

**Nachweis Archaea-typischer Lipide in Bacteria
über die Aufklärung der Funktion
von AraM und PcrB aus *Bacillus subtilis***



**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

vorgelegt von
Harald Guldan
aus Waldmünchen

Regensburg, 2010

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 07. September 2010

Kolloquium am: 17. November 2010

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Reinhard Sterner

Prüfungsausschuss:

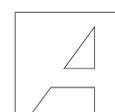
Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Wirth

1. Prüfer: Prof. Dr. Reinhard Sterner
2. Prüfer: Prof. Dr. Ludwig Lehle
3. Prüfer: PD Dr. Winfried Hausner

meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2007 bis September 2010 am Lehrstuhl Biochemie II des Institutes für Biophysik und physikalische Biochemie der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin der Universität Regensburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner angefertigt.

Die Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium der Konrad-Adenauer-Stiftung gefördert.



Konrad
Adenauer
Stiftung

Inhaltsverzeichnis

Abbildungen	V
Tabellen	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Vom Gen zur Funktion.....	3
1.2 Ein integrativer Ansatz zur Funktionsaufklärung.....	4
1.3 Lipidmetabolismus in Archaea und Bacteria	5
1.4 Auswahl von PcrB zur Funktionsaufklärung	7
1.5 Zielsetzung der Arbeit	10
2 Material.....	11
2.1 Chemikalien.....	11
2.2 Antikörper.....	11
2.3 Kits	11
2.4 Enzyme	12
2.4.1 Molekularbiologische Arbeiten	12
2.4.2 Hilfsenzyme zur Herstellung von Glycerin-Phosphat aus Glucose	12
2.5 Bakterienstämme	13
2.6 Genomische DNA	14
2.7 Plasmide	15
2.8 Oligodesoxyribonukleotide	16
2.9 Medien, Puffer und Lösungen	17
2.9.1 Molekularbiologische Arbeiten	18
2.9.2 Lösungen für <i>southern blot</i>	19
2.9.3 Mikrobiologische Arbeiten mit <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	19
2.9.4 Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	19
2.9.5 Induktion der natürlichen Kompetenz von <i>B. subtilis</i>	20
2.9.6 Elektroporationsmedium für <i>B. subtilis</i>	20
2.9.7 Lösungen für <i>one-site</i> ELISA gegen LTA	20
2.9.8 Arbeiten mit Proteinen	21
2.9.9 SDS-Polyacrylelektrophorese.....	21
2.9.10 Puffer für <i>western blot</i>	22

2.9.11	Laufmittel für PC und DC.....	22
2.9.12	Sprühreagenz zum Nachweis von Phosphorsäurederivaten für DC	23
2.10	Software	23
2.10.1	Lokale Anwendung	23
2.10.2	Servergestützte Anwendungen.....	24
3	Methoden.....	25
3.1	Mikrobiologische Methoden.....	25
3.1.1	Vorbereitung von Geräten und Lösungen.....	25
3.1.2	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	25
3.1.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	25
3.1.4	Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	26
3.1.5	Anzucht und Lagerung von <i>B. subtilis</i> Stämmen.....	26
3.1.6	Induktion der natürlichen Kompetenz von <i>B. subtilis</i>	27
3.1.7	Elektroporation von <i>B. subtilis</i>	28
3.1.8	Erstellung genomischer <i>knockout</i> -Mutanten in <i>B. subtilis</i>	29
3.1.9	<i>Southern blot</i> -Analyse.....	30
3.1.10	Zellaufschluss und -fraktionierung von gram-positiven Bakterien.....	31
3.1.11	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	32
3.1.12	Entsorgung von Mikroorganismen.....	33
3.2	Molekularbiologische Methoden	33
3.2.1	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>B. subtilis</i>	33
3.2.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	34
3.2.3	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR	34
3.2.4	<i>Overlap extension</i> -PCR.....	35
3.2.5	Kolonie-PCR von <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	35
3.2.6	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	36
3.2.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	36
3.2.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36
3.2.9	Spaltung von dsDNA durch Restriktionsendonukleasen	36
3.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten.....	37
3.2.11	Ligationsfreie Klonierung (<i>ligation independent cloning</i> ; LIC).....	37
3.2.12	DNA-Sequenzierung.....	39
3.3	Proteinchemische Methoden.....	39
3.3.1	Expression von Proteinen im analytischen Maßstab.....	39
3.3.2	Expression von Proteinen im präparativen Maßstab.....	40
3.3.3	Expression von Proteinen in <i>B. subtilis</i>	40

3.3.4	Metallchelataffinitätschromatographie.....	41
3.3.5	Dialyse von Proteinlösungen.....	42
3.3.6	Einkonzentrierung von Proteinlösungen.....	42
3.3.7	Lagerung von gereinigten Proteinen.....	42
3.4	Präparative Synthese von Substraten.....	42
3.4.1	Synthese von Glycerin-1-Phosphat aus Glucose.....	42
3.4.2	Präparative Papierchromatographie.....	43
3.4.3	Synthese längerer Polyprenyl-PP (C ₂₅ und C ₃₀).....	45
3.5	Analytische Methoden.....	45
3.5.1	Proteinanalytik.....	45
3.5.1.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
3.5.1.2	Färbung der SDS-Gele mit <i>Coomassie Brilliant Blue G250</i>	46
3.5.1.3	<i>Western blot</i>	46
3.5.1.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	47
3.5.1.5	Fluoreszenzspektroskopie und FRET.....	49
3.5.1.6	Analytische Größenausschlusschromatographie.....	50
3.5.1.7	Differentielle <i>Scanning</i> -Kalorimetrie.....	51
3.5.2	Substrat- bzw. Produktanalytik.....	51
3.5.2.1	Bestimmung der katalytischen Parameter von AraM.....	51
3.5.2.2	Quantifizierung von Lipoteichonsäuren.....	52
3.5.2.3	Qualitative Bestimmung der GGGPS Aktivität von PcrB.....	53
3.5.2.4	Test verschiedener Polyprenyl-PP als Substrat für PcrB.....	54
3.5.2.5	Extraktion von Lipiden.....	54
3.5.2.6	Festphasenextraktion.....	54
3.5.2.7	Dünnschichtchromatographie.....	55
3.5.2.8	HPLC-Analytik.....	56
3.5.2.9	Elektrospray-Massenspektrometrie.....	58
3.5.2.10	NMR-Spektroskopie.....	59
4	Ergebnisse und Diskussion.....	61
4.1	Aufklärung der Funktion von AraM aus <i>Bacillus subtilis</i> als erste bakterielle G1PDH.....	61
4.1.1	Katalytische Parameter.....	62
4.1.2	Katalytische Kofaktoren.....	63
4.1.3	Quantifizierung der NADH-Bindung an AraM.....	64
4.1.4	Genomischer <i>knockout</i> von <i>araM</i>	66

4.1.5	Ausschluss der Beteiligung von AraM an der Synthese der Lipoteichonsäuren	68
4.1.6	Zusammenfassung	68
4.2	Aufklärung der Funktion von PcrB	69
4.2.1	Genetischer Kontext und Phylogenie	69
4.2.2	Sequenzanalyse und G1P-Bindestelle	72
4.2.3	Polyprenyl-PP-Bindestelle und Begrenzung der Substratlänge	74
4.2.4	Hypothese zur Funktion von PcrB	75
4.3	Biochemische und biophysikalische Charakterisierung von PcrB	76
4.3.1	Klonierung, Expression und Reinigung von PcrB- und GGGPS-Proteinen	76
4.3.2	Thermische Stabilität	77
4.3.3	Oligomerisierungszustand	78
4.3.4	Strategie zur Produktidentifizierung über radioaktiv markiertes G1P	81
4.3.5	Nachweis der stereospezifischen GGGPS-Aktivität <i>in vitro</i>	83
4.3.6	Substratkettengängenbegrenzung bei PcrB und GGGPS	84
4.4	Reinigung und Identifizierung des <i>in vivo</i> -Produkts von PcrB	86
4.4.1	<i>In vivo</i> -Markierungsexperimente mit ¹⁴ C-G1P	86
4.4.2	Überexpression und Komplementation in <i>B. subtilis</i>	89
4.4.3	HPLC-Analyse der radioaktiv markierten Produkte	92
4.4.4	Massenspektrometrische Analyse	98
4.4.5	NMR-spektroskopische Analyse	100
4.4.6	Nachweis der Acetylierung von Heptaprenylglycerin	102
4.4.7	Dephosphorylierung und Acetylierung <i>in vivo</i>	104
4.5	Moleküldynamische Berechnungen zur Substratspezifität von PcrB	108
5	Abschließende Diskussion	111
5.1	Vorkommen und Evolution von Etherlipiden	111
5.2	Ein neuer Syntheseweg in <i>B. subtilis</i>	113
5.3	Mögliche Funktionen von HepGP in <i>B. subtilis</i>	114
5.4	Ausblick	117
6	Literaturverzeichnis	119
7	Anhang	127
7.1	Polyprenylpyrophosphate in der Natur	127
7.2	Präparative Papierchromatographie	128
7.3	Kalibrierungsgerade der Superdex-75 (16/60) Säule	129
7.4	Massenspektren von X ₁ und X ₃	131

7.5	Hochaufgelöste Massenspektren von X ₁ und X ₂	133
7.6	NMR Spektren von X ₂	135
	Danksagung	137
	Teilpublikation.....	139
	Tagungsbeiträge.....	139

Abbildungen

Abbildung 1:	Schematischer Vergleich der Synthese der archaeellen und bakteriellen Phospholipide	6
Abbildung 2:	Struktur von PcrB (1VIZ).	8
Abbildung 3:	Der stereospezifische Schritt der archaeellen Zellmembransynthese.	9
Abbildung 5:	Vektorkarte von pMUTIN4_Δ <i>araM</i>	30
Abbildung 6:	Schematischer Aufbau des <i>southern blot</i>	31
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des LIC Systems	38
Abbildung 8:	Anordnung der Komponenten in der <i>semi-dry western blot</i> Apparatur.	47
Abbildung 9:	Schematischer Aufbau des verwendeten Hochdruckchromatographiesystems LC 1200 (Agilent).	57
Abbildung 10:	Schematische Darstellung der von AraM katalysierten Reaktion.	62
Abbildung 11:	Metallabhängige Reaktivierung von AraM nach Inaktivierung mit EDTA.	64
Abbildung 12:	Spektroskopische Charakterisierung der NADH-Bindung an AraM.	65
Abbildung 13:	Homologe Rekombination von pMUTIN4 in das Zielgen <i>araM</i>	66
Abbildung 14:	Verifizierung der Deletion von <i>araM</i>	67
Abbildung 15:	Genomische Organisation des PcrB kodierenden Operons.	69
Abbildung 16:	Phylogenetischer Baum, basierend auf einem Alignment von PcrB und ähnlichen Sequenzen	70
Abbildung 17:	Multiples Sequenzalignment verschiedener PcrB-Proteine aus Bacteria und ihrer homologen GGGPS aus Archaea.	73
Abbildung 18:	G1P-bindende Reste.	73
Abbildung 19:	Superpositionierung der Kristallstrukturen	74
Abbildung 20:	Absorptionsspektrum von PcrB.....	76
Abbildung 21:	DSC-Analyse von PcrB.....	77
Abbildung 22:	Analytische Größenausschlusschromatographie.	78
Abbildung 23:	Mögliche Dimer-Konfigurationen von PcrB und afGGGPS.....	80
Abbildung 24:	Syntheseweg von Glucose zu Glycerin-1-Phosphat	82
Abbildung 25:	Nachweis der GGGPS-Aktivität von PcrB <i>in vitro</i>	84

Abbildung 26: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der dephosphorylierten Produkte.....	85
Abbildung 27: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der <i>in vivo</i> ¹⁴ C-markierten Produkte auf Kieselgel 60-Platten.....	87
Abbildung 28: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von X ₂ im Vergleich zu synthetischen Polyprenylglycerin-Derivaten.....	89
Abbildung 29: <i>Western blot</i> zum Nachweis der Herstellung.....	90
Abbildung 30: Dünnschichtchromatographische Auftrennung gleicher Extraktmengen aus <i>in vivo</i> ¹⁴ C-markierten Zellen.....	91
Abbildung 31: Dünnschichtchromatographische Analyse der Effizienz der Festphasenextraktion.....	93
Abbildung 32: Auftrennung des hydrophoben ¹⁴ C-markierten Extraktes von <i>B. subtilis</i>	94
Abbildung 33: Überlagerung der säulenchromatographischen Auftrennung von ¹⁴ C-markiertem und unmarkiertem Extrakt von <i>B. subtilis</i> Δ <i>pcrB</i> + PcrB.....	95
Abbildung 34: Überlagerung der säulenchromatographischen Auftrennung von Gesamtextrakt und Membranfraktion.....	96
Abbildung 35: Überlagerung der säulenchromatographischen Auftrennung von Extrakten aus <i>B. subtilis</i> Wildtyp und des Stamms Δ <i>pcrB</i> + <i>pcrB</i>	97
Abbildung 36: Massenspektrometrische Analyse des <i>in vivo</i> Produktes X ₂ im Positiv-Ionenmodus.....	99
Abbildung 37: ¹ H-NMR-Spektrum des <i>in vivo</i> Produktes X ₂	101
Abbildung 38: Aus dem ¹ H NMR-Spektrum abgeleitete Strukturformel von X ₂	101
Abbildung 39: Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung von ¹⁴ C-G1P markiertem Extrakt von <i>B. subtilis</i> Δ <i>pcrB</i> + PcrB Zellen.....	103
Abbildung 40: Struktur der <i>in vivo</i> Produkte X ₁ , X ₂ und X ₃ von PcrB.....	104
Abbildung 41: Dünnschichtchromatographische Auftrennung Lipidextrakte einer <i>B. subtilis</i> Kultur nach sequenzieller Zugabe von ¹⁴ C-GGGP.....	106
Abbildung 42: Flüssigchromatographische Auftrennung des Extraktes nach mechanischer Lyse.....	107
Abbildung 43: Modell von PcrB mit gebundenem C ₃₅ -HepPP nach Energieminimierung.....	109
Abbildung 44: Gewinn an Energie bei Bindung von verschieden langen Polyprenyl-PP an PcrB.....	110
Abbildung 45: Synthese und Prozessierung von Heptaprenylglycerin in <i>B. subtilis</i> unter Beteiligung von AraM und PcrB.....	113
Abbildung 46: Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von <i>B. subtilis</i>	116
Abbildung 47: Synthese von linearen Polyprenyl-PP über Polyoprenyl-PP-Synthasen und die Verwendung ihrer Produkte in der Natur.....	127
Abbildung 48: Aufbau der Papierchromatographie.....	128

Abbildung 49: Präparative Paperchromatographie.....	129
Abbildung 50: Kalibrierungsgerade der Superdex-75 (16/60) Säule.	130
Abbildung 51: Fraktionierte Auftrennung von <i>B. subtilis</i> Lipidextrakt.	131
Abbildung 52: Massenspektrometrische Analyse von X ₁ und X ₃ im Positiv-Ionenmodus.	133
Abbildung 53: Hochauflösende massenspektrometrische Analyse von X ₂ und X ₁ im Positiv-Ionenmodus.	134
Abbildung 54: NMR Spektren von X ₂ – HepG.	136

Tabellen

Tabelle 1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.....	13
Tabelle 2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten genomischen DNA	14
Tabelle 3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide	15
Tabelle 4: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxyribonucleotide	16
Tabelle 5: Konzentration der Enzyme bei der Synthese von G1P	43
Tabelle 6: Substratkonzentrationen und Pufferbedingungen bei der Synthese von G1P	43
Tabelle 7: Reaktionsansatz zur Darstellung längerer Polyprenyl-PP.....	45
Tabelle 8: Molekulargewicht, molarer (ϵ_{280}) und spezifischer ($^{0,1\%}A_{280}$) Extinktionskoeffizient der bearbeiteten Proteine	48
Tabelle 9: Reaktionsansatz für den Test auf GGGPS-Aktivität.....	53
Tabelle 10: <i>Steady state</i> -kinetische Konstanten der G1PDH-Aktivität von AraM.....	62
Tabelle 11: Abhängigkeit der G1PDH-Aktivität von AraM vom supplementierten zweiwertigen Metallion im Wachstumsmedium	63
Tabelle 12: Retentionsvolumina bei der Größenausschlusschromatographie.....	79
Tabelle 13: Lokalisation des <i>in vivo</i> -Produktes X ₂ in <i>B. subtilis</i>	97
Tabelle 14: Auftreten der nötigen Enzyme zur Synthese von HepPG in verschiedenen Organismen.	114
Tabelle 15: Proteine für Kalibrierung der Superdex S 75 (16/60) Gelfiltrationssäule und Dokumentation der Retentionsvolumina der untersuchten Proteine.	130

Abkürzungsverzeichnis

$^{0,1\%}A_x$	spezifischer Extinktionskoeffizient bei x nm
afGGGPS	GGGPS aus <i>Archaeoglobus fulgidus</i>
Amp	Ampicillin
baPcrB	PcrB aus <i>Bacillus anthracis</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albuminum</i> ; Rinderserumalbumin
bsPcrB	PcrB aus <i>Bacillus subtilis</i>
c	Konzentration
CD	Circulardichroismus
COG	<i>database of clusters of orthologous groups of proteins</i>
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
cps	<i>counts per second</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
C _x G	Polyprenylglycerin der Länge x Kohlenstoffatome
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DiGGGP	Di-Geranylgeranylgeranyl-Phosphat
DGlcDAG	di-Glucosyl-di-Acetyl-Glycerol
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisierung
ϵ_x	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
G1P	Glycerin-1-Phosphat
G1PDH	Glycerin-1-Phosphat-Dehydrogenase
G3P	Glycerin-3-Phosphat
GGG	Geranylgeranylgerin
GGGPS	Geranylgeranylgerin-Phosphat-Synthase
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
gkPcrB	PcrB aus <i>Geobacillus kaustophilus</i>
HepGP	Heptaprenylglycerin-Phosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HepPP	Heptaprenylpyrophosphat
His ₆ -tag	Anhang von sechs Histidinen an ein Protein
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
k _{cat}	Wechselzahl
k _{cat} /K _M	katalytischer Effizienzparameter
kDa	Kilodalton
K _M	Michaelis-Konstante
KP	Kaliumphosphat-Puffer
LB	Luria-Bertani
ImPcrB	PcrB aus <i>Listeria monocytogenes</i>
MS	Massenspektrometrie
mtGGGPS	GGGPS aus <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
M _R	relative molare Masse eines Proteins
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OD _x	optische Dichte bei x nm
P	Pellet, unlösliche Fraktion des Zellextraktes
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PC	Papierchromatographie
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PP	Pyrophosphat
ppm	<i>parts per million</i>
pkGGGPS	GGGPS aus <i>Pyrococcus kodakarensis</i>
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woeseii</i>
racGP	racemisches Glycerinphosphat
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
saPcrB	PcrB aus <i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
SV	Säulenvolumen
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin

T_M	Schmelztemperatur des Oligonukleotids
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
üN	über Nacht
v_i	Anfangsgeschwindigkeit
V_{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

Zusammenfassung

Der Entwicklungsstand der Sequenzieretechnik erlaubt mittlerweile die Entzifferung eines bakteriellen Genomes innerhalb weniger Tage. Eine der wichtigsten Herausforderung der nun angebrochenen post-genomischen Ära ist es, den Produkten der identifizierten Gene Funktionen zuzuordnen.

In dieser Arbeit wurde zur Aufklärung der Funktion von Enzymen ein integrativer Ansatz verfolgt. Dabei wurden Methoden der Bioinformatik, Genetik und Mikrobiologie mit den analytischen Techniken der physikalischen Biochemie kombiniert. Als Kandidat zur Funktionsaufklärung wurde das $(\beta\alpha)_8$ -Fass-Protein PcrB aus *B. subtilis* gewählt. PcrB hat hohe Ähnlichkeit zu einem Schlüsselenzym der archaellen Membranlipidsynthese, der Geranylgeranylgeralin-Phosphat-Synthase (GGGPS), die die stereospezifische Kondensation von Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und Glycerin-1-Phosphat (G1P) katalysiert.

Ausgangspunkt für die Aufklärung der Funktion von PcrB bildete der Vergleich der Kristallstrukturen von PcrB und der GGGPS aus *Archaeoglobus fulgidus* (afGGGPS), aus dem G1P als ein Substrat auch von PcrB abgeleitet werden konnte. Mit AraM als Glycerin-1-Phosphat-Dehydrogenase konnte das G1P produzierende Enzym in *B. subtilis* identifiziert werden.

Über radioaktiver Markierung des Substrates G1P konnte die Aktivität von PcrB in *in vitro* und *in vivo* Experimenten untersucht werden.

Zur Präparation wurde ^{14}C -Glucose über die Enzyme des ersten Teils der Glycolyse und AraM stereospezifisch zu ^{14}C -G1P umgesetzt. Damit konnte die GGGPS-Aktivität von PcrB G1P-abhängig nachgewiesen werden. Zudem wurden längere Polyprenylpyrophosphate (C_{25} - C_{30}) als das bereits getestete C_{20} -GGPP enzymatisch synthetisiert, die PcrB auch umsetzen konnte.

Die postulierte Bedeutung eines Aminosäurerestes in afGGGPS bei der Begrenzung der Substratlänge konnte experimentell bestätigt werden.

Über Inkorporationsversuche mit ^{14}C -G1P eines genomischen *knockout* Stamms ΔpcrB im Vergleich mit *B. subtilis* Wildtyp konnten drei mögliche hydrophobe Produkte von

PcrB identifiziert werden. Zur Steigerung der Signalstärke wurde *pcrB* in *B. subtilis* rekombinant exprimiert, die drei Produkte nichtradioaktiv präpariert und über Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie identifiziert.

C₃₅-Heptaprenylglycerinphosphat wurde als das Reaktionsprodukt von PcrB bestimmt. In der Zelle liegt dieses dephosphoryliert und zum Teil einfach bzw. doppelt acetyliert vor. Über Zellfraktionierung wurde deren Lokalisation in der Zellmembran von *B. subtilis* nachgewiesen.

Damit konnte zum ersten Mal Polyprenyl-Glycerin-1-Phosphat-Ether außerhalb der Domäne der Archaea nachgewiesen. Gestützt auf Sequenzvergleiche und *in vitro* Versuche ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse auch auf die PcrB Enzyme anderer gram-positiver Bacillales zu übertragen sind. Eine mögliche Funktion der gefunden Heptaprenylglycerinderivate könnte in der Regulation der Membranrigidität oder der Adhäsion der Organismen an Oberflächen liegen. Diese Hypothesen sollen nun in Zusammenarbeit mit mikrobiologisch orientierten Arbeitsgruppen überprüft werden.

1 Einleitung

1.1 Vom Gen zur Funktion

Der enorme Fortschritt in der Sequenzieretechnik seit der Entwicklung der Polymerasekettenreaktion durch Kary B. Mullis (Saiki *et al.*, 1985) erlaubt mittlerweile die Entzifferung eines bakteriellen Genoms innerhalb weniger Tage. Eine der wichtigsten Herausforderung der nun angebrochenen post-genomischen Ära ist es, den Produkten der identifizierten Gene Funktionen zuzuordnen. Dies gelingt teilweise über den Vergleich ihrer Sequenzen mit bereits bekannten Genen bzw. Proteinen (Furnham *et al.*, 2009). Allerdings besitzt rund die Hälfte aller mikrobiellen Genprodukte keine erkennbare Ähnlichkeit zu bereits charakterisierten Proteinen, während andererseits 30 bis 40% aller beschriebenen enzymatischen Aktivitäten noch keiner spezifischen Proteinsequenz zugeordnet werden können (Chen & Vitkup, 2007). Über verschiedene Ansätze wird nun versucht, die weißen Flecken auf den genetischen Landkarten zu füllen. So werden z.B. über die systematische Herstellung von genomischen *knockouts* eines jeden Gens eines Organismus dessen essentielle Gene identifiziert bzw. dem *knockout* eines nicht essentiellen Gens ein Phänotyp zugeordnet, welcher der Ausgangspunkt zur Aufklärung der Funktion sein kann.

Auf der Ebene des Metaboloms von Zellen erlauben die neuesten Entwicklungen in der Flüssigkeitschromatographie, der hochauflösenden Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie die Analyse von komplexen Molekülgemischen innerhalb von wenigen Minuten (*metabolic profiling*, Beckonert *et al.*, 2007). Diese Fortschritte werden genutzt, um Veränderungen, die z.B. durch Zugabe eines Proteins zum Zellextrakt oder durch den *knockout* eines Gens verursacht werden, zu detektieren. So konnte über Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie die katalytische Aktivität des Proteins YihU aus *E. coli* nach dessen Zugabe zu einem Zellextrakt als Hydroxybutyrat-Dehydrogenase bestimmt werden (Saito *et al.*, 2009). Ein weiteres Beispiel ist die Entdeckung einer 2-Hydroxy-3-oxoadipat-Synthase in *Mycobacterium bovis* (de Carvalho *et al.*, 2010) über eine Kombination von Massenspektrometrie und NMR im Rahmen von *activity based metabolic profiling*.

Dennoch ist die Aufklärung von neuen Enzymfunktionen aufgrund der Vielfalt an Metaboliten, die auch schon in relativ einfachen Bakterienzellen auftreten, eine anspruchsvolle Aufgabe mit oft unvorhersehbarem Ausgang. Die Erfolgsaussichten können erhöht werden, indem man Gruppen von Proteinfamilien fokussiert, die Struktur- und Sequenzähnlichkeiten aufweisen und daher vermutlich evolutionär miteinander verwandt sind. Bei einigen dieser sogenannten Protein-Superfamilien, die mechanistisch ähnliche Reaktionen katalysieren, ist die Identifizierung des Substrates gleichbedeutend mit der Identifizierung der Funktion (Allen, 2007), da die Proteine meist die gleiche Reaktion mit strukturell ähnlichen Substraten katalysieren. Auf diese Weise konnten beispielsweise vorher uncharakterisierten Mitgliedern der Enolase- und Amidohydrolase-Superfamilien Funktionen in bis dahin unbekanntem Stoffwechselwegen zugeordnet werden (Hermann *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2007). Diese Studien basierten auf *in silico-docking*-Experimenten von putativen Substraten oder Reaktionsintermediaten in Röntgenkristallstrukturen oder Homologiemodellen der untersuchten Enzyme. Durch diese Vorgehensweise konnten die Autoren aus tausenden potenzieller Substrate die besten Kandidaten eingrenzen und experimentell testen, was schließlich zum Erfolg führte. Bei diesem Ansatz muss jedoch bereits sehr viel über das Zielprotein bekannt sein, um die Menge an putativen Substraten auf eine selbst durch Computer und moderne *screening*-Techniken verarbeitbare Anzahl zu reduzieren. Neue Reaktionen, die von bislang noch unbekanntem Enzymen katalysiert werden, entziehen sich jedoch diesem Ansatz.

1.2 Ein integrativer Ansatz zur Funktionsaufklärung

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verfolgten Ansatz zur funktionellen Charakterisierung von Enzymen werden Methoden der Bioinformatik, Genetik und Mikrobiologie mit den analytischen Techniken der physikalischen Biochemie kombiniert. Die Auswahl von Proteinen unbekannter Funktion wurde auf Kandidaten mit Ähnlichkeit zu in der Arbeitsgruppe Sterner seit längerem bearbeiteten Enzymen eingeschränkt, welche die weit verbreiteten $(\beta\alpha)_8$ -Fass-Faltung aufweisen und/oder Reaktionen innerhalb der Tryptophan- und Histidin-Biosynthese katalysieren. Die $(\beta\alpha)_8$ -Fass-Proteine bestehen aus einem Kern mit acht β -Strängen, dem β -Fass, welches von acht α -Helices umgeben ist. Sie sind ein eindrucksvolles Beispiel dafür, wie viele

unterschiedliche Funktionen im Verlauf der Evolution auf dem selben Strukturgerüst etabliert werden können (Wierenga, 2001).

Das $(\beta\alpha)_8$ -Fass PcrB aus dem gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* mit noch unbekannter Funktion wurde als interessantes Untersuchungsobjekt ausgewählt. PcrB hat auf Sequenz- und Strukturebene große Ähnlichkeit zu den Geranylgeranyl-glycerin-Phosphat-Synthasen (GGGPS), die in den Archaea einen wichtigen Schritt in der Lipidbiosynthese katalysieren (Abbildung 1).

1.3 Lipidmetabolismus in Archaea und Bacteria

Als ein fundamentaler Unterschied zwischen Archaea einerseits und Bacteria und Eucarya andererseits wird die Zusammensetzung der jeweiligen Zellmembran gesehen (Boucher *et al.*, 2004; Koga & Morii, 2007; Payandeh & Pai, 2007; Pereto *et al.*, 2004; Weijers *et al.*, 2006; Woese *et al.*, 1990; Zhang & Poulter, 1993c). Die Lipide, die das Rückgrat der Membran bilden, bestehen in den Archaea aus Glycerin-1-Phosphat (G1P), das über eine Etherbindung taxonabhängig an ein C₂₀- oder C₂₅-Polyprenyl gebunden ist. Bei den Bacteria und Eucarya hingegen ist Glycerin-3-Phosphat mit Fettsäuren verestert (Abbildung 1). Dennoch wurden kleine Mengen an Etherlipiden in einigen Bacteria (Jahnke *et al.*, 2001) und Eucarya (Nelson *et al.*, 1999) gefunden, genauso wie Fettsäuren in den Seitenketten einiger archaeeller Lipide identifiziert wurden (Gattinger *et al.*, 2002). Modifikationen der Phospholipide mit verschiedenen Strukturen wie Serin, Ethanolamin, Inositol und Glycerol finden sich in allen drei Domänen des Lebens.

Die Nutzung von G1P als hydrophiler Anteil der Phospholipide wird hingegen bisher als ein typisches Merkmal der Archaea betrachtet. G1P ist das Enantiomer von Glycerin-3-Phosphat (G3P) und wurde zuerst *in vivo* über radioaktive Inkorporationsversuche (Kates *et al.*, 1970) gefunden. Zhang und Poulter wiesen die Stereoselektivität des verknüpfenden Enzyms GGGPS (Abbildung 1) nach, indem sie ¹⁴C-G3P und ³H-G1P um die Reaktion mit dem C₂₀-Polyprenyl-PP Geranylgeranyl-PP (GGPP) konkurrieren ließen. Anschließend konnten sie das ¹⁴C/³H Verhältnis im Produkt mit 0,02 bestimmen (Zhang & Poulter, 1993c). In den folgenden Jahren wurde die Meinung vertreten, G1P würde in den Archaea über eine Folge von Oxidation, Isomerisierung und Phosphorylierung aus Glycerin entstehen.

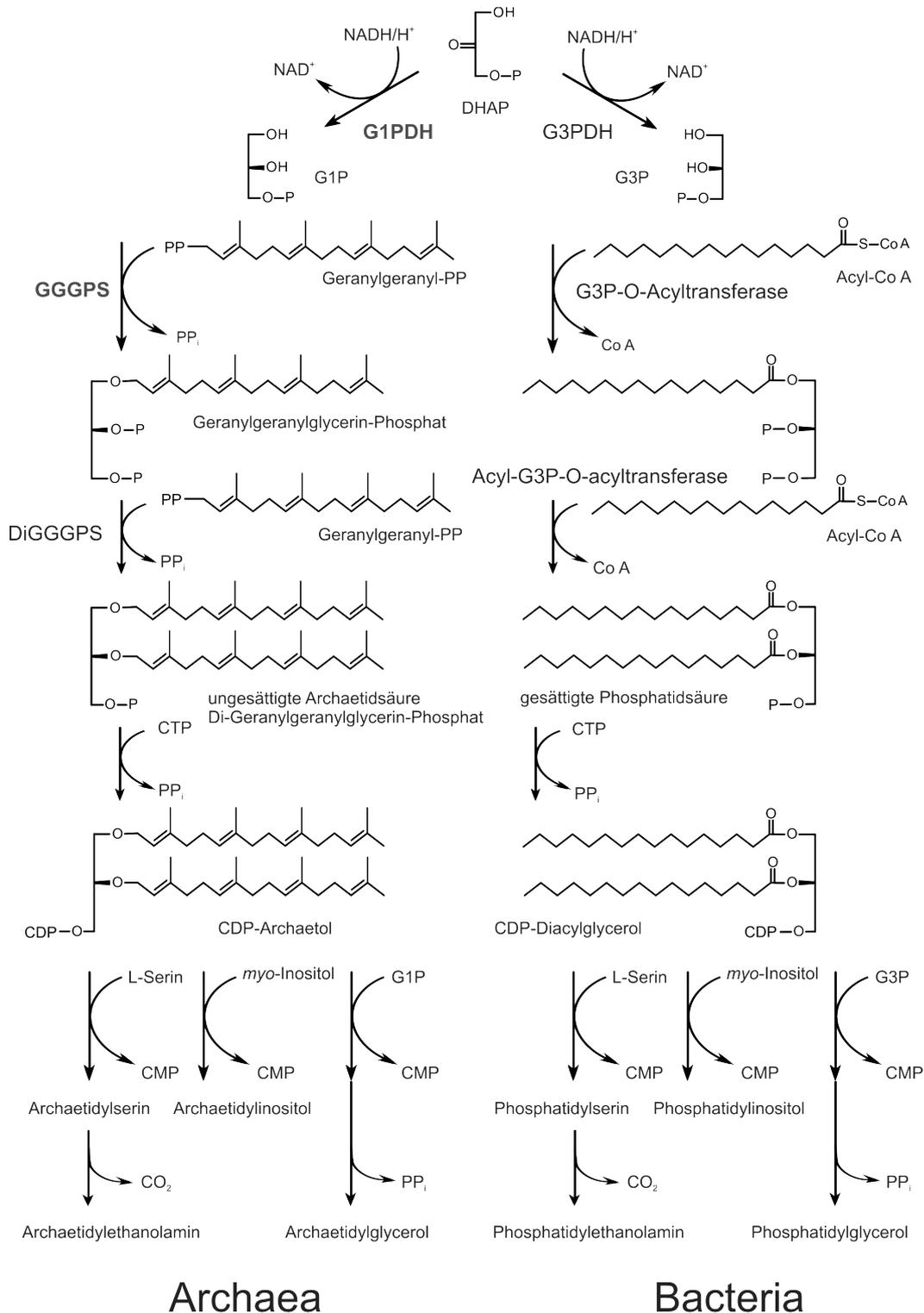


Abbildung 1: Schematischer Vergleich der Synthese der archaeellen und bakteriellen Phospholipide (verändert nach Koga & Morii, 2007). G1PDH, G3PDH, Glycerin-1 bzw. 3-Phosphat-Dehydrogenase; GGGPS, Geranylgeranyl-glycerin-Phosphat-Synthase; DiGGGPS, Di-Geranylgeranyl-glycerin-Phosphat-Synthase. P und PP bezeichnen Phosphat bzw. Pyrophosphat.

Diese Theorie musste fallen gelassen werden, als Nishihara und Koga (1995) in *Methanothermobacter thermoautotrophicum* eine Glycerin-1-Phosphat-Dehydrogenase (G1PDH) entdeckten. Dieses Enzym reduziert NADH-abhängig Dihydroxyacetonphosphat stereospezifisch zu G1P (Abbildung 1). Die Aktivität konnte danach auch in verschiedenen anderen Archaea nachgewiesen (Nishihara *et al.*, 1999) und das entsprechende Gen *egsA* in allen bislang sequenzierten archaeellen Genomen identifiziert werden (Boucher *et al.*, 2004). Das Auftreten von G1PDH zusammen mit der GGGPS in einer Subpopulation des *last universal common ancestors* (LUCA) wird heute als Ursprung der Aufspaltung in Archaea und Bacteria gesehen (Payandeh & Pai, 2007, Glansdorff *et al.*, 2008, Pereto *et al.*, 2004; Wächtershäuser, 2003). Es wird postuliert, dass mit der Entwicklung der G1PDH und GGGPS eine strukturell unterschiedliche Zellmembran entstand, wodurch weiterer genetischer Austausch unterbunden wurde, so dass sich die Archaea entwickeln konnten.

In den Bacteria ist G1P bislang nur als integraler Bestandteil der Lipoteichonsäuren bekannt (Armstrong *et al.*, 1959, Fischer, 1994), deren Funktion für ein normales Wachstum der meisten gram-positiven Bakterien unentbehrlich ist (Gründling & Schneewind, 2007). Das G1P entsteht allerdings erst bei der Synthese der LTA aus Phosphatidylglycerol (1,2-Diacylglycerol-3-Phosphat), wobei es bei der Polymerisierung zur Änderung der Stereochemie kommt (Fischer, 1994). Freies G1P tritt dabei nicht auf.

1.4 Auswahl von PcrB zur Funktionsaufklärung

Eine bioinformatische Analyse zeigte, dass die archaeellen GGGPS und PcrB aus *B. subtilis* eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen. Entsprechend wurden sie in den gleichen *Cluster of Orthologous Groups of Proteins* (COG) 1646 eingeordnet (Tatusov *et al.*, 2000). Die apo-Kristallstruktur von PcrB (1VIZ; Badger *et al.*, 2005) und die Struktur der GGGPS aus *Archaeoglobus fulgidus* (afGGGPS; 2F6U, 2F6X; Payandeh *et al.*, 2006) mit gebundenem G1P sind bekannt. Der Vergleich der Strukturen bildete die Basis für die Funktionsaufklärung. Beide sind homodimere $(\beta\alpha)_8$ -Fass-Proteine, wobei es durch Einfügungen und Deletionen zu Abweichungen von der kanonischen Faltung kommt (Abbildung 2).

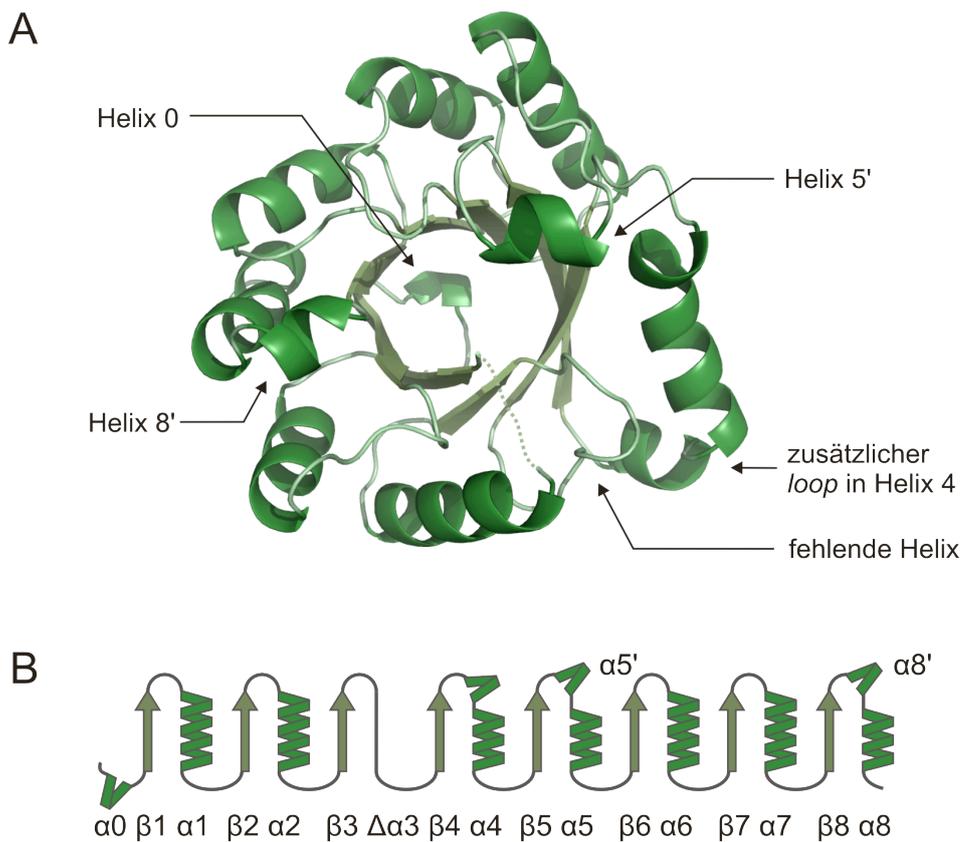


Abbildung 2: Struktur von PcrB (1VIZ). Bänderdiagramm (Aufsicht auf die C-terminalen Enden der zentralen β -Stränge, die den „Katalysepol“ bilden). Abweichungen von der kanonischen $(\beta\alpha)_8$ -Fass-Faltung sind gekennzeichnet (vgl. Text). Die in der Struktur nicht aufgelösten vier Aminosäuren sind gestrichelt dargestellt. **(B)** Topologische Darstellung der Sekundärstrukturelemente.

So ist vor dem β -Strang 1 eine Helix 0 eingeführt. Helix 4 ist durch einen *loop* in die zwei Helices 4a und 4b unterteilt. Vor die Helix 5 ist die kleine Helix 5' eingefügt, vor die Helix 8 die kleine Helix 8'. Die Helix 3 hingegen fehlt. Die Reste Serin 40, Asparagin 41, Glycin 42 und Valin 43 sind in der Struktur von PcrB (1VIZ) nicht aufgelöst.

Die GGGPS katalysiert in *A. fulgidus* wie in allen Archaea die stereospezifische Kondensation von G1P mit Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) unter Abspaltung des Pyrophosphat (Abbildung 3).

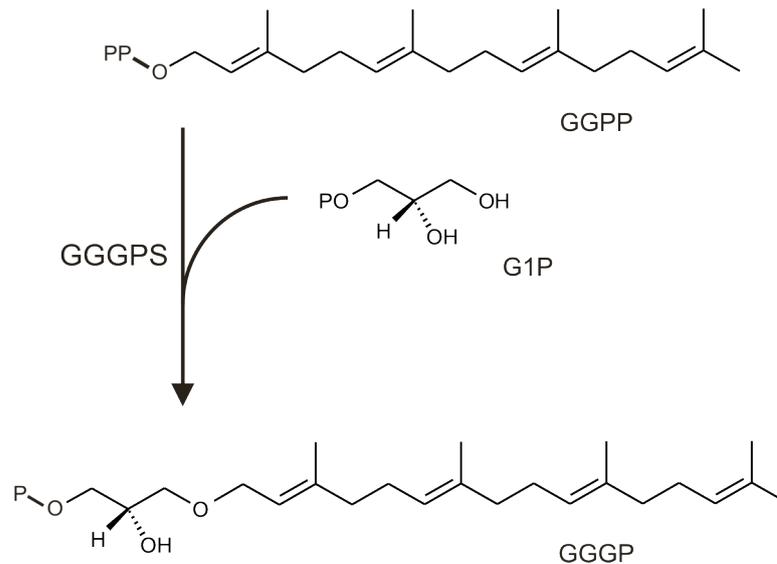


Abbildung 3: Der stereospezifische Schritt der archaeellen Zellmembransynthese. Die GGGPS katalysiert die Kondensation von Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und Glycerin-1-Phosphat (G1P) zu Geranylgeranyl-glycerolphosphat (GGGP). P und PP bezeichnen Phosphat bzw. Pyrophosphat.

Das Produkt Geranylgeranyl-glycerin-Phosphat (GGGP) ist ein Intermediat im Aufbau der archaeaspezifischen Zellmembran-Lipide (Abbildung 1). In der Literatur sind neben der afGGGPS zudem die Charakterisierung der GGGPS aus *Thermoplasma acidophilum* (Nemoto *et al.*, 2003) und aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Chen *et al.*, 1993, Soderberg *et al.*, 2001) im Detail beschrieben. Im Vergleich zur dimeren GGGPS aus *A. fulgidus* fällt auf, dass das letztgenannte Protein als Homopentamer beschrieben ist.

Mit der Identifizierung und Charakterisierung von AraM als erster bakterieller G1PDH konnte ich im Rahmen meiner Diplomarbeit die Existenz von freiem G1P in *B. subtilis* nachweisen (Guldan *et al.*, 2008), welches somit als Substrat für PcrB zur Verfügung stehen könnte. Es erschien jedoch unwahrscheinlich, dass GGPP wie bei den GGGPS das zweite Substrat von PcrB ist, da das Reaktionsprodukt GGGP im Bakterium *B. subtilis* anders als bei den Archaea keine offensichtliche physiologische Bedeutung hat.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Entdeckung von AraM aus *B. subtilis* als G1PDH und damit der erstmalige Nachweis von G1P in einem Bakterium bildete den Ausgangspunkt für die Aufklärung der Funktion von PcrB als vermutetes Folgeenzym in einem zu postulierenden Syntheseweg.

Dazu sollten zunächst die Gemeinsamkeiten und die Unterschiede zwischen PcrB und den GGGPS in detaillierter Analyse beider Kristallstrukturen erarbeitet werden. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen sollte eine Hypothese zum zweiten Substrat neben G1P von PcrB formuliert und *in vitro* getestet werden. Des Weiteren sollte ein Protokoll zur enzymatischen Synthese von radioaktiv markiertem G1P entwickelt werden, um darüber das *in vivo*-Produkt von PcrB zu markieren und es nach Etablierung geeigneter Analyse- und Präparationsverfahren isolieren und identifizieren zu können.

2 Material

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien besaßen den höchstmöglichen Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen:

APPLICHEM GMBH, Darmstadt	MERCK, Darmstadt
BIO101 Inc., Carlsbad, CA, USA	MP BIOCHEMICALS, Illkirch, Frankreich
BIORAD LABORATORIES, München	NATIONAL DIAGNOSTICS, Simerville, USA
BIOZYM, Hessisch Oldendorf	OXOID, Wesel
BODE CHEMIE, Hamburg	RIEDEL-DE HAEN, Seelze
BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
DIFCO, Dreieich	ROTH, Karlsruhe
FLUKA, Neu-Ulm	SERVA, Heidelberg
GE HEALTHCARE, München	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
GERBU Biotechnik GmbH, Gailberg	VWR, Leuven, Belgien
GIBCO/BRL, Eggestein	
D-[U- ¹⁴ C] Glucose; 12.0 GBq/mmol (323mCi/mmol)	GE HEALTHCARE, München

2.2 Antikörper

Anti-LTA-Antikörper, Maus IgG3, Clone 55	DUNN LABORTECHNIK, Asbach
Anti-Maus-IgG3-Antikörper, HRP linked, NA 931	GE HEALTHCARE, München
Anit-His6-Antikörper, Peroxidase-konjugiert	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
HRP-Substrat TMBE-500	DUNN LABORTECHNIK, Asbach

2.3 Kits

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot
pJET® Cloning Kit	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot
pGEM®-T-Vektor-Systems I	PROMEGA, Mannheim

NucleoSpin® Extract II	MACHEREY-NAGEL, Düren
QIAprep Spin Miniprep	QIAGEN, Hilden
SV Minipreps Wizard Plus	PROMEGA, Mannheim

2.4 Enzyme

2.4.1 Molekularbiologische Arbeiten

Alkalische Phosphatase (CIP)	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt a. M. ROCHE Diagnostics, Mannheim
DNA-Polymerasen:	
GoTaq® Flexi DNA-Polymerase	PROMEGA, Madison, USA
Pfu-DNA Polymerase	STRATAGENE, La Jolla, USA
Phusion HiFi DNA-Polymerase	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt a. M.
Pwo-DNA-Polymerase	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt a. M.
T4 DNA-Ligase	MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
T4 DNA Polymerase	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt a. M.

