

# **Identifizierung neuer Proteine des PHB-Granulumkomplexes und Charakterisierung von PHB Depolymerasen in *Ralstonia eutropha* H16**

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

**Vorgelegt von  
Anna Karolina Sommer  
aus Świdnica**

**Hauptberichter: Apl. Prof. Dr. D. Jendrossek**

**Mitberichter: Prof. Dr. B. Hauer**

**Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2016**

**Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart  
2016**

## **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Sznajder A., Jendrossek D., (2014). To be or not to be a poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase: PhaZd1 (PhaZ6) and PhaZd2 (PhaZ7) of *Ralstonia eutropha*, highly active PHB depolymerases with no detectable role in mobilization of accumulated PHB. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(16):4936-46.

Sznajder A., Pfeiffer D., Jendrossek D., (2014). Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(5):1847-58.

Tumlirsch T.\*, Sznajder A.\*, Jendrossek D., (2015). Formation of Polyphosphate by Polyphosphate kinases and its Relationship to PHB Accumulation in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl. Environ. Microbiol.* (accepted)

\*geteilte Erstautorschaft

## i. Inhaltsverzeichnis

i.	Inhaltsverzeichnis.....	III
ii.	Abkürzungsverzeichnis.....	V
iii.	Zusammenfassung.....	VII
iv.	Abstract.....	IX
1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Akkumulierung von Poly(3-hydroxybutyrat) (PHB) von <i>R. eutropha</i> H16.....	1
1.2	Die Zusammensetzung der Oberflächenschicht eines PHB Granulums.....	2
1.3	PHB Mobilisierung.....	4
1.3.1	PHB Depolymerasen aus <i>R. eutropha</i> H16.....	5
1.4	Biosynthese anderer Biopolymere in <i>R. eutropha</i> H16: Polyphosphat.....	7
1.5	Zielsetzung.....	9
2	MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1	Organismen, Plasmide und Primer.....	11
2.2	Nährmedien.....	16
2.2.1	Komplexmedien.....	16
2.2.2	Mineralmedien.....	16
2.2.3	Antibiotika.....	17
2.3	Stammhaltung und Konservierung.....	17
2.3.1	Kurzfristige Lagerung.....	17
2.3.2	Längerfristige Konservierung.....	18
2.4	Zellkultivierung.....	18
2.4.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	18
2.4.2	Kultivierung von <i>R. eutropha</i> H16.....	18
2.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	19
2.5.1	Nilrotfärbung.....	19
2.5.2	DAPI-Färbung.....	20
2.5.3	Propidiumiodidfärbung.....	20
2.6	Isolierung nPHB Granula aus <i>R. eutropha</i> H16.....	20
2.7	Bestimmung der nPHB-Konzentration und des apparenten Extinktionskoeffizienten.....	21
2.8	Gaschromatographie.....	22
2.9	Reinigung von Proteinen.....	23
2.10	Proteinbiochemische Methoden.....	24
2.10.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	24
2.10.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	25
2.10.3	Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Blue.....	26
2.11	Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	27
2.11.1	Turbidimetrischer Test zur Bestimmung der PHA Depolymeraseaktivität.....	27
2.11.2	Bestimmung von nPHB-Depolymeraseaktivitäten durch Titration.....	28
2.11.3	Bestimmung von Esterase-Aktivitäten.....	28
2.12	Nachweis von 3-HB durch HPLC.....	29
2.13	Genetische Methoden.....	30
2.13.1	Vorbehandlung von Geräten und Lösungen.....	30
2.13.2	Isolation genomischer DNA aus <i>R. eutropha</i> H16.....	30
2.13.3	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> .....	30
2.13.4	Standard-Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	30
2.13.5	Präparation von Nukleinsäuren aus Agarosegelen.....	31
2.13.6	Enzymatische Modifikation von DNA.....	31
2.13.7	PCR.....	32
2.13.8	Herstellung der <i>knock-out</i> Mutanten.....	34
2.13.9	Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen und Transformation.....	35
2.13.10	Konjugation.....	35
2.13.11	Sequenzierung.....	36
2.14	Phosphataufnahme Assay.....	36

2.15	<i>In vitro</i> Polyphosphat Quantifizierung mit DAPI-Fluoreszenz.....	37
2.16	Bakterielles Adenylatzyklase Two-Hybrid System .....	38
2.16.1	Genbank Screening Experiment.....	38
2.16.2	Two-Hybrid Interaktionsversuch mit bekannten Proteinen .....	39
2.16.3	Miller-Assay für 96-well Platten.....	40
2.17	Promotor-Aktivitätsmessung .....	41
2.18	Proteomanalyse.....	43
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE .....</b>	<b>46</b>
3.1	A2274, ein Interaktionspartner der PhaZa1 Depolymerase .....	46
3.1.1	Two-Hybrid-Analyse von A2273 und A2274 .....	48
3.1.2	Analyse der Aminosäuresequenz von A2273 und A2274 .....	52
3.1.3	Lokalisierung von A2274 .....	53
3.1.4	Deletionsanalyse von <i>a2274</i> .....	55
3.1.4.3	NB-Medium im Vergleich zu NB + NaGlukonat-Medium.....	59
3.1.5	Speicherung von Polyphosphat in <i>R. eutropha</i> H16 .....	61
3.1.6	Promotor-Aktivitätsmessung .....	67
3.1.7	Phosphataufnahme assay .....	68
3.1.8	Proteomanalyse.....	70
3.2	PHB-Depolymerasen .....	71
3.2.1	Einfluss der Expression von PhaZd1 und PhaZd2 auf die Speicherung von PHB .....	72
3.2.2	Expression der PhaZd1 und PhaZd2 Depolymerasen in <i>E. coli</i> BL21-Zellen und Aufreinigung.....	79
3.2.3	Biochemische Charakterisierung von PhaZd1 und PhaZd2.....	80
3.2.4	Intrazelluläre Lokalisierung von PhaZd1 und PhaZd2 .....	88
3.2.5	Deletion der <i>phaZd1</i> und <i>phaZd2</i> Gene.....	90
3.2.6	Bestimmung des Molekulargewichtes der Granula .....	92
3.2.7	Expressionskontrolle, LacZ-Reporter Assays.....	93
3.2.8	Proteomanalyse.....	95
3.3	Weitere Versuche zur Erforschung des PHB Granulums .....	96
3.3.1	Proteomanalyse des Granulums .....	96
3.3.2	Vier neue PHB assoziierte Proteine: A0225, A0671, A2001 und B1632 .....	98
3.3.3	Lokalisierung von A0225, A0671, A2001 und B1632 .....	100
3.3.4	Einfluss der Deletion von A0672 und B1632 auf die PHB-Speicherung .....	101
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>105</b>
4.1	A2274, ein Interaktionspartner der PhaZa1 Depolymerase .....	106
4.2	PHB-Depolymerasen PhaZd1 und PhaZd2 .....	110
4.3	Weitere Versuche zur Erforschung des PHB Granulums .....	113
<b>5</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>120</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>131</b>
v.	Danksagung.....	165
vi.	Lebenslauf.....	166

## ii. Abkürzungsverzeichnis

$\Delta$	Delta (Gendeletion)
3-HB	3-Hydroxybuttersäure, 3-Hydroxybutyrat
Blast	Programm zur Analyse biologischer Sequenzdaten, engl. Basic Local Alignment Search Tool
Bq	Becquerel, SI-Einheit der Aktivität einer Menge einer radioaktiven Substanz
C-terminal	Carboxy-Terminus eines Proteins
CoA	Coenzym A
cPHB	channel PHB
cpm	<i>Counts per Minute</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dPHB	denaturiertes parakristallines Poly(3-Hydroxybutyrat)
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EBPR	enhanced biological phosphate removal
et al.	et alii = und andere
ePHA	extrazellulärer PHA
eYfp	gelb fluoreszierendes Protein, engl. enhanced yellow fluorescent protein
Gfp	grün fluoreszierendes Protein, engl. green fluorescent protein
G	Gramm
GC	Gaschromatographie
H	Stunde
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. high performance liquid chromatography
i PHA	intrazellulärer PHA
kb	Kilobasen
KEEG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
LC-ESI-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Elektrosprayionisation-Tandem- Massenspektrometrie
LCL	long-chain-length
MCL	medium-chain-length
Min	Minute
MM	Mineralmedium
N-terminal	Amino-Terminus eines Proteins
NAD <sup>+</sup> , NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadeninukleotid, Nicotinamidadeninukleotidphosphat; oxidiert
NADH, NADPH	Nicotinamidadeninukleotid, Nicotinamidadeninukleotidphosphat;reduziert
NB	Nutrient Broth
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nPHB	native = biochemisch intakte PHB Granula (amorphes Poly(3- Hydroxybutyrat))

OD	Optimische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGAP	PHB-Granula-assoziiertes Protein
PHA	Polyhydroxyalkanoat
PhaA	$\beta$ -Ketothiolase
PhaB	Acetoacetyl-CoA-Reduktase
PhaC	PHA-Synthase
<i>phaCAB</i>	Operon der PHB-Biosynthese
PhaM	Granula Segregationsfaktor
PhaP	Phasin
PhaR	Regulator der Phasinexpression in <i>R. eutropha</i>
PhaZ	PHA-Depolymerase
PHB	Poly (3-Hydroxybuttersäure), Poly(3-Hydroxybutyrat)
PhoB	Responsregulator des Pho-Regulons
PhoR	Sensorkinase des Pho-Regulons
PitA	niedrig affiner Phosphattransporter
<i>p-NPB</i>	<i>p</i> -Nitrophenylbutyrat
PolyP	Polyphosphat
Ppk	PolyP Kinase
Ppx	Exopolyphosphatase
<i>pstSCAB</i>	Operon des hochaffinen Phosphattransportersystems
PTS	Phosphotransferasesystem
Rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
S	Sekunde
SCL	short-chain-length
SDS	Natriumdodecylsulfat
SK	Stammkultur
SL	Spurenelementlösung
T	Zeit
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	Units (Einheiten der Enzymaktivität)
w/w	weight per weight = Massenprozent
w/v	weight per volume = Gewicht pro Volumen
v/v	volume per volume = Volumenanteil
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl--D-galactopyranosid

### iii. Zusammenfassung

Der intrazelluläre Abbau von Poly (3-hydroxybutyrat) (PHB) wurde in dieser Arbeit in drei experimentellen Ansetzten untersucht. Der erste Ansatz war eine Two-Hybrid-Analyse unter Verwendung der PHB Depolymerase *phaZa1* als Köder-Gen. Das Ergebnis war die Identifizierung des Gens *a2274*. Die Fähigkeit von *A2274 in vivo* mit der PHB Depolymerase zu interagieren suggerierte, dass *A2274* bei der Mobilisierung von PHB beteiligt sein könnte. In der Tat konnte in den  $\Delta a2274$  Zellen keine signifikante Änderung des PHB-Gehalts in der stationären Wachstumsphase beobachtet werden. Stattdessen blieb der Gehalt mit 40-45% konstant hoch während beim Wildtyp ein starker PHB Abbau festgestellt wurde. Zusätzlich waren die  $\Delta a2274$  Zellen in ihrer Lebensfähigkeit reduziert. Co-Färbung der Zellen mit Nilrot und DAPI zeigte deutlich, dass von *R. eutropha* zwei Arten von Granula, PHB und Polyphosphat (PolyP), gebildet werden. Im Gegensatz zum Wildtyp war die Anzahl und Größe der PolyP Granula in  $\Delta a2274$  Zellen deutlich erhöht. Abschließend kann man sagen, dass die Deletion des *a2274* Gens zu Beeinträchtigung der PHB Mobilisierung in der stationären Wachstumsphase, zur Akkumulierung einer erhöhten Menge an PolyP Granula und zu Verringerung der Lebensfähigkeit geführt hat. Diese Ergebnisse legen nahe, dass das *a2274* Genprodukt sowohl am PolyP- als auch am PHB-Stoffwechsel beteiligt ist. Um eine putative Verbindung von *A2274* zum PHB Metabolismus anzudeuten wurde das neu identifizierte Protein PhaX genannt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die physiologischen Funktionen von zwei intrazellulären PHB Depolymerasen, PhaZd1 und PhaZd2, aus *Ralstonia eutropha* H16 untersucht. *In vitro* zeigten PhaZd1 und PhaZd2 eine hohe Aktivität gegenüber nativen PHB-Granula. Konstitutive Expression von sowohl PhaZd1 als auch PhaZd2 *in vivo* verringert oder verhindert sogar die Synthese von PHB. Die Expression der inaktiven PhaZd1-eYfp und PhaZd2-eYfp Fusionen (Serine (S190 und Ser193) wurde durch Alanin ersetzt), ergab die Kolokalisierung von ausschließlich der PhaZd1 Fusion mit den PHB-Granula. Die C-terminale eYfp-Fusion mit inaktivem PhaZd2 (S193A) führte zu fadenförmigen Strukturen und nicht zu einer Kolokalisierung an PHB-Granula. Chromosomale Deletion von *phaZd1*, *phaZd2* oder beiden Gene hatte keinen signifikanten Effekt auf die PHB Akkumulation und Mobilisierung während des Wachstums im Komplexmedium: NB bzw. NB-Glukonat. Darüber hinaus hat sowohl die Proteomanalyse von gereinigten nativen PHB-Granula als auch *lacZ*-Fusions Studien keinen Hinweis dafür liefern können, dass PhaZd1 oder PhaZd2 nachweisbar in der PHB Fraktion vorhanden sind oder überhaupt während des Wachstums in NB-Glukonat Medium exprimiert werden. Bei PhaZd1 und PhaZd2 handelt es sich somit um

zwei PHB Depolymerasen mit hoher PHB Abbauaktivität, die offenbar unter den verwendeten Wachstumsbedingungen nicht an der PHB Mobilisierung im *R. eutropha* H16 Wildtyp Stamm beteiligt sind. Die wahre *in vivo* Funktion von PhaZd1 und PhaZd2 bleibt unbekannt.

Der letzte Ansatz dieser Arbeit bestand aus der Identifizierung von Proteinen, die ausschließlich in der PHB Granulafraktion, gewonnen aus *Ralstonia eutropha* H16 Zellen, vorhanden waren und nicht aus der löslichen Fraktion oder der membran- bzw. membranassoziierten-Fraktion isoliert werden konnten. Somit handelt es sich um PHB-spezifische Proteine. Mit dieser Methode konnten 12 Proteine, die eine spezifische Lokalisierung am PHB Granulum aufwiesen und zusätzlich vier bereits bekannte PHB-assoziierte Proteine, die in geringer Konzentration auch in anderen Fraktionen vorhanden waren, identifiziert werden. Vier der gefundenen Proteine wurden zum ersten mal als PHB-assoziierten Proteinen identifiziert. Drei der neuen Proteine sind putative  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen, und zwei von ihnen (A0671 und B1632) besitzen ein PHB-Synthase/Depolymerase Motiv. Das Protein A0225 zeigt eine Ähnlichkeit zu den Patatin-like Phospholipasen. Die Beteiligung derartiger Enzyme wurde bis jetzt noch nicht im Zusammenhang mit PHB-Granula beschrieben. Dem vierten Protein (A2001) konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden, das kodierende Gen bildet aber ein putatives Operon mit der Acetoacetyl-CoA-Reduktase (*phaB2*) und PHB-Synthase (*phaC2*). Dies deutet auf eine Funktion im PHB Stoffwechsel hin. Die Lokalisierung der vier neuen Proteine an der PHB Granuloberfläche wurde *in vivo* durch Fluoreszenzmikroskopie mit Fusionsproteinen (eYfp) zusätzlich bestätigt. Im weiteren konnten erste Hinweise auf die funktionelle Beteiligung von A0671 und B1632 am PHB Stoffwechsel bestätigt werden. Deletion von A0671 und B1632 hatte eine geringe, jedoch nachweisbare Auswirkung auf die PHB Mobilisierungsfähigkeit der Zellen in der stationären Wachstumsphase.

#### iv. Abstract

Three different approaches were undertaken to gain more knowledge of the intracellular degradation process of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB). Two hybrid analysis using PHB depolymerase *phaZa1* as bait gene resulted in identification of the *a2274* gene. The ability of A2274 to interact with PHB depolymerase *in vivo* suggested that A2274 could somehow affect the ability of the cells to mobilize PHB during times of starvation. Indeed, the PHB content of  $\Delta a2274$  cells did not change significantly in the stationary growth phase and remained constantly high at 40-45%. Additionally, the  $\Delta a2274$  cells were reduced in viability. Co-staining of the cells with Nile red and DAPI clearly showed that two types of granules, PHB and polyphosphate (PolyP) granules, were produced by *R. eutropha*. In contrast to the wild type the number of PolyP granules per  $\Delta a2274$  cell was increased. In conclusion,  $\Delta a2274$  cells were strongly impaired in PHB mobilization in the stationary growth phase, accumulated an increased amount of PolyP granules and were reduced in viability. These findings suggest that the *a2274* gene product is somehow connected to PolyP granule formation and PHB metabolism. We designated the A2274 gene product as PhaX protein to indicate a putative but so far functionally unknown link to PHB metabolism.

In the second part of this thesis the putative physiological functions of two related intracellular (PHB) depolymerases, PhaZd1 and PhaZd2, of *Ralstonia eutropha* H16 were investigated both *in vivo* and *in vitro*. Constitutive expression of PhaZd1 or PhaZd2 reduced or even prevented the synthesis of PHB under PHB permissive conditions *in vivo*. Expression of translational fusions of enhanced yellow fluorescent protein (eYfp) with PhaZd1 and PhaZd2, in which the active-site serines (S190 and Ser193) were replaced by alanine, resulted in the colocalization of only PhaZd1 fusions with PHB granules. C-terminal fusions of inactive PhaZd2 (S193A) with eYfp revealed the presence of spindle-like structures, and no colocalization with PHB granules was observed. Chromosomal deletion of *phaZd1*, *phaZd2*, or both depolymerase genes had no significant effect on PHB accumulation and mobilization during growth in nutrient broth (NB) or NB gluconate medium. Moreover, neither proteome analysis of purified native PHB granules nor *lacZ* fusion studies gave any indication that PhaZd1 or PhaZd2 was detectably present in the PHB granule fraction or expressed at all during growth on NB gluconate medium. In conclusion, PhaZd1 and PhaZd2 are two PHB depolymerases with a high capacity to degrade PHB when artificially expressed but are apparently not involved in PHB mobilization in the wild type. The true *in vivo* functions of PhaZd1 and PhaZd2 remain obscure.

Finally, identification of proteins that were present in a PHB granule fraction isolated from *Ralstonia eutropha* H16 but absent in the soluble, membrane, and membrane-associated fractions revealed the presence of only 12 polypeptides with PHB-specific locations plus 4 previously known PHB-associated proteins with multiple locations. Four polypeptides were found that had not yet been identified in PHB granules. Three of the novel proteins are putative  $\alpha/\beta$ -hydrolases, and two of those (A0671 and B1632) have a PHB synthase/depolymerase signature. The third novel protein (A0225) is a patatin-like phospholipase, a type of enzyme that has not been described for PHB granules of any PHB-accumulating species. No function has been ascribed to the fourth protein (A2001), but its encoding gene forms an operon with acetoacetyl-CoA-reductase (*phaB2*) and PHB synthase (*phaC2*), and this is in line with a putative function in PHB metabolism. The localization of the four new proteins at the PHB granule surface was confirmed in vivo by fluorescence microscopy of constructed fusion proteins with enhanced yellow fluorescent protein (eYfp). Deletion of A0671 and B1632 had a minor but detectable effect on the PHB mobilization ability in the stationary growth phase, confirming the functional involvement of both proteins in PHB metabolism.

# 1 Einleitung

## 1.1 Akkumulierung von Poly(3-hydroxybutyrat) (PHB) von *R. eutropha* H16

Das Polymer Polyhydroxyalkanoat (PHA) ist ein biologisches, wasserunlösliches Polyester, und aufgrund seiner thermoplastischen Eigenschaften besteht ein großes akademisches und industrielles Interesse. Der Vorteil gegenüber konventionellem Plastik ist die Herstellung aus erneuerbaren Rohstoffen und die Bioabbaubarkeit (Anderson und Dawes, 1990; Jendrossek und Pfeiffer, 2014; Jendrossek et al., 1996; Keshavarz und Roy, 2010; Müller und Seebach, 1993). Das Anwendungsspektrum erstreckt sich vom Bioplastik für den alltäglichen Gebrauch bis zu Nanobeads als Biomaterialien für die personalisierte Medizin (Dinjaski und Prieto, 2015; Philip et al., 2007; Wu et al., 2009; Zinn et al., 2001). Es wurden bereits mehr als 150 unterschiedliche PHAs entdeckt, die in Abhängigkeit von den bildenden Monomereinheiten in folgende Gruppen eingeteilt werden können: PHA<sub>SCL</sub> (short-chain-length, weniger als C<sub>6</sub>), PHA<sub>MCL</sub> (medium-chain-length, C<sub>6</sub> bis C<sub>14</sub>) und PHA<sub>LCL</sub> (long-chain-length, mehr als C<sub>14</sub>) (Steinbüchel und Valentin, 1995). Poly(3-hydroxybutyrat) (PHB) ist das bekannteste Mitglied der PHA Familie und gehört zur Untergruppe der PHA<sub>SCL</sub>. PHB kommt in drei unterschiedlichen Formen vor, als hochmolekularer PHB-Speicherstoff ( $> 10^3$  (R)-3-hydroxybutyrat (3HB) Monomere), als oligo-PHB aus ca. 100 bis 200 3HB Monomeren oder als so genanntes „complexed“ oder „channel“ PHB (cPHB) aus weniger als 30 3HB Einheiten (Jendrossek und Pfeiffer, 2014). Für mehr Informationen zu oligo- bzw. cPHB siehe (Huang und Reusch, 1996; Reusch, 1995, 2012; Reusch et al., 1995). PHB als Speicherstoff wird von vielen Prokaryoten (Bakterien und Archaeen) intrazellulär in Form von „inclusion bodies“ (Granula) unter Limitierungsbedingungen zur Erhöhung der Überlebenschancen akkumuliert und kann bis zu 90% des Zellrockengewichts ausmachen (Anderson und Dawes, 1990; Madison und Huisman, 1999; Steinbüchel et al., 1992). *R. eutropha* H16 ist ein chemolithoautotrophes Betaproteobakterium, das in der Lage ist, große Mengen an PHB zu akkumulieren. *R. eutropha* repräsentiert den Modellorganismus für die Erforschung von PHB (Reinecke und Steinbüchel, 2009). Am häufigsten führen nicht ausbalancierte Wachstumsbedingungen, vor allem ein Überschuss der C-Quelle bei gleichzeitiger N-Limitierung zur PHB Speicherung. Ebenso kann beschränkte Verfügbarkeit von z.B. Phosphat oder Sauerstoff bei aeroben Organismen eine erhöhte Akkumulierung von PHB auslösen (Schembri et al., 1995; Schlegel et al., 1961a; Suzuki et al., 1986).

