 0,028                | nicht identifiziert                            |
| 1454                              | -0,098               | Lipide   |
| 1688                              | -0,028               | nicht identifiziert                            |
| 1730                              | -0,042               | PHB  |

Die Unterschiede in den Raman-Signalintensitäten zwischen *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante mit mehr als dem Doppelten der Standardabweichung betrafen in der exponentiellen Phase sowohl Nucleinsäuren als auch Proteine und Lipide, in der stationären Phase Lipide und PHB. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die zelluläre Zusammensetzung in den beiden Stämmen bezüglich dieser Molekülgruppen qualitativ oder quantitativ unterschiedlich ist. Unterschiedliche Signalintensitäten zwischen 1165 und 1175 cm<sup>-1</sup> für PolyP wurde hier jedoch nicht ermittelt. Zumindest bei t=24 h müsste aber ein unterschiedlicher PolyP Gehalt in *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante vorliegen.

Auch das Differenzspektrum von *R. eutropha*  $\Delta pptA$  - WT zeigte nur geringfügige Unterschiede zwischen WT Zellen und dieser Mutante auf. Die Signale mit mehr als der doppelten Intensität der Standardabweichung wurden in Tab. 3.10 aufgelistet.

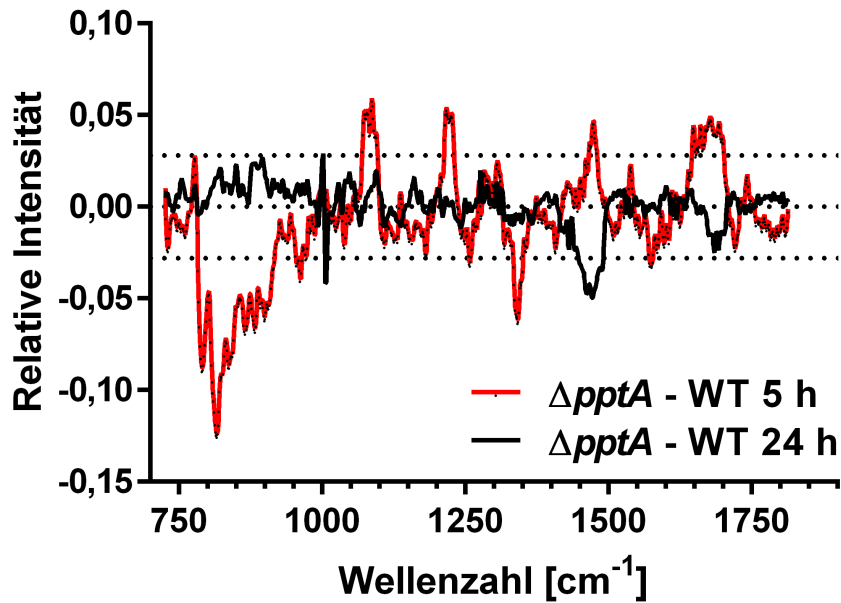


Abb. 3.73: Raman-Differenzspektren von *R. eutropha*  $\Delta pptA$  - WT nach 5 h und 24 h Kultivierung in NB Medium + 0,2 % Fruktose bei Anregung mit 785 nm. Die Signale wurden gegen die Intensität des Phenylalaninsignals bei 1004 cm<sup>-1</sup> normalisiert. Punkte markieren den Bereich der doppelten Standardabweichung.

Bei der *R. eutropha*  $\Delta pptA$  Mutante wurden in der exponentiellen Phase in der Nucleinsäureregion verringerte Signalintensitäten gegenüber dem WT gefunden, sowie zwei Proteinsignale, von denen eines verringert und eines erhöht vorlag in der Mutante. Dies ist wiederum ein Hinweis darauf, dass PptA mit der Transkription und Translation verknüpft sein könnte. Nicht identifizierbare Signale fielen jeweils stärker aus als im WT. Die Signale in der stationären Phase, die deutlich geringer ausfielen als beim WT, konnten anhand der Literatur nicht identifiziert werden. Das Signal bei 1006 cm<sup>-1</sup> kam auch schon in der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante vor.

Tab. 3.10: Auswahl identifizierter Moleküle im Raman-Differenzspektrum von *R. eutropha*  $\Delta pptA$ 

| Wellenzahl<br>[cm <sup>-1</sup> ] | Intensitätsdifferenz | Substanz            |
|-----------------------------------|----------------------|---------------------|
| <b>5 h</b>                        |                      |                     |
| 789 - 884                         | -0,085 - 0,058       | Nukleinsäureregion  |
| 814                               | -0,121               | Nukleinsäuren/RNA   |
| 962                               | -0,039               | nicht identifiziert |
| 1086                              | 0,054                | nicht identifiziert |
| 1216                              | 0,052                | nicht identifiziert |
| 1338                              | -0,057               | C-N vib. Protein    |
| 1472                              | 0,045                | nicht identifiziert |
| 1648 - 1692                       | 0,042 - 0,046        | Proteinregion       |
| <b>24 h</b>                       |                      |                     |
| 1006                              | -0,042               | nicht identifiziert |
| 1460                              | -0,045               | nicht identifiziert |

Zusammenfassend wurden einige Unterschiede im Vorkommen von Biomolekülen in den verschiedenen *R. eutropha* Stämmen mit Raman-Mikrospektroskopie aufgedeckt. Diese gaben Hinweise auf eine Veränderung der Lipide bezüglich Zusammensetzung oder Häufigkeit in der  $\Delta ppk-all$  Mutante, in der  $\Delta pptA$  Mutante Änderungen beim Nukleinsäuregehalt und den Proteinen.

### 3.3.2 Phospholipidanalyse von *R. eutropha* WT und der $\Delta ppk-all$ Mutante

Dem Hinweis der Raman-Mikrospektroskopie folgend, dass *R. eutropha* WT in der Lipidregion um 1440 cm<sup>-1</sup> höhere Signalintensitäten aufwies als die  $\Delta ppk-all$  Mutante, wurde eine Analyse der Phospholipide in lyophilisierten Zellen beider Stämme in Kooperation mit dem DSMZ unter Leitung von Dr. Meina Neumann-Schaal durchgeführt.

Die Lipide wurden angereichert und mittels HPLC analysiert. Verschiedene Phospholipide wurden aufgrund ihrer Retentionszeit auf der Säule voneinander getrennt für eine qualitative Analyse. Die Peakfläche gab wiederum Aufschluss über die relative Quantität der einzelnen Phospholipide.

Die drei identifizierten Phospholipide Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und

Diphosphatidylglycerol waren sowohl in *R. eutropha* WT als auch der  $\Delta ppk-all$  Mutante vorhanden. Phosphatidylethanolamin war im WT häufiger als in der Mutante, während Phosphatidylglycerol und Diphosphatidylglycerol in ähnlichen Mengen in beiden Stämmen vorlagen. Somit wurde aufgedeckt, dass die PolyP-freie Mutante  $\Delta ppk-all$  einen geringeren Phosphatidylethanolamingehalt als der WT hat. In *R. eutropha* sind weitere Lipide wie Cardiolipin enthalten, diese wurden in der vorliegenden Analyse nicht berücksichtigt.

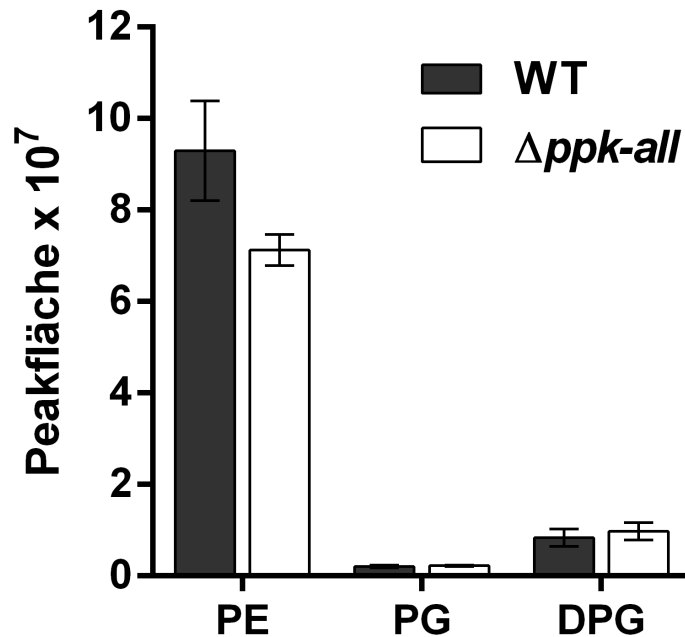


Abb. 3.74: Quantitative Lipidanalyse von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk-all$  Mutante. *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk-all$  Mutante wurden nach einer ü. N. NB Vorkultur für 24 h in 200 ml NB Medium in 11 Erlenmeyerkolben kultiviert, durch Zentrifugation mit 5000 rpm für 15 min bei 4 °C geerntet und lyophilisiert. Mit HPLC wurden verschiedene Lipide aufgrund ihrer Retentionszeit identifiziert und durch die Bestimmung der Fläche unter der Kurve quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SD von drei biologischen Replikaten. PE = Phosphatidylethanolamin, PG = Phosphatidylglycerol, DPG = Diphosphatidylglycerol.

### 3.4 Strukturanalyse von PolyP

Nun sollte die Struktur des Biopolymers PolyP selbst in *R. eutropha* untersucht werden. Über die Struktur von PolyP in *R. eutropha* ist bisher nur bekannt, dass es in der Zelle distinkte, mit Proteinen assoziierte Granula bildet. Unklar ist, ob zusätzlich lösliches PolyP vorliegt, die Struktur linear, verzweigt oder zyklisch ist, welche Kettenlängen vorherrschen oder wie viele Polymerketten ein Granulum bilden. Da die Struktur von PolyP

ausschlaggebend für dessen Funktion ist, kann über die Strukturanalyse hinaus zusätzlich ein Eindruck zur Funktion gewonnen werden. Die Strukturaufklärung von PolyP wurde mit PolyP Gelen, einem enzymatischen Assay und  $^{31}\text{P}$ -NMR angegangen.

### 3.4.1 Abschätzung von PolyP Kettenlängen im PolyP Gel

Im PolyP Gel wurde das Biopolymer elektrophoretisch nach seinem Molekulargewicht aufgetrennt. Es wurden die PolyP Standards S100 (etwa 100 Phosphatmonomere) und Budit 7 (10-13 Phosphatmonomere) sowie isoliertes PolyP aus *R. eutropha* mit Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung oder PolyP Granula Isolation durch Zentrifugation und Filtration analysiert.

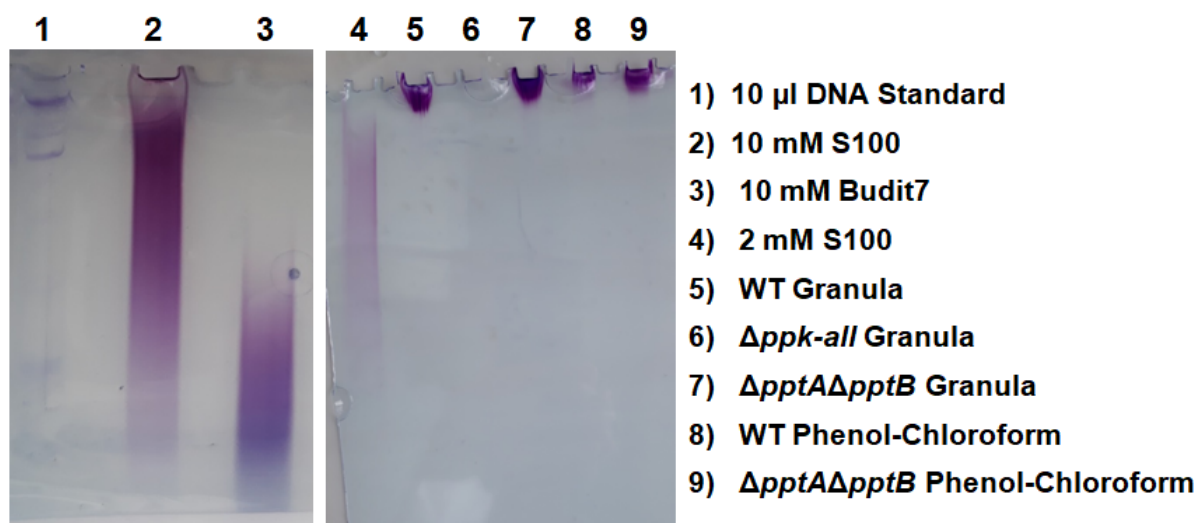


Abb. 3.75: Analyse des Molekulargewichts von PolyP Standards und isoliertem PolyP aus *R. eutropha* mittels PolyP Gel. Je 10 µl Probe mit 10 µl Orange dye wurden ohne Zentrifugation auf ein 15 % PolyP Gel geladen und für 20 min bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA in TBE Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. PolyP wurde mit Toluidinblau für 10 min gefärbt, das Gel mit  $\text{H}_2\text{O}$  entfärbt.

Aus Abb. 3.75 wird ersichtlich, dass der synthetische PolyP Standard Budit7 weiter ins Gel migrierte als der Standard S100. Das bestätigt das größere Molekulargewicht von S100. Beide Proben waren in einem größeren Gelabschnitt vertreten, was für eine Verteilung mehrerer Kettenlängen statt einer distinkten Kettenlänge spricht. Die isolierten, bakteriellen PolyP Proben migrierten jeweils kaum ins Gel, unabhängig von der Isolationsmethode, ein Hinweis für große Kettenlängen in *R. eutropha* oder eine unreine Isolation, bei der Moleküle an PolyP assoziiert vorlagen und das Molekulargewicht erheblich erhöhten oder das Laufverhalten der Probe störten.

### 3.4.2 Bestimmung der PolyP Kettenlänge mittels Kettenkonzentrationsassay

Mit einer von Christ *et al.*, 2019 entwickelten Methode kann die mittlere PolyP Kettenlänge in einer Probe bestimmt werden. Dazu wird in einer Probe mit PolyP nach Verdau mit ScPPX und ScIPP zu Monophosphat die Phosphatkonzentration mittels Antimon-Ascorbat-Assay ermittelt. Des Weiteren wird die Probe ausschließlich mit ScPPX verdaut, wodurch pro PolyP Kette ein Phosphatdimer übrig bleibt, dessen Konzentration mit einem Reporterassay ermittelt wird. So kann die Konzentration an PolyP Ketten in einer Probe bestimmt werden und der Quotient aus  $\frac{c(PO_4^{3-})}{c(P_2O_7^{4-})} = \frac{c(PolyP)}{c(Ketten)}$  ergibt die mittlere Kettenlänge. Dies wurde für extrahiertes PolyP von *R. eutropha* in Kooperation mit Jonas Christ, AG Blank, Institut für angewandte Mikrobiologie der RWTH Aachen durchgeführt.

Dazu wurde *R. eutropha* WT und die  $\Delta pptA\Delta pptB$  Mutante nach einer ü. N. Vorkultur in NB Medium für 20 h in 50 ml NB Medium kultiviert. Nach der Ernte wurden die Zellen lyophilisiert und aus 6-8 mg lyophilisierten Zellen das PolyP mit Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung isoliert. Das erhaltene PolyP wurde in 1 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Zudem wurden konzentrierte Lösungen der PolyP Standards in 50 mM MOPS angesetzt: 10 mM Budit7 (10-13 Phosphatmonomere), 50 mM S100 (etwa 100 Phosphatmonomere) und 100 µM Pyrophosphat, das später als Kalibriersubstanz für den darauf folgenden Kettenkonzentrationsassay diente.

Mittels Sb-Ascorbat-Assay wurden zunächst die exakten PolyP-Konzentrationen in Form von Monophosphat nach Verdau mit ScPPX in den Proben bestimmt. Dazu wurden die Proben entsprechend verdünnt, um eine Phosphatkonzentration im sensitiven Bereich des Assays zu gewährleisten. Die Proben wurden in technischen Duplikaten, der Pyrophosphatstandard mit sechs Replikaten gemessen. Als blank wurde der Monophosphatgehalt in der Probe ohne ScPPX Verdau bestimmt. Als Kalibriersubstanz diente KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Die Kalibriergerade ist in Abb. 3.76 dargestellt, die Rohdaten zur Kalibrierung sind in Tab. 5.2 im Anhang zu finden. Nachfolgend in Tab. 3.4.2 sind die Ergebnisse der Gesamtphosphatbestimmung aufgeführt.

Die Messwerte der A<sub>882</sub> wurden über die Kalibriergerade zunächst in Phosphatkonzentrationen umgerechnet unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, anschließend der blank von der Probe subtrahiert (fett). Zudem wurde der PolyP Gehalt der verwendeten *R. eutropha* WT und  $\Delta pptA\Delta pptB$  Kulturen berechnet.

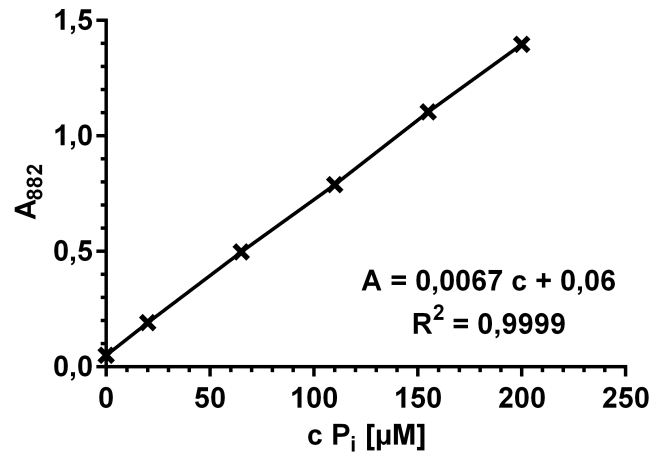


Abb. 3.76: Kalibriergerade mit  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  des Sb-Ascorbat-Assays für die Bestimmung der Phosphatkonzentration. Aufgetragen ist der Mittelwert zweier technischer Replikate pro vorgegebener Phosphatkonzentration in  $\mu\text{M}$  gegen die Absorption der Probe bei 882 nm. Die Kalibriergerade und das Bestimmtheitsmaß sind angegeben.

Nachfolgend in Tab. 3.4.2 sind die Ergebnisse der Gesamtphosphatbestimmung aufgeführt.

Die Messwerte der  $A_{882}$  für den blank und die Probe wurden über die Kalibriergerade zunächst in Phosphatkonzentrationen umgerechnet unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, anschließend der blank von der Probe subtrahiert (fett). Zudem wurde der PolyP Gehalt der verwendeten *R. eutropha* WT und  $\Delta pptA\Delta pptB$  Kulturen berechnet.

### 3. Ergebnisse

Tab. 3.11: Rohdaten der A<sub>882</sub> Messung des Sb-Ascorbat-Assays der verwendeten PolyP Standards und *R. eutropha* Proben zur Kettenlängenbestimmung und Umrechnung in Phosphatkonzentrationen unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors. Der blank wurde von der Probe subtrahiert. Die A<sub>882</sub> wurde im Plattenlesegerät gemessen.

| Probe   | S100         | Budit7       | WT         | $\Delta_{pptA}\Delta_{pptB}$ | P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>4-</sup> |
|---|--------------|--------------|------------|------------------------------|---|
| Verdünnungsfaktor                                     | 500          | 100          | 5          | 3                            |   |
| A <sub>882</sub> blank 1                              | 0,06         | 0,06         | 0,55       | 0,07                         | 0,05  |
| A <sub>882</sub> blank 2                              | 0,06         | 0,06         | 0,63       | 0,06                         | 0,05  |
| A <sub>882</sub> blank 3                              |              |              |            |                              | 0,05  |
| A <sub>882</sub> blank 4                              |              |              |            |                              | 0,05  |
| A <sub>882</sub> blank 5                              |              |              |            |                              | 0,05  |
| A <sub>882</sub> blank 6                              |              |              |            |                              | 0,06  |
| c PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [μM] blank unverdünnt |              |              |            |                              |   |
| c blank 1   | 0            | 0            | 364        | 2,2                          | 0   |
| c blank 2   | 1            | 0            | 423        | 0,9                          | 0   |
| c blank 3   |              |              |            |                              | 0   |
| c blank 4   |              |              |            |                              | 0   |
| c blank 5   |              |              |            |                              | 0   |
| c blank 6   |              |              |            |                              | 0   |
| Mittelwert  | 0            | 1            | 394        | 1                            | 0   |
| A <sub>882</sub> Probe 1                              | 0,76         | 0,84         | 1,37       | 0,82                         | 0,71  |
| A <sub>882</sub> Probe 2                              | 0,76         | 0,84         | 1,27       | 0,81                         | 0,73  |
| A <sub>882</sub> Probe 3                              |              |              |            |                              | 0,72  |
| A <sub>882</sub> Probe 4                              |              |              |            |                              | 0,72  |
| A <sub>882</sub> Probe 5                              |              |              |            |                              | 0,72  |
| A <sub>882</sub> Probe 6                              |              |              |            |                              | 0,73  |
| c PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [μM] Probe unverdünnt |              |              |            |                              |   |
| c Probe 1   | 52050        | 11650        | 974        | 338                          | 98  |
| c Probe 2   | 52490        | 11690        | 903        | 336                          | 99  |
| c Probe 3   |              |              |            |                              | 98  |
| c Probe 4   |              |              |            |                              | 99  |
| c Probe 5   |              |              |            |                              | 98  |
| c Probe 6   |              |              |            |                              | 104   |
| Mittelwert  | 52270        | 11670        | 939        | 337                          | 99  |
| <b>c PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> [μM]</b>             | <b>52270</b> | <b>11670</b> | <b>545</b> | <b>336</b>                   | <b>99</b>                                   |

Fortsetzung folgende Seite



| Probe  | S100         | Budit7       | WT         | $\Delta pptA\Delta pptB$ | $P_2O_7^{4-}$ |
|--|--------------|--------------|------------|--------------------------|---------------|
| <b>c PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> [<math>\mu</math>M]</b> | <b>52270</b> | <b>11670</b> | <b>545</b> | <b>336</b>               | <b>99</b>     |
| Einwaage [mg]  |              |              | 8,4        | 6,2                      |               |
| c PolyP [ $\mu$ mol/g cdw]                               |              |              | 65         | 54                       |               |
| c PolyP [%/g cdw]  |              |              | 0,5        | 0,4                      |               |

Anschließend wurde mit den gleichen Proben der Kettenkonzentrationsassay durchgeführt. Für die Kalibrierung wurde die Pyrophosphatlösung mit einem gemessenen Phosphatgehalt von 99  $\mu$ M verwendet. Die folgenden Verdünnungen erfolgten wie in Abschnitt 2.5.2.4 beschrieben gravimetrisch mit einer Feinwaage. Die Kalibriergerade ist in Abb. 3.77 dargestellt, die Rohdaten befinden sich in Tab. 5.2 im Anhang. Die Ergebnisse der Kettenlängenanalyse von je einer Probe mit technischen Duplikaten und die Berechnung der mittleren Kettenlänge sind in Tab. 3.12 aufgeführt.

Die Berechnung der Kettenkonzentration und der mittleren Kettenlänge (fett) ist Abschnitt 2.5.2 zu entnehmen.

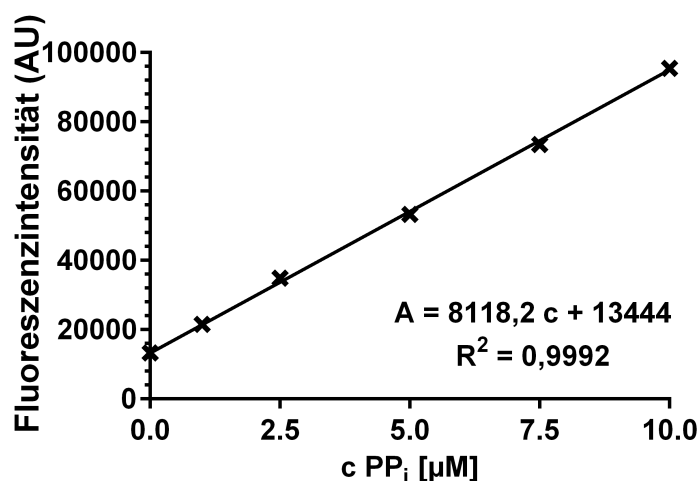


Abb. 3.77: Kalibriergerade mit  $P_2O_7^{4-}$  des Kettenkonzentrationsassays für die Bestimmung der Pyrophosphatkonzentration. Aufgetragen ist der Mittelwert zweier technischer Replikate pro vorgegebener Pyrophosphatkonzentration in  $\mu$ M gegen die Fluoreszenzintensität der Probe bei einer Anregung bei  $\lambda=340$  nm und Emission bei  $\lambda=460$  nm. Die Kalibriergerade und das Bestimmtheitsmaß sind angegeben.

### 3. Ergebnisse

Tab. 3.12: Ergebnisse des Kettenkonzentrationsassays und Berechnung der mittleren PolyP Kettenlänge von *R. eutropha* WT und  $\Delta pptA\Delta pptB$  sowie den PolyP Standards S100 und Budit7. FI = Fluoreszenzintensität

| Probe   | S100      | Budit7    | WT        | $\Delta pptA\Delta pptB$ |
|---|-----------|-----------|-----------|--------------------------|
| Verdünnungsfaktor                               | 500       | 300       | 3         | 2                        |
| FI blank 1                                      | 11760     | 12610     | 14040     | 14030                    |
| FI blank 2                                      | 12710     | 12680     | 14430     | 14290                    |
| FI Probe 1                                      | 47490     | 77270     | 43990     | 21990                    |
| FI Probe 2                                      | 46360     | 75830     | 43600     | 24130                    |
| c $P_2O_7^{4-}$ [ $\mu$ M] blank 1              | 0         | 0         | 0         | 0                        |
| c $P_2O_7^{4-}$ [ $\mu$ M] blank 2              | 0         | 0         | 0         | 0                        |
| c Mittelwert                                    | 0         | 0         | 1         | 0                        |
| c $P_2O_7^{4-}$ [ $\mu$ M] Probe 1              | 2097      | 2359      | 11        | 2                        |
| c $P_2O_7^{4-}$ [ $\mu$ M] Probe 2              | 2027      | 2305      | 11        | 3                        |
| c Mittelwert                                    | 2060      | 2330      | 11        | 2,5                      |
| Kettenkonzentration<br>$P_2O_7^{4-}$ [ $\mu$ M] | 1031      | 1166      | 5,5       | 1,3                      |
| <b>mittlere<br/>Kettenlänge</b>                 | <b>51</b> | <b>10</b> | <b>97</b> | <b>283</b>               |

Der synthetische PolyP Standard Budit7 hatte eine berechnete Kettenlänge von 10 Phosphatresten, der unteren Grenze der vom Hersteller angegebenen Kettenlänge, während der Standard S100 im Mittel aus 51 Phosphaten bestand. Wie aus dem PolyP Gel in Abb. 3.75 ersichtlich, befand sich in den Standards eine Vielzahl an PolyP Molekülen mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Die PolyP Proben von *R. eutropha* WT und der  $\Delta pptA\Delta pptB$  Mutante waren mit durchschnittlich 97 bzw. 283 Phosphatresten pro Kette deutlich länger und bildeten einen ersten Anhaltspunkt der Kettenlänge in *R. eutropha*.

#### 3.4.3 Strukturanalyse von PolyP mit $^{31}P$ -NMR

PolyP wurde aus lyophilisierten Zellen einer 24 h NB Kultur von *R. eutropha* WT durch Phenol-Chloroformextraktion und Ethanolfällung oder PolyP Granula Isolation isoliert und lyophilisiert. Außerdem wurden aus einer weiteren 24 h NB Kultur von *R. eutropha* WT PolyP Granula isoliert nach dem Protokoll aus Abschnitt 2.6.11. Nach der Zen-

trifugation bei 10000 rpm und dem Abspülen des grauen, weichen Pellets (vgl. Abschnitt 3.2.1.1) wurde das weiße Pellet in 1 ml H<sub>2</sub>O bei 37 °C gelöst. Im Anschluss wurde die Probe zentrifugiert bei 5000 rpm für 1 min bei RT. Der Überstand enthielt die wasserlösliche Fraktion (Granula 1), das Pellet die wasserunlösliche Fraktion (Granula 2). Beide Proben mit angereicherten PolyP Granula wurden lyophilisiert. Die Analyse mit <sup>31</sup>P-NMR und Auswertung der Spektren erfolgte am Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Dr. Sabine Willbold.

Die NMR-Spektren wurden ausgewertet nach dem chemischen Shift  $\delta$  der verschiedenen <sup>31</sup>P Atome. Dieser ist abhängig von seiner chemischen Umgebung. So können bei PolyP endständige Phosphate (PP1), der vorletzte Phosphatrest (PP2), ggf. der dritte Phosphatrest (PP3), innenliegende Phosphate (PP4) und zyklische Phosphate voneinander unterschieden werden. Ein beispielhaftes <sup>31</sup>P-NMR Spektrum von PolyP ist in Christ *et al.*, 2020 gezeigt. Zusätzlich findet über die Fläche des NMR-Signals eine Quantifizierung der Phosphatspezies statt. In Abb. 3.78 sind die <sup>31</sup>P-NMR Spektren der verschiedenen Proben mit PolyP aus *R. eutropha* WT dargestellt.

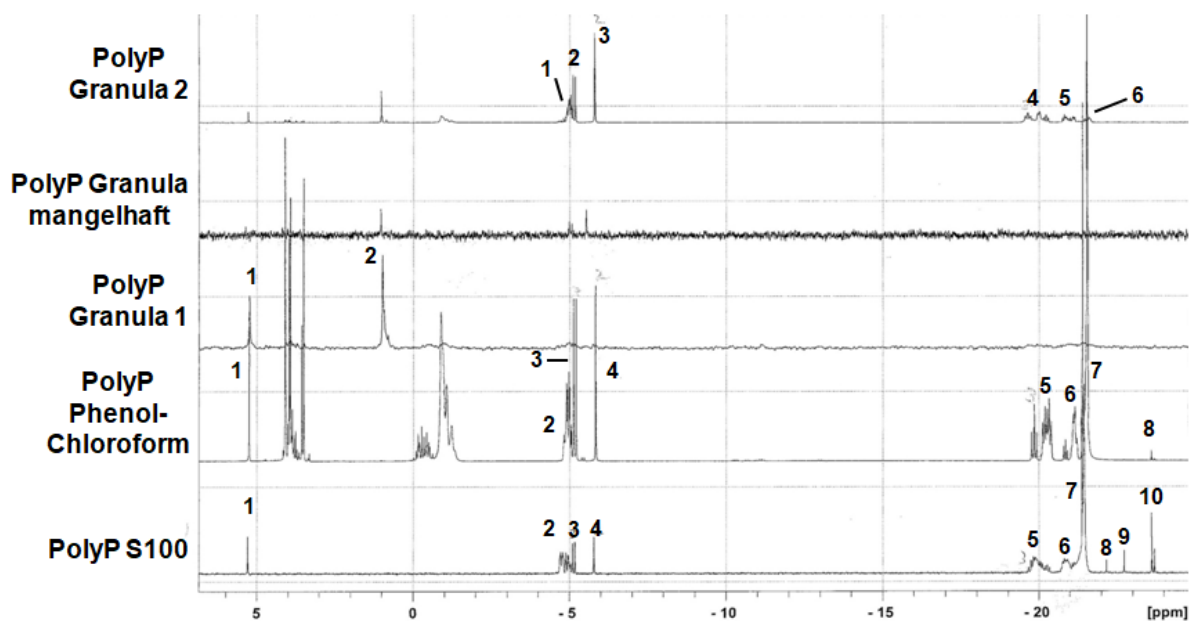


Abb. 3.78:  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren von PolyP aus *R. eutropha*. Aus einer 24 h *R. eutropha* WT Kultur in NB Medium wurde PolyP mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert sowie eine PolyP Granula Isolation durchgeführt mit Differenzierung in eine  $\text{H}_2\text{O}$ -lösliche und  $\text{H}_2\text{O}$ -unlösliche Fraktion. Zusätzlich wurde der synthetische PolyP Standard S100 mitgeführt. Lyophilisiertes PolyP wurde in  $\text{D}_2\text{O}$  und NaOD gelöst mit einer Endkonzentration von 39 mM für S100, 79 mM für PolyP Phenol-Chloroform-Extraktion, während die Proben der PolyP Granula Isolation nicht quantifiziert werden konnten. Die Messung erfolgte mit einem 600 MHz Spektrometer (Bruker). Die Spektren wurden mit einem  $90^\circ$  Puls, 1 s Aquisitionszeit, 15 s Relaxationszeit bei 298 K aufgenommen. Die Peaks wurden nummeriert und sind in Tab. 3.13 spezifiziert. Die Spektren wurden bereitgestellt von Dr. Sabine Willbold.

Die Peaks der NMR-Spektren wurden verschiedenen Phosphoratomen in den Proben zugeordnet. Diese sind in Tab. 3.13 aufgeführt. Peaks ohne Nummer konnten nicht zugeordnet werden und gehören ggf. zu anderen phosphorhaltigen zellulären Molekülen wie z.B. NXPs (X = Mono, Di oder Tri) oder NADPH, die bei der Isolierung als Verunreinigung zurückgeblieben sein können. Eine zweite Messung der PolyP Granula  $\text{H}_2\text{O}$ -löslichen Fraktion ("mangelhaft") zeigte keine spezifischen Signale und konnte nicht ausgewertet werden.

Tab. 3.13: Identifizierte Phosphatspezies in den  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren aus Abb. 3.78 von isoliertem PolyP aus einer 24 h NB Kultur von *R. eutropha* WT. Die Isolation erfolgte entweder durch Phenol-Chloroform Extraktion des Gesamt-PolyP aus lyophilisierten Zellen (Ph/Chl) oder durch PolyP Granula Isolation mit Zentrifugationsschritten und Filtration.

PolyP Granula Isolation: 1 = zwei Präparationen der  $\text{H}_2\text{O}$ -löslichen Fraktion des Pellets nach der finalen Zentrifugation, 2 =  $\text{H}_2\text{O}$ -unlösliche Fraktion des Pellets nach der finalen Zentrifugation, Differenzierung PolyP: endständiges Phosphat (PP1), vorletzter Phosphatrest (PP2), dritter Phosphatrest (PP3), innenliegende Phosphate (PP4)

| Probe | Peak Nr. | Zuordnung Phosphatspezies |
|-------|----------|---------------------------|
| S100  | 1        | Monophosphat              |
|       | 2        | PP1                       |
|       | 3        | Triphosphat               |
|       | 4        | Diphosphat                |
|       | 5        | PP2                       |
|       | 6        | PP3                       |
|       | 7        | PP4                       |
|       | 8-10     | zyklisches PolyP          |

Fortsetzung folgende Seite

| Probe     | Peak Nr. | Zuordnung Phosphatspezies |
|-----------|----------|---------------------------|
| Ph/Chl    | 1        | Monophosphat              |
|           | 2        | PP1                       |
|           | 3        | Triphosphat               |
|           | 4        | Diphosphat                |
|           | 5        | PP2                       |
|           | 6        | PP3                       |
|           | 7        | PP4                       |
|           | 8        | zyklisches PolyP          |
| Granula 1 | 1        | Monophosphat              |
|           | 2        | Diphosphat                |
| Granula 2 | 1        | PP1                       |
|           | 2        | Triphosphat               |
|           | 3        | Diphosphat                |
|           | 4        | PP2                       |
|           | 5        | PP3                       |
|           | 6        | PP4                       |

In den Proben wurden Phosphoratome verschiedener Phosphate gefunden: freies Monophosphat und Diphosphat sowie PP1, PP2 und PP3 von PolyP bis zu ketteninternen Phosphatresten von PolyP mit Kettenlängen  $> 7$  (PP4), die weiter als drei Phosphatreste vom Kettenende entfernt sind. Über die Peakfläche des Signals fand eine semiquantitative Auswertung statt durch Normalisierung auf das Vorkommen von Diphosphat (= 1,0). Zyklisches PolyP wurde relativ zum Monophosphat quantifiziert. Die Häufigkeit der einzelnen Phosphatspezies und die mittlere Kettenlänge in den verschiedenen Proben ist in Tab. 3.14 aufgelistet.

Tab. 3.14: Quantifizierung der Phosphatspezies in isoliertem PolyP aus einer 24 h NB Kultur von *R. eutropha* WT mit Angabe der relativen Häufigkeit bezogen auf Diphosphat und der mittleren Kettenlänge in der Probe. Die Häufigkeit von zyklischem PolyP wurde angegeben in Relation zu Monophosphat.

PolyP Granula Isolation: 1 = zwei Präparationen der H<sub>2</sub>O-löslichen Fraktion des Pellets nach der finalen Zentrifugation, 2 = H<sub>2</sub>O-unlösliche Fraktion des Pellets nach der finalen Zentrifugation

| Probe                        | S100 | Ph/Chl | Granula 1 | Granula 2 |
|------------------------------|------|--------|-----------|-----------|
| Monophosphat                 | 0,8  | 0,3    | 8,9       | 0,05      |
| Diphosphat                   | 1,0  | 1,0    | 1,0       | 1,0       |
| Triphosphat                  | 1,5  | 1,9    | -         | 0,5       |
| PolyP                        | 5,4  | 2,5    | -         | 1,3       |
| Zyklisch (rel. Monophosphat) | 1,9  | 0,03   | -         | -         |
| Mittlere Kettenlänge         | 14   | 10     | -         | 8         |

Im PolyP Standard kamen mit dem 5,4-fachen des Diphosphatvorkommens Ketten mit mehr als drei Phosphaten am häufigsten vor. Die mittlere Kettenlänge betrug 14 Phosphate. Triphosphate kamen 1,5-mal so viel vor wie Diphosphat, Monophosphat dagegen nur 0,8-mal so viel. Laut Herstellerangaben soll der PolyP Standard aus rund 100 Phosphatresten bestehen, ist aber nicht einheitlich. Beim Gesamt-PolyP der Phenol-Chloroform Extraktion lag auch vorwiegend PolyP mit mehr als drei Phosphatresten vor, die mittlere Kettenlänge betrug mit 10 Phosphatresten etwas weniger als der Standard. Auch Triphosphate und in geringen Mengen Monophosphate waren in der Probe vorhanden. Die H<sub>2</sub>O-lösliche Fraktion des PolyP Granula Isolats (Granula 1) bestand zum 8,9-fachen des Diphosphatgehalts aus Monophosphat, während keine Triphosphate oder PolyP detektiert wurden. In der H<sub>2</sub>O-unlöslichen Fraktion des PolyP Granula Isolats (Granula 2) wurde Monophosphat dagegen nur geringfügig gefunden, auch Triphosphat nur halb so viel wie Pyrophosphat, während langkettiges PolyP mit dem 1,3-fachen überwog. Die mittlere Kettenlänge betrug wiederum 8. Insgesamt wurde PolyP mit einer mittleren Kettenlänge von 8 bis 10 in den biologischen Proben und 14 im synthetischen PolyP gefunden. In allen Proben lag auch Monophosphat und Diphosphat vor, Triphosphate fehlten nur in der H<sub>2</sub>O-unlöslichen Fraktion des PolyP Granula Isolats. Zusätzlich wurde im PolyP Standard und der Probe, die durch Phenol-Chloroform Extraktion entstand, zyklisches PolyP entdeckt, nicht jedoch in den PolyP Granula Isolaten. So hatte die Methode der PolyP Isolation einen Einfluss auf die detektierten Strukturen der Probe.

## 4 Diskussion

Das anorganische, polyanionische Biopolymer PolyP ist ubiquitär und kommt in vielen bakteriellen Spezies vor (Kornberg *et al.*, 1999; I. S. Kulaev & Vagabov, 1983). Es ist an einer Vielzahl physiologischer Funktionen beteiligt. In dieser Arbeit wurde die Struktur und Funktion von PolyP sowie der Aufbau des PolyP Granulums und die Charakterisierung der PolyP assoziierten CHAD Proteine untersucht.

Die Funktion von PolyP in *R. eutropha* war bisher unbekannt. In der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante, in der alle sieben *ppks* deletiert sind, wurde bisher kein Phänotyp bezüglich physiologischer Funktionen festgestellt (Tumlirsch, 2017). Es ist jedoch zu vermuten, dass PolyP in einem Organismus mit sieben *ppk* Genen eine bedeutsame Rolle spielt. In dieser Arbeit konnte aufgedeckt werden, dass PolyP als Phosphatspeicher dient und bei Phosphatmangel Wachstumsvorteile erzielt.

### 4.1 PolyP Stoffwechsel in *R. eutropha* und die *stringent response*

In dieser Arbeit wurde der PolyP Metabolismus und die physiologische Funktion dieses Biopolymers in *R. eutropha* untersucht. Es wurde gezeigt, dass *R. eutropha* in Komplexmedium in der exponentiellen Phase kaum PolyP besaß und in der stationären Phase PolyP akkumulierte bis zu einem Maximum von rund  $190 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$ . Im Vergleich dazu betrug der PolyP Gehalt in *A. tumefaciens* in vergleichbarem Medium nur rund  $40 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$  in der stationären Phase (Frank & Jendrossek, 2020). *Corynebacterium glutamicum* akkumuliert kurzfristig granuläres PolyP zu Beginn des exponentiellen Wachstums, während in der mittleren exponentiellen Phase kein PolyP gespeichert ist. In der stationären Phase wird in Medium mit ausreichend Phosphat lösliches PolyP akkumuliert (Klauth *et al.*, 2006). Damit unterscheidet sich der PolyP Stoffwechsel erheblich von der Art des PolyP Speichers in *R. eutropha*.

In Komplexmedium war Phosphat im Überschuss vorhanden. Ursächlich für den Eintritt in die stationäre Phase waren Parameter wie Mangel anderer Nährstoffe, hohe Konzentration toxischer Stoffwechselendprodukte oder pH-Änderungen durch Stoffwechselprodukte. Im folgenden Abschnitt wird diskutiert, wozu die PolyP Akkumulation in *R. eutropha* in der stationären Phase dienen kann und über die Regulation des Metabolismus spekuliert.



In der stationären Phase akkumuliert *R. eutropha* PolyP bis zu 1,6 % des Zelltrockengewichts. Zur Adaption an Stresssituationen, wie die stationäre Phase, leiten Bakterien die *stringent response* ein, z.B. über die Alarmone (p)ppGpp (Chatterji & Ojha, 2001) oder den Transkriptionsfaktor DksA (Magnusson *et al.*, 2007), was mit einer umfassenden Änderung der Genexpression einhergeht. In *E. coli* wird im Zuge der *stringent response* die Transkription der *ppk* durch den  $\sigma$ -Faktor  $\sigma^S$  induziert (Macia *et al.*, 2011) und über die Bindung von ppGpp an die PPX einer reversiblen Inhibierung des Enzyms erreicht (Kuroda *et al.*, 1997). Dies führt insgesamt zu einer Akkumulation von PolyP bei Stress (Gray, 2019; Gray *et al.*, 2014; Rao *et al.*, 1998). Dieses Biopolymer ist dann verantwortlich für weitere Regulation der Genexpression (Rao *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010) sowie den spezifischen Abbau von ribosomalen Proteinen oder dem Replikationsinitiator DnaA durch die Lon-Protease (Kuroda *et al.*, 2001; Ropelewska *et al.*, 2020). Diese Funktionen und Mechanismen sind in erster Linie in *E. coli* erforscht und sind nicht direkt auf *R. eutropha* übertragbar. Denkbar ist eine derartige Rolle und Funktionsweise in diesem Organismus aber auch. Dafür sprechen folgende Gründe:

Die *stringent response* ist eine Stressantwort in vielen bakteriellen Spezies (Chatterji & Ojha, 2001) und in den meisten  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien durch die hochkonservierten Proteine RelA und SpoT für die Regulation der (p)ppGpp Level gesteuert (Germain *et al.*, 2019). *R. eutropha* besitzt für die Regulation der intrazellulären Level dieser Alarmone SpoT1, eine ppGpp Synthase/Hydrolase, und SpoT2, eine ppGpp Synthase. Diese Enzyme sind bei der Induktion der *stringent response* in *R. eutropha* aktiv (Jüngert, 2018; Jüngert *et al.*, 2017). Damit sind die Prozesse der *stringent response* im  $\beta$ -Proteobakterium *R. eutropha* vermutlich ähnlich gestaltet wie im  $\gamma$ -Proteobakterium *E. coli*.

PolyP könnte z.B. für die Proteolyse in der stationären Phase durch den PolyP-Lon-Protease Komplex zuständig sein. Eine annotierte Lon-Protease (A1485) ist auch in *R. eutropha* vorhanden. Eine weitere Ähnlichkeit ist nachgewiesen bei der Induktion der *stringent response*. Bei *nutrient downshift* von NB zu aminosäurefreiem Schlegel-MSM werden in *R. eutropha* die Alarmone (p)ppGpp induziert, insbesondere bei zusätzlichem Stickstoffmangel (Jüngert, 2018; Jüngert *et al.*, 2017). Die durch (p)ppGpp induzierten molekularen Prozesse in Bezug auf PolyP sind in *R. eutropha* jedoch nicht näher untersucht.

Des Weiteren sind in *R. eutropha* zwei *dksA* Homologe annotiert, *dksA1* (A0194) und *dksA2* (A1992). Beide besitzen ein Zinkfingermotiv wie DksA bei *E. coli*. Jedoch fehlen bei DksA1 konservierte Aminosäuren und eine Funktion als Transkriptionsfaktor ist nicht nachgewiesen (uniprot Datenbank). Neben diesen Gemeinsamkeiten zwischen *R. eutropha* und *E. coli* gibt es aber auch Befunde, die auf deutlich unterschiedliche Regulationsmechanismen bei Stress hinweisen:

Für *E. coli* wird berichtet, dass bei einem Wechsel von LB Medium zu aminosäurefreiem MSM eine lag-Phase bei der  $\Delta ppk$  Mutante auftritt (Kuroda *et al.*, 1999). Weiterhin fand

die Gruppe heraus, dass die PolyP-freie  $\Delta ppk\Delta ppx$  Mutante kaum Proteindegradation aufwies. Demnach haben PolyP-freie Mutanten einen Nachteil bei der Umstellung auf eigenständige Aminosäuresynthese, weil ihr der PolyP-Lon-Protease Komplex fehlt, der im WT einen großen Teil der Proteolyse ausmacht und somit Aminosäuren für die Synthese von Enzymen für die Aminosäureproduktion bereitstellt (Kuroda *et al.*, 2001). Beim Wachstum von *R. eutropha* in Schlegel-MSM wurde in dieser Arbeit sowie bei Tumlirsch, 2017 keine verlängerte lag-Phase bei der  $\Delta ppk$ -all Mutante gemessen und kein Überlebensnachteil festgestellt. Ob in *R. eutropha* eine kurzfristige PolyP Akkumulation direkt nach dem *nutrient downshift* erfolgte, wurde nicht bestimmt. Insgesamt wurde aber über einen Zeitraum von 6 h PolyP von etwa 80  $\mu\text{mol}$  vor dem *nutrient downshift* auf 20  $\mu\text{mol}$  pro g Zelltrockenmasse abgebaut (vgl. Abschnitt 3.1.2.7). Eine Akkumulation von PolyP fand in Schlegel-MSM erst in der stationären Phase statt, was darauf hinweist, dass PolyP in Komplexmedium wie aminosäurefreiem MSM eine Rolle in der stationären Phase spielt, jedoch keine wesentliche Funktion bei der Adaption an Aminosäuremangel hat, bei der offensichtliche Störungen wie Wachstumsverzögerung hervorgerufen werden.

Des Weiteren ist das Überleben in der stationären Phase in der *E. coli*  $\Delta ppk$  Mutante um bis zu vier Zehnerpotenzen reduziert im Vergleich zum WT bei Kultivierung in MOPS-Medium (Rao & Kornberg, 1996). In dieser Arbeit dagegen wurde kein Viabilitätsunterschied zwischen *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk$ -all Mutante in NB Medium, Schlegel-MSM oder MOPS-MSM gefunden.

In NB Medium wie auch Schlegel-MSM wurde PolyP zu Beginn der exponentiellen Phase abgebaut. Es ist nicht genauer bestimmt, ob die PPX oder eine bzw. mehrere PPKs für die Degradation verantwortlich sind. Bei Aktivität der PPX würde Monophosphat frei, beim Abbau durch PPKs würden NTPs generiert für DNA Synthese oder als Energieäquivalent (Brown & Kornberg, 2008). Ebenso ist bisher unbekannt, welche der PPKs in *R. eutropha* PolyP in der stationären Phase synthetisieren und ob in der exponentiellen Phase ein ausgeglichener Auf- und Abbau stattfindet oder der PolyP Stoffwechsel inaktiv ist. Es wurde bereits begonnen, die Genexpressionsprofile der sieben *ppks* und der *ppx* zu bestimmen. Erste bisher unveröffentlichte Ergebnisse in Zusammenarbeit mit Jennie Hildenbrand, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, weisen darauf hin, dass in NB Medium in der frühen und mittleren stationären Phase zwischen 12 und 24 h die *ppk1a*, *ppk2a*, *ppk2d* und *ppk2e* exprimiert werden. Laut Literatur katalysieren die PPK1 vorwiegend die Synthese, die PPK2 bevorzugt den Abbau von PolyP (Neville *et al.*, 2022). Die PPKs von *R. eutropha* wiesen *in vitro* unterschiedliche Substratspezifitäten und Aktivitäten auf und waren oft sowohl im PolyP Aufbau als auch Abbau aktiv (Hildenbrand *et al.*, 2020, unveröffentlichte Daten Jennie Hildenbrand). Sofern die genannten *ppks* in *R. eutropha* nicht nur exprimiert werden, sondern auch aktiv sind, würden diese Befunde eher dafür sprechen, dass auch die PPK2s an der PolyP Synthese beteiligt sind, da in der

stationären Phase eine starke PolyP Akkumulation parallel zur *ppk2* Expression verzeichnet wurde.

Die PolyP Quantifizierung erfolgte entweder mit dem Malachitgrün-Assay nach Bru *et al.*, 2016 oder dem Sb-Ascorbat-Assay nach Christ und Blank, 2018. Letzterer wurde erst im Verlauf der Arbeit etabliert und zeigte einen größeren Sensitivitätsbereich, von etwa 20-200  $\mu\text{M}$  im Gegensatz zum Malachitgrün-Assay, der zwischen 5 und 90  $\mu\text{M}$  PolyP bezogen auf die Monophosphatkonzentration quantifizieren konnte. Damit vereinfachte sich beim Sb-Ascorbat-Assay die Probenvorbereitung, da seltener Probenverdünnungsreihen benötigt wurden, und die Quantifizierungsmethode wurde vom Malachitgrün- auf den Sb-Ascorbat-Assay umgestellt. Die gemessenen Werte sind im Bereich bis 90  $\mu\text{M}$  sehr ähnlich, bei höheren Konzentrationen war der Sb-Ascorbat-Assay genauer, allein weil die Probenverdünnung geringfügiger ausfiel oder ausblieb (Abb. Anhang 5.20). Innerhalb eines Experiments wurde immer der gleiche Assay verwendet, sodass die Werte innerhalb eines Versuchs vergleichbar waren. Bei niedrigen Konzentrationen kleiner als 5  $\mu\text{M}$  im Malachitgrün-Assay bzw. 20  $\mu\text{M}$  im Sb-Ascorbat-Assay war nur eine allgemeine Aussage möglich, ob geringe Konzentrationen an PolyP detektiert wurden ohne exakte Quantifizierung, z.B. in *R. eutropha* in der exponentiellen Phase bei Wachstum in NB Medium oder Schlegel-MSM.

## 4.2 PolyP als Phosphatspeicher und Zusammenhang mit dem Kohlenstoffspeicher PHB

Ein typischer Auslöser der *stringent response* ist neben Aminosäuremangel auch Phosphatmangel (Brown & Kornberg, 2008). Bei dieser Art von Stress wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals ein Phänotyp für die *R. eutropha*  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante beschrieben. Diese Mutante hatte bei wachstumslimitierendem Phosphatgehalt im Medium ein verringertes Wachstum gegenüber dem WT (siehe Abb. 3.4 und 3.7). Während des PolyP Abbaus im WT fand Wachstum statt, das nach etwa 24 h langsam erlag, parallel zum Aufbrauchen der PolyP Reserven. Diese Ergebnisse legen eine Funktion von PolyP als Phosphatspeicher nahe, zur Bereitstellung von Phosphat oder Nukleotiden, die weiteres Wachstum unter phosphatlimitierenden Bedingungen ermöglichen. Unveröffentlichte Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Jennie Hildenbrand zur Expression der PolyP metabolisierenden Enzyme liefern Hinweise, dass bei Phosphatmangel PPKs exprimiert werden, nicht aber die PPX, sodass das gespeicherte Phosphat vermutlich in die Nukleotidsynthese eingeht. Für eine umfassende Untersuchung des PolyP Metabolismus wäre an dieser Stelle notwendig, die Nukleotidlevel von *R. eutropha* bei Phosphatmangel im Verlauf der Zeit zu bestimmen.

Ob PolyP neben dem Phosphatspeicher weitere, z.B. regulatorische, Funktionen erfüllt, wurde nicht näher aufgeklärt. Man kann spekulieren, dass PolyP zusätzlich an der Regulation der Genexpression beteiligt ist oder an der Proteolyse durch die Lon-Protease, um den Stoffwechsel optimal an die Mangelsituation anzupassen durch den Abbau von verzichtbaren Strukturen wie einem Teil der Ribosomen und damit die größtmögliche Menge an Nährstoffen bereitzustellen.

Eine Schutzwirkung von PolyP auf die ruhenden Zellen bei anhaltendem Phosphatmangel wird ausgeschlossen, weil *R. eutropha* Zellen es vorziehen, ihren PolyP Speicher aufzubrauchen statt zu erhalten. Sowohl phosphatgehungerte Zellen vom WT als auch der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante wuchsen bei Zugabe von Phosphat nach einigen Stunden lag-Phase in gleichem Maß an. Somit schränkten sie bei Phosphatmangel ihren Metabolismus ein, während die Kultivierbarkeit erhalten blieb. PolyP als Phosphatspeicher ist eine bekannte Funktion des Biopolymers in vielen bakteriellen Spezies (Kornberg *et al.*, 1999). Besonders in Wasserhabitaten sind Organismen oft stark fluktuierenden Phosphatkonzentrationen ausgesetzt. Cyanobakterien beispielsweise haben verschiedene Taktiken, ihren Phosphatstoffwechsel bei schwankenden Nährstoffangeboten zu stabilisieren (Sanz-Luque *et al.*, 2020). Bei verschiedenen Arten von *Synechococcus* wird PolyP während des exponentiellen Wachstums aufgebaut mit höchsten PolyP Konzentrationen zu Beginn der stationären Phase. Die intrazelluläre PolyP Konzentration ist dabei invers proportional zur Phosphatkonzentration im Medium (Li & Dittrich, 2019). Bekannt ist auch das Phänomen der übermäßigen Phosphataufnahme und Speicherung als PolyP, wenn die Zellen zuvor einem Phosphatmangel ausgesetzt waren, genannt *luxury phosphate uptake* (Li & Dittrich, 2019). Hier zeigt sich, dass die Speicherung von PolyP von Organismus zu Organismus anders reguliert ist und womöglich auch unterschiedlichen Zwecken dient.

Somit hat ein Bakterium mit der Fähigkeit, Phosphat in Form von PolyP zu speichern, in einer Umgebung mit fluktuierendem Phosphatgehalt einen Vorteil gegenüber anderen Vertretern der bakteriellen Gemeinschaft, die ständig auf Phosphat aus der Umgebung angewiesen sind, wie es auch bei den Versuchen von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante unter Phosphatmangel in dieser Arbeit aufgetreten ist. *R. eutropha* ist in der Natur in Quellwasser zu finden, das oft phosphatarm ist (Pohlmann *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang ist ein Phosphatspeicher für *R. eutropha* sinnvoll. Spekulativ könnte *R. eutropha* eine differenzierte Regulation der enzymatischen Aktivität verschiedener PPKs besitzen zur optimalen Verwendung dieses Speichers zur Bereitstellung von Phosphat oder Nukleotiden, was nützlich ist für das Überleben und die Konkurrenzfähigkeit in diesem Habitat.

Neben dem Wachstumsdefizit bei Phosphatmangel wies die  $\Delta ppk$ -*all* Mutante auch verringerte PHB Gehalte ab 24 h auf. In *R. eutropha* zeigte sich also bei fehlender Möglichkeit zur PolyP Speicherung eine verringerte Neigung zur PHB Speicherung. Weitere

Zusammenhänge zwischen dem PHB und PolyP Metabolismus wurde bereits in dieser Arbeitsgruppe aufgedeckt: Ein potentieller Phosphattransportregulator PhaX interagiert mit PHB Granula assoziierten Proteinen. Die *R. eutropha*  $\Delta phaX$  Deletionsmutante fiel auf durch ihre enorme Speicherung von PolyP sowie verringerten Abbau von PHB in der stationären Phase (Tumlirsch *et al.*, 2015). Nach diesen Hinweisen auf einen Zusammenhang zwischen dem PolyP und PHB Metabolismus wurde die PHB freie *R. eutropha*  $\Delta phaC1$  Mutante auf ihren PolyP Stoffwechsel untersucht. Sie zeigte nur eine geringe Zunahme der OD<sub>600</sub> bei Phosphatlimitierung und -mangel, die sogar unter der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante lag. Ein Schwachpunkt der photometrischen Wachstumsverfolgung bei 600 nm ist, dass neben der Zunahme an Zellen und Zellgröße auch die intrazelluläre Zunahme an PHB zur OD<sub>600</sub> beiträgt. Dadurch kann die  $\Delta phaC1$  Mutante bei gleichem Wachstum wie ein PHB akkumulierender Stamm eine geringere OD<sub>600</sub> aufweisen. Eine vergleichbare Messung des Wachstums unabhängig von PHB wäre über eine Bestimmung der Zelldichte durch Zellzahlbestimmung in der Neubauerzählkammer oder Bestimmung des Gesamtprotein-gehalts zu erreichen. Ein Wachstumsdefizit ist jedoch trotzdem sehr wahrscheinlich, da die  $\Delta phaC1$  Mutante bei Phosphatmangel ihren PolyP Speicher langsamer mobilisierte als der WT. Womöglich konnte die Mutante nur langsam wachsen, weil Phosphat aus dem internen Speicher nur zögerlich bereitgestellt wurde.

Zusätzlich zeigten die phosphatgehungerten  $\Delta phaC1$  Zellen bei Bereitstellung von 0,02 % Phosphat im Medium einen *luxury phosphate uptake* mit PolyP Akkumulation von  $45 \pm 3 \frac{\mu\text{mol PolyP}}{\text{g cdw}}$ , im Gegensatz zum WT, der das zugegebene Phosphat für neues Wachstum nutzte. So scheint der WT maximales Wachstum unter Ausnutzung der gegebenen Ressourcen anzustreben, während die  $\Delta phaC1$  Mutante reguliert ist zugunsten einer starken Speicherung von PolyP zulasten des Wachstums.

Eine distinkte Regulation verschiedener Speicherpolymere ist beim *enhanced biological phosphate removal* (EBPR) Prozess bekannt. Dieser Prozess spielt eine wichtige Rolle bei der Reinigung von Abwasser. Dabei werden unter anaeroben Bedingungen PolyP und Glycogen abgebaut, dadurch ATP und Reduktionsäquivalente bereitgestellt für PHA Akkumulation aus Fettsäuren. Bei anschließenden aeroben Bedingungen werden PHAs wieder abgebaut. Dabei werden Reduktionsäquivalente frei für die Energiegewinnung in Form von ATP durch Zellatmung, das in den Aufbau von PolyP und Glykogen investiert wird. In *R. eutropha* führen hohe Level der Alarmone (p)ppGpp zu einer verstärkten PHB Akkumulation bzw. einer verringerten PHB Mobilisation in der stationären Phase (Jüngert, 2018; Jüngert *et al.*, 2017). ppGpp besitzt auch eine regulatorische Funktion im PolyP Stoffwechsel. In *E. coli* inhibiert es reversibel die Aktivität der PPX (Kuroda *et al.*, 1997). Ob dies beim EBPR-Prozess eine Rolle spielt, dessen zugrundeliegenden Regulationsmechanismen nicht aufgeklärt sind (Lin *et al.*, 2015; Majed *et al.*, 2012; Majed & Gu, 2010), ist unbekannt.

### 4.3 Toleranz von *R. eutropha* gegen Hitzestress und oxidativen Stress

Eine weitere Form der bakteriellen Antwort auf Stress ist die Hitzeschockantwort. Hier wird ein Set von hochkonservierten Genen für Chaperone oder Proteasen exprimiert. Diese Antwort ist nicht ausschließlich auf die Adaption an Hitzestress beschränkt sondern kann auch bei oxidativem Stress, Schwermetallbelastung oder osmotischem Stress induziert werden (Muffler *et al.*, 1997). Die Stressoren haben die Gemeinsamkeit, Schäden an Proteinen hervorzurufen, die mit partieller Entfaltung und Proteinaggregation einhergehen. Die bei der Hitzeschockantwort synthetisierten Proteasen degradieren fehlgefaltete Proteine, während Chaperone eine Rückfaltung der Proteine in ihren funktionalen Zustand unterstützen. Auf diese Weise fördert die Hitzestressantwort die Proteinhomöostase bei Stress (Schumann, 2016).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hitzetoleranz von *R. eutropha* untersucht. Es wurde weder bei Kultivierung bei erhöhter Temperatur noch bei kurzem Hitzeschock ein schützender Effekt von PolyP festgestellt. Daraus wurde geschlossen, dass in diesem Bakterium PolyP nicht in die zelluläre Stressantwort auf Hitze involviert ist. Um zu überprüfen, ob die gewählten Versuchsbedingungen geeignet waren, um eine Hitzestressantwort zu provozieren, wurde der Hitzeschock in *E. coli* wiederholt. Für dieses Bakterium wurde bereits festgestellt, dass die Viabilität bei Hitze sowohl in der  $\Delta ppk$  Mutante (Rao & Kornberg, 1996) als auch in einer *ppx* Überexpressionsmutante verringert ist (Shiba *et al.*, 2000). Die höhere Hitzesensitivität der *E. coli*  $\Delta ppk$  Mutante wurde hier reproduziert als Validierung der Versuchsbedingungen. Neben einer fehlenden Schutzfunktion von PolyP wurde auch keine Änderung im PolyP Gehalt bei *R. eutropha* festgestellt. In der Arbeit von Rao und Kornberg, 1996 wurde der PolyP Gehalt der gestressten Zellen nicht bestimmt. In dieser Arbeit wurde unter ähnlichen Kultivierungsbedingungen kein PolyP in 24 h LB Kulturen von *E. coli* detektiert und auch nach Hitzeschock kein Anstieg verzeichnet (Rosigkeit *et al.*, 2021), was im Einklang steht mit dem Ergebnis von Fraley *et al.*, 1998, dass *E. coli* WT in LB Medium weder bei 37 °C noch bei 42 °C PolyP akkumulierte. Dennoch zeigte *E. coli* WT eine höhere Hitzetoleranz. Warum die *E. coli*  $\Delta ppk$  Mutante sensitiver auf den Hitzestress reagierte, obwohl beide Stämme vermutlich PolyP frei waren, ist nicht geklärt. Eine Hypothese wäre, dass die PPK neben der PolyP Synthese weitere Kinaseaktivität besitzt und andere Substrate wie z.B. Proteine phosphoryliert, ggf. unter Nutzung von NTPs als Phosphatdonor und damit den Nukleotidstoffwechsel und die Proteinaktivität beeinflusst. Damit könnte die PPK einen zellulären Zustand mitgestalten, der dem Überleben unter Hitzestress dienlich ist, ohne Beteiligung von PolyP.

Bei Rao und Kornberg, 1996 konnte eine *E. coli*  $\Delta ppk$  Mutante durch *rpoS* Überexpression den Überlebensnachteil auf WT Niveau ausgleichen. Daraus wurde geschlossen,

dass  $\sigma^S$  bei Hitzestress an der Hitzestressantwort beteiligt ist. Auch Muffler *et al.*, 1997 kam zu dem Schluss, dass  $\sigma^S$  bei Hitzestress stabilisiert wird und für die Stressadaptation verantwortlich ist. Die *rpoS* Expression wird unter anderem durch PolyP verstärkt. In *R. eutropha* war zum Zeitpunkt des Hitzeschocks PolyP vorhanden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass das Biopolymer bei dieser Form von Stress nicht an der Regulation der Stressantwort beteiligt ist. Womöglich wird *R. eutropha* in der Natur als Süßwasserbakterium generell kaum von Hitzestress geplagt, sodass diese Form der Stresstoleranz eine untergeordnete Rolle im Überlebenskampf spielt.

Viele Wachstumsversuche wurden mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht, um die Zellmorphologie und PolyP Lokalisation unter den spezifischen Kultivierungsbedingungen zu verfolgen. Es wurden jeweils die gleichen Belichtungszeiten für die Mikroskopieaufnahmen eingestellt und innerhalb eines Versuches wurden für alle Bilder die gleichen Helligkeits- und Kontrasteinstellungen verwendet. Trotz immer gleicher FärbeprozEDUREN war die Qualität der Färbungen immer etwas unterschiedlich, wohl gegeben durch die Pipettierungenauigkeiten der geringen Volumina der Farbstoffe (z.B. 0,5  $\mu$ l DAPI). So fluktuierte bereits die Fluoreszenzintensität von DAPI-PolyP bei Aufnahmen verschiedener Präparationen der gleichen Kultur, sodass keine quantitative Aussage durch die Fluoreszenzintensität möglich ist. Generell wurde emittierte Fluoreszenz bei DAPI-PolyP spezifischer Wellenlänge gleichgesetzt mit der Detektion von PolyP. Diese Methode ist jedoch ungenau: In der *R. eutropha*  $\Delta$ *ppk-all* Mutante wurden an den Zellpolen teilweise DAPI-gefärbte Kappen detektiert, die keine typische granuläre Struktur haben wie die PolyP Granula im WT. Da auch die PolyP Quantifizierung die Mutante als PolyP-frei bewies, ist davon auszugehen, dass es sich um eine andere Struktur als PolyP handelt. Zu Fehldeutungen der Ergebnisse kann die unspezifische Färbung von DAPI führen, in dieser Arbeit bei den Hitzestresstests mit *E. coli*. Hier waren nach Hitzestress in der  $\Delta$ *ppk* Mutante Strukturen erkennbar, die wie PolyP Granula aussahen. Somit muss DAPI hier andere Strukturen gefärbt haben. Denkbar ist eine Färbung von RNA, z.B. durch die Hitze beschädigte Ribosomen, die auch Polyanionen darstellen und mit DAPI gefärbt werden können (Aschar-Sobbi *et al.*, 2008). Die Färbung von Zellen mit DAPI ist ein gutes Mittel zu Verfolgung der PolyP Granula Präsenz und ihrer Lokalisation, sie hat aber Limitationen in der Spezifität.

Neben Hitzestress wurde *R. eutropha* auf seine Toleranz gegenüber oxidativem Stress in Form von HOCl und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> getestet. Für die Versuche mit oxidativen Agenzien wurde MOPS-MSM als Medium gewählt, da dessen Komponenten nicht selbst oxidiert werden und eine stabile Konzentration an Oxidationsmittel gewährleistet ist (Ferreira *et al.*, 2015). In diesem Medium produzierte sowohl *R. eutropha* als auch *E. coli* PolyP, vermutlich als Reaktion auf den *nutrient downshift* beim Übergang von der Vorkultur in Komplexmedium in die Hauptkultur in aminosäurefreiem MSM. Für *E. coli* ist dies auch bereits bei

Kuroda *et al.*, 1997 belegt. Die Viabilität war bei oxidativem Stress in *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante jeweils vergleichbar, auch der PolyP Gehalt im WT veränderten sich bei oxidativem Stress durch HOCl nicht. Diese Befunde legen nahe, dass PolyP bei der Toleranz von oxidativem Stress in *R. eutropha* keine Funktion hat. Kontrollexperimente in *E. coli* zeigten einen geringen Anstieg des PolyP Gehalts in *E. coli* WT bei HOCl Stress sowie ein deutlich verbessertes Überleben. Damit wurden die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt. Groitl *et al.*, 2017 wiesen nach, dass in *P. aeruginosa* bei HOCl Stress PolyP synthetisiert wurde und die  $\Delta ppk$  Mutante sensitiver reagierte als der WT. Auch *E. coli* akkumulierte PolyP und die  $\Delta ppk$  Mutante war sensitiver gegenüber Oxidantien (Gray *et al.*, 2014). Damit war validiert, dass die in dieser Arbeit gewählten Versuchsbedingungen geeignet sind zur Untersuchung der Toleranz von oxidativem Stress. Generell ist eine Stressantwort, die PolyP Synthese beinhaltet, sinnvoll. Die Synthese des Biopolymers ist unabhängig von Translation und Transkription und kann somit auch aufgebaut werden, wenn diese Prozesse bei Stress gestoppt werden, sofern eine leistungsfähige PPK vorhanden ist. Außerdem ist PolyP selbst nicht an Redoxreaktionen beteiligt. In *E. coli* wird bei HOCl Stress vorübergehend ATP abgebaut zugunsten von PolyP. Dadurch ist die Energie verlustfrei gespeichert, bis die Bedingungen sich wieder verbessern (Gray *et al.*, 2014). PolyP verhindert Proteinaggregation, das durch die Schädigung von Proteinen durch Oxidation hervorgerufen wird (Gray *et al.*, 2014). Mit Hilfe von Chaperonen können diese Proteine wieder rückgefaltet werden oder durch Proteasen abgebaut werden. In der *E. coli*  $\Delta ppk$  Mutante werden bei HOCl Stress mehr Proteinaggregate gebildet und eine höhere Expression von Hitzeschockgenen wie *hsp33*, *dnaK* oder *rpoH* gemessen, vermutlich um der Belastung durch fehlgefaltete Proteine entgegenzuwirken (Gray *et al.*, 2014). Wie *R. eutropha* mit oxidativem Stress umgeht, ohne dass PolyP involviert zu sein scheint, ist ungeklärt.

Bei Behandlung von *R. eutropha* mit HOCl wurde eine Verringerung der Viabilität im WT wie auch der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante verzeichnet, die in der exponentiellen Phase geringer ausfiel als in der stationären Phase. Zum selben Ergebnis kamen auch Groitl *et al.*, 2017 in *P. aeruginosa*. Ein Grund dafür könnte sein, dass in den metabolisch hoch aktiven Zellen der exponentiellen Phase die Stressantwort umgehend eingeleitet werden konnte und Gene zur Stressadaptation exprimiert wurden. Diese umfassen Gene für Chaperone und Proteasen, wie oben bereits genannt, aber auch Enzyme und kleine thiolhaltige Proteine oder Peptide, die an der Redoxhomöostase beteiligt sind (Gray *et al.*, 2013).

Um die Viabilität und Teilungsfähigkeit von Zellen in verschiedenen Phasen der Kultivierung oder unter Stress zu untersuchen, wurden Kultivierungsassays durchgeführt. Diese geben einen ersten Eindruck, ob und in welcher Größenordnung sich kultivierbare Zellen in der Probe befanden. Dennoch ist die Aussage dieser Assays sehr eingeschränkt. Zum Einen wird eine Kombination aus zwei Parametern abgefragt, die Viabilität und Teilungsfähigkeit, zum Anderen ist der Assay nur semiquantitativ. Pro Tropfen wird die



Verdünnung um eine Zehnerpotenz wiedergegeben, das Probenvolumen war auf 200  $\mu\text{l}$  beschränkt, es wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  pipettiert, sodass durch die Pipettierungenauigkeit und Folgefehler der Verdünnungsreihe starke Ungenauigkeiten bei den koloniebildenden Einheiten auftreten konnten.

Eine genauere Betrachtung wäre mit folgenden zwei Versuchen gegeben: Erstens Färbung der Proben mit PI und Analyse mit Durchflusszytometrie für eine exakte Bestimmung der Lebendzellzahl. Zweitens das Ausplattieren von Proben in einer Verdünnungsreihe und Zählen der koloniebildenden Einheiten. Ersteres erlaubt eine Trennung zwischen Viabilität und Kultivierbarkeit, letzteres eine genauere Quantifizierung der kultivierbaren Zellen, wobei der Fehler beim Pipettieren der Verdünnungsreihen erhalten bleibt.

Durch die differenzierte Betrachtung der beiden Parameter Viabilität und Kultivierbarkeit können wichtige zusätzliche Informationen gewonnen werden. Bei geringer Viabilität der Kultur unter bestimmten Bedingungen ist bewiesen, dass die Bedingungen die Zellen so stark schädigen, dass sie sterben und die fehlende Kultivierbarkeit ist einzig darauf zurückzuführen. Ist jedoch eine hohe Viabilität der Kultur nachgewiesen, kann die Kultivierbarkeit isoliert betrachtet werden. Hier ist insbesondere der *viable-but-not-culturable* (VBNC) Zustand von Interesse, bei dem die Zellen zwar leben, aber nicht mehr teilungsfähig sind (Nowroth *et al.*, 2016; Oliver, 2005). Es gibt Hinweise darauf, dass PolyP an der Einrichtung dieses Zustands in *Campylobacter jejuni* beteiligt ist. Eine PolyP-freie Mutante von *C. jejuni* erreichte seltener den VBNC Zustand und war anfälliger für verschiedene Stressbedingungen (Gangaiah *et al.*, 2009).