2.4.2 Hilfsenzyme zur Herstellung von Glycerin-Phosphat aus Glucose

Aldolase, EC 4.1.2.13, aus <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
Glucosephosphat-Isomerase Typ III, EC 5.6.1.9, aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Hexokinase Typ F-300, EC 2.7.1.1, aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Phosphofruktokinase (PFK) Typ VII, EC 2.7.1.11, aus <i>Bacillus stearothermophilus</i>	
Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase Typ I, EC 1.1.1.8, aus <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
Triosephosphatisomerase (TIM) Typ VII-S, EC 5.3.1.1, aus <i>Oryctolagus cuniculus</i>	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen

Creatinkinase, EC 2.7.3.2, aus *Oryctolagus cuniculus*

ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim

2.5 Bakterienstämme

Tabelle 1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften ¹	Herkunft Referenz	Anmerkungen
<i>E. coli</i> DH5 α	[F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk-mk-), <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> (Nal ^r), <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15]	Hanahan, 1983 Klonierungsstamm	
<i>E. coli</i> XL1 Blue MRF ['] Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrBC-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F ['] <i>proAB lacIqZ</i> Δ M15Tn10 (Tet ^r)]		STRATAGENE	Klonierungsstamm, Restriktionsendonukleasen deaktiviert
<i>E. coli</i> NEB 5 α F ['] I ^q	F ['] <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q (Δ <i>lacZ</i>)M15 <i>zzf::Tn10</i> (Tet ^r)/ <i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 (Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15) <i>glnV44 gyrA96</i> (Nal ^r) <i>recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	NEW ENGLAND BIOLABS,	Klonierungsstamm, Resistenz gegen Bacteriophagen T1
<i>E. coli</i> NEB Turbo	F ['] , <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , Δ (<i>lacZ</i>)M15/ <i>fhuA2</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>glnV</i> , <i>gal</i> R(<i>zgb-210::Tn10</i>), Tet ^r , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , Δ (<i>hsdS-mcrB</i>)	NEW ENGLAND BIOLABS, Albers <i>et al.</i> , 2006	Klonierungsstamm, Resistenz gegen Bacteriophagen T1, beschleunigtes Wachstum.
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>hsdS</i> , <i>gal</i> , [λ cl, <i>ts857</i> , <i>cmd1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>relA1</i>]	STRATAGENE	Expressionsstamm, T7 RNA Polymerase für pET System
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3) RIL	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (rB-mB-) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Cam</i> ^r]	STRATAGENE	Expressionsstamm, pACYC Plasmid für zusätzliche tRNAs
<i>E. coli</i> NEB T7 Express I ^q	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1</i> [lon] <i>ompT gal sulA11</i> R(<i>mcr-73::miniTn10-Tet^S</i>)2 [<i>dcm</i>] R(<i>zgb-210::Tn10-Tet^S</i>) <i>endA1</i> Δ (<i>mcrC-mrr</i>)114::IS10 <i>lacI</i> ^q (Cam ^R)	NEW ENGLAND BIOLABS	Expressionsstamm, Resistenz gegen Bacteriophagen T1, Proteasendefizienz
<i>E. coli</i> T7 Express Rosetta	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 lon ompT gal</i> Lehrstuhl <i>sulA11 dcm</i> R(<i>zgb-210::Tn10-Tet^S</i>) <i>endA1</i> Δ (<i>mcrC-mrr</i>)114::IS10 R(<i>mcr-73::miniTn10-Tet^S</i>)2 [<i>argU argW glyT ileX, leuW metT proL thrT thrU tyrU Cam</i> ^r]	Biochemie II	Expressionsstamm, Resistenz gegen Bacteriophagen T1, Proteasendefizienz
<i>B. subtilis subsp. subtilis str.</i> 168	Marburg; ATCC 6051, tryptophanauxotroph	Spizizen, 1958; im Folgenden als Zeigler <i>et al.</i> , 2008	<i>B. subtilis</i> Wildtyp bezeichnet

<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168 $\Delta araM$	$\Delta araM$ über pMUTIN4, Ery ^r , Lin ^r	diese Arbeit	im Folgenden als <i>B. subtilis</i> $\Delta araM$ bezeichnet
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168 $\Delta pcrB$	$\Delta pcrB$ über pMUTIN4, Ery ^r , Lin ^r	Kobayashi et al., 2003	im Folgenden als <i>B. subtilis</i> $\Delta pcrB$ bezeichnet
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168 $\Delta araM$ - $\rho DG148$ _bsp <i>crB</i>	$\Delta araM$ über pMUTIN4, Ery ^r , Lin ^r , $\rho DG148$ -Stul mit <i>pcrB</i> , Kan ^r	diese Arbeit	im Folgenden als <i>B. subtilis</i> $\Delta araM$ + P <i>crB</i> bezeichnet
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168 $\Delta pcrB$ - $\rho DG148$ _afGGGPS	$\Delta pcrB$ über pMUTIN4, Ery ^r , Lin ^r , $\rho DG148$ -Stul mit afGGGPS, Kan ^r	diese Arbeit	im Folgenden als <i>B. subtilis</i> $\Delta pcrB$ + afGGGPS bezeichnet
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168 $\Delta pcrB$ - $\rho DG148$ _bsp <i>crB</i>	$\Delta pcrB$ über pMUTIN4, Ery ^r , Lin ^r , $\rho DG148$ -Stul mit <i>bsp<i>crB</i></i> , Kan ^r	diese Arbeit	Komplementationsstamm, im folgenden als <i>B. subtilis</i> $\Delta pcrB$ + P <i>crB</i> bezeichnet
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168 $\Delta pcrB$ - $\rho DG148$ _gk <i>pcrB</i>	$\Delta pcrB$ über pMUTIN4, Ery ^r , Lin ^r , $\rho DG148$ -Stul mit <i>gk<i>pcrB</i></i> , Kan ^r	diese Arbeit	im Folgenden als <i>B. subtilis</i> $\Delta pcrB$ + gkP <i>crB</i> bezeichnet

¹ Genetische Nomenklatur nach Bachmann, 1990

2.6 Genomische DNA

Tabelle 2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten genomischen DNA aus den aufgeführten Organismen als Quelle der klonierten Gene.

Organismus	Herkunft
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	NCBI TxID: 224308; NC_000964; Kunst et al., 1997
<i>Bacillus anthracis</i> cap ⁻ pag ⁺	in Pathogenese abgeschwächter Stamm (Makino et al., 1989)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Lag aus früheren Arbeiten vor
<i>Listeria monocytogenes</i>	Dr. Udo Reichel, Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	Gensynthese, <i>gk<i>pcrB</i></i> mit codon usage von <i>P. furiosus</i>

Archaeoglobus fulgidus DSM
4304

Dr. Harald Huber,
Lehrstuhl für Mikrobiologie

*Methanobacterium
thermoautotrophicum*

Sulfolobus acidocaldarius

Sulfolobus solfataricus

Thermococcus kodakarensis
 Δ pyrF

2.7 Plasmide

Tabelle 3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Name	Marker ²	Herkunft/Referenz	Anmerkungen
pJET 1.2 CloneJET	<i>bla</i>	MBI FERMENTAS	Klonierungsvektor, linearisiert, <i>blunt</i>
pET21a	<i>bla</i>	NOVAGEN	Expressionsvektor, IPTG induzierbar, C-term. His ₆ tag
pET21a_bsaraM	<i>bla</i>	Guldan, 2007	Expression von <i>bsaraM</i>
pET21a_bspcrB	<i>bla</i>	Guldan, 2007	Expression von <i>bspcrB</i>
pET21a_bapcrB	<i>bla</i>	diese Arbeit	Expression von <i>bapcrB</i>
pET21a_gkpcrB	<i>bla</i>	diese Arbeit	Expression von <i>gkpcrB</i>
pET21a_lmpcrB	<i>bla</i>	diese Arbeit	Expression von <i>lmpcrB</i>
pET21a_sapcrB	<i>bla</i>	diese Arbeit	Expression von <i>sapcrB</i>
pET21a_afGGGPS	<i>bla</i>	Guldan, 2007	Expression von afGGGPS
pET21a_afGGGPS _W99A	<i>bla</i>	diese Arbeit	Expression von afGGGPS _W99A
pET21a_mtGGGPS	<i>bla</i>	diese Arbeit	Expression von mtGGGPS
pET21a_tkGGGPS	<i>bla</i>	diese Arbeit	Expression von tkGGGPS
pET21a_sacGGPPS	<i>bla</i>	diese Arbeit	Expression von sacGGPPS
pET21a_sacGGPPS_V 73G, F77S	<i>bla</i>	diese Arbeit	Expression von sacGGPPS_V73G, F77S
pMUTIN4	<i>bla</i> (<i>E. coli</i>) <i>erm</i> (<i>B. subtilis</i>)	Vagner <i>et al.</i> , 1998	<i>E. coli</i> – <i>B. subtilis</i> shuttle Vektor
pMUTIN4_ΔaraM	<i>bla</i> (<i>E. coli</i>) <i>erm</i> (<i>B. subtilis</i>)	Guldan <i>et al.</i> , 2008	Konstrukt zum genomischen <i>knockout</i> von <i>araM</i> in <i>B. subtilis</i>
pDG148-Stul	<i>bla</i> (<i>E. coli</i>) <i>ble</i> , <i>kan</i> (<i>B. subtilis</i>)	Joseph <i>et al.</i> , 2001	<i>E. coli</i> – <i>B. subtilis</i> shuttle Vektor, <i>ligation independent</i> <i>cloning</i>

pDG148_bsp crB	<i>bla</i> (<i>E. coli</i>) <i>ble, kan</i> (<i>B. subtilis</i>)	diese Arbeit	Konstrukt zur Expression von <i>pcrB</i> in <i>B. subtilis</i>
pDG148_gk $pcrB$	<i>bla</i> (<i>E. coli</i>) <i>ble, kan</i> (<i>B. subtilis</i>)	diese Arbeit	Konstrukt zur heterologen Expression gk $pcrB$ in <i>B. subtilis</i>
pDG148_afGGGPS	<i>bla</i> (<i>E. coli</i>) <i>ble, kan</i> (<i>B. subtilis</i>)	diese Arbeit	Konstrukt zur heterologen Expression von afGGGPS in <i>B. subtilis</i>

² Genetische Nomenklatur nach Novick *et al.*, 1976

2.8 Oligodesoxyribonukleotide

Alle aufgeführten Oligodesoxyribonucleotide wurden von der Firma METABION, Martinsried bezogen. Die homologen Bereiche der Adapter für das LIC-System (3.2.11), die Position der Mutationen (3.2.4), sowie Schnittstellen sind durch Fettdruck hervorgehoben (Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxyribonucleotide

Name	Sequenz, 5'→3'	Verwendung
T7-Promotor-Primer	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung pET/pGEM
T7-Terminator-Primer	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
SP6-Promotor-Primer	ATTTAGGTGACACTATAG	
pJET <i>forward</i> Primer	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Sequenzierung pJET1.2
pJET <i>reverse</i> Primer	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	
pMUTIN_up	CATCCAGAACAACCTCTGCT	Sequenzierung pMUTIN4 pDG148- <i>Stul</i>
pMUTIN_down	CCCAGTCGACCCGTAATCT	
pDG148_down	CTGCGACATCGTATAACGTTACT	Sequenzierung pDG148- <i>Stul</i>
5' <i>bsaraM</i> <i>Ndel</i>	GTAC CATATG AACGATATTGCGCATAACCT	Amplifikation <i>bsaraM</i>
3' <i>bsaraM</i> <i>XhoI</i>	CTAG CTCGAG TTTCATATAGACCATGGTT	
5' <i>bspcrB</i> <i>Ndel</i>	GAT CATATG TACGATGTAACGGAGTGGAA	Amplifikation <i>bspcrB</i>
3' <i>bspcrB</i> <i>XhoI</i>	GTAC CTCGAG CTCGCCTTTCACAGCCGCTA	
5' <i>sapcrB</i> <i>NheI</i>	GCTAG GCTAG CATGTATGACATTAATAAATG	Amplifikation <i>sapcrB</i>
3' <i>sapcrB</i> <i>XhoI</i>	GCTA CTCGAG TTTACTAGACTCCTTTATTT	

5' <i>ImpcrB</i> <i>NdeI</i>	CTAG CATATG AAGCATTATTCAAGTTAGATC	Amplifikation <i>ImpcrB</i>
3' <i>ImpcrB</i> <i>XhoI</i>	CTAG CTCGAG AACCGTTTTCTTCCTAAAAA	
5' <i>bapcrB</i> <i>NdeI</i>	GATC CATATG TACGATATTTCCGGGTG	Amplifikation <i>bapcrB</i>
3' <i>bapcrB</i> <i>XhoI</i>	GTAC CTCGAG CTCTCCTTTTACTGCTTTAAC	
5' <i>afGGGPS</i> <i>NdeI</i>	GATC CATATG CGATGGAGAAAGTGGAG	Amplifikation <i>afGGGPS</i>
3' <i>afGGGPS</i> <i>XhoI</i>	CTAG CTCGAG AGGTAGCGTTTTCAAGGAACG	
5' <i>tkGGGPS</i> <i>NdeI</i>	CTAG CATATG CTCAAGCTTGGAAAAG	Amplifikation <i>tkGGGPS</i>
3' <i>tkGGGPS</i> <i>XhoI</i>	CTAG CTCGAG TCCCTTAACGCCCTGT	
5' <i>mtGGGPS</i> <i>NdeI</i>	ATCG CATATG TTCAAATGAAGGTTGAAGATT	Amplifikation <i>mtGGGPS</i>
3' <i>mtGGGPS</i> <i>XhoI</i>	ATCG CTCGAG GACGGACCCCATACCCTCAACG ATCTCC	
5' <i>sacGGPPS</i> <i>NdeI</i>	ATCG CATATG AGTTACTTTGACA ACTATTTTAAT GAG	Amplifikation <i>sacGGPPS</i>
3' <i>sacGGPPS</i> <i>XhoI</i>	ATCG CTCGAG TTTTCTCCTTCTTATCGTAAATTCAG	
5' <i>araM_ko</i> <i>SacII</i>	GATC CCGCGG CTGACGTT CAGCGTGCTTT	Klonierung und Nachweis von Δ <i>araM</i>
3' <i>araM_ko</i> <i>BamHI</i>	GATC GGATCCT GGAGCAGTCGGATAAGAAA	
5' <i>bsPcrB_pDG148</i>	AAGGAGGAAGCAGGT ATGTACGATGTAACGGAGT	Adapter für LIC in <i>pDG148-Stul</i>
5' <i>afGGGPS_pDG148</i>	AAGGAGGAAGCAGGT ATGCGATGGAGAAAGT GGAG	
5' <i>gkPcrB_pDG148</i>	AAGGAGGAAGCAGGT ATGGAAGAGATTAGGGCGTG	
3' <i>His₆_pDG148</i>	GACACGCACGAGGT TCAGTGGTGGTGGTGGTG	
5' <i>afGGGPS_W99A</i>	TGGATTACGGGAAAGCATGCGCAG GCGG TCAG	Mutagenese von <i>afGGGPS</i>
3' <i>afGGGPS_W99A</i>	AATGCATTACGAGAATCTG CAGATTCTCGTAATGCATTCTGAC CGC CTGCG CATGCTTTCCCGTAATCCA	
5' <i>sacGGPPS</i> _V73G, F77S	GCTATTGAAG GT CTTCATACT GGT ACGCTTGTG	Mutagenese von <i>sacGGPPS</i>
3' <i>sacGGPPS</i> _V73G, F77S	CACAAGCGT ACC AGTATGAAG ACCTT CAATAGC	

2.9 Medien, Puffer und Lösungen

Alle Nährmedien wurden zur Sterilisation 20 min bei 121°C autoklaviert. Antibiotika bei Selektivmedien sowie andere hitzelabile Medienzusätze wurden nach Abkühlung der Medien in Form von steril filtrierten Stammlösungen zugegeben. Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Puffer filtriert (ME24 Ø47mm; 0,2 µm Porengröße; SCHLEICHERT & SCHUELL, Dassel) und bei Raumtemperatur gelagert. Es

wurde gefiltertes (MilliQ Advantage A10 System, MILLIPORE GMBH, Schwalbach) bzw. bidestilliertes Wasser (ddH₂O) verwendet.

2.9.1 Molekularbiologische Arbeiten

PCR-dNTP-Lösung (2 mM)

je 2 mM dNTP (N=A, C, G oder T) in Wasser gelöst, bei -20°C gelagert

Isolierung chromosomaler DNA aus *B. subtilis*

Resuspendierungspuffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA

Lysispuffer

20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA

4 mg/ml Lysozym (zum Zellaufschluss; Zugabe kurz vor Verwendung)

Proteinase K (unspezifische Serinprotease)

20 mg/ml in TE

RNase

10 mg/ml in TE

DNAse-Aktivität durch Hitze – 20 min kochen – entfernt; bei -20°C gelagert

TE Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, pH 7,5

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

25:24:1 (v/v/v), pH 7,5 -8,0

Agarosegelelektrophorese

Agarose (1%)

1% (w/v) Agarose in 0,5x TBE-Puffer; aufgekocht und bei 60°C gelagert

Sukrose-Farbmarker

60% (w/v) Sukrose, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) Xylencyanol FF
in 0,5x TBE

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml Ethidiumbromid in Wasser gelöst

TBE (5x)

445 mM Borsäure, 12,5 mM EDTA, 445 mM Tris-HCl, pH 8,15

2.9.2 Lösungen für *southern blot*

Denaturierungslösung

0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung

0,5 M Tris-HCl, pH 8.0 bei Rt, 1,5 M NaCl

SSC (20x)

3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7 – 7,5

2.9.3 Mikrobiologische Arbeiten mit *E. coli* und *B. subtilis*

Die kurzfristige Lagerung der Antibiotika-Stammlösungen erfolgte bei 4°C, die langfristige bei -20°C.

Ampicillin-Stammlösung (1000-fach)

150 mg/ml Ampicillin (Natriumsalz) in Wasser gelöst und steril filtriert

Kanamycin-Stammlösung (1000fach) für pET-System

75 mg/ml Kanamycin in Wasser gelöst und steril filtriert

Kanamycin-Stammlösung (1000fach) für pDG1488-*StuI*

10 mg/ml Kanamycin in Wasser gelöst und steril filtriert

Chloramphenicol-Stammlösung (1000fach)

30 mg/ml Chloramphenicol in 70% EtOH gelöst und steril filtriert

Linocmycin-Stammlösung (1000fach)

25 mg/ml Lincomycin in Wasser gelöst und steril filtriert

Erythromycin-Stammlösung (1000fach)

1 mg/ml Erythromycin in 70% EtOH gelöst und steril filtriert

IPTG-Stammlösung (0,5M)

0,5M IPTG in Wasser gelöst, steril filtriert, bei -20°C gelagert

2.9.4 Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

TFB I

100 mM KCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KOAc, 10 mM CaCl, 15% Glycerin;
die Stammlösungen der Einzelkomponenten wurden bei 4°C gelagert und der Puffer direkt vor der Verwendung frisch angesetzt.

TFB II

100 mM Tris-HCl, pH 7,0, 10 mM KCl, 75 mM CaCl₂;

die Stammlösungen der Einzelkomponenten wurden bei 4°C gelagert und der Puffer direkt vor der Verwendung frisch angesetzt.

2.9.5 Induktion der natürlichen Kompetenz von *B. subtilis***MNGE (10 ml)**

9,2 ml 1x MN-Medium, 2% Glucose, 10 mM Kaliumglutamat, 10 µg/ml Ammoniumeisencitrat, 50 µg/ml L-Tryptophan, 3 mM MgSO₄

10 x MN-Medium (1 l)

600 mM K₂HPO₄ • 3H₂O, 400 mM KH₂PO₄, 30 mM Natriumcitrat • 2H₂O

MNGE*-Medium (10 ml)

MNGE-Medium mit 1% Casaminoäuren

Expressionsmix (1 ml)

2,5% Hefeextrakt, 2,5% Casaminoäuren, 0,25 mg/ml L-Tryptophan

2.9.6 Elektroporationsmedium für *B. subtilis*

nach Xue *et al.*, 1999

Wachstumsmedium

LB, 0,5 M Sorbitol

Porationsmedium

0,5 M Sorbitol, 0,5 M Mannitol, 10% Glycerin

Regenerationsmedium

LB, 0,5 M Sorbitol, 0,38 M Mannitol

2.9.7 Lösungen für *one-site* ELISA gegen LTA**Citratpuffer**

100 mM Natriumcitrat, pH 4,7

Waschpuffer

1x PBS, 0,05% Tween 20

Blockierungspuffer

1x PBS, 0,05% Tween 20, 0,5% BSA

2.9.8 Arbeiten mit Proteinen

Aufschlusspuffer

50 mM KP pH 7,5, 300 mM KCl, 10 mM Imidazol

Dialyse- und Lagerungspuffer

50 mM KP pH 7,5, 10 mM Tris-HCl pH 7,0

HEPES Puffer

1 M HEPES, pH 7,5

Kaliumphosphatpuffer (KP)

1 M K_2HPO_4 , 1 M KH_2PO_4 ;

der gewünschte pH-Wert wurde über das Mischverhältnis der beiden Komponenten eingestellt.

2.9.9 SDS-Polyacrylelektrophorese

Ammoniumperoxodisulfid

10% APS-Stammlösung

Protogel™

30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid

SDS-PAGE

Trenngelpuffer

0,4% (w/v) SDS, 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 bei RT

Sammelgelpuffer

0,4% (w/v) SDS, 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 bei RT

Laufpuffer

0,1% (w/v) SDS, 0,025 M Tris-HCl, pH 8,5 bei RT, 0,2 M Glycin

Probenpuffer (6-fach)

5% (w/v) SDS, 30% (w/v) Glycerin, 15% (v/v) β -Mercaptoethanol,

0,03% (w/v) Bromphenolblau, 3,75 M Tris-HCl, pH 6,8 bei RT

SDS-PAGE Sammel- und Trenngel (12,5%)

Die Angaben beziehen sich auf 13 Gele.

	Sammelgel	Trenngel
SDS-Sammelgelpuffer	7,38ml	-
SDS-Trenngelpuffer	-	19,5ml
Protogel Acrylamid/Bisacrylamid	5,9ml	26,2ml
H₂O	15,95ml	31,58ml
TEMED	0,089ml	0,089ml
APS-Stammlösung (10%)	0,029ml	0,195ml

Coomassie-Färbelösung

0,2% (w/v) *Coomassie Brilliant Blue* R250, 50% (v/v) Ethanol,

10% (v/v) Eisessig

2.9.10 Puffer für *western blot*

2x Transfer-Puffer

20 mM Tris-HCl, pH 8,5 bei RT, 150 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol

0,02 % (w/v) SDS

10x PBS (*phosphate buffered saline*)

91 mM Na₂HPO₄, 17 mM NaH₂PO₄, 1,5 M NaCl, pH 7,4 mit NaOH eingestellt

Waschpuffer PBS-T

1x PBS-Puffer mit 0,1 % (v/v) Tween 20

Blockierungspuffer PBST-M

PBS-T mit 5 % (w/v) Milchpulver

2.9.11 Laufmittel für PC und DC

für die präparative PC

Isopropanol/Ammoniak/Wasser, 6:3:1 (v/v/v)

für die DC

Ethylacetat/Hexan, 1:1 (v/v)

Aceton/Wasser, 9:1 (v/v)

2.9.12 Sprühreagenz zum Nachweis von Phosphorsäurederivaten für DC

nach Dittmer & Lester, 1964

Lösung A 20,05 g MoO₃, 0,5 l 25 N H₂SO₄
3-4 h gekocht; Lösung wird klar.

Lösung B 0,9 g Mo, 0,25 l Lösung A
15 min gekocht.

Sprühreagenz: Lösung A/Lösung B/Wasser, 1:1:4,5 (v/v/v)

2.10 Software

2.10.1 Lokale Anwendung

ChemStation for LC 3D Systems	© 2001-2008 AGILENT TECHNOLOGIES
ÄKTA Unicorn Version 5.01 (318)	© 2004 AMERSHAM BIOSCIENCES
Cary Eclipse Version 1.1 (175)	© 2002 VARIAN Australia Pty Ltd.
Cary Win UV Version 3.0 (182)	© 2002 VARIAN Australia Pty Ltd.
Corel Draw Version 14	© 2003 COREL Corp.
Deep View Swiss PDB Version 3.6.b3/3.7	© Guex & Peisch 1997
DocIt Version 2.3.0	© 2003 UVP Inc.
EndNote Version 7.0	© 2000 WINTERTREE Software Inc.
GeneDoc	© 2000 Karl Nicholas
ISIS Draw Version 2.3	© 2000 MDL INFORMATION SYSTEMS
MS Office 2003	© 1983-2003 MICROSOFT CORPORATION
MOLOC	www.moloc.ch
OptiQuant 02.50	© 1997 Packard Instrument Co.
pDRAW32 1.0	© 2006 ACACLONE software
PyMol	© 2006 DELANO SCIENTIFIC LLC.
PovRay Version 3.1g	© 1999 POV-Team
Gina Star 4.07	© 2008 RAYTEST
Sigma Plot Version 8.0	© 1999/2002 SPSS, Inc.
SplitsTree4 4.6	© Huson & Bryant 2006
SpinWorks 3.1.6.0	© 2009 Kirk Marat
Vector NTI 10.3.0	© 2006 INVITROGEN CORPORATION

2.10.2 Servergestützte Anwendungen

ProtParam tool	http://www.expasy.org/tools/protparam.html
SIB BLAST Network Service	http://www.expasy.org/tools/blast/
T-COFFEE	Notredame <i>et al.</i> , 2000 http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Lösungen, sowie alle Medien wurden 20 min bei 121°C autoklaviert. Hitzelabile Lösungen hingegen wurden mit einem Spritzenfilter der Porengröße 0,22 µm steril filtriert. Glaswaren wurden zur Sterilisation vier Stunden bei 200°C ausgebacken.

3.1.2 Anzucht und Lagerung von *E. coli*-Stämmen

E. coli-Stämme wurden, falls nicht anders angegeben, bei 37°C in LB-Medium unter Schütteln (150–200 rpm) angezogen. Für Stämme mit Selektionsmarker wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum aus einer tausendfach konzentrierten Stammlösung zugegeben. Die Endkonzentration betrug bei Ampicillin 150 µg/ml, bei Kanamycin 75 µg/ml und bei Chloramphenicol 30 µg/ml. Das Wachstum der Zellen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) gegen Medium am Photometer verfolgt. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht dabei ca. $3,2 \cdot 10^8$ Zellen/ml.

Zur Anzucht von Einzelkolonien wurde die Zellsuspension auf entsprechenden Selektivagarplatten ausgestrichen und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die dauerhafte Lagerung von *E. coli*-Stämmen erfolgte als Glycerinkultur bei -80°C. Dazu wurde ein Aliquot einer Übernachtskultur in einem Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel zu gleichen Teilen (v/v) mit 87% Glycerin gemischt.

3.1.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen (nach Inoue *et al.*, 1990) wurde 1 l LB-Medium mit einer 50 ml üN Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden die Zellen 15 min auf Eis gestellt und anschließend geerntet (SORVALL, GS3-Rotor, 4000 rpm, 4°C, 10 min). Das Zellpellet wurde auf Eis in 100 ml TFB I-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, 4°C,

15 min) und das Zellpellet in 5 ml eiskalter TBF II-Lösung aufgenommen. 100 µl Aliquots wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.4 Chemische Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurde ein Aliquot (50 oder 100 µl) chemisch kompetenter Zellen mit mindestens 10 ng DNA versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 45 s einer Temperatur von 42°C ausgesetzt (Hitzeschock). Danach wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Wurde Ampicillin, das die Synthese der Zellwand inhibiert und deshalb nur sich gerade teilende Zellen abtötet, als Selektionsmarker verwendet, so wurden die transformierten Zellen sofort auf zwei LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum plattiert. Wurde ein Selektionsmarker verwendet, der auf der Transkriptions- (wie Rifampicin) oder Translationsebene (wie Streptomycin und Chloramphenicol) wirkt, so wurden diese Zellen nach der Transformation mit 900 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) für 1 h bei 37°C im Schüttler (200 rpm) inkubiert, um die Resistenz auszubilden (Kur). Es wurden dann zunächst 100 µl der Zellsuspension ausplattiert, die verbleibenden 900 µl Zellen kurz abzentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5415 D, 4000 rpm, 1 min), in ca. 100 µl LB-Medium resuspendiert und ebenfalls ausplattiert.

3.1.5 Anzucht und Lagerung von *B. subtilis* Stämmen

B. subtilis-Stämme wurden, falls nicht anders angegeben, bei 37°C in LB-Medium unter Schütteln (80-200 rpm) angezogen. Dabei sollte das Kulturvolumen $\frac{1}{10}$ des Gefäßvolumens nicht überschreiten, da es sonst durch mangelnde Luftzufuhr zu eingeschränktem Wachstum kommen kann. Die Zellen, deren Lipide extrahiert werden sollten, wurden über Nacht in 5 ml LB Medium (kleiner Ansatz) in verschlossenen 50 ml Röhrchen bzw. in 300 ml LB (großer Ansatz) in 3 l Kolben bei 37°C geschüttelt (200 bzw. 100 rpm). Bei der Überimpfung von Kulturen von der Agarplatte sind die Zellen am Gefäßrand sorgsam zu resuspendieren, da ansonsten das Anwachsen in Flüssigkultur ausbleiben kann.

Bei vorhandenem plasmidkodiertem Selektionsmarker wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum aus einer tausendfach konzentrierten Stammlösung zugegeben. Die Endkonzentration betrug bei Lincomycin 25 µg/ml, bei Erythromycin

1 µg/ml und bei Kanamycin 10 µg/ml. Das Wachstum der Zellen wurde durch Messung der OD₆₀₀ gegen Medium am Photometer verfolgt.

Zur Anzucht von Einzelkolonien wurde die Zellsuspension auf entsprechenden Selektivagarplatten ausgestrichen und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die dauerhafte Lagerung von *B. subtilis*-Stämmen erfolgte als Glycerinkultur bei -80°C. Dazu wurde ein Aliquot einer Übernachtskultur in einem Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel zu gleichen Teilen (v/v) mit 87% sterilem Glycerin gemischt.

3.1.6 Induktion der natürlichen Kompetenz von *B. subtilis*

Eine ganze Reihe von Mikroorganismen besitzt die natürliche Eigenschaft, DNA aus ihrer Umwelt aufzunehmen und in ihr Genom zu integrieren. Dieser Vorgang wird als natürliche Kompetenz bezeichnet und erlaubt so die Anpassung an veränderte Umweltbedingungen. Ausgelöst wird dieser Prozess der Aufnahme von DNA durch individuelle Faktoren wie *quorum sensing* und Veränderung im Nahrungsangebot (Lorenz & Wackernagel, 1994). Im Falle von *B. subtilis* kann natürliche Kompetenz durch den Wechsel des Kulturmediums induziert werden.

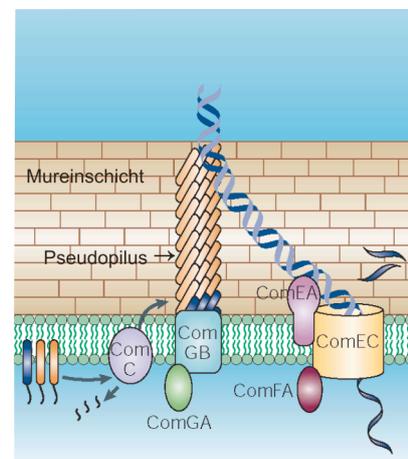


Abbildung 4: DNA-Aufnahme bei *B. subtilis*. Erklärungen vgl. Text; Chen & Dubnau 2004.

Kurz zusammengefasst erfolgt die Aufnahme von DNA über mehrere Schritte (Chen & Dubnau, 2004; Dubnau, 1991). Zuerst wird linearisierte externe DNA über einen sogenannten Pseudopilus (synthetisiert mit Hilfe der Protease ComC) und die Proteine ComGB und ComGA an den membrangebunden Rezeptor ComEA geleitet, der dann die DNA in einem Kanal (ComEC) ATP-abhängig über das Protein ComFA durch die Cytoplasmamembran führt (Abbildung 4). Ein Strang wird dabei in die Zelle eingeführt, während der zweite abgebaut wird. In der Zelle wird der Einzelstrang vervollständigt und kann ins Genom integriert werden.

Herstellung natürlich kompetenter *B. subtilis* Zellen

MNGE*-Medium (2.9.5) mit einem Volumen von 10 ml werden mit einer Übernachtskultur von *B. subtilis* in LB zur OD₆₀₀ = 0,1 inokuliert und bei 37°C geschüttelt. Bei

Erreichen der $OD_{600} = 1,2-1,3$ wird der Ansatz mit 10 ml MNGE-Medium verdünnt und 60 min weitergeschüttelt. Durch die Halbierung der Konzentration an Casaminosäuren durch die Verdünnung des Mediums wird die Kompetenz der Zellen induziert. Diese können dann direkt zur Transformation verwendet oder als Glycerinkultur gelagert werden. Dazu werden die Zellen geerntet (EPPENDORF Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, RT, 5 min), in 2,4 ml des Überstands resuspendiert und mit 600 μ l 50% sterilem Glycerin gemischt; aliquotiert (300 μ l), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Transformation

von frischen Zellen

Pro Ansatz werden 400 μ l Zellen mit 0,1 – 1 μ g DNA versetzt und 30 – 60 min bei 37°C geschüttelt. Dann werden 100 μ l Expressionsmix hinzugegeben und weitere 60 min geschüttelt. Anschließend werden die Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert (2 x 250 μ l).

von Glycerinkulturen

Pro Ansatz werden 300 μ l Zellen kurz bei 37°C aufgetaut und mit 1,7 ml 1 x MN-Medium, 43 μ l Glucose (20%) und 34 μ l Magnesiumsulfat (1 M) gemischt. Mit 400 μ l Zellen wird wie mit frischen Zellen verfahren.

3.1.7 Elektroporation von *B. subtilis*

Neben der Induktion der natürlichen Kompetenz kann DNA auch über Elektroporation in Zellen eingeführt werden. Durch ein elektrisches Feld wird die Membran der Zielzelle permeabilisiert und die Aufnahme einer Vielzahl von Stoffen in die Zelle induziert. Da die Zellen jedoch durch die Poration geschädigt oder lysiert werden, hat sich die Verwendung von Lösungen mit hoher Osmolarität als günstig für die Überlebensrate der Zellen herausgestellt. In Adaption der Methode von Xue, Johnson und Dalrymple (Xue *et al.*, 1999) konnte *B. subtilis* im Rahmen der vorliegenden Arbeit effizient und reproduzierbar transformiert werden.

Dazu wurde eine LB-Übernachtskultur von *B. subtilis* 16-fach in Wachstumsmedium (2.9.6) verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,85 - 0,95 bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden 10 min im Eisbad gekühlt und dann geerntet (EPPENDORF Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, 4°C , 5 min). Viermaliges Waschen des Zellpellet mit Porationsmedium

entfernte Reste des Wachstumsmediums. Die Zellen wurden in 1/40 des Kulturvolumens in Porationsmedium resuspendiert und konnten so bei -80°C gelagert werden.

Zur Elektroporation wurden 100 μl Zellen mit 1 μl (50 ng) DNA gemischt und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite: 2 mm) überführt und 1,5 min inkubiert. Dann wurde mit einem Puls von 2500 V (25 μF , 200 Ω) poriert (BIORAD Gene Pulser Xcell). Die Zeitkonstanten lagen zwischen 4,9 und 5,1 ms. Sofort nach der Entladung wurde 1 ml Regenerationsmedium zugegeben und die Zellen in vorgewärmten Reagenzgläsern 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Selektionsagar ausplattiert. Der Erfolg der Transformation wurde über Kolonie-PCR (3.2.4) überprüft.

3.1.8 Erstellung genomischer *knockout*-Mutanten in *B. subtilis*

Zur Analyse der *in vivo*-Funktion von Genen bzw. Genprodukten wird klassischerweise das Gen im Genom deletiert und dann über den Phänotyp auf die Funktion rückgeschlossen. Eine Möglichkeit, den *knockout* eines Gens zu erreichen, ist die Integration eines Vektors über homologe Bereiche in das Genom (Lopez-Diaz *et al.*, 1986).

Im Fall der Deletion von *araM* wurde in die *multiple cloning site* des Vektors pMUTIN4 ein 404 bp großes Fragment von *araM* über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sac*II eingeführt und das Konstrukt in *E. coli* amplifiziert (Abbildung 5).

Nach der Bestätigung der Sequenz wurde *B. subtilis* mit diesem Konstrukt transformiert (3.1.6) und auf Selektionsagar ausplattiert. Positive Klone wurden über Kolonie-PCR (3.2.4) identifiziert und der *knockout* über *southern blot*-Analyse (3.1.9) verifiziert.

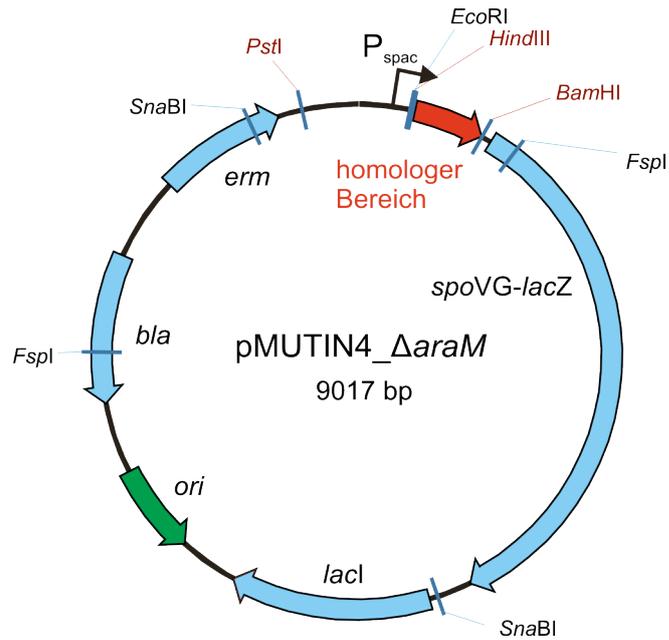


Abbildung 5: Vektorkarte von pMUTIN4_ΔaraM. Der homologe Bereich des *araM* Genes (rot) zur Integration des Vektors in das Genom von *B. subtilis* wurde über die Schnittstellen *SacII* und *BamHI* kloniert. Gezeigt sind zudem die Schnittstellen *SnaBI*, *FspI* und *EcoRI* für den Nachweis der Integration über *southern blot*. P_{spac}, IPTG indzierbare Promotor; *spoVG-lacZ*, Ribosomenbindestelle *spoVG* fusioniert mit dem Gen der β-Galactosidase; *lacI*, Gen des lac-Repressors; *ori*, Replikationsursprung (*E. coli*); *bla*, Ampicillin-resistenz; *erm*, Erythromycinresistenz.

3.1.9 Southern blot-Analyse

Die Technik des *southern blot* (Southern, 1975) ermöglicht den Nachweis spezifischer Gensequenzen in einem Gemisch an DNA (z.B. dem spezifischen verdauten Genom von *B. subtilis*).

Zur Verifizierung des *knockouts* wurde eine genomische DNA-Präparation (3.2.1) des Stamms *B. subtilis* Δ*araM* mit spezifischen Restriktionsendonukleasen verdaut und über Agarosegelelektrophorese (3.2.7) aufgetrennt. Das Gel wurde zusammen mit einem fluoreszierenden Lineal fotografiert, dann 20 min in frischer 0,25 M HCl inkubiert und mit Wasser gespült. Anschließend wurde das Gel 2 x 15 min in Denaturierlösung inkubiert, erneut mit Wasser gewaschen und dann 2 x 20 min in Neutralisierlösung geschwenkt. Parallel dazu wurde die positiv geladene Nylonmembran (BOEHRINGER, 0,5 cm größer als das Gel) kurz mit Wasser und zweimal kurz mit SSC benetzt und vier Chromatographie-Papiere (WHATMAN Nr. 1, 2 cm größer als das Gel) wurden in 2 x SSC Lösung equilibriert und gemäß Abbildung 6 arrangiert.

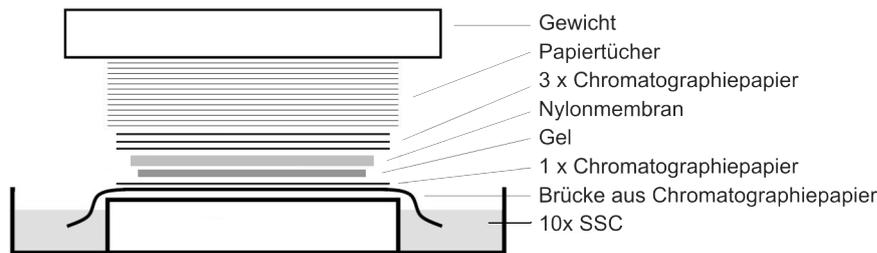


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des *southern blot*.

Mit Streifen Parafilm wurde gewährleistet, dass die Lösung nur über das Gel und die Membran nach oben in die aufgelegten Papiertücher gezogen wird. Der Stapel Papiertücher wurde beschwert und üN mit 10x SSC geblottet. Am nächsten Morgen wurde der *blot* abgebaut, mit Bleistift die Lage der Taschen des Gels auf die Membran übertragen und diese mit 2x SSC gespült. Dann wurde die Membran zwischen zwei Papieren 1-2 h bei 80°C fixiert. Mit 8 ml Rapid-hyb™ Puffer (GE HEALTHCARE) wurde die Membran zwischen zwei Netzen mindestens 30 min bei 65°C im Hybridisierungsöfen in 15 cm-Flaschen vorhybridisiert. Die Sonde wurde 2-5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis schnell abgekühlt, mit $\sim 10^6$ cpm pro ml Hybridisierungspuffer zu der Membran gegeben und üN bei 65°C im Hybridisierungsöfen inkubiert.

Am folgenden Morgen wurde die Membran über mehrere Schritte gewaschen:

- 2x SSC, 0,1% SDS, RT, 20 min
- 2x SSC, 0,1% SDS, 65°C, 20 min
- 0,2x SSC, 0,1% SDS, 65°C, 20 min

Zwischen den Waschschritten wurde mit dem Geigerzähler die Aktivität gemessen. Bei Erreichen von ≤ 100 cpm wurde das Waschen unterbrochen, auf die Membran ein *screen* des Cyclone *phosphorimager* System (PACKARD BioScience) aufgelegt und nach 2 h ausgelesen.

3.1.10 Zellaufschluss und -fraktionierung von gram-positiven Bakterien

B. subtilis besitzt als gram-positives Bakterium eine stabilere Zellwand als gram-negative *E. coli* Bakterien. Um diese Zellen quantitativ aufzuschließen wurden die Zellen nach Kultur mit Lysozym inkubiert.

Die Zellen, deren Lipide extrahiert werden sollten, wurden über Nacht in 5 ml LB Medium (kleiner Ansatz) in verschlossenen 50 ml Röhrchen bzw. in 300 ml LB (großer Ansatz) in 3 l Kolben bei 37°C geschüttelt (200 bzw. 100 rpm). Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, 4°C, 15 min) geerntet, in $\frac{1}{10}$ des Kulturvolumens in 1x PBS aufgenommen und mit Lysozym (300 µg/ml), DNase (10 µg/ml) und RNase (10 µg/ml), zusammen mit 10 mM MgSO₄, 30 min bei 37°C inkubiert.

Zur Abtrennung der Membranfraktion wurden 50 ml Kultur in der späten exponentiellen Phase über Zentrifugation (EPPENDORF Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, 4°C, 10 min) geerntet. Das Pellet wurde in 50 mM KP Puffer pH 8,0 zu einer Konzentration von 4 g pro Liter Nassgewicht resuspendiert. Zum Aufschluss wurden Lysozym (300 µg/ml), DNase (10 µg/ml) und RNase (10 µg/ml) zugegeben und zusammen mit 10 mM MgSO₄ 30 min bei 37°C inkubiert. Um größere Zellbestandteile abzutrennen, wurde die Lösung zentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, 4°C, 10 min). Zur Pelletierung der Zellmembran wurde der Überstand in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert (BECKMAN, Optima TL mit Rotor TLA-100.3, *fixed angle*, 40000 rpm, RT, 45 min). Das Pellet wurde im gleichen Volumen 100 mM KP pH 6,6 resuspendiert und die Lipide extrahiert (3.5.2.5).

3.1.11 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der *B. subtilis* Zellen im Vakuum mussten diese entsprechend fixiert werden. Dazu wurden Einzelkolonien in 90 µl 1x PBS resuspendiert, mit 10 µl Glutaraldehyd (25%, EM *grade*) versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (EPPENDORF Centrifuge 5415 R, 4000 rpm, 4°C, 2 min) und über eine ansteigende Ethanolreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 99%) entwässert. Dazu wurde das Pellet in Ethanol resuspendiert, 5 min bei RT inkubiert und erneut wie oben pelletiert. In 99% Ethanol konnten die Zellen gelagert werden oder es wurden direkt 50 µl der Suspension auf den Probenstab (*step*) aufgetragen und üN im Excikator über Kieselgel getrocknet. Von den so vorbereiteten Proben wurden am Rasterelektronenmikroskop (ZEISS, DSM 950) der Arbeitsgruppe Förster (Institut für Zoologie, Universität Regensburg) in Zusammenarbeit mit Frau Angelika Kühn, Aufnahmen bei verschiedenen Vergrößerungen und Winkeln gemacht.

3.1.12 Entsorgung von Mikroorganismen

Nicht mehr benötigte Kulturen, sowie mit Bakterien in Kontakt gekommene Lösungen wurden vor der Entsorgung autoklaviert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *B. subtilis*

Für die Extraktion chromosomaler DNA aus *B. subtilis* wurde 4 ml üN-Kultur durch Zentrifugation (EPPENDORF Centrifuge 5415 R, 13000 rpm, 4°C, 30 sec) geerntet und das Pellet in 1,5 ml kaltem Resuspendierungspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 0,7 ml Lysispuffer (+ Lysozym) resuspendiert und zunächst 10 min auf Eis, dann 10 min bei 37°C inkubiert, bis die Suspension viskos wurde. Durch Zugabe von 25 µl N-Lauroyl-Sarkosin (30%) wurde die Zellmembran aufgelöst und die Proteine nach Zugabe einer Spatelspitze Proteinase K 20 min bei 65°C verdaut. Anschließend wurde die Probe 2 min auf Eis gekühlt und vorsichtig ohne zu vortexen gemischt.

Durch Zugabe von 700 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v; Abzug), mischen durch Invertieren und anschließende Zentrifugation (EPPENDORF Centrifuge 5415 R, 13000 rpm, 4°C, 5 min) wurden hydrophobe Substanzen aus der wässrigen Phase entfernt. Die obere (wässrige) Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und 1- bis 2-mal wiederholt, bis die weiße Interphase verschwunden ist. Die so gereinigte wässrige Phase wurde mit 0,7 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt und zentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5415 R, 13000 rpm, 4°C, 5 min). Der Überstand (0,4 - 0,5 ml) wurde mit 50 µl RNase (10 µg/ml) bei 37°C 15 min inkubiert.

Abschließend wurde die DNA durch Zugabe von 1 ml 96% Ethanol (-20°C) 10 min auf Eis gefällt, dann zentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5415 R, 13000 rpm, 4°C, 10 min), mit 1 ml 70% Ethanol (-20°C) gewaschen, erneut zentrifugiert und das Pellet 10 min in der Speedvac (EPPENDORF, Concentrator 5301) bei RT getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl TE aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration einer wässrigen Lösung wurde spektroskopisch bei der Wellenlänge $\lambda=260$ nm bestimmt (EPPENDORF UV-Vis Biophotometer). Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm und einer Schichtdicke von $d = 1$ cm entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$, einer ssDNA-Konzentration von 33 $\mu\text{g/ml}$, sowie einer ssRNA-Konzentration von 35 $\mu\text{g/ml}$. Eine reine DNA-Lösung zeigt keine Absorption oberhalb von 300 nm und weist einen $\text{OD}^{260}/_{280}$ -Quotienten von mindestens 1,8 auf.

3.2.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die enzymatische Vervielfältigung von DNA-Fragmenten *in vitro* (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985).

Für Klonierungen wurde im Allgemeinen die GoTaq® Flexi DNA-Polymerase (PROMEGA) verwendet. *Pfu*- oder *Pwo*-DNA-Polymerasen, die 3'→5'-Exonuklease- und damit *proof-reading*-Aktivität besitzen, kamen bei Amplifikationen aus genomischer DNA zum Einsatz. Die Reaktion wurde standardmäßig in 50 μl Volumen in einem Thermocycler (EPPENDORF Mastercycler personal, Deckeltemperatur 105°C) durchgeführt. Die Primermenge betrug je 50 pmol. Die Reaktion wurde mit 50-100 ng zu amplifizierender DNA-Matrize, 1 U thermostabiler Polymerase und 200 nM dNTPs in individuell optimalem Reaktionspuffer standardmäßig wie folgt durchgeführt:

1. Denaturierung	95°C	2 min
2. Denaturierung	95°C	30 s
3. <i>annealing</i>	T_A °C	30 s
4. Extension	72°C	2 min
5. finale Extension	72°C	5 min
6. Abkühlung	4°C	∞

Die Schritte 2 bis 4 wurden zyklisch 30- bis 35-mal wiederholt.

Die *annealing*-Temperatur (T_A) wurde dabei an den Schmelzpunkt der Primer angepasst. Ergaben sich für die einzelnen Primer stark unterschiedliche *annealing*-Temperaturen oder wurde gerade bei der Erstamplifikation von Genen mit genomischer DNA als Matrize kein Produkt gebildet, so konnte mit Hilfe einer Gradienten-PCR die optimale *annealing*-Temperatur gefunden werden. Dabei wurden in einem Cycler mit

Gradientenfunktion (EPPENDORF Mastercycler gradients) bis zu 12 Ansätze gleichzeitig bei verschiedenen *annealing*-Temperaturen im Bereich des berechneten T_A amplifiziert. Die Analyse der Produkte auf einem Agarosegel zeigte dann die optimale *annealing*-Temperatur.

3.2.4 *Overlap extension-PCR*

Bei der *overlap extension* (OE)-PCR zur gerichteten Mutagenese (Ho *et al.*, 1989) werden zwei zueinander komplementäre Mutationsprimer von 25 bis 35 bp Länge definiert, die im zentralen Bereich den gewünschten Nukleotidaustausch tragen. Im ersten Schritt werden in getrennten PCR-Ansätzen mit diesen Primern in Kombination mit je einem genflankierenden Primer von der gleichen Matrize zwei überlappende Genfragmente amplifiziert und mittels Gelelektrophorese gereinigt. Diese Fragmente überlappen im Bereich der ausgetauschten Nukleotide und dienen in einer zweiten PCR als Matrize, um in Kombination mit genflankierenden Primern das vollständige Gen mit den ausgetauschten Nukleotiden zu amplifizieren.

OE-PCR wurde gewählt, wenn die zu mutagenisierende Position relativ mittig im Gen lag, so dass die beiden überlappenden Fragmente eine vergleichbare Länge aufwiesen. Die Amplifikation erfolgte anschließend mittels Standard-Protokoll (3.2.3)

3.2.5 Kolonie-PCR von *E. coli* und *B. subtilis*

Diese analytische Methode diente der Überprüfung von Klonierungen in Vektoren. Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR wurden hier ganze Zellen aus Einzelkolonien dem PCR-Ansatz hinzugefügt, welche durch den Denaturierungsschritt bei 95°C aufgeschlossen wurden. Hierzu wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze oder einem sterilen Holzstäbchen von der Platte genommen und kurz auf dem Boden des PCR-Gefäßes verstrichen. Die freigesetzte DNA diente im folgenden Amplifikationszyklus als Matrize. Als Oligonukleotide wurden genflankierende Plasmidprimer eingesetzt.