*R. eutropha* H16 synthetisiert PHB ausgehend von den Intermediaten des zentralen Stoffwechsels in drei relativ einfachen Schritten. Die Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA wird von der Ketothiolase (PhaA) katalysiert mit nachfolgender Reduktion zu (*R*)-3-Hydroxybutyryl-CoA durch die NADPH-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase (PhaB). Der letzte Schritt besteht aus der Polymerisierung der (*R*)-3-Hydroxybutyryl-CoA Einheiten durch die PHB-Synthase (PhaC) zur Bildung von PHB. In *R. eutropha* H16 aber auch in vielen anderen Organismen bilden alle drei Biosynthese-Gene ein Operon *phaCAB* und werden konstitutiv exprimiert (Anderson und Dawes, 1990; Haywood et al., 1989; Lawrence et al., 2005; Madison und Huisman, 1999; Steinbüchel et al., 1992).

An der Regulation der PHB Synthese sind zwei Regulatorproteine beteiligt. PhaR repräsentiert einen transkriptionellen Repressor, der entweder an PHB Granula oder an regulatorische DNA-Bereiche der Gene *phaP1*, *phaP3* und *phaR* (Autoregulation) bindet (Pötter und Steinbüchel, 2005; Pötter et al., 2002, 2005; York et al., 2002). PhaM dagegen kontrolliert die Lokalisierung der PHB Granula in *R. eutropha* H16 und fungiert als ein physiologischer Aktivator der PHB-Synthase (PhaC1) (Pfeiffer und Jendrossek, 2013, 2014; Wahl et al., 2012). Ferner wurde über Regulation der PHB Bildung mittels Stringent Response unter Beteiligung des regulatorischen PTS<sup>Ntr</sup>- Systems mit dem Proteinen EIIA<sup>Ntr</sup> (A0384) berichtet (Brigham et al., 2012a; Kaddor und Steinbüchel, 2011a, 2011b; Kaddor et al., 2012; Karstens et al., 2014; Pries et al., 1991).

### **1.2 Die Zusammensetzung der Oberflächenschicht eines PHB Granulums**

PHB kommt in unterschiedlichen physikalischen Konformationen vor. Bei schonend isolierten PHB-Granula (z.B. durch Glycerolgradientendichtezentrifugation) wird angenommen, dass es sich um den natürlichen = nativen *in vivo* Zustand der PHB-Granula handelt (nPHB) (Griebel et al., 1968; Jendrossek und Handrick, 2002; Merrick und Doudoroff, 1964). Ausschließlich die nPHB-Granula besitzen an der Oberfläche eine Reihe von Proteinen mit spezifischen Funktionen. Sobald die Struktur der nPHB-Granula durch chemische, physikalische bzw. biochemische Behandlung verändert wird, verlieren sie ihre Proteinschicht und beginnen in eine denaturierte, teilkristalline Form überzugehen. Diese stellen die sogenannten denaturierten PHB-Granula (dPHB) dar und kommen möglicherweise extrazellulär nach Zelltod und Zellyse der Bakterien vor (Griebel und Merrick, 1971; Jendrossek und Handrick, 2002; Merrick et al., 1965). Die Anwesenheit vieler Proteine in der Oberflächenschicht um den Polymerkern legt nahe, dass die PHB-Granula nicht nur einfache

## Einleitung

Speichermoleküle sondern komplexe subzelluläre Organellen darstellen. Diese werden als Carbonosomen bezeichnet (Jendrossek, 2009).

Häufig werden die Oberflächenproteine am PHB Granulum als integrierte Komponenten einer Lipid-Monolayer dargestellt (Grage et al., 2009; Pötter und Steinbüchel, 2005; Rehm, 2003). Dieses Model resultiert aus einer Arbeit zur Bestimmung der Zusammensetzung von PHB (Griebel et al., 1968) und wurde experimentell seit der Veröffentlichung nicht weiter untersucht. Die Tatsache, dass während des Zellaufschlusses zur Isolierung von nPHB auch die Phospholipide aus der Zellmembran freigesetzt werden und aufgrund ihrer Eigenschaften an die hydrophobe Oberfläche des PHB Granulums binden könnten, lässt es möglich erscheinen, dass es sich bei den detektierten Phospholipiden um Artefakte des Isolierungsprozesses handeln könnte. Aus diesem Grund wird die *in vivo* Anwesenheit von Phospholipiden als Bestandteil der PHB-Oberflächenschicht kritisch diskutiert (Jendrossek und Pfeiffer, 2014).

Die Proteine der Oberflächenschicht in *R. eutropha* H16 konnten dagegen eindeutig *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden und können in vier Gruppen eingeordnet werden. Zum einen sind dies Enzyme, die an der Biosynthese des Granulums beteiligt sind. Dazu gehören die PHB-Synthase (PhaC1) und die vermutlich katalytisch inaktive PhaC2. Für eine Zusammenfassung siehe (Cho et al., 2012; Pfeiffer und Jendrossek, 2014b; Pötter und Steinbüchel, 2006; Rehm, 2003b; Stubbe et al., 2005; Zhang et al., 2014). Die zweite Gruppe bilden die kleinen vermutlich katalytisch inaktiven Phasine (PhaP1-PhaP7). Diese amphiphilen Polypeptide sind für die Bestimmung der Größe, Anzahl und strukturellen Integrität der gebildeten Granula verantwortlich (Pfeiffer und Jendrossek, 2011, 2012; Pötter et al., 2004; Steinbüchel et al., 1995). Die dritte Gruppe besteht aus Proteinen, die für den Abbau der Granula (Mobilisierung) verantwortlich sind (PhaZa1 bis PhaZa5, PhaZb, PhaZc, PhaZd) und im Kapitel 1.3 vorgestellt werden. Die vierte Gruppe bilden zwei bereits erwähnte Proteine: PhaR (Pötter und Steinbüchel, 2005; Pötter et al., 2002, 2005; York et al., 2002) und PhaM (Pfeiffer und Jendrossek, 2013, 2014; Wahl et al., 2012), die die Fähigkeit besitzen sowohl an PHB Granulum als auch an DNA zu binden und regulatorische Funktionen übernehmen. Alle erwähnten Proteine werden unter den Namen PHB-Granula-assoziierte Proteine (PGAPs) zusammengefasst.

### 1.3 PHB Mobilisierung

Entsprechend der Aufteilung der PHA Granula in native und denaturierte Form erfolgt die Klassifikation der Abbauenzyme (genannt PHA Depolymerasen (PhaZ)) in intrazelluläre PHA Depolymerasen (i-PHA Depolymerasen), welche spezifisch natives PHA abbauen, und extrazelluläre PHA Depolymerasen (e-PHA Depolymerasen), spezifisch für den Abbau von denaturierten PHAs (Jendrossek und Handrick, 2002). Aus Sicht der Industrie und des Umweltschutzes sind e-PHA Depolymerasen (PHA abbauende Enzyme, die von zahlreichen Mikroorganismen in die Umwelt sezerniert werden) von größerem Interesse und wurden deshalb intensiver erforscht als i-PHA Depolymerasen. Seit 1989 wurden zahlreiche bakterielle e-PHA Depolymerasen charakterisiert (für eine Zusammenfassung siehe (Jendrossek, 2005; Jendrossek und Handrick, 2002). Zu den Erforschungen aus der jüngeren Vergangenheit gehören die Identifikation und Charakterisierung einer neuen Klasse von e-PHB Depolymerasen aus *Bacillus* sp. (Ma et al., 2011), und die Beschreibung einer e-PHB Depolymerase aus *Streptomyces ascomycinicus*, welche unter sauren Bedingungen PHA-Copolymere abbauen kann (García-Hidalgo et al., 2013) .

Unter intrazellulärem Abbau versteht man die aktive Mobilisierung des gespeicherten Polymers bei Nährstoffmangel durch das produzierende Bakterium selbst. Dies entspricht einer endogenen Nutzung und sichert den Organismen das Überleben in Abwesenheit einer geeigneten Kohlenstoff-/Energiequelle (Schlegel et al., 1961b). Im Gegensatz zu den e-PHA Depolymerasen sind i-PHA Depolymerasen relativ wenig erforscht. Die erste isolierte und charakterisierte PHB Depolymerase war PhaZa1 aus *R. eutropha* H16 (Handrick et al., 2000; Saegusa et al., 2001) gefolgt von einigen weiteren Enzymen aus *Paracoccus denitrificans* (Gao et al., 2001), *Rhodobacter spheroides* (Kobayashi et al., 2004), *Bacillus thuringiensis* (Tseng et al., 2006) und *Bacillus megaterium* (Chen et al., 2009). Die aus *Rhodospirillum rubrum* bereits 1964 beschriebene Depolymerase, die als Teil eines intrazellulären Enzymkomplexes (thermostabiler Aktivator, Depolymerase und Esterase) erkannt wurde, erwies sich als eine einzigartige periplasmatische PHB Depolymerase (Handrick et al., 2004a, 2004b; Merrick und Doudoroff, 1964). Eine intrazelluläre Depolymerase aus *R. rubrum* wurde inzwischen ebenso beschrieben (Sznajder und Jendrossek, 2011). Außerdem konnte der bis jetzt einzige Vertreter der PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerasen aus *Pseudomonas putida* KT2442 biochemisch charakterisiert werden (Eugenio et al., 2007) obwohl der Prozess der Mobilisierung und das verantwortliche Gen bereits viel früher aus Eigenhydrolyseversuchen mit nPHA und aus Experimenten mit Deletionsmutanten bekannt waren (Foster et al., 1994, 1996; Huisman et al., 1991).

## Einleitung

Die bis dato beschriebenen iPHB Depolymerasen bilden eine heterogene Gruppe mit keiner erkennbaren Domänenstruktur wie bei den ePHB Depolymerasen. Gemeinsam ist lediglich die für alle Depolymerasen charakteristische katalytische Triade aus einem Aspartat-, einem Histidin- und einem Serin- bzw Cysteinrest, wobei das Serin/Cystein innerhalb einer konservierter Sequenz, genannt Lipase-Box: Gly-X-**Ser/Cys**-X-Gly liegt. Weiterhin teilen alle iPHB Depolymerasen die Fähigkeit, nPHB Granula zu hydrolysieren, einige benötigen jedoch eine Vorbehandlung mit einer Protease. Denaturiertes PHB wird von den meisten i-PHA Depolymerasen nicht abgebaut. Das Substrat wird in Abhängigkeit des eingesetzten Enzyms zu 3-Hydroxybutyrat-Monomeren, Dimeren, Trimeren oder höheren Oligomeren umgesetzt. Die Oligomere können weiter von 3HB-Oligomerhydrolasen verarbeitet werden. Für die Reaktion des PHA-Abbaus wurde eine hydrolytische Spaltung, katalysiert von den PHA Depolymerasen, postuliert. Zusätzlich wurde ein alternatives thiolytisches Abbausystem von PHB für die PhaZa1 Depolymerase aus *R. eutropha* H16 vorgeschlagen. Die Depolymerase PhaZa1 ist in der Lage bei Zugabe von CoA die Spaltung des Polymers unter Bildung eines Hydroxyalkyl-CoA-Esters zu katalysieren (Uchino und Saito, 2006; Uchino et al., 2007). Der Vorteil dieses Mechanismus ist die Energiespeicherung der Esterbindung in Form des energiereichen Thioesters. 2013 wurde der Mechanismus des Abbauweges für PHB in *R. eutropha* H16 erweitert. Es wurde gezeigt, dass die iPHB Depolymerase PhaZa1 das PHB zu (*R*)-3HB-CoA umsetzt, das wahrscheinlich nicht freigesetzt wird, sondern direkt weiter von PhaZa1 zu Crotonyl-CoA umgewandelt wird. Somit stellt Crotonyl-CoA die Verbindung zwischen dem Abbau von PHB und dem  $\beta$ -Oxidationsweg dar (Eggers und Steinbüchel, 2013).

### 1.3.1 PHB Depolymerasen aus *R. eutropha* H16

Sieben Gene, die für eine PHB Depolymerase (*phaZs*) codieren könnten, wurden für *R. eutropha* H16 beschrieben. Basierend auf der Aminosäuresequenz wurden die Genprodukte in zwei Klassen eingeteilt. Depolymerasen mit der DepA-Domäne (PhaZa1 bis PhaZa5) und Depolymerasen mit der LpqC-Domäne (PhaZd1 und PhaZd2) (Reinecke und Steinbüchel, 2009). Die in der Literatur verwendete Nomenklatur ist für die PHB Depolymerasen nicht einheitlich (für die Zusammenfassung siehe Tabelle 1). Das Genprodukt PhaZa1 wurde ausreichend untersucht und eine signifikante Funktion als PHB Depolymerase wurde *in vivo* und *in vitro* bestätigt (Handrick et al., 2000; Kobayashi und Saito, 2003; Saegusa et al., 2001; Uchino et al., 2008). Auch für PhaZa2 konnte eine Beteiligung an der PHB-Mobilisierung unter C-Quellen Limitierung und Verfügbarkeit einer N-Quelle mit *knock-out* Mutanten

## Einleitung

gezeigt werden (York et al., 2003). Für die Beteiligung von PhaZa3 und PhaZa5 am aktiven Abbau vom PHB konnten keine Evidenzen gefunden werden (Brigham et al., 2012b; York et al., 2003). Das Gen *phaZa4* wurde nach abgeschlossener Sequenzierung des Megaplasmids pHG1 identifiziert und nicht weiter untersucht (Schwartz et al., 2003). Die PhaZd1 Depolymerase aus der zweiten Klasse der Enzyme erwies sich als die potenteste Depolymerase für den Abbau von nPHB Granula *in vitro*. Die *knock-out* Mutation dagegen hatte keinen bzw. nur sehr geringen Einfluss auf die Mobilisierung von gespeichertem PHB (Abe et al., 2005). Das *R. eutropha* H16 Genom enthält ein zusätzliches putatives PHB Depolymerase-Gen *phaZd2* (Pohlmann et al., 2006). Experimentellen Daten zur Funktion und zu den Eigenschaften der PhaZd2 Depolymerase sind bislang nicht verfügbar. Zusätzlich zu den PHB Depolymerasen wurden Gene, die für 3HB-Oligomerhydrolasen codieren, identifiziert und die entsprechenden Genprodukte (PhaZb und PhaZc) biochemisch untersucht (Kobayashi et al., 2003, 2005). Transkriptomanalysen der *R. eutropha* H16 Gene zeigten, dass neben *phaZa1* einige der postulierten iPHB Depolymerasen (*phaZa2*, *phaZa4*, *phaZa5* und *phaZd2*) exprimiert wurden (Brigham et al., 2012a; Lawrence et al., 2005; Peplinski et al., 2010), allerdings wurde eine Expression auf der Proteinebene nicht gezeigt. Zusammenfassend konnte bis dato die Beteiligung von lediglich zwei der identifizierten Proteine (PhaZa1 und PhaZa2) am Abbau von PHB bestätigt werden, wobei ausschließlich für PhaZa1 die *in vitro* Aktivität und die *in vivo* Bindung an PHB gezeigt werden konnte.

Neueste Arbeiten zeigen, dass PHB-Depolymerasen nicht nur für den Abbau des Polymers verantwortlich sind, sondern auch bei der dreidimensionalen Struktur der Granula eine Rolle spielen. Dies konnte elektronenmikroskopisch gezeigt werden indem Granula in verschiedene PHB Depolymerasemutanten von *R. eutropha* H16 miteinander verglichen wurden (Brigham et al., 2012b). Zellen mit der Genedeletion  $\Delta$ *phaZa2* oder einer Doppeldeletion der Gene *phaZa2* und *phaZa1* zeigten ein erhöhtes Verhältnis der Granulafläche zur Zellfläche, was bedeutet, dass in der Mutante mehr Raum innerhalb der Zelle von PHB besetzt war als im Wildtyp. Zusätzlich konnte eine erhöhte Anzahl der Granula beobachtet werden. Eine *phaZa5* *knock-out* Mutante wies ebenso eine erhöhte Anzahl der Granula auf, aber kein Unterschied im Verhältnis der Flächen. Eine Vierfachmutante ( $\Delta$ *phaZa1* $\Delta$ *phaZa2* $\Delta$ *phaZa3* $\Delta$ *phaZa5*) dagegen hatte ein niedriges Verhältnis der Granulafläche zur Zellfläche und eine geringere Anzahl der Granula.

**Tabelle 1: PHB Depolymerasen und Oligomerhydrolasen in *R. eutropha* H16**

Protein (KEGG)	Locus tag	Länge [AS]	Molekulargewicht [kDa]	Aktives Zentrum
PhaZa1 (PhaZ1)	A1150	419	47,3	SVC <sub>183</sub> QP <sup>a</sup>
PhaZa2 (PhaZ2)	A2862	404	44,8	AIC <sub>173</sub> QP
PhaZa3 (PhaZ5)	B1014	407	45,2	AVC <sub>175</sub> QP
PhaZa4 (PhaZ4)	PHG178	245	27,4	?
PhaZa5 (PhaZ3)	B0339	412	45,2	AIC <sub>182</sub> QA
PhaZb (PhaY1)	A2251	718	74,3	SVS <sub>320</sub> NG <sup>a</sup>
PhaZc (PhaY2)	A1335	293	31,6	GTS <sub>108</sub> MG
PhaZd1 (PhaZ6)	B2073	362	39,2	GMS <sub>190</sub> AG <sup>a</sup>
PhaZd2 (PhaZ7)	B2401	365	38,4	GLS <sub>193</sub> AG <sup>a</sup>

? nicht identifiziert

<sup>a</sup> experimentell bestätigt

#### 1.4 Biosynthese anderer Biopolymere in *R. eutropha* H16: Polyphosphat

*R. eutropha* H16 ist jedoch nicht nur auf die Biosynthese von PHA und PHA-verwandten Polymeren beschränkt. Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *R. eutropha* H16 zeigte eine Anwesenheit von putativen Genen für die Synthesen von Polyphosphat (PolyP) (Pohlmann et al., 2006). Die Synthese von PolyP ist in allen drei Domänen des Lebens weit verbreitet. PolyP ist eine multifunktionale Verbindung, die nicht nur als Phosphatspeicher und Energiequelle sondern auch als ein Komplexbildner für Metallionen, ein Puffer gegen Alkaliionen, ein Kanal für DNA, ein Regulator bei Stressreaktionen und als eine Komponente in der Genregulation fungieren kann (Kornberg et al., 1999). In Prokaryoten wird PolyP hauptsächlich durch PolyP-Kinasen (Ppk) synthetisiert, die die reversible Übertragung energiereicher Phosphatgruppen von ATP auf PolyP katalysieren (Ahn und Kornberg, 1990; Akiyama et al., 1992; Kornberg et al., 1956; Kuroda und Kornberg, 1997). Exopolyphosphatasen (Ppx) sind für die Hydrolyse des Polymers verantwortlich (Akiyama et al., 1993; Rangarajan et al., 2006; Rao et al., 2009). Auch *R. eutropha* H16 ist in der Lage, PolyP zu synthetisieren (Kaltwasser und Schlegel, 1959). *R. eutropha* H16 ist genetisch ausreichend ausgestattet, um PolyP zu speichern. Zudem konnte über elektronenmikroskopische Untersuchungen bereits gezeigt werden, dass PolyP in Form von Granula im Zytoplasma von *R. eutropha* H16 akkumuliert wird (Aragno et al., 1977; Beeby et al., 2012). Die Gene *ppk1* (A2437) und *ppx* (A2436) liegen nebeneinander auf dem Chromosom 1. Als direkter Nachbar in entgegengesetzter Orientierung findet sich das putative Zweikomponentensystem für die Regulation phosphatabhängiger Prozesse, bestehend aus der Sensorkinase PhoR (A2438) und dem Response-Regulator PhoB (A2439)

## Einleitung

(Makino et al., 1989). Weiter *downstream* liegt das Gen für den negativen Regulator der Phosphataufnahme *phoU* und die Gene für das putative hochaffine phosphatspezifische ABC Transportersystem (*pstSCAB*) (A2440-A2444) (Santos-Beneit, 2015; van Veen, 1997; Yuan et al., 2006). Ein putatives Gen für den niedrig affinen Phosphattransporter *pitA* (A2273) ist ebenso vorhanden und befindet sich auf dem Chromosom 1 (Bardin et al., 1998; Gebhard et al., 2009). Ein zweites putatives *ppk*-Gen (*ppk2*, B1019) wurde auf dem Chromosom 2 lokalisiert.