Daüber hinaus wurde quantifiziert, wie stark die Oxidationsmittel in *R. eutropha* mit intrazellulären Strukturen reagieren und dabei verschiedene ROS bilden, die dann wiederum mit Zellkomponenten reagieren. Die Quantifizierung von ROS erfolgte mit der Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes CellROX green und Messung der Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer. Dabei war die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge an ROS in der Zelle. Diese Messung kann weiteren Aufschluss geben über die Reaktivität der verwendeten Oxidationsmittel und das Ausmaß an Schäden in der Zelle. Limitierend ist an dieser Methode, dass sie nur die ROS Level in intakten Zellen misst. Sobald die Zellen so stark mit ROS belastet sind, dass die Zelle stirbt und ihre Integrität verliert, wird diese in der Messung nicht mehr berücksichtigt und die Zellen mit sublethalen ROS Leveln überrepräsentiert, sodass kein Abbild der gesamten Kultur möglich ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die PolyP Granula assoziierten Proteine untersucht, um weitere Funktionsbereiche von PolyP und dessen Metabolismus aufzuklären. Es wurden eine annotierte GTP Cyclohydrolase (B1967) und Guanylatkinase (A0953) sowie die hypothetischen Proteine A1273, A1984, B0177 und B0702 als neue potentielle PolyP Bindeproteine identifiziert sowie die beiden CHAD Protein PptA und PptB strukturell

und funktional untersucht. Es stellte sich heraus, dass die *R. eutropha*  $\Delta$ *pptA* Deletionsmutante leichte Veränderungen im PolyP Stoffwechsel und der Granulaanzahl aufwies, jedoch ohne essentielle Funktion für diese Prozesse. Die bioinformatische Strukturanalyse ergab eine Ähnlichkeit zwischen PptA und PptB mit gut untersuchten CHAD Proteinen aus anderen Organismen. Verschiedene in vitro und in vivo Messungen ergaben widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Quartärstruktur von PptA. Darüber hinaus wurde die GlnA1 von *R. eutropha* als funktionale Glutaminsynthetase an einer Schnittstelle zwischen dem Stickstoff- und Phosphatstoffwechsel identifiziert. Im Folgenden werden zunächst strukturelle, dann funktionale Aspekte der CHAD Proteine in *R. eutropha* diskutiert, anschließend die Bedeutung der GlnA1 im Stickstoff- und Phosphatstoffwechsel.

#### 4.4 Struktur der CHAD-Proteine in *R. eutropha*

CHAD Proteine binden spezifisch an PolyP (Lorenzo-Orts *et al.*, 2019; Tumlirsch & Jendrossek, 2017; Werten *et al.*, 2019) und stehen in Bezug zum PolyP- und Nukleotidstoffwechsel (Iyer & Aravind, 2002). Aus diesen Gründen ist denkbar, dass in *R. eutropha* die beiden CHAD-Proteine PptA (A0104) und PptB (B1017) auch im Zusammenhang mit dem Polyphosphatstoffwechsel stehen.

Die Primärstrukturen der *R. eutropha* CHAD Proteine (PptA<sub>Re</sub> und PptB<sub>Re</sub>) wurden mit den untersuchten CHAD Proteinen von *Streptomyces chartreusis* (PptA<sub>Sc</sub>) (Werten *et al.*, 2019) und *C. tepidum* (CHAD<sub>Ct</sub>) (Lorenzo-Orts *et al.*, 2019) verglichen. In Tab. 4.1 sind die Anzahl an Aminosäuren der Proteine, die Anzahl an Aminosäuren der CHAD (laut UniProt Datenbank) und der isoelektrische Punkt des Proteins (Berechnung mit dem online Programm ExpASy compute pI) aufgeführt. Zudem wurden konservierte Aminosäuren herausgestellt, die zu den CHAD-Motiven gehören oder anderweitig an der Bindung von PolyP an CHAD<sub>Ct</sub> beteiligt sind (Lorenzo-Orts *et al.*, 2019) und ihre Entsprechung in den anderen CHAD Proteinen. Das CHAD-Motiv besteht aus konservierten Histidinen und Argininen in einer HXX(R/K)XXXXR Sequenz (X = beliebige Aminosäure) (Tumlirsch & Jendrossek, 2017).

Alle laut Lorenzo-Orts *et al.*, 2019 in CHAD<sub>Ct</sub> an der Bindung von PolyP beteiligten Aminosäuren sind in Tab. 4.1 aufgeführt. Sie stimmen größtenteils mit den konservierten Aminosäuren der CHAD Motive überein und sind überwiegend auch in PptA und PptB aus *R. eutropha* sowie weiteren CHAD Proteinen anderer Bakterien vorhanden (Tumlirsch & Jendrossek, 2017). An der Bindung von PolyP sind bei PptA vermutlich die Aminosäuren H<sup>92</sup>, R<sup>95</sup>, R<sup>99</sup>, R<sup>221</sup>, R<sup>222</sup>, K<sup>225</sup>, R<sup>226</sup>, R<sup>246</sup>, R<sup>251</sup>, R<sup>253</sup>, Y<sup>254</sup>, E<sup>257</sup> und R<sup>273</sup> beteiligt. Dies bestärkt bioinformatisch die in vivo Befunde, dass eYFP-markiertes PptA und PptB mit PolyP Granula kolokalisierten, als eine spezifische Bindung, da strukturelle Ähnlichkeit auf funktionale Ähnlichkeit schließen lässt (Alberts *et al.*, 2012, S. 130). Lorenzo-Orts *et al.*, 2019 unterschieden zwischen langen CHAD Domänen mit etwa 300 Aminosäuren

und kurzen CHAD Domänen mit etwa 200 Aminosäuren. PptA hat eine Gesamtlänge von 317 Aminosäuren, davon sind die Aminosäuren 57-317 als CHAD zugehörig annotiert (UniProt Datenbank) mit einer N-terminalen ungeordneten Region von 56 Aminosäuren. Somit hat die CHAD Domäne von PptA 260 Aminosäuren und liegt zwischen der kurzen und langen Domäne.

Tab. 4.1: Eigenschaften der CHAD Proteine aus *C. tepidum*, *S. chartreusis* und *R. eutropha* sowie wichtige Aminosäuren für die Bindung von PolyP in CHAD<sub>Ct</sub> und ihre Entsprechung in den anderen Spezies.

| CHAD <sub>Ct</sub>              | PptA <sub>Sc</sub> | PptA <sub>Re</sub> | PptB <sub>Re</sub> |                       |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
| 522                             | 374                | 317                | 510                | n Aminosäuren Protein |
| 290                             | 355                | 260                | 288                | n Aminosäuren CHAD    |
| 7,0                             | 10,3               | 11,5               | 8,8                | Isoelektrischer Punkt |
| <b>Konservierte Aminosäuren</b> |                    |                    |                    |                       |
| H253                            | R58                | H92                | H258               | 1. CHAD Motiv         |
| R256                            | R61                | R95                | R261               |                       |
| R260                            | R65                | R99                | R265               |                       |
| R261                            | R66                | H100               | R266               |                       |
|                                 |                    | R102               | R268               |                       |
|                                 |                    | R219               | R392               | 2. CHAD Motiv         |
| R385                            | T231               | R221               | R394               |                       |
| K386                            | A232               | R222               | R395               |                       |
| K389                            | D235               | K225               | K398               |                       |
| K390                            | R236               | R226               | R399               |                       |
|                                 |                    | H243               | H412               | 3. CHAD Motiv         |
| R411                            | R279               | R246               | R415               |                       |
|                                 | R283               | K250               | K419               |                       |
| K416                            |                    | R251               | K420               |                       |
| R418                            | R286               | R253               | R422               |                       |
| Y419                            | Y287               | Y254               | Y423               |                       |
| E422                            | E290               | E257               | E426               |                       |
| R438                            |                    | R273               | R442               |                       |
| K441                            | L306               | V276               | S445               |                       |

Die Ähnlichkeit der Primärstruktur der CHAD Proteine aus *C. tepidum* (CHAD<sub>Ct</sub>) und *R. eutropha* mit 27 % Identität (National Center for Biotechnology Information, *Basic Local Alignment Search Tool* (NCBI BLAST)) lässt auch auf eine ähnliche Tertiärstruktur schließen. CHAD<sub>Ct</sub> besitzt eine C-terminale lange CHAD Domäne mit

290 Aminosäuren und wurde strukturell mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt (Abb. 4.1 B) (Lorenzo-Orts *et al.*, 2019). Aus der Röntgenkristallstruktur von CHAD<sub>Ct</sub> wurde basierend auf der Primärstruktur von PptA eine Tertiärstruktur modelliert mit dem online verfügbaren Programm *The Phyre<sup>2</sup> web portal for protein modeling, prediction and analysis* (Kelley *et al.*, 2015). Die Modellierung der Tertiärstruktur von PptA ist in Abb. 4.1 A dargestellt und entspricht im Wesentlichen der CHAD<sub>Ct</sub> Struktur (Abb. 4.1 B) mit  $\alpha$ -Helices, die eine Pore formen. Am C-Terminus fehlen PptA jedoch die letzten zwei  $\alpha$ -Helices. Man kann also diese CHAD als lange Domäne ansehen mit Verlust der C-terminalen Helices. Konservierte Arginin- und Histidinseitenketten zeigen ins Innere der Pore. Damit ist bioinformatisch über die Struktur der in vivo Befund erklärt, dass PptA in der Lage ist, PolyP zu binden (Tumlirsch & Jendrossek, 2017). Das erste und dritte CHAD Motiv, vom N-Terminus aus nummeriert, bildet die basische Oberfläche der Pore an der  $\alpha$ -Helix 2 (hellblau) und  $\alpha$ -Helix 8 (orange), während das zweite CHAD Motiv an der  $\alpha$ -Helix 7 (gelb) nach außen gerichtet ist. Dieses Motiv ist unvollständig, weil das proximale Histidin fehlt. In CHAD<sub>Ct</sub> ist diese  $\alpha$ -Helix weniger exponiert durch die zusätzlichen  $\alpha$ -Helices 11 (hellrot) und 12 (rot) am C-Terminus. In *S. chartreusis* ist dieses dritte CHAD Motiv gar nicht vorhanden. Die Bindungsspezifität von PptA an PolyP wurde in *R. eutropha* in vivo durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen, sie könnte zusätzlich in vitro z.B. mittels Isotherme Titrationskalorimetrie oder Mikroskalige Thermophorese quantifiziert werden.

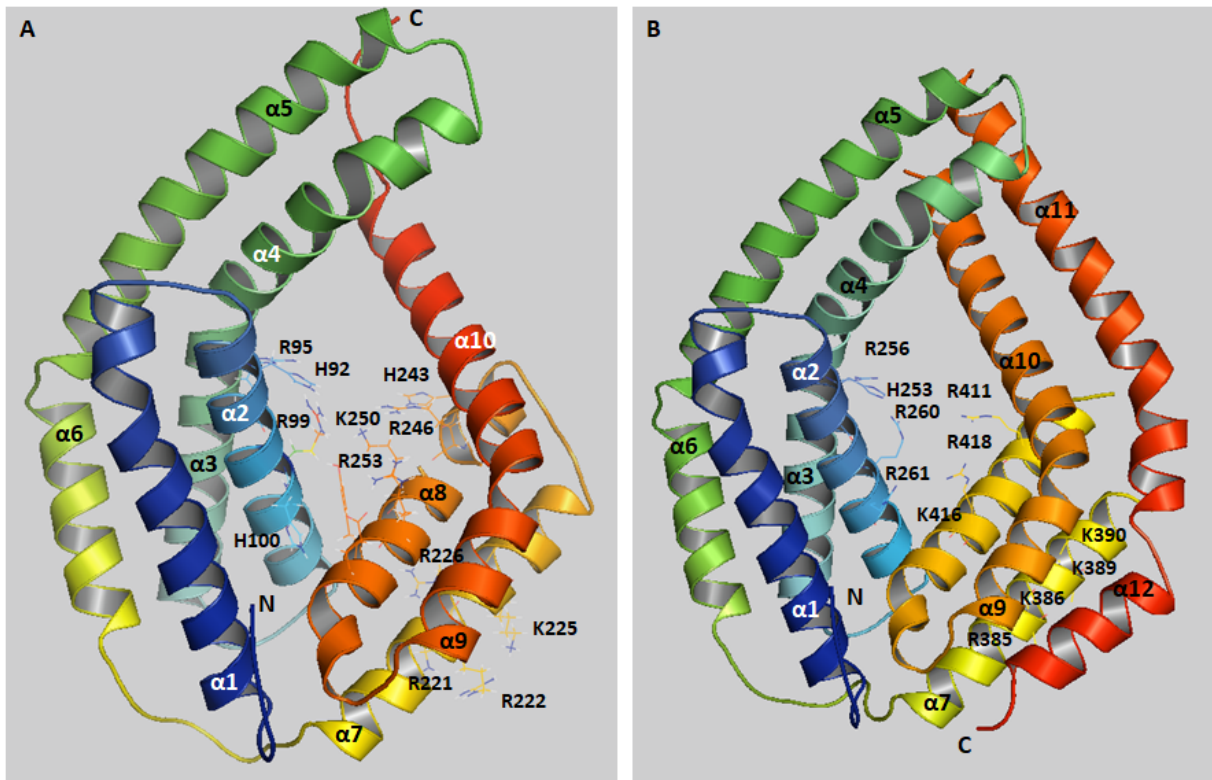


Abb. 4.1: Modellierung der Tertiärstruktur von A) PptA auf Grundlage der Röntgenkristallstruktur von CHAD<sub>Ct</sub> mit dem Programm *The Phyre<sup>2</sup> web portal for protein modeling, prediction and analysis* und B) Röntgenkristallstruktur von CHAD<sub>Ct</sub> nach Lorenzo-Orts *et al.*, 2019. Dargestellt ist das Proteinrückgrad mit Sekundärstrukturen. Zwei Vier-Helix-Bündel bilden eine Pore. Vom N-Terminus (N) (blau) bis zum C-Terminus (C) (rot) sind die Helices nummeriert ( $\alpha x$ ). Konservierte Aminosäuren in den drei CHAD Motiven sind als Stäbchen hervorgehoben.

Darüber hinaus wurde mit dem Programm PyMOL ausgehend von der Primärstruktur von PptA dessen Oberflächenstruktur und -ladung berechnet. In Abb. 4.2 ist das Oberflächenmodell von PptA von zwei gegenüberliegenden Seiten dargestellt. Blaue Oberflächenfärbung steht für basische Aminosäurereste an der Proteinoberfläche, weiß für neutrale und rot für saure. Die Unterseite der Pore mit den konservierten Aminosäuren der CHAD Motive an den Helices  $\alpha 2$  (hellblau in Abb. 4.1) und  $\alpha 8$  (orange in Abb. 4.1) ist in blau dargestellt, also positiv geladen, ebenso wie seitliche potentielle Bindetaschen für PolyP an beiden Seiten des Proteins. Diese Oberflächenbeschaffenheit ähnelt stark dem CHAD<sub>Ct</sub> (vgl. Abb. 1.3). Allerdings besitzt PptA in der Pore an der gegenüberliegenden Seite der positiven Oberflächenladung auch einen negativ geladenen Bereich. Ebenso liegen an der Außenseite des Proteins gegenüberliegend zu den positiv geladenen seitlichen Bereichen auch stark negativ geladene Bereiche. Diese dienen womöglich der Interaktion mit anderen Proteinen wie der GlnA1.

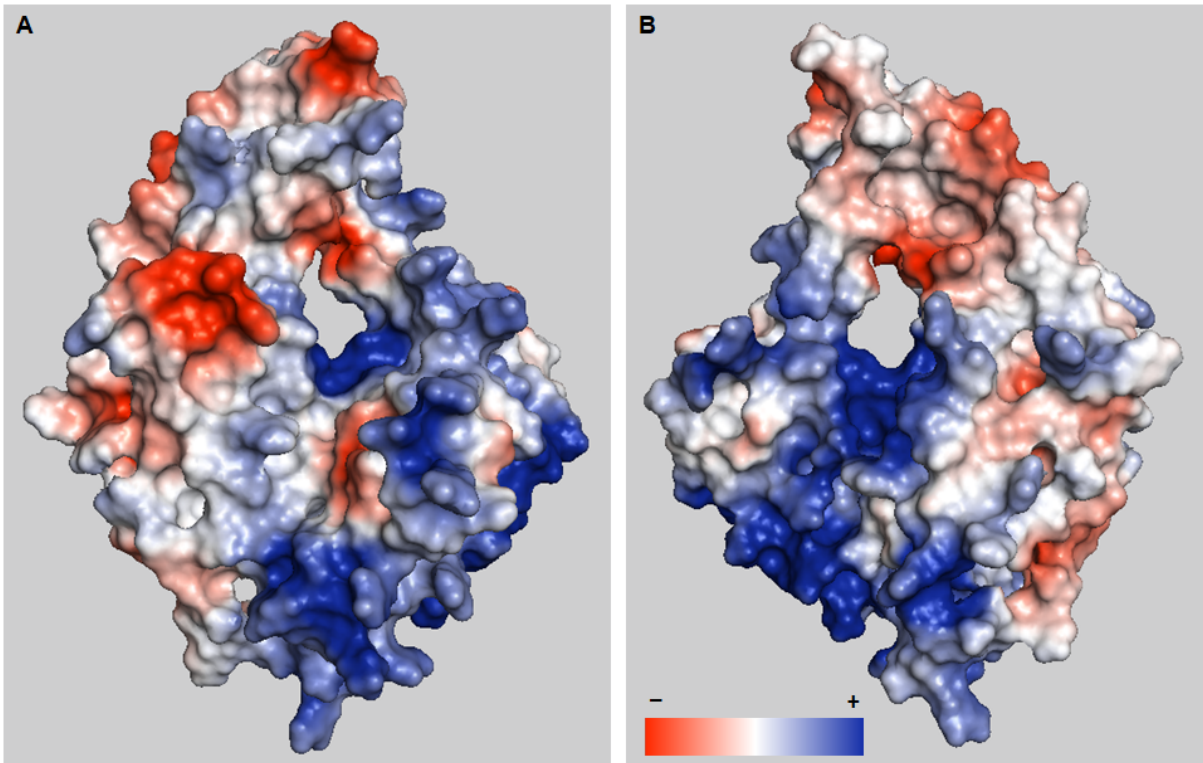


Abb. 4.2: Modellierung der Oberflächenstruktur und -ladung von PptA auf Grundlage der Primärstruktur mit dem Programm PyMOL. Rot steht für negative Ladung, blau für positive. Ein Großteil der zentralen Pore und der seitlichen potentiellen PolyP Binde-taschen sind positiv geladen. Gegenüberliegend ist ein Teil der Pore negativ geladen, ebenso kleinflächig äußere Bereiche des Proteins. A) entspricht der Ausrichtung von PptA in Abb. 4.1 A), B) ist um  $180^\circ$  an der Längsachse gedreht.

PptB besteht neben der C-terminalen CHAD Domäne (Aminosäuren 223-510), mit 288 Aminosäuren eine lange CHAD Domäne, zusätzlich aus einer N-terminalen, 208 Aminosäuren langen Adenylatcyclase Untergruppe B (CyaB), Thiamintriphosphatase Domäne (CYTH) (UniProt Datenbank). Gene für CYTH Proteine liegen oft in einem Operon oder benachbart zu Genen von CHAD Proteinen bzw. Proteinen des PolyP- oder Nukleotidstoffwechsels. In *R. eutropha* ist *pptB* (B1017) benachbart zur *ppk1b* (B1019). Der CYTH Domäne wird, wie der CHAD, eine ursprüngliche Funktion im PolyP- und Nukleotidstoffwechsel zugeschrieben (Iyer & Aravind, 2002).

Anschließend wurde die Quartärstruktur von rekombinantem strep-PptA untersucht. Im reduzierenden SDS-PA-Gel wurde überraschenderweise nicht nur das Monomer von strep-PptA, sondern auch das Dimer identifiziert. Protein-Protein-Interaktionen werden üblicherweise durch thermische und chemische Denaturierung der Probe unterbunden, so dass dieser Befund eine sehr starke Bindung von PptA Dimeren vorschlägt, insbesondere auch in linearer Form ohne spezifische Tertiärstruktur. Der *in vivo* Protein-Protein-Interaktionsassay (bac2hybrid) ließ dagegen keine Oligomerisierung erkennen. In den

*E. coli* BTH101 Zellen, die über Nacht in LB Medium mit Antibiotika kultiviert wurden, lag vermutlich kein PolyP während des Assays vor. Möglich wäre, dass die Interaktion von PptA mit sich selbst in vivo erst bei Präsenz von PolyP zustande kommt. Möglicherweise braucht es für die Oligomerisierung eine kritische Konzentration an Protein oder PolyP als Mediator der Interaktion. PptB zeigte im bac2hybrid eine Interaktion mit sich selbst, bildet also mindestens Dimere.

Zuletzt wurde die Frage der Quartärstruktur in vitro mittels SEC-MALS angegangen. Strep-PptA wurde mittels FPLC über eine kalibrierte Größenausschlusschromatographiesäule nach dem Molekulargewicht getrennt und durch Messung der Absorption bei 280 nm sowie der Lichtstreuung sensitiv detektiert. Es wurden verschiedene Oligomerisierungszustände gefunden. Aufgrund der geringen Proteinkonzentration konnten die Signale der FPLC jedoch nicht in der SDS-PAGE der Elutionsfraktionen als strep-PptA validiert werden.

Das LS-Signal bei geringer  $V_{\text{Retention}}$ , das große Moleküle bedeutet, war sehr breit, sodass eine genaue Bestimmung des jeweiligen Oligomerisierungszustands nicht möglich war. Grob berechnete sich ein 90-mer, bei Zugabe von PolyP etwa ein 58-mer. Spekulativ handelt es sich um akkumuliertes Protein, sodass das Ergebnis nichts über den physiologischen Zustand aussagt. Präzipitat wurde vor dem Auftragen auf die Säule durch Zentrifugation entfernt, kleinere Aggregate könnten dennoch vorhanden sein. Dass in Anwesenheit von PolyP die hochmolekularen Oligomere kleiner waren als in Abwesenheit von PolyP, könnte ein Nachweis für die chaperonartige Funktion sein, dass PolyP Proteine besser in Lösung hält (Gray *et al.*, 2014).

Die Quartärstruktur anderer CHAD-Proteine ist in vitro vielfältig. Das CHAD Protein von *Sulfolobus solfataricus* ist ein Monomer, während das CHAD<sub>Ct</sub> in Abwesenheit von PolyP Dimere und Tetramere bildete, mit langkettigem PolyP neben Tetrameren sogar hochmolekulare Oligomere (Lorenzo-Orts *et al.*, 2019). Letzteres wurde experimentell durch Werten *et al.*, 2019 erklärt, indem das Migrationsverhalten von PptA<sub>Sc</sub> mit PolyP im SDS-Gel mittels *electrophoretic mobility shift assay* geprüft wurde. Sie stellten fest, dass mehrere PptA Moleküle an PolyP banden und pro PptA-Dimer 14-15 Phosphatmonomere besetzt waren. Dies könnte auch erklären, dass in Anwesenheit von PolyP verschiedene Oligomerisierungszustände gefunden wurden.

PptA besteht größtenteils aus einer spezifischen PolyP Bindedomäne, der CHAD ohne eine bekannte enzymatische Funktion (Lorenzo-Orts *et al.*, 2019). Es besitzt wie die verifizierten PolyP Bindeproteine CHAD<sub>Ct</sub> und PptA<sub>Sc</sub> wichtige konservierte, basische Aminosäuren für die Bindung von PolyP. Die Quartärstrukturaufklärung von PptA mit SEC-MALS und bac2hybrid lieferte widersprüchliche Ergebnisse.

## 4.5 Funktion der CHAD Proteine und PolyP assoziierte Proteine

Die Funktion der CHAD Proteine in *R. eutropha* war bisher unbekannt. Spekulativ ist PptA an der Lokalisation der PolyP Granula beteiligt (Tumlirsch & Jendrossek, 2017). In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass in *R. eutropha* WT und der  $\Delta pptA$  Mutante in NB Medium der Anteil an Zellen mit bestimmter Anzahl an Granula pro Zelle jeweils gleich war über einen Zeitraum von 24 h. Dagegen war die Anzahl an Granula in Zellen mit Überexpression von eYFP-PptA moderat verändert mit Tendenz zu mehr Granula pro Zelle (Tumlirsch & Jendrossek, 2017). Die Granulazahl pro Zelle war damit nicht von PptA initiiert, hohe PptA Level beeinflussten jedoch die Granulazahl. Zusätzlich führte die Überexpression zur Akkumulation von PptA am Zellpol und zu einer Positionierung des PolyP Granulums am Zellpol weg von der Zellmitte (Tumlirsch & Jendrossek, 2017). In dieser Arbeit wurde der PolyP Stoffwechsel in *R. eutropha*  $\Delta pptA$  detailliert betrachtet. Dabei kam im Gegensatz zu den Ergebnissen von Tumlirsch und Jendrossek, 2017 heraus, dass nach 24 h Kultivierung von *R. eutropha* in NB Medium der Anteil an Zellen ohne Granulum etwa  $\frac{1}{3}$ , mit einem Granulum etwa  $\frac{2}{3}$  betrug mit einem verschwindend geringen Anteil an Zellen mit zwei Granula. Bei Tumlirsch hatten bei  $t=24$  h dagegen 99 % der Zellen ein Granulum. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied ist ein technischer Fehler bei der Färbung der Kulturen mit DAPI, der beim Versuch der aktuellen Arbeit einige Zellen nicht färbte (falsch negativ), oder ein Fehler bei der Belichtung der Mikroskopiebilder, der die DAPI-gefärbten Strukturen zu stark herausstellte (falsch positiv bei Tumlirsch).

Geht man von zwei technisch korrekten Versuchen aus, könnten die Kulturen trotz standardisierter Kultivierungsbedingungen bei verschiedenen Personen unterschiedlich wachsen und somit phänotypische Differenzen hervorrufen. Gleich war in beiden Arbeiten der Nachweis, dass *R. eutropha* WT und  $\Delta pptA$  eine ähnliche Verteilung der Granulazahl pro Zelle in einer NB Kultur hatten. PptA war also nicht essentiell für die Regulation der Granulazahl.

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem die Granulazahl pro Zelle bei Wachstum in Schlegel-MSM bei  $t=24$  h bestimmt. Anders als in NB Medium wurden hier auch Zellen mit zwei bis drei Granula pro Zelle in beiden Stämmen detektiert. Zusätzlich bestand ein Unterschied zwischen dem WT und  $\Delta pptA$ . Die Mutante hatte weniger Zellen ohne Granulum, dafür mehr Zellen mit zwei Granula, während der Anteil an Zellen mit einem oder drei Granula vergleichbar mit dem WT war. Hier zeigte sich ein geringfügiger Phänotyp, wiederum ohne essentielle Funktion von PptA.

In dieser Arbeit wurde der PolyP Gehalt in *R. eutropha*  $\Delta pptA$  quantitativ untersucht mit dem Ergebnis, dass sowohl in NB Medium als auch Schlegel-MSM der Aufbau von PolyP in der stationären Phase in der  $\Delta pptA$  Mutante geringer ausfiel als im WT, was



durch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Tumlirsch und Jendrossek, 2017 nicht auffiel. Auch fehlte die für den WT typische lineare PolyP Akkumulation. Vielmehr gab es in der Mutante in der stationären Phase Zeiträume, in denen der PolyP Aufbau stagnierte. Es gibt keine Hinweise auf eine enzymatische Funktion von PptA im PolyP Stoffwechsel. Dennoch traten Abweichungen im Aufbau von PolyP unter typischen Akkumulationsbedingungen auf. Dies deutet auf eine Rolle von PptA bei der Regulation des PolyP Stoffwechsels hin, wiederum ohne essentielle Funktion, da dieser auch in Abwesenheit von PptA funktionierte. Denkbar ist, dass PptA die Aktivität der PPKs in Richtung PolyP Synthese positiv reguliert oder den Abbau hemmt.

Während der Aufbau von PolyP ohne PptA leicht vermindert war, wurde der Abbau von PolyP bei Phosphatmangel in Abwesenheit von PolyP beschleunigt. Dies spricht wiederum für eine negative Regulation der PPKs in Richtung PolyP Abbau durch PptA oder eine generelle sterische Hinderung der PPKs durch Besetzung des PolyP Strangs durch PptA. In *S. chartreusis* beeinflusst PptA nicht die Aktivität der PPX (Werthen *et al.*, 2019), eine Regulation der Aktivität der PPKs ist aber durchaus möglich.

Ohne PptA war die PolyP Synthese verzögert und verringert und der PolyP Abbau beschleunigt. Eine mögliche Funktion von CHAD Proteinen ist, die PolyP Kette zugänglich zu machen für metabolische Enzyme oder diese sterisch zu hindern und somit den PolyP Metabolismus zu regulieren, ähnlich wie bei Eukaryoten Histone und deren Modifikationen die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren oder Polymerasen regulieren (Alberts *et al.*, 2012, 203 f.).

Bei Tumlirsch, 2017 wurde mittels bac2hybrid und eYFP-PptA eine Interaktion von PptA mit PPK2c und PPK1a ermittelt, sodass eine Regulation der Enzymaktivität durch Bindung von PptA durchaus denkbar ist.

Dagegen fiel der PolyP Abbau unter Phosphatmangel deutlich langsamer aus bei gemeinsamer Deletion von PptA und PptB. Dieser Phänotyp ist schwer zu bewerten, da keine Informationen zum PolyP Stoffwechsel in der  $\Delta pptB$  Einzelmutante vorliegen. Zum Einen kann PptB selbst am PolyP Stoffwechsel beteiligt sein, da die CYTH Domäne potentiell Reaktionen mit organischen Phosphaten katalysieren kann (Bettendorff & Wins, 2013). Um dies zu prüfen, müsste der PolyP Stoffwechsel von *R. eutropha*  $\Delta pptB$  detailliert untersucht werden und eine *in vitro* Enzymaktivität mit rekombinantem, isoliertem PptB getestet werden. Andererseits könnte PptB auch an der Regulation der Enzymaktivität der PPKs beteiligt sein. In Tumlirschs Arbeit wurde eine geringfügige Interaktion von PptB mit PPK1a und PPK2c sowie möglicherweise mit PPK2d und PPK2e durch bac2hybrid nachgewiesen. Eine Regulation der Zugänglichkeit der PPKs an das PolyP Granulum durch PptB, wie für PptA vorgeschlagen, ist dagegen unwahrscheinlich, da PptB in verschiedenen Versuchen nicht als Granula assoziiert identifiziert wurde.

Die Befunde des PolyP Stoffwechsels in *R. eutropha*  $\Delta pptA$  bzw.  $\Delta pptA\Delta pptB$  bei Phosphatmangel sind jedoch nur vorläufig, da es keine biologischen Replikat gab.

Bekannt sind Strukturproteine an der Oberfläche des zweiten Biopolymers PHB in *R. eutropha*. Die als Phasine bezeichneten amphiphilen Proteine haben unter anderem die Funktion, das hydrophobe Polymer mit dem hydrophilen Cytoplasma zu verbinden (Sznajder *et al.*, 2015). PolyP als Polyanion könnte ähnliche Oberflächenproteine zur Abschirmung seiner negativen Ladung ebenfalls brauchen, da die hohe negative Ladungsdichte toxisch wirken kann, indem zu viele Gegenionen gebunden werden. Das stört die Osmohomöostase und entzieht der Zelle Metallionen für physiologische Prozesse. Da sich PolyP Granula in der Nähe des polyanionischen Nukleoids aufhalten (Tumlirsch & Jendrossek, 2017), muss eine Neutralisation der Ladung erfolgen, um elektrostatische Abstoßung zu verhindern, und im Falle einer diskreten Bindung auch Proteine als Mediator vorhanden sein. Die Lokalisation von PolyP in der Nukleoidregion ist auch in Abwesenheit von PptA gegeben (Tumlirsch & Jendrossek, 2017). Zum Vergleich mit dem PHB Granulum ist bekannt, dass für die Lokalisation an der DNA das Phasin PhaM benötigt wird (Bresan & Jendrossek, 2017). Die Oberflächenbeschaffenheit von PolyP könnte durch PptA oder andere Phosine moduliert sein.

Für die Initiation der PHB Granula Synthese ist ebenfalls PhaM wichtig als Aktivator der PhaC1 (Bresan & Jendrossek, 2017; Jüngert *et al.*, 2018). Ein solcher Initiator ist für PolyP nicht nötig. In vitro konnten einzelne isolierte PPKs PolyP nur aus Nukleosidtriphosphaten bilden (Hildenbrand *et al.*, 2020). Daher ist PptA generell nicht nötig zur Initiation der Granulasynthese.

Fluoreszenzmikroskopische Bilder zeigten auch, dass in *R. eutropha* WT neben dem PolyP Granula assoziierten eYFP-PptA auch fokussiertes eYFP-PptA ohne sichtbares PolyP Granulum vorlag. Fraglich ist, warum eYFP-PptA ohne PolyP im WT fokussiert war, während das gleiche Molekül in der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante löslich vorlag. Zusätzlich wurden Zellen gefunden mit zwei Granula, von denen nur eines mit eYFP-PptA besetzt war.

Es bleiben die Fragen offen, ob an diese Granula nie eYFP-PptA assoziiert war oder ob dieses ein neu synthetisiertes Granulum darstellte, das z.B. erst später, z.B. ab einer bestimmten Gesamtgröße des Biopolymers, mit eYFP-PptA besetzt wurde. Erschwerend kommt hier hinzu, dass die eYFP-PptA Überexpression in WT Zellen stattfand, sodass zusätzlich zum markierten PptA auch natives, nicht sichtbares PptA vorlag. Diesbezüglich fehlen Informationen über den zeitlichen Verlauf der Granulasynthese, die man mit *time-lapse* Experimenten eruieren könnte.

Ergänzend wurde die Expression von PptA und PptB mit qRT-PCR gemessen und eine Expression in der stationären Phase ermittelt, in der auch PolyP aufgebaut wird. Dies stützt weiterhin die Annahme, dass beide Proteine eine Funktion im Zusammenhang mit PolyP haben. Rätselhaft bleibt, warum PptB in der stationären Phase exprimiert wurde und bei Fluoreszenzmarkierung mit PolyP in vivo kolokalisierte, aber in Pulldowns nicht identifiziert wurde. Womöglich ist es nicht an PolyP gebunden trotz der CHAD oder instabil und degradierte bei der Probenaufbereitung.

Die biologischen Replikate der qRT-PCR zeigten die gleiche Tendenz, jedoch mit stark unterschiedlichen Werten. Trotz standardisierter Kultivierungsmethoden können die Kulturen leicht unterschiedliche Genexpression aufweisen. Wahrscheinlich sind vor allem technische Probleme für den Unterschied der Ergebnisse verantwortlich. Eine Möglichkeit stellt ein teilweiser Verlust der Probe bei der RNA Isolation dar. Um Fehler durch teilweise degradierte RNA zu vermeiden, wurde die Qualität der RNA im Agarosegel geprüft über die Detektion distinkter Banden für die rRNA und Proben von der Analyse ausgeschlossen, die Degradation aufwiesen. Ein kritischer Punkt bei der qPCR ist die Wahl des Referenzgens, da alle Daten in Relation zu diesem erhoben werden. Gewählt wurde die *gyrB*, der eine stabile Expression in der exponentiellen und stationären Phase bescheinigt wird (Jugder *et al.*, 2015; Rocha *et al.*, 2015). Ein Vergleich der Expression von *gyrB* zu den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb eines Versuches zeigte jedoch in einem Replikat eine schwankende Menge an detektierter cDNA für das Referenzgen (siehe Abb. 4.3). Das machte die quantitativen Messungen nicht belastbar. Sicher ist ein qualitativer Nachweis des Transkripts, dass definitiv PptA und PptB in *R. eutropha* in der stationären Phase exprimiert wurde.

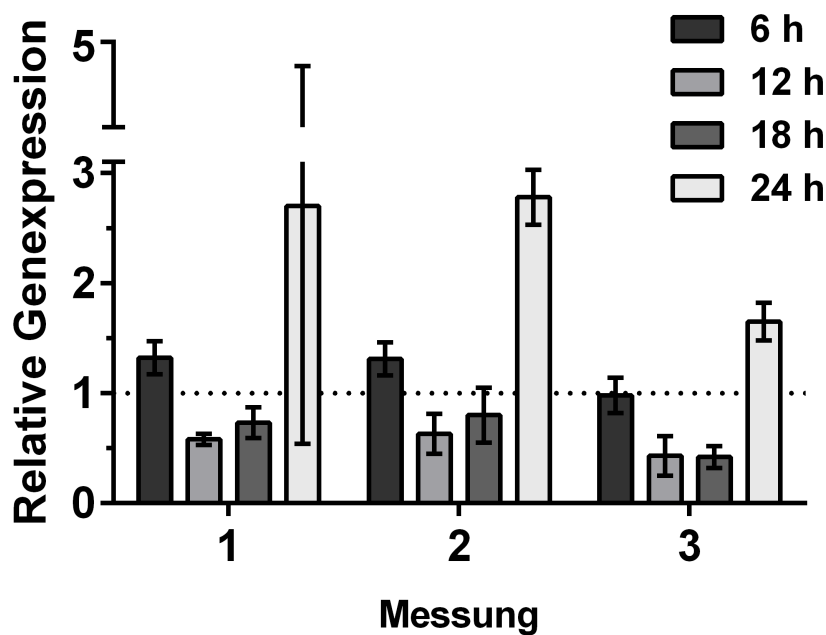


Abb. 4.3: Vergleich der relativen Expression des Referenzgens *gyrB* für die qPCR. Mittels qPCR wurde die Menge an Transkripten in 1  $\mu$ l cDNA über einen DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff ermittelt. Dargestellt ist die Genexpression der *gyrB* relativ zur Expression zum Zeitpunkt  $t=3$  h im zweiten biologischen Replikat. Pro gemessener Mikrotiterplatte (Messung 1 - 3) wurde jeweils ein *gyrB* Standard pipettiert. Dargestellt sind technische Triplikate der einzelnen gemessenen Platten mit Proben.

Neben der Funktion der CHAD Proteine wurde auch durch Isolation der PolyP Granula

untersucht, welche weiteren Proteine an das PolyP Granulum banden. Es wurden Proteine aus verschiedenen zellulären Strukturen und Prozessen identifiziert, darunter ribosomale Proteine und andere Proteine der Translation und Transkription, Proteasen und Chaperone, Zellteilungsproteine, Transporter, Enzyme des Primär- und Sekundärstoffwechsels uvm. Davon wurden etliche als unspezifisch eingestuft durch eine Untersuchung der PolyP Granula Fraktion der *R. eutropha*  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante als Negativkontrolle.

In Tabelle 4.2 wurden ausgewählte, wichtige Proteine, die im Pulldown der PolyP Granula in *R. eutropha* WT identifiziert wurden, mit den Ergebnissen von Tumlirsch und Jendrossek, 2017 verglichen. Dieser trennte das untersuchte Zelllysate nach PolyP Granula Fraktion, Membranfraktion, PHB Granula Fraktion und Cytosolfraktion auf.

Tab. 4.2: Auswahl identifizierter Proteine in der PolyP Granula angereicherten Fraktion

| Gennummer | Annotation  | Vgl. Pulldown Tumlirsch  |
|-----------|---|--------------------------|
| A2437     | PPK1a   | PolyP Fraktion           |
| A1212     | PPK2c   | PolyP Fraktion           |
| A1271     | PPK2d   | PolyP Fraktion           |
| A0104     | PptA  | PolyP Fraktion           |
| B1967     | GTP Cyclohydrolase                                  | PolyP Fraktion           |
| B0702     | konserviertes hypothetisches Protein                | PolyP Fraktion           |
| A2800     | Uncharakterisiertes Protein                         | PolyP Fraktion           |
| B0177     | konserviertes Protein                               | Cytosolfraktion          |
| A1984     | konserviertes Protein                               | PHB- und Cytosolfraktion |
| A3271     | D-Ala-D-Ala Ligase                                  | Cytosolfraktion          |
| A3363     | Endo- $\alpha$ -1,4-Polygalaktosaminidase Vorläufer | Membranfraktion          |
| A0953     | Guanylatkinase                                      | nein                     |
| A3333     | Ribosom-bindende ATPase YchF                        | nein                     |
| A1273     | konserviertes Protein                               | nein                     |
| A0965     | konserviertes Protein                               | nein                     |

Die PPK1a, PPK2c und PPK2d wurden als PolyP assoziiert bestätigt, ebenso PptA. Auch die GTP Cyclohydrolase, Bestandteil des Sekundärmetabolismus, und die zwei uncharakterisierten Proteine B0702 und A2800 wurden sowohl bei Tumlirsch als auch in dieser Arbeit gefunden, teilweise bei Tumlirsch jedoch nicht im PolyP spezifischen Isolat sondern anderen zellulären Fraktionen. In diesen Fällen ist fraglich, ob es sich um ein

spezifisches PolyP assoziiertes Protein handelt. Andere Proteine wie die Guanylatkinase, die in den Nukleotidstoffwechsel involviert ist, wurden bei Tumlirsch nicht entdeckt. Folgende aufgelistete Proteine in Tab. 4.3 wurden bereits mit PolyP in Zusammenhang gebracht, wurden in diesem Pulldown aber nicht gefunden oder auch als unspezifisch in der Negativkontrolle identifiziert.

Tab. 4.3: Fehlende Proteine im PolyP Granula Pulldown von *R. eutropha* WT oder als unspezifisch deklarierte Proteine aufgrund hoher Abundanz in der Negativkontrolle.

| nicht gefunden |            | unspezifisch identifiziert |   |
|----------------|------------|----------------------------|---|
| Gennummer      | Annotation | Gennummer                  | Annotation                                    |
| B1019          | PPK1b      | A2335                      | Glutaminsynthetase A1                         |
| A0226          | PPK2a      | A1485                      | Lon Protease                                  |
| A0997          | PPK2b      | A2274                      | PhaX  |
| A1979          | PPK2e      | A0527                      | PhoH  |
| A2436          | PPX        | A1185                      | CTP Synthase                                  |
| B1017          | PptB       | A3108                      | Metalloregulation DNA-bindendes Stressprotein |
|                |            | A3178                      | H1 Histon-ähnliches Protein (Ala-/Lys-reich)  |

PPK1b, PPK2a, PPK2b und PPX wurden schon von Tumlirsch, 2017 als nicht PolyP gebunden eingestuft und hier bestätigt. eYFP-PPK2e kolokalisierte dennoch in vivo mit DAPI gefärbten PolyP Granula, weshalb es als PolyP Bindeprotein benannt wurde. Damit verhält es sich wie PptB, das in den Pulldowns nicht gefunden wurde, aber mit eYFP fusioniert und im Plasmidsystem überexprimiert mit PolyP colokalisiert. Die Proteine A3108 und A3178 waren bei Tumlirsch als PolyP gebunden angegeben, wurden hier als falsch positiv eingestuft. PhoH und CTP Synthase (A1185) wurden als nicht spezifisch assoziiert bestätigt. Somit wurden diverse Proteine aus dem PolyP Proteom ausgeschlossen, was jedoch trotzdem bedeuten kann, dass sie mit PolyP zu tun haben, z.B. als Signalmolekül für den zellulären Phosphatbedarf oder Regulator des PolyP Metabolismus, z.B. durch Bindung an PPKs oder PPX und Änderung ihrer Aktivität.

Das PolyP Proteom von *R. eutropha*  $\Delta$ *pptA* war gegenüber dem WT moderat verändert. Zunächst wurden alle PPKs mit mehr Fragmenten gefunden als im WT und zusätzlich die PPK2a, die im WT löslich vorlag (Tumlirsch, 2017). Einige Proteine, wie Endo- $\alpha$ -1,4-Polygalaktosaminidase Vorläufer (A3363), Ribosom-bindende ATPase YchF (A3333) oder Guanylatkinase (A0953) kamen in der  $\Delta$ *pptA* Mutante nicht vor. Dies spricht für

eine Bindung dieser Proteine an PolyP über PptA. Andere Proteine, darunter verschiedene Transkriptionsregulatoren, kamen ausschließlich in der PolyP Granula Fraktion der  $\Delta pptA$  Mutante vor, möglicherweise als Kompensation des Verlustes von PptA. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine Funktion von PolyP bzw. PptA bei der Transkription.

Die GlnA1, die als Interaktionspartner von PptA durch Tumlirsch, 2017 und in dieser Arbeit verifiziert wurde, lag beim Pulldown auch in der PolyP-freien Mutante und damit unspezifisch vor. Als Enzym des Aminosäurestoffwechsels liegt es womöglich häufig in der Zelle vor und wurde unspezifisch an Strukturen gebunden isoliert, die bei der Zentrifugation pelletiert wurden. Auf die GlnA1 wird im nächsten Abschnitt gesondert eingegangen. Die Lon Protease wurde in *R. eutropha* im WT mit nur zwei Peptiden in der PolyP Granula Fraktion gefunden, während in der Negativkontrolle neun Fragmente identifiziert wurden und in der  $\Delta pptA$  Mutante sogar 21. Die Datenlage spricht für eine unspezifische Detektion oder geringfügige Bindung der Lon Protease in *R. eutropha* WT, wohingegen in der  $\Delta pptA$  Mutante eine spezifische Interaktion denkbar ist. Dies müsste durch eine Lokalisationsstudie mit Fluoreszenzmikroskopie in *R. eutropha*  $\Delta pptA$  überprüft werden. Die Lon Protease in *E. coli* ist spezifisch aktiv im Komplex mit PolyP (Kuroda *et al.*, 2001). Vielleicht findet die Bindung der Lon Protease in *R. eutropha* WT mit kurzkettigem PolyP oder löslichem PolyP statt, das im Pulldown vielleicht nicht in der PolyP Granula Fraktion landete, während Lon in der  $\Delta pptA$  Mutante an das PolyP Granulum band. Das starke Vorkommen von Lon in der Granulafraktion in der  $\Delta pptA$  Mutante könnte wiederum einer Kompensation geschuldet sein.

## 4.6 Die Struktur und Funktion der GlnA1 in *R. eutropha*

In *R. eutropha* wurde die GlnA1 über Interaktion mit PptA als PolyP assoziiert identifiziert durch Pulldown zellulärer Proteine mit eYFP-PptA oder eYFP-GlnA1 als Köder (Tumlirsch, 2017), Fluoreszenzmikroskopie fluoreszenzmarkierter GlnA1 (Tumlirsch, 2017) und bac2hybrid Assay. Neben den spezifischen Nachweisen der Interaktion wie im bac2hybrid wurde die GlnA1 auch unspezifisch in der Negativkontrolle des Pulldowns der PolyP Granula gefunden. Da die GlnA ein häufiges cytoplasmatisches Protein darstellt, z.B. 1-2 % des gesamten löslichen Proteins in *E. coli* (Luo *et al.*, 2005), war es wichtig, über verschiedene Methoden eine rein unspezifische Bindung auszuschließen. Nach Verifizierung dieser Ergebnisse ergab sich die Frage, zu welchem Zweck eine annotierte Glutaminsynthetase am PolyP Granulum lokalisiert ist. Über PptA gibt es am Phosphatosom eine potentielle Schnittstelle zwischen dem Phosphat- und Stickstoffstoffwechsel. Zur Erweiterung des Verständnisses des zellulären Netzwerks wurden daraufhin Interaktionspartner von GlnA1 mittels Pulldown von Proteinen aus Zelllysate von *R. eutropha* WT,  $\Delta pptA$  und der  $\Delta ppk-all$  Mutante mit eYFP-GlnA1 als Köder identifiziert.

Da die Negativkontrolle in Form eines Pulldowns mit eYFP allein fehlte, wurde ersatzweise die Kontrolle von Tumlirsch, 2017 als Anhaltspunkt verwendet, die allerdings den Zeitpunkt  $t=10$  h darstellt und daher nur tendenziell aussagekräftig ist. Darin waren viele ribosomale Proteine sowie Proteine der Translation und Transkription enthalten, z.B. Untereinheiten der RNA-Polymerase, sowie verschiedene Transporter, Chaperone und Enzyme, die als unspezifisch deklariert wurden.

In allen drei *R. eutropha* Stämmen wurden verschiedene Enzyme des Stickstoffstoffwechsels als Interaktionspartner der GlnA1 identifiziert, z.B. eine Lysin/Ornithin N-Monooxygenase (B1680), außerdem auf dem Chromosom in Nachbarschaft befindliche drei nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (B1685-B1687) und ein nicht-ribosomale Peptidsynthetase-verwandtes Protein (B1683). Zwar wurde in der Negativkontrolle von Tumlirsch auch eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase (A1687) identifiziert, da aber alle Proteine dieses Operons mit eYFP-GlnA1 geködert wurden, ist eine spezifische Interaktion vermutlich trotzdem gegeben. Daneben wurde im Pulldown mit eYFP-GlnA1 mit Zelllysate von *R. eutropha* WT das regulatorische Protein PII (A0750) als bekannter Interaktionspartner von GlnA Enzymen (Forchhammer, 2007) identifiziert. PII fördert die Adenylylierung und damit Inaktivierung von GlnA. Bei niedriger Glutaminkonzentration in der Zelle wird PII uridylyliert und aktiviert die Deadenylylierung von GlnA, was mit einer Aktivitätssteigerung einhergeht (Arcondeguy *et al.*, 2001). Im eYFP-GlnA1 Pulldown mit Zelllysate der  $\Delta pptA$  und  $\Delta ppk-all$  Mutante fehlte PII dagegen. Dies könnte dafür sprechen, dass die Bindung von PptA an GlnA1 am PolyP Granulum an der Regulation der Enzymaktivität von GlnA1 beteiligt ist. Auch die PII Uridylyltransferase, die die Aktivität von PII reguliert (Forchhammer, 2007), wurde als GlnA1 Interaktionspartner gefunden, nicht jedoch in der  $\Delta ppk-all$  Mutante. Dies bestärkt die Vermutung, dass PolyP im weiteren Sinne an der Regulation der GlnA1 Aktivität beteiligt ist. Da die GlnA eine wichtige Rolle im Aminosäurestoffwechsel spielt, ist davon auszugehen, dass eine Fehlregulation der Aktivität, z.B. durch das Fehlen von PolyP, zu erheblichen Defiziten führt. Jedoch zeigten weder die  $\Delta ppk-all$  Mutante noch die  $\Delta pptA$  Mutante Schwierigkeiten beim Wachstum in aminosäurefreiem Schlegel-MSM. Daher ist vermutlich die Regulation von GlnA1 auch in diesen beiden Mutanten gewährleistet. Außerdem ist die GlnA1 möglicherweise nicht ausschließlich am PolyP Granulum lokalisiert, sodass man zwischen PolyP gebundener GlnA1 und cytosolischer GlnA1 unterscheiden müsste. Lokalisationsstudien gab es nur mit Überexpression von eYFP-GlnA1 oder mCherry-GlnA1, das immer fokussiert in *R. eutropha* vorlag in Kolo-kalisation mit PptA am PolyP Granulum bzw. am Zellpol (Tumlirsch, 2017). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass natives GlnA1 ohne eYFP-Markierung bei natürlicher Expressionsrate in vivo teilweise löslich vorliegt.

Weiterhin wurden mehrere Proteine aus dem Phosphatstoffwechsel an GlnA1 gebunden gefunden: das bereits bekannte PptA, das phosphatmangelinduzierte Protein PhoH sowie eine PhoH-verwandte ATPase, Lon-Protease und der putative Phosphattransportregula-

tor PhaX. Letzterer war wiederum nur in *R. eutropha* WT an GlnA1 gebunden. Es ist bekannt, dass eine Deletion von *phaX* zu einer verstärkten PolyP Akkumulation führt, womöglich durch eine erhöhte Aufnahme von Phosphat aus der Umgebung und Speicherung des Phosphatüberschusses als PolyP (Tumlirsch *et al.*, 2015). Warum PhaX nur in *R. eutropha* WT an GlnA1 gebunden war, ist unklar. Möglich ist eine ausbleibende Expression von *phaX* in den Mutanten. Da PhaX selbst nicht an das PolyP Granulum assoziiert vorliegt, kann eine fehlende Plattform für die Interaktion ausgeschlossen werden. PhoH wurde zwar im WT und  $\Delta pptA$  im eYFP-GlnA1 Pulldown nur mit einem Peptid gefunden, dessen spezifische Interaktion mit GlnA1 wurde aber mittels bac2hybrid bestätigt. In der  $\Delta ppk-all$  Mutante war PhoH dagegen nicht an GlnA1 gebunden. Das kann daran liegen, dass PhoH nur geringfügig in der Zelle vorlag und in der  $\Delta ppk-all$  Mutante kein spezifisches Fragment identifiziert werden konnte. Möglich ist auch eine veränderte Genexpression von *phoH* in Abwesenheit von PolyP. Die PhoH-verwandte ATPase wurde auch in der Negativkontrolle gefunden und könnte damit falsch positiv sein.

Für die Lon-Protease könnte GlnA1 ein Substrat darstellen oder wiederum ein falsch positiver Treffer sein. Falls es ein spezifisches Substrat sein sollte, wäre hier wieder ein Hinweis gegeben, dass die Bindung der Lon-Protease an seine Substrate in *R. eutropha* unabhängig von PolyP erfolgen kann, da Lon auch im eYFP-GlnA1 Pulldown der  $\Delta ppk-all$  Mutante vorlag.

Durch die Untersuchungen des Proteoms des PolyP Granulums ergaben sich neue Erkenntnisse zum Phosphatosom, die in den letzten beiden Abschnitten zusammengefasst und diskutiert wurden. In Vielem wurde das Modell des Phosphatosoms von Tumlirsch, 2017 (siehe Abb. 1.2) bestätigt, aber auch einige gegensätzliche Ergebnisse erzielt und erweiterte Kenntnisse errungen. In Abb. 4.6 ist das veränderte Modell des Phosphatosoms auf Grundlage von Tumlirsch, 2017, wie es sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergibt, dargestellt.



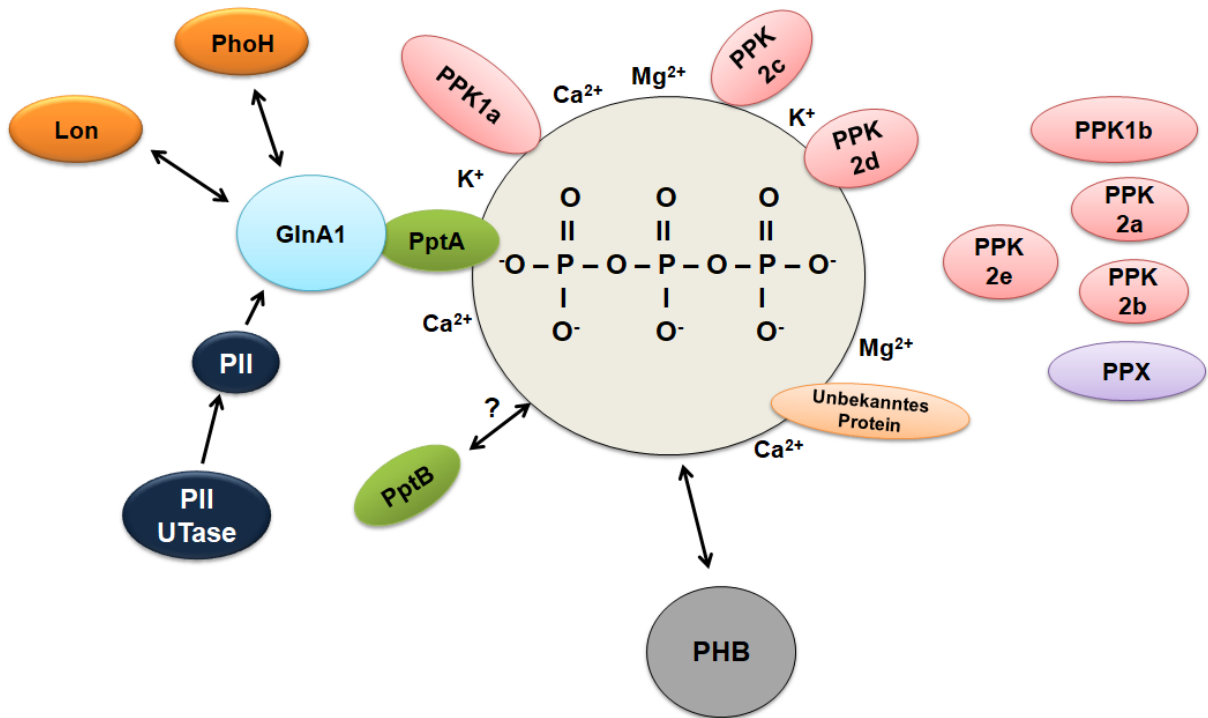


Abb. 4.4: Aktualisiertes Schema des Phosphatosoms in *R. eutropha*. Das PolyP Granulum (grau) ist mit der PPK1a, PPK2c und PPK2d als metabolische Enzyme (rot) assoziiert. Metallionen sorgen für einen Ladungsausgleich. Das CHAD Protein PptA (grün) bindet spezifisch an PolyP und interagiert auch mit der GlnA1. Diese wird von PII und der PII UTase in seiner Aktivität reguliert. GlnA1 interagiert auch mit der Lon Protease und dem phosphatmangelinduzierten Protein PhoH. Es binden noch weitere, nicht identifizierte oder charakterisierte Proteine (orange) an das PolyP Granulum. Das zweite CHAD Protein PptB (grün) liegt nicht assoziiert am Granulum vor, ebenso die PPK1b, PPK2a, PPK2b und PPK2e sowie die PPX (lila). Der PolyP und PHB Stoffwechsel stehen miteinander in Zusammenhang.

Eine Überschneidung des Phosphat- und Stickstoffstoffwechsels ist auf Transkriptionsebene gut untersucht. In *E. coli* werden bei Phosphatlimitierung Gene für die Stickstoffassimilation reprimiert, bei Stickstofflimitierung werden *phoB* und andere Mitglieder des Pho Regulons, das für die Regulation der phosphatabhängigen Gene zuständig ist, verstärkt exprimiert (Santos-Beneit, 2015). Dies ist sinnvoll, da beide Nährstoffe essentiell sind und nur gemeinsam Wachstum ermöglichen. In *S. coelicolor* bindet nicht nur der Transkriptionsregulator GlnR an die Promoterregionen von stickstoffabhängigen Genen wie *glnA* oder *amtB*, einem Ammoniumtransporter, sondern auch kompetitiv der Phosphatstoffwechselregulator PhoP, der bei Phosphatmangel exprimiert wird. Das führt zur Repression der stickstoffabhängigen Gene durch PhoP. Andersherum band GlnR jedoch nicht an Pho-abhängige Promotoren (Sola-Landa *et al.*, 2013). Dies führt zu einer gemeinschaftlichen Regulation der Stickstoff- und Phosphatassimilation. Auch ein Zusam-

menhang zwischen Stickstoff und dem PolyP Stoffwechsel ist bekannt: In Cyanobakterien findet eine PolyP Akkumulation bei stickstoffgehungerten Zellen statt, das bei erneuter Verfügbarkeit von Stickstoff wieder abgebaut wurde (Sanz-Luque *et al.*, 2020). Vermutlich wurde bei Stickstoffmangel das Wachstum eingestellt und vorhandenes ATP oder Phosphat in Form von PolyP zwischengespeichert, bis wieder Wachstum möglich war.

Im Pulldown mit der eYFP-GlnA1 wurden weitere Hinweise auf eine Schnittstelle des Stickstoff- und Phosphatstoffwechsels auf Proteinebene an der GlnA1 gefunden. Diese betrafen zum Einen die Regulation der Enzymaktivität durch PII, das nur in *R. eutropha* WT an GlnA1 gebunden war, andererseits die Bindung von Proteinen aus dem Phosphatstoffwechsel (PptA, PhoH und PhaX). Somit könnte die Lage der GlnA1 am PolyP Granulum ein Punkt der gemeinschaftlichen Regulation beider Stoffwechselwege sein.

Des Weiteren wurde die Struktur und Funktion der GlnA1 untersucht. Basierend auf seiner Primärstruktur im Vergleich mit gut untersuchten GlnAs wurde sie bioinformatisch den Typ-I-Glutaminsynthetasen zugeordnet, die in Bakterien am häufigsten vorkommende Glutaminsynthetase (Forchhammer, 2007) mit putativen Bindestellen für ATP und Ammonium im aktiven Zentrum sowie einer Adenylylierungsstelle zur Aktivitätsregulation (UniProt Datenbank).

Eine *in vitro* Strukturanalyse mit rekombinantem 10xHis-GlnA1 durch SEC-MALS ergab die Bildung einer Vielzahl von Oligomeren bis etwa 26mere. Üblicherweise bildet die GlnA eine doppelte Hexamerringstruktur (Forchhammer, 2007). Bei der Trennung der 10xHis-GlnA1 Probe befand sich das Dodekamer in einem polydispersen Bereich und konnte nicht aufgelöst werden. Das berechnete 26-mer könnte zwei Dodekamere darstellen mit einem ungenau berechneten Molekulargewicht aufgrund der Kalibrierung der SEC-Säule oder einem zu breiten Lichtstreuungssignal. Somit handelte es sich bei diesem Interaktionspartner von PptA, soweit untersucht, um eine typische Typ-I-GlnA.

Die denaturierende SDS-PAGE lieferte ein apparentes Molekulargewicht von etwa 63 kDa und war damit höher als das für GlnA1 aus der Primärstruktur berechnete Molekulargewicht von 55 kDa, möglicherweise durch unvollständige Entfaltung mit abweichendem Migrationsverhalten oder tatsächlich höherem Molekulargewicht durch posttranslationale Modifikationen (Abb. 4.5).

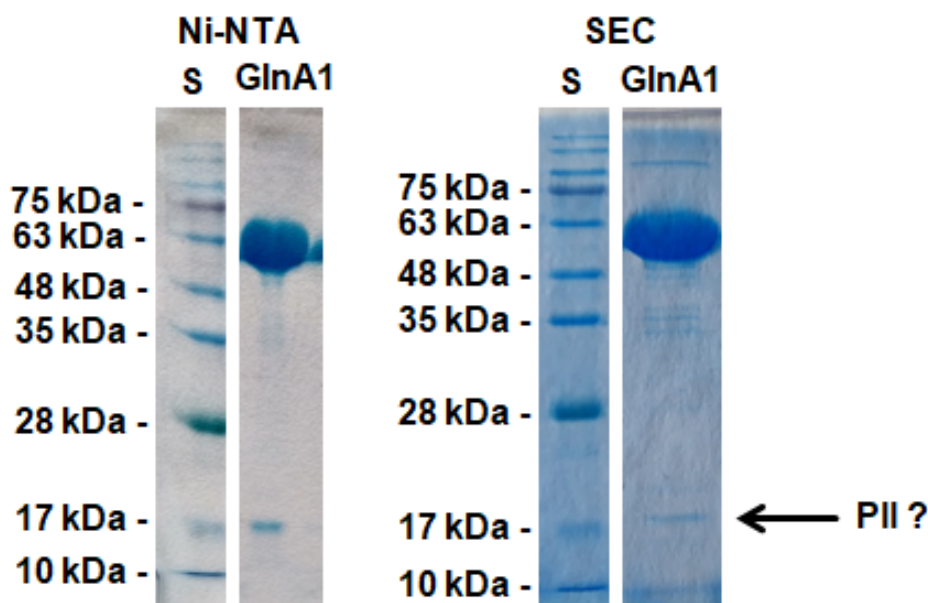


Abb. 4.5: Analyse des Molekulargewichts von rekombinantem *R. eutropha* 10xHis-GlnA1 mittels SDS-PAGE. Rekombinant in *E. coli* BL21(DE3)pLysS pET16b-*glnA1* exprimiertes 10xHis-GlnA1 wurde über eine Ni-NTA Säule affinitätschromatographisch isoliert und über eine SEC-Säule (Superdex Increase prepgrade) weiter gereinigt. 5  $\mu$ l mit 400 mM Imidazol eluierte Fraktion wurden mit 10  $\mu$ l 3x Laemmli-Puffer für 5 min bei 95 °C denaturiert und in einem 12 % SDS-PA-Gel aufgetrennt. Ein Protein-Standard (S) wurde für jedes Gel mitgeführt. Die Proteine wurden mit colloidalem Coomassie gefärbt und die Gele mit H<sub>2</sub>O entfärbt.

Mit einem Reporterenzym-gekoppelten in vitro Enzymaktivitätsassay (siehe Abschnitt 2.6.13) wurde die Umsetzung von Glutamat zu Glutamin durch rekombinantes 10xHis-GlnA1 nachgewiesen mit einer spezifischen Aktivität von  $15 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}}$ . Die *E. coli* GlnA hat mit etwa  $60 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}}$  eine viermal höhere spezifische Aktivität (Kingdon *et al.*, 1967). In deren Arbeit wurde auch adenylylierte *E. coli* GlnA getestet mit verminderter Aktivität von nur  $2,2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}}$ . Somit könnte die rekombinante 10xHis-GlnA1 aus *R. eutropha* eine ebenso hohe spezifische Aktivität haben wie aus *E. coli*, während im hier durchgeführten Aktivitätsassay teils adenylylierte GlnA1 mit eingeschränkter Aktivität vorlag. Möglich ist auch, dass die Versuchsbedingungen suboptimal waren für die *R. eutropha* GlnA1 und sie in vivo ähnlich aktiv ist wie die *E. coli* GlnA. Zusätzlich unterliegt GlnA neben der Adenylylierung zur Hemmung der Aktivität auch einer Regulation durch PII Proteine. Möglich wäre eine Isolation von 10xHis-GlnA1, das im *E. coli* Expressionsstamm schon hinlänglich seiner Aktivität reguliert wurde durch kovalente Adenylylierung. Möglich ist auch eine Koisolation der rekombinanten 10xHis-GlnA1 mit *E. coli* PII Protein über die Ni-NTA Säule, wenn eine starke Bindung besteht. In der SDS-PAGE der Elutionsfraktion wurde eine Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 17 kDa

detektiert, das PII darstellen könnte (etwa 12 kDa) und selbst bei Reinigung über eine SEC-Säule noch geringfügig vorhanden war (siehe Abb. 4.5). Falls es sich tatsächlich um *E. coli* PII handelt, ist bei einer so spezifischen Bindung an die *R. eutropha* GlnA1 auch eine Übernahme der regulatorischen Funktion des *E. coli* PII Proteins möglich.

Wie bereits für *E. coli* festgestellt wurde, bewirkte eine Zugabe von Aminosäuren eine Hemmung der Aktivität, z.B um 43 % bei 10 mM Glycin (Woolfolk & Stadtman, 1967). In dieser Arbeit führte ein Zusatz von 1 mM Glycin zu einer Reduktion der Aktivität um 58 %. Die Zugabe von strep-PptA führte zu gleichbleibender GlnA1 Aktivität. Dies spricht zunächst gegen eine regulatorische Funktion von PptA. Im Pulldown mit eYFP-GlnA1 als Köder wurde in der  $\Delta pptA$  und  $\Delta ppk-all$  Mutante kein PII als Interaktionspartner festgestellt. So könnte PII im Zusammenspiel mit PptA die Enzymaktivität von GlnA1 regulieren. Beim in vitro Glutaminsynthetaseaktivitätsassay war keine Regulation der Aktivität durch PptA messbar. Das kann einerseits bedeuten, dass PptA keinen Einfluss darauf hat oder dass es nur indirekt an der Regulation beteiligt ist mit PII als ursächlichem Regulator und PptA oder PolyP als Modulator. PII müsste als zusätzlicher Parameter in den Assay integriert werden.

Die Lokalisation von GlnA1 am PolyP Granulum kann der Regulation seiner Aktivität dienen zur Anpassung der Zelle an PolyP akkumulierende Bedingungen. Zusätzlich wäre es möglich, dass die GlnA1 dort angelagert ist, weil durch den Abbau von PolyP durch die PPKs ATP zur Verfügung gestellt werden kann für die Reaktion der GlnA1.

Nachdem der Einfluss der CHAD Proteine PptA und PptB auf den PolyP Metabolismus und das Netzwerk von PolyP assoziierten Proteinen mit anderen zellulären Proteinen untersucht wurde, sollte zum Abschluss der Einfluss von PolyP oder dem assoziierten Protein PptA auf andere zelluläre Strukturen abseits der Proteine betrachtet werden sowie die Struktur von PolyP selbst.

## **4.7 Zelluläre Struktur von *R. eutropha* mit Bezug auf PolyP und PptA**

Um einen Überblick über die Gesamtheit der zellulären Strukturen in An- und Abwesenheit von PolyP bzw. PptA zu erreichen, wurde eine Analyse mit Raman-Spektroskopie gewählt. Zunächst wird auf die technischen Möglichkeiten und Begrenzungen der Methode eingegangen, um die Aussagekraft der Ergebnisse hervorzuheben und anschließend die Ergebnisse im biologischen Kontext diskutiert.

Der Vorteil der Raman-Spektroskopie ist, dass sie schnell, weder destruktiv noch invasiv ist und im wässrigen System durchgeführt werden kann, da H<sub>2</sub>O selbst kaum Raman-aktiv ist (Tao *et al.*, 2016). Dadurch kann die Probe weitestgehend im nativen Zustand gemessen

werden. Mit Raman-Spektroskopie wird die Raman-Streuung von Licht an allen Molekülen in der Zelle simultan gemessen und damit ein umfangreicher Informationsgehalt erlangt. Die Schwierigkeit der Methode besteht darin, die Fülle an Signalen den angeregten Atombindungen zuzuordnen. Für jedes Molekül ergibt sich ein spezifisches Raman-Spektrum. Dieses beinhaltet Peaks der verschiedenen Atombindungen bei definierten Wellenzahlen mit spezifischer Signalintensität, das auch die Differenzierung strukturell ähnlicher Moleküle zulässt (De Gelder *et al.*, 2007). Bei der chemisch überaus komplexen Probe einer ganzen Zelle überlagern Signale teilweise und nur Moleküle, die in großer Menge vertreten sind oder sehr starke Signale liefern, können identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden die gemessenen Spektren von *R. eutropha* Zellen und synthetischem PolyP mit publizierten Daten anderer Gruppen verglichen. Es sind Raman-Spektren bereitgestellt von vielen biologisch relevanten Molekülen (De Gelder *et al.*, 2007) ebenso wie Messungen von *R. eutropha* Zellen (De Gelder *et al.*, 2009; De Gelder *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2016). Auch wurden Messungen von gemischten Zellkulturen im EBPR-Prozess von Majed und Gu, 2010 erbracht mit besonderem Augenmerk auf die Identifizierung und Quantifizierung der Biopolymere PolyP, PHB und Glykogen in PolyP akkumulierenden Organismen (PAOs). Damit wurde die Raman-Spektroskopie von anderen Gruppen bereits erfolgreich für die Analyse von *R. eutropha* Zellen sowie PolyP eingesetzt und war vielversprechend für die angestrebte Ganzzellanalyse von *R. eutropha* in An- und Abwesenheit von PolyP oder PptA.

Mittels Raman-Spektroskopie konnte in der vorliegenden Arbeit PolyP in einem *R. eutropha* Stamm mit *ppk2c* Überexpression (Hildenbrand *et al.*, 2020; Tumlirsch & Jendrossek, 2017) detektiert werden über die  $\text{PO}_2^-$  Streckschwingung bei  $1170\text{ cm}^{-1}$ . In *R. eutropha* WT konnte im Bereich  $1165 - 1175\text{ cm}^{-1}$ , der als PolyP spezifisch angegeben ist (Majed & Gu, 2010; Majed *et al.*, 2009), jedoch kein herausragendes Signal bzw. eine deutliche Differenz zu den Signalen in der  $\Delta\text{ppk-all}$  Mutante entdeckt werden. Es wurde nicht explizit überprüft, ob die WT Kultur zum Zeitpunkt der Ernte PolyP besaß, es herrschten jedoch typische Bedingungen für die PolyP Akkumulation (24 h in NB). Vermutlich war die PolyP Konzentration mit rund 0,5-1 % der Zelltrockenmasse im WT zu gering für eine spezifische Detektion. Möglich wäre eine Anreicherung der PolyP Granula oder Gesamt-PolyP Isolation und Messung des konzentrierten Isolats zur allgemeinen Detektion und Abschätzung der Kettenlänge und chemischen Umgebung wie assoziierte Ionen, da je nach chemischer Umgebung die Wellenzahl der Raman-Signale leicht verändert wird. Eine Analyse der PolyP Granula angereicherten Fraktion (Daten nicht gezeigt) ergab eine erhöhte Signalintensität im Bereich von  $1165-1175\text{ cm}^{-1}$  der PolyP-haltigen Stämme im Vergleich zur  $\Delta\text{ppk-all}$  Mutante, aber kein herausragendes Maximum gegenüber anderen Signalen, die zu Proteinen und weiteren, nicht identifizierten Substanzen in dieser Fraktion gehörten. Das isolierte PolyP war zu unsauber für eine spezifische Analyse. Eine Fällung mit Phenol-Chloroform würde die Reinheit der Probe erhöhen, aber unter Umständen auch

Verluste von PolyP mit sich bringen und die native Umgebung, z.B. durch gebundene Kationen, zerstören. Die Präsenz vieler Proteine in der Granulafraktion wurde bereits mittels SDS-PAGE im Zusammenhang mit dem Pulldown der PolyP Granula assoziierten Proteine nachgewiesen. Die Sensitivität der Raman-Mikrospektroskopie war für die Analyse von PolyP in *R. eutropha* zu gering bzw. wäre dazu eine hoch konzentrierte, reine Probe nötig.