Da *B. subtilis* als gram-positiver Keim eine stabilere Zellwand als *E. coli* besitzt, hat es sich für die Kolonie-PCR als effizient erwiesen, die Kolonie in 100 µl Wasser zu resuspendieren und anschließend 15 min bei 95°C zu inkubieren, um so die Zellen aufzubrechen. Nach Pelletierung der Zellfragmente wurde 1 µl des Überstandes in die Kolonie-PCR eingesetzt.

3.2.6 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (FERMENTAS). Dazu wurden aus einer frischen üN Kultur 3 ml (*high copy* Plasmid, z.B. pGEM) oder 10 ml (*low copy* Plasmid z.B. pET21a) Zellsuspension abzentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5415 D, 13000 rpm, 1 min). Die Isolierung der DNA aus den Zellpellets erfolgte nach Angaben des Herstellers. Eluiert wurde die gebundene DNA mit 40 µl entionisiertem Wasser. Die Plasmidpräparation wurde anschließend bei -20°C gelagert.

3.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA-Fragmenten nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau, sowie zu präparativen Zwecken verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde 1% (w/v) Agarose in 0,5x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst, nach Abkühlung auf etwa 60°C 1/100 Volumen Ethidiumbromid-Stammlösung zugegeben und die Agaroselösung in die Gelkammer gegossen. Das Gel wurde nach dem Erstarren mit 0,5x TBE-Puffer überschichtet und die DNA-Proben in Sukrose-Farbmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 20 min bei einer Spannung von 170 V (HOEFER PHARMACIA BIOTECH Agarosephorese-Kammer). Dabei wandert die negativ geladene DNA zur Anode, wobei die Auftrennung der DNA-Fragmente abhängig von der Länge erfolgt. Unter UV-Licht wurden die DNA-Fragmente mit eingelagertem Ethidiumbromid sichtbar (Sharp *et al.*, 1973) und ihre Länge anhand des Längenstandards (MBI FERMENTAS, GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder) abgeschätzt. Die Dokumentation der Gele erfolgte über den UV-Transilluminator des *Multi-Doc-It Digital Imaging Systems* (UVP INC.)

3.2.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung aus einem Agarosegel wurden die Banden mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem *Nucleo Spin Extract II Kit* (MACHEREY-NAGEL) nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.2.9 Spaltung von dsDNA durch Restriktionsendonukleasen

Für die spezifische Spaltung von dsDNA wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet (Sambrook *et al.*, 1989; Wilson & Murray, 1991). Im analytischen

Restriktionsverdau wurden etwa 1 µg DNA mit 2-10 U Enzym für 2-3 h bei 37°C inkubiert. Bei einem präparativen Restriktionsverdau wurden 3-10 µg DNA und 10-30 U Enzym eingesetzt. Die Inkubation erfolgte üN bei 37°C. Die Reaktionen wurden in dem jeweils vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt. Der Anteil der Restriktionsenzyme im Reaktionsansatz betrug maximal 10% des Volumens.

3.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation wurden mit Restriktionsenzymen gespaltener Vektor und Fragment in einem abgeschätzten molaren Verhältnis von 1 zu 5 eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 2 U T4-DNA-Ligase und dem entsprechenden Puffer entweder über 10 h bei 16°C oder über 1 h bei RT. Dieser Ansatz wurde direkt zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen eingesetzt (3.1.4).

3.2.11 Ligationsfreie Klonierung (*ligation independent cloning*; LIC)

Zur Ligation eines Gens in den *shuttle*- und Expressionsvektor pDG148-*Stu*I wurde das ligationsfreie Klonierungssystem von Aslanidis & de Jong (1990) verwendet. Dabei werden über PCR Adapter an das gewünschte Gen angefügt und dann über die 3'→5' Exonuklease-Aktivität der T4 Polymerase überlappende Bereiche definierter Länge erzeugt. Der Zielvektor wurde komplementär behandelt. Nach Mischung lagern sich die entsprechenden Enden aneinander und mit dem Konstrukt können direkt Klonierungszellen transformiert werden. In diesen werden die Stränge kovalent verknüpft und amplifiziert. Der Gebrauch von Restriktionsenzymen, Ligase oder Phosphatasen ist nicht erforderlich.

Basierend auf diesem System wurde der *shuttle* Vektor pDG148-*Stu*I (Joseph *et al.*, 2001) erstellt. Abbildung 7 zeigt schematisch die Vorgehensweise.

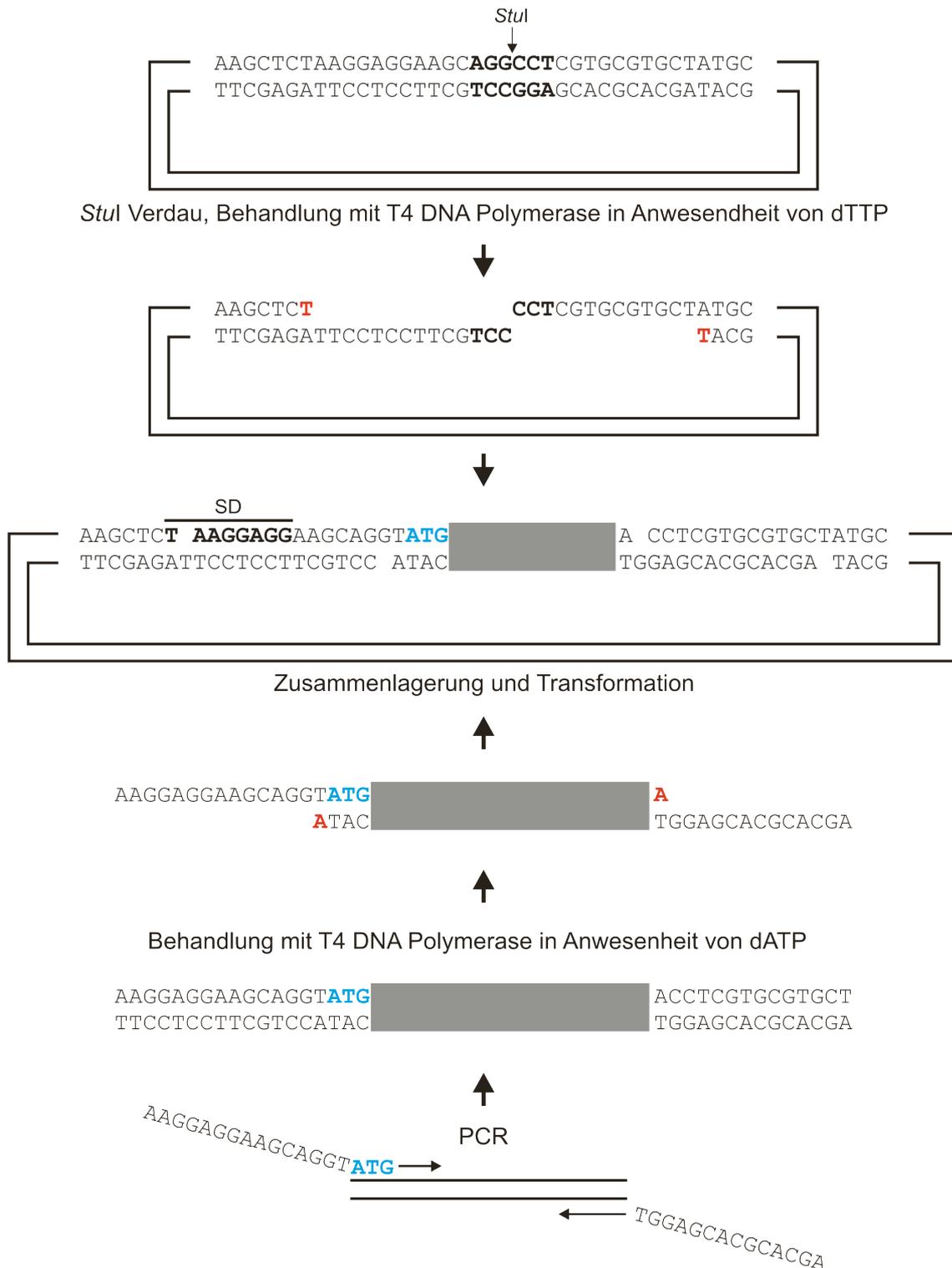


Abbildung 7: Schematische Darstellung des LIC Systems (verändert nach Joseph *et al.*, 2001; Erklärungen im Text); SD, Shine-Dalgarno-Sequenz; der graue Balken symbolisiert das in den Vektor zu integrierende DNA-Stück.

Zunächst wird der Vektor durch das Restriktionsenzym *StuI* linearisiert. Durch die T4 Polymerase unter Anwesenheit von dTTP wird ein Strang bis zum Auftreten eines Thymins auf definierter Länge verdaut. Parallel dazu werden die jeweiligen Adapter an die Enden des gewünschten Gens über PCR angefügt. Wie beim Vektor wird mit der T4 Polymerase und dATP als einziges Nucleotid jeweils ein Strang bis zum ersten Adenin verdaut. Dadurch entstehen bei Vektor und Gen komplementäre *sticky ends*, die im nächsten Schritt gemischt und nach Zusammenlagerung direkt ohne Ligation transformiert werden.

3.2.12 DNA-Sequenzierung

Die Verifizierung von Nucleotidsequenzen klonierter und mutagenisierter Gene erfolgte über Auftragssequenzierung bei der Firma GENEART, Regensburg. Ein Sequenzieransatz bestand standardmäßig aus 150-300 ng Plasmid-DNA und 1 μ l (10 μ M) Primer.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Expression von Proteinen im analytischen Maßstab

Für jedes zu exprimierende Gen wurde eine analytische Probeexpression in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum durchgeführt, um die optimalen Bedingungen für die Herstellung eines möglichst großen Anteils an löslichem Protein zu finden.

Dazu wurden 5 ml Vorkultur mit einer Transformante angeimpft und über Nacht bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Aus der Vorkultur wurden zwei Kolben mit je 50 ml LB-Selektivmedium inokuliert und parallel bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde über die Messung der OD₆₀₀ verfolgt. Einer Kultur wurde bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 zur Induktion der Genexpression 0,5 mM IPTG zugegeben. Gleichzeitig wurde von beiden Kulturen ein Aliquot (1 ml) entnommen und eingefroren (Probe zum Induktionszeitpunkt). Das weitere Wachstum wurde über die OD₆₀₀ kontrolliert, wobei nach jeder Stunde ein weiteres Aliquot entnommen wurde. Aus den erhaltenen Werten konnte eine Wachstumskurve der Kultur erstellt werden. Erreichten die Zellen die stationäre Phase, wurden sie durch Zentrifugation (SORVALL, GS3-Rotor, 4000 rpm, 4°C, 15min) geerntet. Das Pellet wurde in Aufschlusspuffer resuspendiert und durch Sonifizierung (BRANSON Sonifier 250D, 25% Leistung, 2 min, gepulst 15 s Leistung/15 s Pause) auf Eis aufgeschlossen. Zur Abtrennung der löslichen Fraktion

wurde 1 ml des Lysats erneut zentrifugiert (SORVALL, SS34-Rotor, 13000 rpm, 4°C, 10 min) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 1 ml Aufschlusspuffer gelöst und Aliquots beider Fraktionen wurden mit 6-fach SDS-Probenpuffer versetzt und erhitzt (5 min, 95°C). Die Analyse mittels SDS-PAGE (3.5.1.1) erlaubte es, den löslichen und unlöslichen Anteil des rekombinanten Proteins abzuschätzen.

Die Proben der Kontrollpunkte der Wachstumskurve wurden wieder aufgetaut und ebenfalls abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden direkt mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt, erhitzt und gleiche Mengen an Zellmaterial auf das SDS-Gel aufgetragen. Anhand der Zunahme einer Bande bei gleich bleibendem Hintergrund kann so das gewünschte Protein identifiziert und die Wirksamkeit der Induktion kontrolliert werden.

3.3.2 Expression von Proteinen im präparativen Maßstab

Zur präparativen Expression wurden je 2 l vorgewärmtes LB-Selektivmedium (bei AraM und PcrB-Proteinen supplementiert mit 25 mM Kaliumphosphat) aus einer frischen Vorkultur zu einer OD₆₀₀ von 0,05 - 0,1 angeimpft und bei 37°C und 150 rpm unter Beobachtung der Zelldichte inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 wurden die Expression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Es wurde weiterhin das Wachstum der Zellen über die OD₆₀₀ kontrolliert und eine Wachstumskurve erstellt. Mit Erreichen der stationären Phase wurden die Zellen geerntet (SORVALL GS3-Rotor, 4000 rpm, 20 min, 4°C) und das Zellpellet in Aufschlusspuffer aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte über Behandlung mit Ultraschall (BRANSON Sonifier 250D), gepulst bei einer Amplitude von 50%, zweimal 2 min. Zur Abtrennung der Zellreste wurde die Lösung erneut zentrifugiert (SORVALL, SS34-Rotor, 13000 rpm, 4°C, 10 min) und aus dem Überstand das rekombinant hergestellte Protein gereinigt.

3.3.3 Expression von Proteinen in *B. subtilis*

Die Expression von Proteinen im Vektor pDG148-*StuI* zur *in vivo* Komplementation in *B. subtilis* entsprach im Wesentlichen dem Vorgehen bei der Expression in *E. coli* (3.3.1, 3.3.2).

Die Zellen wurden in 5 ml LB Medium (kleiner Ansatz) in verschlossenen 50 ml Röhrchen bzw. in 300 ml LB (großer Ansatz) in 3 l Kolben mit entsprechenden Antibiotika bei 200 bzw. 100 rpm und 37°C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8

wurden die Expression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert und üN weitergeschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, 4°C, 15 min,) geerntet, in $\frac{1}{10}$ des Kulturvolumens in 1x PBS, 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit Lysozym (300 µg/ml), DNase (10 µg/ml) und RNase (10 µg/ml) 30 min bei 37°C aufgeschlossen. Das klare Lysat wurde zum Proteinnachweis über *western blot* (3.5.1.3) und zur Extraktion der Lipide (3.5.2.5) verwendet.

3.3.4 Metallchelataffinitätschromatographie

Die Metallchelataffinitätschromatographie wurde verwendet um Proteine mit N- oder C-terminalem His₆tag aus einem Zelllysate zu reinigen. Dazu wurde HisTrapCrude FF 5 ml Säule mit Hilfe des Äkta Basic 10 better Systems (GE HEALTHCARE) mit dem Zelllysate beladen und mit einem Imidazolgradienten eluiert.

Die eigentliche Reinigung erfolgte nach folgender Methode:

Äquilibration der Säule	4 SV 100 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl Flussrate 10 ml/min
Beladen über die Auftragspumpe	Flussrate 2-5 ml/min
Waschen der Säule	20 SV 100 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl Flussrate 4 ml/min
Elution	20 SV Gradient 0-500 mM Imidazol in 100 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl Flussrate 4 ml/min Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt.
Äquilibration	2 SV 100 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl Flussrate 4 ml/min

Die Elution der Proteine wurde über die Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm (im Falle von AraM zusätzlich über 340 nm) verfolgt; die Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE (3.5.1.1).

3.3.5 Dialyse von Proteinlösungen

Die vereinigten Elutionsfraktionen wurden nach der chromatographischen Reinigung und auch zum Wechsel der Pufferbedingungen gegen ein mindestens 100-faches des Probenvolumens an gewähltem Puffer dialysiert. Dazu wurde die Probe in einem nach Herstellerangaben mit EDTA ausgekochten und in Pufferlösung äquilibrierten Dialyseschlauch (SERVA) mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 14 kDa unter Rühren dreimal für je 4-6 h bei 4°C dialysiert.

3.3.6 Einkonzentrierung von Proteinlösungen

Die Proteinlösungen wurden mit Hilfe der AMICON MW-15 Zentrifugenröhrchen über eine semipermeable Membran nach Herstellerangaben durch Ultrafiltration (EPPENDORF Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, 4°C) einkonzentriert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach dem Ausgangsvolumen, der zu konzentrierenden Proteinlösung und dem gewünschten Endvolumen.

3.3.7 Lagerung von gereinigten Proteinen

Die konzentrierte Proteinlösung wurde in kleinen Volumina (10-20 µl) in flüssigen Stickstoff eingetropf und als feste Kügelchen bei -80°C gelagert.

3.4 Präparative Synthese von Substraten

3.4.1 Synthese von Glycerin-1-Phosphat aus Glucose

¹⁴C-markiertes Glycerin-1-Phosphat wurde aus ¹⁴C-markierter Glucose über die Enzyme der Glycolyse *in vitro* synthetisiert. Für den die stereospezifische Reduktion von ¹⁴C-DHAP zu ¹⁴C-G1P wurde AraM verwendet (Guldan, 2007).

Um die maximale Ausbeute der Synthese zu gewährleisten wurden die Enzyme des oberen Teils der Glycolyse in dem Verhältnis zueinander) in die Reaktion eingesetzt, der die optimale Effizienz sicherstellte (Fiévet *et al.*, 2006, Tabelle 5). Ein ATP-Regenerationssystem bestehend aus Phosphocreatin und der Creatinkinase wurde benutzt, um die Aktivität der PFK nicht zu hemmen (Abbildung 24 in 4.3.4). Damit wurde die Konzentration an ATP konstant im Bereich von 1 mM gehalten.

Tabelle 5: Konzentration der Enzyme bei der Synthese von G1P aus Glucose.

Enzym	c [μM]
Hexokinase	0,1
Phosphoglucoisomerase	0,155
Phosphofruktokinase	0,24
Fructosebisphosphataldolase	0,59
Triosephosphatisomerase	0,015
Creatinkinase	1
Glycerin-1-Phosphat-DH (AraM)	1

Die Reaktion wurde in 1 ml Volumen bei 37°C durchgeführt. Da AraM im verwendeten Tris-Puffer weit weniger stabil ist als die anderen Enzyme im Reaktionsansatz, wurde es nach jeweils 20 min zweimal in gleicher Menge erneut zugegeben. Tabelle 6 zeigt die Pufferbedingungen und Substratkonzentrationen im Ansatz.

Tabelle 6: Substratkonzentrationen und Pufferbedingungen bei der Synthese von G1P aus Glucose

Substrat	c [mM]	Puffer	c [mM]
Glucose „kalt“	0,69	Tris-HCl, pH 7	50
Glucose „heiß“	0,31	KCl	100
NADH	3	MgAc	5
ATP	1		
Phosphocreatin	20		

Die Reaktion wurde nach 2 h durch den Auftrag auf die präparative Papierchromatographie beendet.

Analog wurde auch Glycerin-3-Phosphat mit der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase als stereospezifisches Enzym dargestellt.

3.4.2 Präparative Papierchromatographie

Die Isolierung des so erzeugten radioaktiv markierten ^{14}C -G1P erfolgte über Papierchromatographie (PC, Bassham *et al.*, 1950). Bei der Papierchromatographie handelt es sich um eine Form der Verteilungschromatographie. Sie wurde 1944 von R. Consden, A. H. Gordon und A. Martin in Leeds, UK, zunächst für die Proteinanalytik entwickelt (Consden *et al.*, 1944). Das Trägermaterial stellt homogenes Filterpapier

(z.B. WHATMAN Nr. 1) dar. Als stationäre Phase dient das in den Intermicellarräumen der Cellulosefibrillen gespeicherte Wasser (Gehalt bis zu 30%). Die mobile Phase sind je nach Applikation verschiedene Mischungen von organischen Lösungsmitteln mit Wasser. Die Entwicklung kann aufsteigend (unter dem Einfluss der Kapillarkräfte) oder absteigend (Durchlaufchromatogramm) erfolgen. Optional kann bei unzureichender Trennung auch zweidimensional entwickelt werden.

Zur Etablierung der Papierchromatographie und Bestimmung eines geeigneten Laufmittels wurden die verfügbaren Intermediate der Reaktion zur Darstellung von G1P nichtradioaktiv aufgetrennt. Die optisch nicht nachweisbaren Zuckerphosphate wurden nach der Entwicklung der PC mit dem Molybdän-Färbereagenz nach Dittmer & Lester (1964, 2.8) detektiert. So konnte als optimale Bedingung die Auftrennung der Intermediate der G1P-Synthese auf WHATMAN Nr. 1 Chromatographiepapier in Iso-propanol/Ammoniak/Wasser, 60:30:10, (v/v/v) für 20 h identifiziert werden. Zur Auftrennung wurde in Zusammenarbeit mit der mechanischen Werkstatt der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin eine entsprechende Apparatur entwickelt (Abbildung 48). Die Auftrennung erfolgte hängend in einem abgedeckten Glaszylinder. Dabei können zwei Papiere (16 x 60 cm) über angefertigte Edelstahlbügel in einem Edelstahltrog als Reservoir fixiert und die Kammer abgeschlossen werden. Nachdem sich eine gesättigte Laufmittelatmosphäre in der Kammer eingestellt hat, kann das Laufmittel über ein Loch von oben in den Trog fließen und somit die Entwicklung des Chromatogramms starten.

Bei der Darstellung von ^{14}C -G1P erfolgte die Detektion des Produkts direkt über Autoradiographie mit dem Cyclone *phosphorimager* System (PACKARD BioScience). Weil Banden von mehreren Zwischenprodukten sichtbar waren, wurde die zu G1P gehörende Bande über einen sequenziellen Ablauf der Synthese und chromatographischer Analyse von Proben identifiziert. Im Präparativen Ansatz wurde die entsprechende Bande nach der Entwicklung ausgeschnitten, getrocknet und das Produkt mit Wasser eluiert (Consdon, 1954, Abbildung 49). Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch Messung der Aktivität im Scintillationszähler (PACKARD Bioscience Tri-Carb 2900RT).

3.4.3 Synthese längerer Polyprenyl-PP (C₂₅ und C₃₀)

Zur Untersuchung der Substratlängenabhängigkeit von PcrB im Vergleich zu afGGGPS und afGGGPS_W99A wurden längere Polyprenyl-PP benötigt. Da diese jedoch nur bis Geranylgeranyl-PP (C₂₀) kommerziell erhältlich sind, wurde das Produktspektrum der Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase (GGPPS) aus *S. acidocaldarius* insofern verändert, als diese dann auch Geranylarnesyl-PP (C₂₅) und Hexanyl-PP (C₃₀) produzierte. Erreicht wurde dies durch gezielte Mutagenese der für die Begrenzung der Produktlänge verantwortlichen Aminosäuren Valin 73 zu Glycin und Phenylalanin 77 zu Serin (Ohnuma *et al.*, 1998). Tabelle 7 zeigt den Reaktionsansatz zur enzymatischen Darstellung der gewünschten Substrate mit 150 µl Gesamtvolumen.

Tabelle 7: Reaktionsansatz zur Darstellung längerer Polyprenyl-PP.

Isopentenyl-PP (IPP, C ₅)	2 mM
Geranyl-PP (GPP, C ₁₀)	2 mM
MgCl ₂	5 mM
Na ₃ PO ₄ Puffer (pH 5,8)	10 mM
sacGGPPS_V73G/F77S	1 µM

Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µM sacGGPPS_V73G/F77S. Nach 1 h Inkubation bei 55°C wurde der Ansatz kurz auf Eis gekühlt und sofort für die Analyse der Substratspezifität von PcrB, afGGGPS und afGGGPS_W99A verwendet (3.5.2.4).

3.5 Analytische Methoden

3.5.1 Proteinanalytik

3.5.1.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese dient zur Auftrennung von Proteinen nach deren Größe (Laemmli, 1970). Die Proteinproben wurden mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min auf 95°C erhitzt. Standardmäßig wurden 12,5%ige Gele verwendet (2.9.9). Die Elektrophorese wurde bei 250 V (45 mA) für etwa 35 min durchgeführt (HOEFER PHARMACIA BIOTECH SDS-Elektrophoresekammer Mighty Small II). Das Molekulargewicht der Proteine konnte durch Vergleich mit einem

Größenstandard (Unstained Protein Molecular Weight Marker, MBI FERMENTAS) abgeschätzt werden.

3.5.1.2 Färbung der SDS-Gele mit *Coomassie Brilliant Blue G250*

Der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue G250* färbt Proteine bis zu einer Nachweisgrenze von 0,2-0,5 µg/mm². Die Gele wurden hierzu 15 min in der Färbelösung geschwenkt und im Anschluss wurde unspezifische Färbung durch Aufkochen in Wasser (Mikrowelle, dreimal 1-2 min) entfernt.

3.5.1.3 *Western blot*

Western blots dienen der spezifischen Identifizierung und Quantifizierung von einzelnen Proteinen in komplexen Proteingemischen. Dabei können diese in einer Gesamt-Zellprotein-Präparation oder in Gewebelysaten mit Hilfe hochspezifischer Antikörper, die mit einem Marker versehen sind, nachgewiesen werden (Towbin *et al.*, 1979).

Transfer der Proteinbanden auf eine PVDF-Membran (*semi-dry*)

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben mittels einer *semi-dry-western-blot*-Apparatur vom Gel auf eine PVDF Membran übertragen („geblottet“). Die verwendete Membran Immobilon-P (MILLIPORE) mit 0,45 µm Porengröße wurde gemäß Herstellerangaben vor Gebrauch zur Aktivierung für 1 min in 100 % Methanol geschwenkt. Nach dem Zuschneiden wurde die Membran zusammen mit dem Gel und Filterpapieren 15 min im Transfer-Puffer inkubiert und unter Vermeidung von Luftblasen in der *semi-dry western blot* Apparatur (BIOMETRA Fast-Blot B34) angeordnet (Abbildung 8).

Der Übertrag auf die Membran erfolgt gemäß Herstellerangaben bei einer Stromstärke von 5 mA pro cm² Gelfläche. Anhand der Übertragung des vorgefärbten Größenstandards (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, MBI FERMENTAS) wurde der Erfolg des Transfers überprüft.



Abbildung 8: Anordnung der Komponenten in der *semi-dry western blot* Apparatur. -, Kathode, +, Anode. Der Pfeil zeigt die Richtung des Stromflusses an. Die durch SDS negativ geladenen Proteine werden so vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran übertragen.

Immunodetektion von Proteinen

Die auf der Membran frei zugänglichen Proteine wurden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen ihren His₆-tag sichtbar gemacht. Dazu wurden nach dem Transfer unspezifische Proteinbindestellen auf der Membran durch Inkubation für 1 h bei RT in Blockierungspuffer (2.9.11) abgesättigt und die Membran anschließend für 1 h in Antikörperlösung (Anti-His₆-tag, Peroxidase-konjugiert 1:500) in Blockierungspuffer geschwenkt. Im Anschluss wurde die Membran 3 x je 10 min mit Waschpuffer PBS-T gewaschen. Danach erfolgte die spezifische Detektion von gebundenem Antikörper mit Hilfe des *SuperSignal West Pico Kits* (PIERCE) nach den Angaben des Herstellers. Der Anti-His₆-tag Antikörper ist an das Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugiert, welche das im *SuperSignal West Pico-Kit* enthaltene Luminol zu 3-Aminophthalat oxidiert. Die Lumineszenz von 3-Aminophthalat bei 425 nm wurde durch Auflegen (Expositionszeit 4 s bis ca. 3 min; abhängig von der Leuchtintensität) und Entwickeln von Röntgenfilmen (FUJI) sichtbar gemacht.

3.5.1.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, sowie Cystine (Disulfidbrücken) absorbieren UV-Licht im Bereich von 250-300 nm. Aus der Aminosäuresequenz kann der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm (ϵ_{280}) und bei bekanntem Molekulargewicht der spezifische Extinktionskoeffizient ($^{0,1\%}A_{280}$) mit Hilfe folgender Gleichungen berechnet werden (Pace *et al.*, 1995):

Gleichung 1:
$$\epsilon_{280} = \sum Trp \cdot 5500 + \sum Tyr \cdot 1490 + \sum Cystine \cdot 125$$

Gleichung 2:
$${}^{0,1\%}A_{280} = \frac{\epsilon_{280}}{M_R}$$

ϵ_{280} : molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$M^{-1}cm^{-1}$]
 ${}^{0,1\%}A_{280}$: spezifischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [cm^2mg^{-1}]
 M_R : relative Masse des Proteins (Molekulargewicht)

Unter Verwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes kann daraus die Proteinkonzentration berechnet werden:

Gleichung 3:
$$c = \frac{A_{280}}{d \cdot {}^{0,1\%}A_{280}}$$

c : Konzentration [$mg\ ml^{-1}$]
 A_{280} : Absorption bei 280 nm
 d : Schichtdicke der Küvette [cm]

Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Spektrum der Proteinlösung von 240-340 nm aufgenommen, wobei das Absorptionsmaximum sich idealerweise bei 280 nm befindet.

Tabelle 8: Molekulargewicht, molarer (ϵ_{280}) und spezifischer (${}^{0,1\%}A_{280}$) Extinktionskoeffizient der bearbeiteten Proteine (incl. His₆-tag)

Protein	M_R	ϵ_{280} [$M^{-1}cm^{-1}$]	${}^{0,1\%}A_{280}$ [cm^2mg^{-1}]
AraM	44122	28670	0,650
PcrB	26153	26150	1,000
baPcrB	26583	34630	1,303
gkPcrB	27676	33140	1,197
saPcrB	26953	23505	0,872
lmPcrB	26425	29910	1,132
afGGGPS	27209	41370	1,520
mtGGGPS	27183	19940	0,734
tkGGGPS	27893	15930	0,571

Der Quotient A_{280}/A_{250} sollte mindestens 1,8 betragen und es sollte keine Absorption oberhalb von 300 nm auftreten, da diese auf durch Aggregatbildung hervorgerufene Lichtstreuung hindeutet.

In Tabelle 8 sind die molaren und spezifischen Extinktionskoeffizienten, sowie die Molekulargewichte (relative Molekülmasse) der untersuchten Proteine aufgelistet.

3.5.1.5 Fluoreszenzspektroskopie und FRET

Die intrinsische Fluoreszenz eines Proteins beruht auf den aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, wobei in der Regel die Tryptophanfluoreszenz dominiert. Beide Seitenketten können bei 280 nm angeregt werden, bei 295 nm nur Tryptophan. Sowohl die Intensität der Fluoreszenzemission als auch die Lage des Emissionsmaximums hängen stark von der unmittelbaren Umgebung des Chromophors ab. Wenn sich die Umgebung der Fluorophore verändert, z.B. durch Bindung eines Interaktionspartners, kommt es zu Änderungen der Form des Emissionsspektrums (Rotverschiebung/Blauverschiebung bei Änderung der Hydrophobizität der Umgebung) sowie der Quantenausbeute (Schmid, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eigenfluoreszenz eines Liganden als Messsignal für die Bindung an ein Protein verwendet (in der vorliegenden Arbeit NADH an AraM), wobei die oben genannten Prinzipien genauso gültig sind.

Der Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (auch Förster-Resonanzenergietransfer, FRET, Förster, 1947) beschreibt die strahlungsfreie Übertragung von Energie von einem Donor auf einen Akzeptor. Die Effizienz der Übertragung ist abstandsabhängig, wobei der Förster-Radius den Abstand angibt, bei dem die Übertragungseffizienz bei 50% liegt. Dieser liegt üblicherweise im Bereich von 0,5 – 10 nm.

Im Falle von AraM wird ein Tryptophanrest spezifisch angeregt und dieser überträgt seine Energie auf das gebundene Substrat NADH, das wiederum spezifisch fluoresziert. Dadurch konnte die Bindungskonstante K_D von NADH an AraM bestimmt werden, da nur das gebundene Substrat über FRET angeregt wird und fluoresziert, nicht jedoch das freie NADH in Lösung.

Die Messungen wurden an einem Fluoreszenz-Spektrophotometer Cary Eclipse (VARIAN) in einer vierseitig geschliffenen 2 ml Quarzküvette unter ständigem Rühren durchgeführt. Dazu wurde 0,5 μM AraM in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 vorgelegt und bei 25°C mit NADH von 0 – 2 μM titriert. Nach jedem Titrationsschritt wurden die

Tryptophanreste von AraM spezifisch bei 285 nm angeregt und die resultierende Fluoreszenz der Protein-NADH-Mischung zwischen 300 und 450 nm verfolgt. Nachdem sich das Gleichgewicht eingestellt hatte, wurde die Zunahme der Fluoreszenz von NADH bei 425 nm gemessen und gegen die Ligandekonzentration aufgetragen. Zur Ermittlung der Bindungsparameter wurde die quadratische Gleichung 4 (Reinstein *et al.*, 1990) mit Hilfe des Programms *Sigma Plot* (Version 11) an die Datenpunkte angepasst.

$$\text{Gleichung 4: } F = F_0 + (F_{\max} - F_0) \cdot 0,5 \cdot \left[\frac{1 + L_0 + K_D^{\text{NADH}}}{E_0} - \sqrt{\left(1 + \frac{L_0 + K_D^{\text{NADH}}}{E_0}\right)^2 - 4 \cdot \frac{L_0}{E_0}} \right]$$

F :	gemessene Fluoreszenzintensität
F_{\max} :	maximale Fluoreszenz
F_0 :	minimale Fluoreszenz
L_0 :	Ligandenkonzentration
E_0 :	Proteinkonzentration (Monomer)

3.5.1.6 Analytische Größenausschlusschromatographie

Mit Hilfe der Größenausschlusschromatografie oder Gelfiltration werden Proteine aufgrund ihrer Größe und Form voneinander getrennt. Das Elutionsprofil lässt zudem Aussagen über die Homogenität der Proteinlösung zu. Verwendet wurde eine Superdex 75 Säule (GE HEALTHCARE) mit einem Volumen von 24 ml an einer Chromatographie-Anlage ÄKTA Basic 10 better (GE HEALTHCARE). Auf die mit 50 mM KP-Puffer, pH 7,5, 300 mM KCl äquilibrierte Säule wurden jeweils 100 µl der Proteinlösung der Konzentration 0,1-1 mg/ml über einen Auftrags-*loop* geladen. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts wurde die Säule zuvor mit Proteinen bekannter Größe kalibriert (Anhang 7.3) und die Elution über Absorptionsspektroskopie bei 280 nm verfolgt. Da für globuläre Proteine ein linearer Zusammenhang zwischen dem dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts und der Elutionszeit besteht, lässt sich mit Hilfe der Kalibrierungsgerade das apparente Molekulargewicht und daraus der vermutliche Oligomerisierungszustand eines untersuchten Proteins abschätzen.

3.5.1.7 Differentielle *Scanning*-Kalorimetrie

Bei der differentiellen *Scanning*-Kalorimetrie (DSC) werden Proben mit einer vorgegebenen Heizrate schrittweise erwärmt. Es werden dabei eine Probenzelle (Protein in Puffer) und eine Referenzzelle (Puffer) simultan aufgeheizt. Infolge einer temperaturinduzierten Reaktion in der Messzelle kommt es zu einer minimalen Temperaturdifferenz ΔT , welche von dem Gerät durch Variation des Heizstroms (ΔI) ausgeglichen wird. Durch Registrierung von ΔI lässt sich auf die Wärmekapazität C_p ($\text{kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) bei der jeweiligen Temperatur schließen (Privalov & Khechinashvili, 1974). Es handelt sich dabei um den Energieterm, der zur Erwärmung einer Proteinlösung um 1 K bei konstantem Druck notwendig ist. Entfaltet das Protein reversibel und ohne Populierung von Intermediaten (Zwei-Zustands-Modell, Richards, 1992), so gibt die Analyse der Daten Aufschluss über den Schmelzpunkt T_M (Temperatur, bei der jeweils die Hälfte des Proteins in gefaltetem und ungefaltetem Zustand vorliegt, Freire, 1995), über die Enthalpieänderung während der thermischen Denaturierung und die freie Energie der Auffaltung ΔG_{NU} als Funktion der Temperatur (Pace *et al.*, 1995). Im Falle von irreversibler Denaturierung, wie sie bei der Auffaltung von PcrB beobachtet wurde, lässt sich lediglich ein apparenter T_M -Wert als operationelles Maß für die Stabilität bestimmen.

Die Messungen wurden an einem CSC 5100 *Nano Differential Scanning Calorimeter* (CALORIMETRY SCIENCES CORP.) mit einer Scanrate von $1^\circ\text{C}/\text{min}$ durchgeführt und die Wärmekapazität C_p in Abhängigkeit von der Temperatur aufgezeichnet. In der Messzelle befand sich 1,1 mg/ml Protein in 50 mM KP pH 8. In der Referenzzelle befand sich der identische Puffer ohne Protein.

3.5.2 Substrat- bzw. Produktanalytik

3.5.2.1 Bestimmung der katalytischen Parameter von AraM

Die Aktivitätsbestimmung für AraM unter verschiedenen Substratkonzentrationen erfolgte unter Fließgleichgewichtsbedingungen (*steady-state*) an einem UV/Vis-Spektrometer (VARIAN) in einer 200 μl Küvette der Schichtdicke 1 cm bei 45°C . Gemessen wurde standardmäßig in 50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 70 mM KCl. Die an den Umsatz von DHAP zu G1P gekoppelte Oxidation von NADH zu NAD^+ und H^+ führt zu einer Abnahme der Absorption bei 340 nm. Die Rückreaktion von G1P und NAD^+

wurde unter identischen Bedingungen gemessen. Dabei wurde jeweils die Konzentration eines Substrates variiert, während die des zweiten in Sättigung vorlag. Aus dem resultierenden Sättigungskurvenverlauf wurden durch Anpassung der Parameter einer hyperbolen Funktion (*Sigma Plot*, Version 9) die K_M - und die V_{max} -Werte ermittelt. Durch Normierung von V_{max} auf die Konzentration an aktiven Zentren ($[E_0]$) wurde die Wechselzahl bestimmt: $k_{cat} = V_{max}/[E_0]$.

3.5.2.2 Quantifizierung von Lipoteichonsäuren

Die ELISA (*enzyme linked immunoabsorbent assay*) Technik beruht auf der spezifischen Interaktion von Antikörpern gegen ein Antigen. Durch Kopplung der Antikörper an ein Auslesesystem kann diese hochspezifische Interaktion sichtbar gemacht und quantifiziert werden. Im vorliegenden Fall wurde die Menge an Lipoteichonsäuren von *B. subtilis* wt und *araM knockout*-Mutante analysiert. Dazu wurden ELISA-Platten verwendet, deren Oberfläche bereits unspezifisch LTA bindet (DUNN LABORTECHNIK). Verglichen wurde Kulturen der beiden Stämme in der logarithmischen und der stationären Phase.

Dazu wurden je 5 ml Kulturen durch Zentrifugation geerntet (EPPENDORF Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, 4°C, 10 min), zweimal mit Citratpuffer gewaschen und in 1 ml desselben aufgenommen. Anschließend wurden sie mit Glassperlen über das Fastprep-24 Gerät (3 x 30 s, 6,5 m/s; MP BIOMEDICALS) aufgeschlossen. Das Lysat wurde mit 1 Vol n-Butanol gewaschen, wodurch Phospholipide und weitere amphiphile Substanzen entfernt werden. Die wässrige Phase wurde im Vakuum getrocknet und anschließend in 1 Vol Reinwasser aufgenommen. Es wurden geeignete Verdünnungen in Citratpuffer angelegt und je 100 µl in eine Vertiefung der ELISA-96-well-Platte gegeben. Die Proben wurden 1 h bei RT zur Bindung inkubiert und dann dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die verbliebenen Bindestellen mit 250 µl Blockpuffer 1 h bei RT blockiert. Der Blockpuffer wurde entfernt und die Platte erneut dreimal gewaschen. Nun wurden 100 µl des primären Anti-LTA-Antikörpers (Clone 55; 1:150 in Waschpuffer; DUNN LABORTECHNIK) für 1 h bei RT zugegeben und anschließend dreimal gewaschen. Es folgte die Zugabe von 100 µl des sekundären Anti-Maus-IgG₃-Antikörpers (HRP-konjugiert, NA 951; 1:1000 in Waschpuffer; DUNN LABORTECHNIK) und erneut 1 h Inkubation bei RT. Danach wurde zweimal gewaschen und zur Detektion 100 µl TMBE-500 HRP-Substrat (DUNN LABORTECHNIK) im

Dunkeln zugegeben. Nach 15 min wurde mit 50 μl 1 M H_2SO_4 die Reaktion abgestoppt und das Signal über einen *96-well-plate reader* (TECAN) bei 405 nm ausgelesen.

3.5.2.3 Qualitative Bestimmung der GGGPS Aktivität von PcrB

Die Reaktion von G1P und GGPP zu GGGP und PP_i kann optisch nur schwer verfolgt werden. Aus diesem Grund musste ein radioaktiver Nachweis für die Entstehung von GGGP geführt werden. Als Reporter diente radioaktiv markiertes G1P (3.4.1), wobei sich an den Arbeiten zum Nachweis der Reaktion der archaellen GGGPS orientiert werden konnte (Hemmi *et al.*, 2004). In einem 200 μl -Standard-Reaktionsansatz wurden die in Tabelle 9 aufgelisteten Komponenten eingesetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 9: Reaktionsansatz für den Test auf GGGPS-Aktivität.

Reagenz	Konzentration
Protein (PcrB)	1 μM
GGPP	100 μM
G1P (^{14}C -G1P)	200 μM (12 μM ^{14}C -G1P, ~0,3 μCi)
MgCl_2	5 mM
β -Mercaptoethanol	1 mM
HEPES, pH 7,5	100 mM

Der Anteil von markiertem und nichtmarkiertem G1P ergibt sich aus der Synthese, bei der im kleinen Ansatz markierte und nichtmarkierte Glucose zur Anwendung kam (3.4.1). Nach der Inkubation wurde der Ansatz kurz auf Eis gekühlt und die Produkte extrahiert (3.5.2.5). Die Proben wurden mit Stickstoff getrocknet und in 50 μl NEB Puffer 3 aufgenommen und die Produkte mit 1 μl (10 U) alkalischer Phosphatase (CIP) 1 h bei 37°C dephosphoryliert. Die Produkte wurden erneut extrahiert, eingetrocknet und in 20 μl Methanol/Chloroform, 2:1 (v/v) aufgenommen. Die Analyse erfolgte über Dünnschichtchromatographie (3.5.2.7) auf Kieselgel 60 mit Ethylacetat/Hexan, 1:1 (v/v). Die Detektion erfolgte über Autoradiographie (PACKARD BioScience Cyclone *phosphorimager* System). Zur Quantifizierung wurde die Schwärzung des Autoradiogramms mit dem Programm OptiQuant (Vers. 2.50, PACKARD BioScience) unter Abzug des Hintergrunds bestimmt.

3.5.2.4 Test verschiedener Polyprenyl-PP als Substrat für PcrB

Die über eine mutierte Geranylgeranyl-PP-Synthetase (3.4.3) hergestellten Polyprenyl-PP (C_{10} - C_{30}) wurden verwendet, um die Längenabhängigkeit der Prenyltransferase-Reaktion von PcrB, afGGGPS und der afGGGPS_W99A Mutante zu ermitteln. Dazu wurde der präparative Ansatz aus 3.4.3 ohne weitere Aufarbeitung geteilt. Zu den einzelnen Aliquots wurden je 10 mM ^{14}C -G1P und entsprechend 1 μM eines der Enzyme zugegeben. Die Reaktion wurde eine weitere Stunde bzw. ∞ bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Reaktion durch die Extraktion der Produkte (3.5.2.5) gestoppt und über Dünnschichtchromatographie an RP C_{18} -Platten (MACHERY-NAGEL) mit Aceton/Wasser, 9:1 (v/v) als Laufmittel (3.5.2.7) und Autoradiographie analysiert.

3.5.2.5 Extraktion von Lipiden

Die Extraktion von Lipiden aus Zellen oder hydrophoben Produkten aus Reaktionsansätzen erfolgte über das traditionelle Protokoll von E. G. Bligh und W. J. Dyer (1959), modifiziert nach M. Kates (1986). Dabei ist das Verhältnis der verwendeten organischen Lösungsmittel zu Wasser entscheidend für den Erfolg der Extraktion.

Zur wässrigen Probe (lysierte Zellen oder Reaktionsansätze) wurde zuerst Methanol und dann Chloroform bis zum Verhältnis Methanol/Chloroform/Wasser, 2:1:0.8 (v/v/v) zugegeben und die Probe geschüttelt. Das resultierende Gemisch war einphasig. Anschließend wurde erneut Chloroform und Wasser zugegeben bis zum Verhältnis Methanol/Chloroform/Wasser, 2:2:0.9 (v/v/v). Es zeigte sich bereits die Trennung der organischen von der wässrigen Phase. Durch Zentrifugation (EPPENDORF Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, RT, 10 min) konnte eine vollständige Phasentrennung erreicht werden. Die organische Phase wurde abgenommen, mit Stickstoff zur Trockne geblasen und stellte den Gesamtextrakt.

3.5.2.6 Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) ist eine Probenvorbereitungsmethode in Bezug auf eine mögliche Anreicherung, Aufkonzentration oder Isolation eines Analyten. In dieser Arbeit wurde vor der flüssigchromatographischen Analyse (3.5.2.8) die Lipidextrakte (3.5.2.5) über SPE an Kieselgel 60 (70 – 230 *mesh*, MERCK) aufgrund ihrer Polarität fraktioniert. Dazu wurde in eine ausgebackene Pasteurpipette ein Stück Glaswolle gegeben und anschließend mit bei 100°C aktiviertem Kieselgel 60 (gelöst in Chloroform) befüllt. Der Gesamtextrakt wurde in

einem kleinen Volumen auf die so entstandene Kieselgelsäule aufgetragen. Eluiert wurde anschließend mit 5 ml Aceton. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die so erhaltene Fraktion die apolaren Bestandteile des Extraktes enthalten, während auf der Säule die polaren Moleküle verbleiben. Diese können mit 5 ml Methanol eluiert werden. Abschließend wurden die Fraktionen auf das Ausgangsvolumen einkonzentriert und weiter analysiert.

3.5.2.7 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie mit Kieselgelplatten ist eine Form der Adsorptionschromatographie. Diese beruht auf der unterschiedlichen Verteilung der einzelnen Komponenten an einem Trägermaterial (Adsorptionsmittel Kieselgel). Es stellt sich ein temperatur- und konzentrationsabhängiges Gleichgewicht der Moleküle zwischen gelöstem und reversibel adsorbiertem festen Zustand ein. Bei den Kräften, die für die adsorptive Bindung verantwortlich sind, handelt es sich meist um elektrostatische, also Ionen-Dipol- oder Dipol-Dipol-Kräfte. Bei der Adsorption konkurrieren Lösungsmittel und gelöster Stoff um die Bindungsstellen des Trägermaterials, wobei die Stärke eines Lösungsmittels durch dessen Polarität gegeben ist. Die verwendete Dünnschichtchromatographie wurde besonders seit 1958 durch Egon Stahl (Standardwerk: „Dünnschicht-Chromatographie“, 1967) und die kommerzielle Herstellung von Kieselgelplatten durch die Firma Merck, Darmstadt, wesentlich ausgebaut.

Die Dünnschichtchromatographie eignet sie sich hervorragend für die Analyse der katalytischen Aktivität von PcrB, da durch sie zugleich schnell, reproduzierbar und zudem ohne Kontamination von Pumpen und Detektoren radioaktive Moleküle analysiert werden können. Standardmäßig wurde dabei Kieselgel 60 als stationäre Phase und Ethylacetat/Hexan, 1:1 (v/v) als mobile Phase verwendet (3.5.2.3). Dabei ist zu beachten, dass die polaren Phosphatgruppen der Produkte vor der Analyse über alkalische Phosphatase abgespalten werden müssen, um eine Auftrennung auf der polaren Phase zu ermöglichen. Zur Anwendung kamen neben gleichmäßigen Kieselgel 60-Platten auch solche, die mit einer Konzentrierungszone aus Kieselgur ausgestattet waren. Diese führt zu einer Aufkonzentrierung der Probe an der Kante vom Kieselgur der Konzentrierungszone zum Kieselgel 60 der Trennzone.

Für die Analyse der Substratlängenbegrenzung von PcrB, afGGGPS und afGGGPS_W99A wurden *reversed phase* Platten mit C₁₈-Beschichtung und dem Laufmittel Aceton/Wasser, 9:1 (v/v) verwendet (3.5.2.4).

Die Plattengröße orientierte sich an der Anzahl der zu analysierenden Proben. Die verwendeten Aluminiumplatten (MERCK, Darmstadt und MACHERY-NAGEL, Düren) konnten dazu leicht auf die gewünschte Größe zugeschnitten werden. Das Laufmittelgemisch wurde bis zu einem Tag vor der eigentlichen Entwicklung des Chromatogramms in die Standardchromatographie-Kammer gegeben, um die Sättigung dieser sicherzustellen.

3.5.2.8 HPLC-Analytik

1969 war die industrielle Herstellung von Packungsmaterialien mit Korngrößen $\leq 10 \mu\text{m}$ (LiChrosorb, MERCK, Darmstadt) Ausgangspunkt für die Weiterentwicklung der bislang gängigen Flüssigchromatographien zur HPLC. Bei der HPLC-Analytik können die verschiedenen Komponenten eines Reaktionsansatzes oder eines Substanzgemisches mit sehr hoher Empfindlichkeit und Trennschärfe detektiert werden. Dabei wird die Probe chromatographisch auf einer Säule getrennt und durch Absorptions-, Fluoreszenz- oder Scintillationsmessung ein Elutionsprofil des Laufs erstellt. Je nach den zu trennenden Substanzen werden verschiedene Typen von Säulen und Laufmitteln eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich die *reversed phase*-Technik verwendet. Beim Säulenmaterial handelt es sich um Kieselgele, die mit langen Kohlenwasserstoffketten modifiziert wurden. Dadurch erhält man eine apolare Oberfläche, an die Substanzen durch hydrophobe Wechselwirkungen binden können. Zur Elution wird häufig die Gradiententrennung mit einem wässrigen Puffer und einem organischen Lösungsmittel verwendet. Durch Zumischen des organischen Lösungsmittels zur wässrigen Phase sinkt die Polarität des Laufmittels, wodurch seine Elutionskraft steigt. Die an die Säule gebundenen Substanzen eluieren also gemäß ihrer Polarität, wobei sich polare Stoffe vor den unpolaren von der Säule lösen.