Im Jahr 1989 wurde postuliert, dass die Synthese von intrazellulärem PolyP mit der Synthese von PHB verknüpft ist und es wurde eine regulatorische Verbindung vorgeschlagen (Doi et al., 1989). Seither waren keine weiteren Arbeiten zu diesem Thema in *R. eutropha* H16 durchgeführt worden. Eine weitere Verbindung zwischen PHB und PolyP in Bakterien ist aus dem EBPR Verfahren (erhöhte biologische Phosphorentfernung), welches in Kläranlagen eingesetzt wird, bekannt. Während der ersten, anaeroben Phase wird PHB ausgehend von den verfügbaren C-Quellen gespeichert und kein oder nur wenig PolyP akkumuliert. In einem nachfolgenden aeroben Schritt wird das akkumulierte PHB mobilisiert und für den Stoffwechsel und das Wachstum verwendet. Gleichzeitig werden große Mengen an Phosphat aus der Umgebung aufgenommen und intrazellulär in Form von PolyP Granula gespeichert (Blackall et al., 2002; Hesselmann et al., 1999; Kortstee et al., 1994; Yuan et al., 2012).

Die Ergebnisse der Arbeit von 1989 und der EBPR Prozess suggerieren, dass eine Verbindung zwischen dem PHB und PolyP Metabolismus besteht.

### 1.5 Zielsetzung

Parallel zur technischen Entwicklung des Biokunststoffes PHB wird seit Jahrzehnten ein großer Aufwand in der Erforschung des PHB Metabolismus im Modelorganismus *R. eutropha* H16 betrieben. Trotz der großen Anzahl an wichtigen Entdeckungen und zahlreichen Publikationen bleiben Aspekte des intrazellulären PHB Stoffwechsel, wie z.B. die intrazelluläre Mobilisierung des Polymers, teilweise unerklärt. Die für den Abbau der nativen PHB Granula verantwortlichen Depolymerasen sind ein Teil der Carbonosomen und sitzen in der Oberflächenschicht des Granulums. Deshalb ist es für das Verständnis der Mobilisierung nicht nur wichtig die einzelnen Enzyme zu erforschen, sondern es ist notwendig, die Zusammensetzung der PGAPs zu kennen und deren Interaktionen untereinander und mit anderen Proteinen herauszuarbeiten. So lag der erste Schwerpunkt dieser Arbeit in der Analyse der Interaktionspartner der PhaZa1 Depolymerase. Dieses Protein (A2274) hat eine putative Funktion als ein Phosphattransportregulator und sollte, um dessen Rolle für den Phosphat- und PHB-Stoffwechsel aufzuklären, genauer untersucht werden.

Die Tatsache, dass *R. eutropha* H16 zahlreiche Gene (sieben intrazelluläre PHB Depolymerasen und zwei 3HB-Oligomerhydrolasen) mit einer putativen Funktion für die Hydrolyse von PHB besitzt, führt zur der Frage, welche Rolle die entsprechenden Genprodukte für den Abbauprozess von PHB spielen. Überzeugende Daten existieren lediglich für die PhaZa1 Depolymerase (Handrick et al., 2000; Saegusa et al., 2001; Uchino et al., 2008; York et al., 2003). Bemerkenswert ist, dass die Deletion von *phaZa1* nur zu einer drastischen Reduktion der Abbaurate führt, die Mobilisierung des akkumulierten PHB aber nicht vollständig hemmt (Handrick et al., 2000; Saegusa et al., 2001). Dies lässt vermuten, dass andere PHB-abbauende Enzyme existieren und während der PHB Mobilisierung in *R. eutropha* H16 aktiv sind. Ein direkter Beweis für die Beteiligung einer anderen iPHB Depolymerase während der PHB Mobilisierung ist jedoch nicht verfügbar. Die Depolymerase PhaZd1 ist von besonderem Interesse, da das gereinigte Protein *in vitro* von allen untersuchten Enzymen die höchste PHB Depolymerase-Aktivität besitzt (Abe et al., 2005). Das *R. eutropha* Genom besitzt ein der *phaZd1* Depolymerase ähnliches Gen, nämlich *phaZd2* (H16\_B2401). Über die Eigenschaften des Genproduktes sind keine Informationen verfügbar. Wegen der Ähnlichkeit zu PhaZd1 könnte auch PhaZd2 eine hochaktive PHB Depolymerase sein. Deshalb sollte in dem zweiten Teil dieser Arbeit eine umfassende Analyse der potentiellen physiologischen Funktionen von PhaZd1 und PhaZd2 im PHB Stoffwechsel von *R. eutropha* durchgeführt werden.

## Einleitung

Der letzte Teil dieser Arbeit sollte sich mit der Identifizierung neuer PGAPs durch die Analyse des PHB Proteoms beschäftigen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch unbekannte Proteine an der Oberfläche des Granulums lokalisiert sind und beim Abbau des Polymers eine Rolle spielen. Diese sollten identifiziert werden und erste Hinweise auf deren Funktion sollten gewonnen werden.

Insgesamt sollte eine Kombination dieser drei Ansätze zum besseren Verständnis des PHB Abbaus in *R. eutropha* H16 beitragen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismen, Plasmide und Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Plasmide und Primer sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

**Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme**

\*SK-Nr.: Stammkulturnummer in der Stammsammlung der Arbeitsgruppe D. Jendrossek

Bakterienstämme	Relevante Eigenschaften	Referenz,SK-Nr.*
<i>Escherichia coli</i> JM109	Klonierungs-Stamm	(Yanisch-Perron et al., 1985),528
<i>E. coli</i> S17-1	Konjugations-Stamm	(Simon et al., 1983), 3884
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pLys	Expressions-Stamm	Novagen, 4512
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	<i>R. eutropha</i> Wildtyp Stamm	DSMZ 428, 4772
<i>R. eutropha</i> H16 $\Delta$ <i>phaP1</i>	<i>phaP1</i> Deletionsmutante	(Pötter et al., 2004), 3027
<i>R. eutropha</i> H16 $\Delta$ ( <i>phaP1-phaP4</i> )	<i>phaP1- phaP4</i> Deletionsmutante	(Pötter et al., 2004), 3028
	<i>Deletion von phaP5</i> in Deletionsmutante $\Delta$ <i>phaP1-phaP4</i>	(Pfeiffer und Jendrossek, 2011), 4239
<i>R. eutropha</i> H16 $\Delta$ <i>phaZd1</i>	<i>phaZd1</i> Deletionsmutante	diese Arbeit, 4773
<i>R. eutropha</i> H16 $\Delta$ <i>phaZd2</i>	<i>phazd2</i> Deletionsmutante	diese Arbeit, 4774
<i>R. eutropha</i> H16 $\Delta$ <i>phaZd1</i> $\Delta$ <i>phaZd2</i>	<i>phaZd1, phaZd2</i> Deletionsmutante	diese Arbeit, 4775
<i>R. eutropha</i> H16 $\Delta$ <i>a0671</i>	<i>a0671</i> Deletionsmutante	diese Arbeit, 5347
<i>R. eutropha</i> H16 $\Delta$ <i>b1632</i>	<i>b1632</i> Deletionsmutante	diese Arbeit, 5435
<i>R. eutropha</i> H16 $\Delta$ <i>a0671</i> $\Delta$ <i>b1632</i>	<i>a0671, b1632</i> Deletionsmutante	diese Arbeit,5437
<i>R. eutropha</i> H16 $\Delta$ <i>a2274</i>	<i>a2274</i> Deletionsmutante	diese Arbeit, 4233
<i>R. eutropha</i> H16 $\Delta$ <i>ppk1</i>	<i>ppk1</i> Deletionsmutante	diese Arbeit, 5033
<i>R. eutropha</i> H16 $\Delta$ <i>ppk2</i>	<i>ppk2</i> Deletionsmutante	diese Arbeit, 5036
<i>R. eutropha</i> H16 $\Delta$ <i>ppk1</i> $\Delta$ <i>ppk2</i>	<i>ppk1, ppk2</i> Deletionsmutante	diese Arbeit, 5116

**Tabelle 3: Verwendete Plasmide**

<b>Plasmide</b>	<b>Relevante Eigenschaften</b>	<b>Referenz</b>
pBBR1MCS2	broad host range Vektor	(Kovach et al., 1995)
pBBR1MCS2- P <sub>phaC</sub> - <i>eyfp-c1</i>	Vektor für die Herstellung von Fusionen am C-Terminus von eYfp unter P <sub>phaC</sub> Promotor	(Wahl et al., 2012)
pBBR1MCS2- P <sub>phaC</sub> - <i>eyfp-n1</i>	Vektor für die Herstellung von Fusionen am N-Terminus von eYfp unter P <sub>phaC</sub> Promotor	(Pfeiffer et al., 2011)
pBBR1MCS-2- P <sub>phaC</sub> - <i>eyfp-phaZd1</i>	N-terminale Fusion von PhaZd1 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>eyfp-phaZd2</i>	N-terminale Fusion von PhaZd2 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>eyfp-phaZd1(S190A)</i>	N-terminale Fusion von inaktiver PhaZd1 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>eyfp-phaZd2(S193A)</i>	N-terminale Fusion von inaktiver PhaZd2 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>eyfp-a0225</i>	N-terminale Fusion von A0225 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>eyfp-a0671</i>	N-terminale Fusion von A0671 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>eyfp-a2001</i>	N-terminale Fusion von A2001 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>eyfp-b1632</i>	N-terminale Fusion von B1632 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>eyfp-phaZc</i>	N-terminale Fusion von PhaZc an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>eyfp-a3253</i>	N-terminale Fusion von A3253 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>eyfp-a2924</i>	N-terminale Fusion von A2924 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>eyfp-b0232</i>	N-terminale Fusion von B0232 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>eyfp-a2274</i>	N-terminale Fusion von A2274 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>phaZd1-eyfp</i>	C-terminale Fusion von PhaZd1 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>phaZd2-eyfp</i>	C-terminale Fusion von PhaZd2 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>phaZd1(S190A)-eyfp</i>	C-terminale Fusion von inaktiver PhaZd1 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>phaZd2(S193A)-eyfp</i>	C-terminale Fusion von inaktiver PhaZd2 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>a2274-eyfp</i>	C-terminale Fusion von A2274 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS2-P <sub>BAD</sub> - <i>eyfp-c1</i>	Vektor für die Herstellung von Fusionen am C-Terminus von eYfp unter P <sub>BAD</sub> Promotor	diese Arbeit
pBBR1MCS2-P <sub>BAD</sub> - <i>eyfp-n1</i>	Vektor für die Herstellung von Fusionen am N-Terminus von eYfp unter P <sub>BAD</sub> Promotor	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>BAD</sub> - <i>eyfp-phaZd1</i>	N-terminale Fusion von PhaZd1 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>BAD</sub> - <i>eyfp-phaZd2</i>	N-terminale Fusion von PhaZd2 an eYfp	diese Arbeit

## Material und Methoden

pBBR1MCS-2-P <sub>BAD</sub> - <i>eyfp-phaZd1</i> (S190A)	N-terminale Fusion von inaktiver PhaZd1 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>BAD</sub> - <i>eyfp-phaZd2</i> (S193A)	N-terminale Fusion von inaktiver PhaZd2 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>BAD</sub> - <i>phaZd1-eyfp</i>	C-terminale Fusion von PhaZd1 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>BAD</sub> - <i>phaZd2-eyfp</i>	C-terminale Fusion von PhaZd2 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>BAD</sub> - <i>phaZd1</i> (S190A)- <i>eyfp</i>	C-terminale Fusion von inaktiver PhaZd1 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>BAD</sub> - <i>phaZd2</i> (S193A)- <i>eyfp</i>	C-terminale Fusion von inaktiver PhaZd2 an eYfp	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>phaZd1</i>	Plasmid für Expression von PhaZd1	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>phaZd2</i>	Plasmid für Expression von PhaZd2	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>phaZd1</i> (S190A)	Expression der inaktiven PhaZd1	diese Arbeit
pBBR1MCS-2-P <sub>phaC</sub> - <i>PhaZd2</i> (S193A)	Expression der inaktiven PhaZd2	diese Arbeit
pLO3	Vektor für die Herstellung der Deletionsmutanten; TcR	(Lenz und Friedrich, 1998)
pLO3- $\Delta$ <i>phaZd1</i>	Deletionsvektor für <i>phaZd1</i>	diese Arbeit
pLO3- $\Delta$ <i>phaZd2</i>	Deletionsvektor für <i>phaZd2</i>	diese Arbeit
pLO3- $\Delta$ <i>a0671</i>	Deletionsvektor für <i>a0671</i>	diese Arbeit
pLO3- $\Delta$ <i>b1632</i>	Deletionsvektor für <i>b1632</i>	diese Arbeit
pLO3- $\Delta$ <i>a2274</i>	Deletionsvektor für <i>a2274</i>	diese Arbeit
pLO3- $\Delta$ <i>pitA</i>	Deletionsvektor für <i>pitA</i>	diese Arbeit
pLO3- $\Delta$ <i>ppk1</i>	Deletionsvektor für <i>ppk1</i>	diese Arbeit
pLO3- $\Delta$ <i>ppk2</i>	Deletionsvektor für <i>ppk2</i>	diese Arbeit
pBBR1MCS-3- <i>lacZ</i>	<i>lacZ</i> -Reporterplasmid für die Promotoraktivitätsbestimmung	(Fried et al., 2012)
pBBR1MCS-3- <i>lacZ</i> -P <sub>phaC</sub>	<i>lacZ</i> -Reporterplasmid für die Promotoraktivitätsbestimmung von P <sub>phaC</sub>	diese Arbeit
pBBR1MCS-3- <i>lacZ</i> -P <sub>phaZd1</sub>	<i>lacZ</i> -Reporterplasmid für die Promotoraktivitätsbestimmung von P <sub>phaZd1</sub>	diese Arbeit

## Material und Methoden

pBBR1MCS-3- <i>lacZ</i> - P <sub>phaZd2</sub>	<i>lacZ</i> -Reporterplasmid für die Promotoraktivitätsbestimmung von P <sub>phaZd2</sub>	diese Arbeit
pBBR1MCS-3- <i>lacZ</i> - P <sub>a2274</sub>	<i>lacZ</i> -Reporterplasmid für die Promotoraktivitätsbestimmung von P <sub>a2274</sub>	diese Arbeit
pBBR1MCS-3- <i>lacZ</i> - P <sub>pitA</sub>	<i>lacZ</i> -Reporterplasmid für die Promotoraktivitätsbestimmung P <sub>pitA</sub>	diese Arbeit
pET28a	His-Tag Expressionsvektor; Km <sup>r</sup>	Novagen
pET28a- <i>phaZd1</i>	Plasmid für Expression von His6-PhaZd1	diese Arbeit
pET28a- <i>phaZd2</i>	Plasmid für Expression von His6-PhaZd2	diese Arbeit

**Tabelle 4: Verwendete Primer**

Deletionen	
<i>ΔphaZd1</i> _upstreamF	CGATCAGAGCTCCAGGGATTCGACCGAGACCGCACAAACC
<i>ΔphaZd1</i> _upstreamR	GCCGTTAATTAAGCCGGAGGACTCCTGATCGTGTGACGCGATCTCC
<i>ΔphaZd1</i> _downstreamF	CGGCTTAATTAACGGCAGTCGGGCAGCACCAATGCGCATCAAGC
<i>ΔphaZd1</i> _downstreamR	GCTCTAGATGATGACGCCACCTTCCTGCAGAAGCTGTATGG
<i>ΔphaZd2</i> _upstreamF	CGATCAGAGCTCTGCCCCGGCCGGAAATCATGCAGC
<i>ΔphaZd2</i> _upstreamR	GCCGTTAATTAAGCCGGCGGCGTCCTGTGCGGCTGGGGTAACC
<i>ΔphaZd2</i> _downstreamF	CGGCTTAATTAACGGCGGCAGGCTTGACGCCTCATGGATATCGC
<i>ΔphaZd2</i> _downstreamR	GCTCTAGACATGCCCGCAACCCAGCTCGACG
<i>Δa2274</i> _upstreamF	GCTCTAGAAACCGCGCCACGGAAATTCAGAAATCTCC
<i>Δa2274</i> _upstreamR	GCCGTTAATTAAGCCGGGAATGTTTCCTTGTGGCAGCGTGGTGACG
<i>Δa2274</i> _downstreamF	CGGCTTAATTAACGGCGGGCGGCAATCGGCATGCAGACC
<i>Δa2274</i> _downstreamR	AACTGCAGCACCATCACCATCATCAGCGAACCAGC
<i>Δppk1</i> _upstreamF	CGATCAGAGCTCACTTCGATCGGGAAGCCCAGCG
<i>Δppk1</i> _upstreamR	GCCGTTAATTAAGCCGGAGCATGACCTTCTTTTGGTAATGTGGC
<i>Δppk1</i> _downstreamF	CGGCTTAATTAACGGCGCGGGCTTCTGTTGCCACCTTGC
<i>Δppk1</i> _downstreamR	GCTCTAGAGCGTGGCGCCGAGACCGAACTGC
<i>Δppk2</i> _upstreamF	CGATCAGAGCTCTTCCAAGGTTATCTGCGGTGGC
<i>Δppk2</i> _upstreamR	GCCGTTAATTAAGCCGGATTGGAATGTGCGGTGCGGG
<i>Δppk2</i> _downstreamF	CGGCTTAATTAACGGCGCCCTGCATAAGGGCCACGCAGGC
<i>Δppk2</i> _downstreamR	GCTCTAGAAAACATGCCAAAGCCGTCGGCGCTGC
<i>Δb1632</i> _upstreamF	CGATCAGAGCTCGACGGCCAAAGCGCTCGGCAATATCC
<i>Δb1632</i> _upstreamR	GCCGTTAATTAAGCCGGCCGTTCTCCGCTGCGAATCTTGTGA
<i>Δb1632</i> _downstreamF	CGGCTTAATTAACGGCCGCGCCGCGGCTGGCACAGGCCTC
<i>Δb1632</i> _downstreamR	GCTCTAGATCGGCAAGCGTCGGGGCAATATTGACG
<i>Δa0671</i> _upstreamF	CGATCAGAGCTCGTGGATGGCGGGCACGCTGGATG
<i>Δa0671</i> _upstreamR	GCCGTTAATTAAGCCGTCCACTCCCCTGGTTGGCGCCCCG
<i>Δa0671</i> _downstreamF	CGGCTTAATTAACGGCGTGCGCCGGACCGATCCGCAATTTCG
<i>Δa0671</i> _downstreamR	GCTCTAGACACGCGCCGAACAGCTTGTTCG
<i>ΔphaC1</i> _upstreamF	CGATCAGAGCTCTGCGCGCGCTCGGCTTCAGCCTTGC
<i>ΔphaC1</i> _upstreamR	GCCGTTAATTAAGCCGGATTTGATTGTCTCTCTGCCGTCACTATT

## Material und Methoden

---

<i>ΔphaC1_downstreamF</i>	CGGCTTAATTAACGGCCGCTTGCATGAGTGCCGGCGTGCGTCATG
<i>ΔphaC1_downstreamR</i>	GCTCTAGACCCTTCCTTATTTGCGCTCGACTGCCAGCGCCACG
pLO3_forward	GCAAGCAGCAGATTACGCG
pLO3_reverse	CCGAGGATGACGATGAGCG
<b>Kontrollprimer</b>	
<i>ΔPhaZd1-F</i>	AGCCCGTCGCGGTTCGATGATGCGC
<i>ΔPhaZd2-F</i>	AGGTCTTGTAGTCCTGGTCGAGCTCG
<i>ΔB1632-F</i>	ACCAGGCCTCGCGCTTCATCAGCGG
<i>ΔA0671-F</i>	TAGACCGAGACCTTGACGCTGGATG
<i>ΔA2274-R</i>	GCTCTAGAATCCAGGCGATGTCCCTGGTCGGC
<b>C-Terminale Fusion an eYFP (C1)</b>	
<i>A2274_f_EcoRI</i>	GGAATTCCATGTTTCGGCCGATTCATGCCCACGG
<i>A2274_r_BamHI</i>	CGGGATCCTCAGGCGTTTTCCAGGACGATGCCTTCG
<i>PhAZ6_f_XhoI</i>	CCGCTCGAGGCATGACCAAAAGCTTTGCCGC
<i>PhAZ6_r_BamHI</i>	CGGGATCCTCAACGGCGGTGCTGG
<i>PhAZ7_f_XhoI</i>	CCGCTCGAGGCATGCCCCGCTCATCCGG
<i>PhAZ7_r_BamHI</i>	CGGGATCCTCACCCCCAACCTCCAGA
<i>B1632_f_HindIII</i>	CCCAAGCTTGCATGGATGCAGCAAAGCAACTGGTGC
<i>B1632_r_XbaI</i>	GCTCTAGACTAGGACGCGCGGGTGAGCGG
<i>A0671_f_NdeI</i>	GGGAATTCCATATGACCGCACGCGAACGCGC
<i>A0671_r_HindIII</i>	CCCAAGCTTTCAGTCCTGGTGCGCGGCCTCATCC
<b>N-Terminale Fusion an eYFP (N1)</b>	
<i>A2274_f_NdeI</i>	GGGAATTCCATATGTTTCGGCCGATTCATGCCCACGG
<i>A2274_r_BamHI</i>	CGGGATCCCCGGCGTTTTCCAGGACGATGCCTTCGATG
<i>PhAZd1_f_NdeI</i>	GGGAATTCCATATGACCAAAAGCTTTGCCGCTGACTGGC
<i>PhAZd1_r_BamHI</i>	CGGGATCCCCACGGCGGTGCTGGCTGAAGAAGTGC
<i>PhAZd2_f_NdeI</i>	GGGAATTCCATATGCCCCGCTCATCCGG
<i>PhAZd2_r_BamHI</i>	CGGGATCCCCCCCCAACCTCCAGA
<i>B1632_f_NdeI</i>	GGGAATTCCATATGGATGCAGCAAAGCAACTGGTGC
<i>B1632_r_HindIII</i>	CCCAAGCTTGGACGCGCGGGTGAGCGG
<i>A0671_f_NdeI</i>	GGGAATTCCATATGACCGCACGCGAACGCGC
<i>A0671_r_HindIII</i>	CCCAAGCTTGTCTGGTGCGCGGCCTCATCC
<b>His-Tag</b>	
<i>PhaZd1_C-His_f_NdeI</i>	GGGAATTCCATATGACCAAAAGCTTTGCCGCTGACTGGC
<i>PhaZd1_C-His_r_BamHI</i>	CGGGATCCACGGCGGTGCTGGCTGAAGAAGTGC
<i>PhaZd2_C-His_f_NdeI</i>	GGGAATTCCATATGCCCCGCTCATCCGG
<i>PhaZd2_C-His_r_BamHI</i>	CGGGATCCCCCCCCAACCTCCAGAAAAAATCG
<b>Quick Change</b>	
<i>PhaZd1_f</i>	GCCGGCATGGCCGCCGGCGCGC
<i>PhaZd1_r</i>	CGCGCCGGCGGCCATGCCGGC
<i>PhaZd2_f</i>	CTGGGGCTGGCCGCGGGCGGC
<i>PhaZd2_r</i>	GCCGCCCCGCGGCCAGCCCCAG
<b>pKT25/pUT18C</b>	
<i>A2274_forward_XbaI</i>	GCTCTAGAGATGTTTCGGCCGATTCATGCCCACG
<i>A2274_reverse_KpnI</i>	GGGGTACCTCAGGCGTTTTCCAGGACGATGCC
<i>PitA_forward_XbaI</i>	GCTCTAGAGATGCAGACCATACAAATGGAGCC
<i>PitA_reverse_KpnI</i>	GGGGTACCTTACAGGATATGCCGCCCGATCC

---

---

**LacZ-Fusionen**

PhaX_SpeI_for	GGACTAGTCAAGCAGCGTAACGGCCCGA
PhaX_NcoI_rev	CATGCCATGGAATGTTCTTGTGGCAGCGTGG
PhaZd1_SpeI_for	GGACTAGTATTGTGGCAAACGTGGCGAAAGAGG
PhaZd1_NcoI_rev	CATGCCATGGGGACTCCTGATCGTGTGACGCG
PhaZd2_SpeI_for	GGACTAGTCAGTTGCGCGCGTACCGCGG
PhaZd2_NcoI_rev	CATGCCATGGGGCGTCCTGTCTGGCTGG
PhaC1_SpeI_for	GGACTAGTGCCGAGGCGGATTCCCGCATTG
PhaC1_NcoI_rev	CATGCCATGGGTTGATTGTCTCTCTGCCGTCCT

---

## 2.2 Nährmedien

Nachfolgend sind die verwendeten Nährmedien aufgeführt. Feste Medien enthielten 1,5 % Agar (w/v). Zur Sterilisation wurden alle Nährmedien bei 121°C autoklaviert.