Andere häufige Biomoleküle wie Nukleinsäuren, Proteine, Lipide und PHB konnten in den Raman-Spektren der *R. eutropha* Zellen identifiziert werden. Auch Unterschiede zwischen dem WT und den Mutanten wurden verzeichnet. So ergab sich eine geringere Signalintensität in der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante in der Lipidregion um  $1440\text{ cm}^{-1}$ . Hier trugen eine große Anzahl an Fettsäuren wie auch andere Lipide zu den Signalen bei, sodass geschlossen werden konnte, dass im WT aufgrund der höheren Signalintensitäten entweder eine größere Menge der gleichen Lipide vorlag als in der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante oder eine andere Lipidzusammensetzung mit stark Raman-aktiven Lipiden im WT. Eine Analyse der Lipide beider Stämme mit HPLC am DSMZ offenbarte eine erhöhte Menge an Phosphatidylethanolamin im WT. Zusätzlich wurde jeweils in ähnlicher Menge in beiden Stämmen Phosphatidylglycerol und Diphosphatidylglycerol gefunden, die üblicherweise in Vertretern der *Burkholderiaceae* zu finden sind (Sohlenkamp & Geiger, 2016). Diese drei identifizierten Phospholipide stellen nur einen Teil der vorhandenen Membranlipide dar (Sohlenkamp & Geiger, 2016) und zeigen damit kein umfassendes Ergebnis. Eine veränderte Zusammensetzung der Fettsäuren und weiterer Membranlipide ist denkbar. Eine mögliche Interpretation des verringerten Phosphatidylethanolamingehalts in der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante ist, dass dieses Phospholipid durch ein anderes, phosphatfreies Lipid auf Basis von z.B. Diacylglycerol ersetzt wurde, wie Glykolipide oder Ornithinlipide. Letzteres ist zumindest im verwandten Stamm *Ralstonia solanacearum* zu finden (Sohlenkamp & Geiger, 2016). Da die Mutante keine internen Phosphatreserven in Form von PolyP hat, könnten sich die Zellen in einem Zustand des ständigen, latenten Phosphatmangels befinden und Phosphat in Lipiden einsparen zugunsten z.B. von DNA Replikation, Transkription oder NTPs. Dieser Befund passt zu der in dieser Arbeit gezeigten Funktion von PolyP als Phosphatspeicher. Solche Umgestaltung der Zellmembran bei Phosphatmangel von Phospholipiden zu in diesem Falle Glykolipiden ist aus anderen Spezies wie *Agrobacterium tumefaciens* oder *Rhodobacter sphaeroides* bekannt (Sohlenkamp & Geiger, 2016). Durch die Analyse der *R. eutropha* Zellen mit Raman-Spektroskopie wurde erfolgreich ein Phänotyp der  $\Delta ppk$ -*all* Mutante bezüglich ihrer veränderten Zellmembran mit weniger Phosphatidylethanolamin aufgedeckt.

Auch in der  $\Delta pptA$  Mutante wurden veränderte Signalintensitäten zum WT gefunden, insbesondere eine Verringerung im Nukleinsäurebereich um  $789 - 884\text{ cm}^{-1}$ . Eine Beteiligung von PptA bei der Zellteilung bzw. Replikation, die mit einer Änderung des DNA Ge-

halts einhergeht, ist unwahrscheinlich, weil die Mutante keinen Unterschied im Wachstum zeigte. Daher stammen die Signalunterschiede vermutlich von RNA. Dies ist wiederum ein Hinweis, dass PptA eine Rolle bei der Transkription oder Translation spielen könnte. An dieser Stelle könnte weiterführend die Menge und Beschaffenheit der Ribosomen, den größten RNA Strukturen in der Zelle, sowie die tRNAs näher untersucht werden, um die Funktion von PptA aufzudecken. Dennoch gilt auch hier, dass die Änderung der zellulären Struktur funktional nur geringfügige Auswirkungen haben kann, da sonst bereits ein Phänotyp beim Wachstum auffallen würde.

Viele Signale wurden nicht identifiziert. Diese können eine Vielzahl an Molekülen darstellen, darunter sämtliche Kohlenhydrate, Intermediate und Produkte des Primär- und Sekundärstoffwechsels wie Glycerin, Aminosäuren oder auch Moleküle wie Häm und Vitamine. Mit anderen Messmethoden könnten auch diese Moleküle identifiziert werden und ein detaillierter Überblick über den metabolischen und strukturellen Zustand der Zellen zustande kommen. Dabei könnten wiederum feine phänotypische Unterschiede in den Mutanten zutage treten.

#### 4.8 Struktur von PolyP in *R. eutropha*

Die Struktur von PolyP hat maßgeblichen Einfluss auf seine Funktion (Christ *et al.*, 2019; S. Kulaev *et al.*, 2004). Dies betrifft sowohl die Kettenlänge als auch eine mögliche Verzweigung oder Zyklisierung des Biopolymers (I. S. Kulaev & Vagabov, 1983). Untersucht wurde die Struktur von isoliertem PolyP aus *R. eutropha* mit Gelelektrophorese, einem enzymatischen Assay und  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektroskopie. Dabei ergab die spektroskopische Untersuchung von *R. eutropha* WT eine mittlere Kettenlänge von  $n=8$  für isolierte Granula und  $n=10$  für PolyP aus Phenol-Chloroform-Extraktion. Als Vergleich bestand der synthetische S100 PolyP Standard im Mittel aus  $n=14$  Phosphaten. Vom Hersteller angegeben ist eine Kettenlänge von  $n=100$ , wobei aus den PolyP Gelen polydisperses PolyP ersichtlich war. Dennoch erscheint die spektroskopisch gemessene, mittlere Kettenlänge von  $n=14$  für den S100 Standard recht gering. Bei der Probenvorbereitung, dem Lösen in  $\text{D}_2\text{O}$ , und während der Messung selbst kann durchaus Probe degradieren, was zur übermäßigen Detektion von Monophosphat und verkürzten Kettenlängen führt (Wang *et al.*, 2019). Da für den Standard eine deutlich kürzere mittlere Kettenlänge gemessen wurde als vom Hersteller angegeben, ist auch davon auszugehen, dass bei den isolierten Proben aus *R. eutropha* geringere Kettenlängen berechnet wurden als *in vivo* vorlagen. Zusätzlich stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zum Migrationverhalten der Proben im PolyP Gel. PolyP aus *R. eutropha* migrierte generell weniger im Gel als der S100 Standard, was für größere Kettenlängen beim isolierten PolyP spricht. Ohne Zentrifugation der mit orange dye versetzten Proben vor dem Auftragen auf das Gel könnten die Geltaschen mit zel-

lulären Bestandteilen aus der PolyP Granula Anreicherungsfraktion verstopfen und die Auftrennung der Probe im elektrischen Feld behindern. Allerdings ergab die gelelektrophoretische Analyse von in vitro synthetisiertem PolyP bei Hildenbrand *et al.*, 2020 und Frank *et al.*, 2020, ggf. in Abhängigkeit der eingesetzten NTPs ein ähnliches Migrationsverhalten. In diesen Proben lagen nur PolyP, NTPs und 15  $\mu$ M PPK als hochmolekulare Verbindungen vor. Bei der NMR Spektroskopie dagegen war die mittlere Kettenlänge des Standards etwas höher als beim PolyP aus *R. eutropha*.

Die Berechnung der mittleren Kettenlänge durch den enzymatischen Assay erfolgte über eine Kombination des colorimetrischen Sb-Ascorbat Assays zur Bestimmung der Phosphatkonzentration mit dem Kettenkonzentrationsassay. Erster nutzte ScPPX und ScIPP zum vollständigen Verdau von PolyP zu Monophosphat, während letzterer die Probe ausschließlich mit ScPPX verdaute, sodass pro PolyP Kette ein Pyrophosphat übrig blieb, also zwei Monophosphate weniger generiert wurden. Über die Relation der Monophosphatkonzentration zur Pyrophosphatkonzentration wurde die mittlere Kettenlänge berechnet (Christ *et al.*, 2019). Isoliertes PolyP von *R. eutropha* WT lag bei durchschnittlich  $n=97$  Phosphatresten, die  $\Delta pptA\Delta pptB$  Mutante bei  $n=283$  Phosphatresten und war damit um eine Größenordnung höher als bei der  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektroskopie. Für den S100 PolyP Standard wurde mit dieser Methode eine mittlere Kettenlänge von  $n=51$  berechnet, was 3,6 mal mehr ist als das Ergebnis der  $^{31}\text{P}$ -NMR und etwa der Hälfte der vom Hersteller angegebenen Kettenlänge entspricht. Der Budit7 Standard dagegen wurde mit  $n=10$  Phosphatresten berechnet, was dem unteren Limit der Herstellerangaben mit  $10 \leq n \leq 13$  entsprach. Entweder war der S100 Standard schon bei der Synthese bzw. Fraktionierung stark polydispers oder es ist ein Nachweis der Hydrolyse dieses Standards bei Lösung in  $\text{H}_2\text{O}$  und den vorliegenden Assaybedingungen. Die Ergebnisse dieses Assays passen zu denen des PolyP Gels, dass der Budit7 Standard kleiner ist als der S100 Standard und isoliertes PolyP aus *R. eutropha* größer als der S100 Standard. Ein Unterschied zwischen dem isolierten PolyP verschiedener *R. eutropha* Stämme konnte im PolyP Gel nicht aufgelöst werden. Möglich ist durchaus, dass die CHAD Proteine die Kettenlänge beeinflussen. Dennoch bietet die Messung einer einzelnen Probe keine Verlässlichkeit, sodass die in dieser Arbeit berechneten Kettenlängen nur als erster Anhaltspunkt dienen. Zudem lag der Sensitivitätsbereich des Kettenlängenassays zwischen  $2 \leq n \leq 280$  (Christ *et al.*, 2019), sodass die Probe von *R. eutropha*  $\Delta pptA\Delta pptB$  bereits am Maximum lag. Bei sehr langkettigem PolyP wäre dieser Assay wiederum ungeeignet. Der enzymatische Assay detektiert weder verzweigtes noch zyklisches PolyP sowohl bei der Quantifizierung als auch Kettenkonzentrationsbestimmung, da Ultraphosphate und Metaphosphate nicht von der ScPPX verdaut werden können (Christ *et al.*, 2019).

Die Versuche zur Bestimmung der PolyP Kettenlänge sprechen für langkettiges PolyP in *R. eutropha* ab etwa  $n=100$  Phosphatresten.

Aus anderen Organismen sind bereits Kettenlängen von PolyP bekannt, die in Tab. 4.4



zusammengestellt sind.

Tab. 4.4: PolyP Kettenlängen aus verschiedenen Organismen mit Bezug auf verwendete Methoden und Kultivierungsbedingungen. Tit=Endgruppentitration, anearob = wenig O<sub>2</sub>, anoxisch = O<sub>2</sub>-Ausschluss

| Organismus/Bedingung      | n (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )       | Methode                           | Quelle                                |
|---------------------------|--|-----------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 10-16, 124<br>(polydispers)              | <sup>31</sup> P-DOSY-NMR          | Wang <i>et al.</i> , 2019             |
| <b><i>E. coli</i></b>     |  | SEC, Tit.,<br><sup>31</sup> P-NMR | Rao <i>et al.</i> , 1985              |
| exponentiell              | 17, 23, 35, 55, 142                      |                                   |                                       |
| stationär                 | 15, 23, 42, 95, 132,<br>230, 750, > 1000 |                                   |                                       |
| <b>Belebtschlamm</b>      |  | IEX, SEC                          | Müssig-Zufika <i>et al.</i> ,<br>1994 |
| Anaerob                   | 5-40, 40 - >100                          |                                   |                                       |
| Anoxisch                  | 5-40, 40 - >100                          |                                   |                                       |
| Aerob                     | 5-40, 70 - >100                          |                                   |                                       |

In mehreren Untersuchungen wurden mit <sup>31</sup>P-NMR zwei verschiedene PolyP Kettenlängenbereiche in einer Probe gefunden, jeweils ein kurz- bis mittelkettiger sowie ein langkettiger Bereich (Müssig-Zufika *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2019), in der vorliegenden Studie jedoch nur ein kurz-kettiger Bereich. Dafür wurde im enzymatischen Kettenlängenassay langkettiges PolyP gefunden. Entweder liegen in *R. eutropha* auch zwei Bereiche an PolyP Kettenlängen vor, wobei der kurz-kettige und langkettige Bereich im enzymatischen Assay gemittelt ist, oder es liegt in vivo nur langkettiges PolyP vor und bei der NMR Spektroskopie wurde PolyP degradiert.

In *E. coli* wurde eine große Bandbreite an Kettenlängen identifiziert, teilweise abhängig von der angewandten Methode: <sup>31</sup>P-NMR, SEC oder Endgruppentitration. In der exponentiellen Phase lag die Kettenlänge zwischen 17 und 142 Phosphatresten, in der stationären Phase kamen zusätzlich lange Ketten von 230, 750 und > 1000 Phosphatresten vor. Die Kettenlängen von *R. eutropha* sind vergleichbar mit den gefundenen Daten in *C. vulgaris* und dem Bakteriengemisch aus dem Belebtschlamm, einer Mischung verschiedener bakterieller Spezies mit Funktion im EBPR-Prozess. Ob *R. eutropha* wie *E. coli* auch PolyP mit 750 bis über 1000 Phosphatresten besitzt, ist weiterhin unklar.

Die Kettenlänge bedingt die biologische Funktion von PolyP. Insbesondere lange Ketten

mit  $n > 130$  gelten als schützend gegenüber Stressbedingungen, die zu Proteinschäden führen, indem das Biopolymer diese bindet und toxische Aggregate verhindert. Dabei war die Kettenlänge proportional zum Vermögen, hitzegeschädigte Proteine in Lösung zu halten. (Gray *et al.*, 2014) In *R. eutropha* wurde trotz Präsenz von PolyP mit einer Kettenlänge um 100 Phosphatreste keine explizite Schutzwirkung bei Proteinschäden verursachendem Stress aufgedeckt. Kurzkettiges PolyP könnte als Substrat für PolyP abhängige Enzyme dienen. Dazu gehören abgesehen von den metabolischen Enzymen für PolyP, den PPKs und PPX, auch NAD Kinase, AMP:Phosphotransferase, Adenylatkinase, Glukokinase oder 3-Phosphoglyceratkinase (Bark *et al.*, 1993). Einige Gene für solche Enzyme sind auch in *R. eutropha* vertreten. Ob sie exprimiert und tatsächlich PolyP-abhängig sind oder anderweitig Phosphat, z.B. Triphosphate, für ihre Reaktionen nutzen, ist unklar.

Zudem wurde mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR zyklisches PolyP (Metaphosphat) in *R. eutropha* gefunden. In *Xanthobacter autotrophicus* wurde mit der gleichen Methode ebenfalls neben linearem PolyP auch Metaphosphat mit drei bis acht Phosphatresten festgestellt mit einem Anteil von etwa 40 % des Gesamt-PolyPs (Mandala *et al.*, 2020). Auch bei *C. vulgaris* wurde zyklisches PolyP identifiziert (Wang *et al.*, 2019). Bei der Hydrolyse von linearem PolyP, die bei der Extraktion vorkommen kann, kann sich spontan zyklisches PolyP bilden, sodass unklar ist, ob zyklisches PolyP in vivo vorliegt oder artifiziell ist (Wang *et al.*, 2019). Es sind bisher keine metabolischen Enzyme für zyklisches PolyP bekannt. Dennoch wurde in Zelllysats von *X. autotrophicus* zugegebenes synthetisches Hexametaphosphat zu Trimetaphosphat umgewandelt. Dieser Prozess wurde durch Hitzeinaktivierung des Zelllysats unterbunden, was für eine enzymatische Umwandlung des zyklischen PolyPs und Stabilität von Trimetaphosphat in vivo in diesem Organismus spricht (Mandala *et al.*, 2020). Damit scheint die Existenz von zyklischem PolyP in Bakterien möglich zu sein. Ob das gemessene zyklische PolyP in *R. eutropha* nativ oder artifiziell war, ist jedoch nicht klar.

In dieser Arbeit wurde durch zelluläre Strukturaufklärung von *R. eutropha* aufgedeckt, dass die *R. eutropha*  $\Delta ppk$ -all Mutante eine veränderte Zusammensetzung der Membranlipide mit weniger Phosphatidylethanolamin als der WT aufwies. Die  $\Delta pptA$  Mutante zeigte in der Raman-Spektroskopie unspezifische Veränderungen bei den Nukleinsäuren. Die strukturelle Untersuchung von PolyP ergab, dass kurzkettiges PolyP vorlag, das womöglich als Substrat für PolyP-abhängige Enzyme dient und langkettiges PolyP von 97 Phosphatresten im WT bzw. 283 Phosphatresten in der  $\Delta pptA\Delta pptB$  Mutante, die jedoch keinen schützenden Effekt bei proteinschädigenden Stressbedingungen durch Hitze und oxidativen Stress hatten. Es wurde auch zyklisches PolyP detektiert.

## 4.9 Ausblick

In dieser Arbeit wurde der PolyP Metabolismus in *R. eutropha* detailliert beschrieben sowie die Funktion und Struktur von PolyP untersucht. Dennoch bleibt zu klären, welche der sieben PPKs den Metabolismus in vivo steuern und wie ihre Expression und Aktivität reguliert wird. Zusätzlich ist für ein umfassendes Verständnis der Funktion von PolyP als Phosphatspeicher von Bedeutung, welche Substrate die einzelnen PPKs nutzen und welche Produkte entstehen, um den Zusammenhang mit dem Nukleotidstoffwechsel zu verstehen. Auch die Aktivität der PPX sollte in diesem Zusammenhang untersucht werden, vor allem im Rahmen der PolyP Mobilisation in der späten stationären Phase oder bei Phosphatmangel, um zu differenzieren, ob die Zelle das PolyP zur Freisetzung von Monophosphat durch die PPX oder NTP Synthese durch PPKs nutzt. In dem Zusammenhang müsste die Schnittstelle zwischen dem Nukleotid- und dem PolyP Stoffwechsel in vivo untersucht werden, wie es bei Hildenbrand *et al.*, 2020 bereits in vitro begonnen wurde. Zudem muss geklärt werden, welche Kettenlängen die Enzyme synthetisieren, ob es weitere metabolische Enzyme gibt, die verzweigtes oder zyklisches PolyP bilden bzw. als Substrat nutzen und wozu die verschiedenen strukturierten PolyPs ggf. dienen.

Eine weitere Aufklärung der PolyP Kettenlängenverteilung könnte in einem gekoppelten Versuch aus Ionenaustauschchromatographie (IEX), die sich im Rahmen dieser Arbeit in der Etablierung befand, und dem enzymatischen Kettenkonzentrationsassay angegangen werden. Bei der Anionenaustauschchromatographie wird PolyP in einem, üblicherweise NaOH oder KOH, Gradienten nach seiner negativen Ladung aufgetrennt (Ohtomo *et al.*, 2008; Sekiguchi *et al.*, 2000). Pro Phosphatrest steigt die negative Ladung des Polymers um 1, sodass die Elution von Monophosphat bis zu langkettigem PolyP fraktioniert werden kann. Für das fraktionierte PolyP kann mit dem kombinierten Sb-Ascorbat Assay und Kettenkonzentrationsassay die jeweilige mittlere Kettenlänge bestimmt werden, sodass ein detaillierter Überblick über die Verteilung der Kettenlängen in *R. eutropha* möglich ist. So kann auch untersucht werden, ob Deletionsmutanten einzelner *ppks* oder der Phosingene zu Veränderungen der Kettenlänge führen. Schwierigkeiten bereitet noch, dass hochkonzentrierte Proben eingesetzt werden müssen, damit kleine Fraktionsvolumina für eine hohe Auflösung genommen werden können, in denen eine ausreichende Phosphatkonzentration vorliegt, um die beiden enzymatischen, analytischen Assays durchführen zu können.

Neben der Funktion von PolyP als Phosphatspeicher sind weitere Funktionen in *R. eutropha* denkbar, wie DNA Replikation, bekannt in *S. cerevisiae* (Bru *et al.*, 2016), Zellzykluskontrolle, wie es bereits in *P. aeruginosa* (Racki *et al.*, 2017) bekannt ist oder Transkriptionsregulation wie in *E. coli* (Brown & Kornberg, 2008) oder *H. pylori* (Yang *et al.*, 2010). Auch die Funktionen der PolyP assoziierten Proteine sollten weiter aufgeklärt werden, insbesondere die Hinweise auf eine Beteiligung bei der Transkription oder Translation über das CHAD-Protein PptA. Völlig unbekannt ist bisher neben der Regu-

lation des PolyP Metabolismus auch die Art, wie die Größe, Anzahl und Verteilung der PolyP Granula zustande kommt. In *P. aeruginosa* ist das PolyP assoziierte Protein AlgP, ein H1-ähnliches Protein, für die gleichmäßige Granulaverteilung verantwortlich (Chawla *et al.*, 2021).

Um die zellulären Funktionen im Großen Ganzen der zellulären Einheit zu verstehen, sollten auch Zusammenhänge zwischen PolyP und dem Stickstoffstoffwechsel sowie dem PHB Stoffwechsel weiter untersucht werden. Dazu ist eine Aufklärung der Funktion und Interaktionsstrukturen der PolyP assoziierten Proteine nötig, um folgende offenen Fragen zu beantworten: Wie funktioniert die Kompensation des fehlenden PolyP in der  $\Delta ppk-all$  Mutante, die unter vielen Bedingungen keinen offensichtlichen Phänotyp zeigt. Dazu wären auch Übersicht schaffende Ganzzelluntersuchungen nötig wie Messung der Nukleotidlevel, Genexpressionsprofile von *ppks*, Transkriptomanalysen bzw. Metabolomanalysen. Letztere könnten Aufschluss darüber geben, ob PolyP einen direkten Einfluss auf den Stickstoffstoffwechsel hat und wie die  $\Delta ppk-all$  Mutante ggf. den Mangel an PolyP kompensiert für normales Wachstum.

## Literatur

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2012). *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie* (4. Auflage). Wiley-VHC, Weinheim.
- Albi, T., & Serrano, A. (2016). Inorganic polyphosphate in the microbial world . Emerging roles for a multifaceted biopolymer. *World Journal of Microbiological Biotechnology*, *32*(27).
- Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev*, *54*(4), 450–472.
- Andrews, S. C. (1998). Iron storage in bacteria. *Adv Microb Physiol*, *40*, 281–351.
- Angelova, P. R., Agrawalla, B. K., Elustondo, P. A., Gordon, J., Shiba, T., Abramov, A. Y., Chang, Y. T., & Pavlov, E. V. (2014). In situ investigation of mammalian inorganic polyphosphate localization using novel selective fluorescent probes JC-D7 and JC-D8. *ACS Chemical Biology*, *9*(9), 2101–2110.
- Aragno, M., Walther-Mauruschat, A., Mayer, F., & Schlegel, H. G. (1977). Micromorphology of Gram-negative hydrogen bacteria. I. Cell morphology and flagellation. *Archives of Microbiology*, *114*, 93–100.
- Arcondeguy, T., Jack, R., & Merrick, M. (2001). PII Signal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control. *Bicriobiology and Molecular Biology Reviews*, *65*(1), 80–105.
- Aschar-Sobbi, R., Abramov, A. Y., Diao, C., Kargacin, M. E., Kargacin, G. J., French, R. J., & Pavlov, E. (2008). High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach. *Journal of Fluorescence*, *18*(5), 859–866.
- Bachmann, B. J. (1972). Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriological Reviews*, *36*(4), 525–557.
- Bark, K., Kämpfer, P., Sponner, A., & Dott, W. (1993). Polyphosphate-dependent enzymes in some coryneform bacteria isolated from sewage sludge. *FEMS Microbiology Letters*, *107*, 133–138.
- Bettendorff, L., & Wins, P. (2013). Thiamine triphosphatase and the CYTH superfamily of proteins. *FEBS*, *280*(24), 6443–6455.
- Beyer, H. M., Gonschorek, P., Samodelov, S. L., Meier, M., Weber, W., & Zurbriggen, M. D. (2015). AQUA cloning: A versatile and simple enzyme-free cloning approach. *PLOS ONE*, *10*(9), 1–20.

- Binnewies, M., Jäckel, M., Willner, H., & Rayner-Canham, G. (2011). *Allgemeine und Anorganische Chemie* (2. Auflage). Spektrum Verlag, Heidelberg.
- Birke, J., Röther, W., & Jendrossek, D. (2015). Latex Clearing Protein (Lcp) of *Streptomyces* sp. Strain K30 Is a b-Type Cytochrome and Differs from Rubber Oxygenase A (RoxA) in Its Biophysical Properties. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(11), 3793–3799.
- Blum, M., Chang, H.-Y., Chuguransky, S. R., Grego, T., Kandasamy, S., Mitchell, A. L., Nuka, G., Paysan-Lafosse, T., Qureshi, M., Raj, S., Richardson, L. J., Salazar, G. A., Williams, L., Bork, P., Bridge, A. J., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Marchler-Bauer, A., ... Finn, R. D. (2021). The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, *49*, D344–D354.
- Bresan, S., & Jendrossek, D. (2017). New Insights into PhaM-PhaC-Mediated Granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(12), 1–14.
- Bresan, S., Sznajder, A., Hauf, W., Forchhammer, K., Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2016). Polyhydroxyalkanoate PHA Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports*, *6*(26612).
- Brown, M. R. W., & Kornberg, A. (2004). Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(46), 16085–16087.
- Brown, M. R. W., & Kornberg, A. (2008). The long and short of it – polyphosphate, PPK and bacterial survival. *Trends in Biochemical Sciences*, *33*, 284–290.
- Bru, S., Jimenez, J., Canadell, D., Arino, J., & Clotet, J. (2016). Improvement of biochemical methods of polyP quantification. *Microbial Cell*, *4*(1), 6–15.
- Chatterji, D., & Ojha, A. K. (2001). Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Molecular Biophysics*, *4*, 160–165.
- Chawla, R., Klupt, S., Patsalo, V., Williamson, J. R., & Racki, L. R. (2021). The Histone H1-like protein AlgP facilitates even spacing of polyphosphate granules in *Pseudomonas aeruginosa*. *BioRxiv*.
- 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.
- Christ, J. J., Willbold, S., & Blank, L. M. (2019). Polyphosphate Chain Length Determination in the Range of Two to Several Hundred P- Subunits with a New Enzyme Assay and <sup>31</sup>P-NMR. *Analytical Chemistry*, *91*, 7654–7661.
- Christ, J. J., Willbold, S., & Blank, L. M. (2020). Methods for the Analysis of Polyphosphate in the Life Sciences. *Analytical Chemistry*, *92*, 4167–4176.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., & Miller, R. H. (1989). One-Step Preparation of Competent *Escherichia coli*: Transformation and Storage of Bacterial Cells in the Same

- Solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(7), 2172–2175.
- Clark, J., Beegen, H., & Wood, H. (1986). Isolation of intact chains of polyphosphate from *Propionibacterium shermanii* grown on glucose or lactate. *Journal of Bacteriology*, 168(3), 1212–1219.
- De Gelder, J., Gussem, K. D., Vandenabeele, P., & Moens, L. (2007). Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38, 1133–1147.
- De Gelder, J., Vandenabeele, P., Boever, P. D., Mergeay, M., Moens, L., & Vos, P. D. (2009). Raman Spectroscopic Analysis of *Cupriavidus metallidurans* LMG 1195 (CH34) Cultured in Low-shear Microgravity Conditions. *Microgravity Science Technology*, 21, 217–223.
- De Gelder, J., Willemse-Erix, D., Scholtes, M. J., Sanchez, J. I., Maquelin, K., Vandenabeele, P., Boever, P. D., Puppels, G. J., Moens, L., & Vos, P. D. (2008). Monitoring Poly (3-hydroxybutyrate) Production in *Cupriavidus necator* DSM 428 (H16) with Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 80(6), 2155–2160.
- Docampo, R., & Moreno, S. N. J. (2011). Acidocalcisomes. *Cell Calcium*, 50(2), 113–119.
- Doi, Y., Kawaguchi, Y., Nakamura, Y., & Kunioka, M. (1989). Nuclear Magnetic Resonance Studies of Poly (3-Hydroxybutyrate) and Polyphosphate Metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11), 2932–2938.
- Dürr-Mayer, T., Qiu, D., Eisenbeis, V. B., Hofer, A., Mayer, A., Siegel, J. S., Steck, N., Häner, M., Baldridge, K. K., & Jessen, H. J. (2021). The chemistry of branched condensed phosphates. *Nature Communications*, 12(5368).
- Ferreira, C. M. H., Pinto, I. S. S., Soares, E. V., & Soares, H. M. V. M. (2015). (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions - a review. *RSC Advances*, 5, 30989–31003.
- Fessler, B., Mathias Gummesson, Charbon, G., & Lo Svenningsen, M. A., Sine Sørensen. (2020). Short-term kinetics of rRNA degradation in *Escherichia coli* upon starvation for carbon, amino acid, or phosphate. *Molecular Microbiology*, 113(5), 951–963.
- Forchhammer, K. (2007). Glutamine signaling in bacteria. *Frontiers in Biosciences*, 12(12), 358–370.
- Fraley, C. D., Tzeng, C.-M., Ault-Riche, D., & Kornberg, A. (1998). Novel Assay Reveals Multiple Pathways Regulating Stress-Induced Accumulations of Inorganic Polyphosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(7), 1841–1847.
- Frank, C., & Jendrossek, D. (2020). Acidocalcisomes and Polyphosphate Granules Are Different Subcellular Structures in *Agrobacterium tumefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(8).

- Frank, C., Teleki, A., & Jendrossek, D. (2020). Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* PPKs reveals the formation of oligophosphorylated products up to nucleoside nona-phosphates. *Applied and Environmental Microbiology*, *104*, 9683–9692.
- Friebolin, H. (2006). *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie* (4. vollständig überarbeitete Auflage). Wiley-VCH, Weinheim.
- Gangaiah, D., Kassem, I. I., Liu, Z., & Rajashekara, G. (2009). Importance of Polyphosphate Kinase 1 for *Campylobacter jejuni* Viable-but-Nonculturable Cell Formation, Natural Transformation, and Antimicrobial Resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(24), 7838–7849.
- Gefen, O., Fridman, O., Ronin, I., & Balaban, N. Q. (2014). Direct observation of single stationary-phase bacteria reveals a surprisingly long period of constant protein production activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*, 556–561.
- Germain, E., Guiraud, P., Byrne, D., Douzi, B., Djendli, M., & Maisonneuve, E. (2019). YtfK activates the stringent response by triggering the alarmone synthetase SpoT in *Escherichia coli*. *Nature Communications*, *10*(5763).
- Gray, M. J. (2019). Inorganic polyphosphate accumulation in *Escherichia coli* is regulated by DksA but not by (p)ppGpp. *Journal of Bacteriology*, *201*(9).
- 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., & Jakob, U. (2014). Polyphosphate Is a Primordial Chaperone. *Molecular Cell*, *53*(5), 689–699.
- Gray, M. J., Wholey, W.-Y., & Jakob, U. (2013). Bacterial Responses to Reactive Chlorine Species. *Annual Review of Microbiology*, *67*, 141–160.
- Grillo-Puertas, M., Schurig-Briccio, L. A., Rodríguez-Montelongo, L., Rintoul, M. R., & Rapisarda, V. A. (2014). Copper tolerance mediated by polyphosphate degradation and low-affinity inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, *14*(72), 1–10.
- Groitzl, B., Dahl, J. U., Schroeder, J. W., & Jakob, U. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* defense systems against microbicidal oxidants. *Molecular Microbiology*, *106*(3), 335–350.
- Hengge-Aronis, R. (2002). Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter  $\sigma$ S-selective? *Current Opinion in Microbiology*, *5*, 591–595.
- Hesse, M., Meier, H., & Zeeh, B. (2005). *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie* (7. überarbeitete Auflage). Thieme.
- Hildenbrand, J. C., Reinhardt, S., & Jendrossek, D. (2019). Formation of an Organic Inorganic Biopolymer: Polyhydroxybutyrate Polyphosphate. *Biomacromolecules*, *20*, 3253–3260.



- 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.
- 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).
- Jaishankar, J., & Srivastava, P. (2017). Molecular basis of stationary phase survival and applications. *Frontiers in Microbiology*, *8*(2000).
- Jendrossek, D. (2009). Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). *Journal of Bacteriology*, *191*(10), 3195–3202.
- Jendrossek, D., & Pfeiffer, D. (2014). New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology*, *16*(8), 2357–2373.
- Joo, H. K., Park, Y. W., Jang, Y. Y., & Lee, J. Y. (2018). Structural Analysis of Glutamine Synthetase from *Helicobacter pylori*. *Scientific Reports*, *8*(11657), 4–11.
- Jugder, B.-E., Chen, Z., Tan, D., Ping, T., Lebhar, H., Welch, J., & Marquis, C. P. (2015). An analysis of the changes in soluble hydrogenase and global gene expression in *Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha*) H16 grown in heterotrophic diauxic batch culture. *Microbial Cell Factories*, *14*(42).
- Jüngert, J. R. (2018). *Stringent response and phosphorylations of PHB synthase and PHB depolymerase influence the PHB content of Ralstonia eutropha H16*. Universität Stuttgart.
- Jüngert, J. R., Borisova-Mayer, M., Mayer, C., Wolz, C., Brigham, C., Sinskey, A., & Jendrossek, D. (2017). Absence of ppGpp Leads to Increased Mobilization of Intermediately Accumulated Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(13).
- Jüngert, J. R., Patterson, C., & Jendrossek, D. (2018). Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Polymerase PhaC1 and PHB Depolymerase PhaZa1 of *Ralstonia eutropha* Are Phosphorylated In Vivo. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(13).
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., & Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*, 5752–5756.
- Karimova, G., Ullmann, A., & Ladant, D. (2001). Protein-protein interaction between *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *3*(1), 73–82.
- Kelley, L., Mezulis, S., Yates, C., Wass, M., & Sternberg, M. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, *10*(6), 845–858.

- Kingdon, H. S., Shapiro, B. M., & Stadtman, E. R. (1967). Regulation of Glutamine Synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *58*, 1703–1710.
- Klauth, P., Pallerla, S. R., Vidaurre, D., Ralfs, C., Wendisch, V. F., & Schoberth, S. M. (2006). Determination of soluble and granular inorganic polyphosphate in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *72*(5), 1099–1106.
- Kornberg, A., Rao, N. N., & Ault-Riché, D. (1999). Inorganic Polyphosphate: A Molecule of Many Functions. *Annual Review of Biochemistry*, *68*, 89–125.
- Kovach, M., Elzer, P., Hill, D., Robertson, G., Farris, M., Roop, 2., R.M., & Peterson, K. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, *166*, 175–176.
- Krysenko, S., Okoniewski, N., Kulik, A., Matthews, A., Grimpo, J., Wohlleben, W., & Bera, A. (2017). Gamma-Glutamylpolyamine Synthetase GlnA3 Is Involved in the First Step of Polyamine Degradation Pathway in *Streptomyces coelicolor*. *Frontiers in Microbiology*, *8*(726).
- Kulaev, I. S., & Vagabov, V. M. (1983). Polyphosphate Metabolism in Micro-Organisms. *Adv Microb Physiol.*, *24*, 83–171.
- Kulaev, S., Vagabov, V. M., & Kulakovskaya, T. V. (2004). *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates*. Wiley-VCH.
- Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M., & Kornberg, A. (1997). Guanosine Tetra- and Pentaphosphate Promote Accumulation of Inorganic Polyphosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(34), 21240–21243.
- Kuroda, A., Nomura, K., Othomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., & Kornberg, A. (2001). Role of Inorganic Polyphosphate in Promoting Ribosomal Protein Degradation by the Lon Protease in *E. coli*. *Science*, *293*(530), 705–708.
- Kuroda, A., Tanaka, S., Ikeda, T., Kato, J., Takiguchi, N., & Ohtake, H. (1999). Inorganic polyphosphate kinase is required to stimulate protein degradation and for adaptation to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(25), 14264–14269.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–685.
- Li, J., & Dittrich, M. (2019). Dynamic polyphosphate metabolism in cyanobacteria responding to phosphorus availability. *Environmental Microbiology*, *21*(2), 572–583.
- Liebermann, L. (1888). Ueber das Nuclein der Hefe und künstliche Darstellung eines Nucleins aus Eiweiss und Metaphosphorsäure. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, *21*(1), 598–600.
- Lin, H., Gan, J., Rajendran, A., Reis, C. E. R., & Hu, B. (2015). *Phosphorus Removal and Recovery from Digestate after Biogas Production*. IntechOpen, Rijeka.

- Lorenzo-Orts, L., Hohmann, U., Zhu, J., & Hothorn, M. (2019). Molecular characterization of CHAD domains as inorganic polyphosphate-binding modules. *Life Science Alliance*, 2(3).
- Luo, S., Kim, G., & Levine, R. L. (2005). Mutation of the Adenylylated Tyrosine of Glutamine Synthetase Alters Its Catalytic Properties. *Biochemistry*, 44, 9441–9446.
- MacCready, J. S., & Vecchiarelli, A. G. (2021). Positioning the Model Bacterial Organelle, the Carboxysome. *mBio*, 12(3).
- Macia, A., Peano, C., Pietrelli, A., Egli, T., Bellis, G. D., & Landini, P. (2011). In vitro transcription profiling of the  $\sigma$ S subunit of bacterial RNA polymerase: re-definition of the  $\sigma$ S regulon and identification of  $\sigma$ S-specific promoter sequence elements. *Nucleic Acids Research*, 39(13), 5338–5355.
- Magnusson, L. U., Gummesson, B., Joksimović, P., Farewell, A., & Nyström, T. (2007). Identical, independent, and opposing roles of ppGpp and DksA in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 189(14), 5193–5202.
- Majed, N., Chernenko, T., Diem, M., & Gu, A. Z. (2012). Identification of Functionally Relevant Populations in Enhanced Biological Phosphorus Removal Processes Based On Intracellular Polymers Profiles and Insights into the Metabolic Diversity and Heterogeneity. *Environmental Science and Technology*, 46, 5010–5017.
- Majed, N., & Gu, A. Z. (2010). Application of Raman Microscopy for Simultaneous and Quantitative Evaluation of Multiple Intracellular Polymers Dynamics Functionally Relevant to Enhanced Biological Phosphorus Removal Processes. *Environmental Microbiology*, 44(22), 8601–8608.
- Majed, N., Matthäus, C., Diem, M., & Gu, A. Z. (2009). Evaluation of Intracellular Polyphosphate Dynamics in Enhanced Biological Phosphorus Removal Process using Raman Microscopy. *Environmental Science and Technology*, 43(14), 5436–5442.
- 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  $^{31}\text{P}$  Solid-State NMR. *Journal of the American Chemical Society*, 142(43), 18407–18421.
- Mengin-Lecreulx, D., & van Heijenoort, J. (1985). Effect of growth conditions on peptidoglycan content and cytoplasmic steps of its biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 163, 208–212.
- Mordhorst, S., Singh, J., Mohr, M. K., 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(8), 1019–1022.
- Muffler, A., Barth, M., Marschall, C., & Hengge-Aronis, R. (1997). Heat Shock Regulation of  $\sigma$ S Turnover: a Role for DnaK and Relationship between Stress Responses

- Mediated by  $\sigma$ S and  $\sigma$ 32 in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179(2), 445–452.
- Müller-Santos, M., Koskimäki, J. J., Silveira Alves, E., Luis Paulo Maltempi de Souza, Jendrossek, D., & Pirttilä, A. M. (2021). The protective role of PHB and its degradation products against stress situations in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(3).
- Müssig-Zufika, M., Kornmüller, A., Merkelbach, B., & Jekel, M. (1994). Isolation and analysis of intact polyphosphate chains from activated sludges associated with biological phosphate removal. *Water Research*, 28(8), 1725–1733.
- Neville, N., Roberge, N., & Jia, Z. (2022). Polyphosphate Kinase 2 (PPK2) Enzymes: Structure, Function, and Roles in Bacterial Physiology and Virulence. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(670).
- Nowroth, V., Marquart, L., & Jendrossek, D. (2016). Low temperature-induced viable but not culturable state of *Ralstonia eutropha* and its relationship to accumulated polyhydroxybutyrate. *FEMS Microbiology Letters*, 363(23).
- Ohtomo, R., Sekiguchi, Y., Kojima, T., & Saito, M. (2008). Different chain length specificity among three polyphosphate quantification methods. *Analytical Biochemistry*, 383(2), 210–216.
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*, 43, 93–100.
- Peng, L., Jiang, Q., Pan, J. Y., Deng, C., Yu, J. Y., Wu, X. M., Huang, S. H., & Deng, X. Y. (2016). Involvement of polyphosphate kinase in virulence and stress tolerance of uropathogenic *Proteus mirabilis*. *Medical Microbiology and Immunology*, 205(2), 97–109.
- Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2012). Localization of Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Granule-Associated Proteins during PHB Granule Formation and Identification of Two New Phasins, PhaP6 and PhaP7, in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Bacteriology*, 194(21), 5909–5921.
- Pfeiffer, D., Wahl, A., & Jendrossek, D. (2011). Identification of a multifunctional protein, PhaM, that determines number, surface to volume ratio, subcellular localization and distribution to daughter cells of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Molecular Microbiology*, 82(4), 936–951.
- Pohlmann, A., Fricke, W. F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Schwartz, E., Strittmatter, A., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Pötter, M., Bowien, B., Voss, I., Gottschalk, G., & Steinbüchel, A. (2007). Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology*, 24(10), 1257–62.
- Pötter, M., & Steinbüchel, A. (2006). *Inclusions in Prokaryotes*. Shively J. M., Springer Verlag, Heidelberg.

- Raberg, M., Reinecke, F., Reichelt, R., Malkus, U., König, S., Pötter, M., Fricke, W. F., Pohlmann, A., Voigt, B., Hecker, M., Bowien, B., & Steinbüchel, A. (2008). *Ralstonia eutropha* H16 Flagellation Changes According to Nutrient Supply and State of Poly (3-Hydroxybutyrate) Accumulation. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(14), 4477–4490.
- 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 in the United States of America*, *114*(12), E2440–E2449.
- Rao, N. N., Roberts, M. F., & Torriani, A. (1985). Amount and Chain Length of Polyphosphates in *Escherichia coli* Depend on Cell Growth Conditions. *Journal of Bacteriology*, *162*(1), 242–247.
- 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. (1996). Inorganic Polyphosphate Supports Resistance and Survival of Stationary-Phase *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *178*(5), 1394–1400.
- Rao, N. N., Liu, S., & Kornberg, A. (1998). Inorganic Polyphosphate in *Escherichia coli*: the Phosphate Regulon and the Stringent Response. *Journal of Bacteriology*, *180*(8), 2186–2193.
- Rashid, M. H., & Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(9), 4885–4890.
- Rashid, M. H., Rao, N. N., & Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *Journal of Bacteriology*, *182*(1), 225–227.
- Reinecke, F., & Steinbüchel, A. (2009). *Ralstonia eutropha* Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. *Journal of Microbiological Biotechnology*, *16*, 91–108.
- Rocha, D. J. P., Santos, C. S., & Pacheco, L. G. C. (2015). Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, *108*, 685–693.
- Ropelewska, M., Gross, M. H., & Konieczny, I. (2020). DNA and Polyphosphate in Directed Proteolysis for DNA Replication Control. *Frontiers in Microbiology*, *11*(585717).
- Rosigkeit, H., Kneißle, L., Obruča, S., & Jendrossek, D. (2021). The Multiple Roles of Polyphosphate in *Ralstonia eutropha* and Other Bacteria. *Microbial Physiology*, *31*(2), 163–177.
- Santos-Beneit, F. (2015). The Pho regulon: A huge regulatory network in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, *6*(402).

- Sanz-Luque, E., Bhaya, D., & Grossman, A. R. (2020). Polyphosphate: A Multifunctional Metabolite in Cyanobacteria and Algae. *Frontiers in Plant Science*, *11*(938).
- Schumann, W. (2016). Regulation of bacterial heat shock stimulons. *Cell Stress and Chaperones*, *21*(6), 959–968.
- Sekiguchi, Y., Matsunaga, A., Yamamoto, A., & Inoue, Y. (2000). Analysis of condensed phosphates in food products by ion chromatography with an on-line hydroxide eluent generator. *Journal of Chromatography A*, *881*, 639–644.
- Serafim, L., Lemos, P., Levantesi, C., Tandoi, V., Santos, H., & Reis, M. (2002). Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, *51*(1).
- Seufferheld, M., Vieira, M. C., Ruiz, F. A., Rodrigues, C. O., Moreno, S. N., & Docampo, R. (2003). Identification of organelles in bacteria similar to acidocalcisomes of unicellular eukaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(32), 29971–8.
- Shapiro, B. (1969). The glutamine synthetase deadenylylating enzyme system from *Escherichia coli*. Resolution into two components, specific nucleotide stimulation, and cofactor requirements. *Biochemistry*, *8*(2), 659–670.
- Shiba, T., Tsutsumi, K., Ishige, K., & Noguchi, T. (2000). Inorganic Polyphosphate and Polyphosphate Kinase: Their Novel Biological Functions and Applications. *Biochemistry*, *65*(3), 315–323.
- Slaninova, E., Sedlacek, P., Mravec, F., Mullerova, L., Samek, O., Koller, M., Hesko, O., Kucera, D., Marova, I., & Obruca, S. (2018). Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, *102*, 1923–1931.
- Smith, S. A., Wang, Y., & Morrissey, J. H. (2018). DNA ladders can be used to size polyphosphate resolved by polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, *39*(19), 2454–2459.
- Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (2016). Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, *40*, 133–159.
- Sola-Landa, A., Amin, R., Wohlleben, W., Rodriguez-Garcia, A., & Martin, J. F. (2013). Competition between the GlnR and PhoP regulators for the glnA and amtB promoters in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Research*, *41*(3), 1767–1782.
- Streichan, M., & Schön, G. (1991). Periplasmic and Intracytoplasmic Polyphosphate and Easily Washable Phosphate in Pure Cultures of Sewage Bacteria. *Water Research*, *25*(1), 9–13.
- Sznajder, A., Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2015). Polyhydroxybutyrate (PHB) Granule-Associated Proteins in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(5), 1847–1858.

- Tao, Z., Peng, L., Zhang, P., Li, Y.-Q., & Wang, G. (2016). Probing the Kinetic Anabolism of Poly-Beta-Hydroxybutyrate in *Cupriavidus necator* H16 Using Single-Cell Raman Spectroscopy. *Sensors*, *16*(1257).
- Tarayre, C., Nguyen, H.-T., Brognaux, A., Delepierre, A., Clercq, L. D., Charlier, R., Michels, E., Meers, E., & Delvigne, F. (2016). Characterisation of Phosphate Accumulating Organisms and Techniques for Polyphosphate Detection: A Review. *Sensors*, *16*(797).
- Tee, K. L., Grinham, J., Othusitse, A. M., González-Villanueva, M., Johnson, A. O., & Wong, T. S. (2017). An Efficient Transformation Method for the Bioplastic-Producing “Knallgas” Bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Biotechnology Journal*, *12*(11), 1–7.
- Tumlirsch, T. (2017). *Identifizierung neuer Proteine des Polyphosphat Granulumkomplexes von Ralstonia eutropha H16*. Universität Stuttgart.
- Tumlirsch, T., & Jendrossek, D. (2017). Proteins with CHADs (Conserved Histidine  $\alpha$ -Helical Domains) Are Attached to Polyphosphate Granules In Vivo and Constitute a Novel Family of Proteins (Phosins). *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(7).
- Tumlirsch, T., Sznajder, A., & Jendrossek, D. (2015). Formation of Polyphosphate by Polyphosphate Kinases and Its Relationship to Poly (3-Hydroxybutyrate) Accumulation in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(24), 8277–8293.
- Uebe, R., & Schüler, D. (2016). Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nat Rev Microbiol*, *14*(10), 621–37.
- van Niftrik, L. A., Fuerst, J. A., Sinninghe Damste, J. S., Kuenen, J. G., Jetten, M. S., & Strous, M. (2004). The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, *233*(1), 7–13.
- Wang, L., Kuchendorf, C., & Willbold, S. (2019). Determination of individual chain length and chain-length distribution of polyphosphates in microalgae by 31 P-DOSY-NMR. *Algal Research*, *43*(101631).
- Werten, S., Rustmeier, N. H., Gemmer, M., & Hinrichs, W. (2019). Structural and biochemical analysis of a phosin from *Streptomyces chartreusis* reveals a combined polyphosphate- and metal-binding fold. *FEBS Letters*, *593*(15), 2019–2029.
- Woolfolk, C. A., & Stadtman, E. R. (1967). Regulation of Glutamine Synthetase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *118*, 736–755.
- Xie, L., & Jakob, U. (2019). Inorganic polyphosphate, a multifunctional polyanionic protein scaffold. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(24), 2180–2190.
- Yamashita, M. M., Almassy, R. J., Jansong, C. A., Cascios, D., & Eisenberg, D. (1989). Refined Atomic Model of Glutamine Synthetase at 3.5 Å Resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, *264*(30), 17681–17690.

- Yang, Z. X., Zhou, Y. N., Yang, Y., & Jin, D. J. (2010). Polyphosphate Binds to the Principal Sigma Factor of RNA Polymerase during Starvation Response in *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology*, *77*(3), 618–627.
- Zhang, H., Ishige, K., & Kornberg, A. (2002). A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(26), 16678–16683.
- Zhang, H., Rao, N. N., Shiba, T., & Kornberg, A. (2005). Inorganic polyphosphate in the social life of *Myxococcus xanthus*: Motility, development, and predation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(38), 13416–13420.
- Zhu, Y., Huang, W., Lee, S. S., & Xu, W. (2005). Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis. *EMBO Reports*, *6*(7), 681–687.



## 5 Anhang

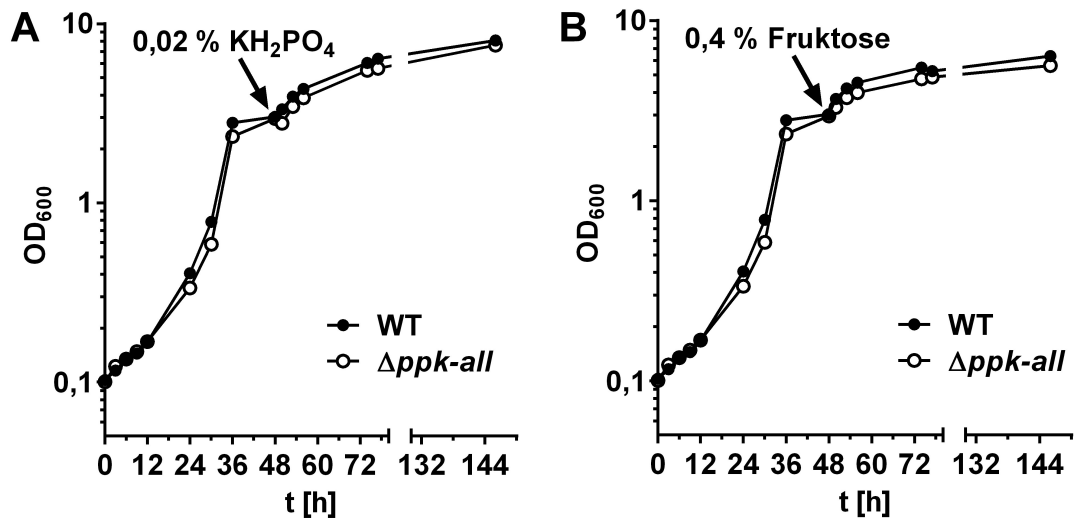


Abb. 5.1: Das Wachstum von *R. etropha* WT und  $\Delta ppk-all$  Mutante wurde in Tris-MSM stärker durch Phosphat als Fructose limitiert. Eine *R. etropha* WT und  $\Delta ppk-all$  Mutante Kultur wurde für 48 h in 50 ml Tris-MSM + 0,4 % Fructose + 0,02 %  $KH_2PO_4$  kultiviert bis zum Beginn der stationären Phase. Nun wurden je 25 ml Kultur in einen frischen Erlenmeyerkolben transferiert und mit A) 0,02 %  $KH_2PO_4$  oder B) 0,4 % Fructose supplementiert und weiter inkubiert.

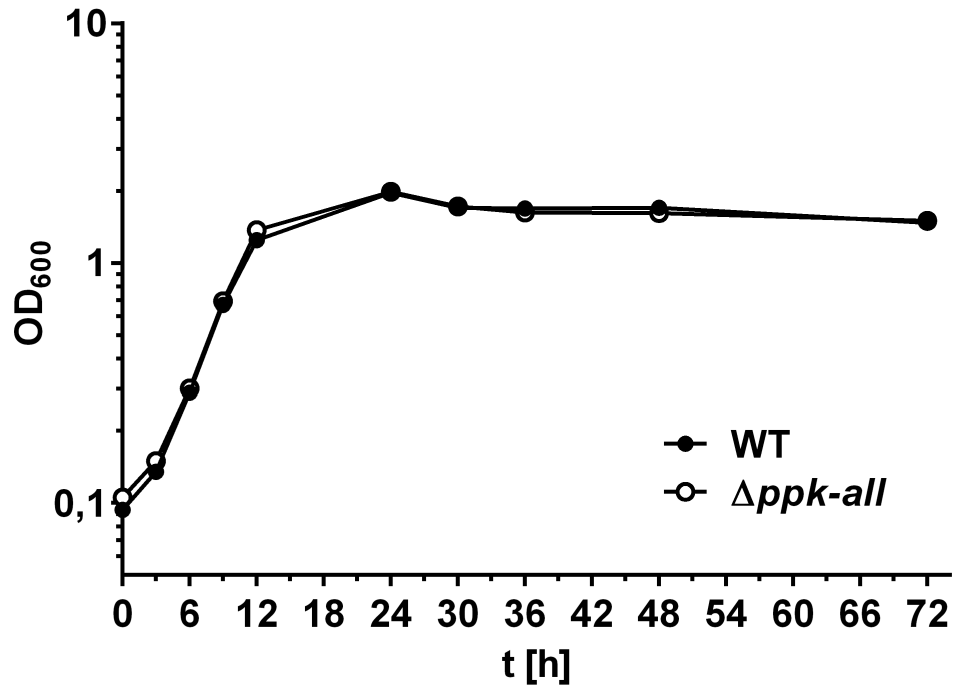


Abb. 5.2: Wachstum von *R. eutropha* WT und der  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante in Schlegel-MSM + 0,4 % Fructose. 350 ml Schlegel-MSM + 0,4 % Fructose in 2l Erlenmeyerkolben wurden mit *R. eutropha* WT oder  $\Delta ppk\text{-all}$  Mutante aus zwei aufeinanderfolgenden ü.N. NB Vorkulturen mit Mediumwechsel auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 30 °C, 150 rpm kultiviert. Dargestellt ist ein einzelner Versuch, zwei biologische Replikate lieferten ähnliche Werte.

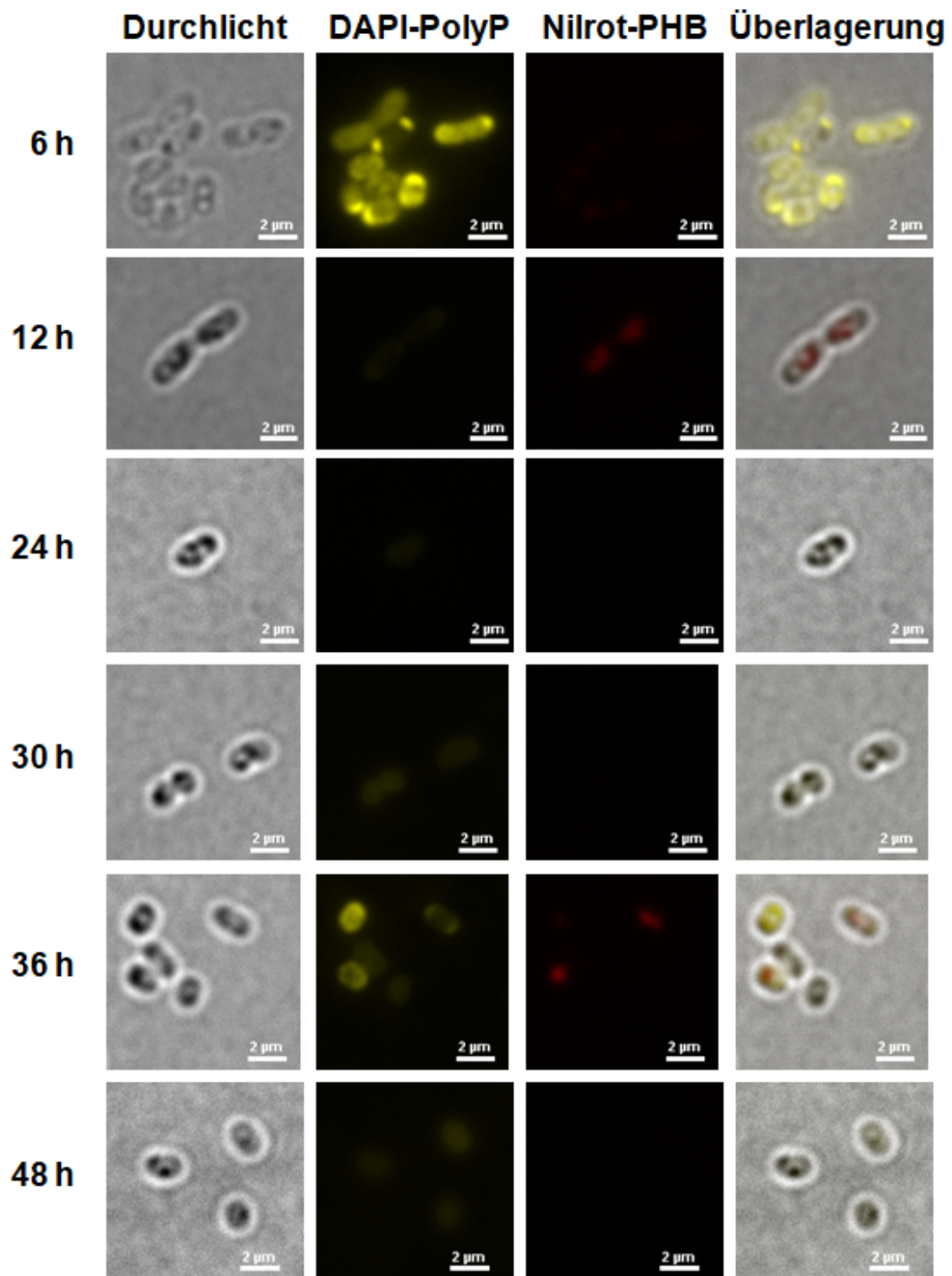


Abb. 5.3: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der *R. eutropha*  $\Delta ppk-all$  Mutante in Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose. 10  $\mu$ l Kultur wurden mit 5  $\frac{\mu g}{ml}$  DAPI und 2  $\frac{frac}{\mu g ml}$  Nilrot für 10 min auf Eis inkubiert. Die dargestellten Aufnahmen zeigen typische Zellen für diesen Zeitpunkt. Die Nilrotfärbung zur Anfärbung der PHB Granula hat teilweise nicht funktioniert. Der Maßstab beträgt 2  $\mu$ m.

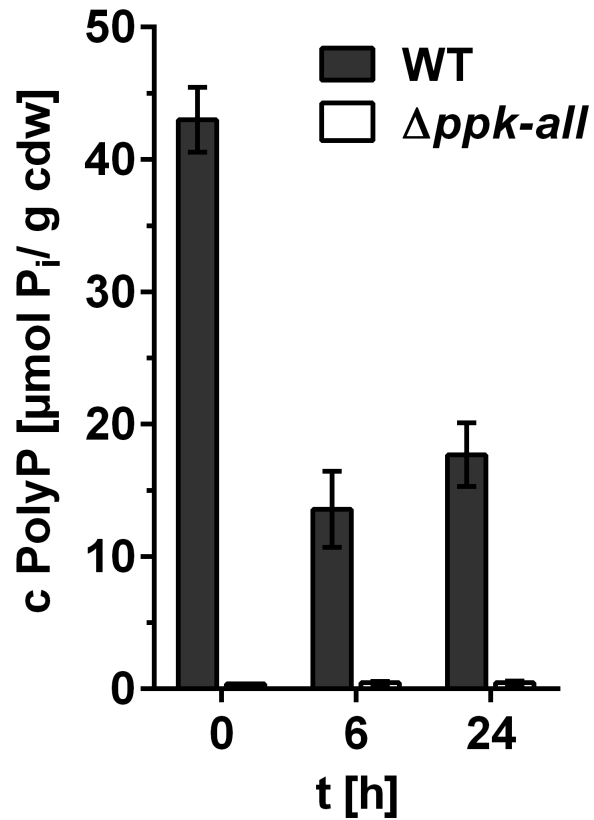


Abb. 5.4: PolyP-Quantifizierung von *R. eutropha* in MOPS-MSM. *R. eutropha* WT und die  $\Delta ppk-all$  Mutante wurden in MOPS-MSM mit 1,32 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  + 0,2 % Fruktose bei 30 °C und 140 rpm inkubiert. Aus den lyophilisierten Zellen wurde PolyP isoliert und mit ScPPX enzymatisch verdaut zu Monophosphat. Der Phosphatgehalt wurde mit dem Malachitgrünassay quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SD aus einem Versuch, bzw. bei  $t=24$  h zwei biologische Replikate.

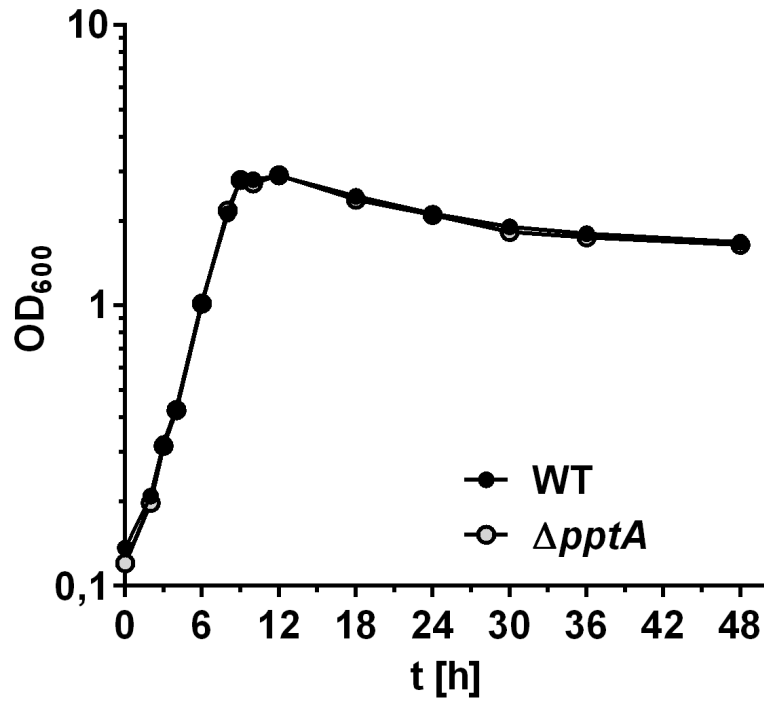


Abb. 5.5: Wachstum von *R. eutropha* WT und der  $\Delta pptA$  Mutante in NB Medium. 50 ml NB Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben wurden mit 2,5 ml ü. N. Vorkultur von *R. eutropha* WT und  $\Delta pptA$  angeimpft und bei 30 °C, 140 rpm inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die OD<sub>600</sub> über einen Zeitraum von 48 h gemessen. Gezeigt ist eine Einzelmessung, zwei biologische Replikate lieferten ähnliche Werte.

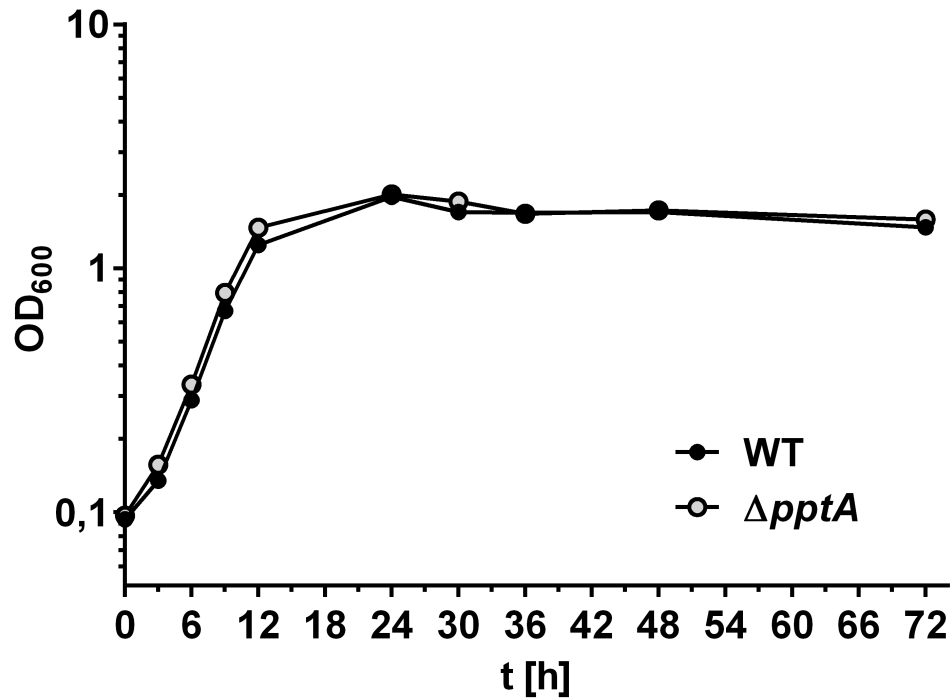


Abb. 5.6: Wachstum von *R. eutropha* WT und der  $\Delta pptA$  Mutante in Schlegel-MSM + 0,4 % Fructose. 350 ml Schlegel-MSM + 0,4 % Fructose in 21 Erlenmeyerkolben wurden mit *R. eutropha* WT oder  $\Delta pptA$  aus zwei aufeinanderfolgenden ü.N. NB Vorkulturen mit Mediumwechsel auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 30 °C, 150 rpm kultiviert. Das Wachstum wurde spektrophotometrisch bei 600 nm verfolgt. Dargestellt ist ein einzelner Versuch, der zwei biologische Replikate lieferten ähnliche Werte.

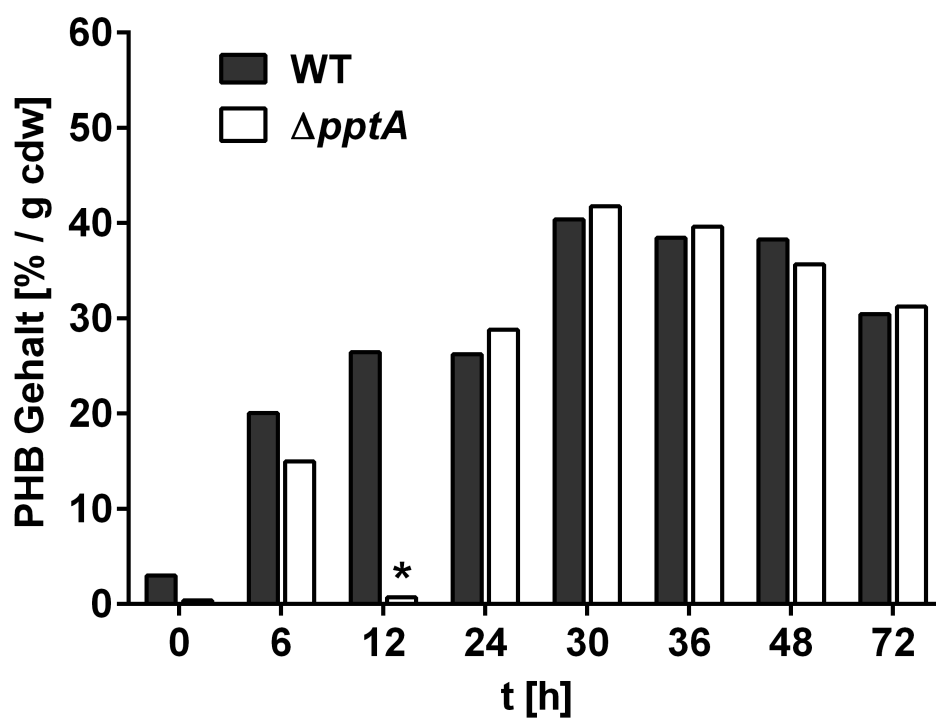


Abb. 5.7: Quantifizierung des PHB Gehalts von *R. eutropha* WT und  $\Delta pptA$  Kulturen in Schlegel-MSM + 0,4 % Fruktose. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 50-200 ml Kultur geerntet. Das PHB in den lyophilisierten Zellen wurde mittels saurer Methanolyse in 3-Hydroxybutyrat Methylester gespalten. Die Quantifizierung erfolgte mit Gaschromatographie. Die Messwerte stellen eine Einzelmessung dar. \* Potentieller Probenverlust während der Präparation.

Tab. 5.1: Verteilung von Zellen in Prozent nach Anzahl der PolyP Granula in *R. eutropha* WT und  $\Delta pptA$  in NB Medium und Schlegel-MSM bei t=24 h

| Stamm, Medium      | Anzahl Granula |      |      |     | n   |
|--------------------|----------------|------|------|-----|-----|
|                    | 0              | 1    | 2    | 3+  |     |
| <i>R. eutropha</i> | 0              | 1    | 2    | 3+  | n   |
| WT NB              | 32,9           | 66,2 | 1,0  | 0,0 | 210 |
| WT MSM             | 23,7           | 51,6 | 16,1 | 8,6 | 93  |
| $\Delta pptA$ NB   | 37,8           | 61,7 | 1,1  | 0,0 | 180 |
| $\Delta pptA$ MSM  | 16,8           | 53,7 | 22,1 | 7,4 | 95  |

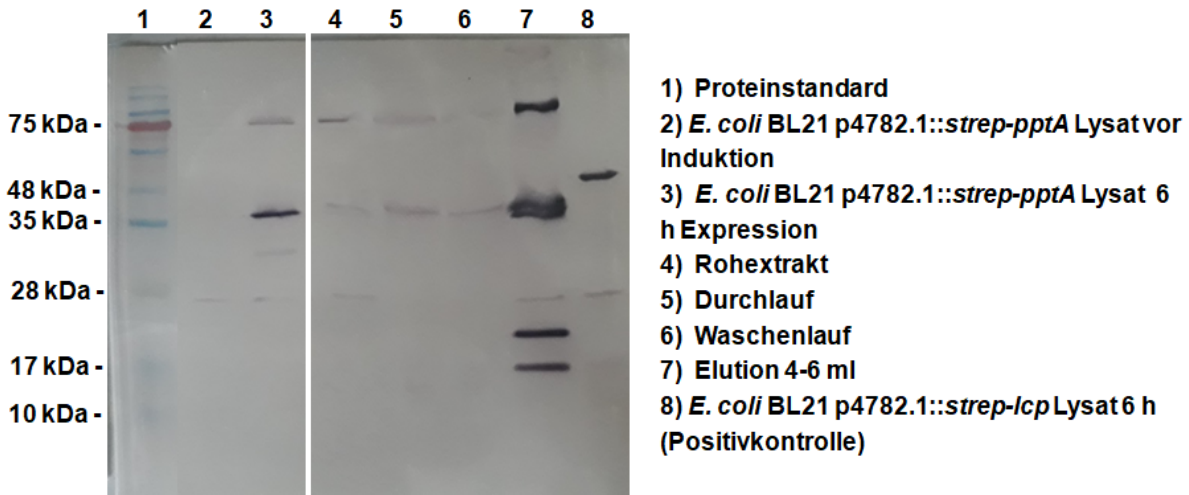


Abb. 5.8: Analyse der Fraktionen der Reinigung von strep-PptA durch Westernblot. Die Proben wurden ggf. nach Verdünnung, mit 3x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. 15 µl Probe wurden für den Westernblot im 12 % SDS-PA-Gel aufgetrennt. Zur Markierung von strep-PptA wurde ein Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat verwendet, die Detektion erfolgte über eine Reaktion mit NTB und BCIP.