Ebenso kann ein solches System isokratisch betrieben werden. In diesem Fall erfolgt die Trennung über die unterschiedliche Adsorption der Moleküle an der Säulenmatrix. Sie werden wie bei der Dünnschichtchromatographie über einen konstanten Lösungsmittelfluss eluiert.

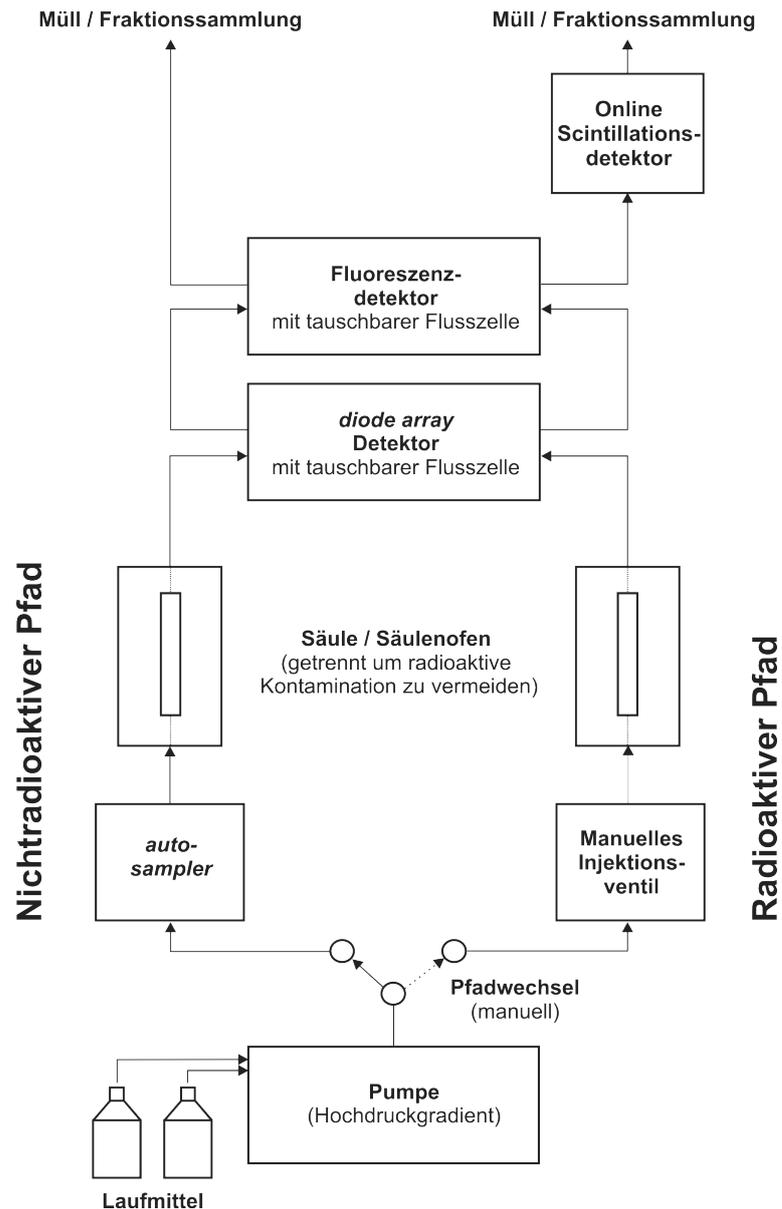


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des verwendeten Hochdruckchromatographiesystems LC 1200 (AGILENT). Das HPLC-System besitzt zwei unabhängige Stränge für die Analyse von radioaktiven und nichtradioaktiven Proben unter Nutzung einer gemeinsamen Pumpe für das Laufmittel. Injektion und Säulen sind getrennt, um radioaktive Kontamination des nichtradioaktiven Pfades zu verhindern. Die optischen Detektoren sind mit wechselbaren Flusszellen ausgestattet, um auch hier radioaktive Kontamination zu vermeiden. Der radioaktive Zweig beinhaltet zusätzlich einen *online* Scintillationszähler.

Für die flüssigchromatographische Auftrennung der Lipidextrakte (3.5.2.5) wurde das HPLC-System LC 1200 (AGILENT) verwendet. Es ist konzipiert, radioaktive und nichtradioaktive Proben im gleichen System mit den identischen Pumpen und

Detektoren zu analysieren, ohne es nennenswert zu kontaminieren. Gewährleistet wird diese durch die Möglichkeit, die Flusszellen und Chromatographiesäulen mit geringem Aufwand zu tauschen und dadurch das System von radioaktiv auf nichtradioaktiv umzustellen. Nötig ist dazu lediglich eine zweite Flusszelle für die Detektoren, die über zusätzliche Schläuche mit einem zweiten Auftragsventil verbunden ist. Zur Radiodetektion ist ein *online* Feststoffscintillationsdetektor (RAYTEST Ramona) vorhanden. Abbildung 9 zeigt den schematischen Aufbau.

Die Analyse der hydrophoben Zellextrakte (3.5.2.5) erfolgte durch deren Auftrennung über eine 4 x 250 mm Kromasil C₁₈-Säule mit 3 µm Partikelgröße (BISCHOFF). Die Proben wurden standardmäßig über entsprechende Spritzenfilter vor dem Auftrag filtriert. Zur Analyse wurde folgendes Programm verwendet:

Zeit [min]	% Laufmittel B		
0	75	Laufmittel A:	Wasser
60	75	Laufmittel B:	Isopropanol
70	100	Flussrate:	0,4 ml/min
80	100	Säulentemperatur:	25°C
90	75	Injektionsvolumen:	5-50 µl
100	75		

Die Detektion erfolgte dabei mittels eines Diodenarray-Detektors (DAD) bzw. dem *online* Scintillationsdetektor *Ramona Star* und das Programm *Gina NT* (RAYTEST). Die zeitliche Verschiebung zwischen dem DAD und dem Radiodetektor wurde bei der Auftragung der Elutionsprofile berücksichtigt. Zur Identifizierung der *peaks* wurden diese getrennt gesammelt und über Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie analysiert.

3.5.2.9 Elektrospray-Massenspektrometrie

Die Elektrospray-Ionisation (ESI) wurde von bereits 1968 von Malcolm Dole und Kollegen (Dole *et al.*, 1968) entwickelt, aber erst von John B. Fenn (Nobelpreis für Chemie 2002) und M. Aleksandrow 1984 in der Massenanalytik etabliert (Fenn *et al.*, 1989, Aleksandrov *et al.*, 1984).

ESI-MS zur Massenbestimmung der identifizierten Produkte von PcrB aus dem Zellextrakt wurde durch Josef Kiermaier (Zentralen Massenanalytik, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg) an dem Triple-Quadrupol Tandem-Massenspektrometer TSQ 7000 (FINNIGAN, THERMO SCIENTIFIC) durchgeführt. Dieser führte auch Fragmentierungsexperimente (ESI-MS-MS) durch, mit deren Hilfe weitere Hinweise auf die Identität der untersuchten Substanzen erhalten wurden.

Zur Präparation der Proben wurde ein Zellextrakt über HPLC aufgetrennt und fraktioniert. Die entsprechenden Fraktionen wurden mit Ammoniumacetat (Endkonzentration 10 mM) versetzt und direkt im positiv-Ionen Modus analysiert.

Hochauflösende massenspektrometrische Messungen der wurden an einem μ TOF-MS-Massenspektrometer (BRUKER) von Prof. Dr. Frank-Michael Matysik (Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg) durchgeführt.

3.5.2.10 NMR-Spektroskopie

Mit der Entdeckung der magnetischen Eigenschaften von Protonen durch Otto Stern (Frisch & Stern, 1933, Nobelpreis für Physik 1943) wurde der Grundstein für die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) gelegt. Den Spin von Atomkernen wies bald darauf Isidor Isaac Rabi nach (Kellogg *et al.*, 1939, Nobelpreis für Physik 1944). Felix Bloch und Edward Will Purcell teilten sich dann 1952 den Nobelpreis für Physik für die Durchführung der ersten NMR Experimente in flüssiger und fester Phase (Bloch & Rabi, 1945, Purcell *et al.*, 1946). Die Entwicklung der Puls-Fourier-Transformation-NMR-Spektrometer (FT-NMR) durch Richard Robert Ernst (Nobelpreis für Chemie 1991), von supraleitenden Magneten und zweidimensionalen Techniken machen die NMR neben der Röntgenkristallographie zu einem wichtigen Analyseverfahren von Molekülstrukturen und führten zu einem weiteren Nobelpreis für Chemie (2002) für Kurt Wüthrich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde NMR-Spektroskopie verwendet, um die Struktur des *in vivo*-Produktes von PcrB in *B. subtilis* aufzuklären. Dazu wurden die gesammelten Produktmengen mehrere präparative HPLC-Läufe vereinigt, eingedampft und um störende Signale zu verhindern, in 200 μ l deuteriertem Chloroform (CDCl_3) aufgenommen. Die Probenmenge wurde anschließend über HPLC-Analyse über den Vergleich mit Geranylgeraniol bekannter Konzentration auf rund 1 mg abgeschätzt. Aufgenommen wurde das Spektrum durch Fritz Kastner in einem CDCl_3 -Shigemi-

NMR-Röhrchen (SHIGEMI INC.) am Avance III 600 (BRUKER; NMR-Abteilung, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg). Tetramethylsilan wurde als interner Standard verwendet. Das verwendete Shigemi-Röhrchen hat dabei die gleichen NMR-spektroskopischen Eigenschaften wie CDCl_3 , was die Verwendung weit geringerer Probenmengen erlaubt.

Ein Protonenspektrum (^1H) enthält diverse Informationen, die zur Strukturaufklärung herangezogen werden können. Die chemische Verschiebung der Signale gibt Auskunft über einzelne Strukturfragmente, die Integrale geben die Zahl der Protonen vor und die Multiplizitäten der Signale ermöglichen Angaben über die Zahl der benachbarten Protonen. Kohlenstoffspektren (^{13}C) geben durch die chemischen Verschiebungen ebenfalls Auskunft über Strukturfragmente.

Daneben wurden auch zweidimensionale Spektren aufgenommen, die durch Korrelation der einzelnen Signale zusätzliche Informationen lieferten und Resonanzüberlagerungen bei größeren Molekülen oder Substanzgemischen entzerren konnten. Das COSY-Experiment (*correlation spectroscopy*), welches die Kopplung zweier Wasserstoffatome im Molekül über zwei (geminal) oder drei (vicinal) Bindungen (skalares Kopplungsnetzwerk) aufzeigt, gehört zu den homonuklearen Experimenten. Zu den heteronuklearen Experimenten zählen unter anderem das durchgeführte HSQC-Experiment (*heteronuclear single quantum coherence*) und das HMBC-Experiment (*heteronuclear multiple bond correlation*). Im ersten werden die Heteroatome und ihre direkt gebundenen Wasserstoffatome korreliert, mit dem zweiten lässt sich die Kopplung eines Protons zu einem Heteroatomen und die Kopplungen zu benachbarten Protonen aufzeigen. Dadurch ist es z.B. möglich, quaternäre Kohlenstoffe zu identifizieren.

4 Ergebnisse und Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der Funktion der bakteriellen PcrB-Proteine am Beispiel von PcrB aus *Bacillus subtilis*. Es handelt es sich dabei um Proteine des $(\beta\alpha)_8$ -Fass-Faltungstyps, eingeordnet in die SCOP-Superfamilie *FMN-linked oxidoreductases*, mit einer hohen Ähnlichkeit zu den Geranylgeranyl-glyceryl-Phosphat-Synthasen (GGGPS) der Archaea.

Im Folgenden ist mit PcrB im Allgemeinen das PcrB-Protein aus *B. subtilis* gemeint. PcrB-Proteine aus anderen Organismen sind mit einer spezifischen Abkürzung gemäß ihrer Herkunft versehen.

Der Analyse von PcrB wurden abschließende Ergebnisse zur Charakterisierung des Proteins AraM aus *B. subtilis* vorangestellt. Das Gen *araM* kodiert in *B. subtilis* eine bakterielle Glycerin-1-Phosphat-Dehydrogenase (G1PDH), deren Funktion bereits aufgeklärt wurde (Guldan, 2007; Guldan *et al.*, 2008). Dieses Enzyms stellt das Substrat G1P für PcrB in *B. subtilis* bereit und bildet somit mit diesem einen neuen Syntheseweg.

4.1 Aufklärung der Funktion von AraM aus *Bacillus subtilis* als erste bakterielle G1PDH

Die mögliche Existenz eines Proteins wie PcrB, das stereospezifisch G1P bindet, setzt gleichzeitig ein G1P produzierendes Enzym im selben Organismus voraus. Im Zuge der Arbeiten an der Aufklärung der Funktion von PcrB konnte mit dem Genprodukt von *araM* aus dem Arabionoseoperon von *B. subtilis* die erste bakterielle G1PDH identifiziert werden (Guldan, 2007; Guldan *et al.*, 2008). Das Protein AraM hat 21 – 24% Sequenzidentität mit den archaellen G1PDH. Die in der Literatur beschriebenen Reste zur Substratbindung sind auch in AraM präsent. Ebenso wie die archaellen G1PDH ist AraM mit den Glycerin-Dehydrogenasen verwandt. Arbeiten zur Lösung der Kristallstruktur in Kooperation Dr. Vanja Kapetaniou (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Rikkert Wierenga, Universität Oulu, Finnland) dauern noch an.

4.1.1 Katalytische Parameter

Das Gen *araM* wurde mittels PCR aus genomischer DNA aus *B. subtilis* amplifiziert, kloniert und in *E. coli* exprimiert. Das Protein wurde über Affinitätschromatographie gereinigt und untersucht. Die Charakterisierung mittels analytischer Größenausschlusschromatographie und Ultrazentrifugation ergab, dass gereinigtes AraM als Homodimer vorliegt. Weiter konnte gezeigt werden, dass AraM das Substrat G1P, nicht jedoch G3P, bindet und mit NADH zu DHAP und NAD⁺ umsetzt (Abbildung 10).

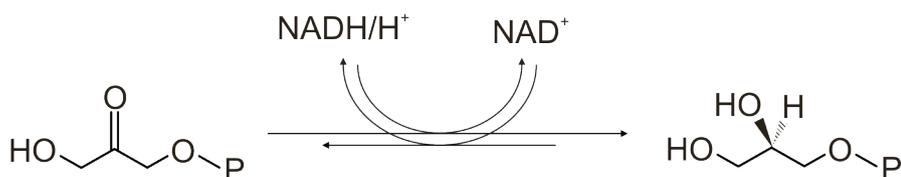


Abbildung 10: Schematische Darstellung der von AraM katalysierten Reaktion. P bezeichnet in der Strukturformel Phosphat.

AraM stellt somit die erste nachgewiesene G1PDH aus der phylogenetischen Domäne der Bacteria dar. Die Reaktion ist reversibel und wurde unter *steady state*-Bedingungen in beide Richtungen gemessen, wodurch die Wechselzahlen für die Hin- und Rückreaktion, sowie die Michaelis-Konstanten für G1P, DHAP, NADH und NAD⁺ bestimmt werden konnten (Guldan, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die katalytischen Parameter mit höherer Genauigkeit erneut bestimmt (3.5.2.1, Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen). Sie sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: *Steady state*-kinetische Konstanten der G1PDH-Aktivität von AraM.

Substrat	K_M [μM]	k_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]
DHAP	8.1 ± 1.5	11.9 ± 0.50	$24,5 \times 10^3 \pm 4,66 \times 10^3$
NADH	16.0 ± 0.9	13.3 ± 0.17	$13,8 \times 10^3 \pm 0,83 \times 10^3$
NADPH	n.b.	n.b.	$108 \pm 27,77$
G1P	1370 ± 160	0.50 ± 0.01	$6 \pm 0,73$
NAD ⁺	59.3 ± 3.0	0.46 ± 0.10	$130 \pm 28,33$

Bedingungen: 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 45 °C, 1 μM (aktive Zentren) AraM. Gezeigt sind die Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen unter sättigenden Konzentrationen an zweitem Substrat (0.25 mM NADH oder 0.1 mM DHAP bzw. 4 mM NAD⁺ oder 10 mM G1P). n.b., nicht bestimmt.

4.1.2 Katalytische Kofaktoren

Alle bisher bekannten archaeellen G1PDH, wie auch die nahe verwandten Glycerin-Dehydrogenasen, benötigen zur katalytischen Aktivität Zn^{2+} (Daiyasu *et al.*, 2002, Han & Ishikawa, 2005; Ruzheinikov *et al.*, 2001). Der erste Hinweis, dass dies im Fall von AraM anders sein könnte, zeigte sich, als das Protein nur dann aktiv war, wenn eine frisch mit Ni^{2+} beladene Metallchelatsäule zur Reinigung verwendet wurde. Um die Metallabhängigkeit von AraM zu testen, wurde die rekombinante Produktion des Proteins in Anwesenheit verschiedener zweiwertiger Metallionen im Kulturmedium durchgeführt. Hochaktive AraM-Präparationen wurden nur bei Ergänzung des Wachstumsmediums mit Ni^{2+} erreicht, während Zn^{2+} und die anderen getesteten Ionen zu keiner signifikanten katalytischen Aktivität führten (Tabelle 11). Daher wurden alle weiteren Kulturen zur Expression von AraM mit 1 mM $NiCl_2$ inkubiert, was reproduzierbar zu Protein mit hoher katalytischer Aktivität führte (festgesetzt als 100%)

Tabelle 11: Abhängigkeit der G1PDH-Aktivität von AraM vom supplementierten zweiwertigen Metallion im Wachstumsmedium

Supplementiertes Kation	G1PDH Aktivität ^b
-	-
alle ^a	+
alle, außer Ni^{2+}	-
Zn^{2+}	-
Ni^{2+} , Zn^{2+}	+
Ni^{2+}	+

^a Zellen zur Expression von AraM wurden in Medium zusammen mit einer Mischung zweiwertiger Kationen (je 1 mM $NiCl_2$, $ZnCl_2$, $CuCl_2$, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $FeCl_2$) inkubiert. ^b (+) Substratumsatz des gereinigten AraM war mindestens 95% des voll aktiven Proteins; (-) Substratumsatz war des gereinigten AraM war unter 5% des voll aktiven Proteins.

Das so gereinigte Protein wurde auch verwendet, um die metallinduzierte Reaktivierung von AraM zu untersuchen. Dazu wurden gebundene zweiwertige Metallionen durch Dialyse gegen 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) mit 50 mM EDTA aus dem Protein entfernt, was zu AraM ohne detektierbare G1PDH-Aktivität führte. Die strukturelle Integrität des Apoenzyms wurde über Fluoreszenzemissions- und Fern-UV-CD-Spektren im Vergleich zu unbehandeltem AraM bestätigt. Der Verlust der katalytischen Aktivität war also nicht mit einer Denaturierung der Polypeptidkette zu

erklären (Daten nicht gezeigt). Das Enzym wurde dann mit verschiedenen zweiwertigen Metallionen titriert, und die katalytische Aktivität unter sättigenden Konzentrationen von DHAP und NADH gemessen (Abbildung 11).

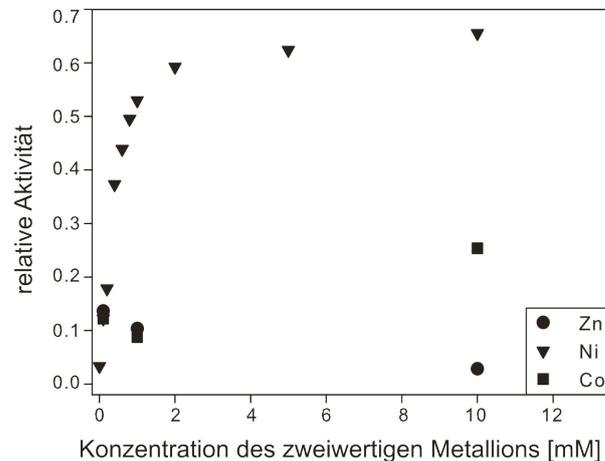


Abbildung 11: Metallabhängige Reaktivierung von AraM nach Inaktivierung mit EDTA. Neben den gezeigten Metallen wurde auch noch Kupfer, Calcium, Magnesium, Mangan und Eisen (II) getestet, ohne jedoch AraM im ähnlichen Maße zu reaktivieren wie Nickel (Guldan, 2007).

Bei der Zugabe von Ni^{2+} konnten 65% der Aktivität des unbehandelten Proteins wieder hergestellt werden. Mit den anderen Metallionen wurden nur maximal 25% erreicht. Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, dass Ni^{2+} der native katalytische Kofaktor von AraM ist und nicht Zn^{2+} wie bei den archaeellen G1PDH.

4.1.3 Quantifizierung der NADH-Bindung an AraM

Bei der Reinigung von AraM fiel auf, dass das Protein im UV-Licht blau leuchtete (Abbildung 12A). Weiterhin war auffällig, dass das Absorptionsspektrum von AraM ein zusätzliches Maximum bei 340 nm besaß, was auf hochaffin gebundenes NADH hindeutete (Abbildung 12B). Deshalb wurden die Eigenheiten der Bindung von NADH an AraM genauer untersucht. Die Fluoreszenz von NADH wird durch die Bindung an das Protein im Vergleich zum freien Molekül ins Kurzwellige verschoben und verstärkt (Abbildung 12C). Vergleichbare Unterschiede in der Fluoreszenz von freiem und proteingebundenem NADH wurden bereits früher beobachtet (Vishwasrao *et al.*, 2005, Fjeld *et al.*, 2003; von Ellenrieder *et al.*, 1972). Dieser Effekt wurde mit der im

Vergleich zum umgebenden Lösungsmittel hydrophoberen Umgebung der Kofaktor-Bindetasche erklärt (Wolff *et al.*, 2000).

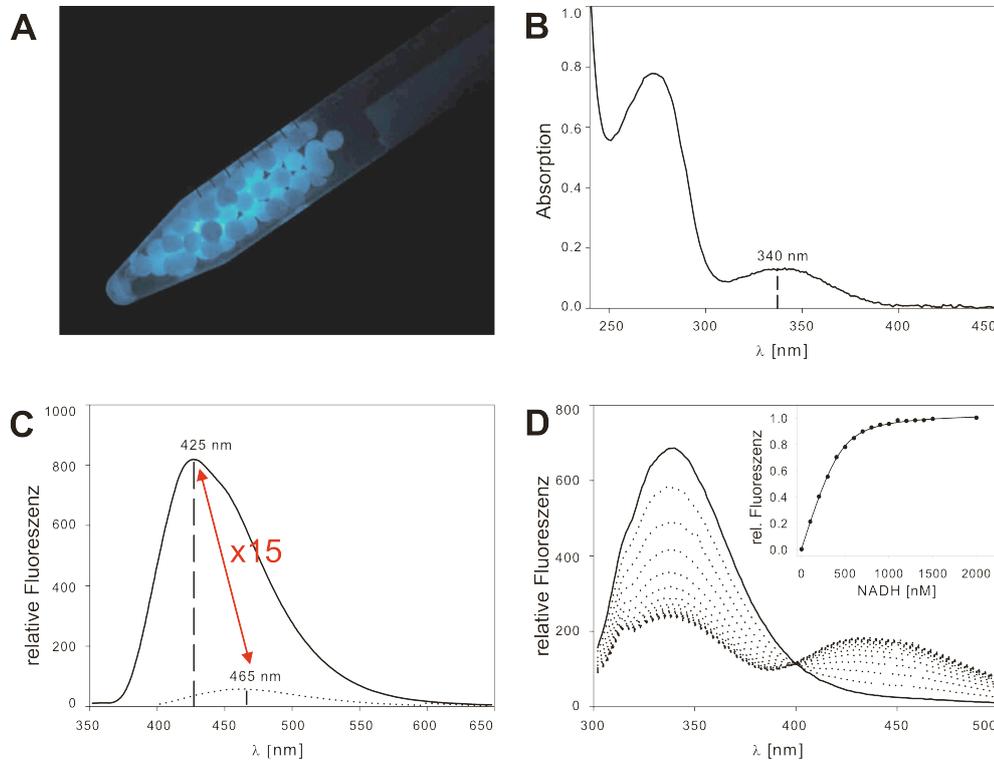


Abbildung 12: Spektroskopische Charakterisierung der NADH-Bindung an AraM. (A) Fluoreszierende, gefrorene Tropfen von AraM-Proteinlösung mit gebundenem NADH bei Anregung bei 366 nm. (B) Absorptionsspektrum von 45 μM AraM. Der *peak* bei 340 nm entspricht 19 μM gebundenem NADH. (C) Fluoreszenzemissionsspektrum von freiem (gestrichelte Linie) und an AraM gebundenem NADH (durchgezogene Linie; je 19 μM) nach Anregung bei 340 nm. Durch Bindung wird das Spektrum ins Kurzweilige verschoben und die Intensität 15-fach erhöht. (D) Die Titration von AraM mit NADH führt zur Abnahme der Proteinfluoreszenz und zur Zunahme der NADH-Fluoreszenz nach Anregung bei 285 nm. Das FRET Signal wurde bei 425 nm analysiert. Aus dem Fit der resultierenden, im Insert gezeigten Bindekurve mit Gleichung 4 (3.5.1.5) konnte der Wert des K_D für NADH mit 53 nM bestimmt werden.

Ein Excitationsspektrum (Emission 425 nm) des AraM-NADH-Komplexes zeigt neben einem Maximum bei 340 nm (Anregung des NADH) ein weiteres, stärkeres Maximum bei 285 nm (Daten nicht gezeigt), welches auf einen Energietransfer von einem Tryptophan aus AraM zum NADH zurückzuführen ist. Damit konnte die Bindung von NADH an AraM über FRET Messungen quantifiziert werden. Um AraM zuvor frei von bereits gebundenem NADH zu machen, wurde dieses über Zugabe von DHAP zum weit

weniger affinen NAD^+ umgesetzt und durch Dialyse entfernt. AraM wurde nun mit NADH titriert, bei 285 nm angeregt und die Zunahme der Fluoreszenz bei 425 nm verfolgt (Abbildung 12D).

Diese Fluoreszenzänderung wurde relativ zur NADH-Konzentration aufgetragen, und der Kurvenverlauf durch Parameteranpassung der quadratischen Ligandenbindungs-Gleichung (Gleichung 4, 3.5.1.5) beschrieben. Der Wert der thermodynamische Dissoziationskonstante K_D konnte so mit 53 ± 5 nM bestimmt werden. Eine derart hohe Affinität eines Proteins zu NADH ist außergewöhnlich, wenngleich sie auch schon in anderen Fällen beobachtet wurde (Bando *et al.*, 2006; Fjeld *et al.*, 2003).

4.1.4 Genomischer *knockout* von *araM*

In der klassischen Genetik wird ausgehend von einem zufällig induzierten Phänotyp nach dem mutierten Gen gesucht. Die Methode der „reversen Genetik“ dreht diesen Ansatz um. Ein Gen wird gezielt deletiert, dann versucht man dieser Deletion einen Phänotyp zuzuordnen.

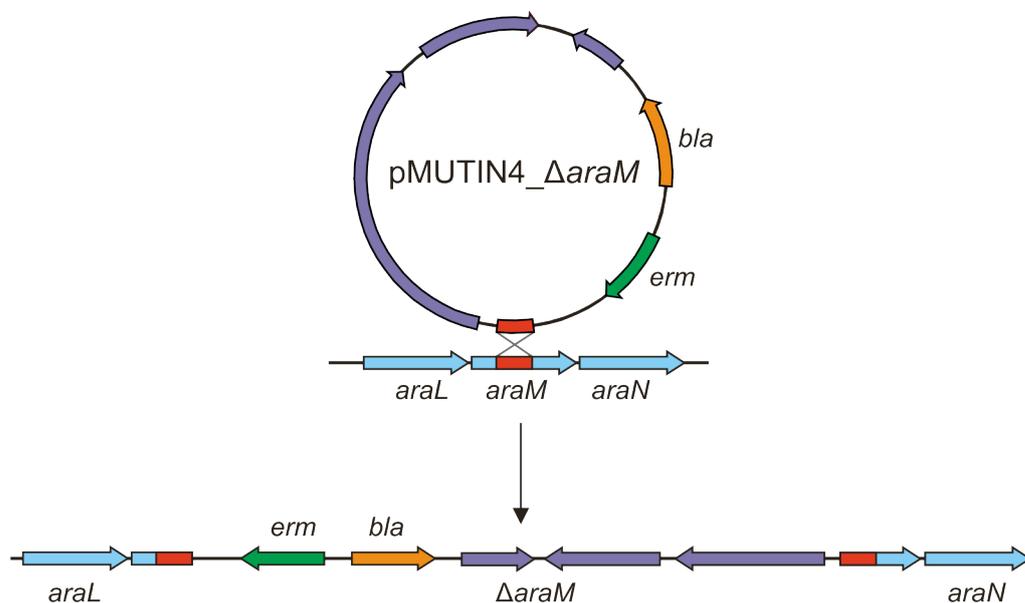


Abbildung 13: Homologe Rekombination von pMUTIN4 in das Zielgen *araM*. Schematisch dargestellt sind *araM*, die flankierenden Gene *araL* und *araN*, sowie das Vektorkonstrukt pMUTIN4_Δ*araM*. In rot ist der Teil des Gens eingezeichnet, über den der Vektor pMUTIN4 über ein homologes Rekombinationsereignis in das Zielgen *araM* integriert. *erm*, Erythromycinresistenz; *bla*, Ampicillinresistenz.

Im konkreten Fall wurde eine genomische *knockout*-Mutante von *araM* über Integration des pMUTIN4-Vektors erzeugt und dieser Stamm phänotypisch auf eine Beteiligung von AraM an der Synthese der Lipoteichonsäuren hin untersucht. Dazu wurde ein 404 Basenpaar langer Abschnitt von *araM* ausgewählt, in den Vektor pMUTIN4 kloniert und *B. subtilis* damit transformiert (3.1.6). Durch Rekombination des Vektors über diesen homologen Bereich in das Zielgen wurde *araM* zerstört und damit seine Expression unterbunden (Abbildung 13). Auf das Integrationsereignis konnte mit Erythromycin und Lincomycin selektiert werden.

Zur Verifizierung der Deletion wurde eine *southern blot*-Analyse durchgeführt. Dazu wurde genomische DNA von putativen Δ *araM*-Zellen mit *EcoRI*, *SnaBI* bzw. *FspI* verdaut, per Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer für *araM* spezifischen 32 P-markierten Sonde hybridisiert (Abbildung 14A).

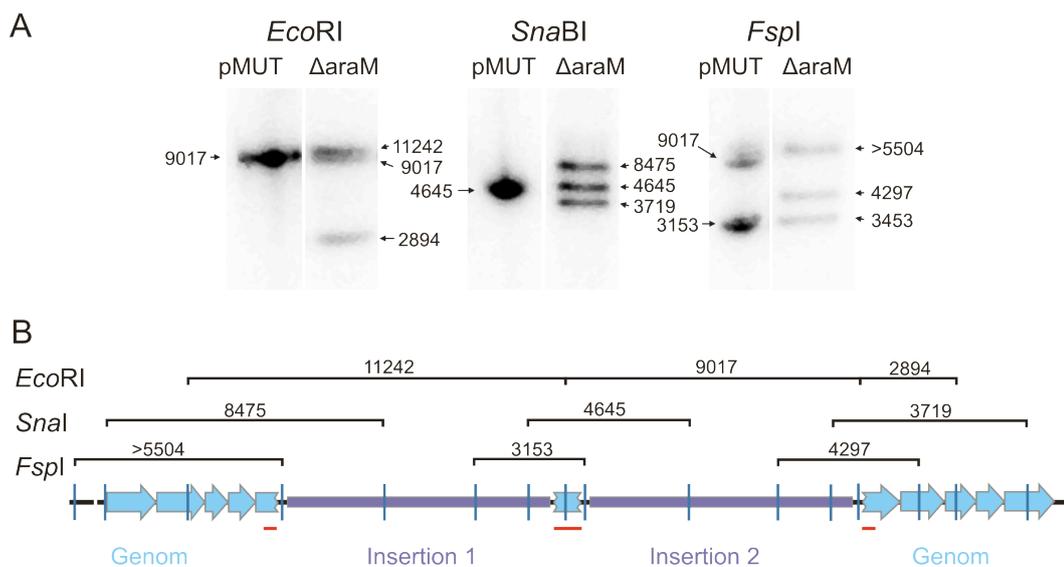


Abbildung 14: Verifizierung der Deletion von *araM*. (A) 1 μ g genomische DNA eines putativen Δ *araM*-Klons und des Plasmids pMUTIN4_ΔaraM (pMUT) wurden für die *Southern Blot*-Analyse mit *EcoRI*, *SnaBI* oder *FspI* verdaut. Die Größen der hybridisierenden Fragmente sind angegeben. Die hybridisierende Bande 9017 im *FspI*-Verdau von pMUT resultiert aus einem unvollständigen Verdau des Plasmids. (B) Schematische Darstellung des Arabinoseoperons bei zweifacher Insertion des Konstruktes pMUTIN4_ΔaraM. In hellblau ist das Genom von *B. subtilis*, in violett der insertierte Vektor, in rot die durch die Sonde erkannten Genbereiche eingezeichnet. Restriktionsschnittstellen sowie die erwarteten Größen hybridisierender Fragmente sind angegeben.

Die hybridisierenden Banden deckten sich unerwarteterweise nur zum Teil mit den berechneten Fragmenten bei einer erfolgreichen Insertion. Sie ließen sich jedoch durch eine Mehrfachinsertion des Vektors in das Genom erklären, da nur so das jeweils mittige Fragment bei den einzelnen Verdauen entstehen konnte (Abbildung 14B).

Damit konnte die Unterbrechung des *araM*-Gens im Genom von *B. subtilis* nachgewiesen werden. Diese Mutante wird im Folgenden als *B. subtilis* Δ *araM* bezeichnet. Sie wurde anschließend für *in vivo*-Experimente zur Aufklärung der Funktion von PcrB als ein Stamm verwendet, der weder eigenes G1P produzieren noch extern zugeführtes G1P abbauen kann. Im ersten Fall wurde somit auch die PcrB Reaktion unterbrochen, da das Substrat G1P nicht mehr gebildet wird. Im zweiten Fall sollte die Menge an markiertem Produkt gesteigert werden, da von außen zugeführtes radioaktiv markiertes G1P vollständig den Umsatz durch PcrB zur Verfügung steht. Die Mehrfachinsertion sollte sich dabei nicht negativ auswirken. Die Disruption von *araM* ist trotzdem gewährleistet und das Plasmid trägt keine für die weiteren Experimente relevanten Gene.

4.1.5 Ausschluss der Beteiligung von AraM an der Synthese der Lipoteichonsäuren

Zuvor wurde jedoch der Frage nachgegangen, ob AraM an der Synthese von Lipoteichonsäuren beteiligt sei. Diese Möglichkeit wurde wegen des Vorhandenseins von G1P in Lipoteichonsäuren in Erwägung gezogen (Guldan 2007). Wäre dies der Fall, dann sollte die *knockout*-Mutante *B. subtilis* Δ *araM* keine oder eine geringere Menge an Lipoteichonsäuren produzieren. Mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen spezifischen Antikörpers gegen die Lipoteichonsäuren von *B. subtilis* wurden der Wildtyp und die *knockout*-Mutante per ELISA (3.5.2.2) analysiert. Es zeigte sich kein Unterschied in der detektierten Menge an Lipoteichonsäuren zwischen den Stämmen (Daten nicht gezeigt), weswegen die Hypothese der Beteiligung von AraM an deren Synthese ausgeschlossen werden konnte. Mittlerweile wurden von der Gruppe um Angelika Gründling und Olaf Schneewind von der Universität Chicago, USA, der Syntheseweg der LTA weitestgehend aufgeklärt (Gründling & Schneewind, 2007).

4.1.6 Zusammenfassung

Mit AraM konnte zum ersten Mal eine Glycerin-1-Phosphat-Dehydrogenase in der Domäne der Bacteria nachgewiesen und charakterisiert werden. Im Gegensatz zu den

archaeellen Vertretern wird bei AraM Nickel statt Zink als katalytischer Kofaktor verwendet. Auffallend ist die hohe Affinität von AraM für NADH. Das Enzym wurde im Folgenden genutzt, um ^{14}C -markiertes Glycerin-1-Phosphat zu synthetisieren.

4.2 Aufklärung der Funktion von PcrB

Die Basis der Aufklärung der Funktion von PcrB aus *B. subtilis* bildete die umfassende Analyse der in der Literatur und den einschlägigen Datenbanken vorhandenen Daten zu dem Protein. Zusammen mit verschiedenen bioinformatischen Analysen sollte die Menge putativer Reaktionen im Vorfeld eingeschränkt werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden die weiteren *in vitro*- und *in vivo*-Experimente geplant und durchgeführt.

4.2.1 Genetischer Kontext und Phylogenie

Im Chromosom von *B. subtilis* ist das Gen *pcrB* gemeinsam mit den Genen einer Helicase, einer Ligase und eines weiteren Proteins unbekannter Funktion in einem Operon organisiert (Abbildung 15).

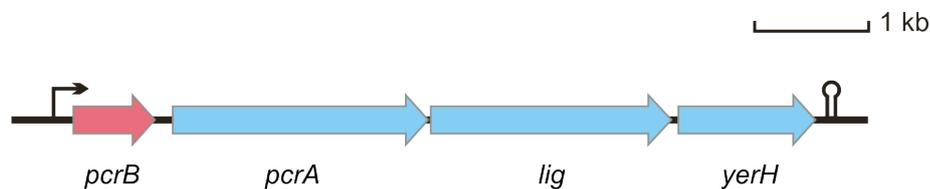


Abbildung 15: Genomische Organisation des PcrB kodierenden Operons.
PcrB ist das erste Gen eines Operons zusammen mit dem Helicasegen *pcrA*, dem Ligasegen *lig* und einem weiteren Gen unbekannter Funktion *yerH*.

Die gleiche Anordnung wurde für die nahe verwandten Genome von *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* und *Listeria monocytogenes* beschrieben (Flannagan & Clewell, 2002) und wurde 2004 für alle weiteren damals identifizierten bakteriellen *pcrB*-Gene bestätigt (Boucher *et al.*, 2004). Der Promotor wurde 37 bp vor dem Startcodon von *pcrB* identifiziert und dessen Stärke über *lacZ*-Fusion und β -Galaktosidase-Assay quantifiziert (Petit *et al.*, 1998). Es zeigte sich, dass es sich dabei um einen schwachen Promotor handelt, der sowohl in der exponentiellen als auch der stationären Wachstumsphase konstitutiv aktiv ist. Somit wird das Gen kontinuierlich abgelesen, was dafür spricht, dass die Funktion von PcrB unabhängig von der Wachstumsphase in

Einige Vertreter der TrpA-Familie, der nächstverwandten ($\beta\alpha$)₈-Fass-Familie (Payandeh *et al.*, 2006), wurden als Außengruppe mit einbezogen. Auf diese Weise lassen sich auf den ersten Blick zwei Hauptgruppen (Abbildung 16; A und B) von PcrB-Proteinen definieren: eine Gruppe A mit bakteriellen Vertretern (in der die Identität innerhalb der bakteriellen Sequenzen bis zu 44% beträgt) und einigen archaeellen GGGPS-Proteinen und eine Gruppe B archaeeller GGGPS-Proteine mit einigen wenigen bakteriellen Vertretern (Nemoto *et al.*, 2003, Boucher *et al.*, 2004). Die archaeellen Proteine um die GGGPS aus *A. fulgidus* (GGGPS_ARCFU, Payandeh *et al.*, 2006, Abbildung 16; A) sind offensichtlich den bakteriellen PcrB ähnlicher (35% Sequenzidentität) als den übrigen archaeellen Homologen der Gruppe B (rund 16% Identität). Bei den bakteriellen PcrB der Gruppe A handelt es sich um Proteine aus Vertretern der Bacillales sowie einem Repräsentanten der Actinobacteria. Durch die identische Anordnung des Gens im Operon in allen Bacillales mit *pcrB* erscheint es plausibel, dass alle bakteriellen PcrB Proteine die gleiche Funktion ausüben. Auf der anderen Seite spaltet sich innerhalb der ansonsten homogenen Gruppe B der archaeellen GGGPS ein Zweig mit bakteriellen PcrB-Proteinen ab, die aus den gram-negativen Spezies der Chlorobi und Bacteroides stammen. Aufgrund der diskreten Abspaltung dieses Astes ist hier horizontaler Gentransfer als Ursache wahrscheinlich (Boucher *et al.*, 2004).

Bei der Verteilung der publizierten GGGPS innerhalb des Baums fällt auf, dass sich die multimeren GGGPS_METTH (Chen *et al.*, 1993; Soderberg *et al.*, 2001, Nemoto *et al.*, 2003) und _THEKO (diese Arbeit) in der Gruppe der überwiegend archaeellen GGGPS (B) wiederfinden lassen, während die Dimere GGGPS_ARCFU (Payandeh *et al.*, 2006) sowie PCRB_BACSU, _GEOKA, _STAAU und _LISMO (diese Arbeit) der Gruppe der mehrheitlich bakteriellen PcrB (A) angehören. Der Oligomerisierungszustand der GGGPS aus *M. thermoautotrophicum* wurde über Größenausschlusschromatographie als Homopentamer bestimmt (Chen *et al.*, 1993). In dieser Arbeit wurde das Protein erneut gereinigt und ebenfalls über Größenausschlusschromatographie der Oligomerisierungszustand bestimmt. Ebenso für die GGGPS aus *T. kodakarensis* (GGGPS_THEKO). Beide Proteine konnten als Homotetramer bestimmt werden. Eine abschließende Klärung des Oligomerisierungszustands sollte mit Lösung der Kristallstruktur der GGGPS aus *M. thermoautotrophicum* in Kooperation mit Dr. Vanja Kapetaniou möglich sein.

Unabhängig von diesen offenen Fragen könnte der Sequenzunterschied, der bei der phylogenetischen Analyse zu der klaren Trennung dieser beiden Gruppen führt, Ausdruck eines unterschiedlichen Oligomerisierungszustands sein (Nemoto *et al.*, 2003; Payandeh *et al.*, 2006).

4.2.2 Sequenzanalyse und G1P-Bindestelle

Der erste Schritt zur Funktionsaufklärung von PcrB war die Analyse der putativ an der Substratbindung beteiligten Reste des Proteins. In einem multiplen Sequenzalignment von ausgewählten bakteriellen PcrB Proteinen und archaeellen GGGPS sind die G1P-bindenden Reste weitgehend konserviert (Abbildung 17).

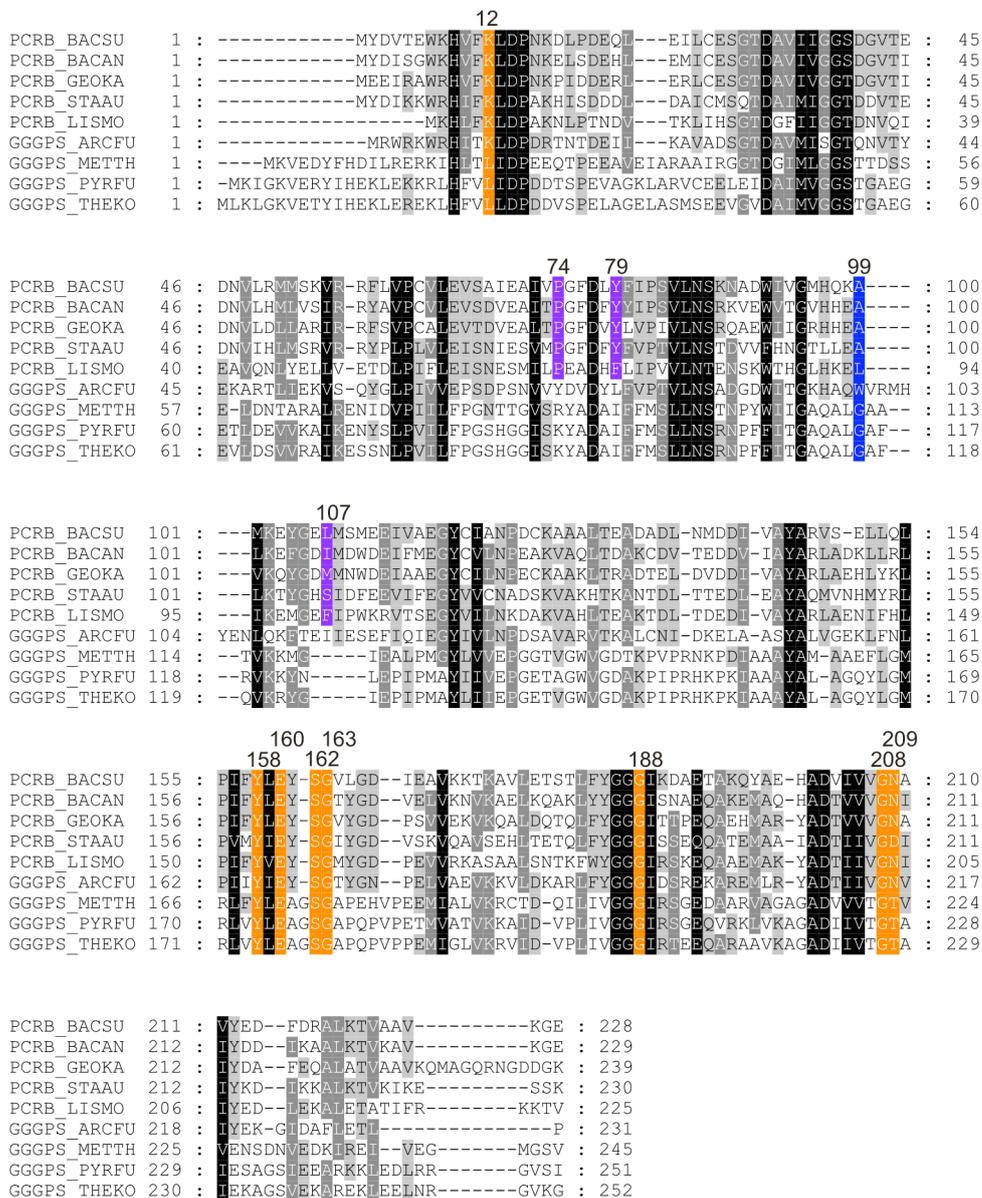


Abbildung 17: Multiples Sequenzalignment verschiedener PcrB-Proteine aus Bacteria und ihrer homologen GGGPS aus Archaea. In der Struktur von afGGGPS (2F6U) identifizierte G1P-bindende Reste sind orange markiert. Die Reste, die bei der Bindung des hydrophoben Polyprenylsubstrates beteiligt sein könnten (4.5), sind violett markiert. Die Position des bei afGGGPS längenbegrenzenden Trp ist blau markiert. Die Konserviertheit der Aminosäuren ist im Farbverlauf von schwarz bis grau wiedergegeben. Die angegebene Nummerierung der Reste bezieht sich auf PcrB aus *B. subtilis*. Die Namens-kürzel entsprechen dem UniProt-Eintrag der Proteinsequenzen folgender, in der weiteren Analyse berücksichtigter Spezies unterteilt entsprechend Abbildung 16 in Gruppe A: *B. subtilis* (PCRB_BACSU), *B. anthracis* (PCRB_BACAN), *G. kaustophilus* (PCRB_GEOKA), *S. aureus* (PCRB_STAAU), *L. monocytogenes* (PCRB_LISMO) *A. fulgidus* (GGGPS_ARCFU); und Gruppe B: *P. furiosus* (GGGPS_PYRFU), *M. thermoautotrophicum* (GGGPS_METTH), *T. kodakarensis* (GGGPS_THEKO). Das Alignment wurde mit T-COFFEE erstellt.

Diese Konservierung findet sich auch in den Kristallstrukturen von PcrB und afGGGPS wieder: Die Reste, die in der holo-Struktur von afGGGPS das Substrat G1P koordinieren, können mit den korrespondierenden Resten der apo-Struktur von PcrB nahezu perfekt zur Deckung gebracht werden (Abbildung 18). Das lässt darauf schließen, dass G1P ein Substrat von PcrB darstellt.

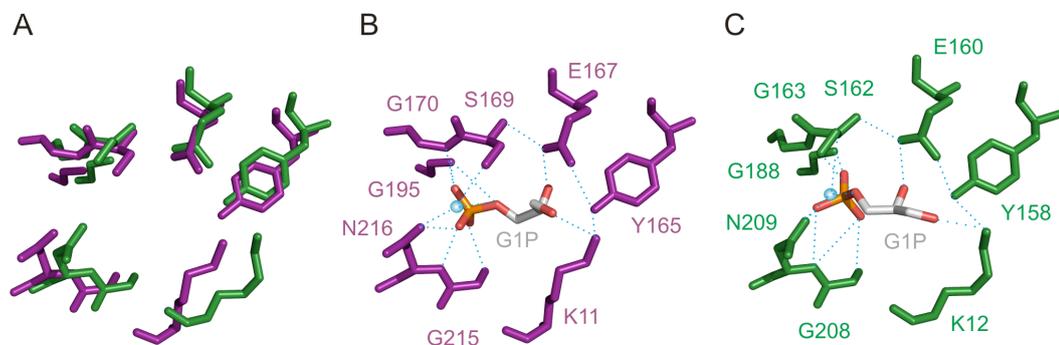


Abbildung 18: G1P-bindende Reste. (A) Superpositionierung der Strukturen von PcrB (1VIZ, grün) und afGGGPS (2F6U, violett). (B) Bindung von G1P an afGGGPS laut gelöster Struktur (2F6U). (C) Modell der Bindung von G1P an PcrB. Wasserstoffbrückenbindungen sind hellblau dargestellt. Die blaue Sphäre in beiden Strukturen bezeichnet ein für die Bindung wichtiges Wassermolekül.