### 2.2.1 Komplexmedien

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

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml

#### Nutrient broth (NB)

Nutrient broth	8 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml

### 2.2.2 Mineralmedien

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

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	9,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g
Eisenammoniumcitrat	0,005 g
Spurenelementlösung SL6, 10000-fach	30 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1000 ml
pH 7,0	

## Material und Methoden

Folgende Stammlösungen wurden getrennt angesetzt und autoklaviert:

MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1000-fach
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1000-fach
SL6	10000-fach
Eisenammoniumcitrat	1000-fach

### Spurenelementlösung SL6 nach Pfennig, 1974; 10000-fach konzentriert

ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1 g
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,3 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3 g
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	2 g
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,1 g
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,2 g
Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,3 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml

Sofern nicht anders angegeben wurde als C-Quelle 0,2 % (w/v) Fructose verwendet.

### 2.2.3 Antibiotika

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden nach (Sambrook et al., 1989) angesetzt, sterilfiltriert (Sartorius AG, Göttingen, 0,2 µm), aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Stammlösungen wurden den Nährmedien nach Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 50°C zugegeben:

**Tabelle 5: Verwendete Antibiotika**

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration
<b>Ampicillin (Na-Salz), Amp(100)</b>	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	100 µg/ml
<b>Chloramphenicol, Cm(20)</b>	20 mg/ml in 96% Ethanol (v/v)	20 µg/ml
<b>Kanamycinsulfat, Kan(50)</b>	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	50 µg/ml
<b>Tetracyclin, Tet(15)</b>	15 mg/ml in 70% Ethanol (v/v)	15 µg/ml

## 2.3 Stammhaltung und Konservierung

### 2.3.1 Kurzfristige Lagerung

Alle Organismen wurden kurzfristig (ca. 3 Wochen) auf geeigneten Agarplatten, die mit Parafilm verschlossen waren, bei 4 - 8°C aufbewahrt.

### **2.3.2 Längerfristige Konservierung**

Eine langfristige Konservierung von *E. coli*-Stämmen erfolgte bei -70°C als Glycerin-Kultur (900 µl Glycerin (96 %) und 900 µl Zellsuspension). Zur Reaktivierung der eingefrorenen Zellen wurden diese direkt auf eine entsprechende LB-Platte ausgestrichen.

*R. eutropha* Stämme wurden langfristig als Lyophilisate aufbewahrt. Zu diesem Zwecke wurden Zellen von einer dicht bewachsenen NB Agarplatte mit 1,5 ml einer sterilen Lösung aus 10 % (w/v) Skimmlak und 5 % (w/v) meso-Inositol abgeschwemmt. Die entstandene Suspension wurde mit 10-15 sterilen Filterpapier-Testplättchen aufgenommen und in sterilen Röhrchen bei -20°C eingefroren und anschließend lyophilisiert. Die Lagerung der getrockneten Plättchen erfolgte in kleinen sterilen Schraubdeckelröhrchen mit Watte über getrocknetem Kieselgel (Trockenmittel) bei -70°C. Zur Reaktivierung eines konservierten Stammes wurden ein bis zwei Testplättchen in 10 ml geeignetem Nährmedium über Nacht bei 30°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert.

## **2.4 Zellkultivierung**

### **2.4.1 Kultivierung von *E. coli***

Für die Anzucht der Bakterien wurden 10 ml LB-Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben und mit einer Einzelkolonie angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht auf dem Schüttler (150 rpm).

### **2.4.2 Kultivierung von *R. eutropha* H16**

#### **2.4.2.1 Wachstum und PHB Speicherung/Abbau im Komplexmedium**

*R. eutropha* H16 wurde in NB Medium bei 30°C kultiviert. In Experimenten, in denen die Speicherung und Abbau von PHB untersucht wurde, war es wichtig, die Versuche mit PHB-freien Zellen zu beginnen. Hierzu wurde der untersuchte *R. eutropha* H16 Stamm in zwei aufeinanderfolgenden Vorkulturen gezüchtet. Die erste Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und 12 h bei 30°C auf einem Schüttler (150 rpm) inkubiert. Die zweite Vorkultur (10% (v/v)) war nach 24 h bis 30 h Wachstum bei 30°C fast frei von akkumuliertem PHB (unter 3%) und wurde benutzt um, die Hauptkultur anzupflanzen (10 to 20 % (v/v)). Natriumgluconat (0,2 % (w/v)) wurde zugefügt, um die PHB Akkumulation zu fördern.

### 2.4.2.2 Wachstum und PHB-Speicherung/-Abbau in MM Medium

Wie auch in Komplexmedium war es wichtig mit PHB-freien Zellen zu beginnen. Zwei aufeinanderfolgende Vorkulturen wurden wie unter 2.4.2.1 kultiviert. Die zweite Vorkultur wurde abzentrifugiert (5000 rpm, 4°C) und 2-mal mit MM-Medium gewaschen. Für die Hauptkultur zur Untersuchung der Akkumulierung von PHB wurde MM-Medium mit Überschuss einer C-Quelle (2 % (w/v) NaGlukonat) und Stickstofflimitierung (0,5 g/l NH<sub>4</sub>Cl) verwendet. Die Hauptkultur wurde zu einem OD<sub>600</sub> Wert von 0,1 angeimpft und bei 30°C auf einem Schüttler (150 rpm) inkubiert. Für die Untersuchung des Abbaus von PHB wurden PHB volle Zellen (ca. 70 % PHB (pro g Trockengewicht)) angesetzt. Diese wurden abzentrifugiert (5000 rpm, 4°C), 2-mal mit MM-Medium ohne C-Quelle gewaschen und im MM Medium ohne C-Quelle und höherem Stickstoffgehalt (1 g/l NH<sub>4</sub>Cl) resuspendiert. Kultivierung erfolgte bei 30°C auf einem Schüttler (150 rpm).

## 2.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Lokalisierung der eYfp-Fusionen, die Speicherung und die Mobilisierung von PHB Granula, die Akkumulierung und der Abbau von Polyphosphat sowie das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die mit entsprechendem Farbstoff angefärbte Zellsuspension wurde zur Fixierung 1:1 mit Agarose (1 % (w/v) in H<sub>2</sub>O) auf dem Objektträger gemischt und mit einem Deckgläschen bedeckt. Alternativ wurde eine Agaroseschicht auf dem Objektträger durch Auftragen von ca. 700 µl 1 % ((w/v) in H<sub>2</sub>O) Agarose und Trocknung unter einem Deckgläschen vorbereitet. Die Zellsuspension wurde auf die festgewordene Agarose aufgetropft. Die angefärbten Zellen wurden im Anschluss mit einem Zeiss Axioplan Fluoreszenzmikroskop (Objektiv Plan-Neofluar 100x/1,30 Oil, Phasenkontrast Ph3, Carl Zeiss, Göttingen) und einem F41-54 Cy2 Filter betrachtet. Bilder wurden im Phasenkontrast und im Fluoreszenzmodus mit einer Schwarz-Weiss-Kamera (CoolSnapCF, Photometrics, Tucson, USA) aufgenommen und mit Hilfe der Software ImageJ nachbearbeitet.

### 2.5.1 Nilrotfärbung

10 µl Zellsuspension (OD<sub>600</sub> ca. 1,0) wurden mit 10 µl Nilrotlösung in DMSO (5 µg/ml) gemischt. Die PHB Granula fluoreszieren rot.

### 2.5.2 DAPI-Färbung

10 µl Zellsuspension ( $OD_{600}$  ca. 1,0) wurden mit 10 µl DAPI-Lösung in  $H_2O$  (0,3 mg/ml) gemischt. Die Polyphosphatgranula fluoreszieren grünlich-gelb, die Zelle blau.

### 2.5.3 Propidiumiodidfärbung

10 µl Zellsuspension ( $OD_{600}$  ca. 1,0) wurden mit 0,5 µl Propidiumiodidlösung in PBS (0,3 mg/ml) gemischt. Der Farbstoff kann die perforierte Membran von toten Zellen, jedoch nicht die intakte Membran von lebenden Zellen durchdringen, und färbt diese rot-orange.

#### PBS:

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g

In 800 ml  $H_2O_{\text{bidest.}}$  lösen, mit HCl den pH auf 7,4 einstellen und auf 1 l auffüllen.

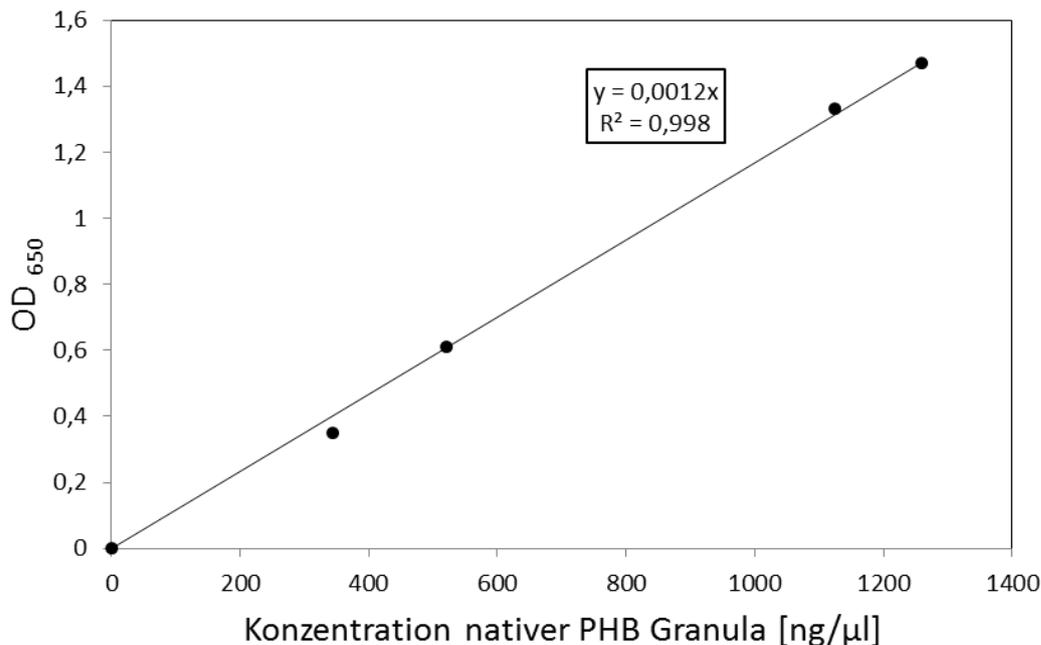
## 2.6 Isolierung nPHB Granula aus *R. eutropha* H16

Für die Isolierung der Granula wurde die Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation verwendet. Die Kultur (2,5 l) wurde wie unter 2.4.2.2 inkubiert, um Zellen mit hohem PHB Gehalt (>70%) zu erhalten. Der Zellaufschluss wurde in 1mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5) durchgeführt. Auf den 1. Gradienten (5ml 87% (v/v) Glycerin und 10ml 50% (v/v) Glycerin in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) wurden vorsichtig 10 -12 ml Zellaufschluß gegeben. Die Röhren kamen in die Zentrifugenröhren des Schwingrotors SW-28 (Fa. Beckman) und wurden mit dem entsprechenden Deckel genau gegeneinander austariert. Die Plastikröhren sollten dabei fast ganz voll sein. Gegebenenfalls wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Ultrazentrifugation erfolgte für 40 Minuten bei 20.000 rpm (Beckman Avanti-35-Ultrazentrifuge). Dabei wurde sowohl für das Beschleunigen als auch das Abbremsen der Zentrifugation der „Slow“-Modus eingestellt. Anschließend wurden die Röhren vorsichtig auf Eis gestellt und die PHB-Granula mit einer automatischen Pipette mit geweiteter (abgeschnittener) Spitze abgenommen und mit 1 Volumen 1 mM Tris/HCl (pH 8,0) versetzt. Zur weiteren Reinigung wurden die Granula auf einen 2.Gradienten gegeben. Dieser bestand aus je 5 ml: 87 %, 80 %, 60 % und 40 % Glycerin (v/v). Die PHB-Granula wurden erneut mit einer automatischen Pipette mit geweiteter (abgeschnittener) Spitze abgenommen.

## 2.7 Bestimmung der nPHB-Konzentration und des apparenten Extinktionskoeffizienten

Drei 2 ml Eppis wurden leer gewogen und mit 0,5 g bis 1 g isolierten nPHB in Glycerin gefüllt. Je 1ml Natrium-Hypochlorit wurden zugeben und die Eppis mit Sicherheitskappen versehen. Proben wurden auf dem Vortexer gemischt und 12 h bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , wurde die Suspension gemischt und für 10-30 min ins Ultraschallbad gestellt, um die PHB Granula zu resuspendieren. Danach wurden die Proben abzentrifugiert (10 min, 14000 rpm) und das PHB Pellet mit 1,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen (10 min, 14000 rpm). Das Pellet wurde zum Trocknen in  $60^\circ\text{C}$ - Schrank gestellt. Die Eppis wurden erneut gewogen und nach dem Abziehen des Gewichtes von leeren Gefäßen konnte die Menge an reinem nPHB pro g nPHB in Glycerin ausgerechnet werden.

Der Extinktionskoeffizient wurde durch eine Kalibrierungsreihe bis  $1,26 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  native PHA-Granula pro ml 100 mM Tris/HCl (pH 9,0) bestimmt (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Bestimmung des Extinktionskoeffizienten**

Bestimmung des Extinktionskoeffizienten nativer PHB-Granula aus *R. eutropha* H16 im Standardphotometer (1 cm Küvettendurchmesser). Die Werte sind Mittelwerte aus drei Wiederholungen.

Für native PHB-Granula (nPHB) aus *R. eutropha* H16 ergab sich ein Extinktionskoeffizient von  **$1,2 \mu\text{l}/\mu\text{g} \cdot \text{cm}$**

## 2.8 Gaschromatographie

Saure Methanolyse nach Brandl et al., 1988 (modifiziert)

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (20 min 4500 rpm) geerntet. Nach dem Einfrieren der Zellmasse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  folgte die Gefriertrocknung. Dazu wurden 2-10 mg Zellen in Schraubdeckelröhrchen mit Teflon-Dichtung auf einer Analysenwaage exakt eingewogen. 1 ml angesäuertes Methanol (15% (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) und 1 ml Chloroform wurden zugegeben, gut durchmischt und bei  $100^{\circ}\text{C}$  im Ölbad 3h inkubiert. Nach Abkühlung (auf Eis) wurden 1 ml Benzoessäuremethylester-Eichstammlösung ( $2\ \mu\text{l} + 998\ \mu\text{l}$  Chloroform) und 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  hinzugegeben und kräftig durchgemischt. Die organische Phase (untere) wurde anschließend direkt für die Analyse verwendet. Es wurde  $1\ \mu\text{l}$  der Chloroformphase (Splitlos) mit Hilfe einer automatisierten Probenauftragung in den Injektor (Injektionstemperatur:  $250^{\circ}\text{C}$ ) injiziert.

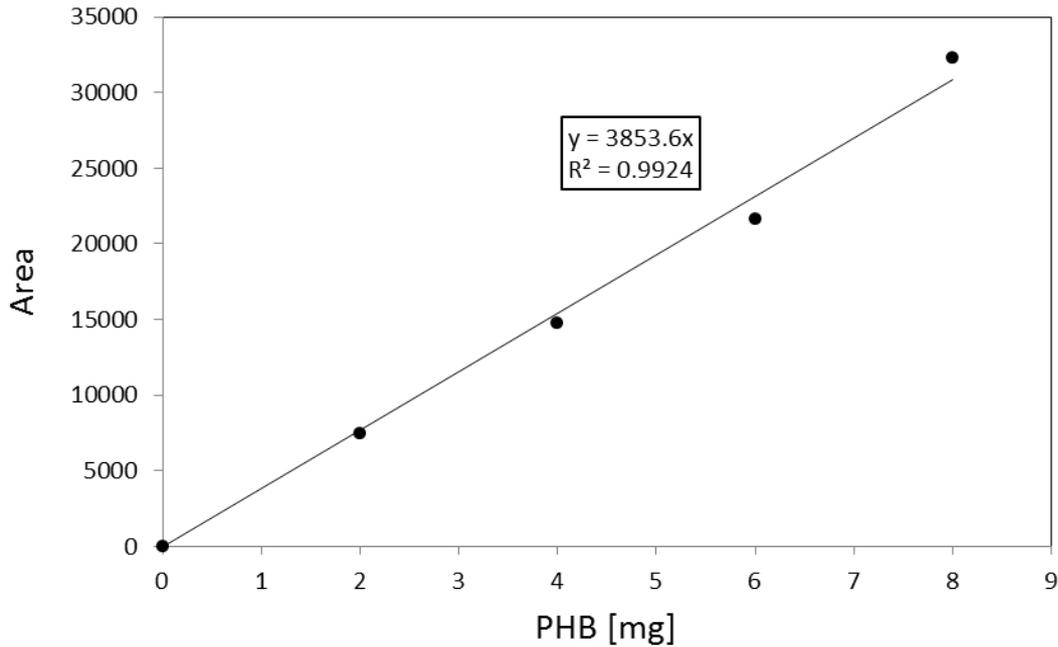
Für die Herstellung der Standardgerade wurden 2 - 10 mg PHB wie oben beschrieben methanolisiert und gemessen.

Trennung der Methylester erfolgte mit Hilfe eines Temperaturprogramms:

2 min	$50^{\circ}\text{C}$
Erhöhung mit einer Rate von $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$60^{\circ}\text{C}$ , 5 min halten
Erhöhung mit einer Rate von $35^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$280^{\circ}\text{C}$ , 1 min halten

Je nach erwartetem PHB Gehalt wurde zwischen einer Split- bzw. Splitlosen-Injektion entschieden.

Die Trennung erfolgte an einer HP-5 Säule (Agilent) mit dem Trägergas Helium (Durchströmgeschwindigkeit:  $5\ \text{ml}/\text{min}$ ). Detektiert wurde mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors bei einer Temperatur von  $275^{\circ}\text{C}$ .



**Abbildung 2: PHB-Standardgerade zur Bestimmung des PHB-Gehalts.**

Aufgetragen wurde die Peakfläche gegen die eingesetzte PHB Menge. Die Werte sind Mittelwerte aus drei Wiederholungen.

## 2.9 Reinigung von Proteinen

### Puffer A:

NaCl                      8,77 g  
 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                3,9 g  
 Glycerin                 25,5 ml (von 98%)  
 In 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, mit NaOH den pH auf 8 einstellen

Zur Gewinnung der Depolymerasen aus *E. coli* BL21(DE3)/pLys + pET28a::*phaZd1/phaZd2* wurden 20 ml LB-Medium (Kan(50), Cm(20)) mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (150 rpm) inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 400 ml LB-Medium (Kan(50)) mit 4 ml der Vorkultur überimpft und bei 30°C inkubiert (150 rpm). Bei einem OD<sub>600</sub>-Wert von 0,6 erfolgte die Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Ernte der Kultur erfolgte nach weiteren 4h (5000 rpm, 20 min, 4°C). Alle Schritte ab der Ernte wurden auf Eis durchgeführt. Das abzentrifugierte Zellpellet wurde in Puffer A + 0,05 % Hecameg + 20 mM Imidazol resuspendiert und zwei Mal mit großer French-Press Zelle (Druckmaximum 1100 PSIG) (Aminco, Maryland, USA) aufgeschlossen. Zur weiteren Untersuchung wurden die Zelltrümmer von den löslichen Bestandteilen durch Ultrazentrifugation (Rotor TFT 65.13, 35000 rpm, 1h, 4 °C, Beckman Optima™LE-80K) abgetrennt.