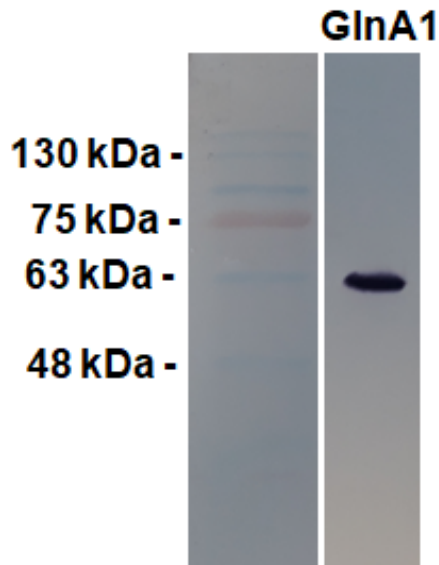


Abb. 5.9: Analyse der eluierten 10xHis-GlnA1 durch Westernblot. Die Probe wurde mit 3x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. 15 µl Probe wurden für den Westernblot auf das 12 % SDS-Gel aufgetragen. Zur Markierung von 10xHis-GlnA1 wurde ein primärer  $\alpha$ -6xHistidin-Antikörper aus der Maus verwendet. Als zweiter Antikörper diente ein  $\alpha$ -Maus Antikörper fusioniert mit Alkalischer Phosphatase aus der Ziege, die Detektion erfolgte über eine Reaktion mit NTB und BCIP.



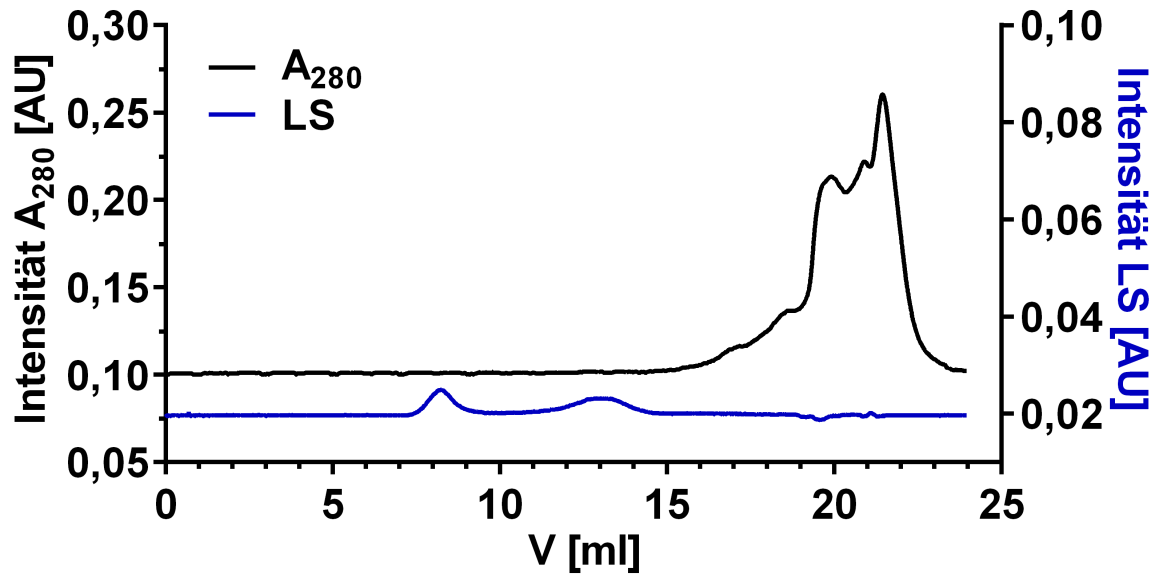


Abb. 5.10: Untersuchung der Quartärstruktur von nativem strep-PptA über das Molekulargewicht des gereinigten Proteins. Das Molekulargewicht wurde mittels SEC-MALS an der FPLC ÄKTA pure (GE Healthcare) bestimmt. Die Säule Superose 6 Increase 10/300 GL (V=24 ml) wurde mit dem Laufpuffer Puffer A, pH 8,0 äquilibriert. Eine strep-PptA Lösung mit  $c=133 \mu\text{g/ml}$  wurde zentrifugiert bei 14800 rpm für 5 min bei  $4^\circ\text{C}$ . Davon wurden  $500 \mu\text{l}$  ( $66,5 \mu\text{g}$  strep-PptA, entspricht  $5,44 \mu\text{M}$ ) mit einer Geschwindigkeit von  $v=0,5 \text{ ml/min}$  über die Säule gegeben. Detektiert wurden die Lichtstreuung und  $A_{280}$  des Eluats.

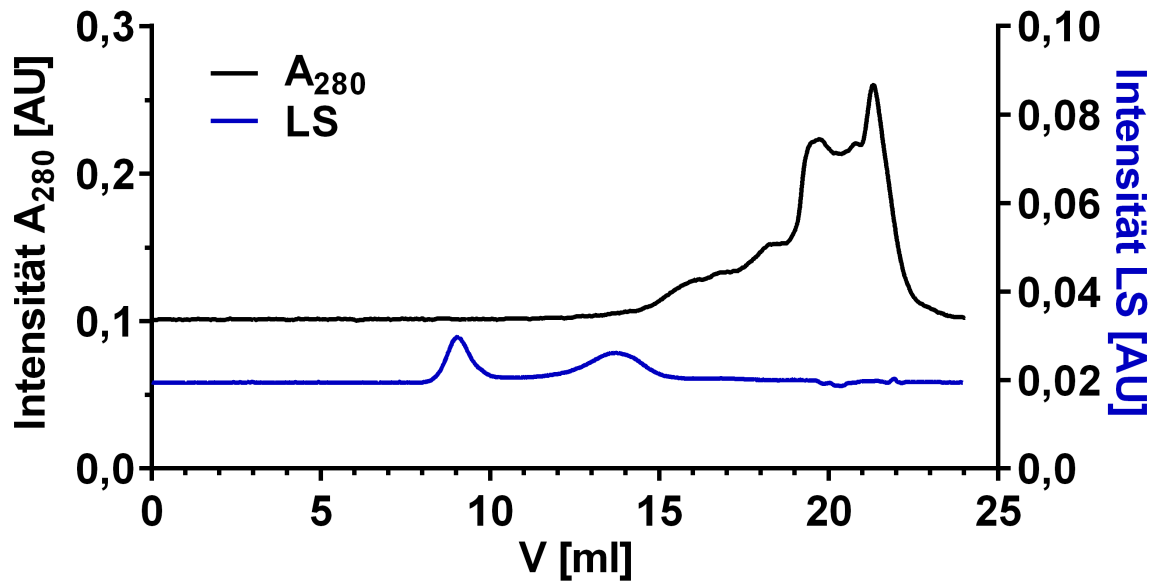


Abb. 5.11: Untersuchung der Quartärstruktur von nativem strep-PptA in Anwesenheit von PolyP über das Molekulargewicht des gereinigten Proteins. Das Molekulargewicht wurde mittels SEC-MALS an der FPLC ÄKTA pure (GE Healthcare) bestimmt. Die Säule Superose 6 Increase 10/300 GL (V=24 ml) wurde mit dem Laufpuffer Puffer A, pH 8,0 äquilibriert. Eine strep-PptA Lösung mit  $c=133 \mu\text{g/ml}$  wurde zentrifugiert bei 14800 rpm für 5 min bei  $4^\circ\text{C}$ . Dann wurden  $2 \mu\text{M}$  PolyP zugegeben und für 20 min inkubiert. Davon wurden  $500 \mu\text{l}$  ( $65 \mu\text{g}$  strep-PptA, entspricht  $5,3 \mu\text{M}$ ) mit einer Geschwindigkeit von  $v=0,5 \text{ ml/min}$  über die Säule gegeben. Detektiert wurden die Lichtstreuung und  $A_{280}$  des Eluats.

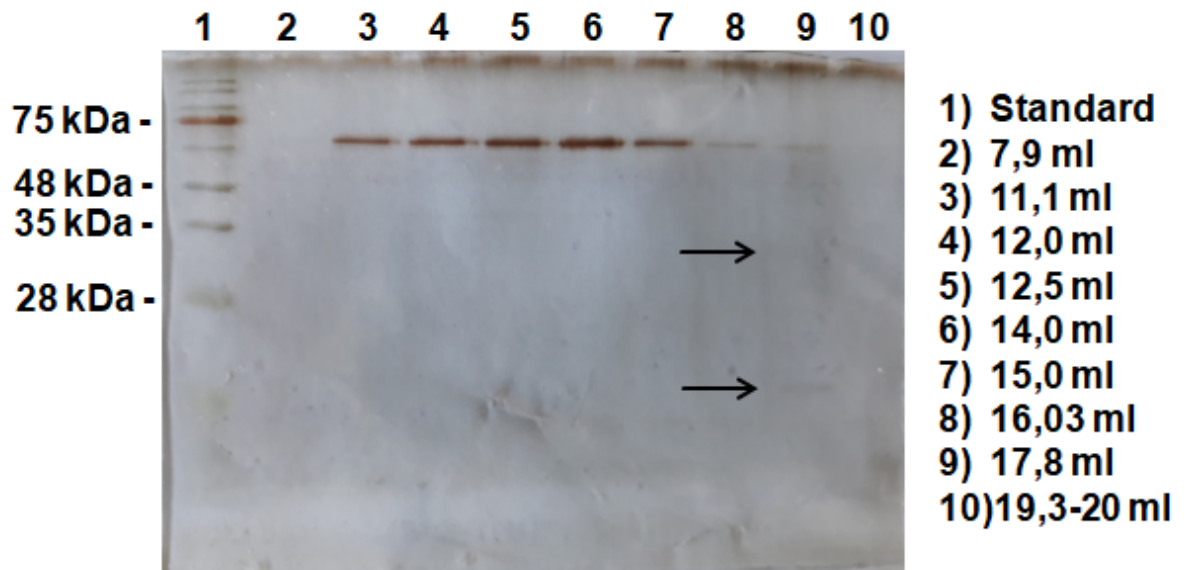


Abb. 5.12: Analyse der Fraktionen der Untersuchung des Molekulargewichts von strep-PptA + 10xHis-GlnA1 + PolyP mittels SEC-MALS durch SDS-PAGE. Strep-PptA, GlnA1 und PolyP wurden koinkubiert, mittels SEC nach dem Molekulargewicht getrennt und durch  $A_{280}$  und MALS detektiert. Das Eluat wurde fraktioniert, mit 3x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. 15  $\mu$ l Probe wurden in einem 12 % SDS-Gel für 30 min bei 25 mA aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Silberfärbung detektiert. Beschrieben ist jeweils das Startvolumen der Fraktion. Die Pfeile weisen auf die nur schwach erkennbaren Proteinbanden, die strep-PptA bzw. ein Fragment davon darstellen könnten.

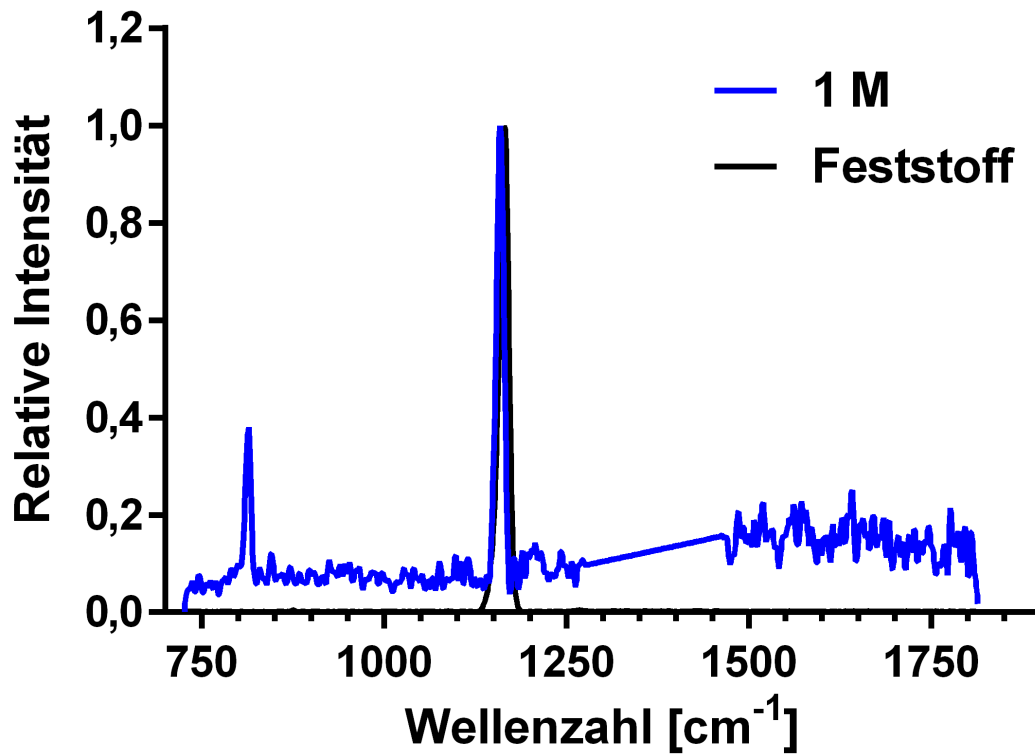


Abb. 5.13: Raman-Spektren von festem PolyP und einer 1 M wässrigen PolyP Lösung bei Anregung mit 785 nm. PolyP bzw. ein Tropfen der 1 M Lösung wurde auf einem CaF-Fenster getrocknet und mit dem InVia<sup>TM</sup> Reflex Raman Mikrospektrometer (Renishaw, Wotton-under-Edge, Großbritannien) mit einer Wellenlänge von 785 nm angeregt. Es wurden 60 Einzelspektren mit einer Belichtungszeit von 1 s aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung und drei technische Replikate gemittelt. Anschließend wurden die Signale gegen die Intensität des stärkstens Signals bei 1164 cm<sup>-1</sup> normalisiert.

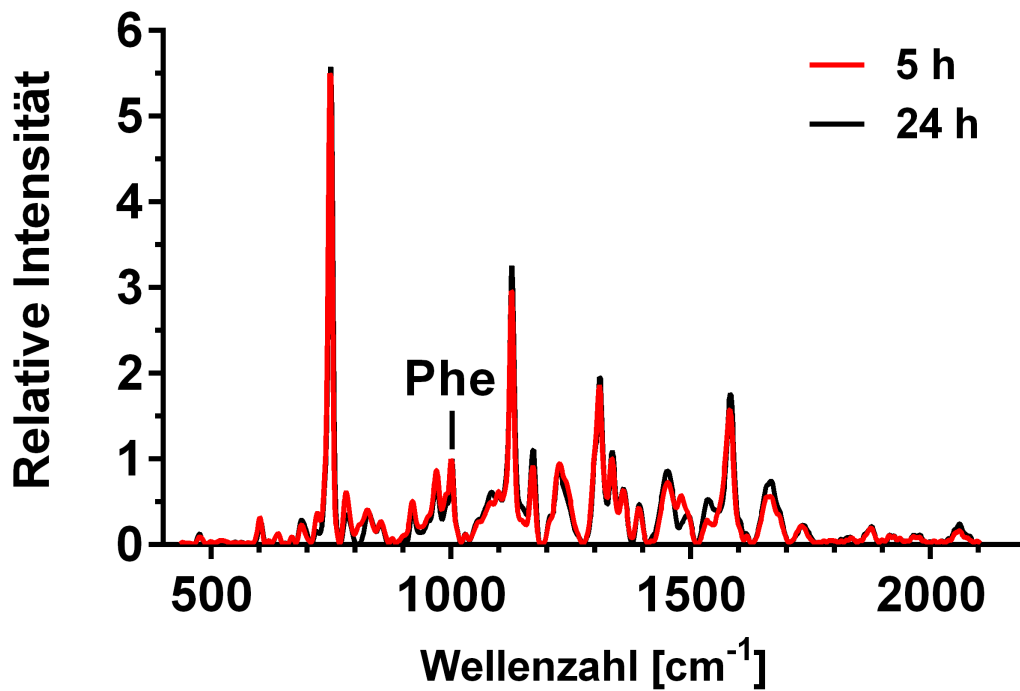


Abb. 5.14: Raman-Spektren von *R. eutropha* WT nach 5 h und 24 h Kultivierung in NB Medium bei Anregung mit 532 nm. 2 ml Zellkultur wurde nach 5 h (rot) und 24 h (schwarz) Kultivierung in NB Medium zentrifugiert und einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, das Pellet auf einem CaF-Fenster getrocknet und mit dem InVia<sup>TM</sup> Reflex Raman Mikrospektrometer (Renishaw, Wotton-under-Edge, Großbritannien) mit einer Wellenlänge von 532 nm angeregt. Es wurden 60 Einzelspektren mit einer Belichtungszeit von 1 s aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung und drei technische Replikate gemittelt. Anschließend wurden die Signale gegen die Intensität des Phenylalaninsignals bei 1004 cm<sup>-1</sup> normalisiert.

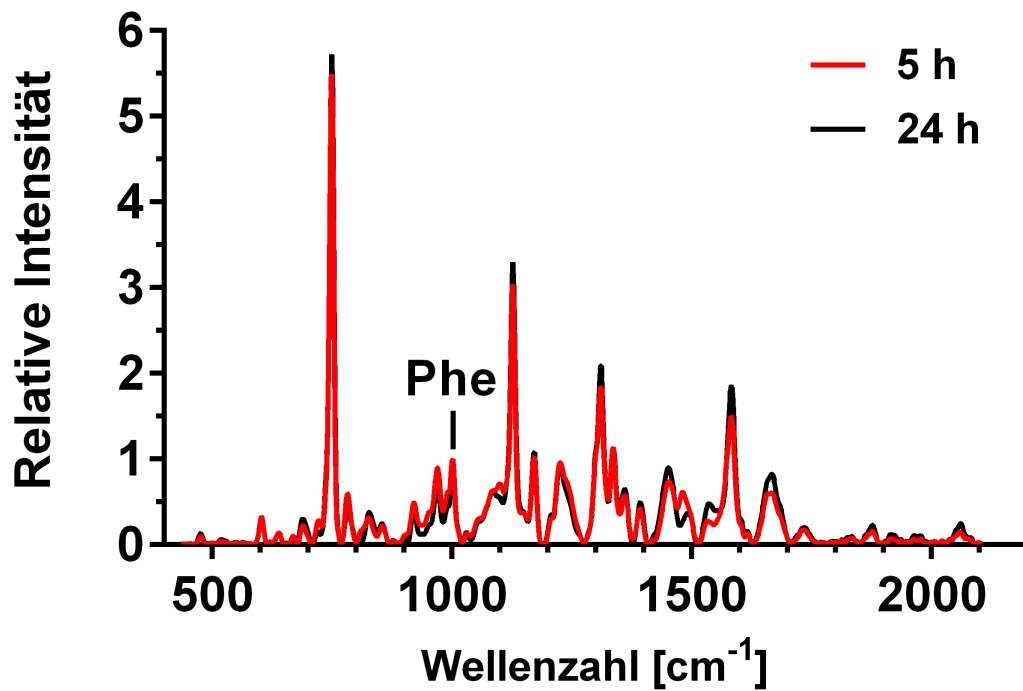


Abb. 5.15: Raman-Spektren von *R. eutropha*  $\Delta ppk$ -*all* nach 5 h und 24 h Kultivierung in NB Medium bei Anregung mit 532 nm. 2 ml Zellkultur wurde nach 5 h (rot) und 24 h (schwarz) Kultivierung in NB Medium zentrifugiert und einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, das Pellet auf einem CaF-Fenster getrocknet und mit dem InVia<sup>TM</sup> Reflex Raman Mikrospektrometer (Renishaw, Wotton-under-Edge, Großbritannien) mit einer Wellenlänge von 532 nm angeregt. Es wurden 60 Einzelspektren mit einer Belichtungszeit von 1 s aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung und drei technische Replikate gemittelt. Anschließend wurden die Signale gegen die Intensität des Phenylalaninsignals bei 1004 cm<sup>-1</sup> normalisiert.

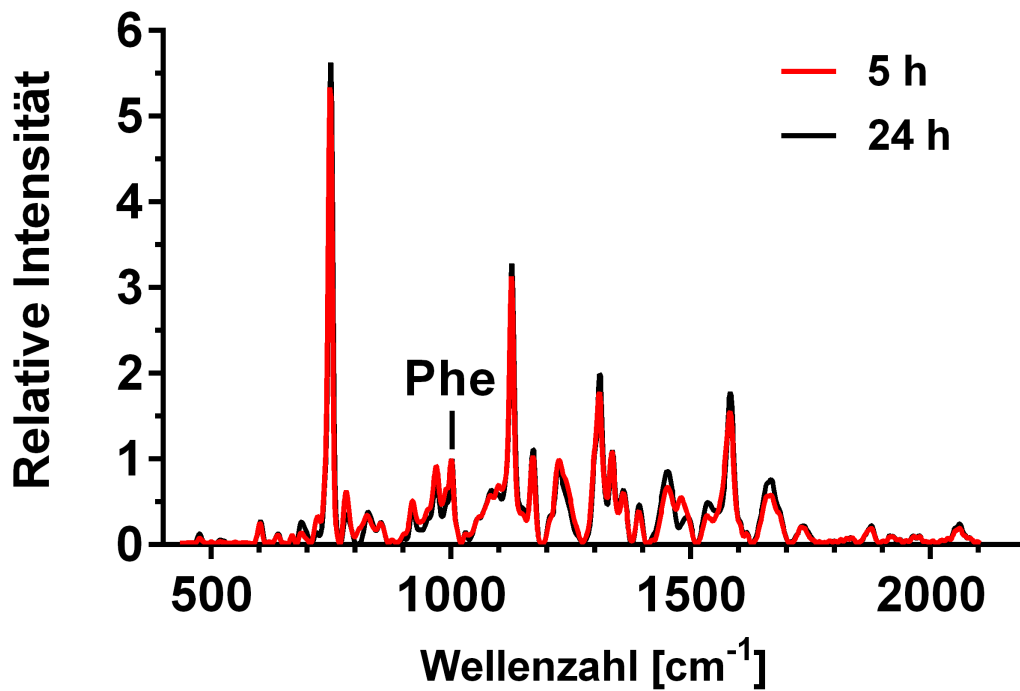


Abb. 5.16: Raman-Spektren von *R. eutropha*  $\Delta pptA$  nach 5 h und 24 h Kultivierung in NB Medium bei Anregung mit 532 nm. 2 ml Zellkultur wurde nach 5 h (rot) und 24 h (schwarz) Kultivierung in NB Medium zentrifugiert und einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, das Pellet auf einem CaF-Fenster getrocknet und mit dem InVia<sup>TM</sup> Reflex Raman Mikrospektrometer (Renishaw, Wotton-under-Edge, Großbritannien) mit einer Wellenlänge von 532 nm angeregt. Es wurden 60 Einzelspektren mit einer Belichtungszeit von 1 s aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung und drei technische Replikate gemittelt. Anschließend wurden die Signale gegen die Intensität des Phenylalaninsignals bei 1004 cm<sup>-1</sup> normalisiert.

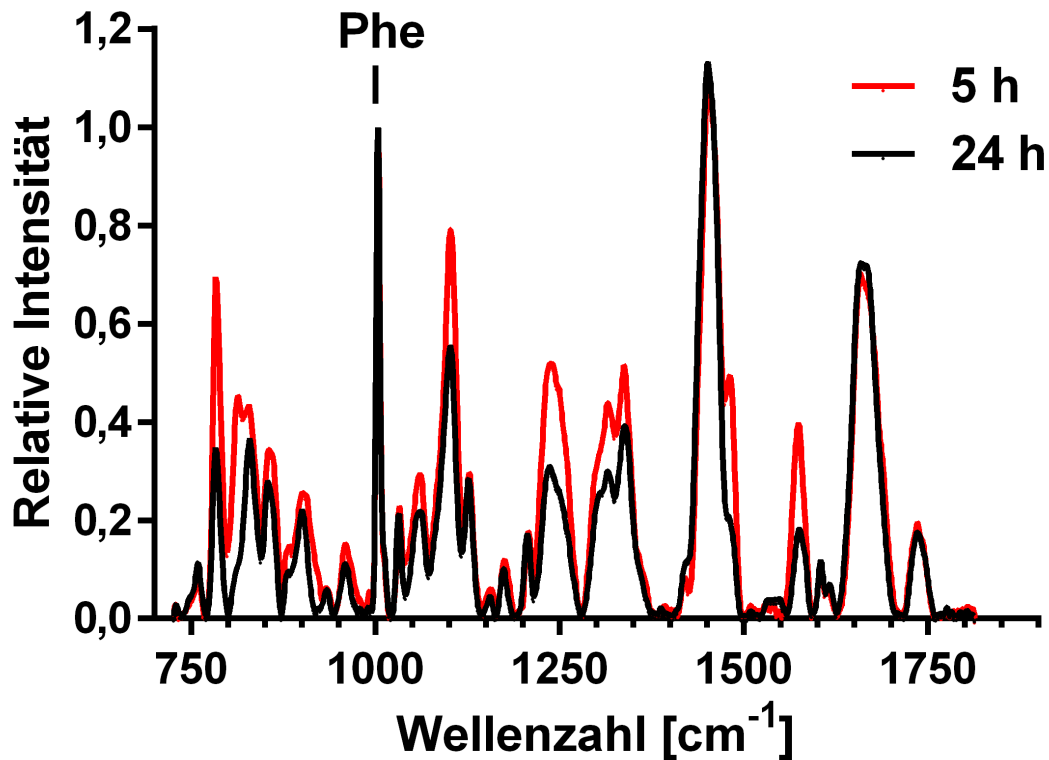


Abb. 5.17: Raman-Spektren von *R. eutropha*  $\Delta ppk$ -*all* nach 5 h und 24 h Kultivierung in NB Medium bei Anregung mit 785 nm. 2 ml Zellkultur wurde nach 5 h (rot) und 24 h (schwarz) Kultivierung in NB Medium zentrifugiert und einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, das Pellet auf einem CaF-Fenster getrocknet und mit dem InVia<sup>TM</sup> Reflex Raman Mikrospektrometer (Renishaw, Wotton-under-Edge, Großbritannien) mit einer Wellenlänge von 785 nm angeregt. Es wurden 60 Einzelspektren mit einer Belichtungszeit von 1 s aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung und drei technische Replikate gemittelt. Anschließend wurden die Signale gegen die Intensität des Phenylalaninsignals bei 1004 cm<sup>-1</sup> normalisiert.



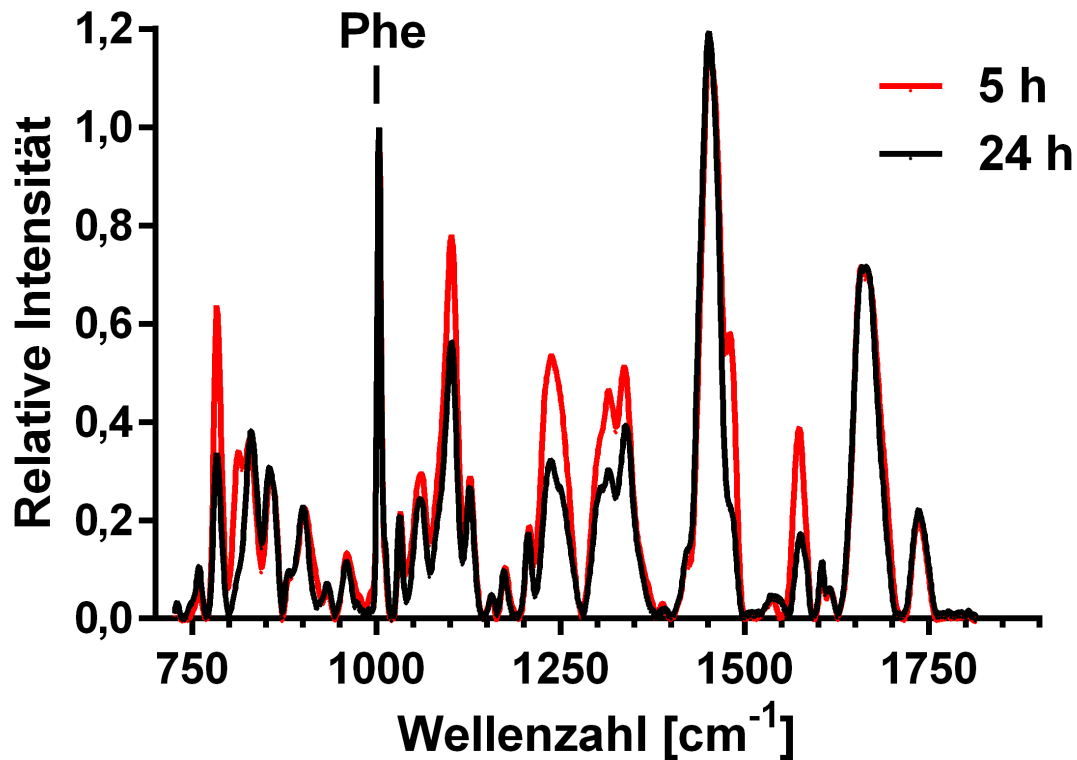


Abb. 5.18: Raman-Spektren von *R. eutropha*  $\Delta pptA$  nach 5 h und 24 h Kultivierung in NB Medium bei Anregung mit 785 nm. 2 ml Zellkultur wurde nach 5 h (rot) und 24 h (schwarz) Kultivierung in NB Medium zentrifugiert und einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, das Pellet auf einem CaF-Fenster getrocknet und mit dem InVia<sup>TM</sup> Reflex Raman Mikrospektrometer (Renishaw, Wotton-under-Edge, Großbritannien) mit einer Wellenlänge von 785 nm angeregt. Es wurden 60 Einzelspektren mit einer Belichtungszeit von 1 s aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung und drei technische Replikate gemittelt. Anschließend wurden die Signale gegen die Intensität des Phenylalaninsignals bei 1004 cm<sup>-1</sup> normalisiert.

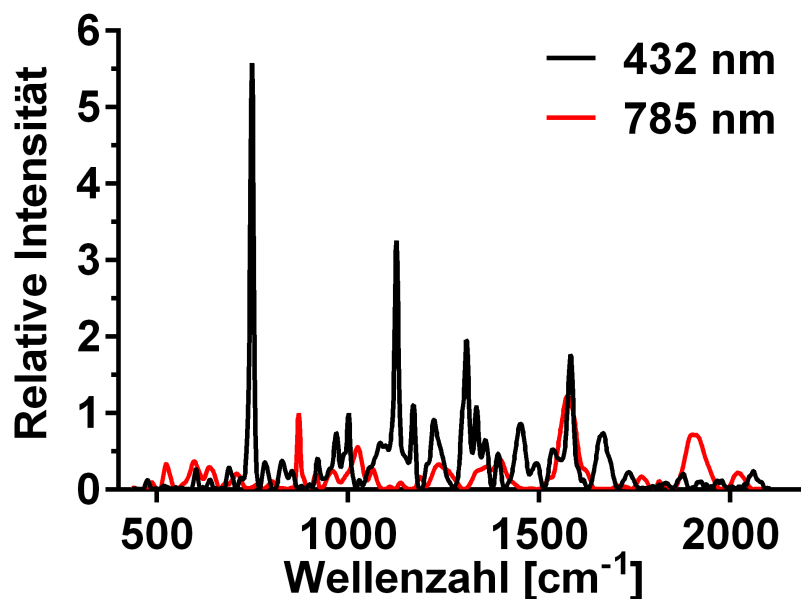


Abb. 5.19: Raman-Spektren von *R. eutropha* WT nach 24 h Kultivierung in NB Medium bei Anregung mit 785 nm oder 532 nm. 2 ml Zellkultur wurde nach 6 h (rot) und 24 h (schwarz) Kultivierung in NB Medium zentrifugiert und einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, das Pellet auf einem CaF-Fenster getrocknet und mit dem InVia™ Reflex Raman Mikrospektrometer (Renishaw, Wotton-under-Edge, Großbritannien) mit einer Wellenlänge von 785 nm oder 532 nm angeregt. Es wurden 60 Einzelspektren mit einer Belichtungszeit von 1 s aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung und drei technische Replikate gemittelt. Anschließend wurden die Signale gegen die Intensität des Phenylalaninsignals bei 1004 cm<sup>-1</sup> normalisiert.

Tab. 5.2: Rohdaten der Kalibriergeraden für die Gesamtphosphatbestimmung mittels Sb-Ascorbat-Assay und für den Kettenkonzentrationsassay zur Kettenlängenanalyse. Dargestellt sind die Mittelwerte der A<sub>882</sub> der KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Standards bzw. die Fluoreszenzintensität der Reportersubstanz NADPH (Anregung λ=340 nm, Emission λ=460 nm). Die Konzentration an NADPH ist proportional zur Pyrophosphatkonzentration.

| <b>Sb-Ascorbat-Assay</b>                      |       |       |       |       |       |       |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| c PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [μM]          | 0     | 20    | 65    | 110   | 155   | 200   |
| A <sub>882</sub>                              | 0,05  | 0,19  | 0,50  | 0,79  | 1,10  | 1,40  |
| <b>Kettenkonzentrationsassay</b>              |       |       |       |       |       |       |
| c P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>4-</sup> | 0     | 1     | 2,5   | 5     | 7,5   | 10    |
| FI (340/460)                                  | 13270 | 21580 | 34890 | 53320 | 73450 | 95460 |

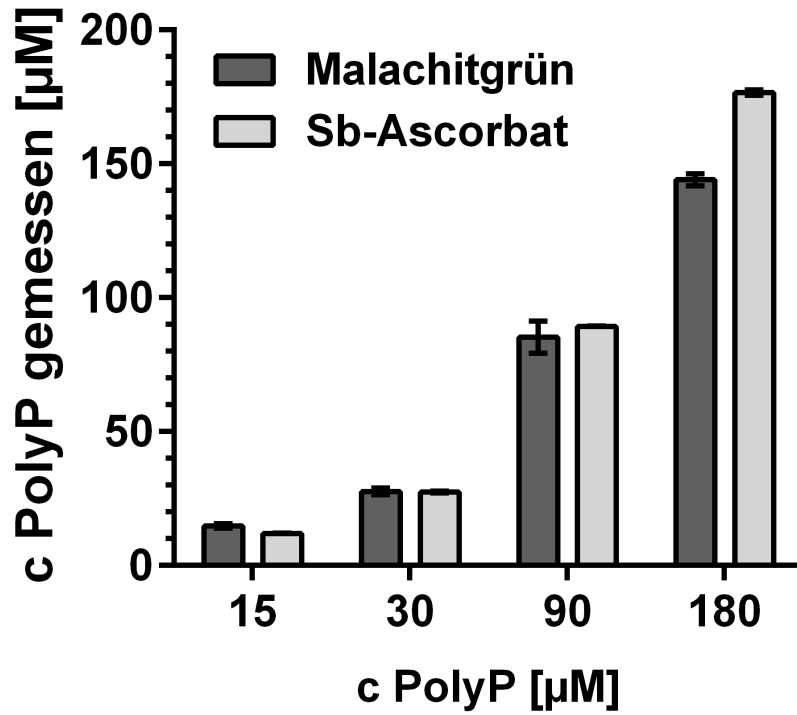


Abb. 5.20: Vergleich der PolyP-Konzentrationsbestimmung mit dem Malachitgrün- und dem Sb-Ascorbat-Assay. Der PolyP Standard S100 wurde in H<sub>2</sub>O auf die angegebenen Konzentrationen verdünnt, mit ScPPX verdaut und das Monophosphat mit dem Malachitgrün- und dem Sb-Ascorbat-Assay quantifiziert. Dargestellt sind Einzelmessungen mit technischen Triplikaten.

Tab. 5.3: Proteomanalyse der isolierten PolyP Granula von *R. eutropha*. Aufgeführt sind alle identifizierten Proteine mit Anzahl der zugeordneten Peptide und der prozentualen Abdeckung der Proteinsequenz, die mit diesen Peptiden erreicht wird für die *R. eutropha* Stämme WT,  $\Delta ppk-all$  und  $\Delta pptA$ .

| Protein fasta   | Peptide |                  | Sequenzabdeckung |                  |
|---|---------|------------------|------------------|------------------|
|   | WT      | $\Delta ppk-all$ | WT               | $\Delta ppk-all$ |
| tr Q0K6A1 Q0K6A1_CUPNH Outer membrane protein (Porin) A3402                                 | 25      | 27               | 66,7             | 66,7             |
| tr Q0KD16 Q0KD16_CUPNH Outer membrane protein A0788   | 18      | 18               | 75,6             | 75,6             |
| tr Q0K6W8 Q0K6W8_CUPNH Probable histone H1-like protein (Alanine/lysine-rich protein) A3178 | 4       | 5                | 18,4             | 18,4             |
| tr Q0KEC6 Q0KEC6_CUPNH Ysc84 domain-containing protein A0495                                | 14      | 16               | 74,2             | 76,8             |
| tr Q0KFI6 Q0KFI6_CUPNH Outer membrane protein (Porin) A0083                                 | 28      | 27               | 72,6             | 71               |
| tr Q0K6L3 Q0K6L3_CUPNH Outer membrane protein (Porin) A3284                                 | 18      | 21               | 56,5             | 66,8             |
| tr Q0KEE9 Q0KEE9_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component: PAAT family A0472       | 29      | 28               | 79,3             | 76,3             |
| tr Q0K5K4 Q0K5K4_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component A3660                    | 29      | 29               | 76,4             | 75,6             |
| tr Q0K538 Q0K538_CUPNH Porin, OmpW family GN=ompW2  | 12      | 12               | 45,8             | 57,9             |
| tr Q0K338 Q0K338_CUPNH TRAP-type transporter, periplasmic component B0794                   | 24      | 23               | 64,8             | 59,7             |
| tr Q0KAG0 Q0KAG0_CUPNH Glutaminase-asparaginase (Amidohydrolase) GN=ansA                    | 24      | 24               | 77,5             | 75,4             |
| tr Q0K0L0 Q0K0L0_CUPNH Outer membrane receptor, TonB dependent GN=fhuE                      | 44      | 48               | 70               | 73,7             |
| tr Q0K1T6 Q0K1T6_CUPNH Bacterial DNA-binding protein, histone-like B1248                    | 13      | 13               | 61,8             | 61,8             |
| tr Q0K8T5 Q0K8T5_CUPNH ABC-type sugar transporter, periplasmic component A2498              | 41      | 42               | 66,7             | 68,4             |
| tr Q0K7W6 Q0K7W6_CUPNH Peptidoglycan-associated protein GN=opL                              | 11      | 11               | 60,7             | 67,3             |
| tr Q7WXJ8 Q7WXJ8_CUPNH Probable ferrisiderophore receptor protein, TonB dependent GN=PHG126 | 36      | 33               | 81,7             | 81               |
| tr Q0K5N4 Q0K5N4_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component: HAAT family A3630       | 22      | 20               | 73,9             | 73,6             |
| tr Q0K8G3 Q0K8G3_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component: HAAT family GN=livK1    | 23      | 24               | 77,1             | 79               |
| tr Q0K7K1 Q0K7K1_CUPNH Outer membrane protein peptidoglycan-associated(Lipo)proteins A2944  | 8       | 6                | 56,1             | 44,8             |
| tr Q0K738 Q0K738_CUPNH Metalloregulation DNA-binding stress protein A3108                   | 13      | 12               | 59,6             | 59               |
| tr Q0K995 Q0K995_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component: CUT1 family A2330       | 26      | 26               | 59,6             | 60,3             |
| tr Q0K5K9 Q0K5K9_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component A3655                    | 15      | 16               | 58,7             | 64,2             |
| tr Q0K6J9 Q0K6J9_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component: Pept family A3298       | 37      | 36               | 75               | 78,4             |
| tr Q0K7B6 Q0K7B6_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component: HAAT family GN=livK2    | 31      | 30               | 78,8             | 76,5             |

| Protein fasta   | Peptide |                  | Sequenzabdeckung |                  |
|---|---------|------------------|------------------|------------------|
|   | WT      | $\Delta ppk-all$ | WT               | $\Delta ppk-all$ |
| tr Q0K6V8 Q0K6V8_CUPNH Hypothetical membrane spanning protein A3188                       | 7       | 8                | 49,5             | 63               |
| tr Q0KBG9 Q0KBG9_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component: HAAT family A1520     | 26      | 26               | 72,1             | 71,9             |
| tr Q0K943 Q0K943_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component A2383                  | 20      | 17               | 74,9             | 63,7             |
| tr Q0KE31 Q0KE31_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A0592                   | 21      | 24               | 71,7             | 80,7             |
| tr Q0KCZ6 Q0KCZ6_CUPNH Flp pilus assembly protein secretin CpaC GN=cpaC3                  | 22      | 23               | 60,3             | 61,7             |
| tr Q0KCX5 Q0KCX5_CUPNH Outer membrane protein (Porin) A1004                               | 17      | 16               | 51,5             | 48,7             |
| tr Q0K0V5 Q0K0V5_CUPNH Uncharacterized protein B1582                                      | 28      | 28               | 64,5             | 64,5             |
| tr Q0K6F6 Q0K6F6_CUPNH Saccharopine dehydrogenase [NADP+, L-glutamate-forming] A3346      | 19      | 20               | 59               | 64,6             |
| tr Q0K7H3 Q0K7H3_CUPNH Outer membrane cobalamin receptor, TonB dependent (BtuB) GN=btuB   | 35      | 39               | 72,8             | 82               |
| tr Q7WX00 Q7WX00_CUPNH SCP domain-containing protein GN=PHG342                            | 10      | 11               | 59,6             | 59,6             |
| tr Q0K9G7 Q0K9G7_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component A2257                  | 26      | 26               | 75,9             | 72,4             |
| tr Q0KB88 Q0KB88_CUPNH Uncharacterized protein A1601                                      | 18      | 17               | 54,5             | 50,8             |
| tr Q0K9X2 Q0K9X2_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component: Pept family GN=dppA1b | 29      | 31               | 68,7             | 71,6             |
| tr Q0JYT8 Q0JYT8_CUPNH Hypothetical lipoprotein B2304                                     | 17      | 17               | 63,1             | 63,1             |
| tr Q0KC03 Q0KC03_CUPNH TRAP-type transporter, periplasmic component A1328                 | 19      | 16               | 57,9             | 50               |
| tr Q0KD30 Q0KD30_CUPNH Rick_17kDa_Anti domain-containing protein A0946                    | 5       | 4                | 52,7             | 46,7             |
| tr Q0K6G1 Q0K6G1_CUPNH Uncharacterized protein A3341                                      | 6       | 5                | 64,2             | 54,1             |
| tr Q0K9K3 Q0K9K3_CUPNH Zn-dependent protease with chaperone function GN=hrpX1             | 12      | 12               | 56,7             | 60,4             |
| tr Q0KBA9 Q0KBA9_CUPNH Hypothetical membrane associated protein A1580                     | 9       | 8                | 51,6             | 51,6             |
| tr Q0K8F2 Q0K8F2_CUPNH Hypothetical membrane associated protein A2637                     | 8       | 6                | 66,5             | 61,1             |
| tr Q0KCN2 Q0KCN2_CUPNH Gamma-glutamyltransferase 1 A1098                                  | 34      | 33               | 63,6             | 62,5             |
| tr Q0KBT6 Q0KBT6_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component A1399                  | 15      | 15               | 64               | 64               |
| tr Q0KCT9 Q0KCT9_CUPNH Uncharacterized protein containing LysM domain A1040               | 12      | 11               | 68,3             | 68,3             |
| tr Q0K3W8 Q0K3W8_CUPNH Outer membrane receptor, TonB dependent B0509                      | 35      | 38               | 59,5             | 64,5             |
| tr Q0K952 Q0K952_CUPNH Metallopeptidase, M23B subfamily A2374                             | 11      | 12               | 48,3             | 49               |

| Protein fasta   | Peptide |                  | Sequenzabdeckung |                  |
|---|---------|------------------|------------------|------------------|
|   | WT      | $\Delta ppk-all$ | WT               | $\Delta ppk-all$ |
| sp P39185 NAPA_CUPNH Periplasmic nitrate reductase GN=napa                                  | 44      | 44               | 58,5             | 53,7             |
| tr Q0K941 Q0K941_CUPNH Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase<br>GN=hmgLi                          | 1       | 2                | 5                | 9,3              |
| tr Q0K6W4 Q0K6W4_CUPNH Outer membrane receptor, TonB<br>dependent A3182                     | 25      | 23               | 77,7             | 76,4             |
| tr Q0KA24 Q0KA24_CUPNH Outer membrane protein assembly<br>factor BamA GN=bamA               | 46      | 48               | 63,5             | 66,7             |
| tr Q0KBQ3 Q0KBQ3_CUPNH Outer membrane protein assembly<br>factor BamD GN=bamD               | 13      | 11               | 52,2             | 44,9             |
| sp Q0K9U5 Y2129_CUPNH UPRF0173 metal-dependent hydrolase<br>H16_A2129 A2129                 | 13      | 12               | 68,2             | 68,2             |
| tr Q0JZG6 Q0JZG6_CUPNH Integral membrane protein B2076                                      | 12      | 9                | 38,2             | 28,3             |
| tr Q0K5H6 Q0K5H6_CUPNH TRAP-type transporter, periplasmic<br>component A3688                | 15      | 14               | 56,3             | 54               |
| tr Q0K6E7 Q0K6E7_CUPNH Cation/multidrug efflux system outer<br>membrane porin GN=acrC6      | 18      | 16               | 50,2             | 49,8             |
| tr Q0JZN4 Q0JZN4_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic<br>component: HAAT family GN=livK3 | 20      | 20               | 72,4             | 72,4             |
| tr Q0K965 Q0K965_CUPNH Outer membrane protein assembly factor<br>BamB GN=bamB               | 22      | 20               | 71,1             | 62,4             |
| tr Q0JZ40 Q0JZ40_CUPNH Uncharacterized protein B2202  | 10      | 8                | 43,8             | 38,1             |
| tr Q0K559 Q0K559_CUPNH Hypothetical periplasmic protein B0059                               | 19      | 18               | 48               | 43,6             |
| tr Q0WXT8 Q0WXT8_CUPNH Putative TonB-dependent outer<br>membrane receptor GN=PHG028         | 40      | 37               | 62,3             | 61,4             |
| tr Q0KFL2 Q0KFL2_CUPNH DUF4382 domain-containing protein<br>A0057                           | 9       | 9                | 43,6             | 43,6             |
| sp Q0KA27 FABZ_CUPNH 3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein]<br>dehydratase FabZ GN=fabZ       | 10      | 10               | 52,3             | 51,7             |
| tr Q0KF71 Q0KF71_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute<br>receptor A0198                  | 15      | 12               | 61,6             | 52,7             |
| tr Q0JZG7 Q0JZG7_CUPNH Hypothetical membrane associated<br>protein B2075                    | 13      | 9                | 59,5             | 33,6             |
| tr Q0KAG4 Q0KAG4_CUPNH Citrate synthase GN=prpC1  | 3       | 3                | 71,7             | 77,4             |
| tr Q0KEY1 Q0KEY1_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic<br>component: HAAT family A0289    | 24      | 22               | 60,9             | 50,1             |
| sp Q0K5Z9 EFTU_CUPNH Elongation factor Tu GN=tufl   | 21      | 28               | 63,6             | 80,3             |
| tr Q0K7C4 Q0K7C4_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic<br>component A3022                 | 14      | 14               | 54,3             | 52,8             |
| tr Q0K8E0 Q0K8E0_CUPNH Methyl-accepting chemotaxis protein<br>A2651                         | 2       | 1                | 13,7             | 4                |
| sp Q0K5M7 ATPB_CUPNH ATP synthase subunit beta GN=atpD                                      | 24      | 24               | 63,8             | 65,3             |
| tr Q0K6B9 Q0K6B9_CUPNH DUF2846 domain-containing protein<br>A3383                           | 11      | 10               | 72,4             | 72,4             |
| sp Q59105 NOSZ_CUPNH Nitrous-oxide reductase GN=nosZ  | 35      | 34               | 56,8             | 52,7             |
| tr Q0K147 Q0K147_CUPNH Outer membrane receptor, TonB<br>dependent B1489                     | 36      | 37               | 54,8             | 57,6             |
| tr Q0K655 Q0K655_CUPNH Uncharacterized protein conserved in<br>bacteria A3448               | 3       | 3                | 27,4             | 27,4             |

| Protein fasta   | Peptide |                         | Sequenzabdeckung |                         |
|---|---------|-------------------------|------------------|-------------------------|
|   | WT      | $\Delta ppk\text{-}all$ | WT               | $\Delta ppk\text{-}all$ |
| tr Q0K5D4 Q0K5D4_CUPNH Outer membrane efflux protein A3731                            | 24      | 23                      | 53,5             | 58,4                    |
| tr Q0K7R5 Q0K7R5_CUPNH Heat shock protein GN=hsLJ                                     | 12      | 10                      | 51,8             | 46,7                    |
| tr Q0K7G5 Q0K7G5_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A2980               | 12      | 12                      | 50,1             | 52,2                    |
| tr Q0KCC5 Q0KCC5_CUPNH Uncharacterized lipoprotein A1205                              | 21      | 20                      | 57,6             | 57,8                    |
| tr Q0KEW8 Q0KEW8_CUPNH D-Alanyl-D-alanine carboxypeptidase (Serine-type) GN=dac       | 17      | 15                      | 50,6             | 49,9                    |
| tr Q0K8F1 Q0K8F1_CUPNH Aconitate hydratase GN=acnA                                    | 34      | 41                      | 50,5             | 61,2                    |
| tr Q0KE45 Q0KE45_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component: HAAT family A0577 | 15      | 14                      | 52,3             | 58,4                    |
| sp Q0K5M5 ATPA_CUPNH ATP synthase subunit alpha GN=atpA                               | 22      | 24                      | 47,6             | 50,5                    |
| tr Q0JYB6 Q0JYB6_CUPNH Outer membrane receptor, TonB dependent B2476                  | 31      | 26                      | 61,2             | 51,1                    |
| tr Q0KEE6 Q0KEE6_CUPNH ABC-type transporter, ATPase component: PAAAT family A0475     | 8       | 9                       | 36,5             | 42,2                    |
| tr Q0K5M2 Q0K5M2_CUPNH ATP synthase subunit c GN=atpE                                 | 2       | 2                       | 20,5             | 20,5                    |
| tr Q0KBB0 Q0KBB0_CUPNH Hypothetical membrane spanning protein A1579                   | 3       | 4                       | 25,2             | 33,8                    |
| tr Q0JZC6 Q0JZC6_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor B2116               | 12      | 12                      | 56               | 56                      |
| tr Q0K5T6 Q0K5T6_CUPNH Predicted periplasmic or secreted lipoprotein A3577            | 10      | 10                      | 39,2             | 35                      |
| tr Q0K307 Q0K307_CUPNH Uncharacterized protein B0825                                  | 9       | 8                       | 62,7             | 62,7                    |
| tr Q0KBV4 Q0KBV4_CUPNH Phasin GN=phaP1  | 11      | 11                      | 78,6             | 78,6                    |
| tr Q0K8H2 Q0K8H2_CUPNH Tfp pilus assembly protein FfmV GN=fimV                        | 27      | 24                      | 36,5             | 32,1                    |
| tr Q0K5J4 Q0K5J4_CUPNH Porin, OmpW family GN=ompW1                                    | 6       | 6                       | 31,7             | 31,7                    |
| tr Q0KE72 Q0KE72_CUPNH Type IV pilus structural subunit Pila GN=pilA                  | 1       | 1                       | 7,3              | 7,3                     |
| tr Q0K5E1 Q0K5E1_CUPNH Dihydroliipoamide dehydrogenase GN=lpdaA                       | 17      | 10                      | 40,7             | 23,7                    |
| sp Q0K5M3 ATPF_CUPNH ATP synthase subunit b GN=atpF                                   | 14      | 15                      | 54,5             | 60,3                    |
| tr Q0K7M4 Q0K7M4_CUPNH Phosphoenolpyruvate carboxylase GN=ppc                         | 46      | 48                      | 50,4             | 57                      |
| tr Q7WX55 Q7WX55_CUPNH Histone-like protein GN=PHG287                                 | 9       | 7                       | 59,9             | 63,3                    |
| tr Q0K8S0 Q0K8S0_CUPNH Hypothetical membrane associated protein A2513                 | 4       | 4                       | 20,7             | 20,7                    |
| tr Q0KBS2 Q0KBS2_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component A1414              | 17      | 18                      | 45               | 53                      |
| tr Q0K7E2 Q0K7E2_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component: HAAT family A3003 | 14      | 15                      | 48,2             | 50                      |
| tr Q0KFC5 Q0KFC5_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A0144               | 12      | 11                      | 54,5             | 50,3                    |
| tr Q0JY22 Q0JY22_CUPNH Outer membrane receptor for Fe(III)-dicitrate GN=fecA          | 24      | 22                      | 42,6             | 40,4                    |
| tr Q0KFA8 Q0KFA8_CUPNH Thioli:disulfide interchange protein A0161                     | 10      | 13                      | 44,1             | 53,1                    |
| tr Q0K7W5 Q0K7W5_CUPNH Tol-Pal system protein TolB GN=tolB                            | 16      | 16                      | 39,6             | 47                      |
| sp Q0KDB7 CH60_CUPNH 60 kDa chaperonin GN=groL  | 27      | 33                      | 56,7             | 66,9                    |
| tr Q0K3W5 Q0K3W5_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor B0512               | 14      | 12                      | 60,5             | 41,3                    |
| tr Q0K2A4 Q0K2A4_CUPNH Outer membrane protein V B1079                                 | 13      | 11                      | 58,4             | 49,3                    |

## 5. Anhang

| Protein faeta   | Peptide |                         | Sequenzabdeckung |                         |
|---|---------|-------------------------|------------------|-------------------------|
|   | WT      | $\Delta ppk\text{-}all$ | WT               | $\Delta ppk\text{-}all$ |
| tr Q0K3V2 Q0K3V2_CUPNH Uncharacterized conserved protein B0525                        | 21      | 20                      | 53,9             | 51,5                    |
| tr Q7WXT9 Q7WXT9_CUPNH Fructose-1,6-bisphosphate GN=PHG027                            | 9       | 10                      | 53,4             | 65,2                    |
| tr Q0KDK2 Q0KDK2_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component: PAAT family A0772 | 14      | 11                      | 67,4             | 59,7                    |
| tr Q0KE13 Q0KE13_CUPNH Superoxide dismutase GN=soda                                   | 2       | 6                       | 11,4             | 43                      |
| tr Q0KD44 Q0KD44_CUPNH Dehydrogenase with different specificities A0931               | 13      | 7                       | 57,3             | 41,2                    |
| tr Q0K6Z9 Q0K6Z9_CUPNH Transketolase GN=ttkA  | 22      | 29                      | 44,5             | 56,4                    |
| tr Q0K820 Q0K820_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A2772               | 9       | 6                       | 40,5             | 31,7                    |
| tr Q0K565 Q0K565_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor B0053               | 12      | 13                      | 57,5             | 57,2                    |
| tr Q0K716 Q0K716_CUPNH NAD(P) transhydrogenase subunit alpha 2 GN=pntAb3              | 2       | 2                       | 10,6             | 10,6                    |
| tr Q0K7X5 Q0K7X5_CUPNH Glutaryl-CoA dehydrogenase GN=gcdH                             | 14      | 13                      | 45,3             | 41,3                    |
| tr Q0KFF6 Q0KFF6_CUPNH Rod shape-determining protein MreB GN=mreB                     | 11      | 12                      | 37,2             | 37,5                    |
| tr Q0JYD6 Q0JYD6_CUPNH Transcriptional regulator, GntR-family B2456                   | 1       | 1                       | 3,9              | 3,9                     |
| tr Q0K283 Q0K283_CUPNH Outer membrane receptor, TonB dependent B1100                  | 32      | 30                      | 57,3             | 53,2                    |
| tr Q0K942 Q0K942_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A2384               | 10      | 13                      | 40,2             | 56,8                    |
| tr Q0KF14 Q0KF14_CUPNH Site-determining protein A0085                                 | 12      | 13                      | 61,3             | 61,6                    |
| sp Q0KEB0 LPTD_CUPNH LPS-assembly protein LptD GN=lptD                                | 37      | 32                      | 51,8             | 46,4                    |
| tr Q0K708 Q0K708_CUPNH LPS-assembly lipoprotein LptE GN=lptE                          | 6       | 6                       | 45               | 44,4                    |
| tr Q0K704 Q0K704_CUPNH Outer membrane protein assembly factor BamE GN=bamE            | 9       | 9                       | 64,7             | 67,6                    |
| tr Q0K5K2 Q0K5K2_CUPNH ABC-type transporter, ATPase component: HAAT family            | 9       | 9                       | 38               | 41,9                    |
| tr Q0KD40 Q0KD40_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component A0935              | 17      | 17                      | 55,4             | 53                      |
| tr Q0KA35 Q0KA35_CUPNH Membrane protease subunits, stomatin/prohibitin homologs A2036 | 12      | 12                      | 52,3             | 52,3                    |
| sp Q0K7F5 AMPA_CUPNH Probable cytosol aminopeptidase GN=pepA                          | 23      | 28                      | 49,6             | 62,1                    |
| tr Q0KBM6 Q0KBM6_CUPNH Peroxiredoxin A1460  | 8       | 14                      | 54,4             | 80,2                    |
| tr Q0JZK8 Q0JZK8_CUPNH Uncharacterized protein B2034                                  | 14      | 11                      | 40,4             | 37,8                    |
| tr Q0K742 Q0K742_CUPNH Type IV pilus twitching motility protein PilT GN=pilT          | 17      | 19                      | 55,9             | 67,4                    |
| tr Q0K273 Q0K273_CUPNH Superoxide dismutase [Cu-Zn] B1110                             | 3       | 4                       | 27,4             | 31,6                    |
| tr Q0K8M8 Q0K8M8_CUPNH Periplasmic serine endoprotease DegP-like A2560                | 18      | 18                      | 42,1             | 42,5                    |
| tr Q0KCM2 Q0KCM2_CUPNH Uncharacterized protein A1108                                  | 8       | 5                       | 39,5             | 28,6                    |
| tr Q0K5E7 Q0K5E7_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor                     | 10      | 14                      | 45,3             | 50,3                    |
| tr Q0K255 Q0K255_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component: Pept family B1128 | 21      | 21                      | 51,4             | 51,4                    |
| tr Q0K788 Q0K788_CUPNH Uncharacterized protein A3058                                  | 1       | 1                       | 16,4             | 16,4                    |
| tr Q0K9U7 Q0K9U7_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component: MUTfamily A2125   | 11      | 10                      | 68,9             | 62,3                    |



| Protein fasta   | Peptide |                   | Sequenzabdeckung |                   |
|---|---------|-------------------|------------------|-------------------|
|   | WT      | $\Delta pphk-all$ | WT               | $\Delta pphk-all$ |
| tr Q0KXCX8 Q0KXCX8_CUPNH DUF4136 domain-containing protein A1001                        | 7       | 6                 | 32,9             | 28                |
| tr Q0KEE8 Q0KEE8_CUPNH ABC-type transporter, permease component: PAAT family A0473      | 7       | 6                 | 33,5             | 26                |
| tr Q0K6E5 Q0K6E5_CUPNH Cation/multidrug efflux system GN=acrA6                          | 15      | 16                | 48,2             | 53,5              |
| tr Q0K0V0 Q0K0V0_CUPNH Hypothetical membrane associated protein B1587                   | 5       | 6                 | 28,8             | 35,2              |
| tr Q0K4T8 Q0K4T8_CUPNH Flp pilus assembly protein, secretin GN=cpaC2                    | 15      | 15                | 46,2             | 45,1              |
| tr Q0K5K3 Q0K5K3_CUPNH ABC-type transporter   | 10      | 11                | 46,9             | 54,4              |
| tr Q0K8G0 Q0K8G0_CUPNH Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit GN=sdhB              | 12      | 11                | 52,4             | 48,5              |
| tr Q0K9A7 Q0K9A7_CUPNH Cbb3-type cytochrome oxidase GN=ccoO                             | 8       | 10                | 40,9             | 54,5              |
| tr Q0K0Q7 Q0K0Q7_CUPNH Uncharacterized protein B1632                                    | 27      | 38                | 37,9             | 56                |
| sp P27746 ACOB_CUPNH Acetoin:2,6-dichlorophenolindophenol oxidoreductase GN=acoB SV=3   | 12      | 13                | 40,5             | 47,9              |
| tr Q0JZK7 Q0JZK7_CUPNH Uncharacterized protein B2035                                    | 19      | 15                | 64               | 56,3              |
| tr Q0K4M4 Q0K4M4_CUPNH Outer membrane lipoprotein GN=esgG                               | 7       | 9                 | 39,4             | 50,4              |
| tr Q0KB87 Q0KB87_CUPNH Arylsulfatase A or related enzyme A1602                          | 18      | 15                | 33,3             | 32,3              |
| tr Q0K9L1 Q0K9L1_CUPNH Non-heme haloperoxidase A2213                                    | 7       | 7                 | 37               | 42,9              |
| sp Q0K634 RL6_CUPNH 50S ribosomal protein L6 GN=rpL6                                    | 10      | 12                | 67,2             | 77,4              |
| tr Q0K732 Q0K732_CUPNH Sec translocon accessory complex subunit YajC GN=yajC            | 1       | 2                 | 12               | 19,4              |
| tr Q0K7R6 Q0K7R6_CUPNH Cation/multidrug efflux system outer membrane porin GN=acrC5     | 20      | 15                | 41,2             | 37,6              |
| tr Q0K9A6 Q0K9A6_CUPNH Cbb3-type cytochrome oxidase, subunit I GN=ccoN                  | 6       | 6                 | 15,4             | 15,4              |
| sp Q0K604 RL10_CUPNH 50S ribosomal protein L10 GN=rpLJ                                  | 1       | 3                 | 5,8              | 14,5              |
| sp P27745 ACOA_CUPNH Acetoin:2,6-dichlorophenolindophenol oxidoreductase GN=acoA SV=3   | 12      | 13                | 51,1             | 56,2              |
| tr Q0JY48 Q0JY48_CUPNH Putative periplasmic esterase or lipase GN=rssA                  | 25      | 21                | 46,6             | 41,1              |
| tr Q0KFM2 Q0KFM2_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component: PAAT family GN=hisJ | 17      | 17                | 56,2             | 59                |
| tr Q0KB11 Q0KB11_CUPNH TRAP-type transporter, periplasmic component A1508               | 12      | 12                | 37,7             | 40,2              |
| tr Q0K361 Q0K361_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor B0766                 | 10      | 10                | 37               | 35,8              |
| tr Q0K1W2 Q0K1W2_CUPNH Uncharacterized protein B1222                                    | 5       | 6                 | 24,4             | 31,9              |
| tr Q0K186 Q0K186_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor B1450                 | 8       | 8                 | 27,6             | 38,2              |
| tr Q0K667 Q0K667_CUPNH Pili assembly protein PilQ GN=pilQ2                              | 20      | 25                | 35,4             | 40,9              |
| tr Q0K206 Q0K206_CUPNH Bd-type quinol oxidase subunit II GN=cydA1                       | 11      | 11                | 26,6             | 26,6              |
| tr Q0K2A0 Q0K2A0_CUPNH 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase GN=hpd                       | 13      | 19                | 39               | 61,8              |
| sp P14697 PHAB_CUPNH Acetoacetyl-CoA reductase GN=phaB                                  | 8       | 9                 | 38,2             | 42,7              |
| tr Q0KE88 Q0KE88_CUPNH Universal stress protein, UspA family A0533                      | 6       | 6                 | 49,7             | 49,7              |
| tr Q0K8E7 Q0K8E7_CUPNH ABC-type transporter A2642                                       | 24      | 18                | 54,1             | 41,6              |
| tr Q0JZM1 Q0JZM1_CUPNH Phasin (PHA-granule associated protein) GN=phaP4                 | 6       | 10                | 37,6             | 47,6              |

| Protein faeta  | Peptide |                         | Sequenzabdeckung |                         |
|--|---------|-------------------------|------------------|-------------------------|
|  | WT      | $\Delta ppk\text{-}all$ | WT               | $\Delta ppk\text{-}all$ |
| tr Q0K813 Q0K813_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A2779                    | 10      | 10                      | 48,9             | 46,5                    |
| sp P52993 ODO2_CUPNH Succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase         | 13      | 9                       | 39,7             | 29,3                    |
| tr Q0KBB5 Q0KBB5_CUPNH Ankyrin repeat protein containing three repeats GN=arp3             | 14      | 14                      | 63,9             | 60,8                    |
| tr Q0K7X3 Q0K7X3_CUPNH Uncharacterized conserved protein A2820                             | 3       | 4                       | 31,5             | 43,5                    |
| tr Q0K817 Q0K817_CUPNH Hypothetical membrane spanning protein A2775                        | 3       | 3                       | 7,4              | 6                       |
| tr Q0K7G8 Q0K7G8_CUPNH Predicted periplasmic or secreted protein A2977                     | 5       | 6                       | 28               | 33,2                    |
| tr Q0K6A6 Q0K6A6_CUPNH Cytochrome b GN=qcrB  | 5       | 5                       | 11,8             | 13,3                    |
| tr Q0K6A7 Q0K6A7_CUPNH Ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome c1 GN=qcrC             | 8       | 8                       | 28,7             | 32                      |
| tr Q0K8Q2 Q0K8Q2_CUPNH TonB-like protein, links inner and outer membranes A2532            | 7       | 7                       | 40,2             | 40,2                    |
| tr Q0K8F9 Q0K8F9_CUPNH Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit GN=sdhA                | 21      | 21                      | 47,5             | 45,9                    |
| tr Q0K743 Q0K743_CUPNH Type IV pilus twitching motility protein PilU GN=pilU               | 11      | 12                      | 36,1             | 43,5                    |
| tr Q0K2M0 Q0K2M0_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component B0963                   | 16      | 11                      | 52,1             | 35,1                    |
| sp Q0K9H3 HBOH_CUPNH D-(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase GN=pbaZ2                   | 17      | 20                      | 29,7             | 38,7                    |
| tr Q0K976 Q0K976_CUPNH Ribonuclease R GN=vacB  | 36      | 15                      | 44               | 24,3                    |
| tr Q0KCH6 Q0KCH6_CUPNH Uncharacterized protein A1154                                       | 5       | 3                       | 67,5             | 40                      |
| tr Q0KEF0 Q0KEF0_CUPNH Glutamate dehydrogenase GN=gdhA1                                    | 12      | 16                      | 37,5             | 47,4                    |
| tr Q0K6W9 Q0K6W9_CUPNH Outer membrane lipoprotein A3177                                    | 3       | 2                       | 14,8             | 14,2                    |
| tr Q0KCT7 Q0KCT7_CUPNH Putative lipoprotein A1042  | 6       | 4                       | 44               | 29,7                    |
| tr Q0K6I8 Q0K6I8_CUPNH Membrane-bound lytic murein transglycosylase GN=mltA                | 17      | 11                      | 58,2             | 38,4                    |
| sp Q0KA16 RS2_CUPNH 30S ribosomal protein S2 GN=rpsB                                       | 11      | 13                      | 46,4             | 55,2                    |
| tr Q0K0Q3 Q0K0Q3_CUPNH Uncharacterized protein B1636                                       | 9       | 9                       | 38,4             | 40,7                    |
| tr Q0K6P8 Q0K6P8_CUPNH Hypothetical periplasmic protein A3248                              | 5       | 6                       | 33,7             | 37,3                    |
| tr Q0JYB9 Q0JYB9_CUPNH Exoenzymes regulatory protein aepA B2473                            | 19      | 15                      | 43,3             | 34,8                    |
| tr Q0KEC5 Q0KEC5_CUPNH Uncharacterized protein A0496                                       | 9       | 9                       | 49,7             | 49,7                    |
| tr Q0JZ38 Q0JZ38_CUPNH Glyco_114 domain-containing protein B2204                           | 32      | 25                      | 42,1             | 32,4                    |
| tr Q0KEJ4 Q0KEJ4_CUPNH L-threonine dehydratase GN=ilvA                                     | 19      | 26                      | 45,1             | 57,2                    |
| tr Q0K960 Q0K960_CUPNH Type IV pilus biogenesis protein PilF GN=pilF                       | 9       | 9                       | 46,3             | 53,7                    |
| tr Q0K9F4 Q0K9F4_CUPNH ATPase related to phosphate starvation-inducible protein PhoH A2270 | 17      | 8                       | 39,3             | 20,1                    |
| tr Q0K340 Q0K340_CUPNH TRAP-type transporter, large permease component B0792               | 3       | 3                       | 6,3              | 5,8                     |
| tr Q0K6R3 Q0K6R3_CUPNH Uncharacterized protein A3233                                       | 12      | 12                      | 41               | 41                      |
| tr Q0KIU6 Q0KIU6_CUPNH Acid phosphatase B1238  | 10      | 7                       | 45,4             | 33,5                    |

| Protein fasta  | Peptide |                  | Sequenzabdeckung |                  | $\Delta pptA$ | $\Delta pptA$ | $\Delta pptA$ |
|--|---------|------------------|------------------|------------------|---------------|---------------|---------------|
|  | WT      | $\Delta ppk-all$ | WT               | $\Delta ppk-all$ |               |               |               |
| sp Q0KED9 RL13_CUPNH 50S ribosomal protein L13 GN=rpIM                               | 4       | 3                | 34,5             | 28,2             | 34,5          | 34,5          |               |
| tr Q0KA41 Q0KA41_CUPNH Inosine-5-monophosphate dehydrogenase GN=guaB                 | 18      | 33               | 47,8             | 79,9             | 38,6          | 38,6          |               |
| sp Q59106 OD01_CUPNH 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component GN=odhA               | 27      | 23               | 32,8             | 27,4             | 40,5          | 40,5          |               |
| tr Q0K700 Q0K700_CUPNH Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GN=gapa              | 13      | 19               | 44               | 59,6             | 41,6          | 41,6          |               |
| tr Q0JZR6 Q0JZR6_CUPNH Outer membrane receptor, TonB dependent B1976                 | 20      | 19               | 40,1             | 39,1             | 48,8          | 48,8          |               |
| tr Q0K818 Q0K818_CUPNH 30S ribosomal protein S21 GN=rpsU                             | 2       | 2                | 34,3             | 34,3             | 34,3          | 34,3          |               |
| tr Q0K679 Q0K679_CUPNH Surface lipoprotein, VacJ-like GN=vacJ                        | 6       | 5                | 26,3             | 21,1             | 26,9          | 26,9          |               |
| tr Q0K5W9 Q0K5W9_CUPNH General secretion pathway protein D GN=gspD                   | 17      | 16               | 29,6             | 27,3             | 34,2          | 34,2          |               |
| tr Q0KER7 Q0KER7_CUPNH Cytochrome oxidase assembly protein, Sco1/SenC family GN=sco2 | 5       | 6                | 35,9             | 47,1             | 52,9          | 52,9          |               |
| tr Q0JZ39 Q0JZ39_CUPNH Uncharacterized protein B2203                                 | 44      | 42               | 38,9             | 37,2             | 40            | 40            |               |
| sp Q0KDR8 CH10_CUPNH 10 kDa chaperonin GN=gros                                       | 6       | 7                | 71,9             | 51               | 51            | 51            |               |
| tr Q0KEA9 Q0KEA9_CUPNH Chaperone SurA GN=surA  | 15      | 19               | 31,6             | 39,3             | 30,3          | 30,3          |               |
| sp Q0K625 RS3_CUPNH 30S ribosomal protein S3 GN=rpsC                                 | 9       | 14               | 31,3             | 45,3             | 37,4          | 37,4          |               |
| tr Q0KDG1 Q0KDG1_CUPNH Lipoprotein A0813   | 11      | 11               | 50,6             | 50,9             | 47,9          | 47,9          |               |
| tr Q0KCY8 Q0KCY8_CUPNH Outer membrane protein A0990                                  | 8       | 9                | 35,7             | 37               | 44,8          | 44,8          |               |
| sp Q0K622 RL2_CUPNH 50S ribosomal protein L2 GN=rpIB                                 | 9       | 12               | 36,2             | 45,7             | 44,2          | 44,2          |               |
| tr Q0K6L2 Q0K6L2_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A3285              | 7       | 9                | 33,3             | 49,2             | 45,6          | 45,6          |               |
| tr Q0K6F5 Q0K6F5_CUPNH Uncharacterized protein conserved in bacteria A0204           | 4       | 4                | 41,4             | 41,4             | 30,2          | 30,2          |               |
| sp Q0K5M6 ATPG_CUPNH ATP synthase gamma chain GN=atpG                                | 8       | 11               | 33,3             | 43,6             | 36,4          | 36,4          |               |
| tr Q0K6M8 Q0K6M8_CUPNH Cell division protein FtsA GN=ftsA                            | 15      | 15               | 39,8             | 40,2             | 32,2          | 32,2          |               |
| tr Q0K7W2 Q0K7W2_CUPNH Tol-Pal system protein TolQ GN=exbB2                          | 4       | 2                | 14,1             | 10,1             | 10,1          | 10,1          |               |
| tr Q0KEQ6 Q0KEQ6_CUPNH Predicted Zn-dependent peptidase, M16B subfamily A0364        | 14      | 12               | 35               | 28               | 34,6          | 34,6          |               |
| tr Q0KCF50 Q0KCF50_CUPNH Peptidase family M48 A0219                                  | 7       | 5                | 31,9             | 21,2             | 38,1          | 38,1          |               |
| tr Q0K715 Q0K715_CUPNH NAD(P) transhydrogenase subunit beta GN=pntB3                 | 4       | 5                | 8,8              | 8,8              | 14,5          | 14,5          |               |
| sp Q0KED8 RS9_CUPNH 30S ribosomal protein S9 GN=rpsI                                 | 5       | 6                | 48,5             | 54,6             | 48,5          | 48,5          |               |
| tr Q0KPF8 Q0KPF8_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A0091              | 12      | 9                | 47,8             | 35,1             | 38,5          | 38,5          |               |
| sp Q0KE75 SUCC_CUPNH Succinate-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta GN=sucC         | 13      | 17               | 39,7             | 57,5             | 38,7          | 38,7          |               |
| tr Q0KBD4 Q0KBD4_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A1555              | 8       | 7                | 24,5             | 28,1             | 24,5          | 24,5          |               |
| tr Q0K8Q1 Q0K8Q1_CUPNH Biopolymer transport protein GN=exbB1                         | 2       | 2                | 13,2             | 13,2             | 22,7          | 22,7          |               |
| tr Q0KFA9 Q0KFA9_CUPNH Cell division protein ftsN A0160                              | 7       | 8                | 36,1             | 36,1             | 44,4          | 44,4          |               |
| tr Q0K969 Q0K969_CUPNH Protein Hfk GN=hfkC2  | 11      | 13               | 29,8             | 37,3             | 35,8          | 35,8          |               |
| sp Q0K698 TATA_CUPNH Sec-independent protein translocase protein TatA GN=tatA        | 2       | 1                | 27,3             | 13               | 27,3          | 27,3          |               |