Auffallend ist zudem eine Art Bruch im Alignment (Abbildung 17) zwischen den Sequenzen der Gruppe A (*B. subtilis*, *B. anthracis*, *G. kaustophilus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *A. fulgidus*) und der Gruppe B (*P. furiosus*, *M. thermoautotrophicum*, *T. kodakarensis*) definiert gemäß ihrer Anordnung im phylogenetischen Baum (Abbildung 16). Es fällt auf, dass neben den stark konservierten Resten der G1P-

Bindung viele weitere Reste nur innerhalb der Sequenzen der einen oder anderen Gruppe konserviert sind. Auch ist die Einführung von *gaps* in die Sequenzen der Gruppe A nötig um sie mit den Sequenzen der Gruppe B zu alignieren. Unter der Annahme, dass es sich bei den Vertretern der Gruppe B durchwegs um höheroligomere (vermutlich homotetramere) Proteine handelt, ist dieser Bruch Ausdruck der verschiedenen Oligomerisierungsgrade und der damit verbundenen unterschiedlichen Anordnung von Aminosäuren zur Ausbildung einer zusätzlichen Interaktionsfläche.

4.2.3 Polyprenyl-PP-Bindestelle und Begrenzung der Substratlänge

Das zweite Substrat der archaeellen GGGP-Synthasen ist das C₂₀-Polyprenylpyrophosphat GGPP.

Durch eine Überlagerung der Kristallstrukturen von PcrB und afGGGPS wurde untersucht, inwieweit dessen Bindestelle auch bei PcrB erhalten ist (Abbildung 19).

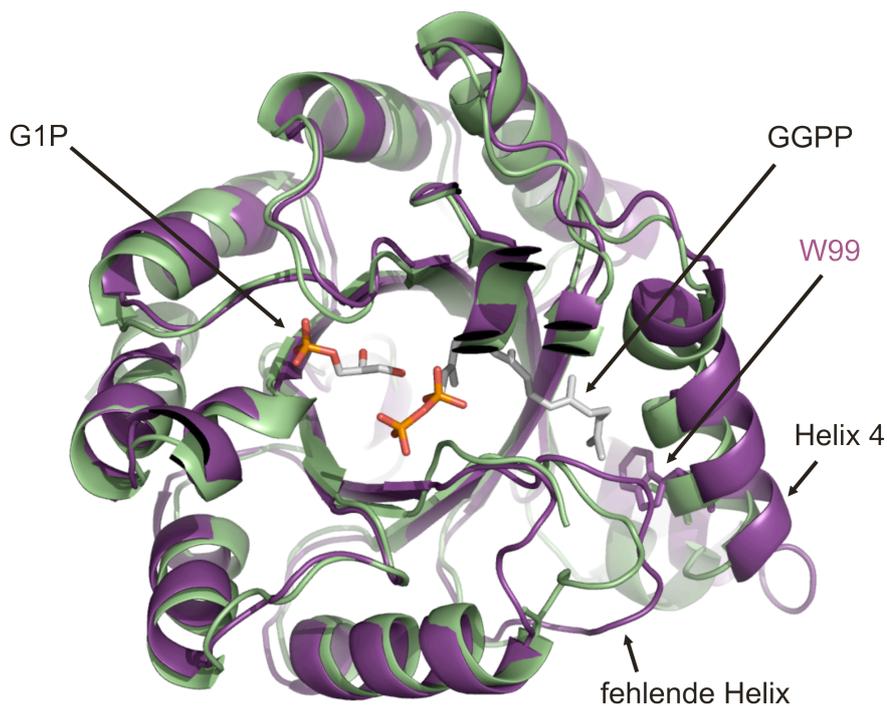


Abbildung 19: Superpositionierung der Kristallstrukturen von PcrB (1VIZ, grün) und afGGGPS (2F6U, violett). Die α -Atome überlagern mit einem RMSD von 1,15 Å. Gezeigt sind die an afGGGPS gebundenen Substrate G1P und GGPP, eingefärbt entsprechend CPK-Konvention (Corey & Pauling, 1953, Koltun, 1965). Die Bindestasche für GGPP wird durch den Tryptophanrest W99 auf die Länge eines C₂₀-Polyprenyl-PP begrenzt. Ein analoger Rest ist in PcrB nicht vorhanden.

In der Struktur wurde eine lange hydrophobe Kuhle identifiziert, über welche GGPP gebunden wird. Ermöglicht wird die Ausbildung dieser Kuhle durch das Fehlen der α -Helix 3 im Vergleich zum $(\beta\alpha)_8$ -Fass Prototypen und durch die Einführung eines zusätzlichen *loops* in der folgenden α -Helix 4. In afGGGPS wird zur Begrenzung dieser Bindestelle auf die Länge des C₂₀-GGPP für das abschließende Tryptophan 99 die Funktion eines *hydrocarbon rulers* postuliert (Payandeh *et al.*, 2006), was im Rahmen dieser Arbeit experimentell verifiziert werden konnte (4.3.6). Als Reaktionsmechanismus der Kondensation von G1P und GGPP wird eine elektrophile Alkylierung vermutet (Chen *et al.*, 1993; Soderberg *et al.*, 2001; Zhang & Poulter, 1993c). Dabei ist die exakte Positionierung von G1P zu GGPP für die effektive Reaktion essentiell (Payandeh *et al.*, 2006), die über den Tryptophanrest geleistet werden könnte. Dieser würde damit nicht nur die Länge, sondern auch die optimale Lage des hydrophoben Polyprenylpyrophosphatsubstrates im aktiven Zentrum definieren.

Im Alignment (Abbildung 17) ist dieser Rest bei den nahe zu afGGGPS verwandten dimeren GGGPS der Gruppe A konserviert, während er sowohl bei den entfernter verwandten GGGPS der Gruppe B als auch bei den dimeren bakteriellen PcrB der Gruppe A durch Alanin/Glycin/Leucin ersetzt ist. Diese Reste können die Längenbegrenzung aufgrund der geringen Größe ihrer Seitenketten nicht leisten. Die charakterisierten entfernter verwandten GGGPS liegen hingegen vermutlich als Tetramere vor und damit könnten die Länge der Substratbindetasche durch die Interaktion der Protomere beeinflusst werden.

4.2.4 Hypothese zur Funktion von PcrB

Aus der umfassenden Analyse von PcrB anhand der Sequenz und Struktur kann eine Hypothese zur Funktion von PcrB formuliert werden.

Alle Daten deuten darauf hin, dass PcrB die Kondensation von Glycerin-1-Phosphat an ein Polyprenylpyrophosphat katalysiert. Das Fehlen der Längenbegrenzung der hydrophobe Kuhle deutet darauf hin, dass letzteres mehr als 20 Kohlenstoffatome umfasst. Die Bindung und stabilisierende Eigenschaft von racemischen Glycerinphosphat an PcrB konnte bereits über tryptischen Verdau nachgewiesen werden (Guldan 2007; Daten nicht gezeigt). Ebenfalls stabilisierend wirkte hierbei die Inkubation von PcrB mit dem zweiten Substrat der archaellen GGGPS, dem Geranyl-

geranylpyrophosphat. Zusammenfassend sollte PcrB in der Lage sein, die GGGPS-Reaktion zu katalysieren. Diese Hypothese wurde im Folgenden experimentell überprüft.

4.3 Biochemische und biophysikalische Charakterisierung von PcrB

4.3.1 Klonierung, Expression und Reinigung von PcrB- und GGGPS-Proteinen

Eine Voraussetzung für die Funktionsaufklärung war die *in vitro*-Charakterisierung des rekombinant hergestellten Proteins. Bereits in vorangehenden Arbeiten (Guldan, 2007) wurde die Gene für PcrB aus *B. subtilis* und afGGGPS in den Vektor pET21a kloniert, in *E. coli* BL21 (DE3) heterolog exprimiert und über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt (3.3.3). Analog dazu wurden nun weitere PcrB- und GGGPS-Vertreter aus anderen Spezies (*B. anthracis*, *G. kaustophilus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* bzw. *A. fulgidus*, *M. thermoautotrophicum*, *T. kodakarensis*) in pET21a kloniert, in *E. coli* NEB T7 Express Zellen heterolog exprimiert und aufgereinigt.

Die Ausbeuten waren mit 50 - 90 mg Protein pro Liter LB Medium konstant auf hohem Niveau. Abbildung 20 zeigt das typische Absorptionsspektrum von sauberem PcrB.

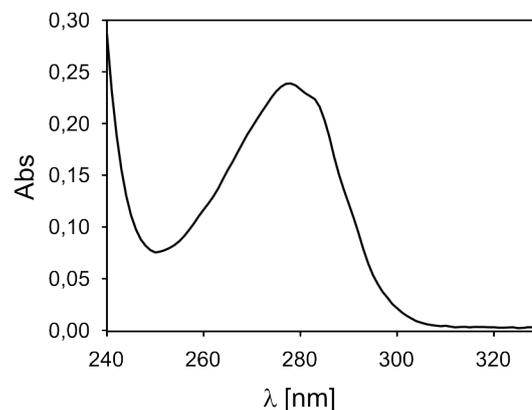


Abbildung 20: Absorptionsspektrum von PcrB (0,24 mg/ml, 9,5 μM) in 50mM KP, pH 8,0. Das Maximum der Proteinabsorption liegt bei 278 nm. Das Spektrum verläuft oberhalb von etwa 305 nm an parallel zur x-Achse, was auf die Abwesenheit von Aggregation hindeutet.

4.3.2 Thermische Stabilität

PcrB und die archaeellen GGGPS stimmen in ihrer Sequenz bis zu 35% überein, ihre Strukturen sind nahezu deckungsgleich. Überlegungen, PcrB sei nach horizontalem Gentransfer aus einem archaeellen Protein hervorgegangen, wurde durch die Analyse ihrer thermischen Stabilität mittels DSC nachgegangen. Sollten die PcrB-Enzyme aus einem archaeellen Vorlaufprotein entstanden sein, könnten sie ähnlich stabil sein wie ihre hyperthermophilen Verwandten. Aus den *scans* der thermischen Denaturierung wurde mithilfe des Programms CpCalc durch einen Fit eines Zweizustandsmodells die apparente Schmelztemperatur $T_{m(\text{app})}$ als ein Maß für die konformationelle Stabilität bestimmt (Abbildung 21).

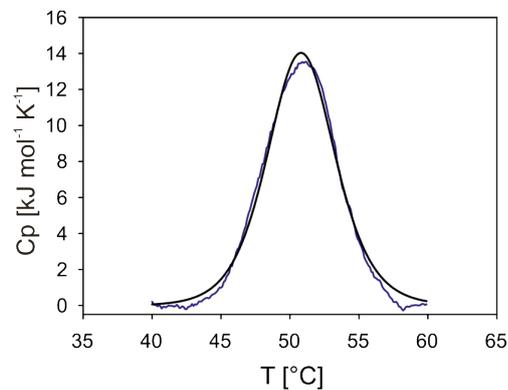


Abbildung 21: DSC-Analyse von PcrB (1,1 mg/ml) in 50 mM KP, pH 8,0. Der thermische Übergang (schwarze Kurve) kann durch ein Zweizustandsmodell (dunkelblaue Kurve) beschrieben werden.

Die apparente Schmelztemperatur beträgt für PcrB 50,8°C und liegt damit nicht außergewöhnlich weit über der optimalen Wachstumstemperatur von 42°C seines mesophilen Wirtes *B. subtilis*. Sollte PcrB durch horizontalen Gentransfer aus einem thermophilen archaeellen Vorläuferprotein entstanden sein, so findet sich in den Daten kein Hinweis in Form von einer erhöhten Schmelztemperatur.

In einem weiteren DSC-Experiment wurde der $T_{m(\text{app})}$ von gkPcrB zu 92°C bestimmt. *G. kaustophilus* ist in der Lage, bei Temperaturen bis 78°C zu wachsen (Takami *et al.*, 2004), dementsprechend ist die Stabilität seiner Proteine und damit auch von gkPcrB, dieser Wachstumstemperatur angepasst. Auf Sequenzebene beträgt die Identität von PcrB aus *B. subtilis* und *G. kaustophilus* 61%. Im Alignment, in *in vitro*- und *in vivo*-

Versuchen wurde kein Unterschied in der katalytischen Aktivität zwischen PcrB und gkPcrB (4.2.2, 4.3.5, 4.4.2) gefunden. Aufgrund der Ähnlichkeit der PcrB-Enzyme zu den GGGPS ergibt sich die Möglichkeit die GGGPS eines thermophilen Archaeons *in vivo* durch das thermostabile gkPcrB zu ersetzen (5.1).

4.3.3 Oligomerisierungszustand

Die beschriebenen archaeellen GGGPS liegen als Homodimer (Payandeh *et al.*, 2006, Nemoto *et al.*, 2003) bzw. als Homopentamer (Chen *et al.*, 1993, Soderberg *et al.*, 2001) vor. Die Struktur von PcrB wurde als Homodimer in der PDB-Datenbank abgelegt (1VIZ, Badger *et al.*, 2005). Der Assoziationszustand aller gereinigten PcrB- und GGGPS-Proteine wurde über analytische Größenausschlusschromatographie an einer Superdex 75-Säule bestimmt. Abbildung 22 zeigt exemplarisch die Elutionsprofile von afGGGPS und PcrB.

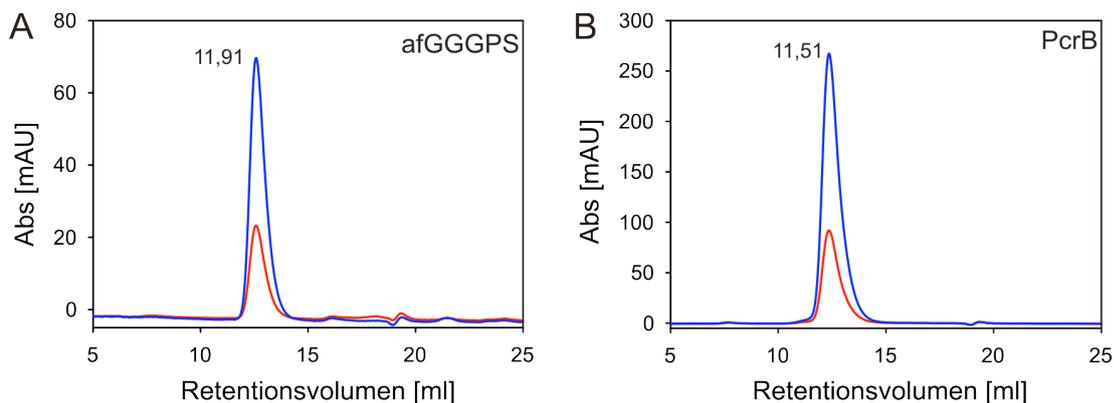


Abbildung 22: Analytische Größenausschlusschromatographie. Elutionsprofile von (A) afGGGPS (0,1 mg) und (B) PcrB (0,4 mg) auf einer Superdex 75-Säule. Die Elution wurde durch die Messung der Absorption bei 280 nm (blau) und 254 nm (rot) verfolgt. Eluiert wurde mit 50 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl und einer Flussrate von 0,5 ml/min.

Die aus den Retentionsvolumina über eine Eichgerade (Anhang 7.3) bestimmten apparenten Massen decken sich mit den berechneten Massen der Homodimere bzw. Homotetramere (Tabelle 12).

Tabelle 12: Retentionsvolumina bei der Größenausschlusschromatographie

an einer analytischen Superdex-75-Säule, apparente und berechnete molare Massen, sowie der abgeleitete Oligomerisierungszustand von verschiedenen GGGPS und PcrB.

	Retentionsvolumen [ml]	apparente molare Masse [kDa]	berechnete molare Masse des Monomers [kDa]	abgeleiteter Assoziationszustand
PcrB	11,51	57	25	Dimer
afGGGPS	11,91	47	26	Dimer
saPcrB	11,96	45	27	Dimer
lmPcrB	11,49	58	25	Dimer
gkPcrB	11,43	59	28	Dimer
mtGGGPS	10,29	106	27	Tetramer
tkGGGPS	10,14	109	27	Tetramer

Das Ergebnis für mtGGGPS widerspricht zwar dem publizierten Pentamer (Chen *et al.*, 1993; Soderberg *et al.*, 2001), stützt dennoch die These, dass die beobachtete phylogenetische Aufspaltung der Proteine der GGGPS- bzw. PcrB-Familie in zwei diskrete Gruppen deren Oligomerisierungszustände widerspiegelt. Die Lösung der Kristallstruktur von mtGGGPS in Kooperation mit Dr. Vanja Kapetaniou sollte Klarheit bezüglich der Form des Oligomers schaffen.

Aus der Struktur von PcrB ist keine sterische Begrenzung der hydrophoben Bindetasche des zweiten Substrats analog zu dem *hydrocarbon ruler* von afGGGPS erkennbar (vgl. Payandeh *et al.*, 2006). Da PcrB ein Homodimer bildet, bestand die prinzipielle Möglichkeit, dass die Substratlänge durch die Interaktion der beiden Protomere begrenzt wird (ähnlich wie bei den Typ II GGPP-Synthasen, Noike *et al.*, 2008). Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden im Rahmen der Diplomarbeit von David Peterhoff (Peterhoff, 2009). weitere *in silico*- und *in vitro*-Untersuchungen zur Dimerisierung durchgeführt (Abbildung 23).

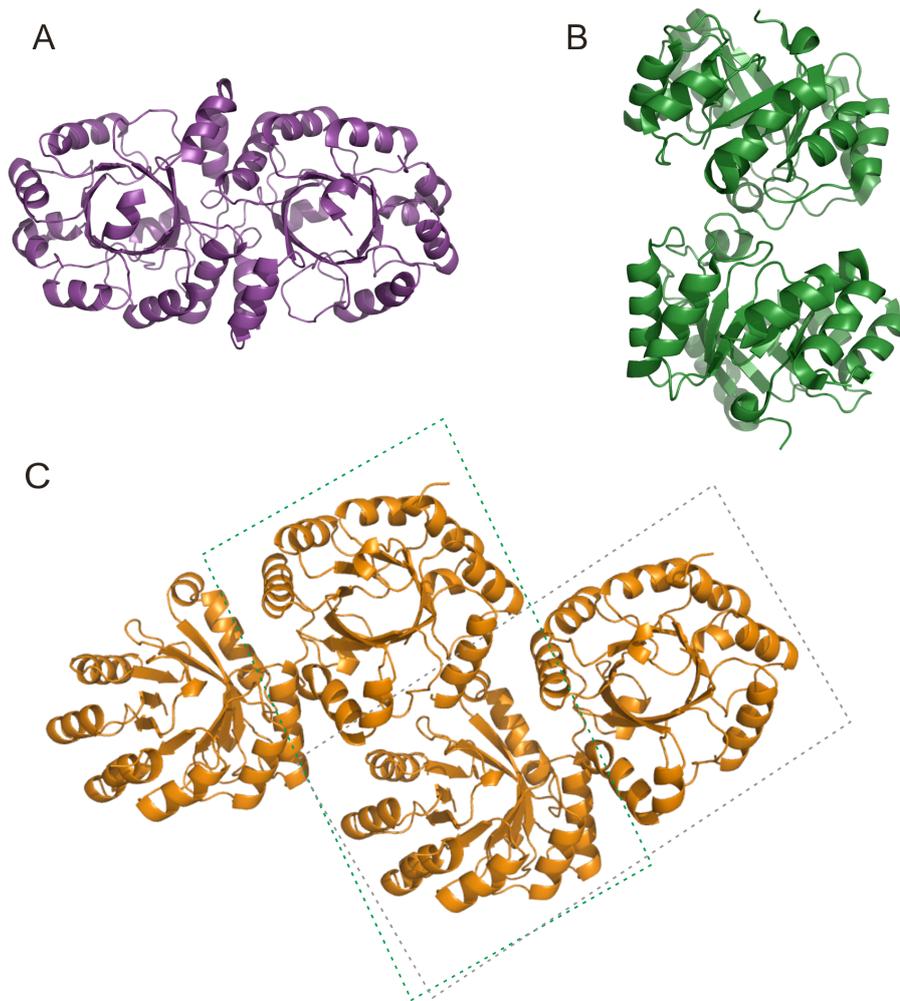


Abbildung 23: Mögliche Dimer-Konfigurationen von PcrB und afGGGPS. (A) afGGGPS-Dimer (nach PDB 2F6X); (B) Dimerisierungs-Konfiguration von PcrB, die in der PDB-Datei 1VIZ annotiert ist; (C) Eine Erweiterung der Elementarzelle zeigt zwei weitere repetitive Einheiten im Kristall von PcrB. Die zugrundeliegenden Dimer-Konfigurationen sind grau und grün eingerahmt (aus Peterhoff, 2009).

Die Struktur von PcrB ist in der PDB-Datenbank als Homodimer abgelegt (1VIZ). Als Dimerisierungsfläche wurde die Helix 5', die vor der eigentlichen α -Helix 5 zusammen mit einem kurzen β -Strang eingeführt ist und über dem aktiven Zentrum zu liegen kommt, angenommen (Abbildung 23B). Diese Konformation erschien von Anfang an als unwahrscheinlich, da die Interaktion nur über einige wenige Reste erfolgte. Aus der Erweiterung der Elementarzelle konnten zwei weitere Dimerisierungsflächen von PcrB abgeleitet werden, eine über die Helices 4 und 5, die zweite über die Helix 2. Während die Erste (Abbildung 23C, grün) homolog zu der Dimerisierungsfläche von afGGGPS

(Abbildung 23A) wäre, würde bei der Zweiten (Abbildung 23C, blau) das andere Protomer gerade gegenüber dem Ende der hydrophoben Kuhle zu liegen kommen und könnte somit deren Länge begrenzen.

Untersuchungen der Oberfläche und der Kontaktflächenresiduen von PcrB durch Hermann Zellner (Lehrstuhl Biochemie II, Universität Regensburg) konnten zwar den Kontakt über die Helix 5' ausschließen, auf der anderen Seite jedoch nicht eine der beiden verbleibenden Kontaktflächen favorisieren. Darum führte David Peterhoff an verschiedene Stellen der putativen Interaktionsflächen nicht-natürliche Aminosäuren ein, die bei definiertem Abstand zum Rückgrat eines Proteins als photoinduzierte bzw. chemische *crosslinker* fungieren können und diese so kovalent verknüpfen. Jedoch konnte auch mit dieser Technik die Frage nach der Interaktionsfläche des Homodimers PcrB nicht abschließend geklärt werden (Details dazu in Peterhoff, 2009).

Über welche Interaktionsflächen die Oligomerisierung der GGGPS zustande kommt, kann nur mit Hilfe der Kristallstruktur der mtGGGPS eindeutig geklärt werden. Die ersten Ansätze in Kooperation mit Dr. Vanja Kapetaniou sind vielversprechend und es ist zu erwarten, dass mittelfristig die Interaktionsflächen der Oligomerisierung und der Mechanismus zur Längenbegrenzung der Substratbindetasche aufgeklärt werden.

4.3.4 Strategie zur Produktidentifizierung über radioaktiv markiertes G1P

Da eines der beiden Substrate von PcrB – G1P – mit sehr großer Sicherheit als bekannt angenommen werden konnte, eröffnete sich die Möglichkeit, das Produkt (und damit auch das zweite Substrat) der PcrB-katalysierten Reaktion über Markierungsexperimente zu identifizieren. Dazu sollte G1P radioaktiv markiert und entweder mit definierten putativen Polyprenylsubstraten oder einem proteinfreien Zellextrakt, der alle möglichen Substrate bereitstellen sollte, gemischt werden. Nach Zugabe von gereinigtem PcrB sollte dann ein radioaktives Produkt entstehen, das so über seine Markierung identifiziert und aufgereinigt werden kann. Alternativ können Zellen auch direkt mit markiertem G1P inkubiert („gefüttert“) werden und das radioaktive Produkt anschließend aufgereinigt werden.

Radioaktiv markierte Substrate eignen sich besonders gut zur Aufklärung von katalytischen Reaktionen. Das Molekül kann ohne Veränderung der Struktur und damit ohne Einfluss auf dessen Umsetzung in putativen Synthesewegen verfolgt werden. Bei

G1P bietet sich eine ^{14}C -Markierung des Kohlenstoffgerüsts an. So kann ausgeschlossen werden kann, dass - wie bei einer Markierung über ^{32}P - die Markierung über eine mögliche Abgangsgruppe verloren wird.

Da ^{14}C -G1P kommerziell nicht verfügbar ist, wurde ein Syntheseweg erarbeitet und optimiert. Dabei wurde ^{14}C -Glucose über die Enzyme des ersten Teils der Glycolyse bis zum ^{14}C -Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) umgesetzt, das dann durch AraM mit NADH stereospezifisch zu ^{14}C -G1P reduziert wurde (Abbildung 24).

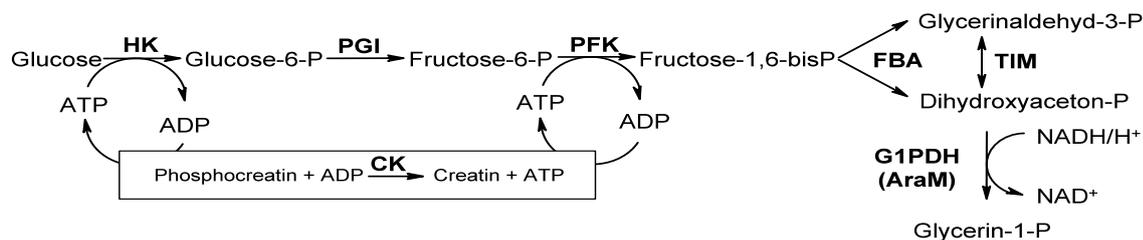


Abbildung 24: Syntheseweg von Glucose zu Glycerin-1-Phosphat. HK, Hexokinase; PGI, Phosphoglucoseisomerase; PFK, Phosphofruktokinase; FBA, Fructosebisphosphataldolase; TIM, Triosephosphatisomerase; G1PDH, Glycerin-1-Phosphat-Dehydrogenase; CK, Creatinkinase.

Die Aufreinigung von ^{14}C -G1P erfolgte über präparative Papierchromatographie (3.4.2) auf Whatman Nr. 1 Chromatographiepapier (WHATMAN) mit Isopropanol/Ammoniak/Wasser, 6:3:1 (v/v/v) als mobile Phase. Etabliert wurde das Laufsystem mit unmarkierten Reinsubstanzen des Eduktes und der Produkte. Diese konnten über ihr Phosphat nach dessen Anfärbung mit Molybdän nach Dittmer & Lester (1964) nachgewiesen werden.

Die Ausbeute an ^{14}C -G1P wurde über die Bestimmung der Radioaktivität ermittelt. Diese lag im Schnitt bei rund 65 - 80% für 100 μl Ansätze mit 10 μCi Glucose. Bei Steigerung der Ansatzgröße auf 1 ml (100 μCi Glucose) verringerte sich die Ausbeute auf 47 - 55%, vermutlich weil beim größeren Ansatz die Kapazitätsgrenze des Chromatographiepapiers erreicht wurde. Bei späteren Reinigungen wurden die Ansätze dementsprechend aufgespaltet. Analog wurde ^{14}C -G3P synthetisiert und gereinigt. Hierzu wurde lediglich im letzten Schritt statt AraM eine kommerziell verfügbare G3PDH eingesetzt.

Die so hergestellten radioaktiv markierten Substrate wurden verwendet, um die katalytische Aktivität von PcrB *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.

4.3.5 Nachweis der stereospezifischen GGGPS-Aktivität *in vitro*

Wie bereits geschildert (4.2.3-4.2.5), könnte PcrB in der Lage sein, zumindest als Nebenaktivität, die Kondensation von G1P mit GGPP zu katalysieren. Die dargestellten Glycerinphosphate konnten nun verwendet werden, um PcrB auf diese GGGPS-Aktivität hin zu untersuchen. Dazu wurde ^{14}C -G1P (bzw. ^{14}C -G3P zum Testen der Stereospezifität) zusammen mit GGPP und PcrB in den GGGPS-Assay (3.5.2.3) eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden identische Ansätze mit afGGGPS inkubiert. Zur Analyse wurden die so gewonnenen Produkte über Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60-Platten (MERCK, Darmstadt) mit Ethylacetat/Hexan, 1:1 (v/v) als mobile Phase aufgetrennt. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um die Auftrennung auf der polaren Kieselgelplatte überhaupt zu ermöglichen. Über das *phosphorimager* System (PACKARD BioScience) wurde das Autoradiogramm digitalisiert und über das Programm OptiQuant (PACKARD BioScience) ausgewertet. Dazu wurden die Intensität quantifiziert und die beiden isomeren Produkte eines Enzyms jeweils als Anteil der Gesamtradioaktivität angegeben. Abbildung 25 zeigt das Ergebnis.

Die Daten belegen, dass PcrB *in vitro*, genauso wie die archaellen GGGPS, G1P-abhängig die GGGPS-Reaktion katalysiert. Es wurde zwar eine geringe G3P-abhängige Katalyse beobachtet, aber mit rund 5 % liegt diese im Bereich der promiskuitiven Aktivität, wie sie bereits für die archaellen GGGPS publiziert ist (Zhang & Poulter, 1993a). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit den PcrB Enzymen aus *B. anthracis*, *G. kaustophilus*, *S. aureus* und *L. monocytogenes* erzielt. In allen Fällen wurde G1P gegenüber G3P bevorzugt.

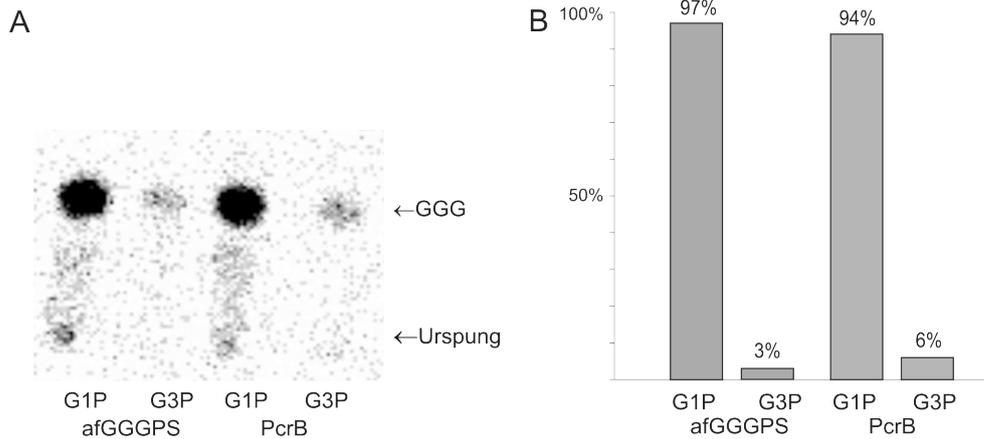


Abbildung 25: Nachweis der GGGPS-Aktivität von PcrB in vitro. (A) Dünnschichtchromatographische Analyse, (B) Quantifizierung der Stereospezifität von PcrB. Der 100%-Wert stellt jeweils die Gesamtradioaktivität des nach Inkubation mit ^{14}C -G1P bzw. ^{14}C -G3P erhaltenden GGG dar. Die durch alkalische Phosphatase dephosphorylierten Produkte (GGG: dephosphoryliertes GGPP) wurden auf Kieselgel 60-Platten aufgetragen, mit Ethylacetat/Hexan, 1:1 (v/v) entwickelt, autoradiographiert und quantifiziert.

4.3.6 Substratkettenslängenbegrenzung bei PcrB und GGGPS

Bereits in den *in silico*-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass an der Position des Tryptophan 99, das in afGGGPS die Länge des Polyprenylpyrophosphatsubstrates auf C_{20} (GGPP) begrenzt, bei PcrB ein Alanin auftritt. Modellierungen ließen den Schluss zu, dass somit bei PcrB die Substratlänge größer als diese C_{20} -Kette sein könnte. Diese Hypothese sollte nun durch *in vitro*-Versuche überprüft werden. Zur Kontrolle wurde durch OE-PCR (3.2.4) die GGGPS-Mutante afGGGPS_W99A erzeugt, bei der das substratlängenbegrenzende Tryptophan 99 gegen Alanin ausgetauscht wurde. Dieses Protein wurde analog zum wildtypischen afGGGPS gereinigt.

Da Polyprenylpyrophosphate länger als C_{20} -GGPP kommerziell nicht verfügbar sind, musste auch ein Enzym, das solche Produkte generieren konnte, kloniert und exprimiert werden. Dazu wurde das Produktspektrum der Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase aus *Sulfolobus acidocaldarius* (sacGGPPS) insofern verändert, als die an zwei Positionen (V73G, F77S) mutierte Form eine Mischung an Polyprenylpyrophosphaten von C_{10} bis C_{30} herstellt (Ohnuma *et al.*, 1998). Längere Substrate als C_{30} lassen sich mit diesem mutierten Enzym auch durch weitere Mutationen nicht in den gewünschten diskreten Verteilungen herstellen (Ohnuma *et al.*, 1998). Die Mutationen V73G und F77S wurden über OE-PCR in das wildtypische Gen eingeführt, dieses in pET21a

kloniert, rekombinant exprimiert und gereinigt. Das gewonnene Enzym wurde verwendet, um aus Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Geranylpyrophosphat (GPP) eine Mischung verschieden langer Polyprenylpyrophosphate (C_{10} , C_{15} , C_{20} , C_{25} , C_{30}) herzustellen. Diese Mischung wurde in gleichen Mengen PcrB, afGGGPS oder afGGGPS_W99A als Substrat für die Verknüpfung mit ^{14}C -G1P angeboten und 1 h bei $37^{\circ}C$ inkubiert. In der anschließenden DC-Analyse der dephosphorylierten Produkte zeigte sich kein Unterschied in der Spezifität zwischen PcrB und afGGGPS, beide produzieren vor allem das C_{20} -Polyprenylglycerin-Derivat ($C_{20}G$), aber auch die kürzeren Polyprenylglycerin-Derivate $C_{15}G$ und $C_{10}G$. AfGGGPS_W99A hingegen konnte erwartungsgemäß längere Substrate mit G1P verknüpfen und sowohl C_{25} - als auch C_{30} -Derivate produzieren (Abbildung 26A). Bei einer Inkubationszeit von 12 h produzierten alle drei Enzyme C_{25} - und C_{30} -Derivate (Abbildung 26B).

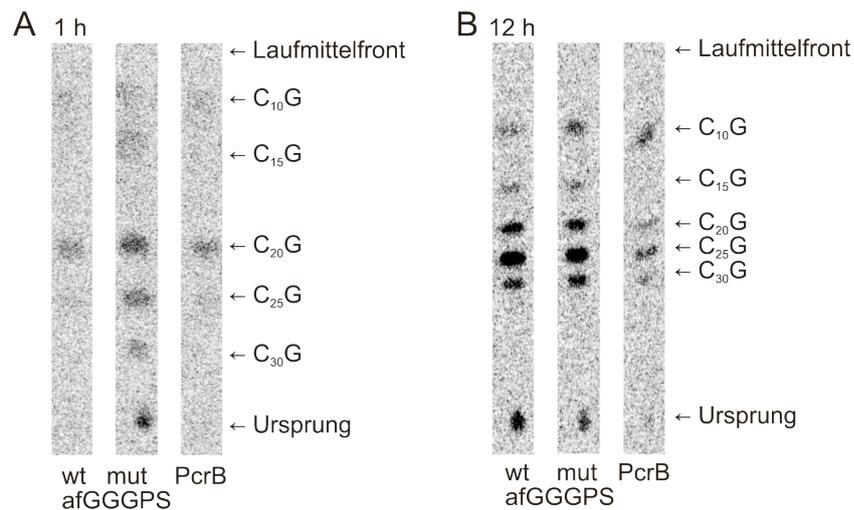


Abbildung 26: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der dephosphorylierten Produkte von je $1 \mu M$ afGGGPS wt, W99A Mutante (mut) und PcrB nach **(A)** 1 h bzw. **(B)** 12 h Inkubation mit ^{14}C -G1P und einer Mischung verschiedener Polyprenylpyrophosphate. C_xG : Polyprenylglycerin der Kettenlänge x. Das Chromatogramm wurde auf RP- C_{18} -Platten mit Aceton/ Wasser, 9:1 (v/v) entwickelt und autoradiographiert.

Das Produktspektrum der afGGGPS_W99A-Mutante beweist die substratlängenbegrenzende Funktion des Tryptophan 99 in afGGGPS und bestätigt damit die Hypothese von Payandeh (Payandeh *et al.*, 2006). PcrB zeigte hingegen keine Präferenz für eines der beiden angebotenen längeren Polyprenyl-PP. Wie auch bei afGGGPS wt

wurden durch PcrB in 1 h nur C₂₀- und erst nach 12 Stunden auch C₂₅- und C₃₀-Polyprenyl-PP mit G1P in nachweisbaren Mengen kondensiert. Aufgrund der gewonnenen Daten können jedoch keine quantitativen Aussagen gemacht werden, denn das Verhältnis der durch sacGGPPS (V73G, F77S) produzierten Polyprenyl-PP zueinander konnte nicht genauer bestimmt werden. Deshalb lassen die Ergebnisse auch keine weiteren Schlüsse über die Länge des nativen Substrates von PcrB zu..

4.4 Reinigung und Identifizierung des *in vivo*-Produkts von PcrB

Basierend auf den Ergebnissen der vorangegangenen *in silico*- und *in vitro*-Analyse der Funktion von PcrB konnten nun gezielt Experimente geplant werden, die die Bestimmung des Produktes (und damit des Substrates) des Enzyms im lebenden Organismus *B. subtilis* ermöglichten. Dazu zählen die Erstellung und Verwendung von genomischen *knockout* Mutanten, *in vivo*-Markierungs- und Komplementationsversuche, sowie die Reinigung und Identifizierung des Produktes aus Zellen über HPLC und spektroskopische Methoden.

4.4.1 *In vivo*-Markierungsexperimente mit ¹⁴C-G1P

Um das zweite Substrat eines Enzyms zu bestimmen, kann man einen proteinfreien Zellextrakt des entsprechenden Organismus herstellen, zusammen mit dem gereinigten Protein und dem bekannten markierten Substrat inkubieren und anschließend das markierte Produkt identifizieren. Im konkreten Falle wurde dieser Ansatz verworfen, da in Vorversuchen zum Zellextrakt zugegebenes GGPP nicht zur Reaktion mit ¹⁴C-G1P kam. Grund dafür könnten Probleme der Löslichkeit des Substrates und die Empfindlichkeit des Pyrophosphates gegenüber Hydrolyse im wässrigen Aufschluss sein.

Deshalb wurde dazu übergegangen, die lebende Zelle direkt mit ¹⁴C-G1P zu füttern. Dazu wurden der Wildtyp und die genomischen *knockout*-Mutanten *B. subtilis* Δ *araM* (diese Arbeit) und Δ *pcrB* (Kobayashi *et al.*, 2003; erhalten von Prof. Michael Hecker, mikrobielle Physiologie und molekulare Biologie, Universität Greifswald) verwendet. Die Zellen wurden über Nacht in 5 ml LB Medium in verschlossenen 50 ml Röhrchen bei 37°C geschüttelt. Zu den Ansätzen wurde jeweils 1 μ Ci ¹⁴C-G1P gegeben. Die Zellen wurden geerntet, mit Lysozym aufgeschlossen und die Lipide extrahiert

(3.5.2.5). Die Extrakte wurden über Dünnschichtchromatographie auf polaren Kieselgel 60-Platten analysiert (Abbildung 27). Die Proben mussten erstaunlicherweise vor der Auftrennung nicht mit CIP dephosphoryliert werden. Wie später gezeigt werden konnte (4.4.7), liegen die Produkte bereits in der Zelle dephosphoryliert vor.

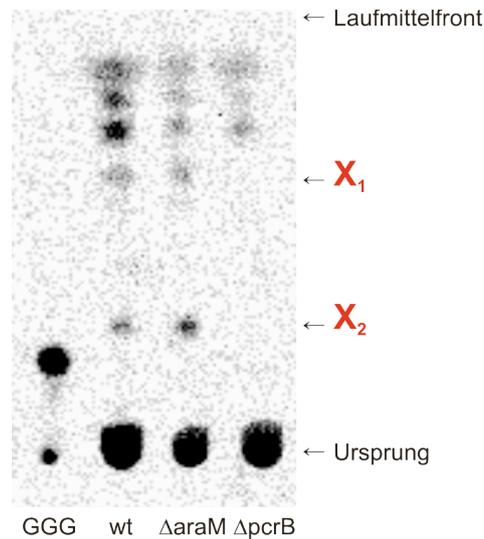


Abbildung 27: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der *in vivo* ^{14}C -markierten Produkte auf Kieselgel 60-Platten. Aufgetragen sind das dephosphorylierte *in vitro* Produkt GGG (vgl. Abbildung 25) sowie die hydrophoben Extrakte aus ^{14}C -G1P-gefüttertem *B. subtilis* wt und der Mutanten ΔaraM und ΔpcrB . X_1 und X_2 bezeichnen die Produkte, die im *B. subtilis* ΔpcrB Stamm im Vergleich zum Wildtyp und dem Stamm ΔaraM fehlen. Das Chromatogramm wurde auf Kieselgel 60-Platten in Ethylacetat/Hexan, 1:1 (v/v) entwickelt und autoradiographiert.

Bei der Zugabe von ^{14}C -G1P zum Stamm *B. subtilis* ΔpcrB kann das *in vivo* Produkt von PcrB nicht mehr gebildet werden. Bei der Analyse der Extrakte sollten somit im Vergleich zum Wildtyp radioaktiv markierte Produkte nicht auftreten. Diese fehlenden Signale identifizieren somit das Produkt von PcrB.

Die nach ihrer Polarität aufgetrennten Extrakte zeigen spezifische Muster, die für den Wildtyp und die *B. subtilis* ΔaraM -Mutante identisch sind. Oberhalb des Ursprungs sind jeweils fünf hydrophobe Produkte zu erkennen, die die in Form von G1P zugeführten ^{14}C -Atome in ihre Molekülstruktur integriert haben müssen. Dem Stamm *B. subtilis* ΔaraM fehlt die Möglichkeit über AraM G1P zu produzieren. Die Zellen sollten somit ausschließlich das extern zugegebene ^{14}C -G1P ins *in vivo* Produkt von

PcrB integrieren. Die Intensität des Radiosignals sollte somit im Vergleich zum Wildtyp höher sein, was aber nur für X_2 der Fall ist. Bei dem Extrakt der Mutante $\Delta pcrB$ treten zwei der fünf hydrophoben ^{14}C -markierte Produkte nicht auf. Diese zwei im Extrakt des Stamms $\Delta pcrB$ fehlenden Substanzen X_1 und X_2 stellen die *in vivo*-Produkte von PcrB im *B. subtilis* Wildtyp dar. Die drei verbleibenden Substanzen, die sowohl beim Wildtyp als auch bei den beiden *knockout* Mutanten auftreten, sind entweder auf ein weiteres G1P umsetzendes Protein in *B. subtilis* zurückzuführen, oder es handelt sich um Produkte promiskuitiver Enzyme. Wie bereits gezeigt werden konnte, setzt PcrB und afGGGPS zu geringen Mengen auch G3P um. Es ist also wahrscheinlich, dass ein hauptsächlich G3P verknüpfendes Enzym auch G1P akzeptiert und das entsprechende Produkt auf dem Autoradiogramm sichtbar ist.

Auf die Isolierung und Identifizierung der beiden Produkte X_1 und X_2 von PcrB fokussierten sich die weiteren Experimente. Die Auftrennung der Extrakte auf der polaren DC zeigt, dass X_2 und vor allem X_1 relativ zu GGG weniger durch die spezifische Adsorption im Lauf verzögert werden, das heißt sie sind weniger polar und damit vermutlich länger.

Einen weiteren Hinweis auf die Natur der *in vivo*-Produkte lieferte der Vergleich von X_2 mit den anderen *in vitro* hergestellten Polyprenylglycerin-Derivaten (Abbildung 26). Dazu wurde X_2 von der Kieselgel 60-Platte abgekratzt, mit Chloroform extrahiert und zusammen mit GGG, sowie den C_{25} - und C_{30} -Derivaten auf eine *reversed phase* C_{18} Platte aufgetragen (Abbildung 28). Aufgrund der geringen Menge konnte die Substanz X_1 nicht von der Platte präpariert und ebenso analysiert werden.

Das Laufverhalten relativ zu den synthetischen Polyprenylglycerinen zeigt, dass X_2 hydrophober als das C_{30} -Derivat ist. Das Produkt muss also entweder mehr als 30 Kohlenstoffatome enthalten, oder so modifiziert sein, dass es auf der *reversed phase* Platte so im Lauf verzögert wird.

Bereits diese Experimente ließen vermuten, dass mit der geringen Menge an markierten Produkten X_1 und X_2 dessen Identifizierung äußerst aufwändig sein würde. Zwar konnte durch die Steigerung der Menge an synthetisiertem ^{14}C -G1P die Markierungseffizienz gesteigert werden, dennoch musste für eine dünnschichtchromatographische Analyse der *phosphorimager screen* mindestens zwölf Stunden aufliegen. Für eine Analyse der

Proben über HPLC und *online*-Scintillationszähler war jedoch selbst die so gesteigerte Menge an Produkt bei Weitem nicht ausreichend.

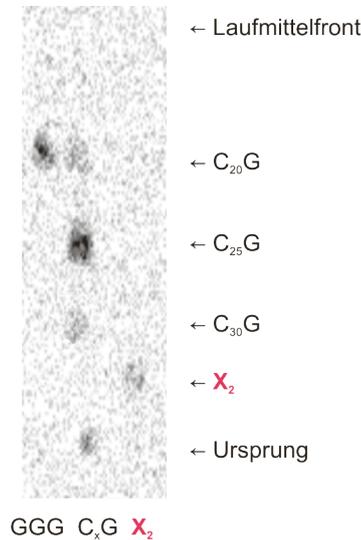


Abbildung 28: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von X₂ im Vergleich zu synthetischen Polyprenylglycerin-Derivaten. Das radioaktiv markierte *in vivo*-Produkt X₂ wurde auf einer RP C₁₈-Platte zusammen mit GGG und einer Mischung von verschiedenen Polyprenylglycerin-Derivaten (C_xG; Abbildung 26) aufgetragen. Das Chromatogramm wurde mit Aceton/Wasser, 9:1 (v/v) entwickelt und autoradiographiert.

4.4.2 Überexpression und Komplementation in *B. subtilis*

Die Promotorstudien von Marie-Agnès Petit und ihren Kollegen (Petit *et al.*, 1998) zeigte eine relativ geringe Expressionsstärke für das gesamte *pcrB*-codierende Operon. Gemäß der Überlegung, dass eine Steigerung der Proteinmenge auch zu einer Steigerung der Produktmenge führen könnte – vorausgesetzt, das noch unbekanntes Substrat liegt in ausreichenden Mengen vor – wurde PcrB in *B. subtilis* in Zusammenhang mit ¹⁴C-G1P Fütterungsexperimenten überexprimiert. Dazu wurde zunächst ein Protokoll zur effizienten Transformation von *B. subtilis* etabliert. Unter Verwendung des für gram-positive Bakterien konstruierten Expressionsvektors pDG148-*StuI* (Joseph *et al.*, 2001) wurde verschiedene Protokolle zur Elektroporation von *B. subtilis* kombiniert und soweit optimiert, bis die Transformation reproduzierbar funktionierte. Über das *ligation independent cloning* wurden *pcrB*, *gkpcrB* (als Kontrolle; vgl. auch 4.3.2, 4.3.5 und 5.1) und das Gen von afGGGPS mit C-terminalem

His₆tag in den Vektor kloniert und die Mutante $\Delta pcrB$ transformiert. Der Erfolg wurde über Kolonie-PCR und *western blot* verifiziert (Abbildung 29).

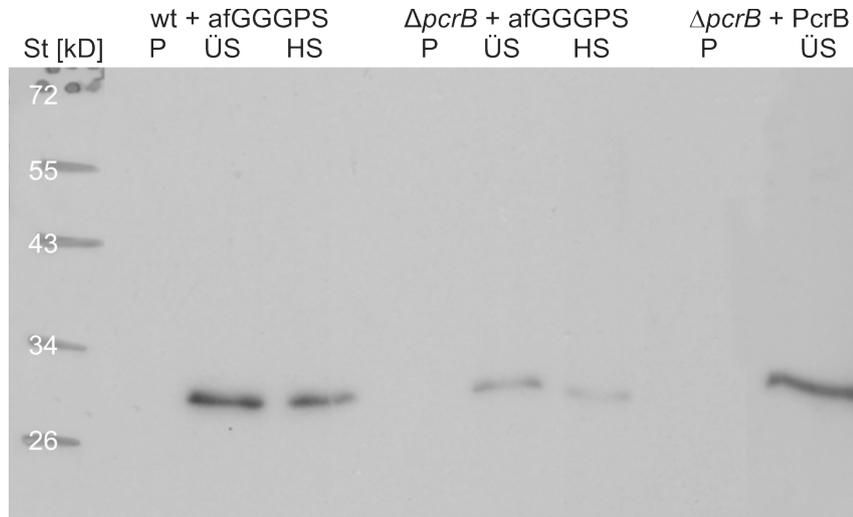


Abbildung 29: Western blot zum Nachweis der Herstellung von PcrB und afGGGPS in *B. subtilis* wt und $\Delta pcrB$. Aufgetragen wurde jeweils die unlösliche (P) und lösliche (ÜS) Fraktion nach Aufschluss, sowie im Fall von afGGGPS eine Fraktion, die einem Hitzeschritt von 10 min 65°C unterzogen wurde (HS). Zur Detektion wurde ein Anti-His-Antikörper gegen den C-terminalen His₆tag der Proteine verwendet. Ein Proteingrößenstandard (St) ist mit Größenangaben aufgetragen.