Für die Aufreinigung des Proteins mit His-tag wurde eine Säule mit je 1 ml Ni-NTA-Material (Quiagen) eingesetzt. Zuerst wurde die Säule mit 10 ml Puffer A + 20 mM Imidazol äquilibriert. Das Rohextrakt wurde zweimal auf die Säule aufgetragen. Der Durchfluss wurde in 15 ml-Falcontubes aufgefangen und auf Eis aufbewahrt. Es folgte das Waschen der Probe mit niedrig konzentriertem Imidazol-Puffer und die Elution des Proteins bei höheren Konzentrationen.

**Tabelle 6: Wasch- und Elutionsfraktionen, Puffer A + 0,05% Hecameg**

Waschfraktion 1	20 mM Imidazol	15 ml
Waschfraktion 2	50 mM Imidazol	10 ml
Waschfraktion 3	100 mM Imidazol	5 ml
Elutionsfraktion 1	200 mM Imidazol	2 ml
Elutionsfraktion 2	250 mM Imidazol	2 ml
Elutionsfraktion 3	400 mM Imidazol	2 ml
Elutionsfraktion 4	500 mM Imidazol	2 ml

Einzelne Fraktionen der Reinigung wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Anschließend wurden die Proteine durch Coomassie Brilliant Blau Färbung angefärbt. Die Fraktionen, die PhaZd1 bzw. PhaZd2 enthielten wurden gepoolt. Die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie Brilliant Blau Färbung überprüft. Danach erfolgt eine Umpufferung mittels PD-10 Säule (GC Healthcare Life Sciences) in 20 mM  $KP_i$ -Puffer, pH 7,5 mit 5% Glycerin und 0,05% Hecameg.

## 2.10 Proteinbiochemische Methoden

### 2.10.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde routinemäßig die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

#### **Bradford Reagenz:**

Serva Blau G 250	100 mg
EtOH (unvergällt, 96 %)	50 ml
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85 % v/v)	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml

## Material und Methoden

Serva Blau G 250 wurde in Ethanol gelöst. Nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  und  $\text{H}_3\text{PO}_4$  wurde die Lösung über Nacht gerührt, filtriert und lichtgeschützt aufbewahrt.

Für den Test wurde die Proteinprobe verdünnt. Zu 100  $\mu\text{l}$  Probe wurden 900  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz zugegeben. Der Ansatz wurde gut durchgemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm (Cary 50bio UV-Visible Spectrophotometer von Varian, Mulgrave Victoria 3170, Australien) gegen einen Leerwert (900  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz und 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ ).

Die Eichkurve wurde im Bereich von 0 bis 80  $\mu\text{g}$  Bovinen Serumalbumins (BSA) aufgenommen. Alle Bestimmungen wurden mindestens als Doppelbestimmung ausgeführt.

### 2.10.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SDS-PAGE nach Laemmli, 1970

Die Proteine wurden in einer vertikalen Minigelkammer (Biometra, Göttingen) unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Die Gele bestanden aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Die Gelgröße betrug 100 x 100 x 1 mm. Die Zusammensetzung der Gele ist in der Tabelle 7 angegeben.

Zur Herstellung der Gele und Puffer wurden folgende Lösungen verwendet:

Acrylamidlösung (Roth, Karlsruhe)

SDS-Lösung: 10 % (w/v) SDS

Ammoniumpersulfat (APS) - Lsg.: 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat

Trenngelpuffer: 1 M Tris/HCl, pH 8,7

Sammelgelpuffer: 0,25 M Tris/HCl, pH 6,8

Denaturierungspuffer (x3):	SDS-Lösung	15 ml
	Glycerol (87 % v/v)	15 ml
	2-Mercaptoethanol	1,5 ml
	Bromphenolblau	75 mg
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	ad 50 ml

SDS-Elektrophoresepuffer:	Tris	12,1 g
	Glycin	7,5 g
	SDS	1,0 g
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	ad 1000 ml

**Tabelle 7: Zusammensetzung für verwendete SDS-Gele**

<b>Lösung</b>	<b>Trenngel 12 % (2 Gele)</b>	<b>Sammelgel 4 % (2 Gele)</b>
Acrylamid-Lsg.	4 ml	650 µl
Trenngelpuffer	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1,25 ml
SDS-Lsg.	100 µl	50 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	3,4 ml	3,05 ml
APS-Lsg. (10 %)	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Alle Bestandteile des Trenngels, mit Ausnahme der APS-Lösung, wurden zusammenpipettiert und durchmischt. Durch die Zugabe der APS-Lösung wurde die Polymerisationsreaktion gestartet. Die Trenngellösung wurde zwischen die vorbereiteten Platten gegossen. Das Gel wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu erhalten. Nach der Polymerisation wurde die Isopropanolschicht entfernt, das Sammelgel gegossen und ein Kamm zur Ausformung der Taschen ins Gel eingesetzt. Die auspolymerisierten Gele wurden in die Apparatur eingebaut und mit SDS-Laufpuffer überschichtet.

Die Proteinproben wurden mit Denaturierungspuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und dann aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte während der Passage des Sammelgels bei 10 mA und dann bei 20 mA, bis die Bromphenolblau-Bande das untere Gelende fast erreicht hatte. Als Protein-Molekulargewichtsmarker diente der „Precision Plus Protein Standard“ von Bio-Rad (München, Deutschland).

### **2.10.3 Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Blue**

Methode nach Weber und Osborn, 1969

Proteine können in Gelen mit dem Farbstoff Coomassie Blau gefärbt werden. Die Polyacrylamidgele wurden für 45 – 60 min bei RT in der Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die Gele in der Entfärbelösung mit mehrmaligem Wechseln inkubiert, bis der Hintergrund völlig farblos war. Die Färbung und Entfärbung wurde unter ständiger Bewegung auf einer Wippe durchgeführt.

**Färbelösung:**

Serva-Blau G-250	0,6 g
Serva-Blau R-250	0,6 g
Methanol	454 ml
Eisessig	92 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
Lösung filtrieren	

**Entfärbelösung:**

Methanol	330 ml
Eisessig	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml

**2.11 Bestimmung von Enzymaktivitäten**

**2.11.1 Turbidimetrischer Test zur Bestimmung der PHA Depolymeraseaktivität**

Die PHA Depolymeraseaktivität wurde durch photometrische Messung (Cary 50bio UV-Visible Spectrophotometer von Varian, Mulgrave Victoria 3170, Australien) der Trübungsabnahme einer Polymersuspension bei 650 nm und 43 °C in Plastikküvetten (d = 1 cm) bestimmt. Der Ansatz bestand aus:

nPHASCL-Stammsuspension in Glycerol	3–5 µl
Enzymlösung	5–50 µl
Tris/HCl (100 mM, pH 9,5)	ad 1 ml

Die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit wurde anhand der Geradensteigung ermittelt. Die Berechnung der Enzymaktivitäten erfolgte nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz unter Einbeziehung des apparenten Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon = 2,8 \mu\text{l} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) für die jeweils verwendete Polymer-Suspension.

$$\text{Aktivität [U/ml]} = \frac{\Delta E * \text{Küvettenvolumen [ml]}}{\Delta t [\text{min}] * \epsilon * d [\text{min}] * \text{Enzymprobevolumen [ml]}}$$

1 Unit [U] wurde definiert als die Hydrolyse von 1 µg Polymer pro Minute.

Für die Aktivierung der verwendeten nativen PHB Granula war eine Proteasebehandlung erforderlich. Hierfür wurden 10 mg native Granula in 20 ml Aktivitätspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 9,5) mit 11 µl Trypsinstammlösung (1,25 mg/ml, SERVA Feinbiochemika

GmbH, Heidelberg) versetzt und 10 min bei 43 °C inkubiert. Die Aktivierung wurde durch die Zugabe von 11 µl Ovomucoidlösung (25 mg/ml) gestoppt. So präparierte Granula waren bis zu 6 h bei RT stabil.

### 2.11.2 Bestimmung von nPHB-Depolymeraseaktivitäten durch Titration

Für eine quantitative Bestimmung der (*R*)-3-HB-Freisetzung wurde ein Titrinat (Titrando 842) bestehend aus pH-Mikroelektrode, Temperatursonde, Dosimat 800 und Rührer 801 (Metrohm, Leinfelden-Echterdingen) verwendet. Als Reaktionsmedium wurden schwach gepufferte Lösungen von 1 mM Kaliumphosphatpuffer (initialer pH 7,3) oder 1 mM Natriumacetatpuffer (initialer pH 5,3) eingesetzt (Anfangsvolumen 10 bis 20 ml), da in Wasser die pH-Wertschwankungen zu hoch waren. Die Verwendung zweier Reaktionsgefäße ermöglichte die parallele Titration zweier Ansätze. Als Maßlösung (Titrant) wurde Natronlauge verwendet, die Konzentration betrug hierbei je nach vermuteter Rate zwischen 0,01 und 0,5 M. Die Reaktionsgefäßtemperatur wurde über ein Wasserbad mit integrierter Pumpe (Haake C1, Thermo Haake, Karlsruhe) gesteuert. Das Titrationsprogramm bestand aus Vortitrationsmodus und Hauptmodus. Im Vortitrationsmodus wurde der pH-Wert auf den vorgegebenen Sollwert eingestellt, anschließend wurden im Hauptmodus Zellen oder nPHB-Granula zugegeben und der Verbrauch an Natronlauge bestimmt. Die Aufzeichnung der Messdaten erfolgte dabei mit der Software tiamo 1.1 (Methrom).

### 2.11.3 Bestimmung von Esterase-Aktivitäten

Die Esterase-Aktivität wurde nach Winkler und Stuckmann (1979, modifiziert) bestimmt. Als Substrate dienten *p*-NP-Acetat und *p*-NP-Butyrat. Die Freisetzung von *p*-Nitrophenol aufgrund der Hydrolyse des Substrats wurde spektrophotometrisch bei 405 nm und 40 °C gemessen. Der Testansatz bestand aus:

<i>p</i> -Nitrophenylacylester (10 mM in 96 % Ethanol)	20 µl
Enzymlösung	5 – 20 µl
Tris/HCl (100 mM, pH 7,9, 1 mM CaCl <sub>2</sub> )	ad 1 ml

Da in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Temperatur Autohydrolyse erfolgte, wurden die Reaktionspuffer vor der Enzymzugabe mit Substrat bis zum Erreichen eines konstanten Verlaufes vorinkubiert. Der Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ , 405 nm, pH 7,9; 30 °C) des *p*-Nitrophenolations betrug 14,925 (mM<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>).

### 2.12 Nachweis von 3-HB durch HPLC

Zur Detektion von Produkten der nPHB-Hydrolyse über HPLC wurden diese mit Bromphenacylbromid (BPB) derivatisiert (Gebauer und Jendrossek, 2006). Bromphenacylbromid weist eine hohe Absorption bei 254 nm auf und ermöglicht so einen sensitiven Nachweis von 3-HB-Verbindungen. Zur Abtrennung des PHBs wurden die Proben für die 3-HB-Bestimmung direkt nach der Probennahme (z.B. im pH-Stat) zentrifugiert (14.000 rpm, 10 min, 4 °C) und der Überstand für die Derivatisierung eingesetzt. Je nach geschätzter 3-HB-Konzentration wurden zwischen 20 und 100 µl Probe verwendet. Nach der Alkalisierung durch Zugabe von 100 µl Triethylamin (100 mM in Aceton) und Eindampfen des Ansatzes mittels einer Speed-Vac (Con-1000, Fröbel Labortechnik, Lindau) wurden jeweils 100 µl Kronether (2 mM in Acetonitril) und Bromphenacylbromid (10 mM in Acetonitril) zugegeben. Da Bromphenacylbromid bei der Derivatisierung im Überschuss vorliegen muss, wurde für Proben mit höherer 3-HB-Konzentration jeweils 100 µl 10 mM Kronether und 50 mM Bromphenacylbromid verwendet. Die Reaktionsansätze wurden anschließend für 90 min bei 80 °C inkubiert. Während der Inkubation wurden die Ansätze mehrmals gemischt und am Ende auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm wurden 5 µl des Überstands auf eine Reversed Phase C-18 HPLC-Säule (LiChrospher 100 RP18, 5 µm, 4,6 x 250 mm, Trentec, Rutesheim) an einer Agilent HPLC-Anlage (1100 Series, Agilent, Waldbronn) aufgetragen. Als Laufmittel wurden 0,01 M Ammoniumformiatpuffer mit 2 % Methanol, pH 4 (Lösung A) und reines Methanol (Lösung B) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer Flussrate von 0,8 ml/min und 30°C unter folgenden Bedingungen:

Gradient von 60 % Lösung A und 40 % Lösung B zu 100 % Lösung B in 28 min

5 min isokratisch mit 100 % Lösung B

Gradient zu den Anfangsbedingungen (60 % Lösung A und 40 % Lösung B) innerhalb einer Minute

5 min isokratisch mit 60 % Lösung A und 40 % Lösung B

Die Absorption der Bromphenacylbromidderivate wurde bei 254 nm detektiert, die Auswertung der Chromatogramme und Berechnung der Peakflächen erfolgte mittels der Software ChemStation Rev. 3.01.03 (Agilent). Als Standard wurde eine definierte Menge (R,S)-3-HB derivatisiert und mitgeführt.

## 2.13 Genetische Methoden

### 2.13.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Geräte und Lösungen wurden zur Inaktivierung von Nukleasen durch Autoklavieren (20 min, 121 °C) sterilisiert. Nicht autoklavierbare Materialien wurden mit 96 % Ethanol gespült oder abgeflammt. Hitzelabile Lösungen wurden steril filtriert (0,2 µm Sterilfilter, Satorius AG, Göttingen).

### 2.13.2 Isolation genomischer DNA aus *R. eutropha* H16

Zur Isolierung der genomischen DNA aus *R. eutropha* H16 wurde ein Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) verwendet. Die Isolation erfolgte nach Angaben des Kit-Herstellers.

### 2.13.3 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Zur Plasmidisolierung wurde ein NucleoSpin<sup>®</sup> Miniprep Kit (Macherey-Nagel) oder High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) verwendet. Die Isolation erfolgte nach Angaben des Kit-Herstellers.

### 2.13.4 Standard-Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Nukleinsäuren wurden durch Agarose-Gelelektrophorese in horizontalen Gelkammern aufgetrennt. Die Agarosekonzentration in den Gelen war abhängig von der Größe der zu trennenden Fragmente und variierte zwischen 0,8 % (w/v) und 1,5 % (w/v). Die Agarose wurde in TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst (Mikrowelle) und nach Abkühlen auf ca. 60 °C in die Gelkammer gegossen. Der zur Ausformung der Probestaschen notwendige Kamm wurde sofort in die noch flüssige Agarose eingesetzt. Nach der Aushärtung der Agarose-Lösung wurde das Gel mit Laufpuffer überschichtet und der eingesetzte Kamm entfernt. Die Probe wurde vor dem Auftragen mit 1/10 Vol. Stop-Mix gemischt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 60-120 V durchgeführt, wodurch sich, je nach Gelgröße, eine Laufzeit von 20 bis 60 min ergab. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für ca. 10 min in ein Ethidiumbromidbad (10 µg/ml H<sub>2</sub>O) gelegt, um die DNA-Banden anzufärben. Nach kurzem Entfärben im Wasserbad konnten die Gele mit einem UV-Transilluminator (ULTRA LUM, Ultra Lum Ins., USA) begutachtet werden.

### **TBE-Puffer:**

50 mM Tris/Borat  
2,5 mM Na<sub>2</sub>-EDTA

### **Stop-Mix:**

5 M Harnstoff  
1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
50 % (w/v) Saccharose  
0,1 % (w/v) Bromphenolblau  
pH 7,0

### **2.13.5 Präparation von Nukleinsäuren aus Agarosegelen**

Zur Isolierung des gewünschten DNA-Fragmentes nach Restriktionsspaltung oder nach PCR Amplifikation wurde die entsprechende DNA-Bande mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kits von Macherey-Nagel oder des PerfectPrep Gel Cleanup Kits von Eppendorf aus dem Gel isoliert. Dabei wurden zuerst die DNA-Fragmente durch Gel-Elektrophorese (siehe 2.13.4) aufgetrennt. Nach kurzem Anfärben mit Ethidiumbromid wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Elution von DNA-Fragmenten aus dem Gel erfolgte nach Angaben des Kits-Herstellers.

### **2.13.6 Enzymatische Modifikation von DNA**

#### **2.13.6.1 Restriktionsverdau von DNA**

Durch Restriktionsverdau wurden sowohl die zur Klonierung verwendeten DNA-Fragmente und Plasmide spezifisch geschnitten als auch die entstandenen Klonierungsprodukte identifiziert.

#### **Reaktionsansatz:**

Plasmid-DNA ca.	1 µg
10x Restriktionspuffer	3 µl
Restriktionsenzym	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 30 µl

Der Ansatz wurde für 2h oder auch über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Anschließend wurde die Vollständigkeit des Verdaus durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel (2.13.4) kontrolliert.

Die Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) bezogen.

### 2.13.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten mit einem Plasmid-Vektor müssen das zu klonierende DNA-Fragment und der Plasmid-Vektor so geschnitten werden, dass die Enden der entstehenden Schnittstellen durch eine DNA-Ligase kovalent verbunden werden können. Dabei spielen die Konzentration und die Länge des DNA-Fragmentes eine große Rolle. Basierend auf dieser Konzentrationsberechnung mit dem NEBioCalculator (<http://nebiocalculator.neb.com>) wurde das zu klonierende DNA-Fragment mit einem 3-fachen molaren Überschuss an den Plasmid-Vektor ligiert. Die Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmid-Vektoren wurde unter Verwendung von T4-Ligase (New England Biolabs) bei 16° C über Nacht durchgeführt.

#### Reaktionsansatz:

10x T4 DNA Ligase Puffer	1 µl
Vector DNA (4 kb)	50 ng
Insert DNA (1 kb)	37.5 ng
T4 DNA Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 10 µl

Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurde der Ansatz hitzeinaktiviert bei 65°C für 10 Minuten und 5 - 10ul der Reaktion wurden zu 200ul kompetenten Zellen für die Transformation gegeben.

### 2.13.7 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zählt zu einer gängigen Methode, um DNA *in vitro* zu amplifizieren. Als DNA-Polymerase wurden Taq-Polymerase (Genaxxon bioscience) und PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase (TaKaRa BIO INC.) verwendet. Hierbei handelt es sich um hochprozessive 5'→3'-DNA-Polymerasen die zusätzlich eine 3'→5'-DNA-Exonuclease-„Proofreading“-Funktion besitzen.

## Material und Methoden

Folgende Reaktionsansätze bzw. PCR-Programme wurden standardmäßig verwendet:

Ansatz: 50 µl

### Taq-Polymerase

### PrimeSTAR™HS DNA Polymerase

< 10ng Plasmid DNA	<200 ng template DNA
< 500ng genomisches DNA	
5 - 25 pmol Primer I	10 - 15 pmol Primer I
5 - 25 pmol Primer II	10 - 15 pmol Primer II
5 µl Puffer (10x)	10µl PrimeSTAR Buffer (Mg <sup>2+</sup> Plus) (5x)
1µL dNTP (10 mM)	4µl dNTP Mix (2,5 mM)
0.25 - 0.3µl Taq-Polymerase	0,5µl PrimeSTAR™HS DNA Polymerase
ad 50 µl H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 50 µl H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

Nach Vorheizen des PCR-Gerätes wurden die Proben ins Gerät gestellt und die Reaktionszyklen gestartet.

### PCR Programm:

Taq-Polymerase		PrimeSTAR™HS DNA Polymerase	
94 °C	3 min	98°C	120 sec
dann 30 Zyklen unter folgenden Bedingungen:			
94°C	30 sec	98°C	10 sec
50°C - 68°C	30 sec	68°C	1 min./kb
72°C	1 min./kb		
72°C	5 min	72°C	5 min
4°C	∞	4°C	∞

Nach Beendigung der PCR wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und durch Elektrophorese aufgetrennt.

Durch Veränderung verschiedener Faktoren wie der Annealingtemperatur, Elongationszeit, Primer- oder Enzymkonzentration und mittels Gradienten konnte die Spezifität und die Ausbeute optimiert werden.

### 2.13.7.1 Aufreinigung der PCR-Produkte

Nach erfolgreicher PCR erfolgte ein Aufreinigungsschritt, um überschüssige Primer und nicht gebundene Desoxynukleotidtriphosphate zu entfernen. Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte direkt nach der PCR durch das QIAquick PCR Purification Kit (Roche), wobei hier der gesamte PCR-Ansatz als Ausgangsmaterial eingesetzt wurde. Alternativ wurde der gesamte PCR-Ansatz mit Hilfe der präparativen Gelelektrophorese aufgereinigt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden für den weiteren Restriktionsverdau bzw. für Klonierungsversuche eingesetzt.