## 5. Anhang

| Protein fasta   | WT |                         | Peptide<br>$\Delta ppk\text{-}all$ |                         | $\Delta pptA$ |                         | Sequenzabdeckung |                         |
|---|----|-------------------------|------------------------------------|-------------------------|---------------|-------------------------|------------------|-------------------------|
|   | WT | $\Delta ppk\text{-}all$ | WT                                 | $\Delta ppk\text{-}all$ | WT            | $\Delta ppk\text{-}all$ | WT               | $\Delta ppk\text{-}all$ |
| sp Q0K629 RL14_CUPNH 50S ribosomal protein L14 GN=rplN                                    | 4  | 4                       | 5                                  | 4                       | 32,8          | 34,4                    | 41,8             | 34,4                    |
| sp Q0K643 RS11_CUPNH 30S ribosomal protein S11 GN=rpsK                                    | 3  | 5                       | 4                                  | 4                       | 29,5          | 47,7                    | 30,3             | 47,7                    |
| tr Q0KFF9 Q0KFF9_CUPNH Uncharacterized protein A0110                                      | 6  | 7                       | 7                                  | 7                       | 37,8          | 34                      | 34               | 34                      |
| tr Q0K970 Q0K970_CUPNH Protein HHC GN=hfC1  | 13 | 11                      | 11                                 | 11                      | 42,4          | 37,4                    | 35,4             | 37,4                    |
| tr Q0K9C2 Q0K9C2_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A2303                   | 12 | 11                      | 11                                 | 11                      | 49,7          | 47,3                    | 44,8             | 47,3                    |
| sp P52992 DLDH_CUPNH Dihydrolypoyl dehydrogenase GN=odhL                                  | 12 | 10                      | 15                                 | 10                      | 32,1          | 26,4                    | 42,2             | 26,4                    |
| tr Q0K4S1 Q0K4S1_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor B0202                   | 7  | 5                       | 5                                  | 5                       | 27,8          | 25,4                    | 25,4             | 25,4                    |
| tr Q0K1V5 Q0K1V5_CUPNH Glucans biosynthesis protein G GN=opgG                             | 17 | 18                      | 17                                 | 18                      | 32,9          | 36,2                    | 32,7             | 36,2                    |
| tr Q0KE54 Q0KE54_CUPNH Fructose-1,6-bisphosphate aldolase GN=fba                          | 9  | 13                      | 6                                  | 6                       | 31,4          | 43,5                    | 19,8             | 43,5                    |
| tr Q0KDN3 Q0KDN3_CUPNH Type IV pilus protein histidine kinase/response regulator GN=pilL2 | 32 | 24                      | 24                                 | 24                      | 19,4          | 14,7                    | 16               | 14,7                    |
| tr Q0K0G8 Q0K0G8_CUPNH Periplasmic glucan biosynthesis protein B1721                      | 18 | 16                      | 17                                 | 16                      | 41,9          | 39,9                    | 42,8             | 39,9                    |
| tr Q0KB43 Q0KB43_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A1646                   | 10 | 10                      | 7                                  | 10                      | 40,6          | 37,9                    | 23               | 37,9                    |
| tr Q0KB97 Q0KB97_CUPNH Hypothetical membrane spanning protein A1592                       | 16 | 18                      | 17                                 | 18                      | 38,6          | 40,9                    | 40,1             | 40,9                    |
| tr Q0KDN1 Q0KDN1_CUPNH MFS transporter, ACS family A0742                                  | 4  | 4                       | 4                                  | 4                       | 9,9           | 9,9                     | 9,9              | 9,9                     |
| tr Q0JYJ8 Q0JYJ8_CUPNH Hypothetical membrane associated protein B2394                     | 4  | 4                       | 3                                  | 4                       | 38,3          | 38,3                    | 32,3             | 38,3                    |
| tr Q0KBJ0 Q0KBJ0_CUPNH Peptidylprolyl isomerase A1499                                     | 25 | 28                      | 27                                 | 28                      | 48,3          | 52,8                    | 49,7             | 52,8                    |
| tr Q0K339 Q0K339_CUPNH TRAP-type transporter B0793  | 4  | 4                       | 4                                  | 4                       | 24,4          | 24,4                    | 24,4             | 24,4                    |
| sp Q0K644 RS4_CUPNH 30S ribosomal protein S4 GN=rpsD                                      | 8  | 10                      | 11                                 | 10                      | 34,8          | 39,1                    | 38,6             | 39,1                    |
| tr Q0KFD8 Q0KFD8_CUPNH ABC-type transporter A0131   | 5  | 3                       | 3                                  | 3                       | 26,2          | 16,6                    | 18,8             | 16,6                    |
| tr Q0K718 Q0K718_CUPNH NAD(P) transhydrogenase GN=pntAa3                                  | 10 | 10                      | 12                                 | 10                      | 28,2          | 28,2                    | 37,8             | 28,2                    |
| tr Q0KDG6 Q0KDG6_CUPNH Membrane-bound lytic murein transglycosylase B GN=mltB             | 11 | 10                      | 13                                 | 10                      | 28,3          | 34,5                    | 37,2             | 34,5                    |
| tr Q0KE74 Q0KE74_CUPNH Succinate-CoA ligase GN=sucD                                       | 7  | 8                       | 7                                  | 8                       | 27,6          | 33,1                    | 27               | 33,1                    |
| tr Q0KBQ6 Q0KBQ6_CUPNH Uncharacterized protein A1430                                      | 5  | 4                       | 3                                  | 4                       | 15,6          | 15,2                    | 11               | 15,2                    |
| tr Q0K961 Q0K961_CUPNH DUF4115 domain-containing protein A2365                            | 9  | 9                       | 11                                 | 9                       | 34,3          | 34,3                    | 37,7             | 34,3                    |
| sp Q0K5C1 YIDC_CUPNH Membrane protein insertase YidC GN=yidC                              | 13 | 15                      | 15                                 | 15                      | 37,7          | 45,4                    | 41,1             | 45,4                    |
| sp P14611 THIL_CUPNH Acetyl-CoA acetyltransferase GN=phaA                                 | 11 | 12                      | 9                                  | 12                      | 33,6          | 37,9                    | 31               | 37,9                    |
| tr Q0KCZ7 Q0KCZ7_CUPNH F1p pilus assembly protein CpaB GN=cpaB3                           | 6  | 8                       | 9                                  | 8                       | 19            | 28,9                    | 37,3             | 28,9                    |
| sp Q0K6A4 MSCL_CUPNH Large-conductance mechanosensitive channel GN=mscL                   | 2  | 2                       | 2                                  | 2                       | 18,4          | 18,4                    | 18,4             | 18,4                    |
| tr Q0K887 Q0K887_CUPNH Microcinn-processing peptidase 1 GN=pmbA                           | 11 | 17                      | 19                                 | 17                      | 22,4          | 43,3                    | 56               | 43,3                    |
| tr Q0K512 Q0K512_CUPNH Putative methyltransferase A3682                                   | 4  | 5                       | 6                                  | 5                       | 24,6          | 28,7                    | 31,6             | 28,7                    |
| tr Q0KA25 Q0KA25_CUPNH Hypothetical outer membrane protein A2046                          | 10 | 3                       | 7                                  | 3                       | 41,1          | 16                      | 32               | 16                      |
| tr Q0KEE7 Q0KEE7_CUPNH ABC-type transporter A0474   | 2  | 2                       | 2                                  | 2                       | 7,5           | 7,5                     | 7,5              | 7,5                     |
| tr Q0K0Q6 Q0K0Q6_CUPNH Uncharacterized protein B1633                                      | 4  | 4                       | 5                                  | 4                       | 34,1          | 34,1                    | 43,9             | 34,1                    |
| tr Q0K6F7 Q0K6F7_CUPNH Aldehyde dehydrogenase family A3345                                | 11 | 13                      | 9                                  | 13                      | 30,1          | 35,2                    | 23,6             | 35,2                    |
| tr Q0KEQ5 Q0KEQ5_CUPNH Predicted Zn-dependent peptidase A0365                             | 13 | 11                      | 10                                 | 11                      | 32,8          | 27,6                    | 27,4             | 27,6                    |
| tr Q0K4Y4 Q0K4Y4_CUPNH Outer membrane protein (Porin) B0134                               | 9  | 10                      | 8                                  | 10                      | 28,5          | 31,6                    | 28               | 31,6                    |
| sp P39662 HMP_CUPNH Flavohemoprotein GN=hmp   | 8  | 7                       | 6                                  | 7                       | 25,6          | 22,8                    | 16,1             | 22,8                    |

| Protein fasta   | Peptide |                         | Sequenzabdeckung |                         |
|---|---------|-------------------------|------------------|-------------------------|
|   | WT      | $\Delta ppk\text{-all}$ | WT               | $\Delta ppk\text{-all}$ |
| tr Q0JZ99 Q0JZ99_CUPNH TRAP-type transporter, periplasmic component B2143           | 14      | 13                      | 15               | 35,6                    |
| tr Q0K6E6 Q0K6E6_CUPNH Efflux pump membrane transporter GN=acrB6                    | 24      | 21                      | 24               | 26,6                    |
| sp Q0K631 RL5_CUPNH 50S ribosomal protein L5 GN=rpJE                                | 6       | 11                      | 8                | 62,8                    |
| tr Q0K5K6 Q0K5K6_CUPNH ABC-type transporter A3658                                   | 4       | 4                       | 6                | 16,8                    |
| tr Q0K4U6 Q0K4U6_CUPNH Uncharacterized protein B0177                                | 3       | 0                       | 3                | 61,8                    |
| tr Q0K9F0 Q0K9F0_CUPNH Predicted Phosphate transport regulator A2274                | 4       | 5                       | 5                | 32,2                    |
| sp Q0KGE2 ENO_CUPNH Enolase GN=eno  | 10      | 11                      | 8                | 30,1                    |
| tr Q0K8C4 Q0K8C4_CUPNH DNA topoisomerase 4 subunit A GN=parC                        | 25      | 31                      | 35               | 51,5                    |
| tr Q0K7G7 Q0K7G7_CUPNH Acyl-CoA synthetase A2978                                    | 14      | 18                      | 24               | 41,9                    |
| tr Q0K534 Q0K534_CUPNH Ferrous iron transport protein B B0084                       | 10      | 13                      | 14               | 26,5                    |
| tr Q0K1V1 Q0K1V1_CUPNH Small-conductance mechano-sensitive channel GN=mscS3         | 4       | 3                       | 4                | 20,1                    |
| tr Q7WXA8 Q7WXA8_CUPNH Usp domain-containing protein GN=PHG228                      | 3       | 4                       | 3                | 36,4                    |
| tr Q7WXF7 Q7WXF7_CUPNH Putative histone-like protein GN=PHG177                      | 1       | 2                       | 2                | 8,6                     |
| sp Q0K603 RL1_CUPNH 50S ribosomal protein L1 GN=rpLA                                | 8       | 10                      | 8                | 39,4                    |
| tr Q0KCK1 Q0KCK1_CUPNH Putative peptidase, S08A subfamily GN=mprA                   | 7       | 7                       | 7                | 23,9                    |
| tr Q0KET3 Q0KET3_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A0337             | 5       | 4                       | 4                | 24,3                    |
| tr Q0KCK6 Q0KCK6_CUPNH Microcin-processing peptidase 2 GN=tldD                      | 14      | 19                      | 20               | 36                      |
| tr Q0K9E1 Q0K9E1_CUPNH Uncharacterized protein A2283                                | 3       | 2                       | 3                | 55,7                    |
| sp Q0K610 RS7_CUPNH 30S ribosomal protein S7 GN=rpsG                                | 3       | 3                       | 3                | 30,1                    |
| tr Q0K536 Q0K536_CUPNH Uncharacterized protein B0082                                | 3       | 2                       | 1                | 8,7                     |
| tr Q0K9R3 Q0K9R3_CUPNH Universal stress protein, UspA family A2161                  | 5       | 5                       | 7                | 49,7                    |
| tr Q0K4T9 Q0K4T9_CUPNH Flip pilus assembly protein CpaB GN=cpaB2                    | 8       | 7                       | 5                | 32,2                    |
| sp Q0K619 RL3_CUPNH 50S ribosomal protein L3 GN=rpLC                                | 7       | 5                       | 7                | 35,6                    |
| sp Q0KCT4 PNP_CUPNH Polynucleotide nucleotidyltransferase GN=ppp                    | 18      | 24                      | 24               | 27,4                    |
| tr Q0K6L5 Q0K6L5_CUPNH Transcriptional regulator MraZ GN=mraZ                       | 4       | 1                       | 5                | 36,2                    |
| sp P39186 NAPB_CUPNH Periplasmic nitrate reductase GN=napB                          | 5       | 4                       | 5                | 36,7                    |
| tr Q0KF44 Q0KF44_CUPNH Predicted esterase A0225                                     | 10      | 20                      | 18               | 25,2                    |
| tr Q0K7C6 Q0K7C6_CUPNH ABC-type transporter A3020                                   | 10      | 9                       | 12               | 43,6                    |
| tr Q0KCK0 Q0KCK0_CUPNH Uncharacterized protein A1130                                | 4       | 4                       | 4                | 28,9                    |
| tr Q0K5Q0 Q0K5Q0_CUPNH Cytochrome c555 A3614  | 5       | 5                       | 6                | 22,9                    |
| tr Q0K8J8 Q0K8J8_CUPNH Hypothetical membrane associated protein A2590               | 4       | 3                       | 3                | 24,6                    |
| tr Q0K8Y5 Q0K8Y5_CUPNH ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH GN=ftsH              | 12      | 13                      | 13               | 22,6                    |
| tr Q0K8F7 Q0K8F7_CUPNH Succinate dehydrogenase (Cytochrome b subunit) GN=sdhC       | 2       | 2                       | 3                | 12,5                    |
| tr Q0K6A5 Q0K6A5_CUPNH Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit GN=qcrA | 5       | 5                       | 6                | 26,8                    |

| Protein fasta  | Peptide |                         | Sequenzabdeckung |                         |
|--|---------|-------------------------|------------------|-------------------------|
|  | WT      | $\Delta ppk\text{-}all$ | WT               | $\Delta ppk\text{-}all$ |
| sp Q0K998 UGPC_CUPNH sn-glycerol-3-phosphate import ATP-binding protein UgpC GN=ugpC         | 6       | 8                       | 20,8             | 32,8                    |
| sp Q0K757 DNAK_CUPNH Chaperone protein DnaK GN=dnaK  | 15      | 21                      | 22,9             | 37,7                    |
| sp Q0K6P4 RL21_CUPNH 50S ribosomal protein L21 GN=rpIU                                       | 1       | 1                       | 11,7             | 11,7                    |
| tr Q0K3C7 Q0K3C7_CUPNH Serine protein kinase GN=prka   | 22      | 34                      | 45,6             | 61,7                    |
| tr Q0K6B8 Q0K6B8_CUPNH Hypothetical membrane associated protein A3384                        | 4       | 3                       | 20,7             | 13,3                    |
| tr Q0KE15 Q0KE15_CUPNH Biopolymer transport channel protein GN=tolQ                          | 7       | 5                       | 32,6             | 20,5                    |
| tr Q0KEC2 Q0KEC2_CUPNH Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase GN=gdpD                   | 11      | 10                      | 35,1             | 33,2                    |
| tr Q0K611 Q0K611_CUPNH Elongation factor G GN=fusA   | 13      | 22                      | 31,9             | 53,3                    |
| tr Q0KE82 Q0KE82_CUPNH Putative MFS transporter A0540  | 9       | 8                       | 23,5             | 21,1                    |
| tr Q0JZ03 Q0JZ03_CUPNH Peroxiredoxin B2239   | 8       | 9                       | 41,3             | 47,7                    |
| tr Q0K8T0 Q0K8T0_CUPNH ABC-type transporter, ATPase component: CUT1 family A2503             | 8       | 6                       | 30,6             | 24,5                    |
| tr Q0K5J3 Q0K5J3_CUPNH Alkyl sulfatase A3671   | 21      | 22                      | 39,7             | 42,3                    |
| tr Q0K5V6 Q0K5V6_CUPNH Uncharacterized protein A3556   | 7       | 8                       | 26               | 29                      |
| tr Q0KE94 Q0KE94_CUPNH Phosphate starvation-inducible protein PhoH, predicted ATPase GN=phoH | 9       | 1                       | 35,8             | 3,3                     |
| sp Q0K0L8 HGD_CUPNH Homogentisate 1,2-dioxygenase GN=hmgA                                    | 12      | 13                      | 32,6             | 45,6                    |
| tr Q0KCH9 Q0KCH9_CUPNH Amino transferase GN=tyrB1  | 11      | 16                      | 32,7             | 44,2                    |
| tr Q7WWZ1 Q7WWZ1_CUPNH Putative component of type II secretion apparatus GN=plin             | 10      | 9                       | 28,3             | 23,2                    |
| tr Q0K724 Q0K724_CUPNH Uncharacterized YceI-like periplasmic protein A3122                   | 6       | 9                       | 36               | 51,3                    |
| tr Q0K8G7 Q0K8G7_CUPNH ABC-type transporter, ATPase component GN=ivf1                        | 7       | 6                       | 33               | 24,9                    |
| tr Q0KEH5 Q0KEH5_CUPNH Hypothetical membrane spanning protein A0446                          | 3       | 3                       | 16,7             | 14,9                    |
| tr Q0K9A9 Q0K9A9_CUPNH Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit GN=ccoP                        | 5       | 7                       | 22,3             | 28,5                    |
| tr Q0KES8 Q0KES8_CUPNH Cytochrome c oxidase subunit 2 GN=ciaC                                | 10      | 6                       | 28,1             | 19,5                    |
| sp Q0K5M8 ATPE_CUPNH ATP synthase epsilon chain GN=atpC                                      | 3       | 4                       | 37               | 42                      |
| tr Q0K324 Q0K324_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component B0808                     | 9       | 10                      | 31,4             | 36                      |
| sp Q0KC02 ILVC_CUPNH Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+)) GN=ilvC                           | 10      | 13                      | 41,1             | 48,8                    |
| tr Q0K7P5 Q0K7P5_CUPNH GDP-mannose 4,6-dehydratase GN=gmd                                    | 10      | 12                      | 36,7             | 41                      |
| tr Q0K561 Q0K561_CUPNH Putative double-glycine peptidase B0057                               | 3       | 4                       | 13,4             | 19,8                    |
| tr Q0KD63 Q0KD63_CUPNH Ribosomal silencing factor RsfS GN=rsfS                               | 5       | 5                       | 23,7             | 23,7                    |
| tr Q0K5M1 Q0K5M1_CUPNH ATP synthase subunit a GN=atpB  | 3       | 3                       | 10,2             | 10,2                    |
| tr Q0K3W7 Q0K3W7_CUPNH Conserved protein with BNR repeats B0510                              | 11      | 10                      | 28,7             | 29,7                    |
| tr Q0KC07 Q0KC07_CUPNH Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase GN=fixC      | 15      | 15                      | 39               | 39,9                    |
| tr Q0K7C5 Q0K7C5_CUPNH ABC-type transporter A3021  | 5       | 5                       | 22,8             | 22,8                    |
| tr Q0K7C5 Q0K7C5_CUPNH ABC-type transporter A3021  | 5       | 5                       | 22,8             | 22,8                    |

| Protein fasta  | Peptide |                   | Sequenzabdeckung |                   |
|--|---------|-------------------|------------------|-------------------|
|  | WT      | $\Delta pphk-all$ | WT               | $\Delta pphk-all$ |
| sp Q0KCS8 NUOC_CUPNH NADH-quinone oxidoreductase GN=nuoC                         | 6       | 6                 | 35,4             | 35,4              |
| tr Q0K7D8 Q0K7D8_CUPNH Predicted permease A3008                                  | 8       | 7                 | 15,5             | 17,3              |
| sp P27747 ACOC_CUPNH Dihydrodipolyllysine-residue acetyltransferase GN=acoC SV=3 | 7       | 7                 | 27               | 27                |
| tr Q0K9K4 Q0K9K4_CUPNH Universal stress protein, UspA family A2220               | 3       | 3                 | 34               | 34                |
| sp Q0KFI5 MINE_CUPNH Cell division topological specificity factor GN=mine        | 3       | 2                 | 31               | 19                |
| tr Q0K7I9 Q0K7I9_CUPNH Outer membrane protein A2956                              | 18      | 13                | 36,5             | 26,7              |
| tr Q0KDG0 Q0KDG0_CUPNH Electron transfer flavoprotein GN=fxa                     | 10      | 12                | 49               | 52,2              |
| tr Q0KEZ8 Q0KEZ8_CUPNH Omega-amino acid-pyruvate aminotransferase GN=apta        | 8       | 15                | 30,7             | 51,7              |
| tr Q0KAI7 Q0KAI7_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A1883          | 7       | 11                | 24,9             | 45,4              |
| tr Q0KCG0 Q0KCG0_CUPNH Putative peptidase, M23B subfamily A1170                  | 6       | 5                 | 38,1             | 30,5              |
| tr Q0K8T1 Q0K8T1_CUPNH ABC-type transporter, ATPase component: CUTI family A2502 | 11      | 11                | 33,2             | 34                |
| tr Q0K5D6 Q0K5D6_CUPNH Acriflavin resistance protein A A3729                     | 12      | 8                 | 36,8             | 23,1              |
| tr Q0KE84 Q0KE84_CUPNH Uncharacterized protein conserved in bacteria A0537       | 14      | 13                | 32,6             | 31,9              |
| tr Q0K5G4 Q0K5G4_CUPNH Putative peptidoglycan binding domain A3701               | 9       | 9                 | 32,3             | 33,3              |
| tr Q0K528 Q0K528_CUPNH L-lactate permease GN=ldp2                                | 5       | 7                 | 10,2             | 14,3              |
| sp Q0KD78 RL19_CUPNH 50S ribosomal protein L19 GN=rpIS                           | 2       | 5                 | 17,7             | 50                |
| tr Q0K6K9 Q0K6K9_CUPNH Long-chain-fatty-acid-CoA ligase GN=fadD3                 | 10      | 13                | 23,6             | 30                |
| tr Q0K8W9 Q0K8W9_CUPNH Soluble lytic murein transglycosylase A2463               | 13      | 11                | 27               | 25,9              |
| sp Q0K8F5 MDH_CUPNH Malate dehydrogenase GN=mdh                                  | 9       | 13                | 33,6             | 43,7              |
| tr Q0K7A3 Q0K7A3_CUPNH Response regulator, NarL-family A3043                     | 5       | 3                 | 30,1             | 21,5              |
| tr Q0KEN2 Q0KEN2_CUPNH Lipopolysaccharide export system protein LptA GN=lptA     | 5       | 4                 | 38,4             | 28,7              |
| tr Q0K5I8 Q0K5I8_CUPNH Large extracellular alpha-helical protein A3676           | 49      | 43                | 29,5             | 24,9              |
| tr Q0K990 Q0K990_CUPNH Glutamine synthetase GN=glnA1                             | 5       | 8                 | 11               | 18,9              |
| tr Q0K463 Q0K463_CUPNH Transcriptional regulator, IclR-family B0412              | 6       | 5                 | 30,1             | 26                |
| tr Q0KF08 Q0KF08_CUPNH Uncharacterized protein A0261                             | 7       | 7                 | 31,6             | 30,2              |
| tr Q0KDF9 Q0KDF9_CUPNH Electron transfer flavoprotein alpha subunit GN=fixB      | 4       | 5                 | 19,3             | 28                |
| tr Q0K238 Q0K238_CUPNH Uncharacterized protein B1145                             | 8       | 6                 | 20,2             | 13,3              |
| tr Q0K7L9 Q0K7L9_CUPNH TRAP-type transporter, small permease component A2926     | 2       | 2                 | 16,5             | 16,5              |
| tr Q0K6J2 Q0K6J2_CUPNH ABC-type transporter A3310                                | 6       | 5                 | 30,7             | 30,7              |
| tr Q0K7B9 Q0K7B9_CUPNH ABC-type transporter, ATPase component GN=livG2           | 5       | 8                 | 19               | 34,9              |
| tr Q0K7Q4 Q0K7Q4_CUPNH Protoporphyrinogen oxidase A2891                          | 11      | 12                | 25,3             | 27,6              |
| tr Q0KEP8 Q0KEP8_CUPNH Ribose-phosphate pyrophosphokinase GN=prsA                | 7       | 9                 | 36               | 41                |
| tr Q0K639 Q0K639_CUPNH Protein translocase subunit SecY GN=secY                  | 4       | 4                 | 10,1             | 11,6              |
| tr Q0K639 Q0K639_CUPNH Protein translocase subunit SecY GN=secY                  | 4       | 4                 | 10,1             | 11,6              |

## 5. Anhang

| Protein fasta   | Peptide |                         | Sequenzabdeckung |                         |
|---|---------|-------------------------|------------------|-------------------------|
|   | WT      | $\Delta ppk\text{-}all$ | WT               | $\Delta ppk\text{-}all$ |
| sp Q0KFE3 PXXPA_CUPNH 5-oxoprolinase subunit A GN=pxpA                                  | 4       | 6                       | 3                | 35                      |
| tr Q0K5P4 Q0K5P4_CUPNH Glycine cleavage system H protein GN=gcvH                        | 1       | 1                       | 1                | 7,1                     |
| tr Q0K925 Q0K925_CUPNH Predicted esterase of the alpha-beta hydrolase superfamily A2404 | 7       | 4                       | 6                | 21,9                    |
| tr Q0K5W5 Q0K5W5_CUPNH Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase GN=porG                       | 22      | 17                      | 23               | 24,1                    |
| sp Q0KE78 RECA_CUPNH Protein RecA GN=recA   | 6       | 11                      | 7                | 45,2                    |
| tr Q0KDL4 Q0KDL4_CUPNH ABC-type transporter A0759                                       | 9       | 11                      | 8                | 32,5                    |
| tr Q0K6H3 Q0K6H3_CUPNH Unassigned peptidase A3329                                       | 13      | 19                      | 21               | 39,4                    |
| tr Q0KAF1 Q0KAF1_CUPNH Putative Lactaldehyde dehydrogenase A1919                        | 7       | 12                      | 4                | 37,1                    |
| tr Q0K7D7 Q0K7D7_CUPNH Aminotransferase GN=asdA   | 13      | 12                      | 9                | 23,7                    |
| sp Q0K609 RS12_CUPNH 30S ribosomal protein S12 GN=rpsL                                  | 3       | 5                       | 4                | 23,2                    |
| tr Q0KBV8 Q0KBV8_CUPNH Dihydropyridin dehydrogenase GN=pdhL                             | 11      | 14                      | 14               | 29,6                    |
| tr Q0K790 Q0K790_CUPNH Isocitrate dehydrogenase [NADP] GN=icd1                          | 11      | 14                      | 8                | 28,4                    |
| tr Q0K6A2 Q0K6A2_CUPNH Periplasmic serine endoprotease DegP-like A3401                  | 6       | 7                       | 6                | 23,2                    |
| tr Q0K3A0 Q0K3A0_CUPNH Outer membrane protein (Porin) B0727                             | 6       | 6                       | 6                | 24,5                    |
| sp Q0KEP6 LOLB_CUPNH Outer-membrane lipoprotein LoIB GN=loIB                            | 3       | 2                       | 3                | 16,8                    |
| tr Q0KET9 Q0KET9_CUPNH C-terminal processing peptidase-3, periplasmic GN=ctp            | 11      | 15                      | 18               | 33,1                    |
| tr Q0JYE1 Q0JYE1_CUPNH Outer membrane porin protein B2451                               | 7       | 3                       | 9                | 33,5                    |
| tr Q0K9D1 Q0K9D1_CUPNH GTP-binding elongation factor family protein GN=tyrA             | 10      | 12                      | 8                | 15,2                    |
| sp Q59097 ODP1_CUPNH Pyruvate dehydrogenase E1 component GN=pdhA                        | 17      | 27                      | 23               | 33,9                    |
| tr Q0KB94 Q0KB94_CUPNH Protein involved in meta-pathway of phenol degradation A1595     | 5       | 5                       | 5                | 15                      |
| tr Q0K5L0 Q0K5L0_CUPNH ABC-type transporter, permease component A3654                   | 2       | 2                       | 2                | 5,1                     |
| tr Q0KDS2 Q0KDS2_CUPNH Aerobic-type carbon monoxide dehydrogenase GN=coxL2              | 13      | 13                      | 14               | 19,5                    |
| tr Q0K6R1 Q0K6R1_CUPNH Ribonucleoside-diphosphate reductase GN=rdA                      | 18      | 27                      | 15               | 34,9                    |
| sp Q0KA17 EFTS_CUPNH Elongation factor Ts GN=tsf  | 7       | 10                      | 5                | 22,3                    |
| sp Q0K626 RL16_CUPNH 50S ribosomal protein L16 GN=rlpP                                  | 2       | 5                       | 2                | 18,8                    |
| tr Q0K8N1 Q0K8N1_CUPNH Signal peptidase I GN=lepB                                       | 6       | 6                       | 6                | 20,7                    |
| tr Q0K5B7 Q0K5B7_CUPNH Replication initiation protein RepA GN=pA2                       | 8       | 15                      | 16               | 39,3                    |
| tr Q0KCB9 Q0KCB9_CUPNH Universal stress protein, UspA family A1211                      | 3       | 5                       | 3                | 32,6                    |
| tr Q0K5R3 Q0K5R3_CUPNH 2-Hydroxy-3-oxopropionate reductase A3600                        | 5       | 8                       | 5                | 26,6                    |
| tr Q0K0K1 Q0K0K1_CUPNH Pyoverdine biosynthesis regulatory protein B1688                 | 4       | 12                      | 4                | 17,6                    |
| tr Q0KFM4 Q0KFM4_CUPNH ABC-type transporter GN=hisP                                     | 4       | 4                       | 4                | 16,6                    |
| tr Q0KFM9 Q0KFM9_CUPNH Predicted membrane protein A0040                                 | 1       | 1                       | 1                | 10,6                    |
| tr Q0K6E4 Q0K6E4_CUPNH Hypothetical periplasmic protein A3358                           | 8       | 8                       | 9                | 15,2                    |
| sp Q0KBP1 BKTB_CUPNH Beta-ketothiolase BktB GN=bktB                                     | 8       | 12                      | 9                | 22,3                    |
| sp Q0K9E8 RL9_CUPNH 50S ribosomal protein L9 GN=rplI                                    | 3       | 5                       | 4                | 41,3                    |



| Protein fasta   | Peptide |                         | Sequenzabdeckung |                         |
|---|---------|-------------------------|------------------|-------------------------|
|   | WT      | $\Delta ypk\text{-}all$ | WT               | $\Delta ypk\text{-}all$ |
| tr Q0K9S1 Q0K9S1_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A2153               | 2       | 1                       | 7,9              | 4,9                     |
| tr Q0K964 Q0K964_CUPNH Transmembrane protein A2362                                    | 5       | 6                       | 26,2             | 35,2                    |
| tr Q0K552 Q0K552_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor B0066               | 6       | 9                       | 27,7             | 38,9                    |
| sp Q0KA19 RRF_CUPNH Ribosome-recycling factor GN=frf                                  | 5       | 3                       | 39,8             | 17,7                    |
| tr Q0KCB2 Q0KCB2_CUPNH Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase GN=ppiB                    | 3       | 4                       | 24,7             | 28,9                    |
| tr Q0KFE1 Q0KFE1_CUPNH Uncharacterized protein A0128                                  | 3       | 3                       | 8,5              | 8,5                     |
| tr Q0K5L2 Q0K5L2_CUPNH ABC-type transporter A3652                                     | 5       | 5                       | 23,1             | 23,1                    |
| tr Q0KC10 Q0KC10_CUPNH Intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase GN=phaZ1    | 9       | 21                      | 32,9             | 68                      |
| tr Q0K731 Q0K731_CUPNH Protein translocase GN=secD                                    | 8       | 11                      | 16,7             | 23,8                    |
| tr Q0K557 Q0K557_CUPNH ABC-type transporter B0061                                     | 10      | 7                       | 36,5             | 27,5                    |
| tr Q0K5Z3 Q0K5Z3_CUPNH Universal stress protein A3519                                 | 2       | 5                       | 14,7             | 42,9                    |
| tr Q0JY93 Q0JY93_CUPNH Penicillin G acylase B2499                                     | 15      | 11                      | 22,6             | 15,9                    |
| tr Q0KJ1 Q0KJ1_CUPNH Phospholipase A1 A1139   | 8       | 9                       | 23,5             | 26,5                    |
| tr Q0KFG5 Q0KFG5_CUPNH CHAD domain-containing protein A0104                           | 6       | 0                       | 23,3             | 0                       |
| tr Q0K4K5 Q0K4K5_CUPNH Flagellar P-ring protein GN=flgI                               | 7       | 3                       | 17,5             | 7,5                     |
| tr Q0K7Y9 Q0K7Y9_CUPNH Cyclopropane fatty acid synthase A2803                         | 9       | 11                      | 25,4             | 34,1                    |
| tr Q0JZ46 Q0JZ46_CUPNH Hypothetical secreted protein B2196                            | 11      | 8                       | 27,7             | 21,1                    |
| tr Q0K721 Q0K721_CUPNH Glutathione S-transferase A3125                                | 5       | 4                       | 27,9             | 22,5                    |
| tr Q0K730 Q0K730_CUPNH Protein-export membrane protein SecF GN=secF                   | 3       | 2                       | 13               | 9,6                     |
| tr Q0KDH6 Q0KDH6_CUPNH 30S ribosomal protein S1 GN=rpsA                               | 12      | 14                      | 23,6             | 33,7                    |
| sp P28613 HPF_CUPNH Ribosome hibernation promoting factor GN=hpf                      | 1       | 1                       | 11,2             | 11,2                    |
| tr Q0KEN3 Q0KEN3_CUPNH ABC-type transporter A0388                                     | 6       | 7                       | 26,3             | 32                      |
| tr Q0K7G2 Q0K7G2_CUPNH Putative inner membrane protein A2983                          | 4       | 5                       | 14,6             | 21,2                    |
| tr Q0K0L9 Q0K0L9_CUPNH Fumarylacetoacetase hydrolase GN=faha                          | 6       | 9                       | 13,1             | 25                      |
| tr Q0JZY3 Q0JZY3_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family B1909                   | 5       | 4                       | 22,8             | 20,1                    |
| sp Q0K620 RL4_CUPNH 50S ribosomal protein L4 GN=rpL4                                  | 3       | 7                       | 17               | 42,7                    |
| tr Q0K8G6 Q0K8G6_CUPNH ABC-type transporter GN=livG1                                  | 7       | 9                       | 32,9             | 40,8                    |
| tr Q0K6F2 Q0K6F2_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A3350               | 4       | 8                       | 15,4             | 33,4                    |
| tr Q0K8M7 Q0K8M7_CUPNH Negative regulator of sigma24 activity GN=rseB                 | 8       | 11                      | 27,9             | 37,3                    |
| tr Q0JYT4 Q0JYT4_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor B2308               | 5       | 5                       | 21,9             | 21,3                    |
| tr Q0K658 Q0K658_CUPNH Protein-methionine-sulfoxide reductase GN=msrp                 | 6       | 6                       | 16,2             | 19,5                    |
| tr Q0K601 Q0K601_CUPNH Transcription termination/antitermination protein NusG GN=nusG | 3       | 6                       | 15               | 35,2                    |
| tr Q0KDL5 Q0KDL5_CUPNH Uncharacterized protein A0758                                  | 1       | 1                       | 22,2             | 22,2                    |
| sp Q0KGS7 NUOD_CUPNH NADH-quinone oxidoreductase GN=nuoD                              | 10      | 13                      | 27,6             | 36,9                    |
| tr Q0K8K8 Q0K8K8_CUPNH Ribonuclease E GN=cafA2  | 15      | 14                      | 17,3             | 16,7                    |
| tr Q0K8Q0 Q0K8Q0_CUPNH Biopolymer transport protein GN=exbD1                          | 2       | 0                       | 16,8             | 0                       |

## 5. Anhang

| Protein fasta   | Peptide |                         | Sequenzabdeckung |                         |
|---|---------|-------------------------|------------------|-------------------------|
|   | WT      | $\Delta ppk\text{-}all$ | WT               | $\Delta ppk\text{-}all$ |
| tr Q0K2A6 Q0K2A6_CUPNH Outer membrane protein (Porin) B1077                         | 3       | 4                       | 14,8             | 18,4                    |
| tr Q0KCS4 Q0KCS4_CUPNH NADH-quinone oxidoreductase GN=nuoG                          | 14      | 14                      | 26,8             | 27,9                    |
| sp Q0K636 RS5_CUPNH 30S ribosomal protein S5 GN=rpsE                                | 3       | 6                       | 18               | 40,7                    |
| tr Q0K0J7 Q0K0J7_CUPNH Putative aminotransferase B1692                              | 7       | 12                      | 22,4             | 37,3                    |
| tr Q0K5U6 Q0K5U6_CUPNH Conserved hypothetical secreted protein A3567                | 3       | 2                       | 24,7             | 16,7                    |
| tr Q0K678 Q0K678_CUPNH ABC-type transporter, involved in toluene tolerance GN=ftg2C | 2       | 2                       | 18,8             | 18,8                    |
| sp Q0K758 DNAJ_CUPNH Chaperone protein DnaJ GN=dnaJ                                 | 4       | 3                       | 12,3             | 10,2                    |
| tr Q0K1V3 Q0K1V3_CUPNH Uncharacterized protein B1231                                | 2       | 2                       | 20,9             | 20,9                    |
| tr Q0K8K4 Q0K8K4_CUPNH Hypothetical membrane spanning protein A2584                 | 2       | 4                       | 22,6             | 39,8                    |
| tr Q0JY85 Q0JY85_CUPNH Predicted carboxypeptidase B2507                             | 24      | 17                      | 24,4             | 16,1                    |
| tr Q0K4W6 Q0K4W6_CUPNH Organic hydroperoxide resistance protein GN=ohr              | 3       | 2                       | 26,4             | 17,1                    |
| tr Q0KEW4 Q0KEW4_CUPNH Peroxiredoxin GN=bcp   | 3       | 3                       | 28,7             | 28,7                    |
| tr Q0K7X1 Q0K7X1_CUPNH Uncharacterized protein A2822                                | 3       | 3                       | 21,4             | 21,4                    |
| tr Q0KE63 Q0KE63_CUPNH ADP-heptose:LPS heptosyltransferase III GN=rfaF3             | 9       | 2                       | 25,9             | 7,1                     |
| tr Q0KCT0 Q0KCT0_CUPNH NADH-quinone oxidoreductase GN=nuoA                          | 2       | 1                       | 21,8             | 9,2                     |
| tr Q0JYF3 Q0JYF3_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor B2439             | 6       | 8                       | 33,8             | 41,8                    |
| tr Q0KCR8 Q0KCR8_CUPNH NADH dehydrogenase chain M GN=nuoM                           | 4       | 3                       | 8                | 5,3                     |
| sp Q0KA18 PYRH_CUPNH Uridylate kinase GN=pyrH                                       | 4       | 5                       | 19,9             | 26,7                    |
| tr Q0KD60 Q0KD60_CUPNH Phosphoribosylamine-glycine ligase GN=purD                   | 8       | 5                       | 28,7             | 17,1                    |
| tr Q0JZH1 Q0JZH1_CUPNH Conserved hypothetical membrane protein B2071                | 25      | 27                      | 23,9             | 27,9                    |
| tr Q0K6H1 Q0K6H1_CUPNH Thioldisulfide interchange protein A3331                     | 3       | 2                       | 17,5             | 14,3                    |
| tr Q0K8Y8 Q0K8Y8_CUPNH Phosphate-binding protein PstS GN=pstS                       | 7       | 8                       | 24,5             | 29,2                    |
| sp Q0KCS3 NUOH_CUPNH NADH-quinone oxidoreductase GN=nuoH                            | 2       | 2                       | 6,5              | 6,5                     |
| sp Q0K613 RS10_CUPNH 30S ribosomal protein S10 GN=rpsJ                              | 2       | 3                       | 21,6             | 28,4                    |
| sp P27748 ACOX_CUPNH Acetoin catabolism protein X GN=acox PE=4                      | 5       | 6                       | 17               | 18,9                    |
| tr Q0K022 Q0K022_CUPNH Sulphoacetaldehyde acetyltransferase GN=xsc                  | 10      | 16                      | 18               | 31,2                    |
| tr Q0K879 Q0K879_CUPNH Cobalamin biosynthesis protein CobD GN=cobD                  | 3       | 5                       | 10,6             | 16,9                    |
| tr Q0KA33 Q0KA33_CUPNH Phosphoenolpyruvate synthase GN=ppsA                         | 19      | 23                      | 30,7             | 34,3                    |
| tr Q0K8R4 Q0K8R4_CUPNH Outer membrane protein A2519                                 | 1       | 1                       | 8,5              | 8,5                     |
| tr Q0K944 Q0K944_CUPNH ABC-type transporter A2382                                   | 5       | 5                       | 31,9             | 28,5                    |
| tr Q0KFP9 Q0KFP9_CUPNH Acetyl-CoA acetyltransferase A0170                           | 5       | 5                       | 15,8             | 34,9                    |
| sp P23608 PHAC_CUPNH Poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase subunit PhaC GN=phaC       | 8       | 13                      | 17,3             | 31,4                    |
| tr Q0KST2 Q0KST2_CUPNH ABC-type sugar transport systems A2501                       | 3       | 1                       | 13,3             | 5,8                     |
| tr Q7WWY5 Q7WWY5_CUPNH Putative channel-forming protein GN=trbG                     | 5       | 2                       | 15,5             | 5,6                     |
| tr Q0KBT8 Q0KBT8_CUPNH ABC-type transporter A1397                                   | 5       | 5                       | 19,7             | 20,5                    |

| Protein fasta   | Peptide |                   | Sequenzabdeckung |                   |
|---|---------|-------------------|------------------|-------------------|
|   | WT      | $\Delta pphk-all$ | WT               | $\Delta pphk-all$ |
| tr Q0K6L0 Q0K6L0_CUPNH Uncharacterized protein A3287                                      | 1       | 1                 | 2                | 7,4               |
| tr Q0KB19 Q0KB19_CUPNH Acyl-CoA thioesterase A1500  | 5       | 4                 | 3                | 21,1              |
| sp Q0K6M4 MURG_CUPNH N-acetylglucosamine transferase GN=murG                              | 5       | 6                 | 10               | 19,1              |
| tr Q0K4H5 Q0K4H5_CUPNH Putative glucose/sorbose dehydrogenase B0299                       | 5       | 3                 | 6                | 15,3              |
| tr Q0KFK8 Q0KFK8_CUPNH Uncharacterized protein A0011                                      | 5       | 7                 | 6                | 17                |
| tr Q0KE59 Q0KE59_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A0563                   | 4       | 7                 | 6                | 10,9              |
| tr Q0KBL9 Q0KBL9_CUPNH Cation/multidrug efflux system GN=acrA3                            | 8       | 9                 | 9                | 30,6              |
| tr Q0JZZ9 Q0JZZ9_CUPNH D-amino-acid dehydrogenase GN=dadA7                                | 11      | 13                | 13               | 20,4              |
| sp Q0KBK3 CLPX_CUPNH ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX GN=clpX          | 7       | 11                | 4                | 20                |
| tr Q0KC58 Q0KC58_CUPNH Uncharacterized protein A1273                                      | 6       | 0                 | 4                | 27,2              |
| tr Q0K188 Q0K188_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor B1448                   | 3       | 6                 | 2                | 9,9               |
| tr Q79IN9 Q79IN9_CUPNH HoxI GN=hoxI   | 4       | 6                 | 2                | 32,3              |
| tr Q0KEA4 Q0KEA4_CUPNH Lactylglutathione lyase GN=gloA1                                   | 1       | 2                 | 1                | 5,2               |
| tr Q0K6J5 Q0K6J5_CUPNH Putative enoyl-CoA hydratase A3307                                 | 5       | 7                 | 2                | 11,1              |
| tr Q0K5D2 Q0K5D2_CUPNH Maleate isomerase GN=maia  | 3       | 5                 | 3                | 12,4              |
| tr Q0K064 Q0K064_CUPNH ABC-type transporter B1828   | 4       | 9                 | 7                | 13,3              |
| tr Q0JZC8 Q0JZC8_CUPNH Predicted acyl-CoA transferase/carnitine dehydratase B2114         | 6       | 6                 | 6                | 26,2              |
| tr Q0K4T0 Q0K4T0_CUPNH Transcriptional regulator, PspF-family B0193                       | 7       | 9                 | 5                | 17,2              |
| tr Q0KEC9 Q0KEC9_CUPNH Phospholipid-binding protein A0492                                 | 3       | 1                 | 1                | 18,1              |
| tr Q0JZ11 Q0JZ11_CUPNH Cytochrome c oxidase subunit 1 GN=coxN                             | 4       | 4                 | 6                | 6                 |
| tr Q0KA86 Q0KA86_CUPNH Uncharacterized protein A1984                                      | 1       | 0                 | 2                | 7                 |
| tr Q0KDT8 Q0KDT8_CUPNH Hypothetical membrane spanning protein A0685                       | 1       | 0                 | 1                | 3,4               |
| tr Q0JZ65 Q0JZ65_CUPNH Vac-J-like lipoprotein B2177                                       | 3       | 1                 | 3                | 11                |
| tr Q0KDL7 Q0KDL7_CUPNH Uncharacterized protein A0756                                      | 3       | 1                 | 2                | 23,4              |
| tr Q0K3P0 Q0K3P0_CUPNH Predicted thioesterase B0587                                       | 5       | 8                 | 2                | 34,5              |
| tr Q0JZS4 Q0JZS4_CUPNH BLUF domain-containing protein B1968                               | 3       | 1                 | 5                | 18,4              |
| tr Q0KFB2 Q0KFB2_CUPNH Uncharacterized conserved protein A0157                            | 2       | 2                 | 1                | 19                |
| tr Q0KFD7 Q0KFD7_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component A0132                  | 3       | 2                 | 2                | 10,2              |
| tr Q0JZ41 Q0JZ41_CUPNH PelD_GGDEF domain-containing protein B2201                         | 4       | 7                 | 8                | 10                |
| tr Q0K765 Q0K765_CUPNH Poly(A) polymerase I GN=pcnB                                       | 7       | 4                 | 14               | 15,2              |
| sp Q0K6M1 IMRAY_CUPNH Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase GN=mrAY           | 3       | 3                 | 3                | 6,4               |
| tr Q0JZA4 Q0JZA4_CUPNH Secretion protein HlyD B2138                                       | 8       | 6                 | 10               | 25,7              |
| tr Q0K6A8 Q0K6A8_CUPNH Stringent starvation protein A (Glutathione S-transferase) GN=ssaP | 4       | 8                 | 7                | 19,7              |
| tr Q0K972 Q0K972_CUPNH Adenylosuccinate synthetase GN=purA                                | 9       | 8                 | 7                | 23,6              |
| tr Q0K847 Q0K847_CUPNH Hypothetical membrane spanning protein A2745                       | 2       | 2                 | 3                | 7,8               |
| tr Q0K600 Q0K600_CUPNH Protein translocase GN=secE  | 2       | 2                 | 2                | 16,7              |

| Protein fasta  | Peptide |                         | Sequenzabdeckung |                         |
|--|---------|-------------------------|------------------|-------------------------|
|  | WT      | $\Delta pph\text{-}all$ | WT               | $\Delta pph\text{-}all$ |
| tr Q0K919 Q0K919_CUPNH Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase<br>GN=fabI1              | 4       | 7                       | 17,9             | 33,6                    |
| sp Q0KDH0 HLLDD_CUPNH<br>ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase GN=hldD             | 6       | 7                       | 20,2             | 23,9                    |
| sp Q0KF39 METK_CUPNH S-adenosylmethionine synthase<br>GN=metK                          | 5       | 8                       | 14,5             | 26,6                    |
| tr Q0K5Q9 Q0K5Q9_CUPNH Efflux pump membrane transporter<br>GN=acrB11                   | 15      | 11                      | 15,6             | 11,7                    |
| tr Q0K824 Q0K824_CUPNH Predicted membrane-bound protease<br>subunit A2768              | 4       | 5                       | 17,9             | 26,9                    |
| tr Q0K723 Q0K723_CUPNH Cytochrome b561 A3123   | 1       | 1                       | 9,8              | 9,8                     |
| tr Q0K8C6 Q0K8C6_CUPNH L-lactate permease GN=hldP1                                     | 4       | 6                       | 7,9              | 10                      |
| tr Q7WXd2 Q7WXd2_CUPNH Phasin GN=phaP2   | 2       | 9                       | 9                | 55,9                    |
| tr Q0K6G7 Q0K6G7_CUPNH Conserved hypothetical membrane<br>protein A3335                | 2       | 1                       | 2                | 2,2                     |
| tr Q0KDU1 Q0KDU1_CUPNH Paraquat-inducible protein B<br>GN=pqIB                         | 8       | 8                       | 15,6             | 15,8                    |
| tr Q0KBN9 Q0KBN9_CUPNH Cystathionine beta-lyase GN=metC                                | 3       | 5                       | 5,4              | 13,3                    |
| tr Q0K3C6 Q0K3C6_CUPNH UPF0229 protein H16_B0701 B0701                                 | 5       | 5                       | 14,3             | 14,3                    |
| sp Q0K624 RL22_CUPNH 50S ribosomal protein L22 GN=rplV                                 | 1       | 3                       | 9,2              | 30,3                    |
| tr Q0KDH1 Q0KDH1_CUPNH D-beta-D-heptose 7-phosphatase<br>kinase GN=hldA                | 5       | 5                       | 17,5             | 17,5                    |
| sp Q0KCU1 PSD_CUPNH Phosphatidylserine decarboxylase<br>proenzyme GN=psd               | 2       | 2                       | 6,9              | 9,7                     |
| tr Q0K0J3 Q0K0J3_CUPNH Short Chain CoA Dehydrogenase B1696                             | 3       | 3                       | 11,8             | 14,5                    |
| tr Q0K948 Q0K948_CUPNH Outer membrane protein (Porin) A2378                            | 5       | 1                       | 14,1             | 2,6                     |
| sp Q59098 ODP2_CUPNH Dihydrodipolyllysine-residue<br>acetyltransferase GN=pdhB         | 5       | 6                       | 15,4             | 13,9                    |
| tr Q0KBG6 Q0KBG6_CUPNH ABC-type transporter A1523                                      | 5       | 7                       | 17,9             | 27,2                    |
| sp Q0K646 RL17_CUPNH 50S ribosomal protein L17 GN=rplQ                                 | 2       | 3                       | 14,5             | 16                      |
| tr Q0KBM3 Q0KBM3_CUPNH Response regulator, OmpR-family<br>A1463                        | 3       | 7                       | 15,8             | 25,8                    |
| tr Q0JYY6 Q0JYY6_CUPNH H-NS-like DNA-binding protein B2256                             | 2       | 2                       | 16,7             | 16,7                    |
| tr Q0KAX2 Q0KAX2_CUPNH Transcriptional regulator,<br>TetR/AcrR-family A1725            | 4       | 2                       | 19,8             | 7,3                     |
| tr Q0K5F7 Q0K5F7_CUPNH Carbon starvation protein A GN=cstA                             | 5       | 2                       | 9,3              | 2,8                     |
| sp Q0K769 PUR5_CUPNH Phosphoribosylformylglycinamide<br>cyclo-ligase GN=purM           | 6       | 10                      | 18,9             | 30,9                    |
| tr Q0K5L1 Q0K5L1_CUPNH ABC-type transporter A3653                                      | 6       | 10                      | 12,1             | 18,6                    |
| tr Q0K7C0 Q0K7C0_CUPNH ABC-type transporter GN=ivfF2                                   | 5       | 5                       | 21               | 21,4                    |
| tr Q0K662 Q0K662_CUPNH Periplasmic<br>transpeptidase/transglycosylase A3441            | 12      | 12                      | 20,5             | 20,5                    |
| tr Q0K3P6 Q0K3P6_CUPNH Cation/multidrug efflux system outer<br>membrane porin GN=acrC8 | 4       | 2                       | 12,1             | 5,3                     |
| sp Q0K645 RPOA_CUPNH DNA-directed RNA polymerase<br>GN=rpoA                            | 4       | 7                       | 13,2             | 28,2                    |
| sp Q0KCS9 NUOB_CUPNH NADH-quinone oxidoreductase<br>GN=nuoB                            | 1       | 2                       | 6,2              | 11,9                    |
| tr Q0JZA0 Q0JZA0_CUPNH Sodium/glutamate symporter GN=gltS                              | 2       | 2                       | 4                | 4                       |
| tr Q0K9R2 Q0K9R2_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute<br>receptor A2162             | 3       | 4                       | 10,7             | 13,1                    |
| tr Q0KE41 Q0KE41_CUPNH Cation/multidrug efflux system outer<br>membrane porin GN=acrC1 | 8       | 7                       | 19,7             | 17,3                    |

| Protein fasta   | Peptide |               | Sequenzabdeckung |               |
|---|---------|---------------|------------------|---------------|
|   | WT      | $\Delta pptA$ | WT               | $\Delta pptA$ |
| tr Q0KFR7 Q0KFR7_CUPNH Beta sliding clamp GN=dnaN                                     | 6       | 5             | 14,6             | 21            |
| tr Q0K6G8 Q0K6G8_CUPNH Uncharacterized protein A3334                                  | 4       | 4             | 27,3             | 27,3          |
| tr Q0K6N0 Q0K6N0_CUPNH Peroxiredoxin A3267  | 4       | 3             | 24,4             | 39,3          |
| tr Q0JZN1 Q0JZN1_CUPNH ABC-type transporter GN=lvG3                                   | 3       | 3             | 13,8             | 14,6          |
| tr Q0K4T1 Q0K4T1_CUPNH Tad_C domain-containing protein B0192                          | 4       | 4             | 9,1              | 9,1           |
| tr Q0K9K7 Q0K9K7_CUPNH Malate synthase GN=aceB  | 7       | 2             | 14,4             | 33,5          |
| sp Q0KBZ0 RL20_CUPNH 50S ribosomal protein L20 GN=rpIT                                | 1       | 2             | 6,8              | 24,6          |
| sp Q0K5P5 GCST_CUPNH Aminomethyltransferase GN=gcvT                                   | 4       | 5             | 12               | 9,6           |
| tr Q0K1Y8 Q0K1Y8_CUPNH S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase GN=adhC             | 2       | 3             | 4,9              | 7,1           |
| sp Q0KEP9 RL25_CUPNH 50S ribosomal protein L25 GN=rpIY                                | 2       | 5             | 14,6             | 47,8          |
| tr Q0KCL2 Q0KCL2_CUPNH MoxR-like ATPase A1118   | 5       | 6             | 18,9             | 39,9          |
| tr Q0KBH5 Q0KBH5_CUPNH Peptidylprolyl isomerase A1514                                 | 3       | 5             | 9,1              | 12,9          |
| tr Q0K966 Q0K966_CUPNH GTPase Der GN=der  | 6       | 9             | 15,6             | 10,7          |
| tr Q0KCR9 Q0KCR9_CUPNH NADH dehydrogenase chain L GN=nuoL                             | 3       | 4             | 4,5              | 5,9           |
| tr Q0K4I0 Q0K4I0_CUPNH ABC-type transporter GN=phnD2                                  | 4       | 6             | 20,2             | 47,9          |
| tr Q0JZL5 Q0JZL5_CUPNH Succinate-semialdehyde dehydrogenase (NADP+) GN=gabD4          | 5       | 4             | 12               | 19,6          |
| tr Q0KCS5 Q0KCS5_CUPNH NADH-quinone oxidoreductase subunit F GN=nuoF                  | 5       | 6             | 16,7             | 16,5          |
| tr Q0K3C5 Q0K3C5_CUPNH Uncharacterized conserved protein GN=spoVR                     | 5       | 2             | 9,3              | 3,1           |
| tr Q0KF98 Q0KF98_CUPNH Dehydrogenase with different specificities A0171               | 3       | 4             | 13,7             | 22,1          |
| sp Q0KBK5 TIG_CUPNH Trigger factor GN=tig   | 8       | 13            | 18,8             | 41,9          |
| tr Q0JZ95 Q0JZ95_CUPNH Outer membrane protein (Porin) B2147                           | 4       | 3             | 13,8             | 2,8           |
| sp Q0KF25 SAHH_CUPNH Adenosylhomocysteinase GN=ahcY                                   | 3       | 5             | 8,1              | 25,2          |
| sp Q0K632 RS14_CUPNH 30S ribosomal protein S14 GN=rpsN                                | 1       | 2             | 7,9              | 7,9           |
| tr Q0K4K6 Q0K4K6_CUPNH Flagellar L-ring protein GN=flgH                               | 3       | 0             | 15,8             | 3,4           |
| tr Q0KE61 Q0KE61_CUPNH Branched-chain-amino-acid aminotransferase GN=livE             | 2       | 2             | 8,2              | 13,4          |
| tr Q0K8I0 Q0K8I0_CUPNH Hypothetical membrane associated protein A2609                 | 3       | 2             | 16,3             | 9,7           |
| sp Q0KCT8 LEU1_CUPNH 2-isopropylmalate synthase GN=leuA                               | 7       | 6             | 14,6             | 31            |
| tr Q0K8G5 Q0K8G5_CUPNH ABC-type transporter, permease component: HAAT family GN=livMI | 2       | 3             | 4,9              | 4,2           |
| tr Q0KDG8 Q0KDG8_CUPNH Nucleobase:cation symporter 2 (NCS2) family transporter A0806  | 2       | 2             | 4,2              | 4,2           |
| tr Q0KC06 Q0KC06_CUPNH Short chain dehydrogenase A1325                                | 4       | 8             | 17,6             | 12,3          |
| sp Q0KDL8 LOLA_CUPNH Outer-membrane lipoprotein carrier protein GN=lola               | 2       | 2             | 10               | 5,2           |
| tr Q0K867 Q0K867_CUPNH RNA polymerase sigma factor RpoD GN=rpoD1                      | 7       | 19            | 8,3              | 6,9           |
| tr Q0K8F3 Q0K8F3_CUPNH Citrate synthase GN=prpC2                                      | 1       | 2             | 65,6             | 61,6          |
| tr Q0K2X2 Q0K2X2_CUPNH Sulfite oxidase B0860  | 7       | 5             | 24,5             | 19,8          |
| tr Q0K7W7 Q0K7W7_CUPNH Cell division coordinator CpoB GN=cpoB                         | 2       | 2             | 11,1             | 11,1          |
| tr Q0KFR7 Q0KFR7_CUPNH Beta sliding clamp GN=dnaN                                     | 6       | 5             | 14,6             | 21            |
| tr Q0K6G8 Q0K6G8_CUPNH Uncharacterized protein A3334                                  | 4       | 4             | 27,3             | 27,3          |
| tr Q0K6N0 Q0K6N0_CUPNH Peroxiredoxin A3267  | 4       | 3             | 24,4             | 39,3          |
| tr Q0JZN1 Q0JZN1_CUPNH ABC-type transporter GN=lvG3                                   | 3       | 3             | 13,8             | 14,6          |
| tr Q0K4T1 Q0K4T1_CUPNH Tad_C domain-containing protein B0192                          | 4       | 4             | 9,1              | 9,1           |
| tr Q0K9K7 Q0K9K7_CUPNH Malate synthase GN=aceB  | 7       | 2             | 14,4             | 33,5          |
| sp Q0KBZ0 RL20_CUPNH 50S ribosomal protein L20 GN=rpIT                                | 1       | 2             | 6,8              | 24,6          |
| sp Q0K5P5 GCST_CUPNH Aminomethyltransferase GN=gcvT                                   | 4       | 5             | 12               | 9,6           |
| tr Q0K1Y8 Q0K1Y8_CUPNH S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase GN=adhC             | 2       | 3             | 4,9              | 7,1           |
| sp Q0KEP9 RL25_CUPNH 50S ribosomal protein L25 GN=rpIY                                | 2       | 5             | 14,6             | 47,8          |
| tr Q0KCL2 Q0KCL2_CUPNH MoxR-like ATPase A1118   | 5       | 6             | 18,9             | 39,9          |
| tr Q0KBH5 Q0KBH5_CUPNH Peptidylprolyl isomerase A1514                                 | 3       | 5             | 9,1              | 12,9          |
| tr Q0K966 Q0K966_CUPNH GTPase Der GN=der  | 6       | 9             | 15,6             | 10,7          |
| tr Q0KCR9 Q0KCR9_CUPNH NADH dehydrogenase chain L GN=nuoL                             | 3       | 4             | 4,5              | 5,9           |
| tr Q0K4I0 Q0K4I0_CUPNH ABC-type transporter GN=phnD2                                  | 4       | 6             | 20,2             | 47,9          |
| tr Q0JZL5 Q0JZL5_CUPNH Succinate-semialdehyde dehydrogenase (NADP+) GN=gabD4          | 5       | 4             | 12               | 19,6          |
| tr Q0KCS5 Q0KCS5_CUPNH NADH-quinone oxidoreductase subunit F GN=nuoF                  | 5       | 6             | 16,7             | 16,5          |
| tr Q0K3C5 Q0K3C5_CUPNH Uncharacterized conserved protein GN=spoVR                     | 5       | 2             | 9,3              | 3,1           |
| tr Q0KF98 Q0KF98_CUPNH Dehydrogenase with different specificities A0171               | 3       | 4             | 13,7             | 22,1          |
| sp Q0KBK5 TIG_CUPNH Trigger factor GN=tig   | 8       | 13            | 18,8             | 41,9          |
| tr Q0JZ95 Q0JZ95_CUPNH Outer membrane protein (Porin) B2147                           | 4       | 3             | 13,8             | 2,8           |
| sp Q0KF25 SAHH_CUPNH Adenosylhomocysteinase GN=ahcY                                   | 3       | 5             | 8,1              | 25,2          |
| sp Q0K632 RS14_CUPNH 30S ribosomal protein S14 GN=rpsN                                | 1       | 2             | 7,9              | 7,9           |
| tr Q0K4K6 Q0K4K6_CUPNH Flagellar L-ring protein GN=flgH                               | 3       | 0             | 15,8             | 3,4           |
| tr Q0KE61 Q0KE61_CUPNH Branched-chain-amino-acid aminotransferase GN=livE             | 2       | 2             | 8,2              | 13,4          |
| tr Q0K8I0 Q0K8I0_CUPNH Hypothetical membrane associated protein A2609                 | 3       | 2             | 16,3             | 9,7           |
| sp Q0KCT8 LEU1_CUPNH 2-isopropylmalate synthase GN=leuA                               | 7       | 6             | 14,6             | 31            |
| tr Q0K8G5 Q0K8G5_CUPNH ABC-type transporter, permease component: HAAT family GN=livMI | 2       | 3             | 4,9              | 4,2           |
| tr Q0KDG8 Q0KDG8_CUPNH Nucleobase:cation symporter 2 (NCS2) family transporter A0806  | 2       | 2             | 4,2              | 4,2           |
| tr Q0KC06 Q0KC06_CUPNH Short chain dehydrogenase A1325                                | 4       | 8             | 17,6             | 12,3          |
| sp Q0KDL8 LOLA_CUPNH Outer-membrane lipoprotein carrier protein GN=lola               | 2       | 2             | 10               | 5,2           |
| tr Q0K867 Q0K867_CUPNH RNA polymerase sigma factor RpoD GN=rpoD1                      | 7       | 19            | 8,3              | 6,9           |
| tr Q0K8F3 Q0K8F3_CUPNH Citrate synthase GN=prpC2                                      | 1       | 2             | 65,6             | 61,6          |
| tr Q0K2X2 Q0K2X2_CUPNH Sulfite oxidase B0860  | 7       | 5             | 24,5             | 19,8          |
| tr Q0K7W7 Q0K7W7_CUPNH Cell division coordinator CpoB GN=cpoB                         | 2       | 2             | 11,1             | 11,1          |