Die mit den jeweiligen Plasmiden transformierten Zellen wurden 5 ml LB Medium in einem verschlossenen 50 ml Röhrchen mit Erythromycin, Lincomycin, Kanamycin und 10 μ Ci ¹⁴C-G1P angeimpft und bei 37°C inkubiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,7 durch Zugabe von IPTG (3.3.3). Die Zellen wurden anschließend \bar{u} N geschüttelt. Ein Extrakt (3.5.2.5) aus diesen Kulturen wurde auf Kieselgel 60-Platten mit Konzentrationszone aufgetrennt (Abbildung 30).

Durch die Überexpression von PcrB und gkPcrB wurden größere Mengen an X₁ und X₂ in der Zelle produziert, wobei X₂ das Hauptprodukt zu sein scheint. Über X₂ findet sich zudem eine starke Bande X₃, die bislang nicht in Erscheinung getreten war (Abbildung 27). Im Falle der Überexpression von afGGGPS liegt hingegen die prominenteste Bande auf Höhe von GGG, die bei den PcrB-Enzymen nur schwach ausgeprägt ist. Die Bande auf Höhe von X₂ ist wiederum bei afGGGPS schwächer als bei den beiden PcrB-Enzymen. Damit ist gezeigt, dass sowohl GGPP als natives Substrat der afGGGPS als

auch das noch unbekannte Substrat von PcrB parallel in ausreichenden Mengen in der Zelle vorliegen, um nachweisbar zu Produktbildung zu führen.

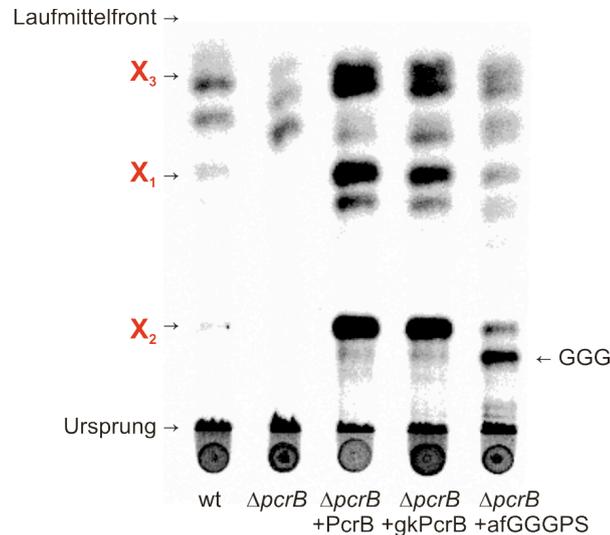


Abbildung 30: Dünnschichtchromatographische Auftrennung gleicher Extraktmengen aus *in vivo* ^{14}C -markierten Zellen. wt, *B. subtilis* wt; ΔpcrB , *B. subtilis* ΔpcrB ; $\Delta\text{pcrB} + \text{PcrB}$, + gkPcrB, + afGGGPS, *B. subtilis* ΔpcrB mit rekombinant exprimierten PcrB, gkPcrB und afGGGPS. Das Chromatogramm wurde auf Kieselgel 60-Platten mit Konzentrierungszone mit Ethylacetat/Hexan, 1:1 (v/v) entwickelt und autoradiographiert.

Das Experiment zeigt zudem eindeutig, dass es sich bei dem *in vivo*-Produkt von PcrB nicht um GGPP handelt. PcrB kann zwar offensichtlich auch die GGGPS-Reaktion *in vivo* katalysieren, bevorzugt jedoch ein anderes Substrat. AfGGGPS katalysiert hingegen die GGGPS-Reaktion auch in *B. subtilis*, dennoch wird auch das unbekannte Substrat, wenn auch in geringeren Mengen, umgesetzt. PcrB und afGGGPS katalysieren also die gleichen Reaktionen, aber mit unterschiedlichen Substratspezifitäten. Zudem sind sie promiskuitiv für das jeweilige native Substrat des anderen Enzyms.

Das eigentliche Substrat von PcrB muss also zu GGPP nahe verwandt sein, aber zugleich ausreichend markante Unterschiede zu diesem aufweisen, so dass PcrB und afGGGPS diese *in vivo* unterscheiden können. Die wahrscheinlichste Hypothese ist, dass es sich um ein Polyprenylpyrophosphat mit mehr als 20 Kohlenstoffatomen handelt.

4.4.3 HPLC-Analyse der radioaktiv markierten Produkte

Da die weitere Analyse der identifizierten *in vivo* Produkte von PcrB über Massenspektrometrie und NMR zur Vermeidung einer Gerätekontamination nur nicht-radioaktiv durchgeführt werden konnte, musste ein Weg gefunden werden, die Produkte „kalt“ in hoher Reinheit und reproduzierbar zu präparieren. Durch die rekombinante Expression von PcrB in *B. subtilis* konnte die Signalstärke der radioaktiv markierten Produkte soweit angehoben werden, dass nun die Trennbedingungen auf ein HPLC-System übertragen werden konnten. Dessen Ausstattung mit Diodenarraydetektor, Fluoreszenzdetektor, *online*-Scintillationsdetektor und die Möglichkeit, radioaktiv markierte und nicht markierte Zellextrakte im gleichen System unter identischen Bedingungen zu analysieren, erlaubt es, dem Radiosignal ein optisches Signal zuzuordnen und somit die Produkte in einem nicht markierten Zellextrakt wieder zu finden (Abbildung 9).

Lipide werden aufgrund ihres hydrophoben Charakters klassischerweise über Normalphasenchromatographie auf polaren Materialien getrennt (Clejan *et al.*, 1986; Jahn *et al.*, 2004; Sturt *et al.*, 2004). Dieser Ansatz wurde in Form der Dünnschichtchromatographie zur Identifikation der Produkte X₁, X₂ und X₃ verwendet. Zhang & Poulter (1993b) trennten Polyprenylpyrophosphate von C₅ bis C₂₅ und GGPP über *reversed phase* HPLC im Acetonitril/NH₄HCO₃-Gradienten auf. Diese Methode konnte in Vorversuchen mit dem archaeellen Substrat GGPP und dem Produkt GGPP nachvollzogen werden. Für die Auftrennung des *in vivo* Extraktes war das Elutionsprofil jedoch nicht geeignet, da zwar 100% Acetonitril das dephosphorylierte GGG noch eluieren konnte, nicht jedoch die noch hydrophoberen Produkte X₁, X₂ und X₃. Es stellte sich heraus, dass ein Gemisch Isopropanol/Wasser 3:1 (v/v) als mobile Phase geeignet ist, den Zellextrakt auf einer *reversed phase* C₁₈-Säule isokratisch aufzutrennen. Um andererseits die verbleibenden polaren Substanzen, die in Vorversuchen zur massiven Erhöhung des Hintergrunds bei der Scintillationsmessung (Verkleben des Detektors) geführt haben, aus dem Extrakt zu entfernen, wurde vor der flüssigchromatographischen Trennung eine Festphasenextraktion (SPE) über aktiviertes Kieselgel 60 durchgeführt (3.5.2.6). Dabei wurde der markierte Zellextrakt auf eine Säule (in Form einer Pasteurpipette) mit aktiviertem Kieselgel 60 aufgetragen und mit steigender Polarität eluiert. Die hydrophoben Anteile des Extraktes mit den Produkten X₁, X₂ und X₃ eluieren mit Aceton, die polaren zum Teil mit Methanol (Abbildung 31).

Im gewählten Laufmittel Ethylacetat/Hexan, 1:1 (v/v) verbleiben die polaren Moleküle am Auftragspunkt der Konzentrierungszone. Die hydrophoben Produkte werden hingegen aufgetrennt.

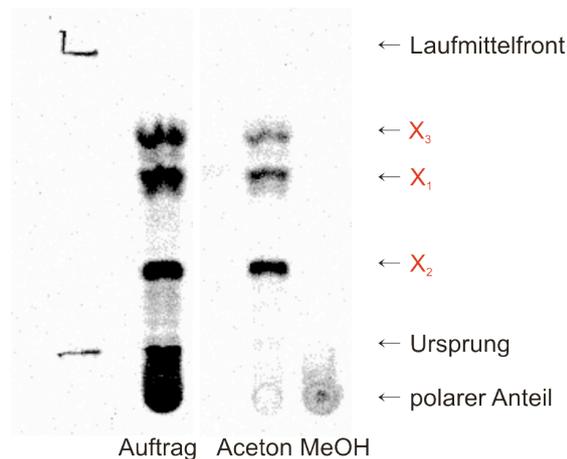


Abbildung 31: Dünnschichtchromatographische Analyse der Effizienz der Festphasenextraktion des ¹⁴C-markierten Extraktes von *B. subtilis* Δ *pcrB* + PcrB Zellen. Auftrag, Zellextrakt vor der SPE; Aceton, Fraktion eluiert mit Aceton; MeOH, Fraktion eluiert mit Methanol. Das Chromatogramm wurde mit Ethylacetat/Hexan, 1:1 (v/v), auf Kieselgel 60-Platten mit Konzentrierungszone entwickelt und autoradiographiert.

Für die weitere HPLC-Analyse wurde nur die Acetonfraktion verwendet. Zur Verbesserung des optischen Signals wurde dem radioaktiv markierten Zellextrakt hochkonzentrierter nichtmarkierter Zellextrakt zugesetzt, der analog zum markierten Extrakt hergestellt wurde. Durch die Kultur ohne zugesetzte Radioaktivität konnten größere Ansätze inkubiert, extrahiert und durch Einkonzentrierung die absolute Menge an putativen Produkten im Extrakt gesteigert und damit deren optische Detektion und später die Zuordnung der Metabolite im nichtmarkierten Extrakt erleichtert werden. Das Radiosignal wurde über einen angeschlossenen *online*-Scintillationszähler verfolgt, das optische Signal über einen Diodenarraydetektor (DAD). Dabei stellte sich eine Wellenlänge von 215 nm als optimal zur Verfolgung der Elution der Metabolite heraus.

Die radioaktiv markierten Fraktionen wurden gesammelt und über Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60 analysiert (Abbildung 32). Dabei konnten die *in vivo*-

Produkte X_1 , X_2 und X_3 zweifelsfrei den *peaks* der Radiodetektion zugeordnet und deren vollständige Trennung bestätigt werden.

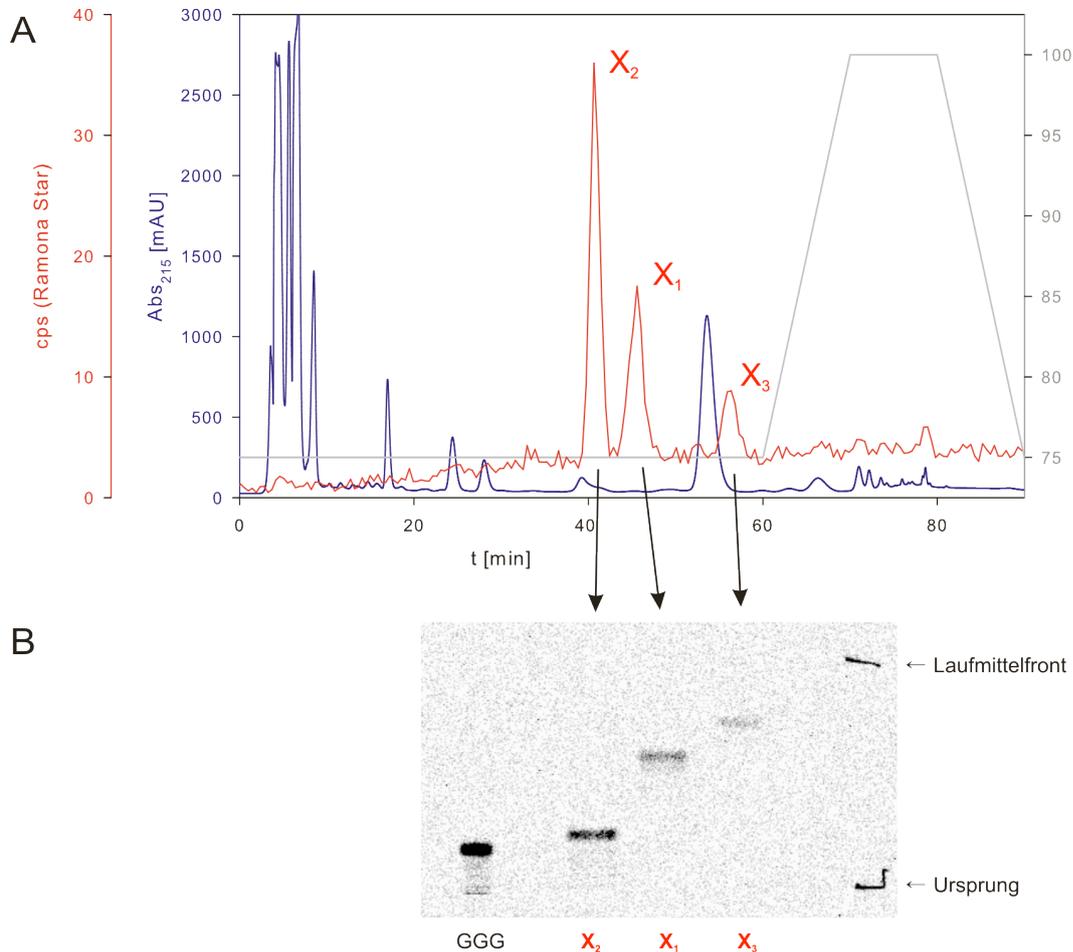


Abbildung 32: Auftrennung des hydrophoben ^{14}C -markierten Extraktes von *B. subtilis* ΔpcrB + PcrB Zellen. (A) Elutionsprofil eines *reversed phase* HPLC-Laufs von 5 μl markiertem Extrakt. Die Trennung erfolgte auf einer Kromasil C_{18} 250x4mm Säule (BISCHOFF) mit 3 μm Partikelgröße und wurde durch Scintillationsmessung und Absorptionsmessung bei 215 nm verfolgt. Die Elution erfolgte isokratisch mit 75% Isopropanol, später mit einem Gradienten zu 100% Isopropanol, um die Säule zu reinigen. **(B)** Analyse der die radioaktiven *peaks* enthaltenden Fraktionen nach säulenchromatographischer Auftrennung (A) des markierten Zellextrakts. Die entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt, einkonzentriert und über Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60 mit Ethylacetat/Hexan, 1:1 (v/v) aufgetrennt.

Um nun entsprechende nicht-radioaktive Fraktionen sammeln zu können, wurde das Elutionsprofil des Laufs aus Abbildung 32 mit einem unter identischen Bedingungen durchgeführten nicht-radioaktiven Lauf überlagert (Abbildung 33).

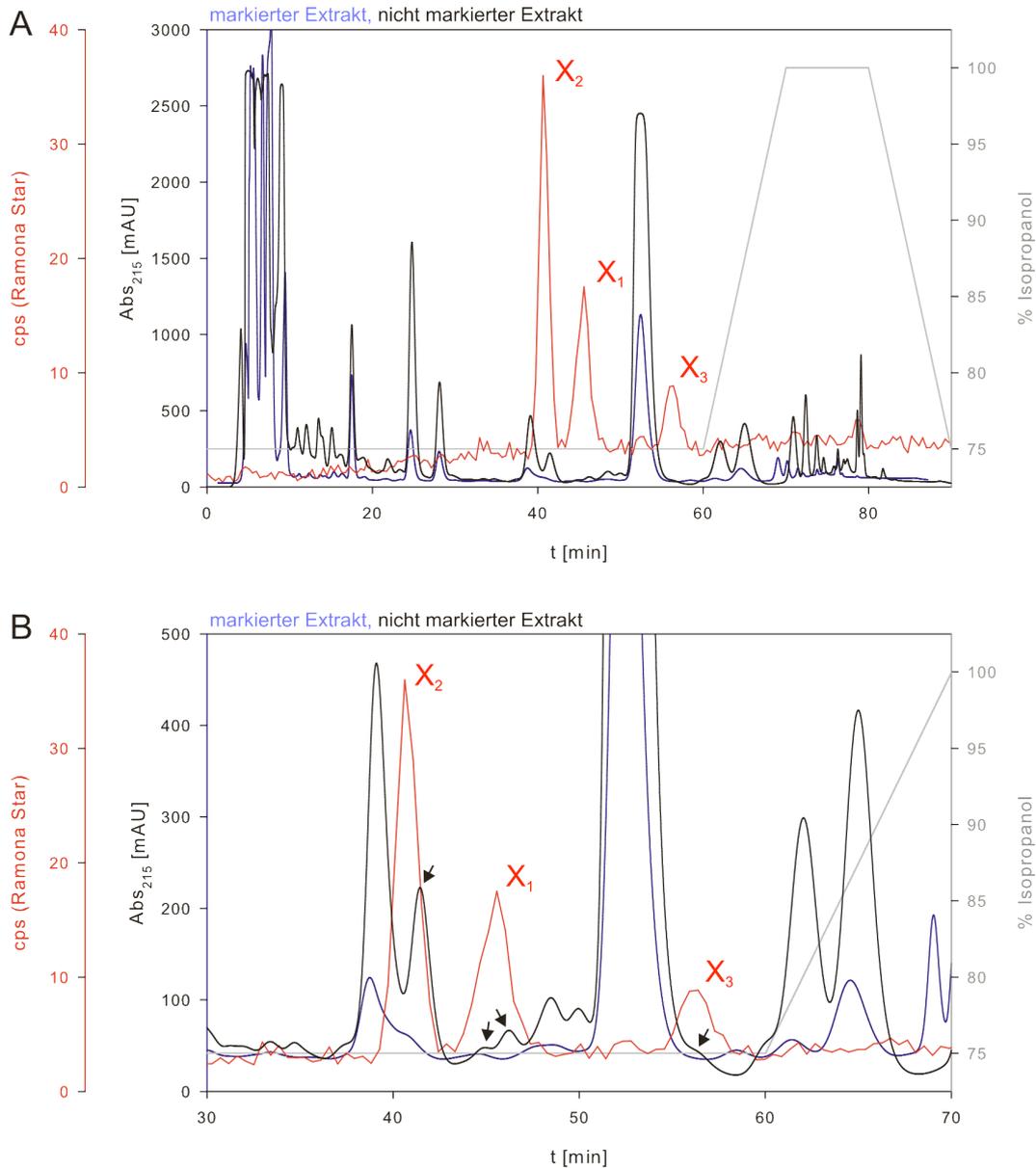


Abbildung 33: Überlagerung der säulenchromatographischen Auftrennung von ^{14}C -markiertem und unmarkiertem Extrakt von *B. subtilis* $\Delta\text{pcrB} + \text{PcrB}$. (A) Gesamtelution. (B) Elution zwischen 30 und 70 min. rot, Radiosignal; blau, optisches Signal des markierten Laufs; schwarz, optisches Signal des unmarkierten Laufs. Die beiden HPLC Läufe wurden auf zwei baugleichen Kromasil C_{18} -Säulen durchgeführt. Pfeile markieren die UV-Signale der Produkte X_2 , X_1 (peak mit Schulter) und X_3 . Die Elutionsbedingungen entsprechen denen in Abbildung 32.

Über die Zuordnung des UV-Signals zum Radiosignal konnten so die Elutionszeiten der zu fraktionierenden *peaks* bestimmt werden. Soweit nötig (X_3), wurden dabei benachbarte *peaks* mit höherer Signalstärke zur Orientierung herangezogen. Das UV-

Signal von X_1 spaltet sich dabei in einen *peak* und eine Schulter auf, was später auf zwei unterschiedliche Konformere von X_1 zurückgeführt werden konnte (vgl. 4.4.6)

Die optische Detektion der *in vivo*-Produkte erlaubte nun Experimente, die bislang aufgrund der verwendeten Radioaktivität und der damit verbundenen Einschränkungen und Sicherheitsmaßnahmen nicht durchführbar waren.

So wurde zunächst der Frage der Lokalisation der Produkte durch Zellfraktionierung (3.1.10) nachgegangen. Über Ultrazentrifugation wurde die Membranfraktion von *B. subtilis* $\Delta pcrB + PcrB$ präpariert (3.1.10), extrahiert (3.5.2.5) und mittels HPLC aufgetrennt. Parallel wurden aus der gleichen Zellmenge ohne vorherige Fraktionierung die Lipide extrahiert (3.5.2.5) und ebenfalls mittels HPLC aufgetrennt. Diese Präparation stellte den Gesamtextrakt dar. Im Vergleich der Mengen an *in vivo*-Produkten im Gesamtextrakt und der Membranfraktion wurde deren Verteilung in der Zelle bestimmt (Abbildung 34).

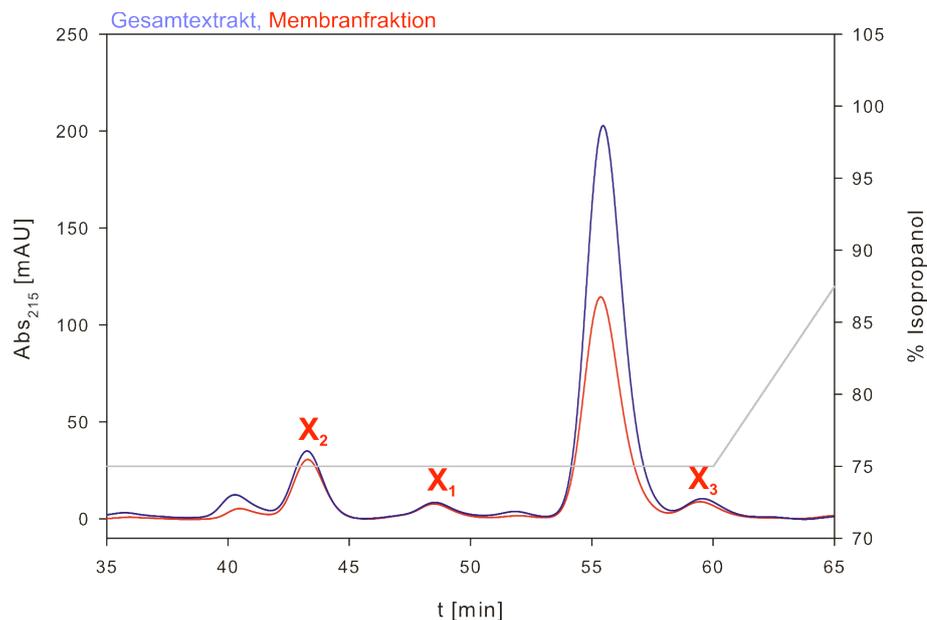


Abbildung 34: Überlagerung der säulenchromatographischen Auftrennung von Gesamtextrakt und Membranfraktion. In blau der Gesamtextrakt, in rot die Membranfraktion des *B. subtilis* Stammes $\Delta pcrB + pcrB$. Die Trennbedingungen sind entsprechend Abbildung 32.

Die Flächen unter den *peaks* wurden zueinander in Relation gebracht und exemplarisch für X_2 ausgewertet. Fast die gesamte Menge an *in vivo*-Produkt befindet sich demnach in der Membranfraktion (Tabelle 13).

Tabelle 13: Lokalisation des *in vivo*-Produktes X₂ in *B. subtilis*

X ₂	Retentionszeit [min]	peak-Höhe [mAU]	peak Fläche	% peak-Fläche
Gesamtextrakt	44,007	34,5	3190	100%
Membranfraktion	44,087	30,8	2897	90,8%

Des Weiteren konnte durch Integration der Flächen unter dem *peaks* der HPLC Läufe von Extrakten aus wildtypischen *B. subtilis* Zellen und der Mutante $\Delta pcrB + PcrB$ die Steigerung der Menge des *in vivo* Produkt X₂ durch die rekombinante Expression von PcrB auf das 19-fache abgeschätzt werden (Abbildung 35).

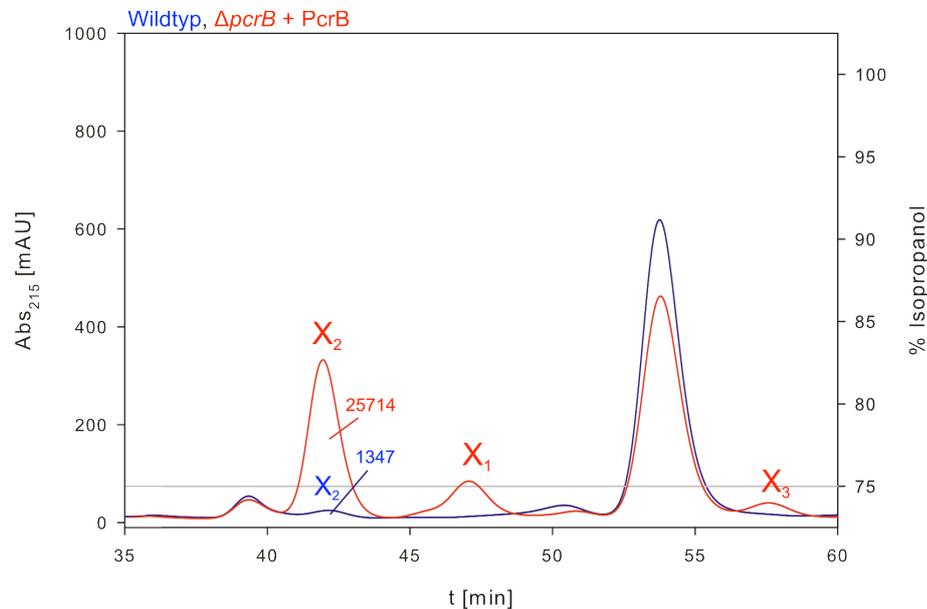


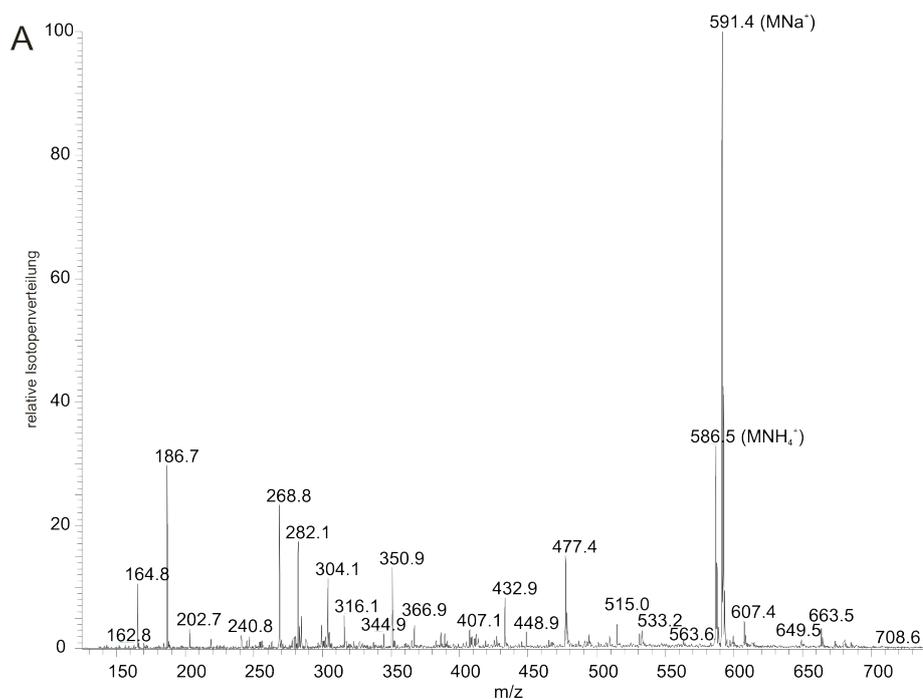
Abbildung 35: Überlagerung der säulenchromatographischen Auftrennung von Extrakten aus *B. subtilis* Wildtyp und des Stamms $\Delta pcrB + PcrB$. Gleichen Mengen Lipidextrakt aus *B. subtilis* Wildtyp (blau) und des Stamms $\Delta pcrB + PcrB$ (rot) wurden aufgetragen. Die Flächen unter dem *peak* X₂ wurden integriert. Die Trennbedingungen sind entsprechend Abbildung 32.

Die Menge des *in vivo*-Produkts von PcrB wird also primär nicht von der Substratmenge limitiert, sondern vielmehr von der Menge an in der Zelle vorhandenem PcrB. Nur deshalb war es möglich durch Überexpression von PcrB die Menge an Produkt in der Zelle zu steigern.

Im nächsten Schritt wurden nun die identifizierten und angereicherten Produkte über präparative HPLC-Läufe gesammelt und über Massenspektrometrie und NMR analysiert.

4.4.4 Massenspektrometrische Analyse

Zur Aufklärung der Identität der *in vivo*-Produkte wurden von Josef Kiermaier (Zentrale Massenanalytik, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg) massenspektrometrische Messungen an einem Elektrosprayionisationsmassenspektrometer (ESI-MS) durchgeführt. Die X_1 , X_2 und X_3 beinhaltenden Fraktionen (Anhang Abbildung 51) wurden mit 5 mM Ammoniumacetat versetzt und im Positiv-Ionenmodus gemessen (Abbildung 36; 3.5.2.9).



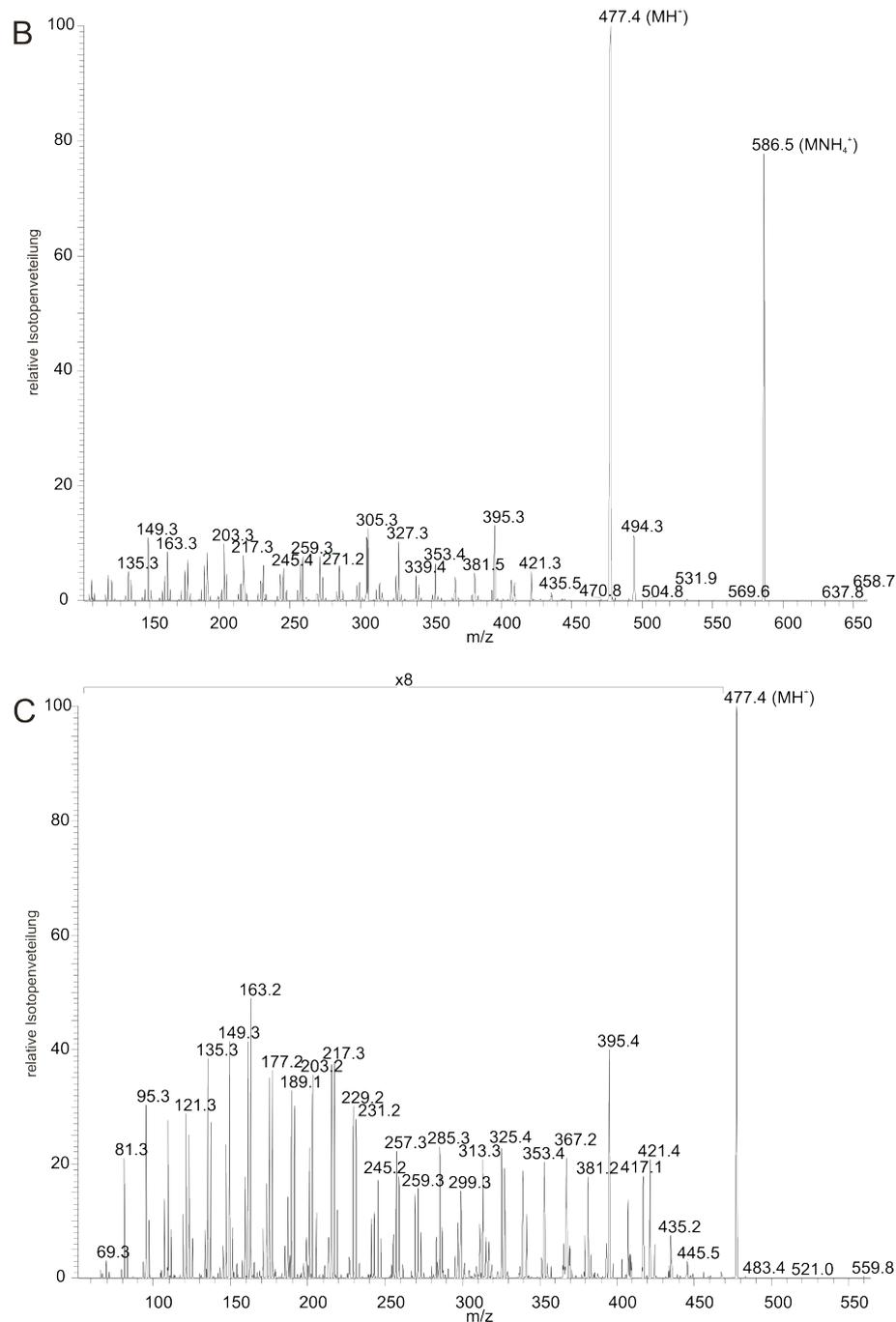


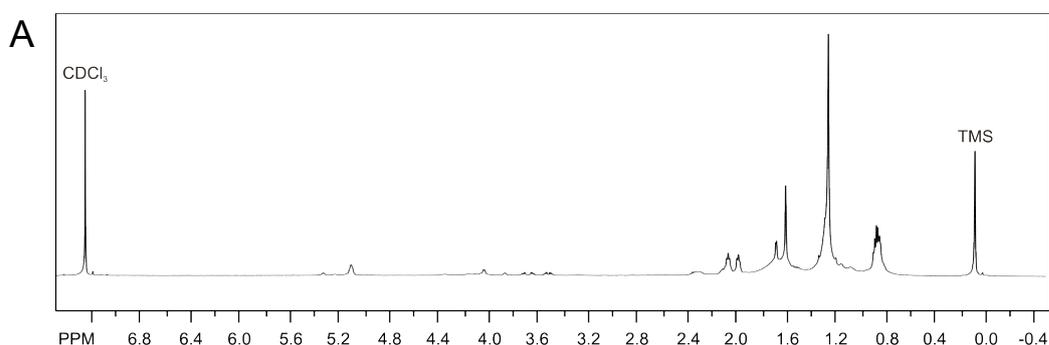
Abbildung 36: Massenspektrometrische Analyse des *in vivo* Produktes X₂ im Positiv-Ionenmodus. (A) ESI-MS Analyse von X₂. Die Haupt-peaks stellen die Ammoniumaddukte (MNH₄⁺) und Natriumaddukte (MNa⁺) eines Moleküls der Masse 568 Da dar. **(B)** ESI-MS-MS Analyse des Moleküls der Masse 586 Da. Dieses Ammoniumaddukt zerfällt zum protonierten Molekül mit 569 Da und dem protonierten Hauptfragment 477 Da. **(C)** ESI-MS-MS Analyse des Moleküls der Masse 477 Da. Das Zerfallsmuster dieses Molekül ist durch die 14er Differenzen charakteristisch für Kohlenwasserstoffe.

Die Gesamtmasse des Moleküls X_2 ist 568 Da. Im Spektrum wurden vor allem die geladenen Ammoniumadukte (+18 Da) und Natriumadukte (+23 Da) gefunden. Bereits hier zeigt sich ein protoniertes Fragment mit 477 Da. Das Ammoniumadukt der Masse 586 Da fragmentierte in Tandem-Massenspektrometrieexperimenten zu diesem protonierten Molekül der Masse 477 Da (Differenz 92 Da) und Kohlenwasserstofffragmenten der Differenz 14 Da. Das Stoßspektrum des Moleküls der Masse 477 Da ist charakteristisch für langkettige Kohlenwasserstoffe.

Die ESI-MS und ESI-MS-MS Experimente für X_1 und X_3 lieferten ähnliche Ergebnisse (Anhang 7.4). Die Masse des Moleküls X_1 beträgt 610 Da. Es fragmentiert zum bekannten Molekül mit 477 Da und dieses wiederum zu Kohlenwasserstofffragmenten. Die Masse von X_3 wurde mit 652 Da bestimmt, ebenfalls fragmentierend zu 477 Da und Kohlenwasserstofffragmenten. Es fällt auf, dass die Differenz zwischen dem dem gemeinsamen Hauptfragment (477 Da) zu X_2 92 Da (Masse des Glycerins), zu X_1 134 Da (92 Da + 42 Da) und zu X_3 176 Da (92 Da + 42 Da + 42 Da) beträgt.

4.4.5 NMR-spektroskopische Analyse

Zur Bestimmung der Struktur des Moleküls X_2 wurden die entsprechenden Fraktionen von neun präparativen HPLC Läufen vereinigt, getrocknet und in deuteriertem Chloroform gelöst. Anschließend wurde von Fritz Kastner ^1H , HSQC, HMBC und COSY Spektren der Substanz X_2 (Zentrale NMR-Analytik der Fakultät für Chemie und Pharmazie) aufgenommen (Abbildung 37).



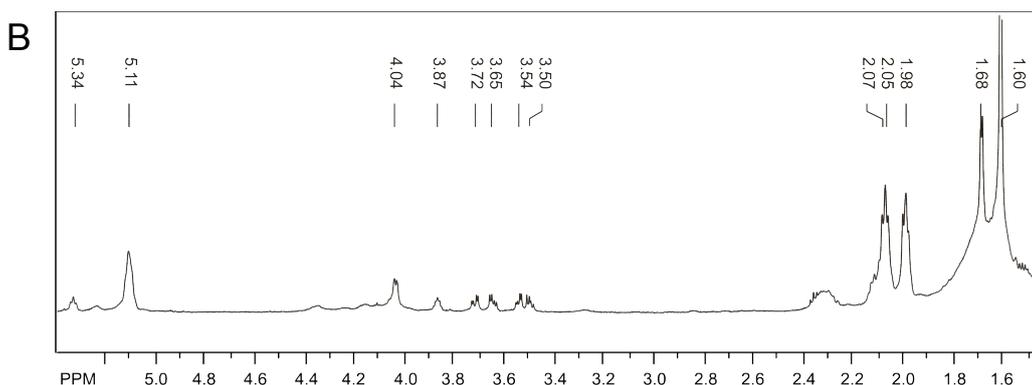


Abbildung 37: ^1H -NMR-Spektrum des *in vivo* Produktes X_2 . (A) Gesamtes Spektrum, (B) Vergrößerung des ausgewerteten Bereiches. Das Spektrum wurde bei 600 MHz aufgenommen. Trimethylsilan wurde als interner Standard verwendet. Die *peaks* wurden gemäß ihrer chemischen Verschiebung in ppm beschriftet.

Das NMR-Spektrum zeigt charakteristische chemische Verschiebungen für Methylgruppen (1,60 ppm), für CH_2 -Gruppen (2,05 ppm) und CH-Gruppen an Doppelbindungen (5,11 ppm). Prominent ist auch das Dublett bei 4,04 ppm für einen Ether in Nachbarschaft zu einer CH-Gruppe. Zudem finden sich Multiplette im Bereich von 3,50 und 3,70 ppm, die bei Protonen in der Nähe von Alkoholen auftreten.

Zusammen mit dem HSQC, dem HMBC, dem COSY (Anhang 7.6) und den Daten aus der massenspektrometrischen Analyse lässt sich für das Molekül X_2 zweifelsfrei die Struktur bestimmen (Abbildung 38).

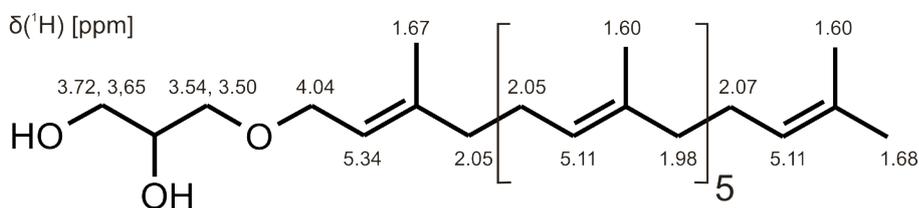


Abbildung 38: Aus dem ^1H NMR-Spektrum abgeleitete Strukturformel von X_2 . Die chemischen Verschiebungen (Abbildung 37) konnten dem Heptaprenylglycerin zugeordnet werden.

Das Molekül hat die Summenformel $C_{38}H_{64}O_3$ und die Masse 568,913 Da. Es handelt sich um Heptaprenylglycerin ($C_{35}G$). Eine zusätzlich von Prof. Dr. Frank-Michael Matysik (Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg) durchgeführte Messung an einem hochauflösenden Massenspektrometer bestätigte die Summenformel und die Gesamtmasse (Anhang 7.5). Auch der bereits festgestellte Unterschied von 42 Da zwischen X_2 und X_1 konnte dabei bestätigt werden.

4.4.6 Nachweis der Acetylierung von Heptaprenylglycerin

Die Acetylierung von einer bzw. von beiden freien OH-Gruppen am Glycerinteil des Lipids würde sowohl die Massendifferenz zwischen X_2 und X_1 bzw. X_3 als auch das unterschiedliche Laufverhalten erklären. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde erneut ein ^{14}C -G1P-markierter Zellextrakt auf einer Kieselgelplatte aufgetrennt und anschließend mit dem Acetylierungsmittel Essigsäureanhydrid besprüht. Nach einer Trockenzeit wurde die Laufrichtung um 90° gedreht und erneut entwickelt. Parallel wurde das Experiment mit der gleichen Probe ohne Besprühen mit Essigsäureanhydrid ausgeführt (Abbildung 39).

Durch Behandlung des in eine Dimension entwickelten Chromatogramms mit Essigsäureanhydrid änderte sich das Laufverhalten eines Teils des Heptaprenylglycerin (X_2) in der zweiten Dimension, es lief nun auf Höhe des Produktes X_1 . X_2 kann also durch Acetylierung in X_1 überführt werden.

Die beobachtete Aufspaltung des Signals X_1 auf einen starken und einen schwachen Punkt (X_{1a} und X_{1b}) ist vermutlich auf die beiden möglichen einfach acetylierten Formen des Heptaprenylglycerin zurückzuführen. Die Acetylierung scheint bei der Konformation X_{1a} begünstigt zu sein. Auch die flüssigchromatographische Auftrennung zeigte bei X_1 einen *peak* mit einer vorgelagerten Schulter (Abbildung 33). Das Massenspektrum der getrennt analysierten Fraktionen hingegen war identisch (Anhang Abbildung 52).

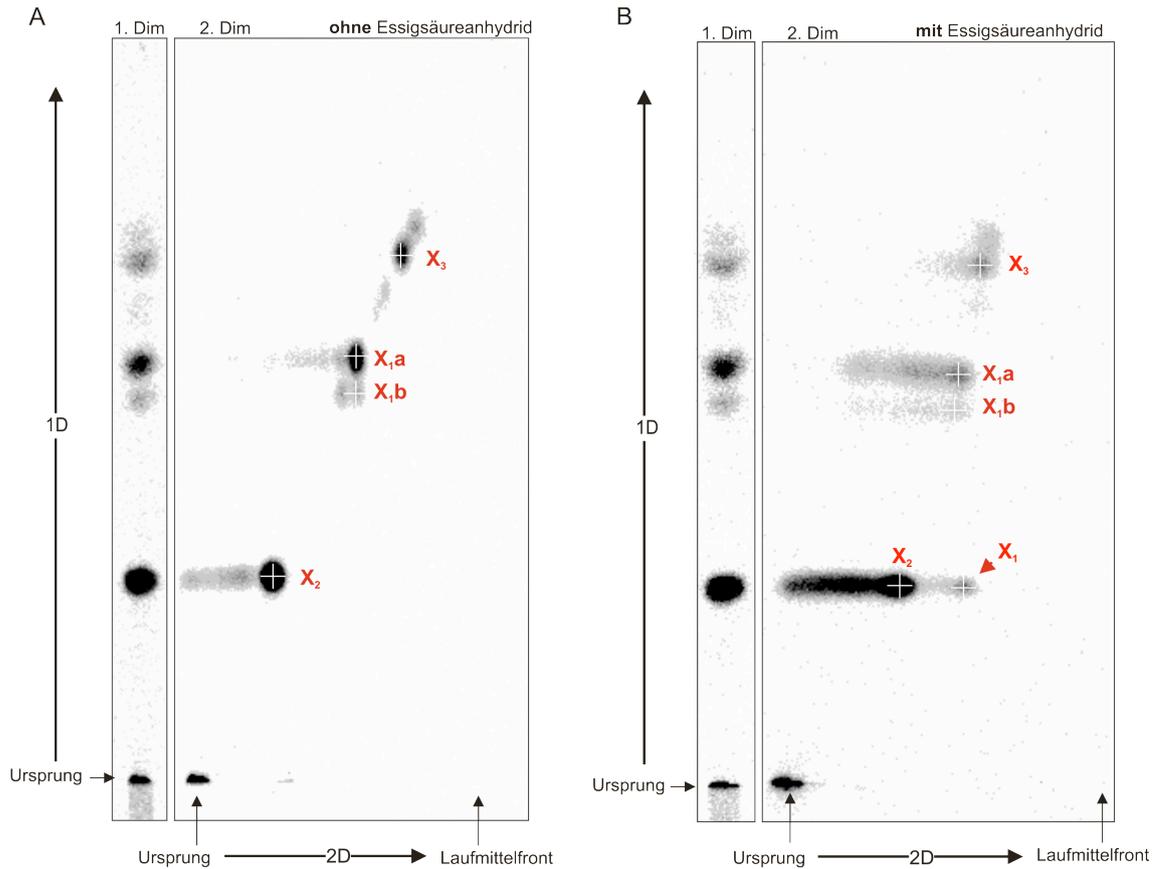


Abbildung 39: Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung von ^{14}C -G1P markiertem Extrakt von *B. subtilis* ΔpcrB + PcrB Zellen. (A) ohne Acetylierung, (B) mit Acetylierung durch Essigsäureanhydrid. Die Chromatogramme wurde auf Kieselgel 60 mit Ethylacetat/Hexan (1:1, v/v) als mobile Phase zuerst in eine Richtung entwickelt und autoradiographiert und anschließend nach Drehen der Platte um 90° ohne Wechsel des Laufmittels in die zweite Richtung entwickelt und autoradiographiert. Gezeigt sind jeweils die Autoradiogramme sowohl nach Auftrennung in 1. als auch 2. Dimension (1. Dim bzw. 2. Dim). Das Heptaprenylglycerin X_2 wurde durch die Behandlung mit dem Acetylierungsmittel in die Komponente X_1 überführt (Pfeil). $X_{1,a}$ und $X_{1,b}$ kennzeichnen verschiedene Formen von X_1 .

Die Massendifferenz zu X_3 lässt sich wiederum als Acetylierung beider freien OH-Gruppen des Heptaprenylglycerins erklären. Bei X_1 und X_3 handelt sich also um einfach bzw. doppelt acetylierte Derivate von Heptaprenylglycerin (X_2 ; Abbildung 40).

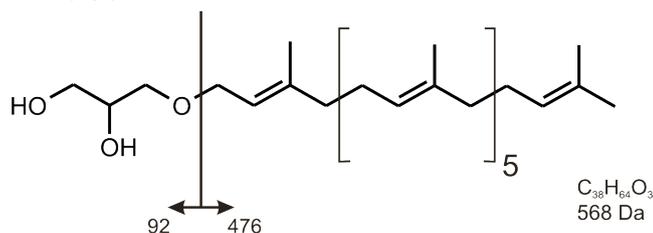
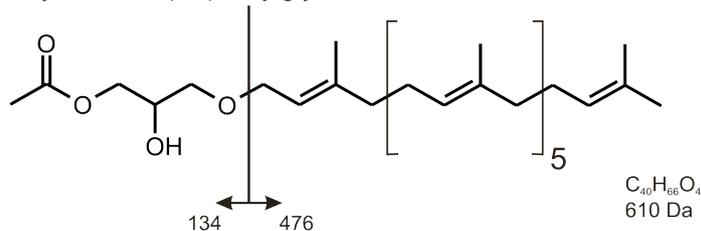
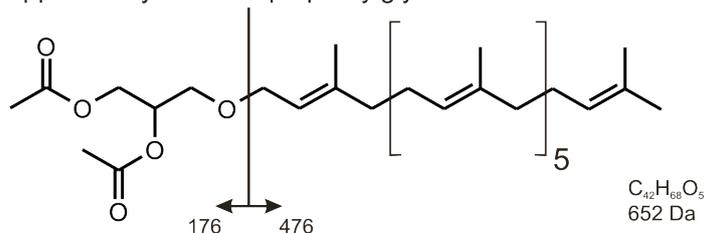
X₂ - HeptaprenylglycerinX₁ - acetyliertes HeptaprenylglycerinX₃ - doppelt acetyliertes Heptaprenylglycerin

Abbildung 40: Struktur der *in vivo*-Produkte X₁, X₂ und X₃ von PcrB. Es handelt sich dabei um *all-trans*-Heptaprenylglycerol, welches teilweise acetyliert vorliegt. Im ESI-MS-MS-Experiment bildet sich das Hauptfragment mit 476+1 Da durch Spaltung an der Etherbindung.

PcrB setzt somit das von AraM bereitgestellte Glycerin-1-Phosphat zusammen mit dem C₃₅-Substrat Heptaprenylpyrophosphat, das durch für *B. subtilis* essentielle Heptaprenylpyrophosphat-Synthasen produziert wird (Takahashi *et al.*, 1980), zum Heptaprenylglycerin-Phosphat um. Dieses wird dephosphoryliert und einfach bzw. doppelt acetyliert.

4.4.7 Dephosphorylierung und Acetylierung *in vivo*

Um zu untersuchen, ob es sich bei der Dephosphorylierung und Acetylierung um ein chemisches Extraktionsartefakt der verwendeten Methode (3.5.2.5) handelt oder ob das Produkt in der Zelle enzymatisch prozessiert wird, wurde die Extraktion unter Zugabe von *in vitro* hergestelltem Produkt wiederholt. Da HepPP zur Produktion von HepGP zu

diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung stand, wurde stattdessen GGGP verwendet. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass GGGP in die Zelle aufgenommen wird und es ebenfalls zur Dephosphorylierung und Acetylierung kommt. Bei Zugabe von radioaktiv markiertem GGGP zu verschiedenen Stadien der Extraktion kann nun der jeweilige Extraktionsschritt auf Artefaktbildung hin untersucht werden.