### 2.13.7.2 Quick Change™ Mutagenese

Zu dem Plasmid, das mutiert werden sollte, wurden zwei Primer gegeben, die komplementär zu je einem Strang der DNA waren und die Mutation etwa in der Mitte des Oligonukleotids enthielten. Als DNA-Polymerase wurde die PrimeSTAR™HS DNA Polymerase (TaKaRa BIO INC.) verwendet. Die PCR-Reaktion wurde wie unter 2.13.7 beschrieben durchgeführt. Die neu synthetisierte DNA mit der gewünschten Mutation wird durch *DpnI*-Verdau von der Template-DNA getrennt. Dieses Enzym verdaut selektiv nur methylierte DNA, so dass nur die *in vitro* neu synthetisierte DNA nach dem Verdau übrig bleibt. Die *DpnI*-verdaute DNA wurde dann in *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert.

### 2.13.8 Herstellung der *knock-out* Mutanten

Methode nach Lenz und Friedrich, 1998

Präzise chromosomale Deletionen wurden in *R. eutropha* H16 mit dem *sacB*-Saccharose-System (10% Saccharose) und mit dem pLO3 als Deletionsvektor konstruiert. Das pLO3 Plasmid mit den entsprechenden homologen Bereichen wurde über Konjugation in *R. eutropha* H16 gebracht (2.13.10). Als Selektionsplatten wurde MM-Medium + 0,2% Fruktose (w/v) + 15 mg/ml Tetracyclin verwendet. Die gewachsenen Klone wurden auf eine frische Selektionsplatte mit Hilfe eines Drei-Strich-Austriches aufgereinigt. Die Integration des pLO3 Plasmids ins Genom wurde mittels PCR überprüft. Der richtige Klon wurde über Nacht in 5 ml NB Medium bei 30°C inkubiert und danach auf NB Medium mit 10% Saccharose ausplattiert. Der Genotyp des resultierenden Deletionsmutanten wurde durch PCR verifiziert.

### 2.13.9 Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen und Transformation

Schnellmethode nach (Chung et al., 1989)

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 20 ml LB-Medium 1:100 mit der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C für 1-2 Stunden wachsen gelassen (bis  $OD_{600} = 0,3 - 0,4$ ). Die Kultur wurde bei 4 °C abzentrifugiert (10 min, 4500 rpm) und in 1 ml kaltem TSS-Medium resuspendiert. Nach 1 min Inkubation auf Eis waren die Zellen bereit für die Transformation. 5 bis 10 µl des Ligationsansatzes bzw. 1 µl Plasmid-DNA wurden zu 200 µl kompetenten Zellen zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock: 90 sec bei 42 °C. Nach dem Hitzeschock wurden 800 µl TSS-Medium zugegeben und der Transformationsansatz 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler (105 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Selektionsplatten ausplattiert.

#### TSS-Medium:

LB-Medium	89 ml
Polyethylenglycol 6000	10 g
Dimethylsulfoxid (DMSO)	4,72 ml
MgCl <sub>2</sub> (2M)	2,5 ml

### 2.13.10 Konjugation

Donor (*E. coli* S17-1 mit dem entsprechendem Plasmid) und Rezipient (*R. eutropha* H16) wurden in 10 ml LB- bzw. NB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angezogen. Die Zellen wurden geerntet und in 1 ml NB - Medium resuspendiert. Es wurden jeweils 0,5 ml der Kulturen gemischt und davon je 0,5 ml auf eine dicke LB-Platte aufgetropft (Rezipient zu Donor 1:1). Als Kontrollen wurden von den Reinkulturen je 0,5 ml auf NB-Platten getropft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die gewachsenen Zellen mit je 1,5 ml 0,9 % Saline abgeschwemmt, 1:10, 1:100, 1:1000 verdünnt und je 100 µl auf Selektionsplatten (MM-Medium + 0,2 % Fruktose (w/v) + 350 mg/ml Kanamycin) ausplattiert. Von den Kontrollen wurden 100 µl unverdünnt ausplattiert.

#### 2.13.10.1 Schnelle Konjugation

Mit einer Impföse wurde eine Kolonie des Donors (*E. coli* S17-1 mit dem entsprechendem Plasmid) von einer frischen Platte gepickt und in mehreren parallelen Strichen auf MM-Medium + 0,2% Fruktose + 350mg/ml Kanamycin Platte übertragen. Die Rezipient (*R.*

*eutropha* H16) Kolonie wurde im rechten Winkel dazu aufgetragen. Der Impfstrich wurde durch alle Donor-Striche gezogen. Die Agarplatte wurde 1-3 Tage bei 30 °C inkubiert. Danach konnten Einzelkolonien, die sich an den Kreuzstellen zwischen Donor- und Rezipienten-Impfstrich gebildet hatten, auf eine frische Selektionsplatte ausgestrichen werden.

### 2.13.11 Sequenzierung

Zur Isolierung hochreiner Plasmid-DNA für Sequenzierungen wurde der High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) nach Angaben der Hersteller benutzt. Die Sequenzierungen wurden von der Firma LGC Genomics GmbH durchgeführt. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit den in der Datenbank Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) hinterlegten entsprechenden Gensequenzen verglichen.

## 2.14 Phosphataufnahme Assay

### Tris-Mineralmedium nach Mergeay et al., 1985 (modifiziert):

Tris	6,06 g
NaCl	4,68 g
KCl	1,49 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,07 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,43 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g
Fe(NH <sub>4</sub> )Citrat	0,005 g
SL6, 10000-fach	30µl
pH 7,2 (HCl)	

Folgende Stammlösungen wurden getrennt angesetzt und autoklaviert.

MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1000-fach
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1000-fach
SL6	10000-fach
Fe(NH <sub>4</sub> )Citrat	1000-fach

### Vorbereitung der Zellen

Zuerst wurden PHB-freie Zellen von *R. eutropha* H16 wie im Abschnitt 2.4.2.1 vorbereitet. 100 ml Hauptkultur (NB + 0,2 % NaGlukonat (w/v)) wurden 1:20 angeimpft und bei 30°C und 150 rpm 8h kultiviert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (4500 rpm, 15 min, 4°C). Das Zellpellet wurde mit Tris-Medium gewaschen und in dem gleichem Puffer bis zu einer

OD<sub>600</sub> von 2 resuspendiert. Um endogene Phosphatreserven zu verbrauchen wurden die Zellen vor der Phosphatzugebe 4h bei 30°C vorinkubiert.

### **Vorbereitung der Phosphatstammlösung:**

Eine 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Lösung (pH 7,2) wurde vorbereitet. Zu 10 ml wurden 6 µl P-33-Phosphorsäure (<sup>33</sup>P<sub>i</sub>) zugegeben (5,76 TBq/mg) (PerkinElmer NEZ080100UC).

### **Assay**

5 ml Zellen wurden auf 30°C vorgewärmt. Die Zellsuspension wurde bei 30°C auf einem Heizblock unter ständigem Rühren gehalten. 200µl Zellen (ohne Phosphat) wurden auf einen Filter gegeben und mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt (0 Probe). Die Phosphatstammlösung wurde zugegeben und je 200 µl wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten abgesaugt. Nachdem die Flüssigkeit von dem Filter aufgenommen wurde, wurde dreimal mit 1 ml Tris-Medium (ohne Phosphat) gewaschen. Die Filter wurden in Szintillationsröhrchen gebracht und 4 ml Szintillationscocktail (Ultima Gold, PerkinElmer) wurden in die Röhrchen gegeben und anschließend in einem β-Zähler (Tri-Carb Packard 1600TR liquid scintillation analyzer) die Radioaktivität (cpm) direkt gemessen (Messung wurde meist am nächsten Tag wiederholt). Zusätzlich wurde eine Probe mit bekannter Phosphatmenge als Standard für die Berechnung der P<sub>i</sub>-Konzentration eingesetzt. Die Konzentration wurde in mmol P<sub>i</sub>/OD<sub>600</sub> umgerechnet.

## **2.15 *In vitro* Polyphosphat Quantifizierung mit DAPI-Fluoreszenz**

Modifiziert nach Diaz und Ingall, 2010; Kulakova et al., 2011

Für eine direkte Quantifizierung wurde zu erst eine Trockengewichtbestimmung in 10 ml Kultur durchgeführt. Zusätzlich wurde 1 ml Kultur für den Assay abzentrifugiert (15000 rpm, 1min, 4°C), in 1 ml 50 mM HEPES Puffer (pH 7,5) gewaschen, das Pellet im flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Das Pellet wurde in 200 µl Assay Puffer (ohne DAPI) resuspendiert und mit Assay Puffer (10 µM DAPI) 1:10 verdünnt. Bei zu hohem PolyP Gehalt wurden die Zellen stärker verdünnt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die DAPI-PolyP Fluoreszenz in einer Quarz-Küvette (Hellma Analytics) (Assayvolumen 2 ml) in einem Fluorometer (Jasco FP-8500) bei einer Extinktion von 415 nm

und Emission von 550 nm gemessen. Die Polyphosphatkonzentration wurde mit Hilfe einer Kalibrierungsgerade, hergestellt mit PolyP-45 (Sodium phosphate glass Type 45, Sigma-Aldrich) bestimmt. Als Nullwert wurde der Fluoreszenzwert der Zellen im Assay Puffer (ohne DAPI) genutzt.

### **Assay Puffer:**

KCl	11,2 g
HEPES	4,8 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
pH 7,0 einstellen	

## **2.16 Bakteriellies Adenylatzyklase Two-Hybrid System**

Modifiziert nach Karimova et al., 1998

### **2.16.1 Genbank Screening Experiment**

#### **M63-Minimalmedium Platten:**

M63-Minimalmedium (5x)	200 ml
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
Maltose (20%)	10 ml
Thiamin (0,5%)	1 ml
Ampicillin (100 mg/ml)	1 ml
Kanamycin (50 mg/ml)	1 ml
IPTG (1M)	0,5 ml
X-Gal (2% in DMF)	2 ml

Die Komponenten wurden zusammengemischt, auf 50°C vorgewärmt und zu vor-autoklaviertem Agar (15 g/800 ml) gegeben, gemischt und in die Platten gegossen.

#### **M63-Minimalmedium (5X):**

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68 g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,5 mg
In 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> lösen, mit KOH den pH auf 7 einstellen, dann mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> auf 1 l auffüllen	

### **LB-X-Gal-IPTG-Amp-Kan-Platten:**

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

Die Komponenten wurden zu 1 L LB-Agar hinzugegeben, gemischt und in Platten gegossen.

Als erstes wurden elektrokompetente *E.coli* BTH101 Zellen mit dem pKT25-Plasmid mit dem entsprechenden Insert hergestellt (für die Transformation siehe 2.13.9). Dafür wurde eine Vorkultur von 10 ml in LB-Medium + Kan(50) angezogen (ca.12h, 37°C, 170 rpm), um damit 100 ml Hauptkultur in LB-Medium + Kan(50) 1:100 anzuimpfen. Nach ca. 2h (37°C, 170rpm) und einem OD<sub>600</sub> Wert von 0,3-0,4 wurden die Zellen zuerst 30 min in Eiswasser gekühlt und anschließend abzentrifugiert (4500 rpm, 4°C 10 min), zweimal mit je 1 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O waschen, dann zweimal mit je 1 ml eiskaltem 10%igen Glycerin waschen und in 200 µl 10%igem Glycerin resuspendieren. Davon wurden 40 µl in ein anderes Eppendorfgefäß überführt und 1 µl Plasmid pUT18::Genbank (Pfeiffer und Jendrossek, 2011) hinzugegeben und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte unter folgenden Parametern: 25µF; 2,5kV und 200Ω. Sofort danach wurden 960 µl LB-Medium zugegeben und der gesamte Ansatz in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden für 90 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml M63-Minimalmedium gewaschen und je 100 µl auf 10 Stück M63-Minimalmedium-Platten ausplattiert.

Zusätzlich wurden Verdünnungen von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-5</sup> auf LB-X-Gal-IPTG-Amp-Kan-Platten ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Für die Auswertung der Transformationseffizienz wurde die Anzahl der bei den einzelnen Verdünnungen gewachsenen Kolonien bestimmt.

Von den auf M63-Minimalmedium-Platten gewachsenen, blauen Kolonien wurden insgesamt 50 ausgewählt, die per 3-Strich-Methode auf neuen M63-Platten ausgestrichen wurden. Dabei wurde darauf geachtet, möglichst viele verschiedene Kolonien in Bezug auf Größe und Farbintensität auszuwählen. Diese Kolonien wurden zur DNA-Sequenzierung ausgewählt.

### **2.16.2 Two-Hybrid Interaktionsversuch mit bekannten Proteinen**

Die gewünschten Gene wurden zuerst in die pKT25 und pUT18C Plasmide inkloniert. Die fertigen Plasmide wurden in allen benötigten Kombinationen in die *E.coli* BTH101 Zellen transformiert (2.13.9). Anschließend wurden die Zellen auf LB-Kan(50)-Amp(100)-Platten

ausplattiert. Von den Transformationsplatten wurden für jede Plasmid-Kombination jeweils drei Einzelkolonien für den quantitativen  $\beta$ -Galaktosidase Assay (2.16.3) und für die qualitative Plattentests verwendet. Für die Plattentests wurden je 2  $\mu$ l einer Flüssigkultur (LB-Kan(50)-Amp(100)) auf eine McConkey- und M63-Minimalmedium-Platte aufgetropft. Das Wachstum und die Färbung wurden dokumentiert.

### 2.16.3 Miller-Assay für 96-well Platten

Nach Thibodeau et al., 2004

#### **Z-Puffer:**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	16,1 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	5,5 g
KCl	0,75 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,246 g
$\beta$ -Mercaptoethanol (immer frisch zugeben)	2,7 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
pH 7,0 einstellen	
nicht autoklavieren	

#### **ONPG-Lösung:**

4 mg/ml in Z-Puffer (ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol), Lagerung bei -20°C

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

Die Zellen (je 3 Kolonien pro Plasmid-Kombination) wurden in 96-deep-well Platten angezogen: 1 ml LB-Medium je well mit Ampicillin (100  $\mu$ g/ml), Kanamycin (50  $\mu$ g/ml) und IPTG (0,5 mM) wurde mit einer Kolonie angeimpft, die Platte mit einem gaspermeablem Film verschlossen und bei 30°C auf dem Schüttler (90 rpm) inkubiert. Für die Zellen aus der stationären Wachstumsphase wurde die Platte über Nacht geschüttelt. Für die exponentielle Phase wurden die Kulturen nach ca.12h 1:100 in ein frisches Medium überimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 – 0,7 wachsen gelassen. Bevor der Aktivitätstest gestartet wurde, wurde die OD<sub>600</sub> gemessen. Dafür wurden je 40  $\mu$ l Kultur in 96-well Mikrotiterplatte mit 160  $\mu$ l 0.9% Saline überführt (1:5 Verdünnung). Als Leerwert wurden 200  $\mu$ l 0.9% Saline verwendet.

### **Permeabilisieren der Zellen in 96-well deep-well Platten:**

Für die Permeabilisierung der Zellen in 96-deep-well Platten wurde der Z-Puffer (mit  $\beta$ -Mercaptoethanol) mit 20  $\mu$ l 0,1% SDS vermischt und davon wurden 920  $\mu$ l in jedes Well vorgelegt. 100  $\mu$ l den 1:5 verdünnten Zellen wurden zugegeben und nach Zutropfen von je 20  $\mu$ l Toluol gut gemischt durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren. Die Platten wurden mit gaspermeablem Film verschlossen (Toluol muss verdampfen können) und bei 37°C für 30-40 Minuten geschüttelt.

### **Durchführen des $\beta$ -Gal-Tests:**

150  $\mu$ l der permeabilisierten Zellen wurden in jedes Well pipettiert (Kontrolle mit 150  $\mu$ l Z-Puffer). Bei hoher Aktivität wurden die permeabilisierte Zellen nochmals mit dem Z-Puffer (ohne SDS) verdünnt. Die Platte und die ONPG-Lösung wurden für mindestens 30 min. bei 28°C vorinkubiert (ansonsten ist die Temperatur in den einzelnen Wells nicht konstant). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30  $\mu$ l der ONPG-Substratlösung (Mehrkanalpipette) gestartet und die Messung erfolgte bei 420 nm. Die Zunahme der  $A_{420}$  wurde für 40 min verfolgt.

### **Berechnung der $\beta$ -Gal-Aktivität:**

Modifizierte Millergleichung nach (Thibodeau et al., 2004)

$(V \times 1000 \times CF1) / (A_{600} \times CF2 \times \text{rel. Vol. eingesetzter Zellen})$

V: Reaktionsgeschwindigkeit  $A_{420}/\text{min}$

CF1: Korrekturfaktor, wandelt  $A_{420}$ -Werte für den Reader in  $A_{420}$ -Werte für ein Standardphotometer um (Vermessen von ONPG-Lsg. verschiedener Konzentrationen im Reader und Photometer und Plotten der  $A_{420}$ -Werte gegeneinander, CF1 ist die Steigung dieses Plots)

CF2: Korrekturfaktor für  $OD_{600}$ , analog zu CF1

## **2.17 Promotor-Aktivitätsmessung**

Für die Messungen der Promotor-Aktivität wurde als Reporter das  $\beta$ -Galaktosidase Gen verwendet. Die putativen Promotorbereiche (300 bp upstream des untersuchten Gens (für die Primer siehe Tabelle 4)) wurden mit Restriktionsschnittstellen (NcoI/SpeI) flankiert und in den Vektor pBBR1MCS-3-*lacZ* (Fried et al., 2012) inkloniert. Die entstandenen Plasmide wurde über Konjugation (2.13.10) in den *R. eutropha* H16 Stamm übertragen. Die

## Material und Methoden

Bestimmung der Aktivität erfolgte über die Beobachtung der Farbentwicklung auf X-Gal-Platten bzw. quantitativ mit Hilfe von Miller-Assay wie bereits in 2.16.3 beschrieben. Für den Plattentest wurden 3 µl der Vorkultur auf die Platte aufgetropft und bei 30°C inkubiert. Für den Miller-Assay wurden die Zellen in zwei nacheinander folgenden Vorkulturen angezogen (2.4.2.1) und die Hauptkultur in einer 96 deep-well Platte angeimpft (900 µl Medium, 100 µl Zellen). Die Inkubation erfolgte bei 30°C auf einem Schüttler (90 rpm). Der Assay wurde in Abhängigkeit von dem verwendeten Medium nach 6h (NB-Medium) bzw. nach 12h inkubation in MM-Medium gestartet. Als MM-Medium wurde das Tris-Medium verwendet und 100 mM Na-P-Puffer (pH=7) wurde als Phosphat-Quelle in benötigte Konzentration dazugegeben. Als Positivkontrolle wurde ein konstitutiver Promotor  $P_{phaC1}$ , der bekanntlich eine starke Genexpression in *R. eutropha* H16 induziert, eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde ein promotorloses  $\beta$ -Galactosidase Gen verwendet.

### **NB-X-Gal-Tet-Platten:**

X-Gal (2% in DMF)                    2 ml

Tetracyclin (15 mg/ml)                1 ml

Die Komponenten wurden zu 1 l NB-Agar hinzugegeben, gemischt und in Platten gegossen.

### **Tris-Mineralmedium nach Mergeay et al., 1985 (modifiziert):**

Tris	6,06 g
NaCl	4,68 g
KCl	1,49 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,07 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,43 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g
Fe(NH <sub>4</sub> )Citrat	0,005 g
SL6, 10000-fach	30µl
pH 7,2 (HCl)	

Folgende Stammlösungen wurden getrennt angesetzt und autoklaviert.

MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1000-fach
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1000-fach
SL6	10000-fach
Fe(NH <sub>4</sub> )Citrat	1000-fach

Als C-Quelle wurde 0,2 % (w/v) NaGlukonat verwendet.

Feste Medien enthielten 1,5 % Agar (w/v).

## 2.18 Proteomanalyse

### Vorbereitung der Proben

*R. eutropha* H16 Stämme wurden in zwei aufeinanderfolgenden Vorkulturen angezogen. Die erste 20 ml NB Vorkultur in einem 100 ml Erlenmeyerkolben wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und 12h bei 30°C auf einem Schüttler (150 rpm) inkubiert. Die zweite 100 ml NBVorkultur in einem 1 l Erlenmeyerkolben wurde mit 10 ml VK1 beimpft und weitere 24h bei 30°C inkubiert. 40 ml der VK2 wurden benutzt, um 400ml Hauptkultur anzupflanzen. Natriumgluconat (0,2% (w/v)) wurde zugefügt, um die PHB Akkumulation zu fördern. Während der Kultivierung wurde die OD-Bestimmung durchgeführt und der PHB-Gehalt bestimmt. Für die Proteomanalyse wurden die Zellen zum Zeitpunkt 8 h (Übergangsphase, höchster PHB-Gehalt) geerntet. Für jeden Stamm wurden drei biologische Replikate angezogen.

### Zellaufschluss

Die Zellen wurden in 20 ml 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8 (je Aliquot Zellen ~3 g Feuchtmasse aus einem 400 ml Kolben) resuspendiert und 100 µl einer DNaseI-Lösung (1 mg/ml) sowie 100 µl RNaseA (1 mg/ml) zugeben. Der Aufschluss erfolgte durch zweimalige Passage durch eine vorgekühlte French Presse (Aminco, Silver Spring, Maryland, USA) bei einem Druck von 95 MPa (große Zelle).

### Granulaisolierung

Zelllysate wurde vorsichtig auf den 1. Glyceringradient gegeben. Die Ultrazentrifugation für nPHB aus *R. eutropha* wurde für 40 Minuten bei 20.000 rpm, 4°C (Beckman Avanti-35-Ultrazentrifuge, SW28-Rotor) durchgeführt. Beschleunigen und Abbremsen wurde auf „langsam“ eingestellt. Der Überstand wurde abgenommen und auf zwei UZ-Röhrchen (TFT65.13-Rotor) (je ~8 ml) für die Abtrennung der Membranen vom Rohextrakt verteilt.