## 5. Anhang

| Protein fasta   | Peptide |                  | Sequenzabdeckung |                  |
|---|---------|------------------|------------------|------------------|
|   | WT      | $\Delta ppk-all$ | WT               | $\Delta ppk-all$ |
| tr Q0KE38 Q0KE38_CUPNH Cation/multidrug efflux system<br>GN=acrA1                           | 3       | 0                | 9,3              | 0                |
| tr Q0JZK1 Q0JZK1_CUPNH ABC-type transporter B2041   | 4       | 5                | 16,2             | 22,1             |
| tr Q0KC59 Q0KC59_CUPNH Uncharacterized protein A1272  | 1       | 1                | 3,8              | 3,8              |
| tr Q0KBG3 Q0KBG3_CUPNH Enoyl-CoA hydratase A1526  | 10      | 14               | 16,7             | 24,5             |
| tr Q0KDT4 Q0KDT4_CUPNH Predicted ornithine cyclodeaminase<br>A0689                          | 2       | 7                | 5,8              | 20,8             |
| sp Q07252 MEMP_CUPNH Membrane protein A0667   | 2       | 2                | 5,5              | 8,6              |
| sp Q0K823 SYA_CUPNH Alanine-tRNA ligase GN=alaS   | 2       | 3                | 3,3              | 4,8              |
| tr Q0K7D9 Q0K7D9_CUPNH Zn-dependent protease with chaperone<br>function A3007               | 2       | 3                | 17,4             | 22,7             |
| sp Q0K623 RS19_CUPNH 30S ribosomal protein S19 GN=rpsS                                      | 1       | 1                | 8,8              | 8,8              |
| tr Q0KCZ3 Q0KCZ3_CUPNH Flp pilus assembly protein TadC<br>GN=tadC2                          | 4       | 3                | 9,9              | 8,2              |
| tr Q0K8E6 Q0K8E6_CUPNH Spermidine synthase A2643  | 3       | 5                | 12,9             | 17,9             |
| sp P31638 ACSA_CUPNH Acetyl-coenzyme A synthetase GN=acsA                                   | 6       | 7                | 10,9             | 11,8             |
| tr Q0JZC7 Q0JZC7_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family<br>B2115                      | 1       | 0                | 3,1              | 0                |
| tr Q0KB85 Q0KB85_CUPNH MoxR-like ATPase A1604   | 4       | 6                | 16               | 27,8             |
| tr Q0KBN3 Q0KBN3_CUPNH Putative peptidase, M20D subfamily<br>GN=abgB                        | 3       | 7                | 9,5              | 23,5             |
| tr Q0KE04 Q0KE04_CUPNH YeaC related amidohydrolase A0619                                    | 1       | 1                | 17,3             | 17,3             |
| tr Q0K6M7 Q0K6M7_CUPNH Cell division protein FtsQ GN=ftsQ                                   | 3       | 2                | 12,8             | 10,2             |
| tr Q0K7J1 Q0K7J1_CUPNH Putative lipoprotein A2954   | 2       | 2                | 14,3             | 14,3             |
| tr Q0K4D0 Q0K4D0_CUPNH Phospholipase B0344  | 5       | 5                | 13,5             | 15,9             |
| tr Q0KDN0 Q0KDN0_CUPNH Short chain dehydrogenase A0743                                      | 3       | 5                | 13,9             | 27,8             |
| tr Q0KB07 Q0KB07_CUPNH YeaC related amidohydrolase GN=ycaC<br>component: HAAAT family A1524 | 1       | 1                | 12               | 12               |
| tr Q0KBG5 Q0KBG5_CUPNH ABC-type transporter, ATPase<br>GN=glyA                              | 3       | 4                | 11,4             | 17,7             |
| sp Q0K7W0 GLYA_CUPNH Serine hydroxymethyltransferase<br>GN=glyA                             | 4       | 6                | 14,7             | 19,3             |
| tr Q0K7B8 Q0K7B8_CUPNH ABC-type transporter GN=livM2  | 1       | 2                | 3,9              | 7,8              |
| tr Q0KF17 Q0KF17_CUPNH Glutathione S-transferase A0252                                      | 3       | 6                | 15,9             | 32,3             |
| sp Q9X6U2 BDHA_CUPNH D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase<br>GN=hbdH1                       | 2       | 4                | 12,8             | 16,7             |
| tr Q0K7H6 Q0K7H6_CUPNH Corrinoid adenosyltransferase<br>GN=btuR                             | 1       | 0                | 8,9              | 0                |
| tr Q0KBW3 Q0KBW3_CUPNH Response regulator, NarL-family<br>A1372                             | 2       | 4                | 12,9             | 22,9             |
| tr Q0K6X4 Q0K6X4_CUPNH Biotin carboxylase GN=accC2  | 4       | 5                | 19               | 26,7             |
| tr Q0KD00 Q0KD00_CUPNH Tad domain-containing protein A0978                                  | 5       | 8                | 13,6             | 25,1             |
| tr Q0K7S3 Q0K7S3_CUPNH Hypothetical membrane associated<br>protein A2872                    | 5       | 3                | 13,9             | 9,8              |
| tr Q0K379 Q0K379_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute<br>receptor B0748                  | 2       | 2                | 17,2             | 21,5             |
| tr Q0KCY5 Q0KCY5_CUPNH Membrane protein A0993   | 4       | 2                | 18,9             | 9,2              |
| tr Q0KFM3 Q0KFM3_CUPNH ABC-type transporter GN=hisM   | 1       | 1                | 3,4              | 3,4              |
| tr Q0K2U4 Q0K2U4_CUPNH ABC-type transporter B0888   | 1       | 2                | 4,5              | 4,5              |
| tr Q0K3W9 Q0K3W9_CUPNH D-amino-acid dehydrogenase<br>GN=dadA6                               | 3       | 3                | 15,7             | 14,2             |
| tr Q0K3W9 Q0K3W9_CUPNH D-amino-acid dehydrogenase<br>GN=dadA6                               | 4       | 5                | 10,2             | 11,6             |
| sp P40289 Y669_CUPNH Putative tyrosine-protein phosphatase<br>A0669                         | 3       | 6                | 12,5             | 25,3             |

| Protein fasta   | WT |                  | Peptide<br>$\Delta ppk-all$ |      | $\Delta ppkA$ |      | Sequenzabdeckung<br>$\Delta ppk-all$ |  |
|---|----|------------------|-----------------------------|------|---------------|------|--------------------------------------|--|
|   | WT | $\Delta ppk-all$ | $\Delta ppkA$               | WT   | $\Delta ppkA$ | WT   | $\Delta ppk-all$                     |  |
| tr Q0JZB0 Q0JZB0_CUPNH Uncharacterized protein B2132                                  | 2  | 0                | 1                           | 7,1  | 0             | 7,1  | 0                                    |  |
| tr Q0KCM0 Q0KCM0_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A1110               | 2  | 3                | 2                           | 11,3 | 16,8          | 11,3 | 13,1                                 |  |
| sp Q0KBT4 PYRD_CUPNH Dihydroorotate dehydrogenase (quinone) GN=pyrD                   | 5  | 5                | 4                           | 23,5 | 23,5          | 23,5 | 20,1                                 |  |
| tr Q0KFF5 Q0KFF5_CUPNH Cell shape-determining protein MreC GN=mreC                    | 4  | 4                | 7                           | 16,8 | 11,5          | 16,8 | 25,5                                 |  |
| sp Q0K638 RL15_CUPNH 50S ribosomal protein L15 GN=rplO                                | 2  | 4                | 4                           | 12,5 | 27,1          | 12,5 | 20,1                                 |  |
| tr Q0KCC8 Q0KCC8_CUPNH Zn-dependent membrane-bound protease A1202                     | 2  | 2                | 1                           | 6,8  | 6,8           | 6,8  | 3,2                                  |  |
| tr Q0K67 Q0K67_CUPNH Response regulator A0202   | 2  | 2                | 0                           | 12,8 | 12,8          | 12,8 | 0                                    |  |
| tr Q0KBF6 Q0KBF6_CUPNH Putative NADP-dependent oxidoreductase yncB A1533              | 2  | 4                | 2                           | 8    | 16,7          | 8    | 8                                    |  |
| sp Q0K6N3 SECA_CUPNH Protein translocase subunit SecA GN=secA                         | 8  | 11               | 7                           | 11,4 | 13,8          | 11,4 | 9,8                                  |  |
| tr Q0K648 Q0K648_CUPNH Thioldisulfide interchange protein Dsbd GN=dsbd                | 4  | 6                | 10                          | 7,4  | 10            | 7,4  | 19,1                                 |  |
| tr Q0KEL4 Q0KEL4_CUPNH Hypothetical membrane associated protein A0407                 | 1  | 0                | 2                           | 8    | 0             | 8    | 15,2                                 |  |
| tr Q0JY19 Q0JY19_CUPNH Periplasmic alpha-carbonic anhydrase GN=caa                    | 2  | 0                | 0                           | 8,8  | 0             | 8,8  | 0                                    |  |
| tr Q0KE21 Q0KE21_CUPNH Short-chain alcohol dehydrogenase A0602                        | 3  | 7                | 2                           | 12,3 | 33,7          | 12,3 | 9,5                                  |  |
| tr Q0K0D2 Q0K0D2_CUPNH MFS transporter, AAHS family B1760                             | 2  | 2                | 4                           | 5,8  | 5,8           | 5,8  | 12,7                                 |  |
| tr Q0K8G2 Q0K8G2_CUPNH Citrate synthase GN=cisY                                       | 5  | 7                | 3                           | 15,9 | 24            | 15,9 | 11,8                                 |  |
| tr Q0K6P2 Q0K6P2_CUPNH Type IV pilus assembly protein PilB GN=pilB                    | 7  | 9                | 11                          | 12,5 | 15,5          | 12,5 | 24                                   |  |
| sp Q0K628 RS17_CUPNH 30S ribosomal protein S17 GN=rpsQ                                | 1  | 1                | 1                           | 9,8  | 9,8           | 9,8  | 9,8                                  |  |
| tr Q0K737 Q0K737_CUPNH Catalase GN=katE1  | 6  | 8                | 3                           | 12,7 | 17,5          | 12,7 | 5,8                                  |  |
| tr Q0K0K9 Q0K0K9_CUPNH Lysine/ornithine N-monooxygenase GN=pvdA                       | 5  | 6                | 0                           | 11,6 | 15,2          | 11,6 | 0                                    |  |
| sp Q0K692 HIS4_CUPNH L-(5-phosphoribosyl)-5-imidazole-4-carboxamide isomerase         | 3  | 4                | 3                           | 14,5 | 25            | 14,5 | 14,5                                 |  |
| tr Q0K945 Q0K945_CUPNH ABC-type transporter A2381                                     | 1  | 1                | 1                           | 4,2  | 4,2           | 4,2  | 4,2                                  |  |
| tr Q0K931 Q0K931_CUPNH Transcription termination factor Rho GN=rho                    | 5  | 12               | 8                           | 14,4 | 36,9          | 14,4 | 22                                   |  |
| tr Q0KCB0 Q0KCB0_CUPNH TPR repeat A1220   | 1  | 1                | 0                           | 8,5  | 8,5           | 8,5  | 0                                    |  |
| tr Q0KCP0 Q0KCP0_CUPNH Glutathione S-transferase A1090                                | 2  | 2                | 6                           | 8,3  | 7,4           | 8,3  | 25,7                                 |  |
| tr Q0K281 Q0K281_CUPNH Acetyl-CoA synthetase B1102                                    | 5  | 9                | 1                           | 11,8 | 22            | 11,8 | 2                                    |  |
| tr Q0JY61 Q0JY61_CUPNH Argininosuccinate synthase GN=argC                             | 4  | 10               | 2                           | 11,1 | 26,3          | 11,1 | 6,3                                  |  |
| tr Q0JYL5 Q0JYL5_CUPNH GFA domain-containing protein B2377                            | 1  | 2                | 2                           | 10,9 | 16,6          | 10,9 | 16,6                                 |  |
| tr Q0KCT3 Q0KCT3_CUPNH Putative Zn-dependent oxidoreductase A1046                     | 3  | 6                | 1                           | 9    | 22,2          | 9    | 3                                    |  |
| tr Q0K564 Q0K564_CUPNH Transcriptional regulator, GntR-family B0054                   | 2  | 7                | 3                           | 13,4 | 47,1          | 13,4 | 24,9                                 |  |
| tr Q0K308 Q0K308_CUPNH D-3-Phosphoglycerate dehydrogenase GN=serA4                    | 4  | 11               | 0                           | 14,6 | 40            | 14,6 | 0                                    |  |
| tr Q0KC00 Q0KC00_CUPNH Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit A A1331 | 2  | 6                | 2                           | 11,2 | 24,5          | 11,2 | 11,2                                 |  |
| sp Q0K9E5 RS6_CUPNH 30S ribosomal protein S6 GN=rpsF                                  | 2  | 4                | 3                           | 18,5 | 33,1          | 18,5 | 27,4                                 |  |
| tr Q0K293 Q0K293_CUPNH Patatin-like phospholipase B1090                               | 1  | 1                | 2                           | 3,3  | 3,3           | 3,3  | 7,3                                  |  |

| Protein fasta  | Peptide |                  | Sequenzabdeckung |                  |
|--|---------|------------------|------------------|------------------|
|  | WT      | $\Delta ppk-all$ | WT               | $\Delta ppk-all$ |
| tr Q0K6Z1 Q0K6Z1_CUPNH Flp pilus assembly protein TadG<br>GN=tadG2a                            | 3       | 2                | 15,3             | 11,9             |
| tr Q0K6K4 Q0K6K4_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic<br>component A3293                    | 3       | 1                | 9,8              | 3                |
| tr Q0K8Z5 Q0K8Z5_CUPNH Polyphosphate kinase GN=ppk   | 4       | 0                | 8,6              | 0                |
| tr Q0K6P0 Q0K6P0_CUPNH Type 4 prelin-like proteins leader<br>peptide-processing enzyme GN=pild | 1       | 0                | 2,3              | 0                |
| tr Q0KDK0 Q0KDK0_CUPNH Cyanophycin synthetase GN=cpha  | 9       | 17               | 12,6             | 26,9             |
| sp Q0K606 RPOB_CUPNH DNA-directed RNA polymerase subunit<br>beta GN=rpoB                       | 5       | 21               | 4,3              | 17,5             |
| tr Q0KF38 Q0KF38_CUPNH Uncharacterized protein A0231   | 4       | 4                | 16,9             | 15,7             |
| sp Q0KBZ3 SYT_CUPNH Threonine-tRNA ligase GN=thrs  | 4       | 12               | 7,1              | 21,4             |
| tr Q0KDB9 Q0KDB9_CUPNH Transcriptional regulator,<br>TetR/AcrR-family A0855                    | 2       | 2                | 8,2              | 8,2              |
| tr Q0K8I6 Q0K8I6_CUPNH Transport permease protein A2603  | 1       | 1                | 6,6              | 6,6              |
| tr Q0KD13 Q0KD13_CUPNH Uncharacterized protein A0965   | 4       | 0                | 9,8              | 0                |
| tr Q0K8R2 Q0K8R2_CUPNH Aminotransferase class IV (Putative<br>D-alanine transaminase) GN=dat   | 1       | 4                | 3,2              | 12,4             |
| tr Q0KDJ9 Q0KDJ9_CUPNH Cyanophycin synthetase GN=cpha  | 9       | 16               | 10,6             | 20,8             |
| tr Q0KFA2 Q0KFA2_CUPNH Isovaleryl-CoA dehydrogenase<br>GN=ivdl                                 | 4       | 8                | 10,9             | 20,9             |
| tr Q0JZR9 Q0JZR9_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute<br>receptor B1973                     | 2       | 2                | 6,5              | 6,5              |
| tr Q0K128 Q0K128_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute<br>receptor B1509                     | 2       | 5                | 6,8              | 21,7             |
| tr Q0KEJ6 Q0KEJ6_CUPNH Porin GN=oprB   | 3       | 1                | 8,1              | 2,1              |
| tr Q0KCK8 Q0KCK8_CUPNH Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate<br>aldolase GN=aroG1                 | 4       | 6                | 11,7             | 18,4             |
| tr Q0JZD3 Q0JZD3_CUPNH Outer membrane receptor, TonB<br>dependent B2109                        | 3       | 1                | 5,3              | 1,1              |
| tr Q0KCB8 Q0KCB8_CUPNH PPK2 domain-containing protein<br>A1212                                 | 3       | 0                | 12,4             | 0                |
| sp Q0KEG8 SYDND_CUPNH Aspartate-tRNA(Asp/Asn) ligase<br>GN=asps                                | 5       | 11               | 9,3              | 19,8             |
| tr Q0KDL1 Q0KDL1_CUPNH ABC-type transporter, ATPase<br>component A0762                         | 3       | 3                | 9,1              | 8,9              |
| tr Q0K9B8 Q0K9B8_CUPNH Transcription<br>termination/antitermination protein NusA GN=nusa       | 4       | 10               | 8,4              | 19,1             |
| tr Q0K1H7 Q0K1H7_CUPNH Phenylacetaldehyde dehydrogenase<br>GN=paaK2                            | 4       | 9                | 9,7              | 24,2             |
| tr Q0KB64 Q0KB64_CUPNH Hypothetical membrane associated<br>protein A1625                       | 2       | 4                | 14,9             | 26,3             |
| tr Q0K652 Q0K652_CUPNH Cytochrome c553 A3451   | 1       | 1                | 5                | 5                |
| tr Q0K9H7 Q0K9H7_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic<br>component: SulT family GN=cysP     | 3       | 5                | 7,8              | 15,3             |
| sp Q0K642 RS13_CUPNH 30S ribosomal protein S13 GN=rpsM   | 1       | 3                | 6,6              | 23,1             |
| tr Q0K9X1 Q0K9X1_CUPNH ABC-type transporter GN=dppD1   | 5       | 5                | 13,7             | 13,7             |
| tr Q0JY96 Q0JY96_CUPNH 3-Oxoacyl-L[acyl-carrier protein]<br>reductase B2496                    | 2       | 4                | 8,7              | 21,3             |
| tr Q0JZ74 Q0JZ74_CUPNH Flavonol reductase/cinnamoyl-CoA<br>reductase B2168                     | 3       | 1                | 11,9             | 3,3              |



| Protein fasta   | Peptide |                  | Sequenzabdeckung |                  |
|---|---------|------------------|------------------|------------------|
|   | WT      | $\Delta ppk-all$ | WT               | $\Delta ppk-all$ |
| tr Q0K9X3 Q0K9X3_CUPNH ABC-type transporter GN=dppB1                                    | 3       | 4                | 11,4             | 12,1             |
| tr Q0K882 Q0K882_CUPNH Peptidase, M48 family A2710                                      | 2       | 2                | 4,3              | 5,3              |
| tr Q0KCA5 Q0KCA5_CUPNH Aspartokinase GN=lysC  | 3       | 7                | 6,7              | 20,4             |
| tr Q0K6K1 Q0K6K1_CUPNH ABC-type transporter A3296                                       | 2       | 1                | 8,1              | 5,8              |
| tr Q0JZN0 Q0JZN0_CUPNH ABC-type transporter GN=livF3                                    | 2       | 4                | 6,8              | 16,5             |
| tr Q0KBL8 Q0KBL8_CUPNH Cation/multidrug efflux pump GN=acrB3                            | 8       | 8                | 8,6              | 8,7              |
| tr Q0K6E2 Q0K6E2_CUPNH ABC-type transporter A3360                                       | 5       | 7                | 10,1             | 14,6             |
| tr Q0K4T4 Q0K4T4_CUPNH Flp pilus assembly protein TadC GN=tadC3                         | 3       | 2                | 10,1             | 6,1              |
| sp Q0K6M6 DDL_CUPNH D-alanine-D-alanine ligase GN=ddl                                   | 2       | 1                | 6,4              | 4                |
| tr Q0JZS5 Q0JZS5_CUPNH GTP cyclohydrolase I GN=foIE                                     | 2       | 0                | 8,4              | 0                |
| tr Q0K4Y9 Q0K4Y9_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor B0129                 | 2       | 1                | 6,9              | 4,8              |
| tr Q0KD58 Q0KD58_CUPNH Predicted ATPase A0917   | 7       | 8                | 15               | 15,6             |
| tr Q0K131 Q0K131_CUPNH MFS transporter, MHS family B1506                                | 1       | 1                | 2,3              | 2,3              |
| tr Q0KCCZ4 Q0KCCZ4_CUPNH Flp pilus assembly protein TadB GN=tadB2                       | 2       | 2                | 8,9              | 8,9              |
| tr Q0K1Z2 Q0K1Z2_CUPNH Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase GN=mmsA3               | 4       | 8                | 11,2             | 19,5             |
| tr Q0K1Z4 Q0K1Z4_CUPNH 3-Hydroxybutyryl-CoA dehydratase GN=crt                          | 2       | 4                | 7                | 14,5             |
| tr Q0KA23 Q0KA23_CUPNH Zinc metalloprotease GN=rseP                                     | 4       | 3                | 10,1             | 8,6              |
| tr Q0KF93 Q0KF93_CUPNH Glutathione S-transferase A0176                                  | 3       | 4                | 13,3             | 18,7             |
| tr Q0K0G9 Q0K0G9_CUPNH Membrane protein possibly involved in tellurium resistance B1720 | 1       | 1                | 7,6              | 7,6              |
| sp Q0K630 RL24_CUPNH 50S ribosomal protein L24 GN=rplX                                  | 1       | 1                | 9,8              | 9,8              |
| tr Q0KAS4 Q0KAS4_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A1787                 | 2       | 3                | 7,1              | 9,4              |
| tr Q0KD70 Q0KD70_CUPNH ADP-heptose:LPS heptosyltransferase II GN=rfaF2                  | 4       | 5                | 14,3             | 14,3             |
| tr Q0K1X7 Q0K1X7_CUPNH Gluconate Transporter GN=gntT                                    | 2       | 2                | 5,5              | 5,5              |
| tr Q0KA99 Q0KA99_CUPNH Acyl-CoA synthetase /AMP-acid ligase II A1971                    | 4       | 6                | 11               | 14,8             |
| tr Q0K5G7 Q0K5G7_CUPNH Protease HtpX homolog GN=htpX3                                   | 2       | 2                | 9,4              | 9,4              |
| tr Q0K2B4 Q0K2B4_CUPNH Uncharacterized protein B1069                                    | 1       | 1                | 14,3             | 14,3             |
| tr Q0JZP1 Q0JZP1_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor B2001                 | 2       | 3                | 12,7             | 21,9             |
| sp Q0K979 TAL_CUPNH Transaldolase GN=tal  | 1       | 4                | 2,8              | 13,2             |
| tr Q0K6M3 Q0K6M3_CUPNH Probable peptidoglycan glycosyltransferase FtsW GN=ftsW          | 3       | 1                | 7,3              | 2,4              |
| tr Q0K5T8 Q0K5T8_CUPNH Uncharacterized NAD(FAD)-dependent dehydrogenase GN=hcaD         | 4       | 10               | 11,2             | 31,1             |
| tr Q0K526 Q0K526_CUPNH LUD_dom domain-containing protein B0092                          | 2       | 6                | 9,9              | 29,6             |
| tr Q0JZ10 Q0JZ10_CUPNH Bb3-type cytochrome oxidase GN=coxM                              | 2       | 3                | 6,2              | 11,9             |
| tr Q0KF74 Q0KF74_CUPNH Putative GTPase (G3E family) A0195                               | 3       | 5                | 10,7             | 15               |
| tr Q0KD23 Q0KD23_CUPNH Guanylate kinase GN=gmk  | 2       | 4                | 7,7              | 17,3             |
| tr Q0JZN2 Q0JZN2_CUPNH ABC-type transporter GN=livM3                                    | 1       | 1                | 3,2              | 3,2              |
| tr Q0K9X4 Q0K9X4_CUPNH ABC-type transporter GN=dppC1                                    | 1       | 1                | 2,6              | 2,6              |

## 5. Anhang

| Protein fasta   | WT |                         | Peptide<br>$\Delta ppk\text{-}all$ |      | $\Delta ppiA$           |      | Sequenzabdeckung        |               |
|---|----|-------------------------|------------------------------------|------|-------------------------|------|-------------------------|---------------|
|   | WT | $\Delta ppk\text{-}all$ | $\Delta ppiA$                      | WT   | $\Delta ppk\text{-}all$ | WT   | $\Delta ppk\text{-}all$ | $\Delta ppiA$ |
| tr Q0K4U9 Q0K4U9_CUPNH Acyl-CoA synthetase B0174                                  | 4  | 8                       | 2                                  | 10,3 | 17,7                    | 4,7  | 4,7                     | 4,7           |
| tr Q0KF96 Q0KF96_CUPNH 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase A0173            | 2  | 2                       | 1                                  | 9,2  | 13,8                    | 6    | 6                       | 6             |
| tr Q0KF06 Q0KF06_CUPNH Glutamin-fructose-6-phosphate aminotransferase GN=glms     | 4  | 11                      | 3                                  | 9,8  | 22,2                    | 5,4  | 5,4                     | 5,4           |
| sp Q0KE20 KAD_CUPNH Adenylate kinase GN=adk                                       | 2  | 4                       | 3                                  | 10,4 | 22,2                    | 16,3 | 16,3                    | 16,3          |
| tr Q0K0K7 Q0K0K7_CUPNH ABC-type transporter B1682                                 | 4  | 9                       | 2                                  | 9,5  | 25                      | 4,1  | 4,1                     | 4,1           |
| tr Q0K8N2 Q0K8N2_CUPNH Hypothetical membrane associated protein A2556             | 1  | 1                       | 3                                  | 6,2  | 6,2                     | 20,8 | 20,8                    | 20,8          |
| tr Q0K833 Q0K833_CUPNH Predicted signal transduction protein A1248                | 10 | 8                       | 14                                 | 10   | 8,4                     | 13,3 | 13,3                    | 13,3          |
| tr Q0K5J8 Q0K5J8_CUPNH Lysohospholipase GN=pldB                                   | 3  | 3                       | 5                                  | 10   | 13,2                    | 20,3 | 20,3                    | 20,3          |
| tr Q0KF19 Q0KF19_CUPNH Soluble lytic murein transglycosylase A0250                | 7  | 4                       | 6                                  | 15,1 | 7,4                     | 10,9 | 10,9                    | 10,9          |
| tr Q0K0P9 Q0K0P9_CUPNH Glycosyltransferase involved in cell wall biogenesis B1640 | 2  | 2                       | 3                                  | 6,5  | 6,5                     | 9    | 9                       | 9             |
| tr Q0K9B0 Q0K9B0_CUPNH Polyferredoxin GN=ccoG                                     | 4  | 4                       | 8                                  | 8,9  | 8,5                     | 17,1 | 17,1                    | 17,1          |
| tr Q0K852 Q0K852_CUPNH NADH dehydrogenase type2 GN=ndh                            | 3  | 3                       | 2                                  | 8,8  | 8,8                     | 6,1  | 6,1                     | 6,1           |
| tr Q0K8R8 Q0K8R8_CUPNH LprI domain-containing protein A2515                       | 1  | 0                       | 0                                  | 7,4  | 0                       | 0    | 0                       | 0             |
| tr Q0KF49 Q0KF49_CUPNH N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase GN=argC1       | 3  | 7                       | 1                                  | 12,4 | 25,1                    | 3,8  | 3,8                     | 3,8           |
| tr Q0K6G9 Q0K6G9_CUPNH Ribosome-binding ATPase YchF GN=ychF                       | 3  | 9                       | 0                                  | 8,3  | 33,9                    | 0    | 0                       | 0             |
| tr Q0K702 Q0K702_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family GN=phcA             | 3  | 6                       | 1                                  | 10,6 | 21,5                    | 4,5  | 4,5                     | 4,5           |
| tr Q0KF90 Q0KF90_CUPNH Enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase A0179              | 2  | 6                       | 2                                  | 12,6 | 29                      | 9,2  | 9,2                     | 9,2           |
| tr Q0K5I4 Q0K5I4_CUPNH Response regulator, OmpR-family GN=phhR                    | 2  | 3                       | 0                                  | 7,3  | 15,4                    | 0    | 0                       | 0             |
| tr Q0K818 Q0K818_CUPNH Putative transporter, APC superfamily A2774                | 1  | 1                       | 1                                  | 5,2  | 5,2                     | 5,2  | 5,2                     | 5,2           |
| tr Q0K8T7 Q0K8T7_CUPNH Amidase related to nicotinamidase A2496                    | 2  | 3                       | 0                                  | 15,4 | 19,4                    | 0    | 0                       | 0             |
| tr Q0KB86 Q0KB86_CUPNH Predicted spermidine synthase A1603                        | 4  | 3                       | 2                                  | 6,7  | 5,2                     | 3,1  | 3,1                     | 3,1           |
| tr Q0K676 Q0K676_CUPNH ABC-type transporter GN=tg2A                               | 2  | 0                       | 2                                  | 7    | 0                       | 6,6  | 6,6                     | 6,6           |
| tr Q0K7L8 Q0K7L8_CUPNH TRAP-type transporter, large permease component A2927      | 1  | 1                       | 0                                  | 1,2  | 1,2                     | 0    | 0                       | 0             |
| tr Q0K677 Q0K677_CUPNH ABC-type transporter GN=tig2B                              | 1  | 1                       | 1                                  | 5,4  | 5,4                     | 5,4  | 5,4                     | 5,4           |
| tr Q0K949 Q0K949_CUPNH NADPH:quinone oxidoreductase A2377                         | 2  | 5                       | 2                                  | 7,4  | 17,3                    | 7,4  | 7,4                     | 7,4           |
| tr Q0K3Y4 Q0K3Y4_CUPNH Transcriptional regulator, MarR-family B0493               | 1  | 2                       | 1                                  | 6,1  | 10,6                    | 6,1  | 6,1                     | 6,1           |
| tr Q0K550 Q0K550_CUPNH Enoyl-CoA hydratase A3593                                  | 3  | 2                       | 2                                  | 13,1 | 7,3                     | 9,3  | 9,3                     | 9,3           |
| sp Q0KEC0 KTHY_CUPNH Thymidylate kinase GN=tmk                                    | 2  | 1                       | 0                                  | 11,3 | 5,9                     | 0    | 0                       | 0             |
| tr Q0K0Q8 Q0K0Q8_CUPNH Phosphotransacetylase GN=pta1                              | 2  | 3                       | 2                                  | 9,3  | 11,5                    | 9,3  | 9,3                     | 9,3           |
| tr Q0K6D9 Q0K6D9_CUPNH Endo alpha-1,4 polygalactosaminidase precursor A3363       | 2  | 0                       | 0                                  | 7,4  | 0                       | 0    | 0                       | 0             |
| tr Q0KEY8 Q0KEY8_CUPNH 3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase GN=paah1                   | 1  | 2                       | 0                                  | 3,9  | 9,5                     | 0    | 0                       | 0             |
| tr Q0K6Z3 Q0K6Z3_CUPNH Malic enzyme (NAD-binding) GN=maeA                         | 4  | 15                      | 5                                  | 5,3  | 24,4                    | 6,2  | 6,2                     | 6,2           |
| sp Q0K7Z0 PDXH_CUPNH Pyridoxine/pyridoxamine 5-phosphate oxidase GN=pdxH          | 2  | 5                       | 2                                  | 13,7 | 30,7                    | 15,6 | 15,6                    | 15,6          |
| tr Q0K6Y7 Q0K6Y7_CUPNH Magnesium transport protein CorA GN=corA2                  | 2  | 2                       | 5                                  | 6,5  | 5                       | 15,6 | 15,6                    | 15,6          |

| Protein fasta   | Peptide |                   | Sequenzabdeckung |                   |
|---|---------|-------------------|------------------|-------------------|
|   | WT      | $\Delta pphk-all$ | WT               | $\Delta pphk-all$ |
| tr Q0KFD0 Q0KFD0_CUPNH Uncharacterized protein A0139                                    | 3       | 9                 | 12,2             | 32,1              |
| tr Q0K6P1 Q0K6P1_CUPNH Type IV pilus assembly protein PilC<br>GN=piC                    | 1       | 0                 | 1,7              | 0                 |
| sp Q0KCS2 NUO1_CUPNH NADH-quinone oxidoreductase subunit I<br>GN=nuo1                   | 1       | 4                 | 4,9              | 22,1              |
| tr Q0KEY4 Q0KEY4_CUPNH ABC-type transporter, ATPase<br>component: HAAT family A0286     | 3       | 3                 | 7,1              | 7,1               |
| tr Q0JYY5 Q0JYY5_CUPNH Uncharacterized protein B2257                                    | 2       | 3                 | 10,4             | 14,8              |
| tr Q0K7C8 Q0K7C8_CUPNH Histidine ammonia-lyase GN=hutH                                  | 2       | 3                 | 7,6              | 8,8               |
| tr Q0KEI0 Q0KEI0_CUPNH Dehydrogenase (FAD)/FMN-containing<br>GN=glpCD                   | 8       | 4                 | 8                | 4                 |
| tr Q0K750 Q0K750_CUPNH 2-Hydroxy-acid oxidase, FAD-binding<br>subunit GN=glcE           | 3       | 5                 | 10,9             | 21                |
| tr Q0K527 Q0K527_CUPNH Iron-sulfur cluster-binding protein B0091                        | 3       | 3                 | 7,9              | 7,9               |
| tr Q0K3U0 Q0K3U0_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute<br>receptor B0537              | 2       | 2                 | 8,5              | 8,5               |
| tr Q0KCF6 Q0KCF6_CUPNH Lipoprotein-releasing system<br>ATP-binding protein LolD GN=lolD | 1       | 3                 | 4,5              | 13                |
| tr Q0KES3 Q0KES3_CUPNH Aa3-type cytochrome oxidase, subunit<br>III GN=ctaE              | 1       | 0                 | 4,5              | 0                 |
| tr Q0K6L8 Q0K6L8_CUPNH Peptidoglycan D,D-transpeptidase FtsI<br>GN=ftsI                 | 5       | 3                 | 8,7              | 5                 |
| tr Q0K7W3 Q0K7W3_CUPNH Biopolymer transport protein<br>GN=exbD2                         | 1       | 0                 | 6,8              | 0                 |
| tr Q0K7G4 Q0K7G4_CUPNH Malonyl-CoA decarboxylase<br>Malonyl-CoA decarboxylase GN=mcd    | 3       | 6                 | 7                | 14,8              |
| tr Q0K5U5 Q0K5U5_CUPNH Sulfur oxidation protein (SoxZ)<br>GN=soxZ                       | 2       | 4                 | 15,5             | 40,8              |
| tr Q0K2F7 Q0K2F7_CUPNH Bo3-type chinol oxidase, subunit I<br>GN=cyoB3                   | 2       | 1                 | 3,9              | 1,5               |
| tr Q0K8G8 Q0K8G8_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute<br>receptor A1360              | 3       | 9                 | 9,6              | 37,5              |
| tr Q0KEG9 Q0KEG9_CUPNH Hypothetical membrane spanning<br>protein A0452                  | 1       | 1                 | 4,2              | 4,2               |
| sp Q0KCT2 TPIS_CUPNH Triosephosphate isomerase GN=tpiA                                  | 2       | 2                 | 9,8              | 9,8               |
| sp Q0KA43 GUAA_CUPNH GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]<br>GN=guaA                    | 4       | 9                 | 11,5             | 23,6              |
| tr Q0K8G8 Q0K8G8_CUPNH 3-isopropylmalate dehydratase large<br>subunit GN=leuC3          | 1       | 2                 | 1,7              | 3,8               |
| tr Q0K5W2 Q0K5W2_CUPNH GFA domain-containing protein A3550                              | 1       | 0                 | 10,3             | 0                 |
| tr Q0JZ42 Q0JZ42_CUPNH Uncharacterized protein B2200                                    | 3       | 3                 | 9,5              | 9,5               |
| tr Q0K7W4 Q0K7W4_CUPNH Hypothetical membrane associated<br>protein A2830                | 1       | 1                 | 3,2              | 3,2               |
| tr Q0K6X7 Q0K6X7_CUPNH Thioredoxin-like protein A3169                                   | 1       | 2                 | 8,6              | 16,6              |
| tr Q0KFE8 Q0KFE8_CUPNH Uncharacterized protein A0121                                    | 1       | 2                 | 12,3             | 18,9              |
| tr Q0KAT7 Q0KAT7_CUPNH Putative transcriptional regulator<br>A1771                      | 1       | 2                 | 4,9              | 13                |
| tr Q0K6I9 Q0K6I9_CUPNH Phenylacetate-coenzyme A ligase<br>GN=paalI                      | 2       | 6                 | 6,5              | 19,6              |
| tr Q0K6G6 Q0K6G6_CUPNH Hypothetical membrane protein A3336                              | 2       | 1                 | 5,6              | 3,5               |
| tr Q0K2A2 Q0K2A2_CUPNH Tyrosine aminotransferase GN=tyrB2                               | 3       | 7                 | 7,8              | 22,6              |
| tr Q0JZL0 Q0JZL0_CUPNH ATPase involved in chromosome<br>partitioning B2032              | 2       | 2                 | 7,8              | 7,8               |

| Protein fasta   | Peptide |                  | Sequenzabdeckung |                  |
|---|---------|------------------|------------------|------------------|
|   | WT      | $\Delta ppk-all$ | WT               | $\Delta ppk-all$ |
| tr Q0KDN4 Q0KDN4_CUPNH Type IV pilus transmembrane protein PilJ GN=plj                | 3       | 1                | 4,7              | 1,4              |
| tr Q0K7R0 Q0K7R0_CUPNH Phosphomannomutase GN=manB2                                    | 2       | 5                | 3,9              | 11,5             |
| tr Q0KCU0 Q0KCU0_CUPNH Phosphatidylserine synthase GN=psaA                            | 1       | 2                | 4,3              | 8                |
| tr Q0K3W4 Q0K3W4_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor B0513               | 2       | 2                | 6,4              | 6,4              |
| tr Q0K3E9 Q0K3E9_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor B0678               | 2       | 1                | 10,2             | 7,1              |
| tr Q0K7M7 Q0K7M7_CUPNH Uncharacterized enzyme of heme biosynthesis GN=hemY            | 2       | 2                | 4,3              | 13,1             |
| tr Q0KCC6 Q0KCC6_CUPNH 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase GN=dapA              | 1       | 4                | 3,7              | 16,3             |
| sp Q0K621 RL23_CUPNH 50S ribosomal protein L23 GN=rpLW                                | 1       | 2                | 12,5             | 20,2             |
| tr Q0K4T6 Q0K4T6_CUPNH Flp pilus assembly ATPase CpaF GN=cpaF2                        | 4       | 5                | 8,2              | 12,8             |
| tr Q0KCR7 Q0KCR7_CUPNH NADH-quinone oxidoreductase subunit N GN=nuoN                  | 1       | 1                | 1,8              | 1,8              |
| sp Q0KPF9 HSLU_CUPNH ATP-dependent protease ATPase subunit HslU GN=hslU               | 3       | 8                | 6,5              | 17,8             |
| tr Q0K928 Q0K928_CUPNH 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose transferase GN=amt                 | 2       | 2                | 3,9              | 3,9              |
| tr Q0K4Z4 Q0K4Z4_CUPNH Elongation factor G GN=fusA                                    | 1       | 7                | 9,7              | 11,1             |
| tr Q0KCN7 Q0KCN7_CUPNH Hypothetical membrane associated protein A1093                 | 1       | 0                | 4,1              | 0                |
| tr Q7WWY6 Q7WWY6_CUPNH Putative channel-forming protein GN=trbI                       | 2       | 1                | 5,2              | 12               |
| tr Q0K831 Q0K831_CUPNH NADH pyrophosphatase I of the Nudix family of hydrolases A2761 | 1       | 1                | 8,8              | 8,8              |
| tr Q0K7C1 Q0K7C1_CUPNH Acetylornithine aminotransferase GN=argD                       | 2       | 3                | 6,3              | 9,9              |
| sp Q0K607 RPOC_CUPNH DNA-directed RNA polymerase subunit beta GN=rpoc                 | 8       | 26               | 5,9              | 21,1             |
| tr Q0K0T9 Q0K0T9_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component B1600              | 2       | 2                | 5,3              | 5,3              |
| tr Q0KEG7 Q0KEG7_CUPNH Hypothetical membrane associated protein A0454                 | 1       | 0                | 4,3              | 0                |
| tr Q0KD50 Q0KD50_CUPNH Uncharacterized protein A0925                                  | 2       | 6                | 5,6              | 22               |
| tr Q0JYW3 Q0JYW3_CUPNH Heme d1 biosynthesis protein (NirF) GN=nirF                    | 2       | 1                | 7,8              | 2,7              |
| tr Q0JZD5 Q0JZD5_CUPNH RHS family protein B2107                                       | 2       | 0                | 1,5              | 0                |
| tr Q0K9L3 Q0K9L3_CUPNH Isocitrate lyase GN=icla                                       | 3       | 8                | 4,8              | 16,5             |
| tr Q0KD53 Q0KD53_CUPNH 2-Polyprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase A0922                 | 2       | 13               | 7,8              | 33,4             |
| tr Q0JZ44 Q0JZ44_CUPNH Conserved hypothetical transmembrane protein B2198             | 1       | 1                | 1,8              | 1,8              |
| tr Q0JZH9 Q0JZH9_CUPNH Hypothetical transmembrane protein B2063                       | 1       | 0                | 7,2              | 0                |
| tr Q0JZU9 Q0JZU9_CUPNH Putative non-heme chloroperoxidase B1943                       | 1       | 1                | 6,2              | 6,2              |
| tr Q0K7A5 Q0K7A5_CUPNH tRNA and tRNA cytosine-C5-methylase GN=sunI                    | 2       | 3                | 5,8              | 8,2              |

| Protein fasta  | WT |  | Peptide<br>$\Delta ppk-all$ |  | $\Delta pptA$ |     | Sequenzabdeckung<br>$\Delta ppk-all$ |      | $\Delta pptA$ |
|--|----|--|-----------------------------|--|---------------|-----|--------------------------------------|------|---------------|
|  | WT |  | $\Delta ppk-all$            |  | $\Delta pptA$ | WT  |                                      |      |               |
| tr Q0JZ58 Q0JZ58_CUPNH Copper resistance protein B, copper extruder GN=copB                  | 2  |  | 1                           |  | 2             | 5,9 |                                      | 2,3  | 5,9           |
| tr Q0K8Q7 Q0K8Q7_CUPNH UPF0114 protein H16_A2527 A2527                                       | 1  |  | 1                           |  | 1             | 5,7 |                                      | 12,6 | 12,6          |
| tr Q0K7P9 Q0K7P9_CUPNH NAD dependent sugar epimerase A2896                                   | 3  |  | 8                           |  | 1             | 7,8 |                                      | 25,3 | 2,2           |
| tr Q0K6I4 Q0K6I4_CUPNH Phosphoglycolate phosphatase GN=gph                                   | 1  |  | 2                           |  | 2             | 3,2 |                                      | 8,5  | 8,5           |
| tr Q0K9U6 Q0K9U6_CUPNH Beta-lactamase class C GN=bla1  | 2  |  | 2                           |  | 2             | 4,5 |                                      | 4,5  | 4,3           |
| tr Q0K8H8 Q0K8H8_CUPNH Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase GN=accD            | 2  |  | 4                           |  | 5             | 7,2 |                                      | 13,4 | 15,9          |
| tr Q0K4V2 Q0K4V2_CUPNH Conserved hypothetical membrane protein B0171                         | 1  |  | 1                           |  | 1             | 5,3 |                                      | 5,3  | 5,3           |
| sp Q0K8D7 HTPG_CUPNH Chaperone protein HtpG GN=htpG  | 4  |  | 13                          |  | 3             | 6,5 |                                      | 23,4 | 4,6           |
| tr Q0JYC1 Q0JYC1_CUPNH Cardiolipin synthetase B2471  | 3  |  | 1                           |  | 3             | 8,1 |                                      | 2,7  | 6,8           |
| tr Q0K2A5 Q0K2A5_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor B1078                      | 1  |  | 1                           |  | 0             | 4,8 |                                      | 4,8  | 0             |
| tr Q0KDH3 Q0KDH3_CUPNH Lipopolysaccharide assembly protein B GN=lapB                         | 3  |  | 0                           |  | 1             | 7,8 |                                      | 0    | 2,7           |
| tr Q0K9G8 Q0K9G8_CUPNH ABC-type transporter A2256  | 1  |  | 2                           |  | 1             | 2,8 |                                      | 12,3 | 2,8           |
| tr Q0K8H1 Q0K8H1_CUPNH Aspartate-semialdehyde dehydrogenase GN=asd                           | 1  |  | 1                           |  | 0             | 4   |                                      | 4    | 0             |
| tr Q0K7M6 Q0K7M6_CUPNH Uroporphyrinogen-III synthase/methylase GN=hemXD                      | 3  |  | 5                           |  | 4             | 5,2 |                                      | 8,5  | 6,6           |
| tr Q0KCX7 Q0KCX7_CUPNH Malic enzyme (NADP) GN=maeB   | 3  |  | 9                           |  | 2             | 4,1 |                                      | 15,9 | 3             |
| tr Q0K7C9 Q0K7C9_CUPNH Urocanate hydratase GN=hutU1  | 3  |  | 4                           |  | 2             | 6,2 |                                      | 10,1 | 4,9           |
| tr Q0K1Z0 Q0K1Z0_CUPNH Transcriptional regulator B1193                                       | 2  |  | 2                           |  | 8             | 7,1 |                                      | 5,3  | 27,9          |
| tr Q0K766 Q0K766_CUPNH Phosphoserine phosphatase GN=serB2                                    | 1  |  | 3                           |  | 0             | 5,4 |                                      | 25,5 | 0             |
| tr Q0K7Q1 Q0K7Q1_CUPNH Glycyltransferase involved in cell wall biogenesis GN=wcaA            | 1  |  | 3                           |  | 4             | 2,4 |                                      | 10,1 | 10,7          |
| tr Q0KB98 Q0KB98_CUPNH Membrane-bound alcohol dehydrogenase A1591                            | 3  |  | 3                           |  | 4             | 6,8 |                                      | 7,2  | 8,8           |
| sp Q0K685 MURA_CUPNH UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase GN=murA               | 2  |  | 4                           |  | 0             | 4,8 |                                      | 9,1  | 0             |
| tr Q0K0K8 Q0K0K8_CUPNH Siderophore biosynthesis related protein/Acetyltransferase B1681      | 2  |  | 2                           |  | 2             | 6   |                                      | 5,7  | 5,5           |
| sp Q0K8N0 LEPA_CUPNH Elongation factor 4 GN=lepA   | 3  |  | 2                           |  | 5             | 4,9 |                                      | 5,2  | 11,4          |
| tr Q0K922 Q0K922_CUPNH ABC-type transporter GN=dppC2   | 2  |  | 2                           |  | 2             | 3,7 |                                      | 3,7  | 3,7           |
| tr Q0KE47 Q0KE47_CUPNH D-Alanyl-D-alanine carboxypeptidase GN=dacB                           | 3  |  | 3                           |  | 3             | 6   |                                      | 6    | 7,1           |
| tr Q0K6K3 Q0K6K3_CUPNH ABC-type transporter, ATPase component: Pept family A3294             | 2  |  | 3                           |  | 2             | 7,1 |                                      | 14,4 | 12,7          |
| sp Q0KE5 PYRG_CUPNH CTP synthase GN=pyrG   | 3  |  | 8                           |  | 1             | 5,8 |                                      | 19,3 | 2,2           |
| tr Q0KD56 Q0KD56_CUPNH MFS transporter, SP family A0919                                      | 1  |  | 2                           |  | 3             | 2,6 |                                      | 5,6  | 6,9           |
| tr Q0K7Z2 Q0K7Z2_CUPNH Uncharacterized protein involved in outer membrane biogenesis GN=asma | 4  |  | 2                           |  | 6             | 6,6 |                                      | 3,1  | 10,5          |
| tr Q0KFA0 Q0KFA0_CUPNH Carbonic anhydrase GN=can   | 1  |  | 2                           |  | 1             | 8,1 |                                      | 12,1 | 8,1           |
| tr Q0K8T3 Q0K8T3_CUPNH ABC-type transporter, permease component: CUT1 family A2500           | 1  |  | 2                           |  | 1             | 5,4 |                                      | 8    | 5,4           |
| tr Q0K7E0 Q0K7E0_CUPNH Putative ayiformamidase A3005   | 2  |  | 1                           |  | 6             | 6,5 |                                      | 2,6  | 29,7          |

| Protein fasta   | Peptide |                  | Sequenzabdeckung |                  |
|---|---------|------------------|------------------|------------------|
|   | WT      | $\Delta ppk-all$ | WT               | $\Delta ppk-all$ |
| tr Q0K5Y3 Q0K5Y3_CUPNH Acetyltransferase A3529                                | 1       | 2                | 2                | 8,2              |
| tr Q0KC05 Q0KC05_CUPNH TRAP-type transporter, small permease component A1326  | 1       | 2                | 2                | 7                |
| tr Q0K9Y0 Q0K9Y0_CUPNH Lysophospholipase A2092                                | 3       | 3                | 7                | 6,6              |
| tr Q0JZM8 Q0JZM8_CUPNH Acetylornithine deacetylase B2014                      | 2       | 7                | 3                | 22,6             |
| tr Q0JZJ9 Q0JZJ9_CUPNH Uncharacterized protein B2043                          | 3       | 2                | 1                | 7,5              |
| tr Q0K2T9 Q0K2T9_CUPNH Uncharacterized protein B0893                          | 2       | 0                | 2                | 9,2              |
| tr Q0KF18 Q0KF18_CUPNH Predicted nucleoside-diphosphate-sugar epimerase A0251 | 1       | 1                | 1                | 3,2              |
| tr Q0KAE9 Q0KAE9_CUPNH ABC-type transporter A1921                             | 4       | 6                | 1                | 11,5             |
| sp Q0K7B2 RL28_CUPNH 50S ribosomal protein L28 GN=npmb                        | 1       | 1                | 1                | 13               |
| tr Q0KC60 Q0KC60_CUPNH PPK2 domain-containing protein A1271                   | 2       | 0                | 10               | 7,8              |
| tr Q0KF85 Q0KF85_CUPNH Biotin carboxylase GN=accC1                            | 3       | 7                | 2                | 13,9             |
| tr Q0K5D5 Q0K5D5_CUPNH Efflux pump membrane transporter GN=acrB7b             | 3       | 4                | 9                | 3,5              |
| tr Q0KC76 Q0KC76_CUPNH Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase A1255         | 1       | 1                | 2                | 2,2              |
| tr Q0K4P1 Q0K4P1_CUPNH Methyl-accepting chemotaxis protein B0232              | 2       | 1                | 1                | 6                |
| tr Q0KDK3 Q0KDK3_CUPNH ABC-type transporter A0771                             | 1       | 2                | 1                | 4                |
| tr Q0K1G9 Q0K1G9_CUPNH Transcriptional regulator, AsnC-family B1366           | 1       | 0                | 3                | 7,9              |
| tr Q0JZW1 Q0JZW1_CUPNH Isocitrate dehydrogenase [NADP] GN=icd2                | 3       | 8                | 2                | 4,2              |
| tr Q0K6R2 Q0K6R2_CUPNH Ribonucleoside-diphosphate reductase GN=nrdb           | 3       | 5                | 1                | 6,6              |
| tr Q0K7F0 Q0K7F0_CUPNH Sulfate adenyltransferase GN=cysN1                     | 1       | 1                | 1                | 3,2              |
| tr Q0K5B4 Q0K5B4_CUPNH Chromosome partitioning protein ParB GN=parB3          | 1       | 3                | 3                | 8,6              |
| tr Q0JZR2 Q0JZR2_CUPNH Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase B1980         | 5       | 4                | 13               | 10,4             |
| sp Q0K762 PANB_CUPNH 3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase GN=panB | 1       | 1                | 1                | 4,4              |
| tr Q0K7J6 Q0K7J6_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component A2949      | 1       | 2                | 2                | 1,5              |
| tr Q0KEA6 Q0KEA6_CUPNH Tryptophanyl-tRNA synthetase GN=trpS                   | 1       | 2                | 0                | 3,2              |
| tr Q0JZY0 Q0JZY0_CUPNH Amidohydro_3 domain-containing protein B1942           | 2       | 10               | 6                | 3,3              |
| sp Q0K8L9 FABH_CUPNH 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3 GN=fabh      | 1       | 1                | 1                | 4                |
| tr Q0KBG8 Q0KBG8_CUPNH ABC-type transporter, permease component A1521         | 1       | 0                | 1                | 3,5              |
| tr Q0K9C9 Q0K9C9_CUPNH Outer membrane efflux protein A2296                    | 2       | 0                | 6                | 4,3              |
| tr Q0K6M9 Q0K6M9_CUPNH Cell division protein FtsZ GN=ftsZ                     | 1       | 2                | 1                | 2,5              |
| tr Q0KEU8 Q0KEU8_CUPNH Gamma-glutamate-cysteine ligase GN=gshA                | 2       | 6                | 4                | 5,6              |
| tr Q0K7D3 Q0K7D3_CUPNH N-Formylglutamate amidohydrolase GN=hutG1              | 1       | 2                | 0                | 4,8              |

| Protein fasta  | WT |                         | Peptide<br>$\Delta ppk\text{-}all$ |      | $\Delta ppiA$           |      | Sequenzabdeckung        |               |
|--|----|-------------------------|------------------------------------|------|-------------------------|------|-------------------------|---------------|
|  | WT | $\Delta ppk\text{-}all$ | $\Delta ppiA$                      | WT   | $\Delta ppk\text{-}all$ | WT   | $\Delta ppk\text{-}all$ | $\Delta ppiA$ |
| sp Q0KDG3 METHN_CUPNH Methionine import ATP-binding protein<br>MetN GN=metN          | 2  | 3                       | 4                                  | 9    | 11                      | 14,2 |                         |               |
| tr Q0KDD37 Q0KDD37_CUPNH ABC-type transporter, ATPase<br>component A0938             | 3  | 2                       | 3                                  | 5,4  | 3,8                     | 6,2  |                         |               |
| tr Q0K7Q3 Q0K7Q3_CUPNH Hypothetical membrane spanning<br>protein A2892               | 1  | 0                       | 0                                  | 3,2  | 0                       | 0    |                         |               |
| tr Q0K8Y0 Q0K8Y0_CUPNH Carbamoyl-phosphate synthase large<br>chain GN=carB2          | 4  | 10                      | 3                                  | 3,1  | 10,5                    | 2,8  |                         |               |
| tr Q0K8M1 Q0K8M1_CUPNH 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein]<br>reductase GN=fabG         | 1  | 3                       | 3                                  | 5,6  | 13,7                    | 12,9 |                         |               |
| sp Q0K8N9 EFP_CUPNH Elongation factor P GN=efp                                       | 1  | 4                       | 0                                  | 5,4  | 26,9                    | 0    |                         |               |
| tr Q0K4T5 Q0K4T5_CUPNH Flp pilus assembly protein TadB<br>GN=tadB3                   | 1  | 1                       | 2                                  | 4,5  | 4,5                     | 8,1  |                         |               |
| tr Q0K3X8 Q0K3X8_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic<br>component B0499          | 1  | 0                       | 1                                  | 5,1  | 0                       | 5,1  |                         |               |
| tr Q0KF83 Q0KF83_CUPNH Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase<br>A0186                      | 1  | 4                       | 2                                  | 2,3  | 17,7                    | 6,1  |                         |               |
| tr Q0K7P2 Q0K7P2_CUPNH ABC-type transporter, ATPase<br>component GN=tagH             | 2  | 2                       | 2                                  | 4,7  | 4,7                     | 4,7  |                         |               |
| tr Q0KFF2 Q0KFF2_CUPNH Peptidoglycan glycosyltransferase<br>MrdB GN=rodA             | 1  | 0                       | 1                                  | 3,7  | 0                       | 3,7  |                         |               |
| tr Q0K7P3 Q0K7P3_CUPNH Methyltransf_21 domain-containing<br>protein A2902            | 3  | 5                       | 5                                  | 7,4  | 13,2                    | 13,5 |                         |               |
| tr Q0K881 Q0K881_CUPNH Small ribosomal subunit biogenesis<br>GTPase RsgA GN=rsgA     | 1  | 0                       | 10                                 | 4    | 0                       | 46,1 |                         |               |
| tr Q0K551 Q0K551_CUPNH Metal-dependent hydrolase B0067                               | 1  | 1                       | 2                                  | 3,2  | 3,2                     | 8    |                         |               |
| tr Q0K6B1 Q0K6B1_CUPNH DNA helicase A3391  | 6  | 9                       | 6                                  | 9,3  | 18,2                    | 10,5 |                         |               |
| sp Q0K6M5 MURC_CUPNH UDP-N-acetylmuramate-L-alanine ligase<br>GN=mutC                | 1  | 1                       | 2                                  | 2,7  | 2,7                     | 5,2  |                         |               |
| tr Q0KCHI Q0KCHI_CUPNH Iron-sulfur cluster assembly scaffold<br>protein IscU GN=iscU | 1  | 0                       | 0                                  | 6,8  | 0                       | 0    |                         |               |
| sp Q0KBB7 KUP1_CUPNH Probable potassium transport system<br>protein kup 1 GN=kup1    | 3  | 4                       | 4                                  | 4,3  | 7,9                     | 5,9  |                         |               |
| tr Q0KB16 Q0KB16_CUPNH NADPH-dependent FMN reductase<br>A1676                        | 1  | 2                       | 0                                  | 10,2 | 16                      | 0    |                         |               |
| tr Q0K9J0 Q0K9J0_CUPNH Signal transduction histidine kinase<br>GN=lytS               | 1  | 1                       | 1                                  | 2,6  | 1,8                     | 2,3  |                         |               |
| tr Q0KFR3 Q0KFR3_CUPNH Type I restriction enzyme R Protein<br>A0006                  | 2  | 1                       | 1                                  | 1,8  | 1,1                     | 1,1  |                         |               |
| tr Q0K899 Q0K899_CUPNH FGE-sulfatase domain-containing<br>protein A2693              | 1  | 1                       | 4                                  | 3    | 2,7                     | 12,6 |                         |               |
| tr Q0K682 Q0K682_CUPNH ABC-type transporter, ATPase<br>component, LOSE family A3421  | 2  | 2                       | 2                                  | 5,7  | 5,7                     | 5,7  |                         |               |
| tr Q0K0U4 Q0K0U4_CUPNH Uracil phosphoribosyltransferase<br>GN=upp                    | 2  | 3                       | 1                                  | 10,2 | 13,8                    | 4,9  |                         |               |
| tr Q0K8S5 Q0K8S5_CUPNH Glycerol-3-phosphate dehydrogenase<br>A2508                   | 2  | 5                       | 2                                  | 3,7  | 9                       | 3,6  |                         |               |
| tr Q0KCM7 Q0KCM7_CUPNH Glutathione S-transferase A1103                               | 1  | 2                       | 0                                  | 5,2  | 8,5                     | 0    |                         |               |
| tr Q0K898 Q0K898_CUPNH Serine/threonine protein kinase A2694                         | 3  | 3                       | 6                                  | 6,6  | 4,4                     | 12,3 |                         |               |
| tr Q0KEW9 Q0KEW9_CUPNH Predicted hydrolase of the<br>alpha/beta superfamily A0301    | 1  | 0                       | 1                                  | 4,7  | 0                       | 4,7  |                         |               |
| tr Q0K5L8 Q0K5L8_CUPNH ATPase involved in chromosome<br>partitioning GN=parA2        | 1  | 2                       | 1                                  | 3,5  | 6,6                     | 3,1  |                         |               |

## 5. Anhang

| Protein fasta  | Peptide |                  | Sequenzabdeckung |                  |
|--|---------|------------------|------------------|------------------|
|  | WT      | $\Delta pph-all$ | WT               | $\Delta pph-all$ |
| tr Q0KE56 Q0KE56_CUPNH Phosphoglycerate kinase GN=pgk  | 2       | 7                | 5,5              | 23,4             |
| tr Q0KBC1 Q0KBC1_CUPNH Endolytic murein transglycosylase GN=mltG                             | 1       | 1                | 3                | 3                |
| tr Q0K5X2 Q0K5X2_CUPNH General secretion pathway protein L GN=gspL                           | 2       | 0                | 4,6              | 0                |
| tr Q0K714 Q0K714_CUPNH Response regulator A3132  | 2       | 0                | 7,5              | 0                |
| tr Q0JZF8 Q0JZF8_CUPNH Uncharacterized protein B2084   | 1       | 1                | 2,7              | 2,7              |
| tr Q0KDW9 Q0KDW9_CUPNH Hemolysin-coregulated protein A0654                                   | 1       | 2                | 8,7              | 14,9             |
| tr Q0KCJ8 Q0KCJ8_CUPNH NAD kinase GN=nadK  | 1       | 4                | 2,3              | 20               |
| tr Q0KDL9 Q0KDL9_CUPNH DNA segregation ATPase ftsk/spoIIIE proteins GN=ftsK                  | 2       | 1                | 2,7              | 1                |
| tr Q0K7Q5 Q0K7Q5_CUPNH Conserved hypothetical membrane spanning protein A2890                | 3       | 0                | 6,7              | 0                |
| tr Q0K2T1 Q0K2T1_CUPNH Predicted hydrolase or acyltransferase B0901                          | 1       | 0                | 3,1              | 0                |
| tr Q0K9F7 Q0K9F7_CUPNH Aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase A2267                    | 1       | 2                | 2,7              | 4,6              |
| tr Q0KFC2 Q0KFC2_CUPNH Predicted hydrolase or acyltransferase A0147                          | 1       | 2                | 3,9              | 7,9              |
| tr Q0KBG1 Q0KBG1_CUPNH Acetyl-CoA acetyltransferase A1528                                    | 2       | 4                | 4,8              | 14,3             |
| tr Q0K9G9 Q0K9G9_CUPNH ABC-type transporter, ATPase component: HAAT family A2255             | 1       | 2                | 3,7              | 8,9              |
| sp Q0KEH6 UBIE_CUPNH Ubiquinone/menaquinone biosynthesis C-methyltransferase UbiE GN=ubiE    | 1       | 4                | 3,7              | 17,3             |
| tr Q0K6H2 Q0K6H2_CUPNH Alcohol dehydrogenase A3330   | 1       | 6                | 3                | 19,5             |
| tr Q0KJ0 Q0KJ0_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A0079                        | 1       | 2                | 5,1              | 10,9             |
| tr Q0KCH8 Q0KCH8_CUPNH UvrABC system protein B GN=uvrB                                       | 1       | 2                | 1,2              | 2,3              |
| tr Q0K0J4 Q0K0J4_CUPNH 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase GN=menB                        | 1       | 1                | 5,8              | 5,8              |
| tr Q0JYV5 Q0JYV5_CUPNH Transcriptional regulator, AraC-family GN=pobR                        | 1       | 2                | 3,6              | 7,3              |
| tr Q0KA69 Q0KA69_CUPNH Acetoacetyl-CoA reductase GN=phaB2                                    | 1       | 1                | 3,2              | 3,2              |
| tr Q0KD51 Q0KD51_CUPNH Hydrolase or acyltransferase A0924                                    | 1       | 3                | 5,4              | 14,9             |
| tr Q0K9Z0 Q0K9Z0_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component: Pept family A2082        | 2       | 3                | 4,7              | 4,7              |
| tr Q0K465 Q0K465_CUPNH Outer membrane protein (Porin) B0410                                  | 1       | 0                | 3,3              | 0                |
| tr Q0K510 Q0K510_CUPNH Predicted signal transduction protein B0108                           | 3       | 4                | 2,9              | 5,3              |
| sp Q0KF58 METXS_CUPNH Homoserine O-succinyltransferase GN=metXS                              | 1       | 0                | 2,5              | 0                |
| tr Q0K9G4 Q0K9G4_CUPNH Predicted hydrolase or acyltransferase A2260                          | 1       | 2                | 4,3              | 7                |
| tr Q0K5U1 Q0K5U1_CUPNH Sulfite dehydrogenase (SoxC) GN=soxC                                  | 2       | 0                | 5,6              | 0                |
| tr Q0K1N3 Q0K1N3_CUPNH Beta-lactamase GN=ampC1   | 1       | 2                | 2,8              | 6,3              |
| tr Q0KCR2 Q0KCR2_CUPNH Acyl-CoA dehydrogenase A1068  | 1       | 4                | 2,4              | 15,6             |
| tr Q0K6L9 Q0K6L9_CUPNH UDP-N-acetyl-muramoyl-L-alanyl-D-glutamate-2,6-diaminopimelate ligase | 1       | 1                | 5,4              | 5,4              |
| sp Q0KF45 PYRE_CUPNH Orotate phosphoribosyltransferase GN=pyrE                               | 1       | 1                | 6,6              | 6,6              |
| tr Q0K4H9 Q0K4H9_CUPNH Selenide, water dikinase GN=selD                                      | 1       | 2                | 4,3              | 7,4              |



| Protein fasta  | WT |               | Peptide<br>$\Delta pptA$ |               | $\Delta pptA$ |               | Sequenzabdeckung<br>$\Delta pptA$ |               | $\Delta pptA$ |
|--|----|---------------|--------------------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------------------|---------------|---------------|
|  | WT | $\Delta pptA$ | $\Delta pptA$            | $\Delta pptA$ | WT            | $\Delta pptA$ | WT                                | $\Delta pptA$ |               |
| sp P22320 HOXH_CUPNH_NAD-reducing hydrogenase HoxS<br>GN=hoXH SV=3                       | 1  | 14            | 1                        | 1             | 2,3           | 32            | 2,3                               | 2,3           |               |
| sp Q0K6L6 IRSMH_CUPNH_Ribosomal RNA small subunit<br>methyltransferase H GN=irsmH        | 2  | 2             | 1                        | 1             | 7,5           | 11,1          | 3,9                               | 3,9           |               |
| tr Q0KFN8 Q0KFN8_CUPNH_MFS transporter, ACS family A0031                                 | 1  | 1             | 1                        | 1             | 2,7           | 2,7           | 2,7                               | 2,7           |               |
| tr Q0K3Q5 Q0K3Q5_CUPNH_Glucose/sorbose dehydrogenase<br>B0572                            | 2  | 0             | 0                        | 0             | 4,3           | 0             | 0                                 | 0             |               |
| tr Q0KDJ8 Q0KDJ8_CUPNH_ABC-type transporter A0776  | 2  | 2             | 2                        | 2             | 2,2           | 2,2           | 6                                 | 6             |               |
| sp Q0KDL6 ADH_CUPNH_Alcohol dehydrogenase GN=adh   | 1  | 6             | 1                        | 1             | 3,8           | 21,3          | 2,5                               | 2,5           |               |
| tr Q0KC74 Q0KC74_CUPNH_Transcriptional regulator, GntR-family<br>A1257                   | 1  | 0             | 0                        | 0             | 3,8           | 0             | 6,8                               | 6,8           |               |
| tr Q0KFC7 Q0KFC7_CUPNH_Enoyl-CoA hydratase A0142   | 1  | 4             | 1                        | 1             | 3,6           | 17,7          | 3,6                               | 3,6           |               |
| tr Q0JY82 Q0JY82_CUPNH_3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein]<br>reductase B2510               | 1  | 0             | 0                        | 0             | 5,8           | 0             | 5,8                               | 5,8           |               |
| tr Q0K1K2 Q0K1K2_CUPNH_Acyl-CoA dehydrogenase B1332                                      | 2  | 2             | 1                        | 1             | 3,8           | 3,8           | 1,7                               | 1,7           |               |
| tr Q0JZ76 Q0JZ76_CUPNH_Uncharacterized protein B2166                                     | 1  | 1             | 1                        | 1             | 3,6           | 2,7           | 6,4                               | 6,4           |               |
| tr Q0KDM8 Q0KDM8_CUPNH_NAD-dependent aldehyde<br>dehydrogenase A0745                     | 1  | 1             | 1                        | 1             | 2,9           | 2,9           | 10,7                              | 10,7          |               |
| tr Q0KCW0 Q0KCW0_CUPNH_ABC-type transporter, periplasmic<br>component: SulT family A1019 | 1  | 7             | 2                        | 2             | 5,1           | 28,2          | 7,6                               | 7,6           |               |
| tr Q0JY40 Q0JY40_CUPNH_Periplasmic zinc protease GN=ppqL                                 | 2  | 2             | 2                        | 2             | 2,3           | 2,3           | 2,3                               | 2,3           |               |
| tr Q0KBRI Q0KBRI_CUPNH_dTDP-glucose 4-6-dehydratase A1425                                | 1  | 1             | 1                        | 1             | 2,6           | 6,6           | 2,6                               | 2,6           |               |
| tr Q0KBU6 Q0KBU6_CUPNH_Transcriptional regulator, IclR-family<br>A1389                   | 1  | 3             | 2                        | 2             | 3,7           | 11            | 7                                 | 7             |               |
| sp Q0KEI7 LPXK_CUPNH_Tetraacyldisaccharide 4-kinase GN=lpkK                              | 1  | 4             | 4                        | 4             | 4,6           | 17,4          | 17,2                              | 17,2          |               |
| tr Q0KFL0 Q0KFL0_CUPNH_ATP-dependent RNA helicase<br>GN=dbpA                             | 1  | 1             | 1                        | 1             | 2,3           | 2,3           | 2,3                               | 2,3           |               |
| sp Q0KAH8 PURT_CUPNH_Formate-dependent<br>phosphoribosylglycinamide formyltransferase    | 1  | 2             | 1                        | 1             | 3             | 6,5           | 3                                 | 3             |               |
| sp Q0K6I1 TRPD_CUPNH_Anthranilate phosphoribosyltransferase<br>GN=trpD                   | 1  | 1             | 0                        | 0             | 3,2           | 3,2           | 0                                 | 0             |               |
| tr Q0KEY5 Q0KEY5_CUPNH_Long-chain acyl-CoA synthetase<br>(AMP-forming) A0285             | 2  | 2             | 2                        | 2             | 3,5           | 3,4           | 4,1                               | 4,1           |               |
| tr Q0K7U0 Q0K7U0_CUPNH_3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate<br>synthase GN=ribBA         | 1  | 1             | 1                        | 1             | 2,7           | 2,7           | 2,7                               | 2,7           |               |
| tr Q0K9N9 Q0K9N9_CUPNH_Cobalt-zinc-cadmium resistance outer<br>membrane porin GN=czcC1   | 1  | 2             | 1                        | 1             | 3,2           | 6             | 3,2                               | 3,2           |               |
| tr Q0KCW9 Q0KCW9_CUPNH_Predicted membrane protein A1010                                  | 1  | 2             | 2                        | 2             | 2,7           | 6,2           | 6,5                               | 6,5           |               |
| tr Q0KE58 Q0KE58_CUPNH_Transcriptional regulator, LuxR-family<br>A0564                   | 1  | 1             | 1                        | 1             | 2,4           | 2,4           | 11,8                              | 11,8          |               |
| tr Q0K364 Q0K364_CUPNH_Transcriptional regulator, LytR-family<br>B0763                   | 1  | 1             | 1                        | 1             | 7,7           | 7,7           | 24,3                              | 24,3          |               |
| tr Q0JZJ8 Q0JZJ8_CUPNH_Methyl-accepting chemotaxis transducer<br>GN=mcp                  | 2  | 1             | 2                        | 1             | 4             | 1,8           | 4                                 | 4             |               |
| tr Q0KB96 Q0KB96_CUPNH_Lyso-phosphatidic acid acyltransferase<br>A1593                   | 1  | 0             | 1                        | 1             | 3             | 0             | 3                                 | 3             |               |
| sp Q0KDN9 GSA_CUPNH_Glutamate-L-semialdehyde<br>2,1-aminomutase GN=hemL                  | 1  | 2             | 2                        | 2             | 2,1           | 4,9           | 6,5                               | 6,5           |               |
| tr Q0KDH2 Q0KDH2_CUPNH_UDP-glucose 6-dehydrogenase<br>GN=ugd                             | 1  | 3             | 0                        | 0             | 2,2           | 5,9           | 0                                 | 0             |               |
| sp Q0KFR8 DNAA_CUPNH_Chromosomal replication initiator<br>protein DnaA GN=dnaA           | 1  | 3             | 1                        | 1             | 1,7           | 5,1           | 1,7                               | 1,7           |               |
| tr Q0K7N3 Q0K7N3_CUPNH_Dihydroorotase GN=pyrX  | 1  | 2             | 2                        | 2             | 2             | 7,1           | 6                                 | 6             |               |

## 5. Anhang

| Protein faeta  | Peptide |                  | Sequenzabdeckung |                  |
|--|---------|------------------|------------------|------------------|
|  | WT      | $\Delta ppk-all$ | WT               | $\Delta ppk-all$ |
| tr Q0KCB6 Q0KCB6_CUPNH Inositol-1-monophosphatase GN=suhB                                      | 1       | 1                | 4                | 4                |
| tr Q0KAS2 Q0KAS2_CUPNH Glycerol trinitrate reductase A1789                                     | 1       | 1                | 2,7              | 2,7              |
| tr Q0KF92 Q0KF92_CUPNH Carboxyltransferase A0177   | 1       | 4                | 3,7              | 11,2             |
| tr Q0KCT6 Q0KCT6_CUPNH ABC-type transporter A1043  | 1       | 8                | 3,8              | 20,6             |
| sp Q0K9B9 IF2_CUPNH Translation initiation factor IF-2 GN=infb                                 | 2       | 5                | 1,9              | 5,6              |
| tr Q0K6M0 Q0K6M0_CUPNH UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide-D-alanyl-D-alanine ligase GN=murf       | 1       | 4                | 2,1              | 9,7              |
| tr Q0K5R7 Q0K5R7_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family A3596                            | 1       | 1                | 4,2              | 4,2              |
| tr Q0K4A4 Q0K4A4_CUPNH Pimeoyl-CoA synthetase GN=pimA  | 1       | 1                | 1,3              | 1,3              |
| tr Q0K5Y2 Q0K5Y2_CUPNH Transcriptional regulator, AsnC-family A3530                            | 1       | 3                | 4,3              | 18,3             |
| sp Q0KCG3 SYK_CUPNH Lysine-tRNA ligase GN=lyss   | 1       | 5                | 1,6              | 6,8              |
| tr Q0KCN1 Q0KCN1_CUPNH Predicted aminoglycoside phosphotransferase A1099                       | 1       | 0                | 3,9              | 0                |
| sp Q0K6N1 LPXC_CUPNH UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase GN=lpxc                      | 1       | 2                | 2,6              | 7,2              |
| tr Q0KBF8 Q0KBF8_CUPNH Short chain dehydrogenase A1531   | 1       | 3                | 3,5              | 11,5             |
| tr Q0K650 Q0K650_CUPNH Delta-aminolevulinic acid dehydratase GN=hemb                           | 1       | 1                | 3,6              | 3,6              |
| tr Q7WX92 Q7WX92_CUPNH Putative copper ATP-binding ABC transporter GN=nosF                     | 1       | 1                | 3,9              | 3,9              |
| tr Q0KBU2 Q0KBU2_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family A1393                            | 1       | 0                | 3,4              | 0                |
| tr Q0K1Q4 Q0K1Q4_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor B1280                        | 1       | 3                | 3                | 13,7             |
| tr Q0KE67 Q0KE67_CUPNH Zinc metalloprotease A0555  | 1       | 4                | 2,1              | 10,6             |
| tr Q0K0K2 Q0K0K2_CUPNH Non-ribosomal peptide synthetase GN=nra                                 | 4       | 10               | 1,6              | 4,1              |
| tr Q0KFD6 Q0KFD6_CUPNH ABC-type transporter A0133  | 1       | 2                | 4,2              | 7,4              |
| tr Q0KD71 Q0KD71_CUPNH Lipid A export ATP-binding/permease protein MsbA GN=msbA                | 1       | 1                | 1,4              | 1,4              |
| sp Q0K8L8 PLSX_CUPNH Phosphate acyltransferase GN=plsX   | 1       | 2                | 3,3              | 10,3             |
| tr Q0KD06 Q0KD06_CUPNH FAD-dependent dehydrogenase A0972                                       | 1       | 1                | 1,3              | 1,3              |
| sp Q0K7M0 ARLY_CUPNH Argininosuccinate lyase GN=argH   | 1       | 1                | 2,3              | 2,3              |
| tr Q0KEJ8 Q0KEJ8_CUPNH Multidrug resistance efflux pump A0423                                  | 1       | 0                | 3,7              | 0                |
| tr Q0KD66 Q0KD66_CUPNH Ribonuclease G and E GN=cafA1   | 1       | 2                | 2,3              | 4,9              |
| tr Q0KCU4 Q0KCU4_CUPNH Acetolactate synthase GN=ilvB   | 2       | 2                | 4,1              | 4,1              |
| sp Q0K860 DXS_CUPNH 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase GN=dxs                             | 1       | 2                | 2                | 4,2              |
| tr Q0JZ67 Q0JZ67_CUPNH ABC-type transporter involved in resistance to organic solvents GN=ttg2 | 1       | 2                | 4,7              | 8,4              |
| tr Q0KBI7 Q0KBI7_CUPNH Glucose-6-phosphate isomerase GN=pgi                                    | 2       | 4                | 4                | 10,4             |
| tr Q0K7A2 Q0K7A2_CUPNH Signal transduction histidine kinase A3044                              | 1       | 3                | 1,6              | 6,5              |
| tr Q0K5S5 Q0K5S5_CUPNH Putative peptidase A3588  | 1       | 5                | 3,6              | 15,4             |
| tr Q0K5K1 Q0K5K1_CUPNH Choline dehydrogenase GN=beta4  | 1       | 1                | 1,4              | 1,6              |
| tr Q0KBD6 Q0KBD6_CUPNH NAD-dependent 4-hydroxybutyrate dehydrogenase GN=gb                     | 1       | 2                | 2,1              | 7,1              |

| Protein fasta  | WT |  | Peptide<br>$\Delta_{ppk-all}$ |  | $\Delta_{pptA}$ |     | Sequenzabdeckung<br>$\Delta_{ppk-all}$ |      | $\Delta_{pptA}$ |
|--|----|--|-------------------------------|--|-----------------|-----|--|------|-----------------|
|  | WT |  | $\Delta_{ppk-all}$            |  | $\Delta_{pptA}$ | WT  |  |      |                 |
| sp Q0KF34 THIC_CUPNH Phosphomethylpyrimidine synthase<br>GN=thiC                     | 1  |  | 8                             |  | 2               | 1,6 | 16,5                                   | 3,5  |                 |
| tr Q0KEK1 Q0KEK1_CUPNH Outer membrane exporter of multiple<br>drugs GN=opcM          | 1  |  | 0                             |  | 1               | 3   | 0                                      | 3    |                 |
| tr Q0K0P5 Q0K0P5_CUPNH Putative heavy metal efflux P-type<br>ATPase GN=cadA          | 1  |  | 1                             |  | 4               | 0,9 | 1,1                                    | 6,3  |                 |
| tr Q0K347 Q0K347_CUPNH Outer membrane receptor,<br>TonB-dependent B0785              | 1  |  | 0                             |  | 0               | 1,7 | 0                                      | 0    |                 |
| tr Q0KBH8 Q0KBH8_CUPNH Phosphoribosylformylglycinimidine<br>synthase GN=purL         | 2  |  | 4                             |  | 0               | 1,8 | 3,5                                    | 0    |                 |
| tr Q0K9B3 Q0K9B3_CUPNH Transcriptional regulator, FNR-like<br>GN=fnr3                | 1  |  | 2                             |  | 1               | 4,1 | 8,7                                    | 4,1  |                 |
| tr Q0KEP5 Q0KEP5_CUPNH O-linked N-acetylglucosamine<br>transferase OGT A0376         | 1  |  | 1                             |  | 1               | 2   | 2                                      | 2    |                 |
| tr Q0K5F4 Q0K5F4_CUPNH Phosphoenolpyruvate carboxykinase<br>[GTP] GN=pepck           | 2  |  | 4                             |  | 0               | 3,2 | 7,4                                    | 0    |                 |
| tr Q0KEH8 Q0KEH8_CUPNH ABC-type transporter, ATPase and<br>permease components A0443 | 1  |  | 0                             |  | 1               | 2,1 | 0                                      | 2,7  |                 |
| tr Q0K722 Q0K722_CUPNH Adenylosuccinate lyase GN=purB                                | 1  |  | 2                             |  | 0               | 2,8 | 4,8                                    | 0    |                 |
| tr Q0KCM9 Q0KCM9_CUPNH Enoyl-CoA hydratase/carnithine<br>racemase A1101              | 1  |  | 2                             |  | 0               | 4,2 | 7,7                                    | 0    |                 |
| tr Q0KDS8 Q0KDS8_CUPNH Urocanate hydratase GN=hutU2                                  | 1  |  | 1                             |  | 0               | 2,1 | 2,1                                    | 0    |                 |
| tr Q0K0N8 Q0K0N8_CUPNH Uncharacterized conserved protein<br>B1651                    | 1  |  | 2                             |  | 0               | 4,1 | 10,2                                   | 0    |                 |
| tr Q0KAJ6 Q0KAJ6_CUPNH Uncharacterized protein A1874                                 | 1  |  | 1                             |  | 1               | 2,6 | 2,6                                    | 2,6  |                 |
| tr Q0K840 Q0K840_CUPNH UTP-glucose-1-phosphate<br>uridylyltransferase GN=gauU        | 2  |  | 4                             |  | 0               | 6,4 | 19,3                                   | 0    |                 |
| tr Q0KDK2 Q0KDK2_CUPNH Lon protease GN=lon PE=2                                      | 2  |  | 9                             |  | 21              | 2,9 | 11,3                                   | 25,9 |                 |
| tr Q0KDF7 Q0KDF7_CUPNH D-amino acid dehydrogenase<br>GN=dadA1                        | 1  |  | 1                             |  | 4               | 2,3 | 2,3                                    | 11,5 |                 |
| tr Q0K4T7 Q0K4T7_CUPNH Flp pilus assembly ATPase GN=cpaE2                            | 1  |  | 2                             |  | 1               | 1,9 | 3,6                                    | 1,9  |                 |
| tr Q0K371 Q0K371_CUPNH Enoyl-CoA hydratase B0756                                     | 1  |  | 2                             |  | 2               | 3,4 | 5,8                                    | 5,8  |                 |
| tr Q7WSB2 Q7WSB2_CUPNH Probable acyl-coa dehydrogenase<br>GN=PHG222                  | 2  |  | 2                             |  | 1               | 5,4 | 5,4                                    | 2,5  |                 |
| tr Q0K7P4 Q0K7P4_CUPNH Glycosyltransferase A2901                                     | 2  |  | 2                             |  | 3               | 2,1 | 2,1                                    | 3,2  |                 |
| tr Q0K8X5 Q0K8X5_CUPNH 2-Aminobenzoate-CoA ligase<br>GN=abmG                         | 1  |  | 6                             |  | 0               | 1,6 | 11,6                                   | 0    |                 |
| tr Q0JYU7 Q0JYU7_CUPNH Methyl-accepting chemotaxis protein i<br>B2295                | 1  |  | 1                             |  | 1               | 1,7 | 1,7                                    | 1,7  |                 |
| tr Q0JY84 Q0JY84_CUPNH Predicted oxidoreductase B2508                                | 1  |  | 3                             |  | 0               | 2,3 | 10,8                                   | 0    |                 |
| tr Q0K5N3 Q0K5N3_CUPNH Bifunctional protein PutA GN=putA                             | 2  |  | 1                             |  | 4               | 1,4 | 1                                      | 3,9  |                 |
| sp P28615 RP54_CUPNH RNA polymerase sigma-54 factor GN=rpoN                          | 1  |  | 1                             |  | 2               | 3   | 1,6                                    | 4,7  |                 |
| tr Q0K3P5 Q0K3P5_CUPNH Cation/multidrug efflux system<br>GN=acrA8                    | 1  |  | 1                             |  | 2               | 2,5 | 2,8                                    | 5,3  |                 |
| tr Q0KEX7 Q0KEX7_CUPNH NAD-specific glutamate<br>dehydrogenase GN=gudB               | 2  |  | 6                             |  | 2               | 1,8 | 4,9                                    | 1,7  |                 |
| sp Q0K7K0 SYM_CUPNH Methionine-tRNA ligase GN=metG                                   | 1  |  | 3                             |  | 0               | 2,2 | 6,3                                    | 0    |                 |
| tr Q0K9H5 Q0K9H5_CUPNH Chaperone protein ClpB GN=clpB1                               | 1  |  | 7                             |  | 3               | 2,7 | 12,4                                   | 3,7  |                 |
| sp Q0K8Y7 GLMM_CUPNH Phosphoglucosamine mutase GN=glmM                               | 1  |  | 1                             |  | 2               | 2,2 | 2,2                                    | 2,2  |                 |
| tr Q0K653 Q0K653_CUPNH SB-like family cytochrome c maturation<br>protein GN=sB       | 1  |  | 1                             |  | 2               | 1,2 | 1,2                                    | 2,7  |                 |
| tr Q0KFF3 Q0KFF3_CUPNH Peptidoglycan D,D-transpeptidase<br>MrdA GN=ftsI2             | 2  |  | 2                             |  | 4               | 2,5 | 2,3                                    | 5,7  |                 |