^{14}C -GGGP wurde dazu bereits zur Kultur bzw. zu verschiedenen Stadien des Zellaufschlusses zugegeben und jeweils sofort extrahiert. Ein Aliquot wurde anschließend enzymatisch dephosphoryliert (CIP), ein zweites Aliquot wurde direkt über Dünnschichtchromatographie (Abbildung 41) analysiert. Im Vergleich der beiden Aliquots konnte die *in vivo* Dephosphorylierung identifiziert werden. ^{14}C -GGGP wurden zu folgenden vier Ansätze zugegeben und jeweils bis zur Extraktion inkubiert:

1. Zu einer *B. subtilis* Wildtyp Kultur; die Kultur wurde anschließend noch zwei Stunden inkubiert. GGGP kann in die Zellen aufgenommen und prozessiert werden (Positivkontrolle).
2. Zu einer *B. subtilis* Wildtyp Kultur zusammen mit Lysozym; die Zellen wurden direkt lysiert und die Proteine in das Medium freigesetzt, wo sie GGGP modifizieren könnten. Membranbestandteile und -proteine sind z. T. noch vorhanden/aktiv.
3. Zu einem über Filtration proteinfrei gemachten Zellextrakt einer *B. subtilis* Wildtyp Kultur; es sind keine Proteine vorhanden, die GGGP modifizieren könnten. Kommt es dennoch zur Dephosphorylierung und Acetylierung, ist diese ein nichtenzymatisches Artefakt der Extraktion.
4. Zu einem proteinhaltigen Zellextrakt einer *B. subtilis* Wildtyp Kultur; unlösliche Proteine und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt.

Acetylase für die weitere Prozessierung in Lösung halten. Der genaue Mechanismus sollte aber mit Identifizierung der beteiligten Enzyme geklärt werden können.

Das vorgestellte Experiment konnte jedoch nicht die Frage beantworten, ob das Produkt auch in der Zelle modifiziert vorliegt, oder erst während des Aufschlusses modifiziert wird. Darum wurden 200 ml einer induzierten *B. subtilis* $\Delta pcrB$ + PcrB-Kultur üN mit ^{14}C -G1P inkubiert, geerntet und lyophilisiert. Die Zellen wurden in einer Reibschale mechanisch zusammen mit einem Teelöffel Alcoa A-305 (Al_2O_3 ; ALCOA) und flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und anschließend sofort in Methanol überführt, um die Lipide zu extrahieren (3.5.2.5). Damit wurde sichergestellt, dass kein Protein beim Aufschluss und der Extraktion aktiv war und somit der Ist-Zustand der Heptaprenylglycerine in der Zelle abgebildet wurde. Der Extrakt wurde anschließend flüssigchromatographisch aufgetrennt (Abbildung 42).

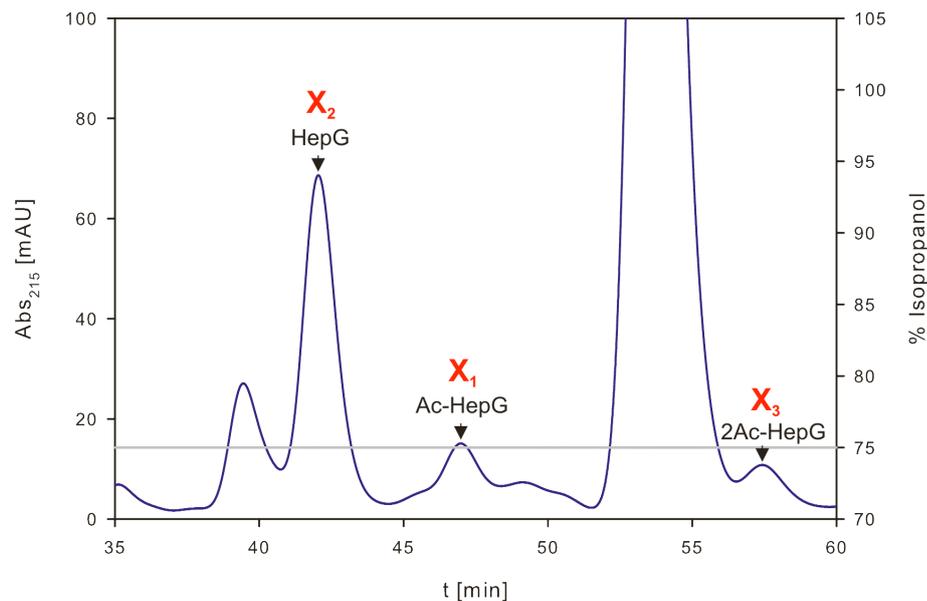


Abbildung 42: Flüssigchromatographische Auftrennung des Extraktes nach mechanischer Lyse von *B. subtilis* $\Delta pcrB$ + PcrB. HepG, Heptaprenylglycerin; Ac-HepG, acetyliertes Heptaprenylglycerin; 2Ac-HepG, zweifach acetyliertes Heptaprenylglycerin. Die Elutionsbedingungen entsprechen denen in Abbildung 32.

Auch ohne aktive Phosphatase und Acetylase zum Zeitpunkt von Aufschluss und Extraktion sind im Chromatogramm die *peaks* für Heptaprenylglycerin und die beiden acetylierten Formen klar zu erkennen. Damit kann ausgeschlossen werden, dass es sich

bei der beobachteten Dephosphorylierung und Acetylierung um ein Extraktionsartefakt handelt. Vielmehr liegen die Produkte *in vivo* bereits zumindest zum Teil acetyliert vor. Über die absolute Menge an diesen Produkten kann basierend auf diesem Experiment keine Aussage gemacht werden, da in den extrahierten Zellen PcrB überexprimiert vorlag und damit die Menge an Protein und damit auch an Produkt über dem natürlichen Niveau lag. Die Prozessierung an sich konnte jedoch bereits bei den ersten Fütterexperimenten mit ^{14}C -G1P und *B. subtilis* Wildtyp beobachtet werden (Abbildung 27). Das bedeutet, dass in der wildtypischen Zelle sowohl Heptaprenylglycerin als auch die acetylierten Derivate vorliegen. Bezüglich der Verwendung dieser Moleküle in *B. subtilis* kann jedoch basierend auf den vorliegenden Daten noch keine Hypothese formuliert werden.

4.5 Moleküldynamische Berechnungen zur Substratspezifität von PcrB

Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass C_{35} -Heptaprenyl-PP das Substrat von PcrB ist. Während die homologe afGGGPS *in vivo* G1P und GGPP zu GGGP kondensiert, setzen die PcrB-Proteine in der Zelle G1P mit HepPP zu HepGP um. Dieser Unterschied in der Substratspezifität ist auf den ersten Blick unerwartet, da die Kristallstrukturen beider Proteine in Superposition nahezu deckungsgleich sind (Abbildung 19). Für afGGGPS konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die Ausdehnung der hydrophoben Substratbindetasche durch einen Tryptophanrest sterisch auf C_{20} -GGPP begrenzt ist. An der entsprechenden Stelle in PcrB befindet sich ein jedoch nur sterisch kleiner Alaninrest. Dies macht es verständlich, dass die hydrophobe Substratbindetasche von PcrB die Bindung von C_{35} -HepPP ermöglicht. Dennoch zeigen beide Enzyme *in vitro* (Abbildung 26) und *in vivo* (Abbildung 30) promiskuitive Aktivität für die jeweils andere Reaktion.

Um C_{35} -HepPP gegenüber C_{20} -GGPP (aber auch C_{25} -FGPP und C_{30} -HexPP, Abbildung 26) zu favorisieren, muss PcrB dieses spezifisch mit höherer Affinität binden. Über moleküldynamische Berechnungen (MD) wurde deshalb von Dr. Marco Boccola (Lehrstuhl Biochemie II, Universität Regensburg,) die Bindeenergie von verschiedenen Polyprenyl-PP an PcrB *in silico* bestimmt.

Die Simulation der Substratbindung von PcrB mit Polyprenyl-PP-Substraten mit verschiedenen Kettenlängen wurde mit Hilfe des Programms Moloc (www.moloc.ch)

und dem Kraftfeld MAB (Gewicht der H-Brückenstärke: 1.768) mit implizitem Solvationsmodell durchgeführt. Als Ausgangsstruktur diente die Kristallstruktur von *B. subtilis* PcrB (1VIZ) ohne gebundene Substrate und mit fehlendem *loop* β_2 (Aminosäuren 40-43) über der Pyrophosphatbindestelle. Die fehlenden Aminosäuren und die Substratbindung wurden auf der Basis der Röntgenstruktur der GGGPS aus *A. fulgidus* (2F6X) mit gebundenem G1P und 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD) in der Polyprenyl-PP-Bindestelle analog modelliert. Die konservierte Pyrophosphatbindestelle mit an zwei Aspartaten koordiniertem Mg^{2+} wurde ebenfalls manuell modelliert. Danach wurden die Polyprenyl-PP verschiedener Kettenlängen von C_{10} -GPP bis C_{40} -OctaPP in die Struktur modelliert, der Komplex mittels MD-Simulation relaxiert und die Energien abschließend minimiert (Abbildung 43).

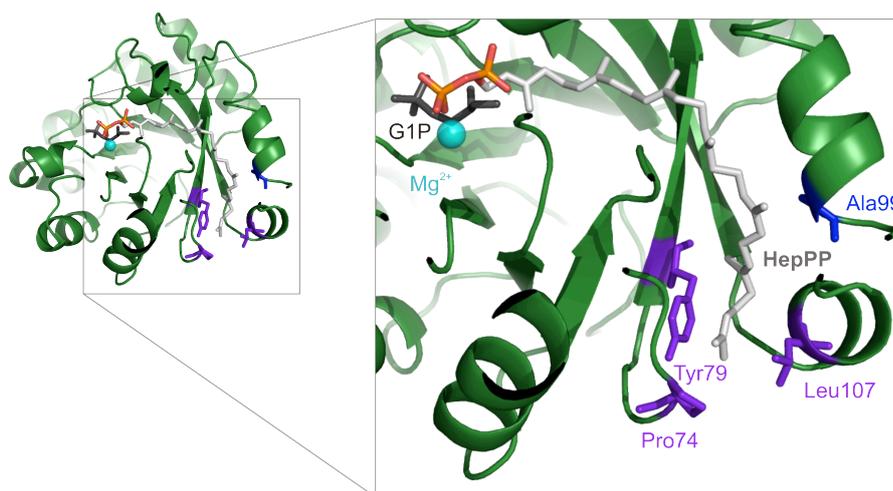


Abbildung 43: Modell von PcrB mit gebundenem C_{35} -HepPP nach Energieminimierung. HepPP ist gemäß CPK-Konvention eingefärbt; das phosphatbindende Mg^{2+} in türkis, G1P in schwarz. Die Aminosäurereste am Ende der hydrophoben Kuhle sind in violett eingezeichnet, das Alanin an Position 99 in blau.

Aus den minimierten Strukturen wurde die Bindungsenergie der einzelnen Liganden berechnet und der Zugewinn an Bindungsenergie bei Verlängerung des Polyprenyl-PP-Liganden um eine Isopreneinheit ausgehend von C_5 -IPP wurden graphisch aufgetragen (Abbildung 44).

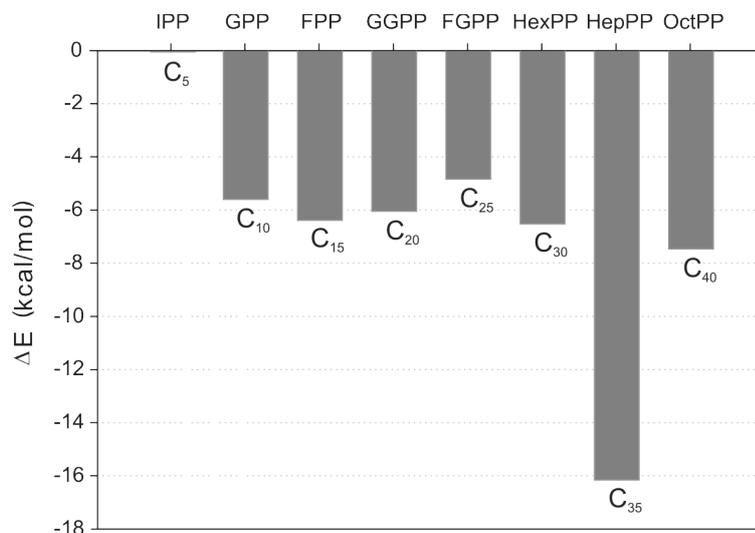


Abbildung 44: Gewinn an Energie bei Bindung von verschiedenen langen Polyprenyl-PP an PcrB. Aufgetragen sind die Ergebnisse der molekulardynamischen Berechnung des Gewinns an Energie ausgehend von C₅-IPP bei Bindung eines um eine Isopreneinheit längeren Polyprenyl-PP (C₁₀ – C₄₀) an PcrB.

Während der Gewinn an Bindungsenergie jeder weiteren Isopreneinheit für C₁₀-GPP bis C₃₀-HexPP und auch für C₄₀-OctPP konstant mit rund 5 kcal/mol berechnet wird, ist die Differenz für C₃₅-HexPP mit über -16 kcal/mol mehr als dreimal so groß wie für die anderen Polyprenyl-PP, inklusive C₂₀-GGPP. Die freigesetzte Energie bei der Bindung von C₃₅-HepPP ist also überproportional hoch und könnte so die Bevorzugung von HepPP gegenüber GGPP erklären. Das Tyrosin 79 kann im Modell über Stapelkräfte das Ende des Polyprenyl-PP fixieren. Die letzte Isopreneinheit des Moleküls würde so bei der Bindung von Tyrosin 79, Leucin 107 und Prolin 74 stabilisiert werden und könnte so im Modell die Spezifität von PcrB erklären. Die Grenzen der Berechnung zeigen sich in den Werten für C₄₀-OctPP, da auch hier die Energiedifferenz noch bei über -6 kcal/mol liegt. In der Simulation würde das entsprechende Molekül die endständigen Reste der hydrophoben Bindetasche auseinanderdrücken, über den Rand des Proteins hinausreichen und dort an die Oberfläche binden. Das Modell berücksichtigt die Löslichkeit der Liganden nicht und erlaubt damit auch keine Aussage über deren Verhalten außerhalb der Bindetasche. Um den Mechanismus der Längenbegrenzung noch genauer zu verstehen ist die Lösung der Kristallstruktur von PcrB mit gebundenem C₃₅-HepPP in Kooperation mit Dr. Vanja Kapetaniou in Arbeit.

5 Abschließende Diskussion

5.1 Vorkommen und Evolution von Etherlipiden

In der vorliegenden Arbeit konnte mit dem C₃₅-Heptaprenylglycerin zum ersten Mal ein Polyprenylglycerinether außerhalb der Domäne der Archaea nachgewiesen werden. Grundlage für die Entdeckung dieses Moleküls bildete die auffallende Ähnlichkeit von AraM und PcrB aus *B. subtilis* zu den archaeellen G1PDH und GGGPS auf Sequenz- und Strukturebene.

Polyprenylderivate sind im Allgemeinen weit in den drei Domänen des Lebens (Archaea, Bacteria, Eucarya) verbreitet (Ohnuma *et al.*, 1998). Gängige Beispiele dafür sind die Zellmembran der Archaea, die Ubiochinone/Menachinone und das Bactoprenol der Bacteria, die Cholesterine der Tiere sowie Terpene und Harze der Pflanzen (Abbildung 47). In *B. subtilis* hat das Menachinon eine C₃₅-Polyprenylseitenkette, die durch die HepPPS synthetisiert wird (Bishop *et al.*, 1962). Es wurden zudem C₄₀-Polyprenyle in Form von membrandurchspannenden β -Carotinen und Phytoenen und C₅₀-Polyprenyle als Teil des UV-Schutzes Bacterioruberin (Clejan *et al.*, 1986) gefunden. C₅₅-Bactoprenol ist als Lipid-carrier essentieller Bestandteil der Peptidoglycansynthese (Thorne & Kodicek, 1966, Leaver *et al.*, 2009, Kobayashi *et al.*, 2003). Über eine Etherbindung an G1P gekoppelte Polyprenylderivate wurden bisher jedoch als charakteristische Eigenschaft der Archaea angesehen und zur Zuordnung und Abgrenzung der ganzen Domäne herangezogen (Boucher *et al.*, 2004; Koga & Morii, 2007; Payandeh & Pai, 2007, Boucher, 2007). Auf der Basis der im Rahmen dieser Arbeit gelungenen Identifizierung von HepGP in den Bacteria muss dieses Konzept neu überdacht werden.

Die Hypothese zur Evolution der Archaea und Bacteria geht davon aus, dass im gemeinsamen Vorläufer der beiden Domänen beide Enantiomere von Glycerinphosphat als Bausteine für heterochirale Membranlipide verwendet wurden. Die höhere Stabilität von homochiralen Lipiden im Vergleich zu racemischen heterochiralen Lipiden könnte zur Entstehung von zwei unterschiedlichen Enzymen für die stereospezifische Synthese des Glycerinphosphat-Rückgrats geführt haben. Als Folge der unabhängigen Entstehung

der biosynthetischen Enzyme für G1P und G3P könnte es zur divergenten Evolution stabiler Zelllinien mit den einen oder anderen chiralen Lipiden gekommen sein (Pereto *et al.*, 2004; Wächtershäuser, 2003), da die Stereochemie des Rückgrates auch die Stereospezifität der archaeellen GGGPS und der bakteriellen Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase festlegt. Die weiteren Enzyme der Lipidsynthese hingegen sind stereospezifisch (Morii *et al.*, 2000, Abbildung 1).

Das vereinzelte Auftreten von G1PDH-ähnlichen Proteinen in Bacteria bzw. von G3PDH in Archaea wird mit horizontalem Gentransfer zwischen den Domänen erklärt (Daiyasu *et al.*, 2002; Pereto *et al.*, 2004; Sakasegawa *et al.*, 2004). Auch für die gefundenen PcrB-Proteine in den Bacteria wurde angenommen, dass sie über horizontale Gentransfer aus den archaeellen GGGPS entstanden sind (Boucher *et al.*, 2004; Payandeh *et al.*, 2006, Koga & Morii, 2007). Bedeutung wurden ihnen jedoch nicht beigemessen. In der phylogenetischen Analyse ist das Enzym PcrB auf die Gruppe der gram-positiven Bacillales konzentriert. Das PcrB kodierende Operon ist immer gleich organisiert (Flannagan & Clewell, 2002, Boucher *et al.*, 2004), was impliziert, dass eine mögliche Genübertragung relativ früh in der Evolutionsgeschichte, noch vor der Diversifizierung der gram-positiven Bacillales, stattgefunden haben muss. Alternativ könnten die beiden Enzyme AraM und PcrB auch Relikte aus der Zeit vor der Aufspaltung der Domänen sein, die in den Bacillales konserviert wurden.

Ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung könnte eindrucksvoll belegt werden, wenn ein PcrB-Enzym eine archaeelle GGGPS *in vivo* ersetzen könnte. Dazu wurde begonnen in Kooperation mit PD Winfried Hausner (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg) die GGGPS des Archaeons *Pyrococcus furiosus* durch ein PcrB-Enzym zu ersetzen. Da es sich bei dem Zielorganismus um ein thermophiles Archaeons handelt, wurde das thermostabile PcrB-Protein aus *G. kaustophilus* für das Experiment ausgewählt (4.3.2). Das entsprechende Gen wurde zusätzlich in Zusammenarbeit mit der Firma GENEART (Regensburg) auf die *codon usage* von *P. furiosus* optimiert und synthetisiert, um die Expression dieses bakteriellen Gens in *P. furiosus* sicherzustellen.

5.2 Ein neuer Syntheseweg in *B. subtilis*

Nach Aufklärung der Funktion von AraM als G1PDH und PcrB als HepGP-Synthase lässt sich nun folgender, bisher in Bakterien nicht beschriebener Syntheseweg formulieren (Abbildung 45):

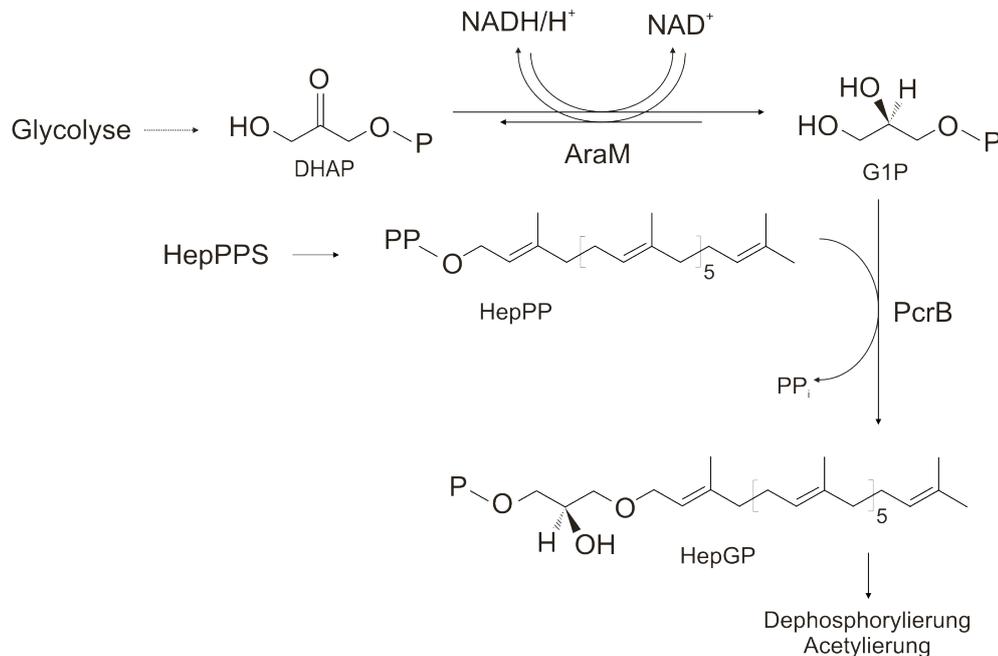


Abbildung 45: Synthese und Prozessierung von Heptaprenylglycerin in *B. subtilis* unter Beteiligung von AraM und PcrB. Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) stammt aus der Glycolyse, Heptaprenyl-PP (HepPP) wird von der in *B. subtilis* essentiellen Heptaprenyl-PP-Synthase bereitgestellt. P und PP bezeichnen Phosphat bzw. Pyrophosphat.

Der erste Teil der Glycolyse stellt das Substrat Dihydroxyacetonphosphat zur Verfügung, das AraM unter Oxidation von NADH zu G1P reduziert und als Substrat für PcrB bereitstellt. Die in *B. subtilis* essentielle HepPPS (ein Heterodimer; Kobayashi *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 1998) produziert mit HepPP neben der hydrophoben Seitenkette des Menachinons auch das zweite Substrat von PcrB. Das von ihm produzierte Heptaprenylglycerin-Phosphat (HepGP) wird in *B. subtilis* zum Teil durch bisher noch unbekannte Enzyme dephosphoryliert und an den freien Alkoholen acetyliert.

Der Umstand, dass für die Funktion von PcrB auch eine G1PDH und eine Heptaprenyl-PP-Synthase (HepPPS) als substratliefernde Enzyme notwendig sind, erfordert das Vorhandensein aller entsprechenden Gene in den jeweiligen Organismen (Tabelle 14).

Tabelle 14: Auftreten der nötigen Enzyme zur Synthese von HepPG in verschiedenen Organismen.

Organismus	G1PDH	HepPPS	HepGPS
<i>B. subtilis</i>	+ (<i>araM</i>)	+	+ (<i>pcrB</i>)
<i>Bacillus sp.</i>	+ (<i>araM</i>)	+	+ (<i>pcrB</i>)
<i>G. kaustophilus</i>	nicht gefunden	+	+ (<i>pcrB</i>)
<i>G. thermodenitrificans</i>	GTNG_1788	+	+ (<i>pcrB</i>)
<i>L. monocytogenes</i>	nicht gefunden	+	+ (<i>pcrB</i>)
<i>S. aureus</i>	nicht gefunden	+	+ (<i>pcrB</i>)

In allen Spezies mit *pcrB*-Gen liegt auch ein Gen für eine HepPPS vor (Tabelle 14). Ein Gen für die G1PDH konnte jedoch nicht bei allen Organismen gefunden werden, die PcrB und HepPPS besitzen. In *B. subtilis* ist wie in allen Vertretern der Gattung *Bacillus* *araM* Teil des Arabinoseoperons. In *G. thermodenitrificans* konnte das Gen GTNG_1788 und das entsprechende Genprodukt mit 40% Sequenzidentität und Konserviertheit der identifizierten katalytischen Reste (Guldan *et al.*, 2008) als putative G1PDH identifiziert werden. In den weiteren Vertretern mit PcrB, *G. kaustophilus*, *L. monocytogenes* und *S. aureus*, konnte bisher hingegen noch kein entsprechendes Gen oder Protein gefunden werden. Dabei ist es durchaus möglich, dass die zu postulierenden Enzyme sich in ihrer Sequenz stark von AraM unterscheiden und so in Datenbanksuchen nicht als putative G1PDH auffallen. Möglicherweise wird in diesen Organismen G1P nicht über eine G1PDH durch Reduktion von DHAP hergestellt, sondern z.B. über die stereospezifische Phosphorylierung von Glycerin durch eine bislang noch nicht identifizierte Kinase.

5.3 Mögliche Funktionen von HepGP in *B. subtilis*

Weder HepGP noch die dephosphorylierten und acetylierten Derivate wurde bislang in der Literatur beschrieben (Prof. Dr. Kai-Uwe Hinrichs, Zentrum für Marine Umweltwissenschaften (MARUM), Universität Bremen, persönliche Mitteilung). Auch ist die Acetylierung von Phosphoglycerinen relativ selten. *In vivo* sind acetylierte Lipide bei der Aktivierung von Thrombocyten (*platelet-activating factor*, PAF, 1-Alkyl-2-acetyl-sn-glycerin-3-phosphocholin, Snyder, 1990) beschrieben. In der Lebensmittel-

industrie werden Fette durch Acetylierung modifiziert, in der Analytik werden Lipide über Derivatisierung mit radioaktiv markiertem Acetat quantifiziert (Stein *et al.*, 1991).

Bei den Archaea werden Polyprenyl-Ether-Lipide aufgrund ihrer erhöhten Resistenz gegenüber Hydrolyse und Oxidation als Anpassung an deren extreme Lebensräume gesehen (Boucher, 2007). Die bakterielle Zellmembran ist hingegen aus Fettsäure-Ester-Lipiden aufgebaut. Bei diesen Molekülen führen Doppelbindungen zur Erhöhung der Fluidität, die andererseits bei zunehmender Kettenlänge abnimmt. Die Membranalokalisation (vgl. 4.4.3) von HepG mit sieben Doppelbindungen könnte also z.B. die Beweglichkeit der Lipidmembran von *B. subtilis* beeinflussen. Ob diese durch die Doppelbindungen und den Methylgruppen des Polyprenyls zunimmt oder durch die Länge von 35 Kohlenstoffatomen ab (ohne die Methylgruppen sind es immerhin noch 28 Kohlenstoffatome in direkter Reihe), kann nur empirisch bestimmt werden. Hinzu kommt die Frage nach der Orientierung in der Membran von *B. subtilis*, also, ob die Glyceringruppe auf der cytosolischen Seite zu liegen kommt oder ob sie nach außen zur Zellwand gerichtet ist. Es ist auch noch unklar, ob das Molekül überhaupt linear vorliegt und die Doppelmembran von *B. subtilis* durchspannt oder ob es auf sich selbst rückfaltet und in einer Hälfte der Membran bleibt.

Hinweise auf eine möglicherweise gravierende Veränderung der Zellwand/-membran konnten im täglichen Umgang mit den genomischen *knockout*-Mutanten von *araM* und *pcrB* im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden:

- geringere Wachstumsgeschwindigkeit, aber dennoch gleiche Zelldichte in stationärer Phase;
- keine Einschränkung der Sporulationsfähigkeit trotz verzögertem Einsetzen;
- gesteigerte Transformationseffizienz bei Elektroporation;
- Produktion von Pulcherriminsäure (ein Eisenkomplex; Uffen & Canale-Parola, 1972, Kupfer *et al.*, 1967);
- veränderte Kolonieform (weichere Kanten, weniger ausgefranst);
- veränderte Konsistenz der Zellen (kompaktes Pellet, Klumpenbildung).

Manche diese Beobachtungen wurden mit Hilfe von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen des Wildtyps und des Stamms *B. subtilis* $\Delta pcrB$ in Zusammenarbeit mit

Frau Angelika Kühn (Institut für Zoologie, Universität Regensburg) dokumentiert. (Abbildung 46).

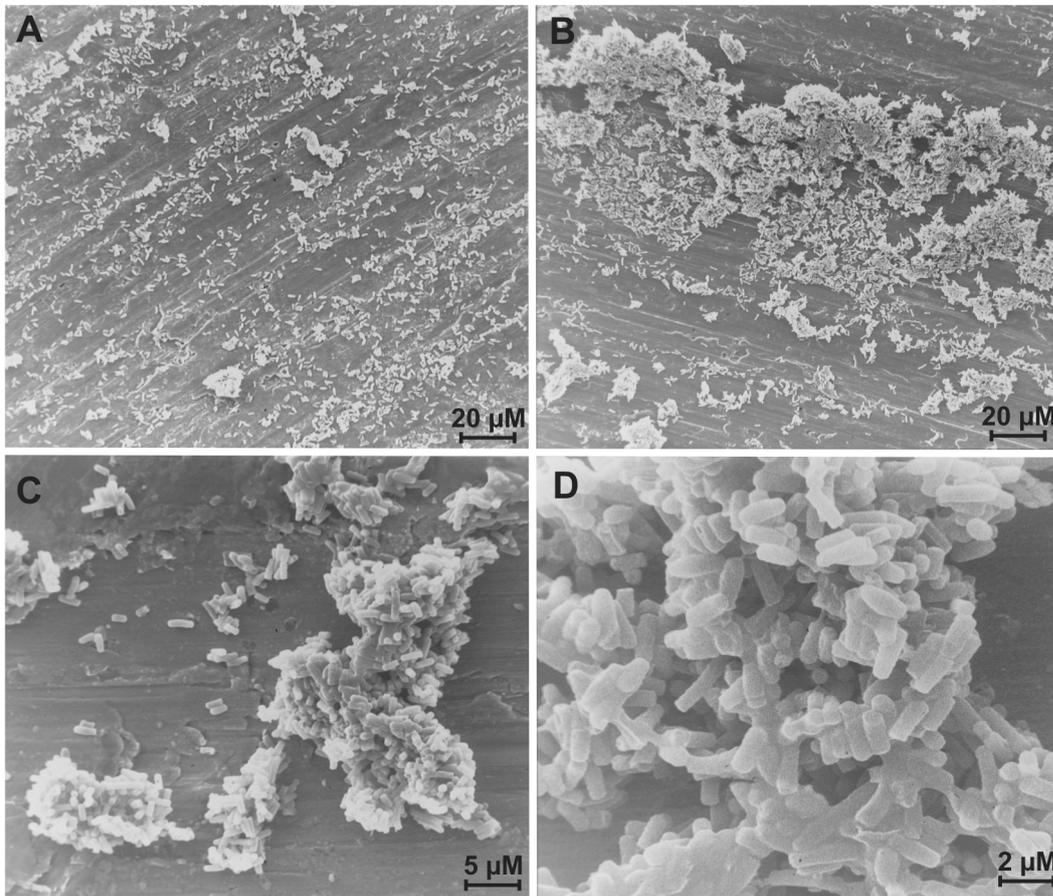


Abbildung 46: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *B. subtilis*. (A) wt, 500 x, (B) $\Delta pcrB$, 500 x, (C) $\Delta pcrB$, 2000 x, (D) $\Delta pcrB$, 5000 x.

Die makroskopisch beobachtete Verklumpung der *B. subtilis* $\Delta pcrB$ Zellen kann mikroskopisch aufgelöst werden. Die Zellen scheinen regelrecht verklebt zu sein und bilden dadurch mitunter bizzare Strukturen aus. Der *knockout* von *pcrB* könnte also die Zusammensetzung der Membran und/oder der Zellwand von *B. subtilis* so verändert haben, dass es zu den beobachteten Effekten kommt. Es fällt auf, dass es sich bei den Bacillales mit dem Gen *pcrB* häufig um Organismen und pathogene Spezies handelt, bei denen Adhäsion an Oberflächen von Bedeutung ist. Jedoch ist die momentane Datenlage nicht ausreichend für eine plausible Hypothese.

5.4 Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass G1P und HepPP die *in vivo*-Substrate von PcrB in *B. subtilis* darstellen. Weiter wurde nachgewiesen, dass das Produkt HepGP enzymatisch dephosphoryliert und acetyliert wird. Die für diese Modifizierungen verantwortlichen Enzyme sollen nun z.B. über fraktionierende Größenausschlusschromatographie aus dem Zellextakt gereinigt und über ihre katalytische Aktivität identifiziert werden.

Die Affinitäten von PcrB für GGPP und HepPP können nun durch *in vitro* Messungen, z.B. mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie, bestimmt und mit den Resultaten der MD-Simulation verglichen werden. Über *steady-state* kinetische Messungen sollen zum anderen die katalytischen Parameter (K_M , k_{cat}) für beide Polyprenyl-PP-Substrate bestimmt und verglichen werden. Um einen molekularen Einblick in den Mechanismus der Spezifität zu erhalten, soll zudem HepPP mit PcrB co-kristallisiert werden. Das Substrat der GGGPS GGPP ist kommerziell verfügbar, HepPP hingegen wird von Prof. Dr. Ewa Swiezewska (Abteilung für Lipidbiochemie, Institut für Biochemie und Biophysik der Polnischen Akademie der Wissenschaften, Warschau, Polen) im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt.

Offen bleibt die Frage nach der biologischen Funktion von HepG in den Bacteria. Dazu wurde bereits begonnen, in Zusammenarbeit mit Prof. Kai-Uwe Hinrichs (Zentrum für Marine Umweltwissenschaften (MARUM), Universität Bremen) die Membranen von *B. subtilis* Wildtyp und dem Stamm $\Delta pcrB$ vergleichend zu analysieren. Erste Ergebnisse lassen gravierende Unterschiede in der Lipidkomposition vermuten. Auch die Orientierung von HepG in der Membran birgt noch offene Fragen, die über immunologische Markierung und Transmissionselektronenmikroskopie angegangen werden könnten. Für weitere phänotypische Untersuchungen wird auch an einem neuen *knockout* von *pcrB* über doppelt homologe Rekombination ohne die Veränderung des Gesamtaufbaus des Operons gearbeitet. So können polare Effekte ausgeschlossen und der beobachtete Phänotyp verifiziert werden. In Zusammenarbeit mit mikrobiologisch orientierten Arbeitsgruppen kann die Funktion von HepG in *B. subtilis* und langfristig auch für die ganze Gruppe der Bacillales geklärt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Albers, S.V., Jonuscheit, M., Becker, S., Urich, T., Kletzin, A., Tampe, R., Driessen, A.J.M., Schleper, C. (2006). Homologous and heterologous expression of proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Appl Environ Microbiol* 72, 102-111.
- Aleksandrov, M.L., Gall, L.N., Krasnov, N.V., Nikolayev, V.I., Pavlenko, V.A., Shkurov, V.A. (1984). Extraction of ions from solutions at atmospheric pressure, mass spectrometric analysis of bioorganic substances. *Dokl. Akad. Nauk SSR* 277, 379-383.
- Allen, K.N. (2007). Form finds function. *Nat. Chem. Biol.* 3, 452-453.
- Armstrong, J.J., Baddiley, J., Buchanan, J.G., Davision, A.L., Kelemen, M.V., Neuhaus, F.C. (1959). Composition of teichoic acids from a number of bacterial walls. *Nature* 184, 247-248.
- Aslanidis, C., de Jong, P.J. (1990). Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res* 18, 6069-6074.
- Bachmann, B.J. (1990). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol Rev* 54, 130-197.
- Badger, J., Sauder, J.M., Adams, J.M., Antonysamy, S., Bain, K., Bergseid, M.G., Buchanan, S.G., Buchanan, M.D., Batiyenko, Y., Christopher, J.A., Emtage, S., Eroshkina, A., Feil, I., Furlong, E.B., Gajiwala, K.S., Gao, X., He, D., Hendle, J., Huber, A., Hoda, K., Kearins, P., Kissinger, C., Laubert, B., Lewis, H.A., Lin, J., Loomis, K., Lorimer, D., Louie, G., Maletic, M., Marsh, C.D., Miller, I., Molinari, J., Muller-Dieckmann, H.J., Newman, J.M., Noland, B.W., Pagarigan, B., Park, F., Peat, T.S., Post, K.W., Radojicic, S., Ramos, A., Romero, R., Rutter, M.E., Sanderson, W.E., Schwinn, K.D., Tresser, J., Winhoven, J., Wright, T.A., Wu, L., Xu, J., Harris, T.J. (2005). Structural analysis of a set of proteins resulting from a bacterial genomics project. *Proteins* 60, 787-796.
- Bando, M., Oka, M., Kawai, K., Obazawa, H., Kobayashi, S., Takehana, M. (2006). NADH binding properties of rabbit lens lambda-crystallin. *Mol. Vis.* 12, 692-697.
- Bascham, J.A., Benson, A.A., Calvin, M. (1950). The path of carbon in photosynthesis. *J Biol Chem* 185, 781-787.
- Beckonert, O., Keun, H.C., Ebbels, T.M., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J.C., Nicholson, J.K. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2, 2692-2703.
- Bishop, D.H., Pandya, K.P., King, H.K. (1962). Ubiquinone and vitamin K in bacteria. *Biochem J* 83, 606-614.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.
- Bloch, F., Rabi, I.I. (1945). Atoms in Variable Magnetic Fields. *Reviews of Modern Physics* 17, 237.

- Boucher, Y. (2007). Lipids: biosynthesis, function, and evolution. In *Archaea, Molecular and Cellular Biology*, R. Cavicchioli, ed. (Washington, DC: ASM Press), pp. 341-353.
- Boucher, Y., Kamekura, M., Doolittle, W.F. (2004). Origins and evolution of isoprenoid lipid biosynthesis in archaea. *Mol. Microbiol.* 52, 515-527.
- Chen, A., Zhang, D., Poulter, C.D. (1993). (S)-geranylgeranyl glyceryl phosphate synthase. Purification and characterization of the first pathway-specific enzyme in archaeobacterial membrane lipid biosynthesis. *J Biol Chem* 268, 21701-21705.
- Chen, I., Dubnau, D. (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol* 2, 241-249.
- Chen, L., Vitkup, D. (2007). Distribution of orphan metabolic activities. *Trends Biotechnol* 25, 343-348.
- Clejan, S., Krulwich, T.A., Mondrus, K.R., Seto-Young, D. (1986). Membrane lipid composition of obligately and facultatively alkalophilic strains of *Bacillus* spp. *J Bacteriol* 168, 334-340.
- Consden, R. (1954). Practical aspects of paper chromatography. *Br Med Bull* 10, 177-182.
- Consden, R., Gordon, A.H., Martin, A.J. (1944). Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. *Biochem. J.* 38, 224-232.
- Corey, R.B., Pauling, L. (1953). Molecular Models of Amino Acids, Peptides, and Proteins. *Review of Scientific Instruments* 24, 621-627.
- Daiyasu, H., Hiroike, T., Koga, Y., Toh, H. (2002). Analysis of membrane stereochemistry with homology modeling of sn-glycerol-1-phosphate dehydrogenase. *Protein Eng.* 15, 987-995.
- de Carvalho, L.P., Zhao, H., Dickinson, C.E., Arango, N.M., Lima, C.D., Fischer, S.M., Ouerfelli, O., Nathan, C., Rhee, K.Y. (2010). Activity-based metabolomic profiling of enzymatic function: identification of Rv1248c as a mycobacterial 2-hydroxy-3-oxoadipate synthase. *Chem Biol* 17, 323-332.
- Dittmer, J.C., Lester, R.L. (1964). A Simple, Specific Spray for the Detection of Phospholipids on Thin-Layer Chromatograms. *J Lipid Res* 15, 126-127.
- Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D., Alice, M.B. (1968). Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics* 49, 2240-2249.
- Dubnau, D. (1991). Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* 55, 395-424.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71.
- Fiévet, J.B., Dillmann, C., Curien, G., de Vienne, D. (2006). Simplified modelling of metabolic pathways for flux prediction and optimization: lessons from an in vitro reconstruction of the upper part of glycolysis. *Biochem J* 396, 317-326.
- Fischer, W. (1994). Lipoteichoic acid and lipids in the membrane of *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 183, 61-76.
- Fjeld, C.C., Birdsong, W.T., Goodman, R.H. (2003). Differential binding of NAD⁺ and NADH allows the transcriptional corepressor carboxyl-terminal binding protein to serve as a metabolic sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9202-9207.

- Flannagan, S.E., Clewell, D.B. (2002). Identification and characterization of genes encoding sex pheromone cAM373 activity in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 44, 803-817.
- Förster, T. (1947). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437, 55-57.
- Freire, E. (1995). Differential Scanning Calorimetry. In Protein stability and folding theory and practice, B.A. Shirley, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 191-218.
- Frisch, R., Stern, O. (1933). Über die magnetische Ablenkung von Wasserstoffmolekülen und das magnetische Moment des Protons. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* 85, 4-16.
- Furnham, N., Garavelli, J.S., Apweiler, R., Thornton, J.M. (2009). Missing in action: enzyme functional annotations in biological databases. *Nat Chem Biol* 5, 521-525.
- Gattinger, A., Schloter, M., Munch, J.C. (2002). Phospholipid etherlipid and phospholipid fatty acid fingerprints in selected euryarchaeotal monocultures for taxonomic profiling. *FEMS Microbiol Lett* 213, 133-139.
- Glansdorff, N., Xu, Y., Labedan, B. (2008). The Last Universal Common Ancestor: emergence, constitution and genetic legacy of an elusive forerunner. *Biol Direct* 3, 29.
- Gründling, A., Schneewind, O. (2007). Synthesis of glycerol phosphate lipoteichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 8478-8483.
- Guex, N., Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- Guldan, H. (2007). Charakterisierung der *sn*-Glycerin-1-Phosphat-abhängigen Enzyme AraM und PcrB aus *Bacillus subtilis*. In Institut für Biophysik und physikalische Biochemie, Lehrstuhl Biochemie II (Universität Regensburg), p. 118.
- Guldan, H., Sterner, R., Babinger, P. (2008). Identification and characterization of a bacterial glycerol-1-phosphate dehydrogenase: Ni(2+)-dependent AraM from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 47, 7376-7384.
- Han, J.S., Ishikawa, K. (2005). Active site of Zn²⁺-dependent *sn*-glycerol-1-phosphate dehydrogenase from *Aeropyrum pernix* K1. *Archaea* 1, 311-317.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hemmi, H., Shibuya, K., Takahashi, Y., Nakayama, T., Nishino, T. (2004). (S)-2,3-Di-O-geranylgeranylglyceryl phosphate synthase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Molecular cloning and characterization of a membrane-intrinsic prenyltransferase involved in the biosynthesis of archaeal ether-linked membrane lipids. *J. Bio.l Chem.* 279, 50197-50203.
- Hermann, J.C., Marti-Arbona, R., Fedorov, A.A., Fedorov, E., Almo, S.C., Shoichet, B.K., Raushel, F.M. (2007). Structure-based activity prediction for an enzyme of unknown function. *Nature* 448, 775-779.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.

- Huson, D.H., Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* **23**, 254-267.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Jahn, U., Summons, R., Sturt, H., Grosjean, E., Huber, H. (2004). Composition of the lipids of Nanoarchaeum equitans and their origin from its host Ignicoccus sp. strain KIN4/I. *Arch Microbiol* **182**, 404-413.
- Jahnke, L.L., Eder, W., Huber, R., Hope, J.M., Hinrichs, K.U., Hayes, J.M., Des Marais, D.J., Cady, S.L., Summons, R.E. (2001). Signature lipids and stable carbon isotope analyses of Octopus Spring hyperthermophilic communities compared with those of Aquificales representatives. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5179-5189.
- Joseph, P., Fantino, J.R., Herbaud, M.L., Denizot, F. (2001). Rapid orientated cloning in a shuttle vector allowing modulated gene expression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **205**, 91-97.
- Kates, M. (1986). Techniques of lipidology : isolation, analysis, and identification of lipids, 2nd rev. edn (Amsterdam ; New York, NY, U.S.A.: Elsevier; Sole distributors for the U.S.A. and Canada, Elsevier Science Pub. Co.).
- Kates, M., Wassef, M.K., Pugh, E.L. (1970). Origin of the glycerol moieties in the glycerol diether lipids of Halobacterium cutirubrum. *Biochim Biophys Acta* **202**, 206-208.
- Kellogg, J.M.B., Rabi, I.I., Ramsey, N.F., Zacharias, J.R. (1939). The Magnetic Moments of the Proton and the Deuteron. The Radiofrequency Spectrum of H₂ in Various Magnetic Fields. *Physical Review* **56**, 728.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S.D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K.K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., Boland, F., Brignell, S.C., Bron, S., Bunai, K., Chapuis, J., Christiansen, L.C., Danchin, A., Debarbouille, M., Dervyn, E., Deuerling, E., Devine, K., Devine, S.K., Dreesen, O., Errington, J., Fillinger, S., Foster, S.J., Fujita, Y., Galizzi, A., Gardan, R., Eschevins, C., Fukushima, T., Haga, K., Harwood, C.R., Hecker, M., Hosoya, D., Hullo, M.F., Kakeshita, H., Karamata, D., Kasahara, Y., Kawamura, F., Koga, K., Koski, P., Kuwana, R., Imamura, D., Ishimaru, M., Ishikawa, S., Ishio, I., Le Coq, D., Masson, A., Mael, C., Meima, R., Mellado, R.P., Moir, A., Moriya, S., Nagakawa, E., Nanamiya, H., Nakai, S., Nygaard, P., Ogura, M., Ohanan, T., O'Reilly, M., O'Rourke, M., Pragai, Z., Pooley, H.M., Rapoport, G., Rawlins, J.P., Rivas, L.A., Rivolta, C., Sadaie, A., Sadaie, Y., Sarvas, M., Sato, T., Saxild, H.H., Scanlan, E., Schumann, W., Seegers, J.F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S.J., Simon, M., Stragier, P., Studer, R., Takamatsu, H., Tanaka, T., Takeuchi, M., Thomaidis, H.B., Vagner, V., van Dijl, J.M., Watabe, K., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamamoto, M., Yamamoto, Y., Yamane, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H., Zuber, U., Ogasawara, N. (2003). Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4678-4683.
- Koga, Y., Morii, H. (2007). Biosynthesis of ether-type polar lipids in archaea and evolutionary considerations. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 97-120.
- Koltun, W.L. (1965). Precision space-filling atomic models. *Biopolymers* **3**, 665-679.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans,

- A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Danchin, A., et al. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249-256.
- Kupfer, D.G., Uffen, R.L., Canale-Parola, E. (1967). The role of iron and molecular oxygen in pulcherrimin synthesis by bacteria. *Arch Mikrobiol* 56, 9-21.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leaver, M., Dominguez-Cuevas, P., Coxhead, J.M., Daniel, R.A., Errington, J. (2009). Life without a wall or division machine in *Bacillus subtilis*. *Nature* 457, 849-853.
- Lopez-Diaz, I., Clarke, S., Mandelstam, J. (1986). *spoIID* operon of *Bacillus subtilis*: cloning and sequence. *J Gen Microbiol* 132, 341-354.
- Lorenz, M.G., Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* 58, 563-602.
- Makino, S., Uchida, I., Terakado, N., Sasakawa, C., Yoshikawa, M. (1989). Molecular characterization and protein analysis of the *cap* region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 171, 722-730.
- Morii, H., Nishihara, M., Koga, Y. (2000). CTP:2,3-di-O-geranylgeranyl-sn-glycero-1-phosphate cytidyltransferase in the methanogenic archaeon *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. *The Journal of biological chemistry* 275, 36568-36574.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.
- Nelson, M.M., Nichols, P.D., Leighton, D.L. (1999). The occurrence and possible significance of diacylglyceryl ether lipids in abalone. *Lipids* 34, 423-427.
- Nemoto, N., Oshima, T., Yamagishi, A. (2003). Purification and characterization of geranylgeranyl-glyceryl phosphate synthase from a thermoacidophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*. *J Biochem (Tokyo)* 133, 651-657.
- Nishihara, M., Koga, Y. (1995). sn-glycerol-1-phosphate dehydrogenase in *Methanobacterium thermoautotrophicum*: key enzyme in biosynthesis of the enantiomeric glycerophosphate backbone of ether phospholipids of archaeobacteria. *J Biochem* 117, 933-935.
- Nishihara, M., Yamazaki, T., Oshima, T., Koga, Y. (1999). sn-glycerol-1-phosphate-forming activities in Archaea: separation of archaeal phospholipid biosynthesis and glycerol catabolism by glycerophosphate enantiomers. *J Bacteriol* 181, 1330-1333.
- Noike, M., Katagiri, T., Nakayama, T., Koyama, T., Nishino, T., Hemmi, H. (2008). The product chain length determination mechanism of type II geranylgeranyl diphosphate synthase requires subunit interaction. *FEBS J* 275, 3921-3933.
- Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 302, 205-217.
- Novick, R.P., Clowes, R.C., Cohen, S.N., Curtiss, R., 3rd, Datta, N., Falkow, S. (1976). Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol Rev* 40, 168-189.