Das Abnehmen der PHB-Bande erfolgte mit einer abgeschnittenen blauen Spitze. Von den isolierten Granula wurden 5 ml ca. 1:1 mit 10 mM Tris-HCl, pH 8 verdünnt und die insgesamt 10 ml zur Reinigung auf einen 2. Gradienten gegeben und erneut abzentrifugiert (40 Minuten bei 20.000 rpm, 4°C) (Beckman Avanti-35-Ultrazentrifuge, SW28-Rotor)).

Lagerung der gereinigten Granula erfolgte bei -20°C.

1. Gradient: 5 ml 87% Glycerin, vorsichtig überschichtet mit 10 ml 50% Glycerin.
2. Gradient: je 5 ml: 87%, 80%, 60% und 40% Glycerin.

### **Abtrennung von Granula-gebundenen Proteinen**

In zwei 1,5 ml Eppendorf-Cup wurden je 200 µl nPHB in Glycerin (mit abgeschnittener Spitze) überführt und mit 5 Vol (=je 1ml) 10 mM Tris-HCl Puffer, pH 8 verdünnt. Dann bei 12.000 rpm für 1-2 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 1 ml Puffer zugegeben, das PHB mit blauer Spitze resuspendiert und erneut 12.000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 4-mal wiederholt. Wenn höhere Proteinkonzentrationen benötigt wurden, wurde der erste Schritt (Zugabe von 200µl nPHB und 1ml Puffer) bis zu fünfmal wiederholt.

Anschließend zum Abtrennen Granula-gebundener Proteine wurden 100 µl 2 % SDS zugegeben, PHB suspendiert und bei 95°C für 10 min inkubiert. Danach bei 12.000 rpm für 1 min abzentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen (Granula-Extrakt), hiervon 60 µl mit 30 µl 3x Ladepuffer versetzt und bei -20°C mit dem Rest der Probe eingefroren.

### **Gewinnung von Rohextrakt und Membranfraktion**

Nach der Granulaisolierung wurde der Überstand eines SW28 Röhrchens auf je 2 UZ-Röhrchen verteilt (je max. ~7-8 ml) und dann 90 min, 35.000 rpm, 4°C, TFT65.13-Rotor zentrifugiert. Der Überstand (lösliches Protein, Rohextrakt) wurde möglichst vollständig abgenommen, ohne das Membranpellet zu zerstören. Vom löslichen Überstand wurden direkt 200 µl mit 100 µl 3x Ladepuffer versetzt (zur Stabilisierung) und bei -20°C mit dem Rest der Probe eingefroren.

### **Aufarbeitung der Membranen**

Nach der Ultrazentrifugation wurde das Rohextrakt (Überstand) abgenommen und zum Waschen des Membranpellets wurden 7 ml 10 mM Tris-HCl Puffer, pH 8 (eisgekühlt) zugegeben und das Membranpellet wurde in einem vorgekühltem Plümper (auf Eis) homogenisiert bzw. im Puffer suspendiert (ca. 15 mal auf und ab) und danach 90 min bei 35.000 rpm, TFT65.13-Rotor zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und Reste des Überstands mit einer gelber Spitze entfernt.

- **Abtrennung der peripheren Membranproteine (Carbonatextraktion)**

Zum Abtrennen peripherer Membranproteine wurden zu den gewaschenen Pellets jeweils 300 µl 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,5 (eisgekühlt) zugegeben und im UZ-Röhrchen mit einem

## Material und Methoden

Glasstab (auf Eis) homogenisiert (Volumen für Plümper zu klein). Der Ansatz wurde über Nacht auf Eis im Kühlraum in Eppis inkubiert und am nächsten Morgen wurden die Proben 90 min bei 35.000rpm und 4°C abzentrifugiert (TFT65.13-Rotor). Der Überstand (=Carbonatextrakt) wurde möglichst vollständig abgenommen und 100 µl direkt mit 50 µl 3x Ladepuffer versetzt und bei -20°C mit dem Rest der Probe eingefroren.

- **Extraktion integraler Membranproteine**

Der verbliebene Membranpellet wurde wiederum mit 7ml 10mM Tris-HCl Puffer, pH 8 (eisgekühlt) versetzt (je Pellet) und in vorgekühltem Plümper (auf Eis) homogenisiert bzw. im Puffer suspendiert (ca. 15-mal auf und ab). Danach wurde 90 min bei 35.000 rpm, TFT65.13-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zum Membranpellet wurden 300µl 2% SDS und 3µl 1M DTT (Endkonzentration 10 mM) zugegeben und Membranpellet mittels Glasstab zerkleinert/aufgelöst. Von den in SDS suspendierten bzw. gelöste Membranen wurden 100 µl mit 50 µl 3x Ladepuffer versetzt und bei -20°C mit dem Rest der Probe eingefroren.

### **Anfertigung von SDS Gelen zur nachfolgenden Proteomanalyse**

50 - 200 µg Protein der löslichen Extrakte wurden jeweils mit 3x SDS Ladepuffer vermischt, 3 min bei 95°C gekocht und zentrifugiert (14000 rpm, 1 min). Die Proben wurden auf ein 10%iges SDS Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 20mA pro Gel für ca. 55min (Rohextrakte, Membranproben) bzw. 35min (Carbonatextrakte, nPHB-Extrakte). Das Gel wurde über Nacht mit kolloidalem Coomassie (hergestellt nach (Candiano et al., 2004) gefärbt und am nächsten Tag mehrmals mit Wasser entfärbt.

### 3 Experimente und Ergebnisse

*R. eutropha* ist ein Modelorganismus für die Erforschung des Poly(3-hydroxybuttersäure) (PHB)-Stoffwechsels in Bakterien. Der Forschungsschwerpunkt dieser Arbeit ist die Untersuchung der Abbaumechanismen dieses Biopolymers. Die Aufklärung der Vorgänge des Abbaus von PHB wird durch die komplexe Struktur des PHB-Granulums, an dessen Oberfläche sich eine Reihe von Proteinen befinden (PHB granule-associated proteins (PGAPs)), erschwert. Viele dieser Proteine wurden in den letzten Jahrzehnten entdeckt und erforscht (Steinbüchel et al., 1995; Pötter et al., 2004; Jendrossek, 2009). Trotzdem ist es nicht ausgeschlossen, dass die Liste der PGAPs noch nicht vollständig ist, und neue Mitspieler warten entdeckt zu werden. Zusätzlich wird die Anwesenheit von Phospholipiden auf der Granulooberfläche in der Literatur kontrovers diskutiert.

Um den Prozess des Abbaus besser zu verstehen, ist es notwendig die PGAPs zu kennen und deren Interaktionen untereinander und mit anderen Proteinen herauszuarbeiten. Zu diesem Zweck wurden Two-Hybrid Versuche durchgeführt um neue Interaktionspartner der bekannten PGAPs zu identifizieren. Ein so ermittelter potentieller Interaktionspartner ist Gegenstand dieser Arbeit und wird in dem ersten Kapitel behandelt. Ein zweiter Ansatz zur Erweiterung des Verständnisses der Abbaumechanismen von PHB ist die Untersuchung putativer PHB Depolymerasen, welche anhand von Aminosäuresequenzähnlichkeiten der Familie der PHB Abbauenden Enzyme zugeteilt worden sind. In dieser Arbeit werden die putativen PHB Depolymerase PhaZd1 und PhaZd2 ausführlich untersucht. Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung neuer PGAPs durch die Analyse des PHB Proteoms.

#### 3.1 A2274, ein Interaktionspartner der PhaZa1 Depolymerase

Eine Möglichkeit den Vorgang der Mobilisierung von PHB besser verstehen zu können ist die Suche nach Interaktionspartnern der bekannten PHB Depolymerasen. Zu diesem Zweck wurde eine genomische Bibliothek von *R. eutropha* H16 in einem Two-Hybrid Experiment auf Interaktionen mit unterschiedlichen Köder-Genen aus dem PHB-Stoffwechsel gescreent. Die Köderproteine wurden hierbei als Fusion an die Adenylatzyklaseuntereinheit T25 und die Genbank als Fusion mit der T18 Domäne exprimiert (Karimova et al., 1998; Pfeiffer und Jendrossek, 2011; Pfeiffer et al., 2011).

Wenn die PHB Depolymerase PhaZa1 als Köder verwendet wurde, wurde zweimal das gleiche Peptid als „Treffer“ (Beute) gefunden. Interessanterweise konnte das gleiche Peptid

## Experimente und Ergebnisse

mit zwei anderen Köder-Genen, nämlich mit den Phasinen PhaP2 und PhaP3, ebenfalls gefunden werden. Entsprechend interagierten drei verschiedene Köder-Proteine aus dem PHB Metabolismus mit den Fragmenten eines gleichen Proteins. Das Protein wurde als H16\_A2274 identifiziert und wird in der KEEG-Datenbank als hypothetisches Protein mit einer vorhergesagten Funktion im Phosphatstoffwechsel annotiert (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Identifizierung neuer Interaktionspartner der Proteine PhaZa1, PhaP2 und PhaP3 mittels einer Genbank**

Anzahl	Treffer (pBlast)	Locus_tag	Köder	Länge Insert [AS]	Länge Sequenz [AS]
2	Phosphate transport regulator	H16_A2274	PhaZa1	79 to 167	208
2	Putative silver efflux P-type ATPase	H16_A1986	PhaZa1	667 to 766	766
2	Glutamyl-tRNA synthetase	H16_A2403	PhaZa1	3 to 255, 334 to 466	466
2	Phasin PhaP5	H16_B1934	PhaZa1	30 to 142	142
1	NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	H16_A0336	PhaZa1	262 to 338	338
1	Amidophosphoribosyltransferase	H16_A0339	PhaZa1	2 to 72	285
1	Type IV pilus transmembrane protein PilJ	H16_A0739	PhaZa1	557 to 679	737
1	Endonuclease III protein	H16_A1147	PhaZa1	159 to 214	214
1	M23B family peptidase	H16_A1170	PhaZa1	89 to 236	236
1	Short chain dehydrogenase	H16_A2152	PhaZa1	1 to 218	304
1	Small-conductance mechano-sensitive channel	H16_A3040	PhaZa1	443 to 468	468
1	Intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase PhaZa5	H16_B1014	PhaZa1	4 to 62	407
1	Hypothetical protein	H16_B1405	PhaZa1	22 to 90	159
1	Glutamine synthetase	H16_B2191	PhaZa1	162 to 313	464
1	Heme d1 biosynthesis protein (NirG)	H16_B2281	PhaZa1	30 to 154	154
26	Phasin PhaP5	H16_B1934	PhaP2	30 to 142, 1 to 110, 1 to 142	142
7	Methyl-accepting chemotaxis transducer	H16_B2044	PhaP2	435 to 551	551
4	Phosphate transport regulator	H16_A2274	PhaP2	79 to 176, 97 to 208	208
3	Methyl-accepting chemotaxis protein	H16_B0232	PhaP2	394 to 549, 382 to 549	549
2	Predicted GTPase	H16_A0378	PhaP2	495 to 606	650
2	Putative membrane protein of unknown function	H16_A3517	PhaP2	164 to 284	705
1	Hypothetical membrane associated protein	H16_A0141	PhaP2	26 to 262	263
1	Acyl-CoA dehydrogenase	H16_A1530	PhaP2	480 to 620	620
1	Transcriptional regulator, LysR-family	H16_B0535	PhaP2	70 to 250	296
1	Acyl-CoA dehydrogenase	H16_B0703	PhaP2	5 to 199	332
1	Transcriptional regulator, LysR-family	H16_B1446	PhaP2	91 to 295	295
1	Transcriptional regulator	H16_B1787	PhaP2	1 to 147	339
1	Conserved hypothetical protein (Paal_thioesterase)	H16_B1907	PhaP2	2 to 139	139
2	Phosphate transport regulator	H16_A2274	PhaP3	79 to 136	208
1	Transcriptional regulator, NNR like	H16_A1838	PhaP3	39 to 225	225
1	Hypothetical protein H16_A2605	H16_A2605	PhaP3	29 to 76	94
1	AcrB7a; cation/multidrug efflux pump	H16_A3716	PhaP3	1010 to 1065	1065
1	Phasin PhaP2	PHG202	PhaP3	1 to 188	188

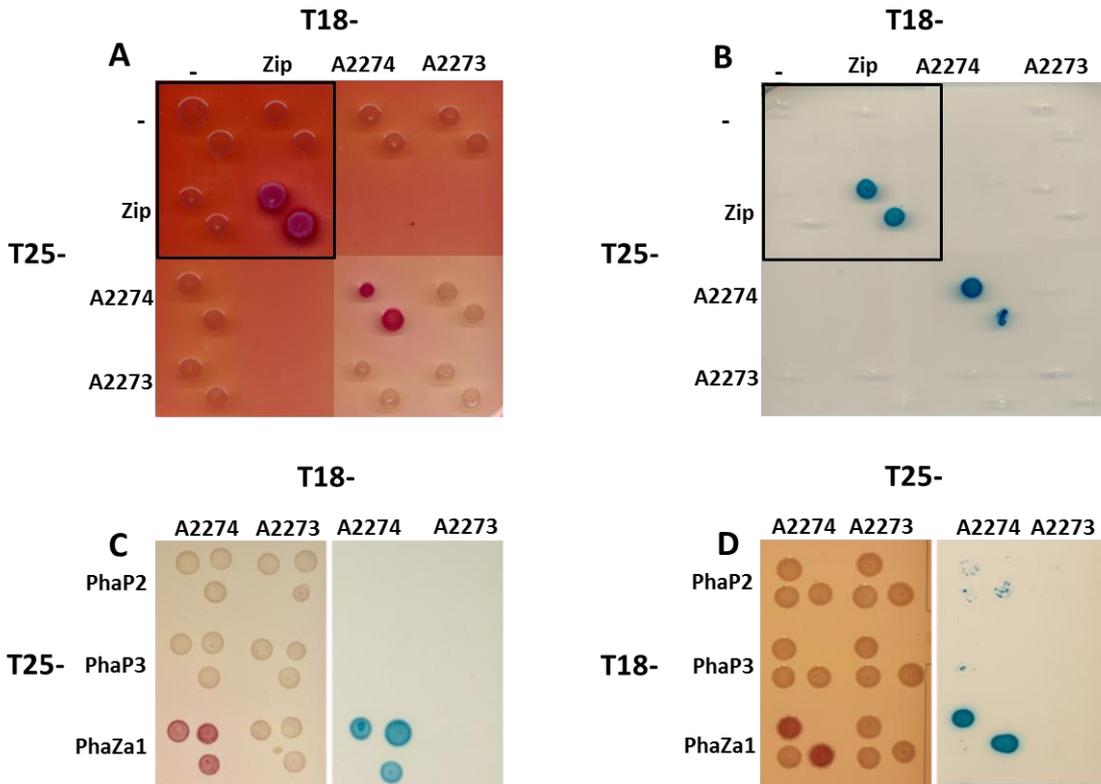
Zusätzlich wurden für die PhaZa1 Depolymerase und die Phasine PhaP2 und PhaP3 Treffer aus der PHB Familie detektiert. Für die PhaZa1 wurde eine Interaktion mit eine putative PHB Depolymerase PhaZa5 und einem Phasin PhaP5 identifiziert. Für PhaP2 war der häufigste Treffer PhaP5 (26 von 51 Treffern). PhaP3 interagierte mit PhaP2. Wie bereits in Pfeiffer und Jendrossek, 2011 diskutiert, sind Phasine in der Lage Homooligomere aber auch Heterooligomere auszubilden. Dieses Ergebnis ist im Zusammenhang mit den netzwerkartigen Strukturen auf der Oberfläche der PHB-Granula interessant (Dennis et al., 2008).

### 3.1.1 Two-Hybrid-Analyse von A2273 und A2274

#### 3.1.1.1 Indikatorplatten

Als nächstes wurden die Wechselwirkungen zwischen dem neuen Genprodukt und den Köder-Proteinen aus dem PHB-Stoffwechsel (PhaZa1, PhaP2 und PhaP3) weiter untersucht. Die Gene wurden vollständig (vom Start- bis Stopp-Codon) in die pKT25 und pUC18C Plasmide inkloniert, in den Adenylatzyklase-defizienten Reporterstamm *E. coli* BTH101 kotransformiert und die Stämme auf entsprechenden Indikatorplatten aufgetropft (Abbildung 3). Zusätzlich wurde auf eine Interaktion mit dem Protein A2273 getestet. Das untersuchte Gen *a2274* liegt augenscheinlich in einem Operon mit *a2273*, einem putativen Phosphattransportergen (*pitA*).

Wenn *a2274* in beide Plasmide inkloniert wurde, entwickelten die Kolonien eine blaue Farbe auf X-Gal Platten und eine rote Farbe auf McConkey Platten (2.16.2). Dies zeigt eine „Eigeninteraktion“ (Abbildung 3 A, B). Die jeweiligen Genprodukte sind in der Lage, *in vivo* Homo-Oligomere zu bilden. Für die anderen Kombinationen (PhaZa1 mit A2274, PhaP2 mit A2274 und PhaP3 mit A2274) ergab lediglich die PHB Depolymerase ein eindeutig positives Ergebnis: Die Farbentwicklung war positiv in beiden Plasmid-Kombinationen, sowohl auf X-Gal Platten als auch auf McConkey Platten (Abbildung 3 B, C). Für PitA konnte keine „Eigeninteraktion“ und keine Interaktion mit A2274 beobachtet werden. Für das Phasin PhaP2 war das Ergebnis nur in einer der Kombinationen auf einer X-Gal Platte als schwach positiv zu erkennen, wenn A2274 an die Adenylatzyklaseuntereinheit T25 fusioniert war und PhaP2 als Fusion mit der T18 Domäne exprimiert wurde (Abbildung 3 D). Auf der McConkey Platten war das Ergebnis für beide Kombinationen negativ (Abbildung 3 C, D). Im Falle von PhaP3 waren alle Plattentest negativ. Zusammenfassend konnte mit Hilfe der Indikatorplatten, lediglich die Interaktion von A2274 mit der PhaZa1 Depolymerase bestätigt werden.



**Abbildung 3: Two – Hybrid - Analyse von A2273 und A2274 mit den Proteinen aus dem PHB Stoffwechsel.**

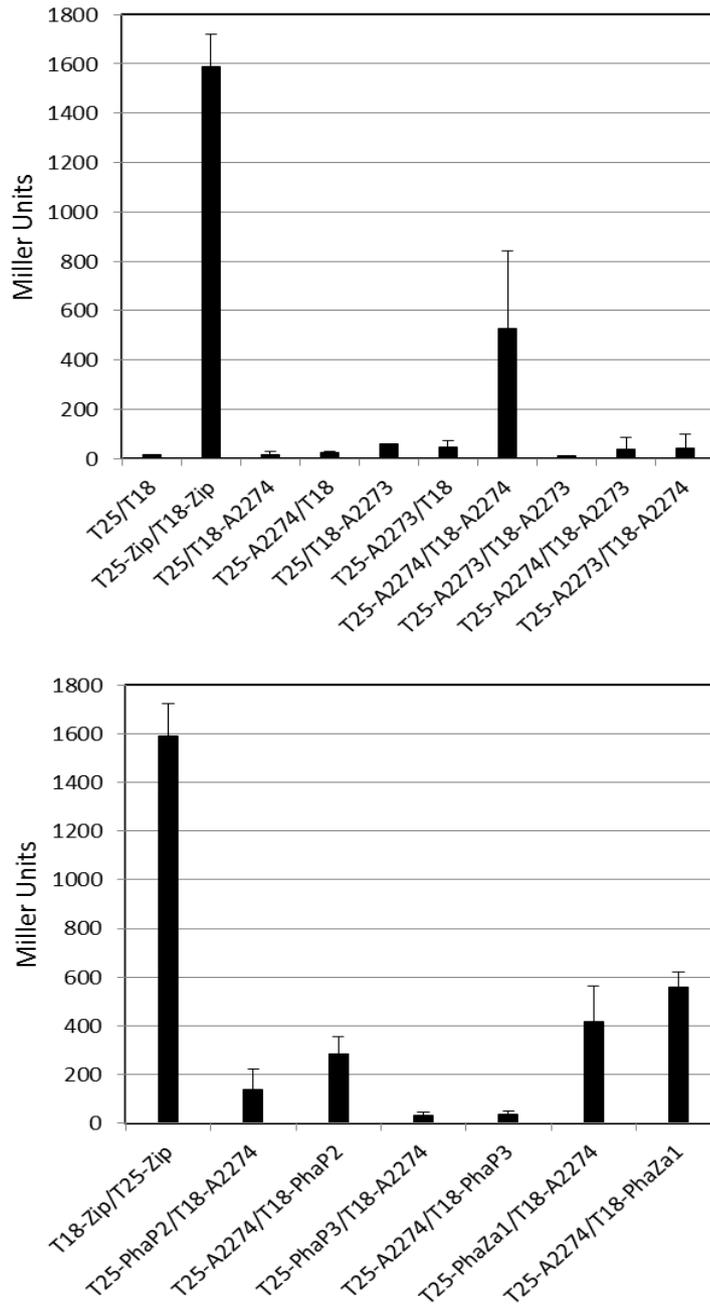
Die Kcotransformanten von *E. coli* BTH101 mit den jeweiligen T18- und T25-Fusionen, wurden auf MacConkey-Agar (A, C links, D links) oder M63-Maltose-Mineralsalz-X-Gal Agar (B, C rechts, D rechts) getropft. Die Platten wurden für 1,5 Tage bei 30°C inkubiert. Die positive (Zip, Zip) und negative (-,-) Kontrolle befinden sich in der Abbildung A, B innerhalb des schwarzen Quadrats. A2274 zeigt eine „Eigeninteraktion“ (A, B) und interagiert mit PhaZa1 (C, D): Farbentwicklung sowohl auf X-Gal Platten als auch auf McConkey Platten. Für das Phasin PhaP2 war das Ergebnis nur in einer der Kombinationen auf X-Gal Platte schwach positiv (D). Für PhaP3 und A2273 waren alle Plattentests negativ.