## 5. Anhang

| Protein fasta   | WT |  | Peptide<br>$\Delta ppk\text{-}all$ |  | $\Delta pptA$ |     | Sequenzabdeckung<br>$\Delta ppk\text{-}all$ |      | $\Delta pptA$ |
|---|----|--|------------------------------------|--|---------------|-----|---|------|---------------|
|   | WT |  | $\Delta ppk\text{-}all$            |  | $\Delta pptA$ | WT  |   |      |               |
| tr Q0K5W8 Q0K5W8_CUPNH Type II secretion system protein E GN=gspE                   | 1  |  | 2                                  |  | 0             | 2,1 |   | 3,9  | 0             |
| tr Q0KKBK7 Q0KKBK7_CUPNH Ribosomal RNA large subunit methyltransferase J GN=rhmJ    | 1  |  | 1                                  |  | 1             | 4,6 |   | 4,6  | 4,6           |
| tr Q0KKBH0 Q0KKBH0_CUPNH Acyl-CoA synthetase (AMP-forming)/AMP-acid ligase II A1519 | 1  |  | 3                                  |  | 0             | 1,8 |   | 5,2  | 0             |
| tr Q0K100 Q0K100_CUPNH Succinate-semialdehyde dehydrogenase (NADP+) GN=gabd3        | 1  |  | 2                                  |  | 0             | 2,3 |   | 4,1  | 0             |
| sp Q0K808 SYQ_CUPNH Glutamine-tRNA ligase GN=glmS                                   | 1  |  | 2                                  |  | 1             | 1,5 |   | 3,2  | 1,5           |
| tr Q0KDT1 Q0KDT1_CUPNH Signal transduction histidine kinase GN=gtS2                 | 1  |  | 2                                  |  | 1             | 2   |   | 3,9  | 1,8           |
| tr Q0JY26 Q0JY26_CUPNH Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase GN=zwf3                  | 1  |  | 1                                  |  | 0             | 3,1 |   | 3,7  | 0             |
| sp Q0K7D1 HUTI_CUPNH Imidazolonepropionase GN=hutI                                  | 1  |  | 2                                  |  | 1             | 3,8 |   | 7,4  | 3,8           |
| sp Q0K7A0 SYL_CUPNH Isoleucine-tRNA ligase GN=ileS                                  | 1  |  | 5                                  |  | 0             | 0,9 |   | 6,5  | 0             |
| tr Q0K0K6 Q0K0K6_CUPNH Non-ribosomal peptide synthetase modules B1683               | 1  |  | 4                                  |  | 0             | 0,8 |   | 5    | 0             |
| tr Q0KD09 Q0KD09_CUPNH GGDEF family protein A0969                                   | 1  |  | 2                                  |  | 0             | 1,4 |   | 3,4  | 0             |
| tr Q0K3Q9 Q0K3Q9_CUPNH Aconitate hydratase B GN=acnB                                | 1  |  | 2                                  |  | 4             | 1,4 |   | 2,7  | 5,7           |
| tr Q0KB14 Q0KB14_CUPNH D-amino-acid dehydrogenase GN=dadA5                          | 1  |  | 1                                  |  | 1             | 2,5 |   | 4,4  | 4,4           |
| tr Q0KEDI1 Q0KEDI1_CUPNH Tyrosine-tRNA ligase GN=tyrS                               | 1  |  | 3                                  |  | 0             | 2,9 |   | 7    | 0             |
| tr Q0K707 Q0K707_CUPNH Leucine-tRNA ligase GN=leuS                                  | 1  |  | 1                                  |  | 1             | 1,2 |   | 1,2  | 1,2           |
| tr Q0K4M6 Q0K4M6_CUPNH Filamentous hemagglutinin / adhesin GN=fhaB                  | 1  |  | 1                                  |  | 2             | 0,4 |   | 0,4  | 0,6           |
| tr Q0K0W6 Q0K0W6_CUPNH UvrABC system protein A GN=uvrA2                             | 1  |  | 12                                 |  | 39            | 0,6 |   | 6,6  | 27,3          |
| sp P22318 HOXU_CUPNH NAD-reducing hydrogenase HoxS subunit gamma GN=hoxU            | 0  |  | 1                                  |  | 0             | 0   |   | 6    | 0             |
| sp P22319 HOXY_CUPNH NAD-reducing hydrogenase HoxS subunit delta GN=hoxY            | 0  |  | 2                                  |  | 0             | 0   |   | 8,6  | 0             |
| sp P31891 MBHL_CUPNH Uptake hydrogenase large subunit GN=hoxG                       | 0  |  | 2                                  |  | 0             | 0   |   | 2,9  | 0             |
| sp P31902 HYPB_CUPNH Hydrogenase maturation factor HypB GN=hypB                     | 0  |  | 3                                  |  | 1             | 0   |   | 13,3 | 3,6           |
| sp Q07251 LDH_CUPNH L-lactate dehydrogenase GN=ldh                                  | 0  |  | 2                                  |  | 1             | 0   |   | 14,6 | 3,7           |
| tr Q0JY17 Q0JY17_CUPNH Response regulator B2575                                     | 0  |  | 0                                  |  | 2             | 0   |   | 0    | 7,3           |
| tr Q0JY30 Q0JY30_CUPNH Signal transduction histidine kinase B2562                   | 0  |  | 1                                  |  | 1             | 0   |   | 3,2  | 2,5           |
| tr Q0JY80 Q0JY80_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family B2512                 | 0  |  | 0                                  |  | 2             | 0   |   | 0    | 7,3           |
| tr Q0JY88 Q0JY88_CUPNH Hypothetical membrane spanning protein B2504                 | 0  |  | 1                                  |  | 0             | 0   |   | 5    | 0             |
| tr Q0JY89 Q0JY89_CUPNH Uncharacterized protein B2503                                | 0  |  | 1                                  |  | 0             | 0   |   | 8    | 0             |
| tr Q0JYA5 Q0JYA5_CUPNH Uncharacterized protein B2487                                | 0  |  | 0                                  |  | 1             | 0   |   | 0    | 9,9           |
| tr Q0JYF9 Q0JYF9_CUPNH Uncharacterized protein B2433                                | 0  |  | 4                                  |  | 9             | 0   |   | 11,7 | 20,5          |
| tr Q0JYH0 Q0JYH0_CUPNH Proton/sodium-dicarboxylate symporter GN=glpP3               | 0  |  | 0                                  |  | 1             | 0   |   | 0    | 2,3           |
| tr Q0JYK0 Q0JYK0_CUPNH Uncharacterized protein B2392                                | 0  |  | 3                                  |  | 2             | 0   |   | 17,2 | 11,7          |
| tr Q0JYR6 Q0JYR6_CUPNH Uncharacterized protein B2326                                | 0  |  | 2                                  |  | 2             | 0   |   | 14,8 | 14,8          |
| tr Q0JYS5 Q0JYS5_CUPNH 3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase B2317                     | 0  |  | 3                                  |  | 2             | 0   |   | 32   | 22,7          |
| tr Q0JYS6 Q0JYS6_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family B2316                 | 0  |  | 0                                  |  | 2             | 0   |   | 0    | 11,8          |
| tr Q0JYZ3 Q0JYZ3_CUPNH Uncharacterized protein B2250                                | 0  |  | 1                                  |  | 0             | 0   |   | 3,6  | 0             |

| Protein fasta   | Peptide |                  | Sequenzabdeckung |                  |
|---|---------|------------------|------------------|------------------|
|   | WT      | $\Delta ppk-all$ | WT               | $\Delta ppk-all$ |
| tr Q0JZ10 Q0JZ10_CUPNH Lipoprotein B2232  | 0       | 1                | 1                | 4,8              |
| tr Q0JZ43 Q0JZ43_CUPNH Lipopolysaccharide N-acetylglucosaminyl transferase B2199    | 0       | 5                | 6                | 9,4              |
| tr Q0JZ57 Q0JZ57_CUPNH Copper resistance protein A, multi-copper oxidase GN=copA    | 0       | 0                | 1                | 2,6              |
| tr Q0JZ70 Q0JZ70_CUPNH Elp3 domain-containing protein B2172                         | 0       | 1                | 1                | 2,1              |
| tr Q0JZ79 Q0JZ79_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family B2163                 | 0       | 3                | 5                | 10,7             |
| tr Q0JZ81 Q0JZ81_CUPNH NADH:flavin oxidoreductase B2161                             | 0       | 0                | 1                | 2,9              |
| tr Q0JZH5 Q0JZH5_CUPNH MFS transporter, MHS family B2067                            | 0       | 1                | 1                | 1,8              |
| tr Q0JZ12 Q0JZ12_CUPNH Similar to bb3-type cytochrome oxidase subunit III GN=coxO   | 0       | 0                | 1                | 9,3              |
| tr Q0JZ16 Q0JZ16_CUPNH Hypothetical membrane protein B2056                          | 0       | 0                | 1                | 3,8              |
| tr Q0JZR1 Q0JZR1_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family B1981                 | 0       | 1                | 2                | 8                |
| tr Q0JZR5 Q0JZR5_CUPNH Transcriptional regulator, Mocr family B1977                 | 0       | 0                | 2                | 6,1              |
| tr Q0JZU8 Q0JZU8_CUPNH Putative hydrolase B1944                                     | 0       | 1                | 0                | 6,1              |
| tr Q0JZV8 Q0JZV8_CUPNH Phasin_2 domain-containing protein B1934                     | 0       | 7                | 0                | 52,1             |
| tr Q0JZY1 Q0JZY1_CUPNH Translation elongation factor G (EF-G) B1911                 | 0       | 3                | 0                | 3,8              |
| tr Q0JZZ2 Q0JZZ2_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family B1900                 | 0       | 1                | 3                | 8,7              |
| tr Q0K043 Q0K043_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family B1849                 | 0       | 0                | 1                | 4,8              |
| sp Q0K0D3 Y5759_CUPNH Putative hydro-lyase H16_B1759 B1759                          | 0       | 1                | 0                | 3,7              |
| tr Q0K0D7 Q0K0D7_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family B1755                 | 0       | 0                | 1                | 5,9              |
| tr Q0K0H1 Q0K0H1_CUPNH Transcriptional regulator, GntR-family B1718                 | 0       | 2                | 0                | 10,5             |
| tr Q0K0H8 Q0K0H8_CUPNH Formyl-CoA:oxalate CoA-transferase GN=frc                    | 0       | 2                | 0                | 7,2              |
| tr Q0K0K4 Q0K0K4_CUPNH Non-ribosomal peptide synthetase GN=nrpC                     | 0       | 1                | 0                | 0,6              |
| tr Q0K0R0 Q0K0R0_CUPNH Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] GN=fabI2       | 1       | 2                | 1                | 7,3              |
| tr Q0K0S6 Q0K0S6_CUPNH MoxR-like ATPase B1613                                       | 0       | 0                | 2                | 9,8              |
| tr Q0K129 Q0K129_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family B1508                 | 0       | 0                | 1                | 3,5              |
| tr Q0K130 Q0K130_CUPNH Putative peptidase, M38 family B1507                         | 0       | 0                | 1                | 2,4              |
| tr Q0K137 Q0K137_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component                  | 0       | 1                | 0                | 3,7              |
| tr Q0K142 Q0K142_CUPNH Beta-lactamase LCR-1 B1495                                   | 0       | 1                | 0                | 5                |
| tr Q0K164 Q0K164_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family B1472                 | 0       | 0                | 5                | 18,2             |
| tr Q0K1D0 Q0K1D0_CUPNH Alkyl hydroperoxide reductase AhpD B1405                     | 0       | 2                | 3                | 11,9             |
| tr Q0K1D1 Q0K1D1_CUPNH Cupin_2 domain-containing protein B1404                      | 0       | 0                | 2                | 21,6             |
| tr Q0K1Z3 Q0K1Z3_CUPNH 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase B1190                     | 0       | 1                | 0                | 5                |
| tr Q0K268 Q0K268_CUPNH Cation/multidrug efflux system outer membrane porin GN=acrC9 | 0       | 0                | 5                | 8,8              |
| tr Q0K278 Q0K278_CUPNH Putative peptidase, M20A subfamily B1105                     | 0       | 1                | 1                | 1,7              |
| tr Q0K279 Q0K279_CUPNH Transcriptional regulator, AraC-family B1104                 | 0       | 0                | 1                | 4,2              |
| tr Q0K2E7 Q0K2E7_CUPNH Transcriptional regulator, GntR-family B1036                 | 0       | 0                | 1                | 4,4              |
| tr Q0K2G2 Q0K2G2_CUPNH Glycine-rich protein B1021                                   | 0       | 1                | 0                | 2,3              |
| tr Q0K2L0 Q0K2L0_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family                       | 0       | 0                | 1                | 4                |

| Protein fasta   | Peptide |                  | Sequenzabdeckung |                  |      |      |
|---|---------|------------------|------------------|------------------|------|------|
|   | WT      | $\Delta ppk-all$ | WT               | $\Delta ppk-all$ |      |      |
| tr Q0K313 Q0K313_CUPNH 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase GN=tbl                    | 0       | 2                | 1                | 0                | 4,8  | 2,5  |
| tr Q0K323 Q0K323_CUPNH Putative MFS transporter, MHS family B0809                         | 0       | 0                | 1                | 0                | 0    | 2,1  |
| tr Q0K333 Q0K333_CUPNH Transcriptional regulator, MarR-family B0799                       | 0       | 1                | 0                | 0                | 6,4  | 0    |
| tr Q0K368 Q0K368_CUPNH Acetyl-CoA acetyltransferase B0759                                 | 0       | 2                | 0                | 0                | 5,9  | 0    |
| tr Q0K3B2 Q0K3B2_CUPNH Transcriptional regulator, TetR/AcrR-family B0715                  | 0       | 0                | 5                | 0                | 0    | 13,3 |
| tr Q0K3B4 Q0K3B4_CUPNH Short-chain alcohol dehydrogenase B0713                            | 0       | 1                | 1                | 0                | 3,8  | 4,2  |
| tr Q0K3F2 Q0K3F2_CUPNH Acyl-CoA dehydrogenase,short-chain specific B0675                  | 0       | 2                | 0                | 0                | 7,5  | 0    |
| tr Q0K3R8 Q0K3R8_CUPNH Transcriptional regulator, MarR-family B0559                       | 0       | 1                | 1                | 0                | 5,5  | 3,9  |
| tr Q0K3U2 Q0K3U2_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family B0535                       | 0       | 0                | 2                | 0                | 0    | 6,4  |
| tr Q0K3U7 Q0K3U7_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family B0530                       | 0       | 0                | 4                | 0                | 0    | 13,8 |
| tr Q0K3Z3 Q0K3Z3_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family B0484                       | 0       | 0                | 2                | 0                | 0    | 6,4  |
| tr Q0K422 Q0K422_CUPNH ABC-type transporter, periplasmic component: POPT family B0455     | 1       | 2                | 3                | 2,6              | 5    | 8,8  |
| tr Q0K4B0 Q0K4B0_CUPNH 2-Nitropropane dioxygenase B0364                                   | 0       | 1                | 0                | 0                | 2,5  | 0    |
| tr Q0K4E5 Q0K4E5_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family B0329                       | 0       | 0                | 4                | 0                | 0    | 12,1 |
| tr Q0K4I8 Q0K4I8_CUPNH Transcriptional regulator, GntR-family B0285                       | 0       | 1                | 1                | 0                | 6,7  | 4,6  |
| tr Q0K4J8 Q0K4J8_CUPNH Transcriptional regulator, MocR family B0275                       | 0       | 0                | 1                | 0                | 0    | 2,8  |
| tr Q0K4N4 Q0K4N4_CUPNH Chemotaxis protein histidine kinase GN=cheA1                       | 0       | 1                | 0                | 0                | 1,5  | 0    |
| tr Q0K4P2 Q0K4P2_CUPNH Chemotaxis protein GN=cheW3  | 0       | 1                | 0                | 0                | 6,3  | 0    |
| tr Q0K4P7 Q0K4P7_CUPNH UDP-glucose 4-epimerase GN=gale                                    | 0       | 2                | 0                | 0                | 6,2  | 0    |
| tr Q0K4R8 Q0K4R8_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family B0205                       | 0       | 0                | 7                | 0                | 0    | 29,2 |
| tr Q0K4S3 Q0K4S3_CUPNH Beta-ketoadipyl CoA thiolase GN=pcaF                               | 0       | 1                | 1                | 0                | 3,5  | 3,5  |
| tr Q0K502 Q0K502_CUPNH Ferric uptake regulation protein GN=fur                            | 0       | 3                | 0                | 0                | 17,3 | 0    |
| tr Q0K555 Q0K555_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family B0063                       | 0       | 0                | 2                | 0                | 0    | 12,3 |
| tr Q0K558 Q0K558_CUPNH Conserved hypothetical membrane protein B0060                      | 0       | 0                | 1                | 0                | 0    | 5,3  |
| tr Q0K5F0 Q0K5F0_CUPNH Cation/multidrug efflux system, membrane-fusion component GN=acrA7 | 0       | 0                | 1                | 0                | 0    | 2,7  |
| tr Q0K5G0 Q0K5G0_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family A3705                       | 0       | 4                | 1                | 0                | 16,2 | 5,1  |
| tr Q0K5G5 Q0K5G5_CUPNH Peptide deformylase GN=def   | 0       | 1                | 0                | 0                | 6    | 0    |

| Protein fasta  | Peptide |                  | Sequenzabdeckung |                  |
|--|---------|------------------|------------------|------------------|
|  | WT      | $\Delta ppk-all$ | WT               | $\Delta ppk-all$ |
| tr Q0K5G8 Q0K5G8_CUPNH tRNA and tRNA cytosine-C5-methylase GN=sun2                           | 0       | 1                | 0                | 0                |
| tr Q0K5H9 Q0K5H9_CUPNH DUF2272 domain-containing protein A3685                               | 0       | 1                | 0                | 3,8              |
| tr Q0K5I6 Q0K5I6_CUPNH Phenylalanine 4-monoxygenase GN=phnA                                  | 0       | 1                | 0                | 6,1              |
| tr Q0K5J6 Q0K5J6_CUPNH Putative copper uptake P-type ATPase GN=copP2                         | 0       | 1                | 0                | 2,1              |
| tr Q0K5K0 Q0K5K0_CUPNH Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase GN=mmsA2                    | 0       | 1                | 0                | 5,9              |
| tr Q0K5L9 Q0K5L9_CUPNH Chromosome partitioning protein ParB GN=parB4                         | 0       | 0                | 0                | 4                |
| tr Q0K5P3 Q0K5P3_CUPNH Glycine dehydrogenase (decarboxylating) GN=gvp                        | 0       | 3                | 0                | 4,4              |
| tr Q0K5R0 Q0K5R0_CUPNH Putative neutral zinc metalloprotease A3603                           | 0       | 1                | 0                | 5,5              |
| tr Q0K5R6 Q0K5R6_CUPNH Uncharacterized protein A3597   | 1       | 0                | 4,3              | 0                |
| tr Q0K5S2 Q0K5S2_CUPNH Transcriptional regulator, GntR-family A3591                          | 0       | 0                | 2                | 7,8              |
| tr Q0K5Y8 Q0K5Y8_CUPNH Phenylacetic acid degradation protein E,flavodoxin reductase GN=paaE1 | 0       | 3                | 0                | 7,2              |
| tr Q0K5Z0 Q0K5Z0_CUPNH Phenylacetic acid degradation protein C GN=paaC1                      | 0       | 1                | 0                | 3,9              |
| sp Q0K633 RS8_CUPNH 30S ribosomal protein S8 GN=rpsH   | 0       | 2                | 0                | 13,7             |
| tr Q0K687 Q0K687_CUPNH Histidinol dehydrogenase GN=hisD                                      | 0       | 0                | 0                | 2,7              |
| tr Q0K688 Q0K688_CUPNH Histidinol-phosphate aminotransferase GN=hisC                         | 0       | 2                | 0                | 5,5              |
| sp Q0K689 HIS7_CUPNH Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase GN=hisB                         | 0       | 6                | 0                | 36,4             |
| tr Q0K691 Q0K691_CUPNH Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH GN=hisH            | 1       | 2                | 4,3              | 8,7              |
| tr Q0K6A0 Q0K6A0_CUPNH Sec-independent protein translocase protein TatC GN=tatC              | 0       | 0                | 0                | 6,8              |
| tr Q0K6B7 Q0K6B7_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor A3385                      | 0       | 1                | 0                | 4,8              |
| sp Q0K6H0 TRPC_CUPNH Indole-3-glycerol phosphate synthase GN=trpC                            | 0       | 1                | 0                | 3,7              |
| tr Q0K6J1 Q0K6J1_CUPNH Enoyl-CoA hydratase A3311   | 0       | 1                | 0                | 3,3              |
| tr Q0K6J8 Q0K6J8_CUPNH Putative peptidase, M20D subfamily GN=hipO                            | 0       | 1                | 0                | 3                |
| tr Q0K6M2 Q0K6M2_CUPNH UDP-N-acetylneuramoylalanine-D-glutamate ligase GN=murD               | 0       | 2                | 0                | 3,6              |
| tr Q0K6N7 Q0K6N7_CUPNH Oligopeptide transporter GN=opt1                                      | 0       | 0                | 0                | 1,2              |
| sp Q0K6N8 ZAPD_CUPNH Cell division protein ZapD GN=zapD                                      | 0       | 1                | 0                | 4,4              |
| sp Q0K6P5 RL27_CUPNH 50S ribosomal protein L27 GN=rpmA                                       | 0       | 1                | 0                | 17,4             |
| sp Q0K6P6 OBG_CUPNH GTPase Obg GN=obg  | 0       | 2                | 0                | 8,2              |
| sp Q0K6P7 PROB_CUPNH Glutamate 5-kinase GN=proB  | 0       | 4                | 0                | 16,7             |
| sp Q0K6P9 RPPH_CUPNH RNA pyrophosphohydrolase GN=rppH  | 0       | 2                | 0                | 12,1             |
| sp Q0K6Q0 SYP_CUPNH Proline-tRNA ligase GN=proS  | 0       | 4                | 0                | 7,3              |

## 5. Anhang

| Protein fasta   | WT |                         | Peptide<br>$\Delta ppk\text{-}all$ |                         | $\Delta pptA$ |                         | Sequenzabdeckung<br>$\Delta ppk\text{-}all$ |                         |
|---|----|-------------------------|------------------------------------|-------------------------|---------------|-------------------------|---|-------------------------|
|   | WT | $\Delta ppk\text{-}all$ | WT                                 | $\Delta ppk\text{-}all$ | WT            | $\Delta ppk\text{-}all$ | WT  | $\Delta ppk\text{-}all$ |
| tr Q0K6R5 Q0K6R5_CUPNH TPR_REGION domain-containing protein A3231             | 0  | 1                       | 2                                  | 0                       | 0             | 0                       | 1,1   | 2,7                     |
| tr Q0K6W3 Q0K6W3_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family A3183           | 0  | 0                       | 2                                  | 0                       | 0             | 0                       | 0   | 9                       |
| tr Q0K6X2 Q0K6X2_CUPNH Znf/thioredoxin_put domain-containing protein A3174    | 1  | 0                       | 3                                  | 0                       | 3             | 0                       | 1,4   | 8,6                     |
| tr Q0K6Y2 Q0K6Y2_CUPNH Predicted short chain dehydrogenase A3164              | 0  | 2                       | 1                                  | 0                       | 0             | 0                       | 8,1   | 14,6                    |
| sp Q0K705 DAPB_CUPNH 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase GN=dapB       | 0  | 2                       | 1                                  | 0                       | 0             | 0                       | 8,7   | 2,6                     |
| tr Q0K726 Q0K726_CUPNH SAM-dependent methyltransferase GN=phcB                | 0  | 2                       | 0                                  | 0                       | 0             | 0                       | 4,5   | 0                       |
| tr Q0K749 Q0K749_CUPNH 2-Hydroxy-acid oxidase, Fe-S subunit GN=glcF           | 0  | 0                       | 3                                  | 0                       | 0             | 0                       | 0   | 9,1                     |
| tr Q0K752 Q0K752_CUPNH Glycolate oxidase subunit GlcD GN=gldD1                | 0  | 0                       | 3                                  | 0                       | 0             | 0                       | 0   | 5,2                     |
| sp Q0K786 Y3060_CUPNH UPF0234 protein H16_A3060 A3060                         | 0  | 1                       | 0                                  | 0                       | 0             | 0                       | 8,7   | 0                       |
| tr Q0K794 Q0K794_CUPNH ATP-dependent protease Clp, ATPase subunit GN=clpA     | 0  | 2                       | 2                                  | 0                       | 0             | 0                       | 2,2   | 2,2                     |
| tr Q0K7A1 Q0K7A1_CUPNH FAD Synthase A3045                                     | 0  | 1                       | 0                                  | 0                       | 0             | 0                       | 4,5   | 0                       |
| tr Q0K7C7 Q0K7C7_CUPNH Histidine utilization repressor GN=hutC                | 0  | 1                       | 0                                  | 0                       | 0             | 0                       | 11,1  | 0                       |
| tr Q0K7D2 Q0K7D2_CUPNH Formiminoglutamate deiminase GN=hutF                   | 0  | 1                       | 0                                  | 0                       | 0             | 0                       | 2,4   | 0                       |
| tr Q0K7I7 Q0K7I7_CUPNH Segregation and condensation protein A A2958           | 0  | 1                       | 0                                  | 0                       | 0             | 0                       | 3   | 0                       |
| tr Q0K7J0 Q0K7J0_CUPNH Gramicidin S biosynthesis grsT protein A2955           | 0  | 1                       | 1                                  | 0                       | 0             | 0                       | 0,9   | 0,9                     |
| sp Q0K7N2 PYRB_CUPNH Aspartate carbamoyltransferase GN=pyrB                   | 0  | 0                       | 2                                  | 0                       | 0             | 0                       | 0   | 7,1                     |
| tr Q0K7P0 Q0K7P0_CUPNH Mannose-1-phosphate guanylyltransferase GN=manC2       | 0  | 2                       | 3                                  | 0                       | 0             | 0                       | 5   | 6,5                     |
| tr Q0K7R7 Q0K7R7_CUPNH Rhodanese-related sulfurtransferase GN=pspE2           | 0  | 1                       | 0                                  | 0                       | 0             | 0                       | 12,1  | 0                       |
| sp Q0K7S4 UPPP_CUPNH Undecaprenyl-diphosphate GN=uppp                         | 1  | 2                       | 1                                  | 0                       | 3,4           | 0                       | 8,9   | 3,4                     |
| tr Q0K7U5 Q0K7U5_CUPNH Riboflavin synthase alpha chain GN=ribC                | 0  | 1                       | 0                                  | 0                       | 0             | 0                       | 7,3   | 0                       |
| tr Q0K7X2 Q0K7X2_CUPNH Hypothetical membrane spanning protein A2821           | 0  | 1                       | 0                                  | 0                       | 0             | 0                       | 9,5   | 0                       |
| sp Q0K7X7 T230_CUPNH Tryptophan 2,3-dioxygenase GN=kynA                       | 0  | 2                       | 2                                  | 0                       | 0             | 0                       | 7,5   | 6,5                     |
| tr Q0K7X8 Q0K7X8_CUPNH Kynureninase GN=kynU                                   | 0  | 1                       | 0                                  | 0                       | 0             | 0                       | 4,8   | 0                       |
| tr Q0K7Y7 Q0K7Y7_CUPNH Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA GN=msrA    | 0  | 1                       | 1                                  | 0                       | 0             | 0                       | 6,1   | 6,1                     |
| tr Q0K853 Q0K853_CUPNH Dienelactone hydrolase or related enzyme A2739         | 0  | 3                       | 1                                  | 0                       | 0             | 0                       | 17,5  | 6,8                     |
| tr Q0K8A9 Q0K8A9_CUPNH Response regulator containing CheY-like receiver A2683 | 0  | 0                       | 2                                  | 0                       | 0             | 0                       | 0   | 4,8                     |
| tr Q0K8C2 Q0K8C2_CUPNH DNA topoisomerase 4 subunit B GN=parE                  | 0  | 0                       | 2                                  | 0                       | 0             | 0                       | 0   | 3,8                     |
| tr Q0K8C5 Q0K8C5_CUPNH ABC-type transporter A2666                             | 0  | 1                       | 2                                  | 0                       | 0             | 0                       | 1,5   | 3,4                     |
| tr Q0K8C9 Q0K8C9_CUPNH Transcriptional regulator, MocR family A2662           | 0  | 0                       | 2                                  | 0                       | 0             | 0                       | 0   | 7,6                     |
| tr Q0K8E5 Q0K8E5_CUPNH Uncharacterized protein A2644                          | 0  | 0                       | 2                                  | 0                       | 0             | 0                       | 0   | 8,8                     |
| tr Q0K8E9 Q0K8E9_CUPNH Hypothetical membrane associated protein A2640         | 0  | 3                       | 0                                  | 0                       | 0             | 0                       | 10,2  | 0                       |
| tr Q0K8G9 Q0K8G9_CUPNH 3-isopropylmalate dehydratase small subunit GN=leuD    | 0  | 2                       | 0                                  | 0                       | 0             | 0                       | 10,6  | 0                       |



| Protein fasta   | Peptide |                         | Sequenzabdeckung |                         |
|---|---------|-------------------------|------------------|-------------------------|
|   | WT      | $\Delta ppk\text{-}all$ | WT               | $\Delta ppk\text{-}all$ |
| tr Q0K8H5 Q0K8H5_CUPNH Tryptophan synthase beta chain GN=trpB                     | 0       | 1                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K8I2 Q0K8I2_CUPNH Amidophosphoribosyltransferase GN=purF                     | 0       | 1                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K8J2 Q0K8J2_CUPNH Probable extra-cytoplasmic solute receptor: A2597          | 0       | 3                       | 1                | 0                       |
| sp Q0K8J6 FENR2_CUPNH Ferredoxin-NADP reductase 2 A2592                           | 0       | 3                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K8K0 Q0K8K0_CUPNH Hypothetical membrane spanning protein A2588               | 0       | 1                       | 1                | 0                       |
| tr Q0K8M0 Q0K8M0_CUPNH Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase GN=fabD      | 0       | 1                       | 0                | 0                       |
| sp Q0K8M2 ACP_CUPNH Acyl carrier protein GN=acpP                                  | 0       | 1                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K8M3 Q0K8M3_CUPNH 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2 GN=fabF        | 0       | 2                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K8N8 Q0K8N8_CUPNH Beta-hexosaminidase GN=nagZ                                | 0       | 9                       | 9                | 0                       |
| tr Q0K8Q6 Q0K8Q6_CUPNH Fumarate hydratase class I GN=fumA                         | 0       | 5                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K8S8 Q0K8S8_CUPNH Formyltetrahydrofolate deformylase GN=purU                 | 0       | 1                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K8S9 Q0K8S9_CUPNH Transcriptional regulator, DeoR-family A2504               | 0       | 1                       | 1                | 0                       |
| tr Q0K8U2 Q0K8U2_CUPNH DUF262 domain-containing protein A2491                     | 1       | 7                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K8X0 Q0K8X0_CUPNH Propionate-CoA ligase GN=prpE                              | 0       | 1                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K8X1 Q0K8X1_CUPNH 2-Aminobenzoyl-CoA monooxygenase/reductase GN=abmA         | 0       | 2                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K8X3 Q0K8X3_CUPNH Putative enoyl-CoA hydratase/isomerase GN=abmC             | 0       | 10                      | 5                | 0                       |
| tr Q0K8X4 Q0K8X4_CUPNH Putative acyl-CoA dehydrogenase GN=abmD                    | 0       | 3                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K8X8 Q0K8X8_CUPNH Carbamoyl-phosphate synthase GN=carA                       | 0       | 3                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K8Y2 Q0K8Y2_CUPNH Conserved hypothetical membrane spanning protein A2450     | 0       | 1                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K901 Q0K901_CUPNH Conserved hypothetical membrane spanning protein A2431     | 0       | 0                       | 2                | 0                       |
| tr Q0K911 Q0K911_CUPNH Predicted permease A2418                                   | 0       | 0                       | 1                | 0                       |
| tr Q0K920 Q0K920_CUPNH ABC-type transporter GN=dppA2                              | 1       | 4                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K923 Q0K923_CUPNH ABC-type transporter GN=dppD2                              | 1       | 3                       | 3                | 0                       |
| sp Q0K926 SYE_CUPNH Glutamate-tRNA ligase GN=gtX                                  | 0       | 2                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K936 Q0K936_CUPNH Vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase GN=nrqJ     | 0       | 2                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K940 Q0K940_CUPNH Predicted acyl-CoA transferase/carnitine dehydratase A2386 | 0       | 3                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K957 Q0K957_CUPNH Integral membrane protein, interacts with FtsH GN=ftsI3    | 0       | 1                       | 1                | 0                       |
| tr Q0K973 Q0K973_CUPNH Predicted phosphoribosyltransferase A2353                  | 0       | 1                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K977 Q0K977_CUPNH 23S rRNA (guanosine-2-O-)-methyltransferase RlmB GN=spoU   | 0       | 1                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K983 Q0K983_CUPNH ATP-dependent helicase GN=hrpA                             | 0       | 1                       | 1                | 0                       |
| tr Q0K989 Q0K989_CUPNH Rhodanese-related sulfurtransferase A2336                  | 0       | 1                       | 0                | 0                       |
| tr Q0K9D5 Q0K9D5_CUPNH Acyl carrier protein phosphodiesterase A2290               | 0       | 1                       | 0                | 0                       |

## 5. Anhang

| Protein fasta  | Peptide |                  | Sequenzabdeckung |                  |
|--|---------|------------------|------------------|------------------|
|  | WT      | $\Delta ppk-all$ | WT               | $\Delta ppk-all$ |
| sp Q0K9E7 RS18_CUPNH_30S_ribosomal_protein_S18_GN=rsR  | 0       | 0                | 0                | 0                |
| tr Q0K9E9 Q0K9E9_CUPNH_Replicative_DNA_helicase_GN=dnaB                                      | 0       | 2                | 0                | 4,5              |
| tr Q0K9F1 Q0K9F1_CUPNH_Low-affinity_inorganic_phosphate_transporter_GN=pitA                  | 0       | 0                | 0                | 3,9              |
| tr Q0K9F5 Q0K9F5_CUPNH_Bacterioferritin_comigratory_protein_A2269                            | 0       | 1                | 0                | 6,5              |
| tr Q0K9F8 Q0K9F8_CUPNH_Homoserine_dehydrogenase_GN=thrA                                      | 0       | 4                | 0                | 8,7              |
| tr Q0K9I7 Q0K9I7_CUPNH_Sulfate/thiosulfate_import_ATP-binding_protein_CysA_GN=cysA           | 1       | 1                | 3,8              | 3,8              |
| tr Q0K9J7 Q0K9J7_CUPNH_Iscitrate_lyase_GN=icbB   | 0       | 3                | 0                | 7,7              |
| tr Q0K9L0 Q0K9L0_CUPNH_Amidase_related_to_nicotinamidases_A2214                              | 0       | 3                | 0                | 19,2             |
| tr Q0K9W9 Q0K9W9_CUPNH_Transcriptional_regulator_GlvR-family_A2103                           | 0       | 3                | 0                | 12,2             |
| tr Q0KA01 Q0KA01_CUPNH_50S_ribosomal_protein_L3_glutamine_methyltransferase_GN=dam           | 0       | 2                | 0                | 10,4             |
| tr Q0KA09 Q0KA09_CUPNH_Chromosome_partition_protein_Smc_GN=smc                               | 0       | 3                | 0                | 3,5              |
| tr Q0KA13 Q0KA13_CUPNH_16S_rRNA_uridine-516_pseudouridylylate_synthase_GN=rsuA1              | 0       | 1                | 0                | 3,8              |
| tr Q0KA15 Q0KA15_CUPNH_Methionine_aminopeptidase_GN=map                                      | 0       | 2                | 0                | 5,9              |
| sp Q0KA28 LPXA_CUPNH_Acyl-[acyl-carrier-protein]-UDP-N-acetylglucosamine_O-acetyltransferase | 0       | 3                | 0                | 15,7             |
| sp Q0KA32 P_SRP_CUPNH_Putative_phosphoenolpyruvate_synthase_regulatory_protein_A2039         | 0       | 2                | 0                | 7,9              |
| tr Q0KA42 Q0KA42_CUPNH_Uncharacterized_protein_A2029   | 0       | 1                | 0                | 8,7              |
| tr Q0KAC5 Q0KAC5_CUPNH_Uncharacterized_protein_A1945   | 0       | 0                | 0                | 2,5              |
| tr Q0KAC8 Q0KAC8_CUPNH_Uncharacterized_protein_A1942   | 0       | 0                | 0                | 2,8              |
| tr Q0KAG2 Q0KAG2_CUPNH_Uncharacterized_protein_A1908   | 0       | 1                | 0                | 2,3              |
| tr Q0KAS8 Q0KAS8_CUPNH_Probable_extra-cytoplasmic_solute_receptor_A1781                      | 0       | 0                | 0                | 0                |
| tr Q0KBA0 Q0KBA0_CUPNH_Transcriptional_regulator_MocR_family_A1589                           | 0       | 0                | 0                | 0                |
| tr Q0KB18 Q0KB18_CUPNH_ABC-type_transporter_ATPase_component:LPT_family_A1501                | 0       | 2                | 0                | 8,6              |
| sp Q0KBK4 CLPP_CUPNH_ATP-dependent_Clp_protease_proteolytic_subunit_GN=clpP                  | 0       | 3                | 0                | 15,3             |
| tr Q0KBW2 Q0KBW2_CUPNH_Signal_transduction_histidine_kinase_A1373                            | 2       | 1                | 3,6              | 1,9              |
| sp Q0KBW5 FOLD_CUPNH_Bifunctional_protein_FoId_GN=foId                                       | 0       | 1                | 0                | 4,2              |
| tr Q0KBW6 Q0KBW6_CUPNH_Oligopeptidase_A_GN=dep   | 0       | 1                | 0                | 1,6              |
| tr Q0KBY8 Q0KBY8_CUPNH_Phenylalanine-trRNA_ligase_beta_subunit_GN=pheT                       | 0       | 1                | 0                | 1,2              |
| sp Q0KBY9 SYFA_CUPNH_Phenylalanine-tRNA_ligase_alpha_subunit_GN=pheS                         | 0       | 1                | 0                | 3,8              |
| tr Q0KC46 Q0KC46_CUPNH_Lipid_A_deacylase_A1285   | 0       | 1                | 0                | 5,2              |
| sp Q0KCA7 ACCA_CUPNH_Acetyl-coenzyme_A_carboxylase_carboxyl_transferase                      | 0       | 3                | 0                | 11,1             |
| tr Q0KCA8 Q0KCA8_CUPNH_3-Methyladenine_DNA_glycosylase_A1222                                 | 0       | 1                | 0                | 3,2              |
| tr Q0KCB4 Q0KCB4_CUPNH_Serine_acetyltransferase_GN=cysE                                      | 0       | 0                | 0                | 0                |

| Protein fasta   | Peptide |                  | Sequenzabdeckung |                  |
|---|---------|------------------|------------------|------------------|
|   | WT      | $\Delta ppk-all$ | WT               | $\Delta ppk-all$ |
| tr Q0KCE3 Q0KCE3_CUPNH DUF1330 domain-containing protein A1187                        | 0       | 1                | 0                | 9,3              |
| sp Q0KGE4 KDSA_CUPNH 2-dehydro-3-deoxyphosphoactonate aldolase GN=kdsA                | 0       | 2                | 0                | 7,3              |
| tr Q0KCF7 Q0KCF7_CUPNH ABC-type transporter, permease component: LPT family A1173     | 0       | 2                | 0                | 7,5              |
| tr Q0KCH2 Q0KCH2_CUPNH Cysteine desulfurase IscS GN=iscS                              | 0       | 1                | 0                | 2,5              |
| tr Q0KCI7 Q0KCI7_CUPNH Heat-inducible transcription repressor HrcA GN=hrcA            | 0       | 2                | 0                | 6,4              |
| tr Q0KCK4 Q0KCK4_CUPNH Uncharacterized protein A1126                                  | 0       | 2                | 0                | 1,4              |
| tr Q0KCL4 Q0KCL4_CUPNH Protein containing von Willebrand factor domain GN=coxE2       | 0       | 2                | 0                | 6,6              |
| tr Q0KCR3 Q0KCR3_CUPNH Acyl-CoA dehydrogenase A1067                                   | 0       | 2                | 0                | 5,5              |
| tr Q0KCK4 Q0KCK4_CUPNH Uncharacterized protein A1126                                  | 0       | 2                | 0                | 1,4              |
| tr Q0KCL4 Q0KCL4_CUPNH Protein containing von Willebrand factor domain GN=coxE2       | 0       | 2                | 0                | 6,6              |
| tr Q0KCR3 Q0KCR3_CUPNH Acyl-CoA dehydrogenase A1067                                   | 0       | 2                | 0                | 5,5              |
| tr Q0KCR6 Q0KCR6_CUPNH Uncharacterized protein A1064                                  | 0       | 0                | 0                | 7,8              |
| tr Q0KCU3 Q0KCU3_CUPNH Acetolactate synthase III small subunit GN=lvh                 | 0       | 6                | 0                | 39,3             |
| tr Q0KCV9 Q0KCV9_CUPNH Periplasmic molybdate-binding protein/domain A1020             | 0       | 3                | 0                | 12,1             |
| sp Q0KCY0 F16A1_CUPNH Fructose-1,6-bisphosphatase class 1 GN=fbp1                     | 0       | 4                | 0                | 8,3              |
| tr Q0KCY9 Q0KCY9_CUPNH Uncharacterized protein A0989                                  | 0       | 1                | 0                | 11,5             |
| tr Q0KZ0 Q0KZ0_CUPNH Uncharacterized protein A0988                                    | 0       | 0                | 0                | 12,3             |
| tr Q0KD02 Q0KD02_CUPNH Transcriptional regulator, ArsR-family A0976                   | 0       | 1                | 0                | 14,3             |
| tr Q0KD42 Q0KD42_CUPNH Zinc-binding dehydrogenase A0933                               | 0       | 4                | 0                | 13,5             |
| tr Q0KD57 Q0KD57_CUPNH Uracl phosphoribosyltransferase GN=upp                         | 0       | 2                | 0                | 10,6             |
| sp Q0KD81 RS16_CUPNH 30S ribosomal protein S16 GN=rpsP                                | 0       | 0                | 0                | 0                |
| tr Q0KD92 Q0KD92_CUPNH Transposase A0882  | 0       | 2                | 0                | 9,5              |
| tr Q0KDB0 Q0KDB0_CUPNH Transcriptional regulator, LuxR-family A0864                   | 0       | 1                | 0                | 0,9              |
| tr Q0KDG7 Q0KDG7_CUPNH Cysteine synthase GN=cysK1                                     | 0       | 1                | 0                | 3,7              |
| tr Q0KDI1 Q0KDI1_CUPNH Histidinol-phosphate aminotransferase GN=hisC                  | 0       | 1                | 0                | 4,3              |
| tr Q0KDK5 Q0KDK5_CUPNH Transcriptional regulator, LysR-family A0769                   | 0       | 0                | 0                | 0                |
| tr Q0KDL2 Q0KDL2_CUPNH ABC-type transporter, permease component: FeT family A0761     | 1       | 0                | 2                | 0                |
| tr Q0KDM0 Q0KDM0_CUPNH Thioredoxin reductase A0753                                    | 0       | 2                | 0                | 16,1             |
| tr Q0KDM5 Q0KDM5_CUPNH Uncharacterized protein A0748                                  | 0       | 0                | 0                | 0                |
| tr Q0KDP2 Q0KDP2_CUPNH TPM_phosphatase domain-containing protein A0731                | 0       | 1                | 0                | 7,8              |
| tr Q0KDS1 Q0KDS1_CUPNH Uncharacterized protein A0702                                  | 0       | 1                | 0                | 20,6             |
| sp Q0KE53 PUR7_CUPNH Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase GN=purC | 0       | 3                | 0                | 7,9              |
|   |         |                  |                  | 2,6              |

| Protein fasta   | Peptide |                  | Sequenzabdeckung |                  |
|---|---------|------------------|------------------|------------------|
|   | WT      | $\Delta ppk-all$ | WT               | $\Delta ppk-all$ |
| sp Q0KE95 YBEY_CUPNH Endoribonuclease YbeY GN=ybeY                                      | 0       | 1                | 0                | 3,5              |
| sp Q0KEC0 PUR9_CUPNH Bifunctional purine biosynthesis protein PurH GN=purH              | 0       | 4                | 0                | 8,6              |
| tr Q0KEC8 Q0KEC8_CUPNH Phosphoglycerate mutase 2 protein GN=pgam2                       | 0       | 1                | 0                | 9,4              |
| tr Q0KEE0 Q0KEE0_CUPNH Predicted redox protein A0481                                    | 0       | 5                | 0                | 40               |
| tr Q0KEG1 Q0KEG1_CUPNH Acyl-CoA dehydrogenase GN=acad                                   | 0       | 1                | 0                | 1,7              |
| tr Q0KEH4 Q0KEH4_CUPNH SCP2 domain-containing protein A0447                             | 0       | 1                | 0                | 7,6              |
| tr Q0KEK2 Q0KEK2_CUPNH Type IV pilus assembly protein GN=piY1                           | 0       | 0                | 0                | 0                |
| tr Q0KEL9 Q0KEL9_CUPNH Single-stranded DNA-binding protein A0402                        | 0       | 1                | 0                | 7,8              |
| tr Q0KEM4 Q0KEM4_CUPNH Na <sup>+</sup> /phosphate symporter GN=npvA1                    | 1       | 0                | 1,8              | 0                |
| tr Q0KEN1 Q0KEN1_CUPNH Uncharacterized protein conserved in bacteria A0390              | 0       | 2                | 0                | 10               |
| tr Q0KEQ8 Q0KEQ8_CUPNH Maleylacetoacetate isomerase A0362                               | 0       | 1                | 0                | 4,7              |
| sp Q0KET8 GPMMA_CUPNH 2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase GN=gpmA | 0       | 1                | 0                | 4                |
| tr Q0KEU2 Q0KEU2_CUPNH Bacterioferritin GN=bfr2   | 0       | 2                | 0                | 15,1             |
| tr Q0KEU2 Q0KEU2_CUPNH Bacterioferritin GN=bfr2   | 0       | 2                | 0                | 15,1             |
| tr Q0KEU7 Q0KEU7_CUPNH Glutathione synthetase GN=gshB                                   | 0       | 1                | 0                | 5,4              |
| tr Q7WVU7 Q7WVU7_CUPNH Putative 2-nitropropane dioxygenase GN=PHG395                    | 0       | 2                | 0                | 6,8              |
| tr Q0KF23 Q0KF23_CUPNH Methylene-tetrahydrofolate reductase A0246                       | 0       | 1                | 0                | 3,6              |
| tr Q0KF43 Q0KF43_CUPNH PPK2 domain-containing protein A0226                             | 0       | 0                | 0                | 0                |
| tr Q0KF57 Q0KF57_CUPNH Methionine biosynthesis protein MetW GN=metW                     | 0       | 0                | 0                | 0                |
| sp Q0KF61 ARGB_CUPNH Acetylglutamate kinase GN=argB                                     | 0       | 1                | 0                | 3,9              |
| tr Q0KF66 Q0KF66_CUPNH Signal transduction histidine kinase A0203                       | 0       | 2                | 0                | 4,5              |
| tr Q0KF75 Q0KF75_CUPNH RNA polymerase-binding transcription factor DksA GN=dksA1        | 0       | 2                | 0                | 8,8              |
| tr Q0KF78 Q0KF78_CUPNH Outer membrane receptor, TonB dependent A0191                    | 0       | 1                | 0                | 1,9              |
| sp Q0KF88 BIOF_CUPNH 8-amino-7-oxononanoate synthase GN=bioF                            | 0       | 1                | 0                | 3,5              |
| tr Q0KF97 Q0KF97_CUPNH Acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific A0172               | 0       | 1                | 0                | 4                |
| tr Q0KFA7 Q0KFA7_CUPNH Dehydrogenase/reductase oxidoreductase protein A0162             | 0       | 1                | 0                | 3,7              |
| tr Q0KFC8 Q0KFC8_CUPNH Hypothetical membrane associated protein A0141                   | 0       | 1                | 0                | 4,6              |
| tr Q0KFE4 Q0KFE4_CUPNH Allophanate hydrolase subunit 2 A0125                            | 0       | 1                | 0                | 5                |
| tr Q0KFF4 Q0KFF4_CUPNH Rod shape-determining protein MreD GN=mreD                       | 0       | 0                | 1                | 0                |

| Protein fasta   | Peptide<br>$\Delta pptA$ |               | Sequenzabdeckung<br>$\Delta pptA$ |               | $\Delta pptA$ |
|---|--------------------------|---------------|-----------------------------------|---------------|---------------|
|   | WT                       | $\Delta pptA$ | WT                                | $\Delta pptA$ |               |
| sp Q0KFG1 GATB_CUPNH Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase GN=gatB | 0                        | 4             | 0                                 | 0             | 0             |
| sp Q0KFI3 MINC_CUPNH Probable septum site-determining protein Minc GN=minC    | 0                        | 1             | 0                                 | 0             | 0             |
| tr Q0KFL1 Q0KFL1_CUPNH Uncharacterized protein A0058                          | 0                        | 3             | 4                                 | 0             | 15            |
| tr Q79IP6 Q79IP6_CUPNH Regulatory [NiFe] hydrogenase large subunit GN=hoxC    | 0                        | 2             | 0                                 | 0             | 0             |
| tr Q7WWWW7 Q7WWWW7_CUPNH Putative partitioning protein GN=parB                | 0                        | 3             | 0                                 | 0             | 0             |
| tr Q7WWX2 Q7WWX2_CUPNH Uncharacterized protein GN=PHG370                      | 0                        | 3             | 0                                 | 0             | 0             |
| tr Q7WX90 Q7WX90_CUPNH Putative transcription regulator GN=nosR               | 0                        | 0             | 1                                 | 0             | 1,4           |
| tr Q7WXB9 Q7WXB9_CUPNH Heme exporter protein C GN=ccmC                        | 0                        | 1             | 1                                 | 0             | 5,3           |
| tr Q7WXP4 Q7WXP4_CUPNH H-NS-like protein GN=PHG180                            | 0                        | 1             | 1                                 | 0             | 10,7          |
| tr Q7WYG4 Q7WYG4_CUPNH Putative endonuclease GN=mrr                           | 1                        | 0             | 0                                 | 3,8           | 0             |
| tr Q7WYG6 Q7WYG6_CUPNH Uncharacterized protein GN=PHG168                      | 0                        | 2             | 1                                 | 0             | 4,6           |
| tr Q7WXI6 Q7WXI6_CUPNH Uncharacterized protein GN=PHG148                      | 0                        | 0             | 2                                 | 0             | 8,2           |
| tr Q7WXK0 Q7WXK0_CUPNH Putative siderophore biosynthesis protein GN=PHG124    | 0                        | 2             | 0                                 | 0             | 3,6           |

Tab. 5.4: Proteomanalyse des Pulldowns mit eYFP-GlnA1 als Köder in *R. eutropha* WT,  $\Delta ppk-all$  und  $\Delta pptA$ . Alle identifizierten Proteine sind aufgelistet mit Anzahl der zugeordneten Peptide.

| Protein Nummer   | Annotation | WT  | n Peptide<br>$\Delta pptA$ | $\Delta ppk-all$ |
|--|------------|-----|----------------------------|------------------|
| gi 113868310 ref YP_726799.1 glutamine synthetase  |            | 103 | 109                        | 84               |
| gi 116695626 ref YP_841202.1 non-ribosomal peptide synthetase                              |            | 71  | 56                         | 63               |
| gi 113869043 ref YP_727532.1 molecular chaperone DnaK                                      |            | 32  | 32                         | 24               |
| gi 113866733 ref YP_725222.1 chaperonin GroEL  |            | 35  | 30                         | 27               |
| gi 113869425 ref YP_727914.1 30S ribosomal protein S3                                      |            | 20  | 19                         | 16               |
| gi 113869006 ref YP_727495.1 ATP-dependent protease Clp, ATPase subunit                    |            | 27  | 25                         | 26               |
| gi 116695624 ref YP_841200.1 non-ribosomal peptide synthetase                              |            | 32  | 22                         | 32               |
| gi 116696296 ref YP_841872.1 flagellin   |            | 17  | 18                         | 17               |
| gi 116695325 ref YP_840901.1 ATP-dependent protease Clp, ATPase subunit                    |            | 32  | 29                         | 17               |
| gi 113867498 ref YP_725987.1 ATP-dependent Lon protease                                    |            | 26  | 26                         | 20               |
| gi 113869189 ref YP_727678.1 ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha            |            | 25  | 20                         | 22               |
| gi 116696350 ref YP_841926.1 hypothetical protein H16_B2414                                |            | 15  | 20                         | 15               |
| gi 116695619 ref YP_841195.1 lysine/ornithine N-monoxygenase                               |            | 17  | 13                         | 12               |
| gi 113868984 ref YP_727473.1 ABC transporter periplasmic protein                           |            | 16  | 18                         | 15               |
| gi 113869658 ref YP_728147.1 hypothetical protein H16_A3723                                |            | 15  | 15                         | 13               |
| gi 116695439 ref YP_841015.1 ABC transporter ATPase  |            | 16  | 19                         | 16               |
| gi 113869443 ref YP_727932.1 DNA-directed RNA polymerase subunit beta'                     |            | 18  | 12                         | 18               |
| gi 113866116 ref YP_724605.1 cell division inhibitor MinD                                  |            | 16  | 14                         | 11               |
| gi 113867066 ref YP_725555.1 polynucleotide phosphorylase/polyadenylase                    |            | 19  | 16                         | 16               |
| gi 113869035 ref YP_727524.1 Poly(A) polymerase  |            | 19  | 16                         | 10               |
| gi 138637787 ref NP_942761.1 iron transport protein  |            | 16  | 15                         | 16               |
| gi 113869624 ref YP_728113.1 TRAP-type transporter, periplasmic component                  |            | 17  | 13                         | 13               |
| gi 113869573 ref YP_728062.1 F0F1 ATP synthase subunit beta                                |            | 15  | 12                         | 13               |
| gi 113868281 ref YP_726770.1 translation initiation factor IF-2                            |            | 17  | 15                         | 18               |
| gi 113869438 ref YP_727927.1 elongation factor Tu (+1)                                     |            | 16  | 12                         | 9                |
| gi 113866824 ref YP_725313.1 30S ribosomal protein S1                                      |            | 15  | 16                         | 16               |
| gi 116695631 ref YP_841207.1 putative aminotransferase                                     |            | 14  | 15                         | 14               |
| gi 113866587 ref YP_725076.1 ADP-heptose:LPS heptosyltransferase III                       |            | 14  | 12                         | 13               |
| gi 116695625 ref YP_841201.1 non-ribosomal peptide synthetase                              |            | 14  | 10                         | 13               |
| gi 113866942 ref YP_725431.1 ATPase related proteins                                       |            | 14  | 15                         | 13               |
| gi 116695622 ref YP_841198.1 non-ribosomal peptide synthetase modules and related proteins |            | 16  | 14                         | 15               |
| gi 113869575 ref YP_728064.1 F0F1 ATP synthase subunit alpha                               |            | 14  | 11                         | 13               |
| gi 113869349 ref YP_727838.1 outer membrane protein (porin)                                |            | 14  | 7                          | 8                |
| gi 113868542 ref YP_727031.1 ribonuclease G and E  |            | 12  | 10                         | 11               |
| gi 113869428 ref YP_727917.1 30S ribosomal protein L2                                      |            | 9   | 7                          | 8                |
| gi 113866240 ref YP_724729.1 haloacid dehalogenase-like hydrolase                          |            | 13  | 13                         | 12               |
| gi 113867396 ref YP_725885.1 phasin (PHA-granule associated protein)                       |            | 11  | 9                          | 11               |
| gi 113866512 ref YP_725001.1 30S ribosomal protein S9                                      |            | 7   | 8                          | 6                |
| gi 113867243 ref YP_725732.1 acetyl-CoA carboxylase subunit alpha                          |            | 12  | 9                          | 10               |

| Protein Nummer  | Annotation | WT | n Peptide<br>$\Delta pptA$ | $\Delta ppk-all$ |
|---|------------|----|----------------------------|------------------|
| gi 113868225 ref YP_726714.1 ATP-dependent protease Clp, ATPase subunit                               |            | 16 | 10                         | 12               |
| gi 38637789 ref NP_942763.1 siderophore biosynthesis protein  |            | 12 | 14                         | 13               |
| gi 38637791 ref NP_942765.1 ferrisiderophore receptor protein, TonB dependent                         |            | 15 | 8                          | 13               |
| gi 113869447 ref YP_727936.1 S0S ribosomal protein L1   |            | 12 | 8                          | 9                |
| gi 116696369 ref YP_841945.1 hypothetical protein H16_B2433   |            | 14 | 15                         | 11               |
| gi 113868761 ref YP_727250.1 cyclopropane fatty acid synthase   |            | 11 | 12                         | 12               |
| gi 113868037 ref YP_726526.1 6S rRNA uridine-516 pseudouridylylate synthase                           |            | 9  | 14                         | 7                |
| gi 113867525 ref YP_726014.1 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase                                      |            | 6  | 11                         | 8                |
| gi 113869444 ref YP_727933.1 DNA-directed RNA polymerase subunit beta                                 |            | 12 | 7                          | 10               |
| gi 38637756 ref NP_942730.1 NAD-reducing hydrogenase moiety large subunit                             |            | 10 | 10                         | 13               |
| gi 113868034 ref YP_726523.1 S0S ribosomal protein S2   |            | 9  | 9                          | 10               |
| gi 113866922 ref YP_725411.1 S0S ribosomal protein L19  |            | 8  | 8                          | 6                |
| gi 113867225 ref YP_725714.1 uncharacterized lipoprotein  |            | 13 | 13                         | 15               |
| gi 113867005 ref YP_725494.1 pilus assembly ATPase CpaF   |            | 12 | 15                         | 11               |
| gi 113868785 ref YP_727274.1 translocation protein TolB   |            | 11 | 11                         | 11               |
| gi 116694141 ref YP_728352.1 pilus assembly ATPase  |            | 11 | 10                         | 10               |
| gi 113869421 ref YP_727910.1 S0S ribosomal protein L14  |            | 8  | 8                          | 11               |
| gi 116695618 ref YP_841194.1 outer membrane receptor, TonB dependent                                  |            | 10 | 8                          | 9                |
| gi 113869439 ref YP_727928.1 elongation factor G  |            | 12 | 6                          | 7                |
| gi 113866960 ref YP_725449.1 ABC-type transporter, periplasmic component                              |            | 12 | 8                          | 7                |
| gi 113866500 ref YP_724989.1 glutamate dehydrogenase  |            | 10 | 8                          | 8                |
| gi 113868572 ref YP_727061.1 acetyl-CoA carboxylase subunit beta                                      |            | 13 | 12                         | 10               |
| gi 113868784 ref YP_727273.1 outer membrane protein or related peptidoglycan-associated (lipo)protein |            | 8  | 5                          | 6                |
| gi 113869221 ref YP_727710.1 cell division protein FtsZ   |            | 7  | 6                          | 8                |
| gi 113869383 ref YP_727872.1 pili assembly protein PilQ   |            | 15 | 9                          | 10               |
| gi 38637692 ref NP_942666.1 fructose-1,6-bisphosphate   |            | 9  | 9                          | 8                |
| gi 113869217 ref YP_727706.1 preprotein translocase subunit SecA                                      |            | 8  | 8                          | 8                |
| gi 113869440 ref YP_727929.1 S0S ribosomal protein S7   |            | 8  | 8                          | 9                |
| gi 113866114 ref YP_724603.1 outer membrane protein (porin)   |            | 11 | 8                          | 5                |
| gi 116695522 ref YP_841098.1 5-methyltetrahydropteroyltryptaminate-homocysteine S-methyltransferase   |            | 12 | 7                          | 10               |
| gi 113867004 ref YP_725493.1 pilus assembly protein secretin CpaC                                     |            | 10 | 8                          | 9                |
| gi 113869581 ref YP_728070.1 chromosome partitioning protein ParB                                     |            | 10 | 6                          | 9                |
| gi 113868300 ref YP_726789.1 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component                                |            | 10 | 4                          | 11               |
| gi 116694832 ref YP_729043.1 hypothetical protein H16_B0886   |            | 2  | 3                          | 0                |
| gi 116695627 ref YP_841203.1 pyoverdine biosynthesis regulatory gene                                  |            | 10 | 8                          | 8                |
| gi 113868287 ref YP_726776.1 transcriptional regulator, FNR-like                                      |            | 8  | 7                          | 7                |
| gi 113869430 ref YP_727919.1 S0S ribosomal protein L4   |            | 9  | 8                          | 8                |
| gi 113866835 ref YP_725324.1 histone deacetylase family deacetylase                                   |            | 5  | 7                          | 5                |
| gi 113867197 ref YP_725686.1 GlvR family transcriptional regulator                                    |            | 11 | 7                          | 8                |
| gi 113868683 ref YP_727172.1 RNA polymerase sigma factor RpoD   |            | 8  | 9                          | 5                |
| gi 116695443 ref YP_841019.1 glucose-6-phosphate isomerase  |            | 9  | 7                          | 7                |
| gi 116696467 ref YP_842043.1 argininosuccinate synthase   |            | 7  | 5                          | 6                |
| gi 113869195 ref YP_727684.1 signal recognition particle GTPase                                       |            | 6  | 10                         | 9                |
| gi 113869408 ref YP_727897.1 S0S ribosomal protein S13  |            | 6  | 7                          | 7                |

| Protein Nummer  | Annotation | WT | n Peptide<br>$\Delta pptA$ | $\Delta pph-all$ |
|---|------------|----|----------------------------|------------------|
| gi 113867497 ref YP_725986.1 ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpX                            |            | 7  | 7                          | 9                |
| gi 113866231 ref YP_724720.1 ATP-dependent protease ATP-binding subunit HslU                            |            | 7  | 7                          | 7                |
| gi 113866485 ref YP_724974.1 metal-dependent hydrolase  |            | 7  | 7                          | 6                |
| gi 113867613 ref YP_726102.1 arylsulfatase A or related enzyme  |            | 8  | 6                          | 6                |
| gi 113866212 ref YP_724701.1 8-amino-7-oxononanoate synthase  |            | 7  | 7                          | 7                |
| gi 113868791 ref YP_727280.1 transcriptional regulator NrdR   |            | 8  | 7                          | 4                |
| gi 113869419 ref YP_727908.1 50S ribosomal protein L5   |            | 8  | 8                          | 7                |
| gi 38637670 ref NP_942644.1 membrane-bound [NiFe] hydrogenase large subunit                             |            | 8  | 6                          | 10               |
| gi 113869416 ref YP_727905.1 50S ribosomal protein L6   |            | 7  | 7                          | 8                |
| gi 116694014 ref YP_728225.1 GntR family transcriptional regulator                                      |            | 7  | 7                          | 5                |
| gi 113866372 ref YP_724861.1 aa3-type cytochrome oxidase, subunit II                                    |            | 8  | 5                          | 5                |
| gi 113868417 ref YP_726906.1 RNA-binding protein  |            | 5  | 9                          | 4                |
| gi 116694188 ref YP_728399.1 methyl-accepting chemotaxis protein  |            | 8  | 5                          | 8                |
| gi 113867495 ref YP_725984.1 trigger factor   |            | 10 | 8                          | 8                |
| gi 113869406 ref YP_727895.1 50S ribosomal protein S4   |            | 5  | 6                          | 7                |
| gi 113869431 ref YP_727920.1 50S ribosomal protein L3   |            | 7  | 6                          | 8                |
| gi 113868246 ref YP_726735.1 ATPase related to phosphate starvation-inducible protein PhoH              |            | 7  | 6                          | 4                |
| gi 113869187 ref YP_727676.1 hypothetical protein H16_A3233   |            | 10 | 9                          | 7                |
| gi 113866144 ref YP_724633.1 od shape-determining protein MreB  |            | 6  | 4                          | 5                |
| gi 113867389 ref YP_725878.1 pyruvate dehydrogenase subunit E1  |            | 8  | 7                          | 7                |
| gi 113867012 ref YP_725501.1 outer membrane protein and related peptidoglycan-associated (lipo)proteins |            | 8  | 6                          | 5                |
| gi 38637681 ref NP_942655.1 HypB1   |            | 4  | 5                          | 6                |
| gi 116695434 ref YP_841010.1 hypothetical protein H16_B1492   |            | 3  | 2                          | 3                |
| gi 113867510 ref YP_725999.1 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase  |            | 7  | 4                          | 10               |
| gi 113868431 ref YP_726920.1 soluble lytic murein transglycosylase or related regulatory protein        |            | 7  | 7                          | 4                |
| gi 116695154 ref YP_840730.1 transcriptional regulator  |            | 8  | 5                          | 5                |
| gi 38638088 ref NP_943062.1 ribulose bisphosphate carboxylase   |            | 6  | 7                          | 5                |
| gi 113866511 ref YP_725000.1 50S ribosomal protein L13  |            | 6  | 6                          | 6                |
| gi 113866525 ref YP_725014.1 hypothetical protein H16_A0496   |            | 8  | 7                          | 7                |
| gi 113866814 ref YP_725303.1 outer membrane protein or related peptidoglycan-associated (lipo)protein   |            | 8  | 4                          | 6                |
| gi 113867477 ref YP_725966.1 osmolarity response regulator  |            | 5  | 6                          | 5                |
| gi 38638036 ref NP_943010.1 partitioning protein  |            | 10 | 6                          | 8                |
| gi 113869201 ref YP_727690.1 dinucleoside polyphosphate hydrolase                                       |            | 4  | 6                          | 5                |
| gi 113869612 ref YP_728101.1 large extracellular alpha-helical protein                                  |            | 7  | 6                          | 5                |
| gi 116695192 ref YP_840768.1 DNA-binding protein, histone-like  |            | 7  | 4                          | 5                |
| gi 38637693 ref NP_942667.1 TonB-dependent outer membrane receptor                                      |            | 7  | 5                          | 5                |
| gi 113869119 ref YP_727608.1 chorismate lyase   |            | 4  | 5                          | 4                |
| gi 113866529 ref YP_725018.1 Holliday junction resolvase  |            | 7  | 8                          | 7                |
| gi 113866301 ref YP_724790.1 MocR family transcriptional regulator                                      |            | 7  | 5                          | 7                |
| gi 113869412 ref YP_727901.1 50S ribosomal protein L15  |            | 6  | 7                          | 5                |
| gi 116695438 ref YP_841014.1 NagC-family transcriptional regulator                                      |            | 8  | 6                          | 6                |
| gi 113869414 ref YP_727903.1 50S ribosomal protein S5   |            | 5  | 2                          | 5                |