- Ohnuma, S., Hirooka, K., Tsuruoka, N., Yano, M., Ohto, C., Nakane, H., Nishino, T. (1998). A pathway where polyprenyl diphosphate elongates in prenyltransferase. Insight into a common mechanism of chain length determination of prenyltransferases. *J Biol Chem* 273, 26705-26713.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4, 2411-2423.
- Payandeh, J., Fujihashi, M., Gillon, W., Pai, E.F. (2006). The crystal structure of (S)-3-O-geranylgeranylglycerol phosphate synthase reveals an ancient fold for an ancient enzyme. *J. Biol. Chem.* 281, 6070-6078.
- Payandeh, J., Pai, E.F. (2007). Enzyme-driven speciation: crystallizing Archaea via lipid capture. *J. Mol. Evol.* 64, 364-374.
- Pereto, J., Lopez-Garcia, P., Moreira, D. (2004). Ancestral lipid biosynthesis and early membrane evolution. *Trends Biochem. Sci.* 29, 469-477.
- Peterhoff, D. (2009). Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren zur Untersuchung der Dimerisierung von PcrB. In Institut für Biophysik und physikalische Biochemie, Lehrstuhl Biochemie II (Universität Regensburg).
- Petit, M.A., Dervyn, E., Rose, M., Entian, K.D., McGovern, S., Ehrlich, S.D., Bruand, C. (1998). PcrA is an essential DNA helicase of *Bacillus subtilis* fulfilling functions both in repair and rolling-circle replication. *Mol Microbiol* 29, 261-273.
- Privalov, P.L., Khechinashvili, N.N. (1974). A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. *Journal of molecular biology* 86, 665-684.
- Purcell, E.M., Torrey, H.C., Pound, R.V. (1946). Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Physical Review* 69, 37.
- Reinstein, J., Vetter, I.R., Schlichting, I., Rosch, P., Wittinghofer, A., Goody, R.S. (1990). Fluorescence and NMR investigations on the ligand binding properties of adenylate kinases. *Biochemistry* 29, 7440-7450.
- Richards, F.M. (1992). Folded and unfolded proteins: an introduction. In *Protein folding*, T.E. Creighton, ed. (New York: W.H. Freeman), pp. xix, 547 p.
- Ruzheinikov, S.N., Burke, J., Sedelnikova, S., Baker, P.J., Taylor, R., Bullough, P.A., Muir, N.M., Gore, M.G., Rice, D.W. (2001). Glycerol dehydrogenase. structure, specificity, and mechanism of a family III polyol dehydrogenase. *Structure* 9, 789-802.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Saito, N., Robert, M., Kochi, H., Matsuo, G., Kakazu, Y., Soga, T., Tomita, M. (2009). Metabolite Profiling Reveals YihU as a Novel Hydroxybutyrate Dehydrogenase for Alternative Succinic Semialdehyde Metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 284, 16442-16451.
- Sakasegawa, S., Hagemeyer, C.H., Thauer, R.K., Essen, L.O., Shima, S. (2004). Structural and functional analysis of the *gpsA* gene product of *Archaeoglobus fulgidus*: a glycerol-3-phosphate dehydrogenase with an unusual NADP+ preference. *Protein Sci* 13, 3161-3171.

- Sambrook, J., Fritsch, E.E., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor, New York).
- Schmid, F.X. (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In *Proofs of Protein Structure: A practical approach*, T.E. Creighton, ed. (Oxford: IRL Press), pp. 259-295.
- Sharp, P.A., Sugden, B., Sambrook, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12, 3055-3063.
- Snyder, F. (1990). Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators. *Am J Physiol* 259, C697-708.
- Soderberg, T., Chen, A., Poulter, C.D. (2001). Geranylgeranylgeranyl glyceryl phosphate synthase. Characterization of the recombinant enzyme from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochemistry* 40, 14847-14854.
- Song, L., Kalyanaraman, C., Fedorov, A.A., Fedorov, E.V., Glasner, M.E., Brown, S., Imker, H.J., Babbitt, P.C., Almo, S.C., Jacobson, M.P., Gerlt, J.A. (2007). Prediction and assignment of function for a divergent N-succinyl amino acid racemase. *Nat Chem Biol* 3, 486-491.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.
- Spizizen, J. (1958). Transformation of Biochemically Deficient Strains of *Bacillus Subtilis* by Deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 44, 1072-1078.
- Stahl, E. (1967). *Dünnschicht-Chromatographie ein Laboratoriumshandbuch*, 2., gänzlich Neubearb. und stark erw. Aufl. edn (Berlin: Springer-Verlag).
- Stein, J.M., Smith, G.A., Luzio, J.P. (1991). An acetylation method for the quantification of membrane lipids, including phospholipids, polyphosphoinositides and cholesterol. *Biochem J* 274 (Pt 2), 375-379.
- Sturt, H.F., Summons, R.E., Smith, K., Elvert, M., Hinrichs, K.U. (2004). Intact polar membrane lipids in prokaryotes and sediments deciphered by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass spectrometry--new biomarkers for biogeochemistry and microbial ecology. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18, 617-628.
- Takahashi, I., Ogura, K., Seto, S. (1980). Heptaprenyl pyrophosphate synthetase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 255, 4539-4543.
- Takami, H., Takaki, Y., Chee, G.J., Nishi, S., Shimamura, S., Suzuki, H., Matsui, S., Uchiyama, I. (2004). Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. *Nucleic Acids Res* 32, 6292-6303.
- Tatusov, R.L., Galperin, M.Y., Natale, D.A., Koonin, E.V. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* 28, 33-36.
- Thorne, K.J., Kodicek, E. (1966). The structure of bactoprenol, a lipid formed by lactobacilli from mevalonic acid. *Biochem J* 99, 123-127.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Uffen, R.L., Canale-Parola, E. (1972). Synthesis of pulcherriminic acid by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 111, 86-93.

- Vagner, V., Dervyn, E., Ehrlich, S.D. (1998). A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology 144 (Pt 11)*, 3097-3104.
- Vishwasrao, H.D., Heikal, A.A., Kasischke, K.A., Webb, W.W. (2005). Conformational dependence of intracellular NADH on metabolic state revealed by associated fluorescence anisotropy. *J. Biol. Chem.* 280, 25119-25126.
- von Ellenrieder, G., Kirschner, K., Schuster, I. (1972). The binding of oxidized and reduced nicotinamide adenine-dinucleotide to yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 26, 220-236.
- Wächtershäuser, G. (2003). From pre-cells to Eukarya--a tale of two lipids. *Mol. Microbiol.* 47, 13-22.
- Weijers, J.W., Schouten, S., Hopmans, E.C., Genevasen, J.A., David, O.R., Coleman, J.M., Pancost, R.D., Sinninghe Damste, J.S. (2006). Membrane lipids of mesophilic anaerobic bacteria thriving in peats have typical archaeal traits. *Environ Microbiol* 8, 648-657.
- Wierenga, R.K. (2001). The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS letters* 492, 193-198.
- Wilson, G.G., Murray, N.E. (1991). Restriction and modification systems. *Annu Rev Genet* 25, 585-627.
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4576-4579.
- Wolff, E.C., Wolff, J., Park, M.H. (2000). Deoxyhypusine synthase generates and uses bound NADH in a transient hydride transfer mechanism. *J. Biol. Chem.* 275, 9170-9177.
- Xue, G.-P., Johnson, J.S., Dalrymple, B.P. (1999). High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Journal of Microbiological Methods* 34, 183-191.
- Zeigler, D.R., Pragai, Z., Rodriguez, S., Chevreux, B., Muffler, A., Albert, T., Bai, R., Wyss, M., Perkins, J.B. (2008). The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains. *J Bacteriol* 190, 6983-6995.
- Zhang, D., Poulter, C. (1993a). Biosynthesis of Archaeobacterial lipids in *Halobacterium halobium* and *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *The Journal of Organic Chemistry* 58, 3919 - 3922.
- Zhang, D., Poulter, C.D. (1993b). Analysis and purification of phosphorylated isoprenoids by reversed-phase HPLC. *Analytical biochemistry* 213, 356-361.
- Zhang, D., Poulter, C.D. (1993c). Biosynthesis of Archaeal Ether Lipids. Formation of Ether Linkages by Prenyltransferases. *J Am Chem Soc*, 1270 - 1277.
- Zhang, Y.W., Koyama, T., Marecak, D.M., Prestwich, G.D., Maki, Y., Ogura, K. (1998). Two subunits of heptaprenyl diphosphate synthase of *Bacillus subtilis* form a catalytically active complex. *Biochemistry* 37, 13411-13420.

7 Anhang

7.1 Polyprenylpyrophosphate in der Natur

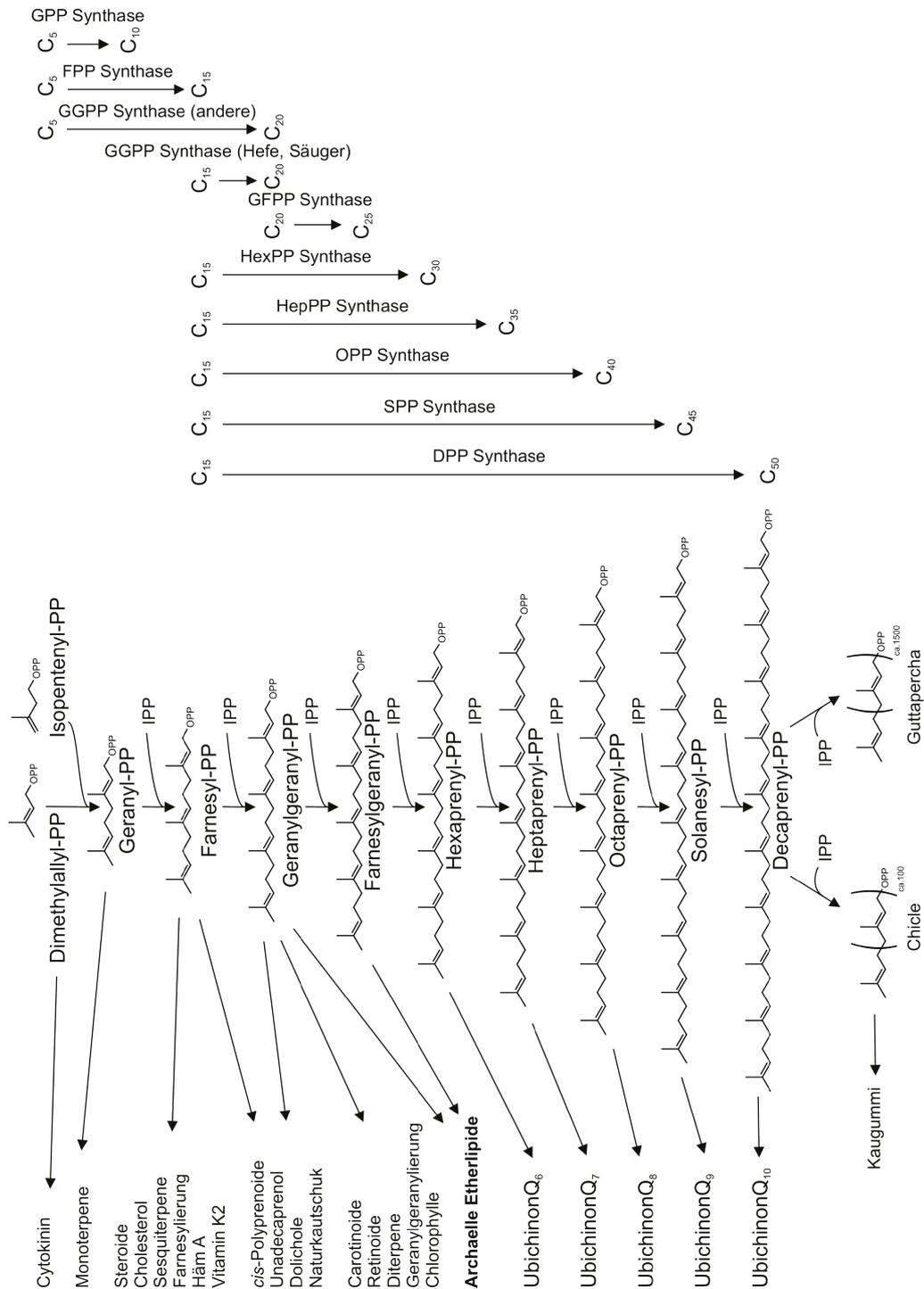


Abbildung 47: Synthese von linearen Polyprenyl-PP über Polyoprenyl-PP-Synthasen und die Verwendung ihrer Produkte in der Natur. PP bezeichnet Pyrophosphat.

In der Natur finden verschiedene Polyprenylpyrophosphate (Polyprenyl-PP) in sowohl essentiellen Bausteinen als auch in Sekundärmetaboliten Verwendung. Exemplarisch sind die Etherlipide der Archaea und die Seitenkette des Häms und der verschiedenen Ubichinone bzw. die Carotinoide und Steroide zu nennen. Aufgebaut werden diese Polyprenyl-PP über spezifische Polyprenyl-PP-Synthasen ausgehend von C₅-Dimethylallyl-PP durch das Addieren von C₅-Isopentenyl-PP (Abbildung 47).

7.2 Präparative Papierchromatographie

Zur Präparation von ¹⁴C-G1P wurde ¹⁴C-Glucose mit den Enzymen des oberen Teils der Glycolyse zu DHAP und mit AraM stereospezifisch zu G1P umgesetzt. Gereinigt wurde das Produkt über präparative Papierchromatographie (Abbildung 48).

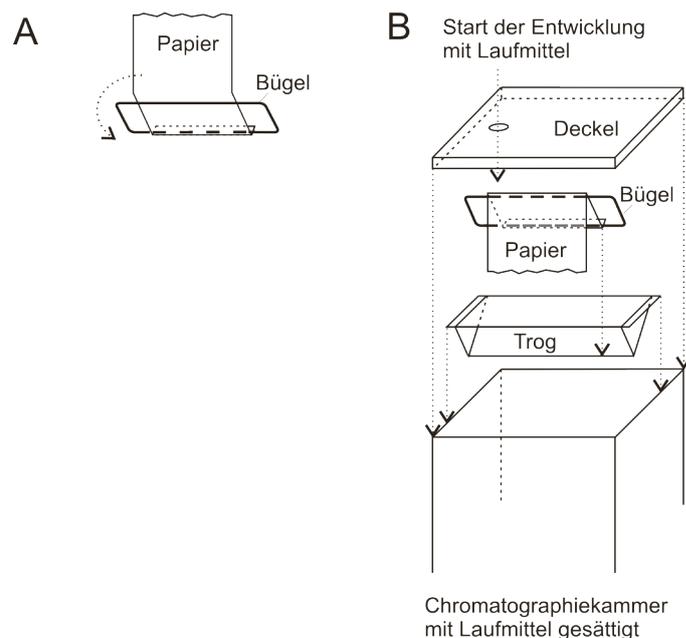


Abbildung 48: Aufbau der Papierchromatographie. (A) Das Chromatographiepapier wird in der angegebenen Weise über den Bügel gefaltet und so in den leeren Trog der Chromatographiekammer eingesetzt. (B) In die Kammer wird zur Sättigung 10 ml Laufmittel gegeben, der Trog in die Kammer eingesetzt und mit dem Deckel verschlossen. Der Lauf wird nachdem die Kammer gesättigt ist über Zugabe des Laufmittels gestartet.

Etabliert wurde die Synthese über sequenzielle Zugabe der Enzyme und die genommen Proben wurden über Papierchromatographie aufgetrennt. Anschließend wurde die Synthese präparativ wiederholt (Abbildung 49).

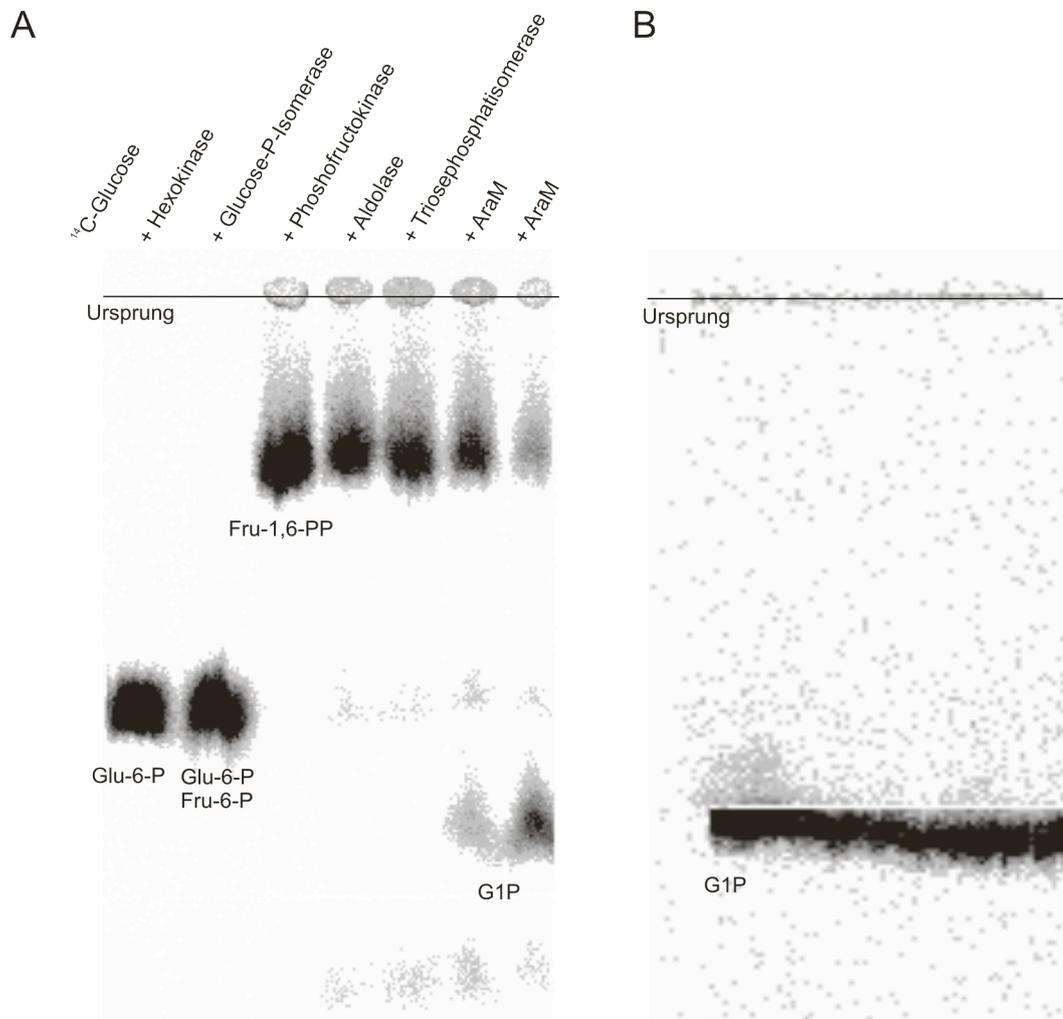


Abbildung 49: Präparative Papierchromatographie. (A) Analyse der gebildeten Produkte nach sequenzieller Zugabe der Enzyme der Glycolyse und AraM. (B) Präparativer Lauf zur Synthese von ¹⁴C-G1P. Das Chromatogramm wurde auf Whatman Nr. 1 Paper hängend mit Isopropanol/Ammoniak/Wasser, 6:3:1 (v/v/v) entwickelt und autoradiographiert.

7.3 Kalibrierungsgerade der Superdex-75 (16/60) Säule

Zur Bestimmung apparater Molekulargewichte wurde die analytische Superdex-75 (16/60) Säule mit dem kommerziell erhältlichen LMW-Gelfiltrationskits (GE HEALTHCARE) nach Herstellerangaben kalibriert (Tabelle 15).

Tabelle 15: Retentionsvolumina und molare Massen der für die Kalibrierung der Superdex S 75 (16/60) Gelfiltrationssäule verwendeten Proteine.

Protein	Retentionsvolumen [ml]	M_R [kDa]	$\log M_R$
Ribonuclease A	14,09	13,7	4,14
Chymotrypsinogen	13,54	25	4,40
Ovalbumin	11,95	43	4,63
Albumin	11,12	67	4,83
PcrB	12,36	57	4,75
afGGGPS	11,90	47	4,66
saPcrB	11,96	45	4,65
ImPcrB	11,49	58	4,76
gkPcrB	11,43	59	4,77
mtGGGPS	10,29	106	5,03
tkGGGPS	10,14	109	5,06

Die resultierende Kalibrierungsgerade ist in Abbildung 50 gezeigt.

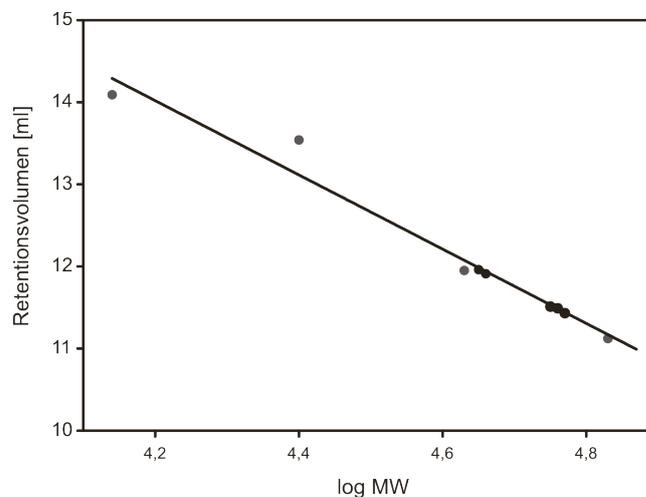


Abbildung 50: Kalibrierungsgerade der Superdex-75 (16/60) Säule. Proteine mit bekannter molekularer Masse (Tabelle 15) wurden bei RT auf die Säule aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min in 50 mM KP, 300 mM KCl, pH 7,5 eluiert. Aufgetragen ist das Retentionsvolumen gegen den Logarithmus des Molekulargewichts ($\log MW$). Die berechnete lineare Funktion der Kalibrierungsgerade ist $y = -4,5255 x + 33,033$.

7.4 Massenspektren von X₁ und X₃

Zur Massenbestimmung der *in vivo*-Produkte von PcrB wurden von Josef Kiermaier (Zentrale Massenanalytik, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg) Messungen mit einem Elektrosprayionisationsmassenspektrometer (ESI-MS) durchgeführt. Dazu wurden Zellextrakte von *B. subtilis* $\Delta pcrB$ + PcrB flüssigchromatographisch aufgetrennt und fraktioniert (Abbildung 51).

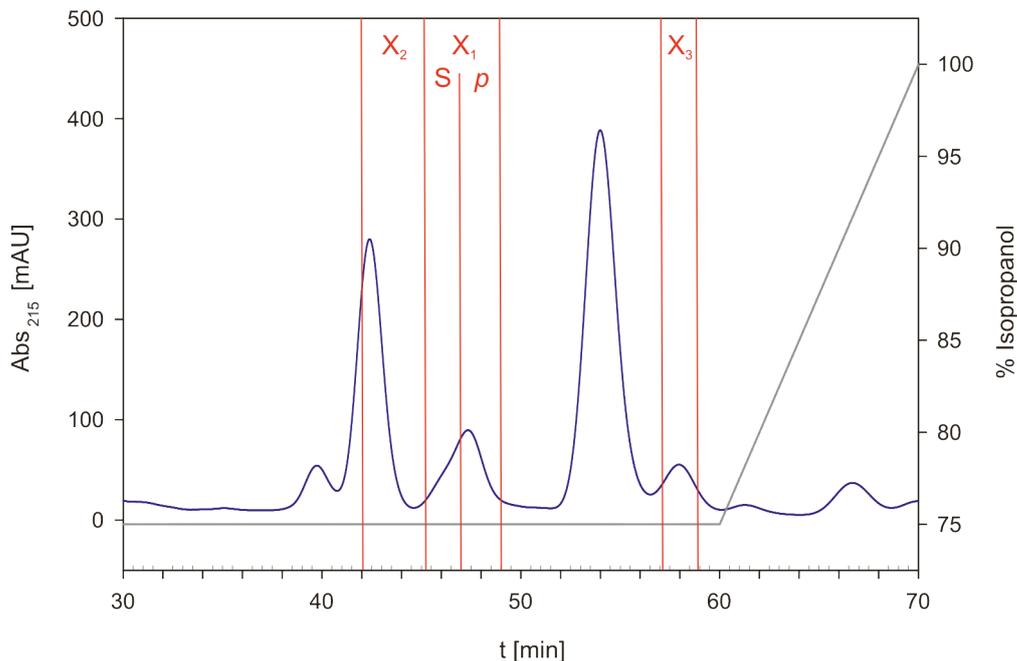
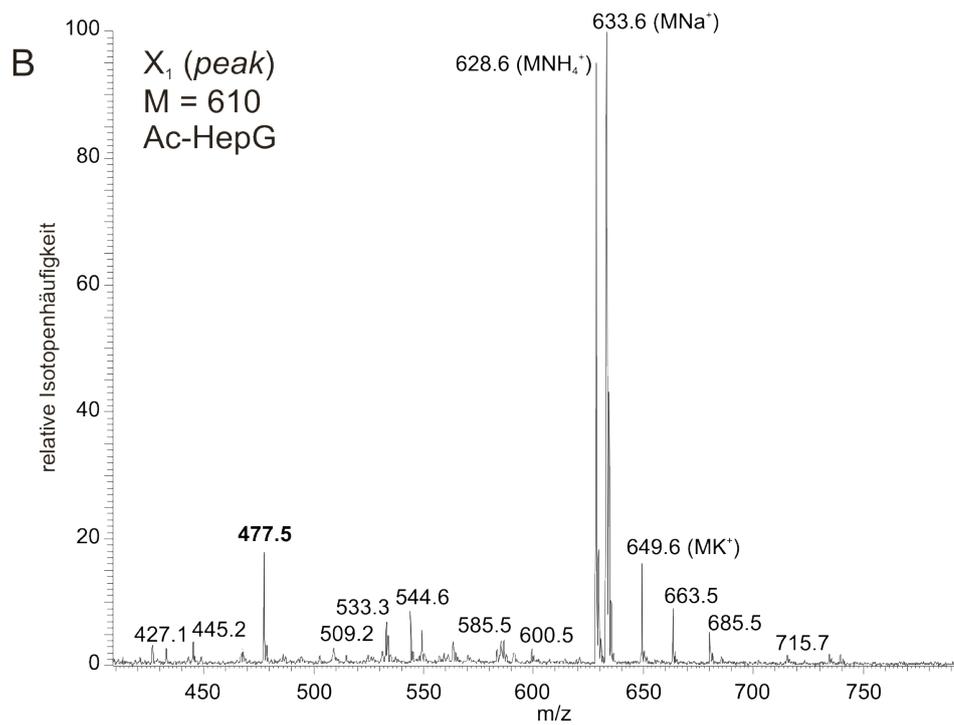
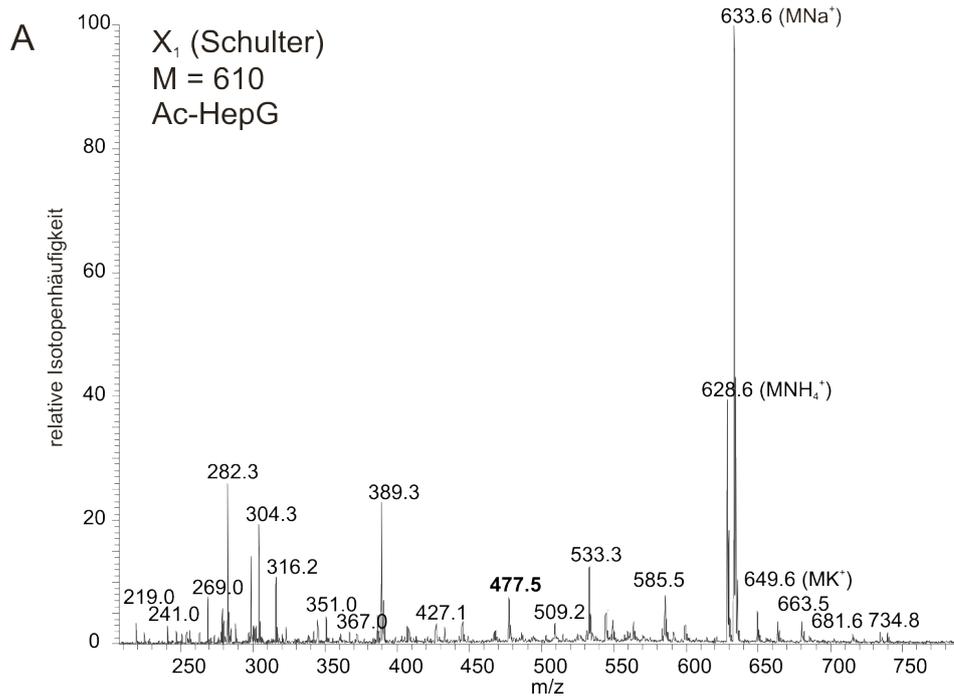


Abbildung 51: Fraktionierte Auftrennung von *B. subtilis* Lipidextrakt. Ein *B. subtilis* $\Delta pcrB$ + PcrB Extrakt wurde an einer Kromasil C₁₈-Säule aufgetrennt und fraktioniert. Die Fraktionen sind nach den entsprechenden Produkten X₂, X₁ (unterteilt in S, Schulter und *p*, *peak*) und X₃ beschriftet. Die Elutionsbedingungen entsprechen Abbildung 32.

Die X₁, X₂ und X₃ beinhaltenden Fraktionen wurden mit 5 mM Ammoniumacetat versetzt und im Positiv-Ionenmodus gemessen. Die Abbildung 36 zeigt die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse des Produktes X₂, Abbildung

Abbildung 52 die Ergebnisse für X₁ (Schulden und *peak*) und X₃.



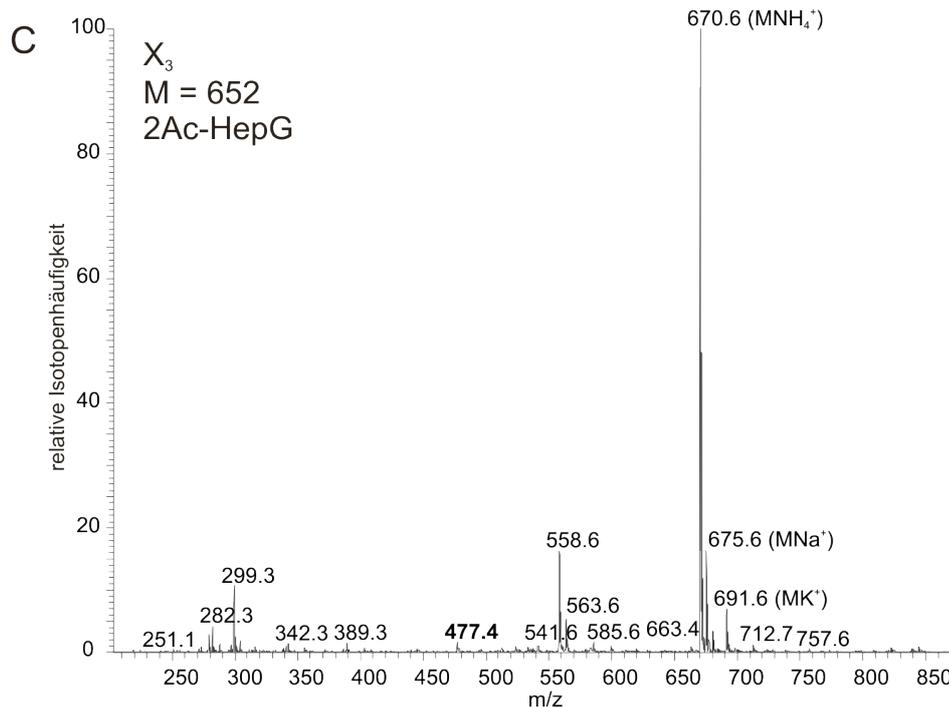


Abbildung 52: Massenspektrometrische Analyse von X₁ und X₃ im Positiv-Ionenmodus. ESI-MS-Analyse der Fraktion der Schulter des *peaks* von X₁ nach flüssigchromatographischer Auftrennung. Markiert sind die Ammoniumadukte (MNH₄⁺), Natriumadukte (MNa⁺) und Kaliumadukte (MK⁺) eines Moleküls der Masse 610 Da. **(B)** ESI-MS Analyse der Fraktion des *peaks* von X₁. Markiert sind ebenfalls die Ammoniumadukte (MNH₄⁺), Natriumadukte (MNa⁺) und Kaliumadukte (MK⁺) eines Moleküls der Masse 610 Da. **(C)** ESI-MS Analyse der Fraktion von X₃. Die Haupt-*peaks* stellen ebenfalls die Ammoniumadukte (MNH₄⁺), Natriumadukte (MNa⁺) und Kaliumadukte (MK⁺) eines Moleküls der Masse 610 Da dar. In den Spektren ist jeweils das C₃₅-Zerfallsprodukt mit der Masse 477 Da durch Fettdruck markiert.

7.5 Hochaufgelöste Massenspektren von X₁ und X₂

Zur Aufklärung der Identität der *in vivo* Produkte wurde zudem von Prof. Dr. Frank-Michael Matysik (Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg) hochauflösende massenspektrometrische Messungen an einem μ TOF-MS (Bruker) mit Kapillar-ESI-Interface im Positiv-Ionenmodus in 50% Isopropanol mit 0,1% Ameisensäure durchgeführt (Abbildung 53).

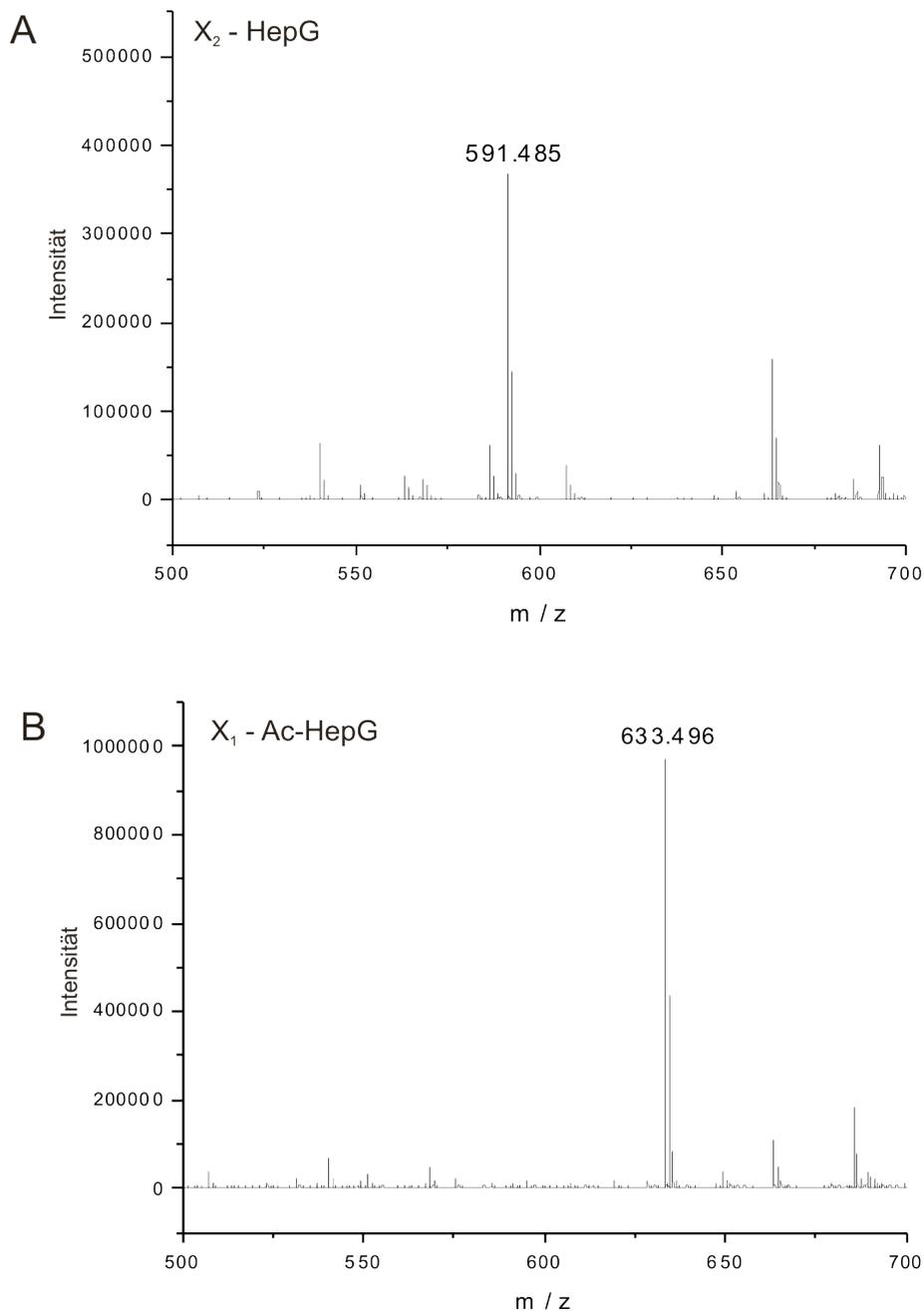


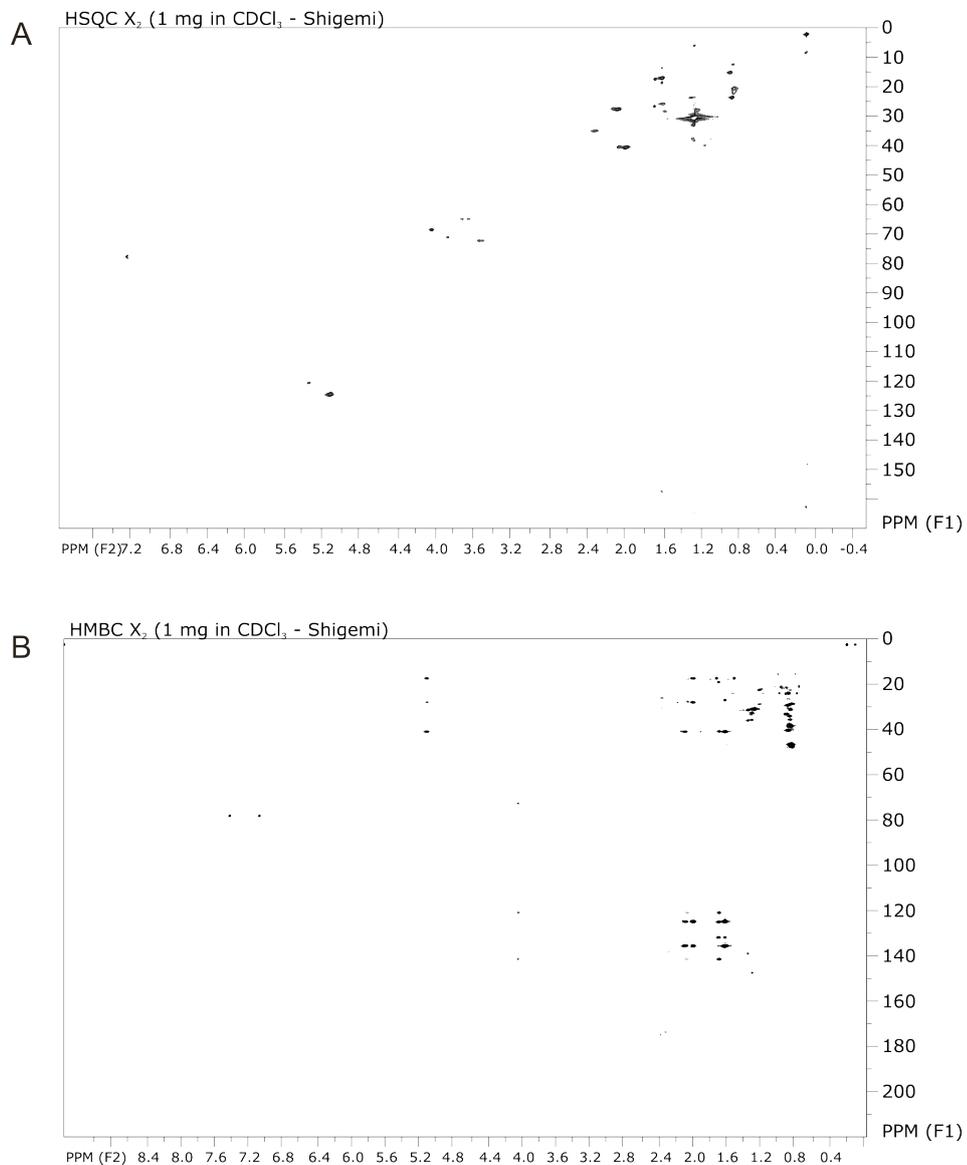
Abbildung 53: Hochauflösende massenspektrometrische Analyse von X_2 und X_1 im Positiv-Ionenmodus. (A) ESI-MS-Analyse von X_2 – HepG. Der Haupt-peak stellt das Natriumadukt des Moleküls der Masse 568 Da dar. **(B)** ESI-MS-Analyse von X_1 – Ac-HepG. Der Haupt-peak stellt das Natriumadukt des Moleküls der Masse 610 Da dar.

Die hochauflösende Massenspektrometrie erlaubt zudem die Berechnung der Summenformel des Moleküls aus dem Isotopenverhältnis. Für X_2 konnte so HepG als Natriumadukt zu $C_{38}H_{64}NaO_3$ mit einem maximalen Fehler von 10 mDa bestätigt

werden. Ebenso bestätigt wurde die Massendifferenz der Acetatgruppe von 42 Da zwischen X₂ und X₁. Die Spektren der Schulter und der *peak*-Fraktion von X₁ waren identisch.

7.6 NMR Spektren von X₂

Neben dem bereits gezeigten ¹H Spektrum von X₂ wurden von Herrn Fritz Kastner noch HSQC, HMBC und COSY Spektren in einem CDCl₃-Shigemi-NMR-Röhrchen am Avance III 600 (BRUKER) Spektrometer (NMR Abteilung, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg) aufgenommen (Abbildung 54).



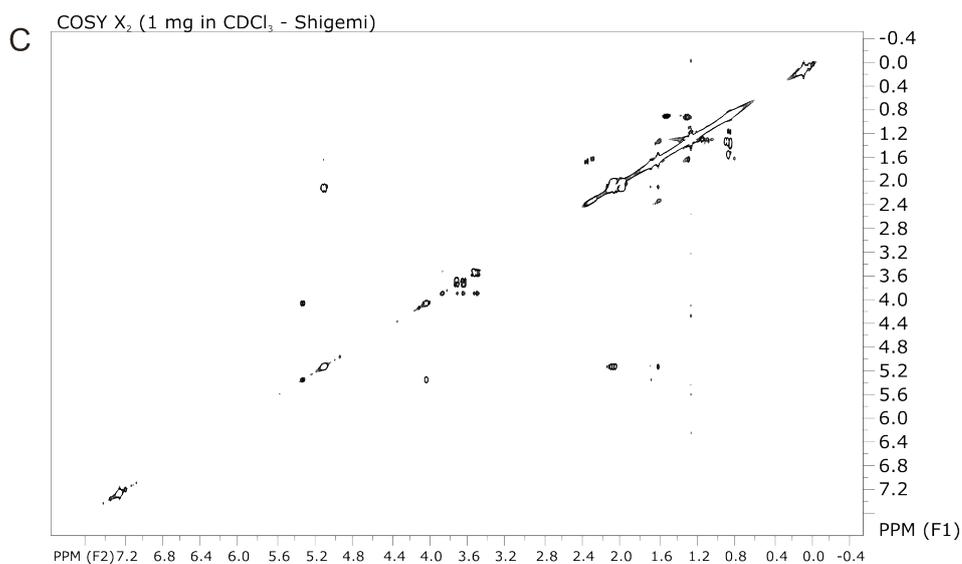


Abbildung 54: NMR Spektren von X₂ – HepG. HSQC-Spektrum; **(B)** HMBC-Spektrum; **(C)** COSY-Spektrum. ~ 1 mg X₂ in CDCl₃ in einem CDCl₃-Shigemi Röhrchen. Die Spektren wurden bei 600 MHz (¹H) bzw 150 MHz (¹³C) aufgenommen. Tetramethylsilan wurde als interner Standard verwendet.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Sterner für das interessante Thema, seine Anregungen und für seine Hilfe und Unterstützung herzlich danken.

Bei dem direkten Betreuer dieser Arbeit, Dr. Patrick Babinger, bedanke ich mich für die Möglichkeit mein Projekt zu entwickeln und mit ihm die Funktionsaufklärung zu etablieren. Ich danke ihm für die Hilfe, die ständige Bereitschaft zur Diskussion sowie die fachlich kompetente und immer freundschaftliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Ludwig Lehle danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für seine Anregungen hinsichtlich der Synthese von G1P und der Etablierung verschiedener Chromatographietechniken.

Herrn PD Dr. Winfried Hausner danke ich für sein Expertenwissen bezüglich Archaea und die Übernahme des Amtes des dritten Prüfers.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Thomm bedanke ich mich für die Diskussion, das Herstellen des Kontaktes zu Herrn Prof. Dr. Kai-Uwe Hinrichs und die Bereitschaft sich als Ersatzprüfer zu Verfügung zu halten.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Wirth danke ich für den Stamm *B. subtilis* 168 wt, die Diskussion der aufgetretenen Phänotypen und den Vorsitz des Kolloquiums.

Der Konrad-Adenauer-Stiftung danke ich für die Förderung meiner Arbeit im Rahmen eines Promotionsstipendiums und für die Möglichkeit der Teilnahme an interessanten Seminaren und dem 59. Treffen der Nobelpreisträger in Lindau/Bodensee.

Ich danke Herrn Josef Kiermaier für die Aufnahme von Massenspektren, Herrn Prof. Dr. Frank-Michael Matysik für die Erstellung und Auswertung von hochaufgelösten Massenspektren und Herrn Fritz Kastner für die Aufnahme der NMR-Spektren. Markus Schmid danke ich für die Auswertung des Spektrums und Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann für die Beantwortung aller Fragen rund um NMR.

Bei Dr. Jürgen Vogl bedanke ich mich für die Unterweisung in die Kultur von *B. subtilis*. Bei Frau Angelika Kühn bedanke ich mich für die Hilfe bei der Rasterelektronenmikroskopie. Klaus-Jürgen Tiefenbach danke ich für die Unterstützung bei allen Problemen mit Hard- und Software während der letzten fünf Jahre. Dr. Marco Boccola danke ich für die MD Rechnungen und die Modellierung von PcrB.

Stéphanie Garcia (*Université Louvain-la-Neuve*, Belgien) danke ich für ihre Hilfe bei der *in vitro* Bestimmung der Substratlängenspezifität von PcrB im Rahmen ihres Erasmus-Aufenthalts in Regensburg.

Bei Daniel Schneider und Dr. Alexander Ehrmann möchte ich mich für die gemeinsame Zeit bedanken. Vor allem für die fachliche Diskussion der Methoden und der Etablierung der HPLC waren sie unentbehrlich. Unvergessen sind auch die erlebten gemeinsamen Abenteuer zusammen mit Dr. Patrick Babinger in den Bergen und auf dem Wasser. Ihnen, sowie David Peterhoff und Florian Busch, danke ich zudem für das Ausrichten meines Junggesellenabschieds, für die Freundschaft und für die mentale Unterstützung in den vergangenen Jahren.

Für eine hilfsbereite und stets angenehme Zusammenarbeit möchte ich mich bei Anke Behr, Dietmar Birzer, Nadine Borst, Kathleen Burghardt, Linn Carstensen, Dr. Jörg Claren, Dr. Helmut Durchschlag, Dr. Susanne Dietrich, Christiane Endres, Uli Esslinger, Dr. Serap Evran, meiner Autoklavierpartnerin Sonja Fuchs, Barbara Kellerer, Dr. Felix List, Monika Meier, PD. Dr. Rainer Merkl, Claudia Pauer, Sebastian Peters, Bernd Reisinger, Hermine Reisner, Dr. Markus Richter, Daniel Roderer, Dr. Sandra Schlee, Thomas Schwab, Dr. Tobias Seitz, Josef Sperl, Jeanette Ückert und allen Ehemaligen, die hier nicht genannt sind, bedanken.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern Brigitte und Clemens danke ich für ihre Unterstützung während des Studiums, während der Promotion und in allen Lebenslagen.

Ganz besonders danke ich meiner Frau Sandra für ihre Geduld, unermüdliche Unterstützung, liebevolle Aufmunterung, Motivation und Bestätigung. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Teilpublikation

Guldan, H., Sterner R., Babinger P. (2008). "*Identification and characterization of a bacterial glycerol-1-phosphate dehydrogenase: Ni²⁺-dependent AraM from Bacillus subtilis.*" *Biochemistry* 47(28): 7376-84.

Tagungsbeiträge

Vorträge

Identification and Characterization of the first glycerol-1-phosphate Dehydrogenase from Bacteria.

3rd Symposium of RZBB, Kostenz, 10/2007

Are there Archaea-type ether lipids in Bacillus subtilis?

5th Symposium of RZBB, Kostenz, 09/2009

Archea-type Lipids in Bacteria

6th Symposium of RZBB, Kostenz, 09/2010

Poster

Guldan H., Sterner R., Babinger P.

Identification and Characterization of a Bacterial Glycerol-1-phosphate Dehydrogenase: Ni²⁺-Dependent AraM from Bacillus subtilis.

20. Faltertage, Lutherstadt-Wittenberg, 09/2008

Guldan H., Sterner R., Babinger P.

Does the Bacterium Bacillus subtilis Synthesize Archaea-Type Ether Lipids?

First International Symposium on Structural Systems Biology, Hamburg. 09/2009