| Protein Nummer  | Annotation                               | WT | n Peptide<br>$\Delta pptA$ | $\Delta ppk-all$ |
|---|--|----|----------------------------|------------------|
| gi 113869449 ref YP_727938.1 transcription antitermination protein NusG                             |  | 5  | 5                          | 4                |
| gi 113867392 ref YP_725881.1 dihydrolipamide dehydrogenase (E3) component of pyruvate dehydrogenase |  | 7  | 6                          | 7                |
| gi 113868252 ref YP_726741.1 50S ribosomal protein L9   |  | 5  | 5                          | 4                |
| gi 113867443 ref YP_725932.1 transcriptional accessory protein                                      |  | 7  | 9                          | 7                |
| gi 116694148 ref YP_728359.1 PspF family transcriptional regulator                                  |  | 6  | 6                          | 9                |
| gi 116695336 ref YP_840912.1 ubisuccinyl transferase  |  | 5  | 3                          | 4                |
| gi 38637790 ref NP_942764.1 siderophore biosynthesis protein  |  | 8  | 5                          | 8                |
| gi 113866034 ref YP_724523.1 DNA gyrase subunit B   |  | 9  | 5                          | 6                |
| gi 113869404 ref YP_727893.1 50S ribosomal protein L17  |  | 5  | 5                          | 5                |
| gi 113869405 ref YP_727894.1 DNA-directed RNA polymerase subunit alpha                              |  | 5  | 4                          | 4                |
| gi 113867408 ref YP_725897.1 LysR family transcriptional regulator                                  |  | 6  | 7                          | 6                |
| gi 113868898 ref YP_727387.1 ATPase involved in chromosome partitioning                             |  | 5  | 4                          | 4                |
| gi 116693964 ref YP_728175.1 chromosome partitioning protein ParB                                   |  | 6  | 5                          | 7                |
| gi 113868009 ref YP_726498.1 inosine 5'-monophosphate dehydrogenase                                 |  | 7  | 5                          | 2                |
| gi 113869237 ref YP_727726.1 outer membrane protein (porin)   |  | 6  | 5                          | 6                |
| gi 113869597 ref YP_728086.1 ABC transporter ATPase   |  | 7  | 6                          | 6                |
| gi 113867015 ref YP_725504.1 hypothetical protein H16_A0993   |  | 5  | 5                          | 5                |
| gi 113869437 ref YP_727926.1 50S ribosomal protein S10  |  | 2  | 2                          | 6                |
| gi 113868520 ref YP_727009.1 GTP-binding protein LepA   |  | 4  | 3                          | 4                |
| gi 116695442 ref YP_841018.1 glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase                                    |  | 6  | 5                          | 6                |
| gi 38637753 ref NP_942727.1 NAD-reducing hydrogenase diaphorase moiety large subunit                |  | 4  | 4                          | 7                |
| gi 113866135 ref YP_724624.1 hypothetical protein H16_A0104   |  | 6  | 0                          | 8                |
| gi 113869424 ref YP_727913.1 50S ribosomal protein L16  |  | 5  | 4                          | 5                |
| gi 116694652 ref YP_728863.1 hypothetical protein H16_B0701   |  | 5  | 5                          | 4                |
| gi 116696481 ref YP_842057.1 ICR family transcriptional regulator                                   |  | 4  | 3                          | 4                |
| gi 113868324 ref YP_726813.1 exoribonuclease R  |  | 8  | 3                          | 5                |
| gi 113868033 ref YP_726522.1 elongation factor Ts   |  | 6  | 2                          | 6                |
| gi 113868657 ref YP_727146.1 ATP-dependent RNA helicase   |  | 9  | 3                          | 0                |
| gi 38637786 ref NP_942760.1 diaminopimelate decarboxylase   |  | 4  | 4                          | 4                |
| gi 113868997 ref YP_727486.1 response regulator   |  | 6  | 3                          | 5                |
| gi 113868591 ref YP_727080.1 succinate dehydrogenase flavoprotein subunit                           |  | 8  | 1                          | 3                |
| gi 113869550 ref YP_728039.1 kytochrome c55   |  | 4  | 3                          | 3                |
| gi 113867171 ref YP_725660.1 aromatic amino acid aminotransferase                                   |  | 7  | 5                          | 5                |
| gi 113868899 ref YP_727388.1 outer membrane protein   |  | 5  | 4                          | 3                |
| gi 113869222 ref YP_727711.1 cell division protein FtsA   | peptidoglycan-associated (lipo) proteins | 6  | 4                          | 4                |
| gi 113868381 ref YP_726870.1 acyl carrier protein reductase   |  | 6  | 4                          | 7                |
| gi 113868070 ref YP_726559.1 lysophospholipase  |  | 3  | 7                          | 4                |
| gi 113868613 ref YP_727102.1 heat shock protein 90  |  | 6  | 1                          | 5                |
| gi 113868299 ref YP_726788.1 dihydrolipamide succinyltransferase                                    |  | 4  | 4                          | 6                |
| gi 113869218 ref YP_727707.1 hypothetical protein H16_A3265   |  | 7  | 6                          | 3                |
| gi 113868590 ref YP_727079.1 succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit                            |  | 6  | 4                          | 4                |
| gi 113867474 ref YP_725963.1 peroxiredoxin  |  | 4  | 1                          | 0                |
| gi 113869420 ref YP_727909.1 50S ribosomal protein L24  |  | 5  | 5                          | 3                |

| Protein Nummer  | Annotation | WT | n Peptide<br>$\Delta pptA$ | $\Delta ppk-all$ |
|---|------------|----|----------------------------|------------------|
| gi 113867138 ref YP_725627.1 MoxR-like ATPase   |            | 7  | 2                          | 5                |
| gi 113869343 ref YP_727832.1 biquinol-cytochrome c reductase, cytochrome c1   |            | 4  | 3                          | 4                |
| gi 113867183 ref YP_725672.1 haperone protein HscA  |            | 5  | 4                          | 3                |
| gi 116694653 ref YP_728864.1  $\phi$ poVR family protein  |            | 5  | 4                          | 3                |
| gi 116694142 ref YP_728353.1 fp pilus assembly ATPase CpaF  |            | 8  | 4                          | 4                |
| gi 113869339 ref YP_727828.1 hypothetical protein H16_A3391   |            | 7  | 2                          | 6                |
| gi 113868628 ref YP_727117.1 DNA topoisomerase IV subunit B   |            | 6  | 4                          | 6                |
| gi 38637687 ref NP_942661.1 HoxA  |            | 2  | 5                          | 4                |
| gi 113866524 ref YP_725013.1 hypothetical protein H16_A0495   |            | 4  | 3                          | 3                |
| gi 116695979 ref YP_841555.1 hypothetical protein H16_B2043   |            | 5  | 2                          | 1                |
| gi 113868481 ref YP_726970.1 hypothetical protein H16_A2514   |            | 4  | 3                          | 3                |
| gi 38637907 ref NP_942881.1 anaerobic nitric oxide reductase transcription regulator                                  |            | 3  | 5                          | 3                |
| gi 116694857 ref YP_729068.1 LysR family transcriptional regulator  |            | 5  | 5                          | 4                |
| gi 38637757 ref NP_942731.1 [NiFe] hydrogenase (HoxH-specific) C-terminal protease                                    |            | 4  | 4                          | 4                |
| gi 113869598 ref YP_728087.1 ABC transporter ATPase   |            | 5  | 4                          | 4                |
| gi 113868777 ref YP_727266.1 hypothetical protein H16_A2820   |            | 4  | 4                          | 4                |
| gi 113869062 ref YP_727551.1 metalloregulation DNA-binding stress protein   |            | 3  | 5                          | 3                |
| gi 113869098 ref YP_727587.1 LysR family transcriptional regulator  |            | 5  | 3                          | 4                |
| gi 113868041 ref YP_726530.1 chromosome segregation ATPase  |            | 4  | 2                          | 3                |
| gi 113868233 ref YP_726722.1 ABC-type transporter, periplasmic component  |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 116693961 ref YP_728172.1 epitope initiation protein RepA  |            | 3  | 2                          | 6                |
| gi 113869208 ref YP_727697.1 Type IV pilus assembly protein PHB   |            | 4  | 5                          | 4                |
| gi 113866170 ref YP_724659.1 hypothetical protein H16_A0139   |            | 4  | 3                          | 4                |
| gi 113867884 ref YP_726373.1 protonate catabolism activator   |            | 5  | 2                          | 4                |
| gi 113868846 ref YP_727335.1 hypothetical protein H16_A2891   |            | 6  | 5                          | 4                |
| gi 116695621 ref YP_841197.1 ABC transporter ATPase/permease  |            | 4  | 3                          | 6                |
| gi 113869659 ref YP_728148.1 dihydroiposamide dehydrogenase (E3 component of pyruvate or 2-oxoglutarate DH-complexes) |            | 5  | 5                          | 4                |
| gi 113867387 ref YP_725876.1 response regulator   |            | 2  | 2                          | 3                |
| gi 113866361 ref YP_724850.1 C-terminal processing peptidase-3, periplasmic   |            | 5  | 4                          | 6                |
| gi 116695657 ref YP_841233.1 GntR family transcriptional regulator  |            | 3  | 2                          | 6                |
| gi 113867199 ref YP_725688.1 gluconate kinase   |            | 4  | 3                          | 2                |
| gi 113867208 ref YP_725697.1 phosphopyruvate hydratase  |            | 5  | 1                          | 6                |
| gi 113869281 ref YP_727770.1 GTP-dependent nucleic acid-binding protein EngD  |            | 5  | 3                          | 3                |
| gi 113868675 ref YP_727164.1 ATP-dependent helicase   |            | 2  | 0                          | 4                |
| gi 113869679 ref YP_728168.1 inner membrane protein translocase component YidC  |            | 5  | 2                          | 6                |
| gi 113868334 ref YP_726823.1 GTP-binding protein EngA   |            | 3  | 3                          | 3                |
| gi 113868147 ref YP_726636.1 acetoacetyl-CoA reductase  |            | 5  | 5                          | 5                |
| gi 113866416 ref YP_724905.1 RNA polymerase factor sigma-54   |            | 3  | 6                          | 4                |
| gi 113869058 ref YP_727547.1 Type IV pilus twitching motility protein PilT  |            | 4  | 4                          | 2                |
| gi 113869446 ref YP_727935.1  $\phi$ S0S ribosomal protein L10  |            | 5  | 4                          | 5                |
| gi 113869086 ref YP_727575.1 response regulator containing an atypical phosphorylation pocket                         |            | 6  | 3                          | 3                |
| gi 113869042 ref YP_727531.1 haperone protein DnaJ  |            | 3  | 4                          | 3                |
| gi 113869289 ref YP_727778.1 hypothetical protein H16_A3341   |            | 3  | 1                          | 2                |

| Protein Nummer               | Annotation   | WT | n Peptide<br>$\Delta pphA$ | $\Delta pphA$ |
|------------------------------|--|----|----------------------------|---------------|
| gi 38637689 ref NP_942663.1  | regulatory [NiFe] hydrogenase large subunit                | 2  | 4                          | 3             |
| gi 113868026 ref YP_726515.1 | outer membrane protein, surface antigen OMA87              | 5  | 3                          | 4             |
| gi 113868348 ref YP_726837.1 | M23B subfamily metalloproteinase                           | 6  | 4                          | 4             |
| gi 113869097 ref YP_727586.1 | FUR family transcriptional regulator                       | 4  | 3                          | 4             |
| gi 113866406 ref YP_724895.1 | formamidopyrimidine-DNA glycosylase                        | 5  | 4                          | 2             |
| gi 116696240 ref YP_841816.1 | lipoprotein  | 6  | 4                          | 2             |
| gi 113868857 ref YP_727346.1 | hypothetical protein H16_A2902                             | 6  | 4                          | 3             |
| gi 113866115 ref YP_724604.1 | cell division topological specificity factor MinE          | 6  | 4                          | 4             |
| gi 113868148 ref YP_726637.1 | phasin (PHA-granule associated protein)                    | 5  | 2                          | 3             |
| gi 113868330 ref YP_726819.1 | membrane protease subunit stomatin/prohibitin-like protein | 6  | 2                          | 5             |
| gi 113868283 ref YP_726772.1 | hypothetical protein H16_A2308                             | 2  | 3                          | 2             |
| gi 113868282 ref YP_726771.1 | transcription elongation factor NusA                       | 3  | 5                          | 7             |
| gi 116696337 ref YP_841913.1 | Poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase                       | 4  | 2                          | 1             |
| gi 113867170 ref YP_725659.1 | intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase         | 4  | 3                          | 3             |
| gi 113868331 ref YP_726820.1 | membrane protease subunit stomatin/prohibitin-like protein | 5  | 2                          | 4             |
| gi 113869191 ref YP_727680.1 | response regulator   | 6  | 4                          | 2             |
| gi 113867453 ref YP_725942.1 | acetyl-CoA reductase                                       | 3  | 3                          | 2             |
| gi 113869548 ref YP_728037.1 | peptidyl-tRNA hydrolase                                    | 3  | 3                          | 2             |
| gi 113866226 ref YP_724715.1 | G3E family GTPase  | 6  | 5                          | 2             |
| gi 113869429 ref YP_727918.1 | S0S ribosomal protein L23                                  | 1  | 2                          | 2             |
| gi 113866266 ref YP_724755.1 | thiamine biosynthesis protein ThiC                         | 3  | 2                          | 4             |
| gi 113869082 ref YP_727571.1 | NAD(P) transhydrogenase subunit alpha 1                    | 5  | 4                          | 3             |
| gi 113867890 ref YP_726379.1 | lutaminase-asparaginase (amidohydrolase)                   | 5  | 0                          | 6             |
| gi 113869407 ref YP_727896.1 | S0S ribosomal protein S11                                  | 3  | 3                          | 3             |
| gi 113866470 ref YP_724959.1 | hydrogenase  | 3  | 0                          | 3             |
| gi 113866930 ref YP_725419.1 | ADP-heptose:LPS heptosyltransferase II                     | 4  | 3                          | 2             |
| gi 113868251 ref YP_726740.1 | hepticate DNA helicase                                     | 4  | 4                          | 4             |
| gi 113869533 ref YP_728022.1 | LysR family transcriptional regulator                      | 4  | 3                          | 5             |
| gi 116696142 ref YP_841718.1 | putative phytoene synthase                                 | 5  | 5                          | 4             |
| gi 113867343 ref YP_725832.1 | electron transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase   | 5  | 3                          | 4             |
| gi 38637758 ref NP_942732.1  | HoxI   | 3  | 3                          | 4             |
| gi 113868727 ref YP_727216.1 | lanyl-tRNA synthetase                                      | 3  | 2                          | 5             |
| gi 113867899 ref YP_726388.1 | lactaldehyde dehydrogenase                                 | 5  | 2                          | 1             |
| gi 113867178 ref YP_725667.1 | cysteine desulfurase                                       | 6  | 2                          | 2             |
| gi 38637705 ref NP_942679.1  | integrase/recombinase                                      | 2  | 4                          | 3             |
| gi 113868362 ref YP_726851.1 | recombinational DNA repair protein (RecF pathway)          | 2  | 0                          | 2             |
| gi 113869629 ref YP_728118.1 | response regulator   | 4  | 3                          | 4             |
| gi 113866393 ref YP_724882.1 | signal recognition particle receptor FtsY                  | 4  | 3                          | 2             |
| gi 116694194 ref YP_728405.1 | chemotaxis protein histidine kinase                        | 3  | 3                          | 3             |
| gi 113868578 ref YP_727067.1 | fp pilus assembly protein FimV                             | 5  | 3                          | 5             |
| gi 113866760 ref YP_725249.1 | LemA like protein  | 4  | 3                          | 3             |

| Protein Nummer   | Annotation | WT | n Peptide<br>$\Delta pptA$ | $\Delta ppk-all$ |
|--|------------|----|----------------------------|------------------|
| gi 113867165 ref YP_725654.1 flavin-binding monooxygenase  |            | 3  | 4                          | 2                |
| gi 113869577 ref YP_728066.1 F0F1 ATP synthase subunit B   |            | 5  | 2                          | 4                |
| gi 113868501 ref YP_726990.1 hemin uptake protein  |            | 0  | 2                          | 0                |
| gi 113866501 ref YP_724990.1 ABC transporter periplasmic protein                                 |            | 2  | 3                          | 1                |
| gi 113866575 ref YP_725064.1 succinyl-CoA synthetase subunit beta                                |            | 4  | 2                          | 0                |
| gi 113866551 ref YP_725040.1 hypothetical protein H16_A0522                                      |            | 3  | 4                          | 3                |
| gi 116694538 ref YP_728749.1 thioesterase  |            | 2  | 3                          | 3                |
| gi 113868710 ref YP_727199.1 UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase                         |            | 5  | 3                          | 4                |
| gi 113868522 ref YP_727011.1 trypsin-like serine protease  |            | 4  | 3                          | 3                |
| gi 113866504 ref YP_724993.1 ABC transporter ATPase  |            | 4  | 2                          | 3                |
| gi 113869348 ref YP_727837.1 trypsin-like serine protease  |            | 2  | 2                          | 3                |
| gi 113866214 ref YP_724703.1 biotin synthase   |            | 1  | 2                          | 2                |
| gi 113866562 ref YP_725051.1 universal stress protein  |            | 3  | 1                          | 3                |
| gi 113868995 ref YP_727484.1 rRNA and rRNA cytosine-C5-methylase                                 |            | 3  | 4                          | 1                |
| gi 116695858 ref YP_841434.1 LysR family transcriptional regulator                               |            | 3  | 4                          | 3                |
| gi 113868017 ref YP_726506.1 phosphoenolpyruvate synthase  |            | 3  | 3                          | 4                |
| gi 113868253 ref YP_726742.1 80S ribosomal protein S18   |            | 2  | 2                          | 3                |
| gi 113868368 ref YP_726857.1 thioredoxin   |            | 4  | 2                          | 3                |
| gi 113868860 ref YP_727349.1 mannose-1-phosphate guanylyltransferase                             |            | 2  | 3                          | 2                |
| gi 113869596 ref YP_728085.1 ABC-type transporter, periplasmic component                         |            | 3  | 2                          | 0                |
| gi 113867390 ref YP_725879.1 hydrolyzamide acetyltransferase                                     |            | 3  | 0                          | 4                |
| gi 113869417 ref YP_727906.1 80S ribosomal protein S8  |            | 3  | 0                          | 3                |
| gi 113866732 ref YP_725221.1  $\sigma$ -chaperonin GroES   |            | 2  | 0                          | 2                |
| gi 116694651 ref YP_728862.1 serine protein kinase   |            | 3  | 0                          | 2                |
| gi 113869085 ref YP_727574.1 NAD(P) transhydrogenase subunit beta                                |            | 1  | 2                          | 0                |
| gi 113868856 ref YP_727345.1 glycosyltransferase   |            | 3  | 2                          | 2                |
| gi 113867008 ref YP_725497.1 hypothetical protein H16_A0986                                      |            | 3  | 3                          | 4                |
| gi 113869664 ref YP_728153.1 acriflavin resistance protein A                                     |            | 3  | 3                          | 3                |
| gi 113868308 ref YP_726797.1 signal transduction histidine kinase nitrogen specific protein NtrB |            | 5  | 2                          | 3                |
| gi 116695568 ref YP_841144.1 noyl-(acyl carrier protein) reductase                               |            | 3  | 3                          | 4                |
| gi 113869132 ref YP_727621.1 histone H1-like protein (alanine/lysine-rich protein)               |            | 3  | 2                          | 2                |
| gi 116695467 ref YP_841043.1 MarR family transcriptional regulator                               |            | 3  | 4                          | 3                |
| gi 113869305 ref YP_727794.1 cation/multidrug efflux system, membrane-fusion component           |            | 4  | 3                          | 4                |
| gi 38638078 ref NP_943052.1 phosphoglycerate kinase  |            | 4  | 5                          | 2                |
| gi 116695570 ref YP_841146.1 phosphate acetyltransferase   |            | 3  | 2                          | 1                |
| gi 113866554 ref YP_725043.1 Mg2+/Co2+ transporter   |            | 3  | 1                          | 2                |
| gi 113867451 ref YP_725940.1 Poly(3-hydroxybutyrate) polymerase                                  |            | 5  | 1                          | 4                |
| gi 113869188 ref YP_727677.1 ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta                   |            | 4  | 4                          | 4                |
| gi 113866619 ref YP_725108.1 extra-cytoplasmic solute receptor                                   |            | 4  | 2                          | 2                |
| gi 116696012 ref YP_841588.1 integral membrane protein   |            | 3  | 2                          | 4                |

| Protein Nummer  | Annotation | WT | n Peptide<br>$\Delta pptA$ | $\Delta ppk-all$ |
|---|------------|----|----------------------------|------------------|
| gi 113868814 ref YP_727303.1 hypothetical protein H16_A2858                           |            | 3  | 4                          | 2                |
| gi 113869441 ref YP_727930.1 80S ribosomal protein S12                                |            | 3  | 3                          | 5                |
| gi 116695629 ref YP_841205.1 thioesterase   |            | 2  | 2                          | 1                |
| gi 113868950 ref YP_727439.1 sulfate adenylyltransferase subunit 1                    |            | 4  | 2                          | 3                |
| gi 113866557 ref YP_725046.1 2-methylthioadenine synthetase                           |            | 4  | 0                          | 5                |
| gi 38637761 ref NP_942735.1 HypF2   |            | 2  | 3                          | 8                |
| gi 116695205 ref YP_840781.1 hypothetical protein H16_B1261                           |            | 3  | 3                          | 2                |
| gi 116694705 ref YP_728916.1 LuxR family transcriptional regulator                    |            | 3  | 3                          | 2                |
| gi 113868073 ref YP_726562.1 hypothetical protein H16_A2095                           |            | 2  | 3                          | 3                |
| gi 116694863 ref YP_729074.1 lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase             |            | 3  | 4                          | 1                |
| gi 113867452 ref YP_725941.1 acetyl-CoA acetyltransferase                             |            | 3  | 2                          | 1                |
| gi 113869481 ref YP_727970.1 general secretion pathway protein D                      |            | 2  | 1                          | 3                |
| gi 113866332 ref YP_724821.1 D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (serine-type)        |            | 3  | 1                          | 3                |
| gi 113868988 ref YP_727477.1 50S ribosomal protein L28                                |            | 5  | 3                          | 3                |
| gi 113868924 ref YP_727413.1 Cob(I)alamin adenosyltransferase (BtuR)                  |            | 3  | 3                          | 2                |
| gi 113868015 ref YP_726504.1 membrane protease subunits, stomatin/prohibitin homologs |            | 5  | 2                          | 4                |
| gi 113869068 ref YP_727557.1 preprotein translocase subunit YajC                      |            | 3  | 2                          | 3                |
| gi 113867062 ref YP_725551.1 2-isopropylmalate synthase                               |            | 2  | 2                          | 4                |
| gi 113866999 ref YP_725488.1 hypothetical protein H16_A0977                           |            | 2  | 2                          | 2                |
| gi 113866976 ref YP_725465.1 hypothetical protein H16_A0952                           |            | 3  | 2                          | 2                |
| gi 113867065 ref YP_725554.1 80S ribosomal protein S15                                |            | 3  | 2                          | 3                |
| gi 113866401 ref YP_724890.1 80S ribosomal protein L25/general stress protein Ctc     |            | 2  | 2                          | 2                |
| gi 113868347 ref YP_726836.1 RNA polymerase sigma factor RpoS                         |            | 4  | 2                          | 3                |
| gi 113869344 ref YP_727833.1 biquinol-cytochrome-c reductase, cytochrome b            |            | 3  | 3                          | 3                |
| gi 113868298 ref YP_726787.1 dihydroipoamide dehydrogenase                            |            | 3  | 2                          | 3                |
| gi 113869448 ref YP_727937.1 50S ribosomal protein L11                                |            | 2  | 3                          | 1                |
| gi 113868269 ref YP_726758.1 GTP-binding elongation factor family protein             |            | 3  | 3                          | 1                |
| gi 113868285 ref YP_726774.1 transcriptional regulator (Ypnh-like)                    |            | 2  | 2                          | 2                |
| gi 113868927 ref YP_727416.1 outer membrane cobalamin receptor, TonB dependent (BtuB) |            | 4  | 2                          | 3                |
| gi 113866979 ref YP_725468.1 GTP pyrophosphokinase                                    |            | 4  | 2                          | 2                |
| gi 116695970 ref YP_841546.1 hypothetical protein H16_B2034                           |            | 3  | 2                          | 0                |
| gi 38637684 ref NP_942658.1 HypD1   |            | 0  | 2                          | 3                |
| gi 116695993 ref YP_841569.1 succinate-semialdehyde dehydrogenase (NADP+)             |            | 2  | 0                          | 2                |
| gi 113869415 ref YP_727904.1 80S ribosomal protein L18                                |            | 2  | 3                          | 2                |
| gi 113867438 ref YP_725927.1 HSP20 family molecular chaperone                         |            | 3  | 2                          | 3                |
| gi 113867003 ref YP_725492.1 pili assembly protein CpaB                               |            | 2  | 2                          | 3                |
| gi 113868243 ref YP_726732.1 aminotransferase AlaT                                    |            | 2  | 0                          | 4                |
| gi 113868562 ref YP_727051.1 80S ribosomal protein S21                                |            | 2  | 1                          | 1                |
| gi 116694027 ref YP_728238.1 beta-lactamase superfamily hydrolase                     |            | 2  | 3                          | 3                |
| gi 116694114 ref YP_728325.1 trypsin-like serine protease                             |            | 3  | 2                          | 2                |
| gi 113866250 ref YP_724739.1 M48 family peptidase                                     |            | 2  | 4                          | 3                |
| gi 113868415 ref YP_726904.1 FtsH endopeptidase                                       |            | 3  | 0                          | 3                |
| gi 113868030 ref YP_726519.1 undecaprenyl pyrophosphate synthetase                    |            | 3  | 4                          | 0                |

| Protein Nummer               | Annotation  | WT | n Peptide<br>$\Delta pptA$ | $\Delta ppk-all$ |
|------------------------------|---|----|----------------------------|------------------|
| gi 113869378 ref YP_727867.1 | glutamate synthase [NADPH], glutamate synthase amidotransferase subunit | 2  | 2                          | 4                |
| gi 113868349 ref YP_726838.1 | protein-L-isoaspartate carboxylmethyltransferase                        | 3  | 2                          | 0                |
| gi 113866397 ref YP_724886.1 | phosphopantetheine adenyllyltransferase                                 | 2  | 2                          | 3                |
| gi 116694249 ref YP_728460.1 | selenophosphate synthase  | 3  | 1                          | 2                |
| gi 116696016 ref YP_841592.1 | LysR family transcriptional regulator                                   | 2  | 2                          | 1                |
| gi 116695523 ref YP_841099.1 | hypothetical protein H16_B1582  | 3  | 3                          | 2                |
| gi 113869445 ref YP_727934.1 | 60S ribosomal protein L7/L12  | 1  | 2                          | 2                |
| gi 113866466 ref YP_724955.1 | carbon monoxide dehydrogenase homolog, medium chain                     | 1  | 1                          | 3                |
| gi 113869572 ref YP_728061.1 | F0F1 ATP synthase subunit epsilon                                       | 0  | 1                          | 3                |
| gi 113869514 ref YP_728003.1 | periplasmic or secreted lipoprotein                                     | 2  | 1                          | 2                |
| gi 113866352 ref YP_724841.1 | gamma-glutamyl-cysteine ligase  | 2  | 2                          | 3                |
| gi 113866191 ref YP_724680.1 | cell division protein ftsN  | 3  | 2                          | 4                |
| gi 113868993 ref YP_727482.1 | fatty acid desaturase   | 2  | 0                          | 4                |
| gi 116695441 ref YP_841017.1 | ABC transporter periplasmic protein                                     | 3  | 1                          | 1                |
| gi 113867118 ref YP_725607.1 | gamma-glutamyltransferase 1   | 3  | 1                          | 1                |
| gi 113866065 ref YP_724554.1 | GntR family transcriptional regulator                                   | 2  | 2                          | 2                |
| gi 113868690 ref YP_727179.1 | deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase                                   | 3  | 2                          | 2                |
| gi 113867061 ref YP_725550.1 | LysM domain/BON superfamily protein                                     | 3  | 2                          | 2                |
| gi 113869100 ref YP_727589.1 | glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase                                | 3  | 2                          | 2                |
| gi 113868458 ref YP_726947.1 | hypothetical protein H16_A2491  | 3  | 2                          | 2                |
| gi 113868400 ref YP_725329.1 | electron transfer flavoprotein beta-subunit                             | 4  | 3                          | 3                |
| gi 116695957 ref YP_841533.1 | phasin (PHA-granule associated protein)                                 | 3  | 1                          | 2                |
| gi 116695968 ref YP_841544.1 | chromosome partitioning ATPase  | 3  | 3                          | 2                |
| gi 113867153 ref YP_725642.1 | heat-inducible transcription repressor                                  | 2  | 2                          | 3                |
| gi 113866464 ref YP_724953.1 | von Willebrand factor type A domain-containing protein                  | 2  | 3                          | 0                |
| gi 113868227 ref YP_726716.1 | D-(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase                              | 2  | 3                          | 0                |
| gi 116694477 ref YP_728688.1 | lyoxalase family protein  | 0  | 2                          | 0                |
| gi 138637754 ref NP_942728.1 | NAD-reducing hydrogenase diaphorase moiety small subunit                | 2  | 0                          | 3                |
| gi 116696195 ref YP_841771.1 | LysR family transcriptional regulator                                   | 2  | 3                          | 1                |
| gi 113868601 ref YP_727090.1 | hypothetical protein H16_A2640  | 2  | 2                          | 2                |
| gi 113866541 ref YP_725030.1 | heptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase c) protein                | 3  | 2                          | 2                |
| gi 113867136 ref YP_725625.1 | von Willebrand factor type A domain-containing protein                  | 2  | 1                          | 1                |
| gi 116695151 ref YP_840727.1 | gluconate transporter   | 3  | 0                          | 2                |
| gi 113868284 ref YP_726773.1 | 16S rRNA uridine-516 pseudouridylylate synthase family protein          | 2  | 1                          | 0                |
| gi 113867198 ref YP_725687.1 | phosphogluconate dehydratase  | 2  | 2                          | 3                |
| gi 113866592 ref YP_725081.1 | LuxR family transcriptional regulator                                   | 2  | 2                          | 2                |
| gi 116695444 ref YP_841020.1 | fructokinase  | 4  | 0                          | 2                |
| gi 113867412 ref YP_725901.1 | ABC-type transporter, ATPase component                                  | 3  | 0                          | 3                |
| gi 113868250 ref YP_726739.1 | phosphate transport regulator   | 3  | 0                          | 0                |
| gi 113869574 ref YP_728063.1 | F0F1 ATP synthase subunit gamma   | 2  | 2                          | 2                |
| gi 116696138 ref YP_841714.1 | hypothetical protein H16_B2202  | 3  | 1                          | 2                |
| gi 116694572 ref YP_728783.1 | response regulator  | 1  | 2                          | 3                |
| gi 113868307 ref YP_726796.1 | response regulator, nitrogen regulation protein NtrC                    | 1  | 2                          | 1                |

| Protein Nummer  | Annotation | WT | n Peptide<br>$\Delta pptA$ | $\Delta ppk-all$ |
|---|------------|----|----------------------------|------------------|
| gi 113866576 ref YP_725065.1 succinyl-CoA synthetase subunit alpha                                |            | 3  | 0                          | 1                |
| gi 38637760 ref NP_942734.1 HypB2   |            | 2  | 0                          | 2                |
| gi 113866786 ref YP_725275.1 ABC transporter periplasmic protein                                  |            | 3  | 1                          | 0                |
| gi 113869418 ref YP_727907.1 SOS ribosomal protein S14  |            | 3  | 0                          | 0                |
| gi 113866244 ref YP_727113.1 lactate permease   |            | 2  | 1                          | 1                |
| gi 113866919 ref YP_725408.1 SOS ribosomal protein S16  |            | 2  | 1                          | 1                |
| gi 113866534 ref YP_725023.1 hypothetical protein H16_A0505                                       |            | 2  | 1                          | 2                |
| gi 113868550 ref YP_727039.1 hypothetical protein H16_A2588                                       |            | 2  | 1                          | 3                |
| gi 113869398 ref YP_727887.1 cytochrome c553  |            | 1  | 1                          | 2                |
| gi 113868363 ref YP_726852.1 DNA polymerase III subunits gamma and tau                            |            | 1  | 0                          | 1                |
| gi 113868945 ref YP_727434.1 leucyl aminopeptidase  |            | 2  | 1                          | 3                |
| gi 38637828 ref NP_942802.1 hypothetical protein PHG164   |            | 1  | 3                          | 1                |
| gi 113866868 ref YP_725357.1 TetR/AcrR family transcriptional regulator                           |            | 2  | 3                          | 2                |
| gi 113868255 ref YP_726744.1 SOS ribosomal protein S6   |            | 2  | 0                          | 0                |
| gi 113868788 ref YP_727277.1 biopolymer transport protein   |            | 2  | 0                          | 1                |
| gi 113869185 ref YP_727674.1 hypothetical protein H16_A3231                                       |            | 4  | 2                          | 0                |
| gi 113867073 ref YP_725562.1 NADH dehydrogenase subunit D   |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 38637785 ref NP_942759.1 aldolase  |            | 0  | 3                          | 0                |
| gi 113868494 ref YP_726983.1 fumarate hydratase class I   |            | 1  | 0                          | 2                |
| gi 113869232 ref YP_727721.1 peptidoglycan glycosyltransferase                                    |            | 2  | 2                          | 1                |
| gi 113866420 ref YP_724909.1 sugar phosphate isomerase involved in capsule formation              |            | 2  | 0                          | 2                |
| gi 113869541 ref YP_728030.1 cation/multidrug efflux pump   |            | 2  | 0                          | 2                |
| gi 116694044 ref YP_728255.1 ferrous iron transport protein B                                     |            | 2  | 1                          | 2                |
| gi 113867881 ref YP_726370.1 HD-GYP domain-containing protein                                     |            | 2  | 2                          | 3                |
| gi 113869346 ref YP_727835.1 large-conductance mechanosensitive channel                           |            | 1  | 1                          | 1                |
| gi 116695333 ref YP_840909.1 fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase                       |            | 3  | 2                          | 0                |
| gi 116695989 ref YP_841565.1 hypothetical protein H16_B2053                                       |            | 2  | 0                          | 2                |
| gi 113866040 ref YP_724529.1 5-methylcytosine-specific restriction protein C                      |            | 2  | 0                          | 1                |
| gi 113869484 ref YP_727973.1 hypothetical protein H16_A3546                                       |            | 3  | 0                          | 3                |
| gi 113866032 ref YP_724521.1 chromosomal replication initiation protein                           |            | 2  | 0                          | 1                |
| gi 38638003 ref NP_942977.1 hypothetical protein PHG342   |            | 0  | 1                          | 1                |
| gi 113869262 ref YP_727751.1 membrane-bound lytic murein transglycosylase                         |            | 2  | 0                          | 2                |
| gi 116696370 ref YP_841946.1 hypothetical protein H16_B2434                                       |            | 0  | 2                          | 2                |
| gi 113866781 ref YP_725270.1 DNA segregation ATPase ftsK/SpoIIIE proteins                         |            | 2  | 0                          | 3                |
| gi 113869031 ref YP_727520.1 phosphoribosylaminoimidazole synthetase                              |            | 3  | 0                          | 3                |
| gi 113866767 ref YP_725256.1 Type IV pilus protein histidine kinase/response regulator hybrid PII |            | 3  | 0                          | 0                |
| gi 38637948 ref NP_942922.1 histone-like protein  |            | 1  | 2                          | 1                |
| gi 113868339 ref YP_726828.1 hypothetical protein H16_A2365                                       |            | 2  | 2                          | 1                |
| gi 113866300 ref YP_724789.1 Co/Zn/Cd efflux system component                                     |            | 2  | 1                          | 2                |
| gi 113868036 ref YP_726225.1 PII uridylyl-transferase   |            | 2  | 2                          | 0                |
| gi 113869427 ref YP_727916.1 SOS ribosomal protein S19  |            | 2  | 2                          | 3                |
| gi 113868480 ref YP_726969.1 hypothetical protein H16_A2513                                       |            | 2  | 1                          | 1                |
| gi 116695410 ref YP_840986.1 MocR family transcriptional regulator                                |            | 2  | 2                          | 0                |
| gi 113866779 ref YP_725268.1 hypothetical protein H16_A0752                                       |            | 2  | 0                          | 4                |

| Protein Nummer   | Annotation | WT | n Peptide<br>$\Delta pptA$ | $\Delta ppk-all$ |
|--|------------|----|----------------------------|------------------|
| gi 113869368 ref YP_727857.1 ABC transporter ATPase  |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 116696023 ref YP_841599.1 response regulator  |            | 2  | 0                          | 2                |
| gi 113866777 ref YP_725266.1 nitrogen regulatory protein PII                               |            | 2  | 0                          | 0                |
| gi 116695031 ref YP_840607.1 response regulator  |            | 0  | 1                          | 2                |
| gi 113869212 ref YP_727701.1 hypothetical protein H16_A3259                                |            | 1  | 1                          | 2                |
| gi 116696176 ref YP_841752.1 chemotaxis signal transduction protein                        |            | 1  | 1                          | 2                |
| gi 116696104 ref YP_841680.1 flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase                    |            | 1  | 3                          | 1                |
| gi 113867072 ref YP_725561.1 NADH dehydrogenase subunit C                                  |            | 2  | 0                          | 3                |
| gi 113869069 ref YP_727558.1 preprotein translocase subunit SecD                           |            | 2  | 1                          | 1                |
| gi 113869280 ref YP_727769.1 biquinone biosynthesis hydroxylase family protein             |            | 3  | 2                          | 1                |
| gi 113868951 ref YP_727440.1 sulfate adenylyltransferase subunit 2                         |            | 2  | 0                          | 1                |
| gi 116694140 ref YP_728351.1 pilus assembly protein, secretin                              |            | 1  | 0                          | 3                |
| gi 113869219 ref YP_727708.1 UDP-3-O-[3-hydroxy-myristoyl] N-acetylglucosamine deacetylase |            | 1  | 2                          | 0                |
| gi 113868840 ref YP_727329.1 phosphomannomutase  |            | 1  | 1                          | 0                |
| gi 113866204 ref YP_724693.1 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase                     |            | 1  | 0                          | 1                |
| gi 116696007 ref YP_841583.1 hypothetical protein H16_B2071                                |            | 3  | 0                          | 0                |
| gi 116695869 ref YP_841445.1 methyl-accepting chemotaxis protein                           |            | 2  | 2                          | 2                |
| gi 113869388 ref YP_727877.1 periplasmic multimodular transpeptidase/transglycosylase      |            | 2  | 1                          | 2                |
| gi 116694186 ref YP_728397.1 chemotaxis protein  |            | 1  | 1                          | 1                |
| gi 113866184 ref YP_724673.1 response regulator  |            | 1  | 0                          | 2                |
| gi 113866225 ref YP_724714.1 DnaK suppressor protein                                       |            | 1  | 1                          | 1                |
| gi 116695440 ref YP_841016.1 ABC transporter permease                                      |            | 2  | 1                          | 1                |
| gi 113866502 ref YP_724991.1 ABC transporter permease                                      |            | 2  | 0                          | 2                |
| gi 113869423 ref YP_727912.1 50S ribosomal protein L29                                     |            | 1  | 1                          | 0                |
| gi 113866377 ref YP_724866.1 aa3-type cytochrome oxidase, subunit III                      |            | 1  | 0                          | 1                |
| gi 113869308 ref YP_727797.1 ABC transporter ATP-binding protein                           |            | 3  | 1                          | 0                |
| gi 113869576 ref YP_728065.1 F0F1 ATP synthase subunit delta                               |            | 2  | 0                          | 2                |
| gi 116695177 ref YP_840753.1 small-conductance mechano-sensitive channel                   |            | 2  | 0                          | 2                |
| gi 113869063 ref YP_727552.1 atalase   |            | 2  | 0                          | 1                |
| gi 113867360 ref YP_725849.1 50S ribosomal protein L20                                     |            | 1  | 1                          | 1                |
| gi 113869633 ref YP_728122.1 M48 family peptidase  |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 113866526 ref YP_725015.1 Holliday junction DNA helicase RuvB                           |            | 2  | 1                          | 0                |
| gi 113869010 ref YP_727499.1 isocitrate dehydrogenase                                      |            | 2  | 2                          | 2                |
| gi 113867655 ref YP_726144.1 MocR family transcriptional regulator                         |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 113868491 ref YP_726980.1 acetyl-CoA synthetase   |            | 2  | 0                          | 1                |
| gi 113868851 ref YP_727340.1 NAD dependent sugar epimerase                                 |            | 2  | 4                          | 0                |
| gi 113866385 ref YP_724874.1 Pirin-like protein  |            | 2  | 0                          | 0                |
| gi 113868352 ref YP_726841.1 outer membrane protein (porin)                                |            | 0  | 0                          | 3                |
| gi 113868947 ref YP_727436.1 permease  |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113867447 ref YP_725936.1 DNA uptake lipoprotein  |            | 2  | 1                          | 1                |
| gi 113867373 ref YP_725862.1 NAD-specific glutamate dehydrogenase                          |            | 0  | 1                          | 1                |
| gi 116696392 ref YP_841968.1 GntR family transcriptional regulator                         |            | 1  | 0                          | 2                |
| gi 113867414 ref YP_725903.1 ABC-type transporter, periplasmic component                   |            | 0  | 1                          | 2                |



| Protein Nummer               | Annotation   | WT | n Peptide<br>$\Delta pptA$ | $\Delta ppk-all$ |
|------------------------------|--|----|----------------------------|------------------|
| gi 38637755 ref NP_942729.1  | NAD-reducing hydrogenase moiety large subunit                          | 1  | 1                          | 2                |
| gi 113868213 ref YP_726702.1 | ABC transporter ATPase   | 2  | 1                          | 1                |
| gi 113866172 ref YP_724661.1 | hypothetical protein H16_A0141   | 1  | 0                          | 0                |
| gi 116696108 ref YP_841684.1 | hypothetical protein H16_B2172   | 2  | 1                          | 0                |
| gi 113869126 ref YP_727615.1 | acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit                      | 2  | 1                          | 0                |
| gi 113869225 ref YP_727714.1 | UDP-N-acetylmuramate-L-alanine ligase                                  | 0  | 2                          | 0                |
| gi 113866181 ref YP_724670.1 | betaine homocysteine S-methyltransferase                               | 2  | 0                          | 2                |
| gi 113868873 ref YP_727362.1 | heme biosynthesis  | 2  | 0                          | 1                |
| gi 116694770 ref YP_728981.1 | D-3-phosphoglycerate dehydrogenase                                     | 2  | 2                          | 0                |
| gi 113866315 ref YP_724804.1 | long-chain acyl-CoA synthetase (AMP-forming)                           | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113869665 ref YP_728154.1 | ation/multidrug efflux pump  | 1  | 0                          | 2                |
| gi 38637676 ref NP_942650.1  | HoxQ   | 2  | 0                          | 2                |
| gi 113868855 ref YP_727344.1 | GDP-D-mannose 4,6 dehydratase  | 0  | 1                          | 0                |
| gi 113866193 ref YP_724682.1 | short chain dehydrogenase  | 3  | 2                          | 0                |
| gi 113866475 ref YP_724964.1 | hypothetical protein H16_A0446   | 1  | 0                          | 1                |
| gi 113867081 ref YP_725570.1 | NADH dehydrogenase subunit L   | 1  | 1                          | 0                |
| gi 113869064 ref YP_727553.1 | oxidative stress-inducibile genes activator                            | 3  | 0                          | 0                |
| gi 113866963 ref YP_725452.1 | ABC transporter ATPase   | 1  | 2                          | 2                |
| gi 116695978 ref YP_841554.1 | hypothetical protein H16_B2042   | 1  | 2                          | 2                |
| gi 116696415 ref YP_841991.1 | GntR family transcriptional regulator                                  | 0  | 0                          | 2                |
| gi 113867144 ref YP_725633.1 | microcin-processing peptidase 2  | 1  | 2                          | 0                |
| gi 11386709 ref YP_727198.1  | lyalyl-tRNA synthetase   | 0  | 0                          | 2                |
| gi 113868369 ref YP_726858.1 | transcription termination factor Rho                                   | 2  | 0                          | 0                |
| gi 113869223 ref YP_727712.1 | cell division protein FtsQ   | 0  | 1                          | 0                |
| gi 116694983 ref YP_729194.1 | erotaxis sensor receptor (chemotaxis transducer) transmembrane protein | 2  | 1                          | 1                |
| gi 113868500 ref YP_726989.1 | biopolymer transport protein   | 1  | 1                          | 1                |
| gi 116694013 ref YP_728224.1 | extra-cytoplasmic solute receptor                                      | 1  | 0                          | 1                |
| gi 38637688 ref NP_942662.1  | regulatory [NiFe] hydrogenase small subunit                            | 1  | 1                          | 1                |
| gi 116696328 ref YP_841904.1 | hypothetical protein H16_B2392   | 2  | 1                          | 1                |
| gi 113867541 ref YP_726030.1 | Acyl-CoA dehydrogenase   | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113867581 ref YP_726070.1 | DNA polymerase III subunit delta'                                      | 0  | 1                          | 0                |
| gi 113866236 ref YP_724725.1 | LysR family transcriptional regulator                                  | 1  | 0                          | 1                |
| gi 113869582 ref YP_728071.1 | ATPase involved in chromosome partitioning                             | 1  | 1                          | 0                |
| gi 113866906 ref YP_725395.1 | reverse transcriptase like protein                                     | 1  | 2                          | 1                |
| gi 113869205 ref YP_727694.1 | 80S ribosomal protein L27  | 1  | 1                          | 1                |
| gi 113866970 ref YP_725459.1 | hypothetical protein H16_A0946   | 2  | 1                          | 1                |
| gi 113867496 ref YP_725985.1 | ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit                         | 1  | 1                          | 2                |
| gi 113867157 ref YP_725646.1 | molecular chaperone GrpE   | 1  | 1                          | 0                |
| gi 113867459 ref YP_725948.1 | beta-ketothiolase  | 1  | 1                          | 0                |
| gi 116695055 ref YP_840631.1 | copper-Zinc superoxide dismutase                                       | 1  | 1                          | 0                |
| gi 113866405 ref YP_724894.1 | O-linked N-acetylglucosamine transferase OGT                           | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113869048 ref YP_727537.1 | glycolate oxidase subunit GlcD   | 2  | 0                          | 0                |
| gi 113866928 ref YP_725417.1 | glycosyltransferase involved in LPS biosynthesis                       | 1  | 2                          | 1                |
| gi 113868977 ref YP_727466.1 | nucleoside-diphosphate-sugar epimerase                                 | 1  | 1                          | 0                |

| Protein Nummer               | Annotation   | WT | n Peptide<br>$\Delta pptA$ | $\Delta ppk-all$ |
|------------------------------|--|----|----------------------------|------------------|
| gi 113866572 ref YP_725061.1 | recombinase A  | 2  | 0                          | 1                |
| gi 116695721 ref YP_841297.1 | response regulator   | 1  | 0                          | 2                |
| gi 113867179 ref YP_725668.1 | scalloid protein   | 2  | 1                          | 2                |
| gi 116694443 ref YP_728654.1 | hypothetical protein H16_B0492                                 | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113869304 ref YP_727793.1 | multidrug efflux pump  | 2  | 0                          | 0                |
| gi 113868335 ref YP_726824.1 | hypothetical protein H16_A2361                                 | 2  | 0                          | 2                |
| gi 113866415 ref YP_724904.1 | sigma54 (RpoN) modulation protein                              | 0  | 0                          | 1                |
| gi 113868699 ref YP_727188.1 | DNA polymerase I   | 1  | 0                          | 1                |
| gi 38638034 ref NP_943008.1  | replication protein  | 2  | 1                          | 1                |
| gi 113868962 ref YP_727451.1 | permease   | 1  | 0                          | 2                |
| gi 113869666 ref YP_728155.1 | outer membrane efflux protein                                  | 1  | 0                          | 2                |
| gi 113869653 ref YP_728142.1 | extra-cytoplasmic solute receptor                              | 2  | 0                          | 3                |
| gi 113868599 ref YP_727088.1 | aconitate hydratase  | 2  | 0                          | 1                |
| gi 113868035 ref YP_726524.1 | methionine aminopeptidase                                      | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113869023 ref YP_727512.1 | DNA mismatch repair protein                                    | 3  | 0                          | 0                |
| gi 113866365 ref YP_724854.1 | preprotein translocase subunit SecB                            | 1  | 1                          | 1                |
| gi 113868691 ref YP_727180.1 | geranylgeranyl pyrophosphate synthase                          | 1  | 1                          | 1                |
| gi 113868564 ref YP_727053.1 | ABC transporter permease                                       | 1  | 1                          | 1                |
| gi 113866239 ref YP_724728.1 | acetylglutamate kinase   | 1  | 1                          | 1                |
| gi 116696504 ref YP_842080.1 | small-conductance mechano-sensitive channel                    | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113869352 ref YP_727841.1 | arginine translocase protein A                                 | 1  | 1                          | 1                |
| gi 113866275 ref YP_724764.1 | adenosyl-L-homocysteine hydrolase                              | 1  | 1                          | 1                |
| gi 113869413 ref YP_727902.1 | 50S ribosomal protein L30                                      | 1  | 0                          | 1                |
| gi 113869255 ref YP_727744.1 | enoyl-CoA hydratase  | 0  | 1                          | 1                |
| gi 113868604 ref YP_727093.1 | spermidine synthase  | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113869206 ref YP_727695.1 | 50S ribosomal protein L21                                      | 1  | 1                          | 1                |
| gi 38638084 ref NP_943058.1  | ribulose-5-phosphate 3-epimerase                               | 0  | 1                          | 1                |
| gi 116695630 ref YP_841206.1 | phosphoethylethyltransferase family protein                    | 1  | 1                          | 1                |
| gi 113866968 ref YP_725457.1 | ABC transporter ATPase   | 1  | 1                          | 1                |
| gi 113866937 ref YP_725426.1 | hypothetical protein H16_A0912                                 | 2  | 1                          | 1                |
| gi 116696438 ref YP_842014.1 | ABC-type transporter, periplasmic component                    | 0  | 1                          | 0                |
| gi 113867224 ref YP_725713.1 | hydrodipicolinate synthase                                     | 1  | 0                          | 1                |
| gi 113868323 ref YP_726812.1 | rRNA methylase   | 1  | 1                          | 1                |
| gi 113868842 ref YP_727331.1 | glycosyltransferase  | 1  | 1                          | 0                |
| gi 113866188 ref YP_724677.1 | hypothetical protein H16_A0157                                 | 1  | 1                          | 1                |
| gi 113868196 ref YP_726685.1 | universal stress protein                                       | 1  | 0                          | 1                |
| gi 38637690 ref NP_942664.1  | histidine protein kinase                                       | 1  | 0                          | 1                |
| gi 116694605 ref YP_728816.1 | biphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase                              | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113869661 ref YP_728150.1 | response regulator   | 1  | 1                          | 1                |
| gi 113868336 ref YP_726825.1 | transmembrane protein  | 2  | 1                          | 2                |
| gi 113868748 ref YP_727237.1 | FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase                  | 2  | 1                          | 1                |
| gi 113868499 ref YP_726988.1 | biopolymer transport protein                                   | 2  | 1                          | 1                |
| gi 113866154 ref YP_724643.1 | lipoyl synthase  | 2  | 1                          | 1                |
| gi 113869125 ref YP_727614.1 | acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein subunit | 1  | 1                          | 0                |

| Protein Nummer  | Annotation | WT | n Peptide<br>$\Delta pptA$ | $\Delta ppk-all$ |
|---|------------|----|----------------------------|------------------|
| gi 113868333 ref YP_726822.1 RNA-binding protein Hfq  |            | 1  | 0                          | 1                |
| gi 113867448 ref YP_725937.1 pseudouridylylase, 23S RNA-specific  |            | 1  | 1                          | 0                |
| gi 38638031 ref NP_943005.1 hypothetical protein PHG370   |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 113866474 ref YP_724963.1 biquinone/menaquinone biosynthesis<br>methyltransferase                              |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 116695586 ref YP_841162.1 response regulator   |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 113867335 ref YP_725824.1 glutathione S-transferase-like protein   |            | 1  | 1                          | 0                |
| gi 113866483 ref YP_724972.1 hypothetical protein H16_A0454   |            | 1  | 0                          | 2                |
| gi 113866134 ref YP_724623.1 RNA modification GTPase TrmE   |            | 2  | 2                          | 0                |
| gi 116695021 ref YP_840597.1 phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase  |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 113869377 ref YP_727866.1 glutamate synthase subunit beta  |            | 2  | 0                          | 2                |
| gi 116694421 ref YP_728632.1 hypothetical protein H16_B0470   |            | 2  | 0                          | 2                |
| gi 113866789 ref YP_725278.1 ABC-type transporter, ATPase component   |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 116694660 ref YP_728871.1 DNA-binding HTH domain-containing protein  |            | 2  | 0                          | 0                |
| gi 113867914 ref YP_726403.1 dehydrogenase  |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 113866583 ref YP_725072.1 zinc metalloprotease   |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113867362 ref YP_725851.1 phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta  |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 113868371 ref YP_726860.1 60S ribosomal protein L31 type B   |            | 1  | 1                          | 1                |
| gi 113867590 ref YP_726079.1 hypothetical protein H16_A1579   |            | 0  | 1                          | 1                |
| gi 38637816 ref NP_942790.1 hypothetical protein PHG152   |            | 0  | 1                          | 1                |
| gi 113868876 ref YP_727365.1 phosphoenolpyruvate carboxylase  |            | 1  | 1                          | 1                |
| gi 113866633 ref YP_725122.1 tetraacyldisaccharide 4'-kinase  |            | 1  | 1                          | 0                |
| gi 113869341 ref YP_727830.1 CpXP protease specificity-enhancing factor   |            | 1  | 1                          | 0                |
| gi 113866578 ref YP_725067.1 Type IV pilus structural subunit P1A   |            | 1  | 1                          | 1                |
| gi 113866233 ref YP_724722.1 response regulator   |            | 1  | 1                          | 1                |
| gi 38637679 ref NP_942653.1 HoxV  |            | 0  | 0                          | 2                |
| gi 113868874 ref YP_727363.1 bifunctional uroporphyrinogen-III<br>synthetase/uroporphyrin-III C-methyltransferase |            | 1  | 0                          | 1                |
| gi 113869215 ref YP_727704.1 ATPase   |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 38637788 ref NP_942762.1 efflux protein  |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 113868197 ref YP_726886.1 Zn-dependent protease with chaperone function  |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113866914 ref YP_725403.1 LysR family transcriptional regulator  |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 113866800 ref YP_725289.1 cyanophycin synthetase   |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113866974 ref YP_725463.1 serine/threonine protein phosphatase   |            | 1  | 0                          | 2                |
| gi 113869105 ref YP_727594.1 hypothetical protein H16_A3151   |            | 2  | 0                          | 0                |
| gi 113868787 ref YP_727276.1 biopolymer transport protein   |            | 1  | 0                          | 1                |
| gi 113868811 ref YP_727300.1 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase  |            | 2  | 0                          | 1                |
| gi 113869426 ref YP_727915.1 60S ribosomal protein L22  |            | 0  | 0                          | 2                |
| gi 113869229 ref YP_727718.1 phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase                                    |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 113866636 ref YP_725125.1 xodoxyribonuclease VII large subunit   |            | 1  | 0                          | 1                |
| gi 113866050 ref YP_724539.1 hypothetical protein H16_A0019   |            | 0  | 0                          | 2                |
| gi 113867058 ref YP_725547.1 ketol-acid reductoisomerase  |            | 1  | 1                          | 1                |
| gi 38637682 ref NP_942656.1 HypF1   |            | 0  | 0                          | 2                |
| gi 116696109 ref YP_841685.1 hypothetical protein H16_B2173   |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 38637832 ref NP_942806.1 hypothetical protein PHG168   |            | 0  | 2                          | 1                |

| Protein Nummer  | Annotation | WT | n Peptide<br>$\Delta pprA$ | $\Delta pph\text{-}all$ |
|---|------------|----|----------------------------|-------------------------|
| gi 113866412 ref YP_724901.1 HP-kinase/phosphorylase  |            | 2  | 0                          | 0                       |
| gi 116695337 ref YP_840913.1 fibulose biphosphate carboxylase small chain (+1)                                  |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 113868598 ref YP_727087.1 hypothetical protein H16_A2637   |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 113868271 ref YP_726760.1 outer membrane efflux protein  |            | 0  | 1                          | 0                       |
| gi 113869639 ref YP_728128.1 DNA topoisomerase III  |            | 0  | 0                          | 2                       |
| gi 113866467 ref YP_724956.1 aerobic-type carbon monoxide dehydrogenase large subunit                           |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 116695431 ref YP_841007.1 outer membrane receptor, TonB dependent  |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 113867437 ref YP_725926.1 aspartyl-tRNA synthetase   |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 113869107 ref YP_727596.1 HSP20 family molecular chaperone   |            | 2  | 0                          | 0                       |
| gi 116696105 ref YP_841681.1 malic enzyme   |            | 3  | 0                          | 2                       |
| gi 113868688 ref YP_727177.1 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase                                 |            | 0  | 0                          | 2                       |
| gi 113866360 ref YP_724849.1 DNA-binding/iron metalloprotein/AP endonuclease                                    |            | 0  | 0                          | 2                       |
| gi 113868779 ref YP_727268.1 molybdopterin/thiamine biosynthesis family protein                                 |            | 1  | 0                          | 1                       |
| gi 116695331 ref YP_840907.1 hypothetical protein H16_A2822   |            | 1  | 1                          | 1                       |
| gi 113868519 ref YP_727008.1 transketolase  |            | 1  | 1                          | 1                       |
| gi 116694112 ref YP_728323.1 signal peptidase I   |            | 1  | 0                          | 1                       |
| gi 116694195 ref YP_728406.1 organic hydroperoxide resistance protein   |            | 0  | 1                          | 0                       |
| gi 116695309 ref YP_840885.1 chemotaxis protein   |            | 1  | 1                          | 1                       |
| gi 113866417 ref YP_724906.1 Asc family transcriptional regulator   |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 113867002 ref YP_725491.1 ABC transporter ATPase   |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 113866772 ref YP_725261.1 hypothetical protein H16_A0980   |            | 1  | 0                          | 1                       |
| gi 38638086 ref NP_943060.1 NAD-dependent aldehyde dehydrogenase  |            | 1  | 1                          | 1                       |
| gi 116694543 ref YP_728754.1 CbxB   |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 113866189 ref YP_724678.1 hypothetical protein H16_B0592   |            | 1  | 1                          | 1                       |
| gi 113869044 ref YP_727533.1 hypothetical protein H16_A0158   |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 113866183 ref YP_724672.1 cobalamin adenosyltransferase  |            | 0  | 1                          | 0                       |
| gi 113866696 ref YP_725185.1 hypothetical protein H16_A0152   |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 113867238 ref YP_725727.1 protein tyrosine/serine phosphatase  |            | 1  | 1                          | 2                       |
| gi 113866487 ref YP_724976.1 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase  |            | 0  | 1                          | 0                       |
| gi 113866429 ref YP_724918.1 phosphatidylserine/phosphatidylglycerophosphate/cardioliplin synthase-like protein |            | 1  | 2                          | 0                       |
| gi 113866841 ref YP_725330.1 excinuclease ABC subunit A   |            | 2  | 0                          | 1                       |
| gi 116696441 ref YP_842017.1 electron transfer flavoprotein alpha subunit                                       |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 113867237 ref YP_725726.1 methyl-accepting chemotaxis protein  |            | 1  | 0                          | 1                       |
| gi 113869118 ref YP_727607.1 UDP-2,3-diacetylglucosamine hydrolase  |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 113869303 ref YP_727792.1 short chain dehydrogenase  |            | 0  | 0                          | 2                       |
| gi 113869036 ref YP_727525.1 cation/multidrug efflux system outer membrane porin                                |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 113867230 ref YP_725719.1 7-8-dihydro-6-hydroxymethylpterin-pyrophosphokinase                                |            | 1  | 0                          | 1                       |
| gi 113868587 ref YP_727076.1 DNA mismatch repair protein MutS   |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 116696033 ref YP_841609.1 ABC transporter periplasmic protein  |            | 2  | 0                          | 0                       |
| gi 116694084 ref YP_728295.1 major facilitator superfamily transporter AtoE family protein                      |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 116694773 ref YP_728984.1 elongation factor G  |            | 1  | 1                          | 0                       |
| gi 116694076 ref YP_728287.1 hypothetical protein H16_B0827   |            | 0  | 1                          | 0                       |

| Protein Nummer   | Annotation | WT | n Peptide<br>$\Delta pptA$ | $\Delta ppk-all$ |
|--|------------|----|----------------------------|------------------|
| gi 113867187 ref YP_725676.1 transcriptional regulator, ferric uptake                                    |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113869616 ref YP_728105.1 lysyl-tRNA synthetase   |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113868913 ref YP_727402.1 response regulator  |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 116694891 ref YP_729102.1 hypothetical protein H16_A2958  |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113867505 ref YP_725994.1 iron-dependent peroxidase   |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113867245 ref YP_725734.1 LysR family transcriptional regulator                                       |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 113866409 ref YP_724898.1 aspartate kinase  |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113868858 ref YP_727347.1 Lon protease domain-containing protein                                      |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113867006 ref YP_725495.1 ABC-type transporter, ATPase component                                      |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 116694674 ref YP_728885.1 pili assembly protein TadB  |            | 2  | 0                          | 0                |
| gi 113868498 ref YP_726987.1 major facilitator transporter   |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113868989 ref YP_727478.1 TonB-like protein, links inner and outer membranes                          |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 116694054 ref YP_728265.1 50S ribosomal protein L33   |            | 1  | 1                          | 1                |
| gi 113868953 ref YP_727442.1 GntR family transcriptional regulator                                       |            | 1  | 1                          | 0                |
| gi 113868583 ref YP_727072.1 hypothetical protein H16_A2998  |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 113866630 ref YP_725119.1 ABC transporter ATPase  |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 116695057 ref YP_840633.1 adenylate kinase  |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 113869091 ref YP_727580.1 sterase/ipase   |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 116695104 ref YP_840680.1 DNA polymerase III subunit delta  |            | 1  | 0                          | 1                |
| gi 38637891 ref NP_942865.1 transcriptional regulator  |            | 1  | 0                          | 1                |
| gi 113867110 ref YP_725599.1 hypothetical protein PHG227   |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113866908 ref YP_725397.1 glutathione S-transferase   |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113867880 ref YP_726369.1 transposase   |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 113868588 ref YP_727077.1 LysR family transcriptional regulator                                       |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 113866533 ref YP_725022.1 type II citrate synthase  |            | 1  | 0                          | 1                |
| gi 113868686 ref YP_727175.1 hypothetical protein H16_A0504  |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 113866211 ref YP_724700.1 SSU ribosomal protein S21   |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 116695126 ref YP_840702.1 adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate<br>transaminase                   |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113866192 ref YP_724681.1 FAD-dependent oxidoreductase  |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 116696433 ref YP_842009.1 Thiol:disulfide interchange protein Dsba                                    |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 113867631 ref YP_726120.1 LysR family transcriptional regulator                                       |            | 1  | 1                          | 0                |
| gi 116695446 ref YP_841022.1 DnaJ-class molecular chaperone  |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113866256 ref YP_724745.1 putative transcriptional regulator  |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 116694661 ref YP_728872.1 alpha-beta hydrolase family esterase  |            | 2  | 0                          | 1                |
| gi 113868852 ref YP_727341.1 plasmid stability protein StbC  |            | 0  | 2                          | 0                |
| gi 116696135 ref YP_841711.1 carbohydrate kinase   |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 113868999 ref YP_727488.1 lipopolysaccharide N-acetylglucosaminyl transferase<br>adenyllyltransferase |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 113867612 ref YP_726101.1 bifunctional riboflavin kinase/FMN<br>adenyllyltransferase                  |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113866213 ref YP_724702.1 hypothetical protein H16_A1601  |            | 2  | 0                          | 0                |
| gi 113868013 ref YP_726502.1 dethiobiotin synthetase   |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113869021 ref YP_727510.1 lipoiketide cyclase/lipid transport protein                                 |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113866910 ref YP_725399.1 hypothetical protein H16_A3067  |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 38637795 ref NP_942769.1 hypothetical protein H16_A0884   |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113867076 ref YP_725565.1 integrase/recombinase   |            | 1  | 0                          | 0                |

| Protein Nummer  | Annotation | WT | n Peptide<br>$\Delta ppta$ | $\Delta pph\text{-}all$ |
|---|------------|----|----------------------------|-------------------------|
| gi 116694222 ref YP_728433.1 NADH dehydrogenase subunit G   |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 113866556 ref YP_725045.1 flagellar basal body L-ring protein  |            | 0  | 1                          | 0                       |
| gi 113869358 ref YP_727847.1 phosphate starvation-inducible protein PhoH, ATPase  |            | 1  | 1                          | 0                       |
| gi 38638038 ref NP_943012.1 1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase |            | 1  | 1                          | 0                       |
| gi 113866998 ref YP_725487.1 hypothetical protein PHG377  |            | 1  | 1                          | 0                       |
| gi 113866910 ref YP_725399.1 hypothetical protein H16_A3067   |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 38637795 ref NP_942769.1 hypothetical protein H16_A0884 (+1)   |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 113867076 ref YP_725565.1 integrase/recombinase  |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 116694222 ref YP_728433.1 NADH dehydrogenase subunit G   |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 113866556 ref YP_725045.1 flagellar basal body L-ring protein  |            | 0  | 1                          | 0                       |
| gi 113869358 ref YP_727847.1 phosphate starvation-inducible protein PhoH, ATPase  |            | 1  | 1                          | 0                       |
| gi 38638038 ref NP_943012.1 1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase |            | 1  | 1                          | 0                       |
| gi 113866998 ref YP_725487.1 hypothetical protein PHG377  |            | 1  | 1                          | 0                       |
| gi 116696192 ref YP_841768.1 rsr family transcriptional regulator   |            | 1  | 0                          | 1                       |
| gi 113866356 ref YP_724845.1 H-NS-like DNA-binding protein  |            | 1  | 1                          | 0                       |
| gi 116696412 ref YP_841988.1 phosphoenolpyruvate-protein kinase (PTS system EI component)                                     |            | 1  | 0                          | 1                       |
| gi 113868014 ref YP_726503.1 outer membrane receptor, TonB dependent  |            | 1  | 0                          | 1                       |
| gi 116694510 ref YP_728721.1 sraA-binding protein   |            | 0  | 1                          | 0                       |
| gi 38637774 ref NP_942748.1 MarR family transcriptional regulator   |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 113867000 ref YP_725489.1 ATPase   |            | 0  | 0                          | 0                       |
| gi 116694535 ref YP_728746.1 hypothetical protein H16_A0978   |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 116695182 ref YP_840758.1 periplasmic protein  |            | 0  | 1                          | 0                       |
| gi 113868302 ref YP_726791.1 acid phosphatase   |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 116695616 ref YP_841192.1 glycerol-3-phosphate transporter ATP-binding subunit   |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 113869584 ref YP_728073.1 iron regulated protein   |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 116695741 ref YP_841317.1 RNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme GidA                                  |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 113866150 ref YP_724639.1 dehydrogenase  |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 113869540 ref YP_728029.1 site-specific tyrosine recombinase XerC  |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 113868928 ref YP_727417.1 neutral zinc metalloproteinase   |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 113869026 ref YP_727515.1 hypothetical protein H16_A2973   |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 113869382 ref YP_727871.1 GntR family transcriptional regulator  |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 116695156 ref YP_840732.1 hikimate kinase  |            | 0  | 1                          | 0                       |
| gi 38637886 ref NP_942860.1 2-keto-3-deoxygluconate kinase  |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 113869647 ref YP_728136.1 acyl-CoA dehydrogenase   |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 113868297 ref YP_726786.1 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase   |            | 0  | 1                          | 0                       |
| gi 113866363 ref YP_724852.1 ATPase   |            | 1  | 0                          | 0                       |
| gi 113869631 ref YP_728120.1 thodanese-related sulfoxidase  |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 116695980 ref YP_841556.1 hypothetical protein H16_A3696   |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 113866765 ref YP_725254.1 methyl-accepting chemotaxis transducer   |            | 0  | 0                          | 1                       |
| gi 113869076 ref YP_727565.1 Type IV pilus signal transduction protein PilH   |            | 0  | 0                          | 1                       |

| Protein Nummer   | Annotation | WT | n Peptide<br>$\Delta pptA$ | $\Delta ppk-all$ |
|--|------------|----|----------------------------|------------------|
| gi 113868392 ref YP_726881.1 hypothetical protein H16_A3122          |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 113869203 ref YP_727692.1 LysR family transcriptional regulator   |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 113866594 ref YP_725083.1 gamma-glutamyl kinase                   |            | 0  | 1                          | 0                |
| gi 113866708 ref YP_725197.1 phosphoglycerate kinase                 |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113866764 ref YP_725253.1 hypothetical protein H16_A0681          |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113866827 ref YP_725316.1 Type IV pilus response regulator PjH    |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113867078 ref YP_725567.1 tetrapeptide repeat protein             |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113867539 ref YP_726028.1 NADH dehydrogenase subunit I            |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 116696122 ref YP_841698.1 acetyl-CoA acetyltransferase            |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 162139478 ref YP_725825.2 response regulator                      |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113867344 ref YP_725833.1 chorismate synthase                     |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113866261 ref YP_724750.1 short chain dehydrogenase               |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 116694290 ref YP_728501.1  $\beta$ -adenosylmethionine synthetase |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113867603 ref YP_726092.1 LysR family transcriptional regulator   |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 116695870 ref YP_841446.1 hypothetical protein H16_A1592          |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 116694740 ref YP_728951.1 hypothetical protein H16_B1934          |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 116696122 ref YP_841698.1 acetyl-CoA acetyltransferase            |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 162139478 ref YP_725825.2 response regulator                      |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113867344 ref YP_725833.1 chorismate synthase                     |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113866261 ref YP_724750.1 short chain dehydrogenase               |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 116694290 ref YP_728501.1  $\beta$ -adenosylmethionine synthetase |            | 1  | 0                          | 0                |
| gi 113867603 ref YP_726092.1 LysR family transcriptional regulator   |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 116695870 ref YP_841446.1 hypothetical protein H16_A1592          |            | 0  | 0                          | 1                |
| gi 116694740 ref YP_728951.1 hypothetical protein H16_B1934          |            | 0  | 0                          | 1                |

## Danksagung

Hiermit danke ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Dieter Jendrossek für seine Unterstützung dieses Thema zu bearbeiten, für ausschweifende Diskussionen, intensive Beratung bei Problemen, dass er mir viel Freiheit bei der Wahl der Untersuchungsaspekte ließ und es mir ermöglichte, auch in mehrere andere Labore hineinzuschnuppern und an vielen Tagungen teilzunehmen.

Dem Zweitkorrektor Herrn Prof. Dr. Martin Siemann-Herzberg danke ich für die Mühe, diese Arbeit zu prüfen.

Bei Herrn Prof. Dr. Georg Sprenger bedanke ich mich, dass ich an seinem Institut forschen durfte und für die vielen Ratschläge, insbesondere eine unerschöpfliche Quelle der Literaturkenntnisse.

Ich danke allen Kollegen aus dem Institut für Mikrobiologie: Simone Reinhardt, die einem immer weiterhelfen konnte, Celina und Jennie für die enge Zusammenarbeit und die schönen Pausen, Erik für die Unterstützung im methodischen Bereich und viele gemeinsam gelaufene Kilometer, Chiara, die einem überall unter die Arme greift, Janina fürs Einarbeiten und allen für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Zusammenarbeit.

Besonders danke ich Lea Kneißle für ihren enormen Fleiß und die Gewissenhaftigkeit bei der Bachelorarbeit und als HiWi sowie die anhaltende Ausstrahlung guter Laune.

Ich danke dem GRK1708 Tübingen für die Finanzierung der Stelle und diverser Dienstreisen zu Kooperationspartnern und Tagungen, die vielen Seminare und Aktivitäten und den Mitgliedern des GRKs für die umfangreichen Diskussionen und Ratschläge.

Von der Brno University of Technology danke ich allen Mitarbeitern der AG Obruča, insbesondere Stanislav Obruča für die Betreuung während meines Arbeitsaufenthalts in Brno und Eva Slaninová, die nicht nur eine Kollegin sondern auch eine Freundin wurde. Auch vielen Dank an Ota Samek und besonders Martin Kizovský für die Unterstützung bei der Raman-Spektroskopie.

Ein Dankeschön geht an die Kooperationspartner Berit Würtz von der Uni Hohenheim und Dr. Marita Franz-Wachtel von der Uni Tübingen für die MS-Analysen, Dr. Meina Neumann-Schaal vom DSMZ für die Lipidanalyse sowie Prof. Dr. Lars Blank und Dr. Jonas Johannes Christ von der RWTH Aachen, bei denen ich den Kettenkonzentrationsassay ausprobieren durfte. Ich danke Dr. Sabine Willbold vom Forschungszentrum Jülich für die Messung von PolyP mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR und ihre freundliche Unterstützung bei allen anfallenden Fragen. In der AG Forchhammer der Uni Tübingen durfte ich meine SEC-MALS Experimente unter Anleitung von Jörg Scholl durchführen, vielen Dank dafür.

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie meinen Weg unterstützt hat und immer für mich da ist.

Und ich danke Stefan, der hinter mir steht, mich stützt, kritisiert und motiviert, immer weiter zu machen und besser zu werden.