-, Leervektor. Zip, Leucin-Zipper.

### 3.1.1.2 Bestimmung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität

Die Ergebnisse der Plattentests wurden durch quantitative Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten nach dem Wachstum der entsprechenden *E. coli*-Klone bestätigt: Die höchsten Werte wurden für die Homo-Oligomerisierung ( $529 \pm 315$  MU) von A2274 und für die Interaktion von A2274 mit PhaZa1 ( $418 \pm 143$  bzw.  $561 \pm 60$  MU) erhalten. Die Interaktion von A2274 mit Phasin PhaP2 war deutlich niedriger ( $137 \pm 86$  bzw.  $285 \pm 72$  MU), aber immer noch über dem Hintergrund-Signal (ca. 20 MU). Die Interaktion von A2274 mit PhaP3 war jedoch nur etwas über dem Hintergrund-Signal (35 MU) und konnte somit *in vivo* nicht bestätigt werden (Abbildung 4).

## Experimente und Ergebnisse



**Abbildung 4:  $\beta$ -Galaktosidase Assay für den Nachweis der Interaktionen aus der Two-Hybrid Analyse.**

Die Kotretransformanten von *E. coli* BTH101 mit den jeweiligen T18- und T25-Fusionen, wurden in 96-deep-well Platten kultiviert (30°C für 16h), permeabilisiert (SDS/Toluol Behandlung) und die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität mit dem Substrat ONPG gemessen.

Die höchsten Werte wurden für die Homo-Oligomerisierung von A2274 (**A**) und für die Interaktion von A2274 mit PhaZa1 (**B**) erhalten. Die Interaktion von A2274 mit Phasin PhaP2 war deutlich niedriger als bei PhaZa1 und die mit PhaP3 konnte nicht bestätigt werden (**B**).

Die Werte sind Mittelwerte aus biologischen Triplikaten. Fehlerbalken zeigen Standard Abweichungen.

Zip, Leucin-Zipper.

### 3.1.1.3 Durchmusterung der Genbank von *R. eutropha* mit A2273 und A2274

Weiterhin wurde eine Two-Hybrid Genbank von *R. eutropha* H16 mit A2274 und PitA durchmustert. Im Fall von A2274 war es erwünscht die Interaktionspartner PhaZa1 und PhaP2 bzw. PhaP3 wiederzufinden und möglicherweise zusätzlich neue Interaktionen zu identifizieren, die Hinweise auf die Funktion von A2274 liefern würden. Aus 68 Klonen enthielten 55 ein Gen in einem falschen Leserahmen. Keine der bereits identifizierten Interaktionen (mit PhaZa1, PhaP2 bzw. PhaP3) wurden wieder gefunden. Die Treffer aus der Genbank ergaben keinen Aufschluss über die mögliche Funktion von A2274. Es wurden keine Interaktionen mit Proteinen aus dem Phosphat- bzw. PHB-Stoffwechsels gefunden. Die Liste der erhaltenden Treffer ist in Tabelle 9 zu sehen. Für PitA wurde als häufigster Treffer ein für ein *major facilitator superfamily transporter* (MFS) kodierendes Gen (H16\_A1733) identifiziert (in 10 von 21 Klonen). In wie weit die zwei Transporter miteinander gekoppelt sind, bleibt unbeantwortet.

**Tabelle 9: Identifizierung neuer Interaktionspartner der Proteine A2273 (PitA) und A2274 mittels einer Genbank.**

Anzahl	Beutekonstrukt	Treffer nBlast (Insert)	locus_tag	Länge Insert	Länge Sequenz AA
1	pKT25- <i>a2274</i>	transcriptional regulator, Fur-family	H16_A0196	71-178	178
1	pKT25- <i>a2274</i>	transcriptional regulator, LysR-family	H16_A0470	93-327	327
1	pKT25- <i>a2274</i>	guanylate kinase	H16_A0953	1-143	220
1	pKT25- <i>a2274</i>	adenosine deaminase	H16_A1014	67-351	351
1	pKT25- <i>a2274</i>	conserved hypothetical protein	H16_A1140	60-143	143
1	pKT25- <i>a2274</i>	ABC-type transporter, ATPase component	H16_A1174	1-178	178
1	pKT25- <i>a2274</i>	signal transduction histidine kinase	H16_A1428	189-432	451
1	pKT25- <i>a2274</i>	hypothetical membrane protein	H16_A1441	16-96	96
1	pKT25- <i>a2274</i>	transcriptional regulator, AraC-family	H16_A1803	216-318	318
1	pKT25- <i>a2274</i>	conserved hypothetical protein	H16_A3722	1-140	140
1	pKT25- <i>a2274</i>	2-Isopropylmalate synthase	H16_B0081	440-565	565
1	pKT25- <i>a2274</i>	Hypothetical protein	H16_B1175	1 bis 49	49
1	pKT25- <i>a2274</i>	hypothetical membrane associated protein	H16_B1246	42-116	116
1	pKT25- <i>pitA</i>	hypothetical protein H16_A1095	H16_A1095	46 to 117	129
10	pKT25- <i>pitA</i>	MFS transporter, ACS family	H16_A1733	195-368, 181-385, 211-426, 214-426, 211-408, 211-406	426
1	pKT25- <i>pitA</i>	multidrug efflux membrane fusion protein [Ralstonia eutropha H16]	H16_A2297	25 to 157	418
1	pKT25- <i>pitA</i>	conserved hypothetical protein	H16_A2713	303 to 331	331
1	pKT25- <i>pitA</i>	aerobic-type carbon monoxide dehydrogenase subunits S and G	H16_B0817	331 to 389	389
1	pKT25- <i>pitA</i>	nitric oxide reductase [Ralstonia eutropha H16]	PHG244	4 to 158	762

Zusammenfassend haben die durchgeführten Two-Hybrid Analysen folgende Erkenntnisse geliefert. Zum ersten Mal wurde eine Protein-Protein Interaktion *in vivo*, zwischen einem Enzym aus dem PHB Stoffwechsel und einem Protein mit einer putativen Funktion im Phosphattransport, gezeigt. Eine PHB-Depolymerase PhaZa1, die für den Abbau des PHB Polymers in *R. eutropha* H16 verantwortlich ist, hat mit einem putativen

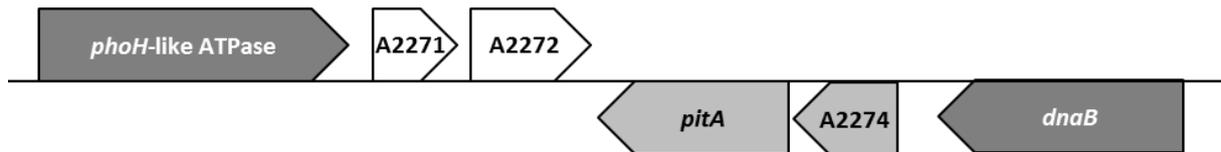
Phosphattransportregulator A2274 in einem Two-Hybrid Versuch interagiert. In weiteren Experimenten sollte die Funktion des neuen Interaktionspartners untersucht werden und dadurch Hinweise auf die Verknüpfung der beiden Stoffwechselwege gewonnen werden.

### 3.1.2 Analyse der Aminosäuresequenz von A2273 und A2274

Schaut man sich die Aminosäuresequenz von A2274 und die Lokalisierung des Gens auf dem Chromosom genauer an, fallen folgende Punkte auf, die an die Beteiligung des Gens am Phosphatmetabolismus hindeuten. Zu einem ist es die PhoU-Domäne die charakteristisch für regulatorische Proteine aus dem Phosphataufnahmesystem ist. Zum anderem die unmittelbare Nachbarschaft zu einem putativen Phosphat Transporter.

Eine Blastp-Analyse von A2274 ergab für die ersten 30 Treffer (mit einer Identität von mindestens 60%) Proteine aus Betaproteobakterien wie: *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Herbaspirillum*, *Collimonas*, *Oxalobacteraceae*, *Janthinobacterium*, *Hermiimonas*, *Oxalobacter*, *Dechlorosoma*, *Variovorax*. Auch in anderen Proteobakterien wie *Rizobium melioli* wurde ein *a2274* ähnliches Gen gefunden (Bardin et al., 1998).

Charakteristisch für alle gefundenen „*a2274*-like“ Gene ist die konservierte Position eines „*pitA*-like“ Gens stromaufwärts von *a2274*, was auf eine funktionelle Verwandtschaft dieser Gene hindeutet. Dies ist nicht nur auf Proteobakterien beschränkt. Auch in Gram-positiven wie z.B. *Bacillus megaterium* (hier allerdings nur 33% Sequenzidentität) liegen beide Gene nebeneinander. Im Gegensatz dazu, wenn in Organismen gesucht wurde, die nicht in der Lage sind, PHB zu synthetisieren, wie *E. coli* oder *Corynebacterium*, wurde kein *a2274* ähnliches Gen gefunden. Eine GenBank- Suche zeigte, dass das aus 335-Aminosäuren bestehende *R. eutropha* H16 Pit-Protein Ähnlichkeiten zu einer großen Familie von prokaryotischen und eukaryotischen Phosphat-Transport-Proteinen zeigt. Vor allem zu einem niedrig affinen Pit Phosphat-Transport-Protein aus *E. coli*. Zusätzlich zu der Homologie mit Pi Transportproteinen, hat die Analyse mit dem TopPred II-Programm (Claros und Heijne, 1994) acht "gewisse" Membran-Domänen identifiziert, was die Funktion als Transporter untermauert. Das A2274-Genprodukt besitzt keine vorhergesagten Membran-Domänen.



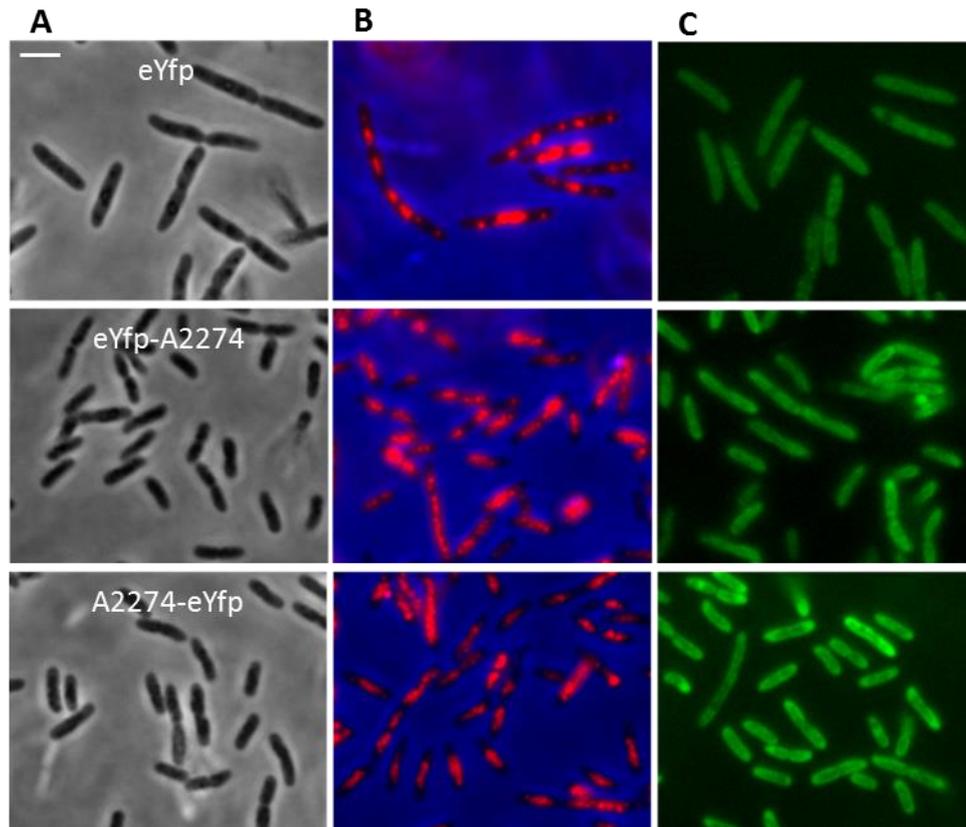
**Abbildung 5: Genomischer Kontext von A2273 und A2274 in *R. eutropha* H16.**

Ein Ausschnitt aus dem annotierten Genom von *R. eutropha* H16. Das Gen *a2274* befindet sich in einem putativen Operon auf Chromosom 1 mit dem *pitA* Gen, einem Phosphattransporter. A2271, A2272, sind hypothetische Proteine.

### 3.1.3 Lokalisierung von A2274

#### 3.1.3.1 *In vivo*-Lokalisierung von A2274 als Fusion mit eYfp (enhanced Yellow Fluorescent Protein)

Der nächste Schritt bei der Untersuchung von A2274 war die Lokalisierung des Proteins mit Hilfe eines Fluoreszenz-Tags (eYfp). Das Gen *a2274*, wurde aus der genomischen DNA mittels PCR amplifiziert. Das Insert wurde *in frame* mit dem *eyfp*-Gen in pBBR1MCS2- $P_{phaC}$ -eYfp-C1 und in das pBBR1MCS2- $P_{phaC}$ -eYfp-N1 Plasmid inkloniert. Alle Konstrukte wurden mittels Konjugation aus rekombinantem *E. coli* S17-1 in *R. eutropha* H16 übertragen. Die intrazelluläre, räumliche Verteilung dieser Konstrukte wurde nach konstitutiver Expression unter Kontrolle eines konstitutiven  $P_{phaC1}$  Promotors untersucht. Die Expression von eYfp führt als Kontrolle zu Fluoreszenz in der gesamten Zelle. Die intrazelluläre Lokalisierung von der A2274-eYfp und eYfp-A2274 Fusion ergab, dass die Fusionsproteine homogen im Zytoplasma verteilt waren, ähnlich dem freiem eYfp (Abbildung 6). Dies gilt sowohl für C- als auch für N-Terminale Fusion.



**Abbildung 6: Lokalisierung der A2274-eYfp und eYfp-A2274 Fusionen in *R. eutropha* H16.**

Proteinfusionen von eYFP mit A2274 (N- und C-terminal) wurden nach 6h Wachstum in NB-Medium mit 0,2% (w/v) NaGlukonat mikroskopisch untersucht. Die Zellen wurden mit Phasenkontrast (A), fluoreszenzmikroskopisch nach einer Nilrotfärbung mit einem Nilrot-Filter (B) und mit einem eYfp-Filter (C) betrachtet. Das freie eYfp sowie die Fusionsproteine sind homogen im Zytoplasma verteilt. Bilder wurden mit einer Schwarz-Weiss-Kamera (CoolSnapCF, Photometrics, Tucson, USA) aufgenommen und mit Hilfe der Software MacBiophotonics ImageJ bearbeitet. Der Maßstab entspricht 2µm.

### 3.1.3.2 Lokalisierung mit Hilfe der Proteomanalyse

Die Lokalisierungsergebnisse, die mit den eYfp Fusionen erzielt wurden, waren nicht vollständig zufriedenstellend. Bei einem Regulator eines Phosphattransporters, der in einem Two-Hybrid Versuch mit PHB gebundenen Proteinen und einigen vermutlich Membran- bzw. Membran assoziierten Proteinen interagiert hat, würde man erwarten, dass das Fluoreszenzsignal an der Membran bzw. PHB verstärkt auftreten würde. In einem anderen Ansatz wurden die *R. eutropha* Wildtyp Zellen in vier Fraktionen aufgeteilt, und daraufhin mit LC-ESI-MS/MS analysiert. Insgesamt wurden 1756, 889, 439 und 268 Proteine in der löslichen-, Membran-, membranassoziierten- und PHB-Granula Fraktion gefunden. A2274 befand sich vorwiegend in der membranassoziierten Fraktion (ca. 50% der Peptide) aber auch

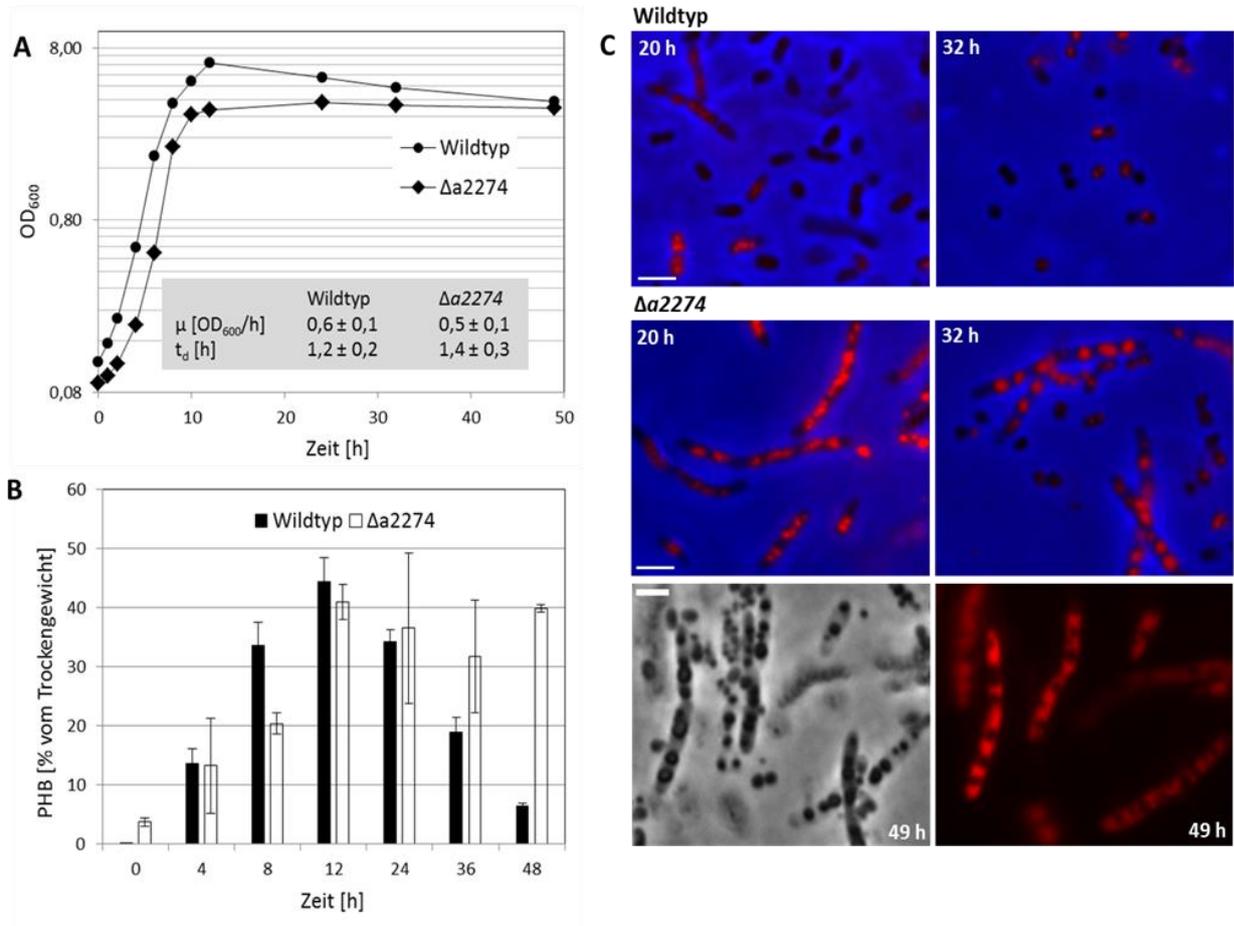
in der Membran- und löslichen Fraktion (Tabelle 16). Die übrigen Proteomdaten werden in Kapitel 3.3 im Detail erläutert. Abschließend kann man bezüglich der Lokalisierung von A2274 spekulieren, dass das Protein als Regulator mit der Membran oder einem Membranprotein interagiert und sich deshalb vorwiegend in der membranassoziierten Fraktion befindet.

### **3.1.4 Deletionsanalyse von *a2274***

#### **3.1.4.1 Einzelmutante $\Delta a2274$**

Für die weitere Untersuchung des neuen Proteins, vor allem um die Beteiligung von A2274 am PHB Stoffwechsel zu erforschen, wurde eine Deletionsmutante  $\Delta a2274$  hergestellt und die Speicherung von PHB in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Diese Versuche wurden in NB-Medium mit 0,2% (w/v) NaGlukonat (zur Erhöhung der PHB-Speicherung) durchgeführt. Beide Stämme zeigten ein ähnliches Wachstum (Verdopplungszeiten von 1,6h bzw. 1,9h für den Wildtyp und  $\Delta a2274$  Mutante) (Abbildung 7 A). Ebenfalls speicherten beide Stämme PHB-Granula während der exponentiellen Wachstumsphase. Dieser Vorgang wurde nach Anfärben der Granula mit dem Farbstoff Nilrot fluoreszenzmikroskopisch untersucht und über die quantitative Messung des PHB Gehaltes mittels Gaschromatographie charakterisiert. Es konnten keine Unterschiede während der exponentiellen Wachstumsphase festgestellt werden. Sowohl beim Wildtyp als auch in der  $\Delta a2274$  Mutante ist der PHB-Gehalt von 1% bzw. 3% der Zelltrockenmasse bis zu einem Zeitpunkt von 12 h kontinuierlich bis auf einen maximalen Wert von 44% bzw. 41% PHB angestiegen. Im Gegensatz dazu konnte beim Abbau des Polymers bei der Mutante ein deutlicher Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden. Während beim Wildtyp der PHB-Gehalt in der stationären Phase stetig absank und nach 48 h nur noch 3 % betrug, hat der PHB Gehalt bei der Mutante nicht abgenommen und blieb bei ca. 40 % (Abbildung 7 B, C).

## Experimente und Ergebnisse



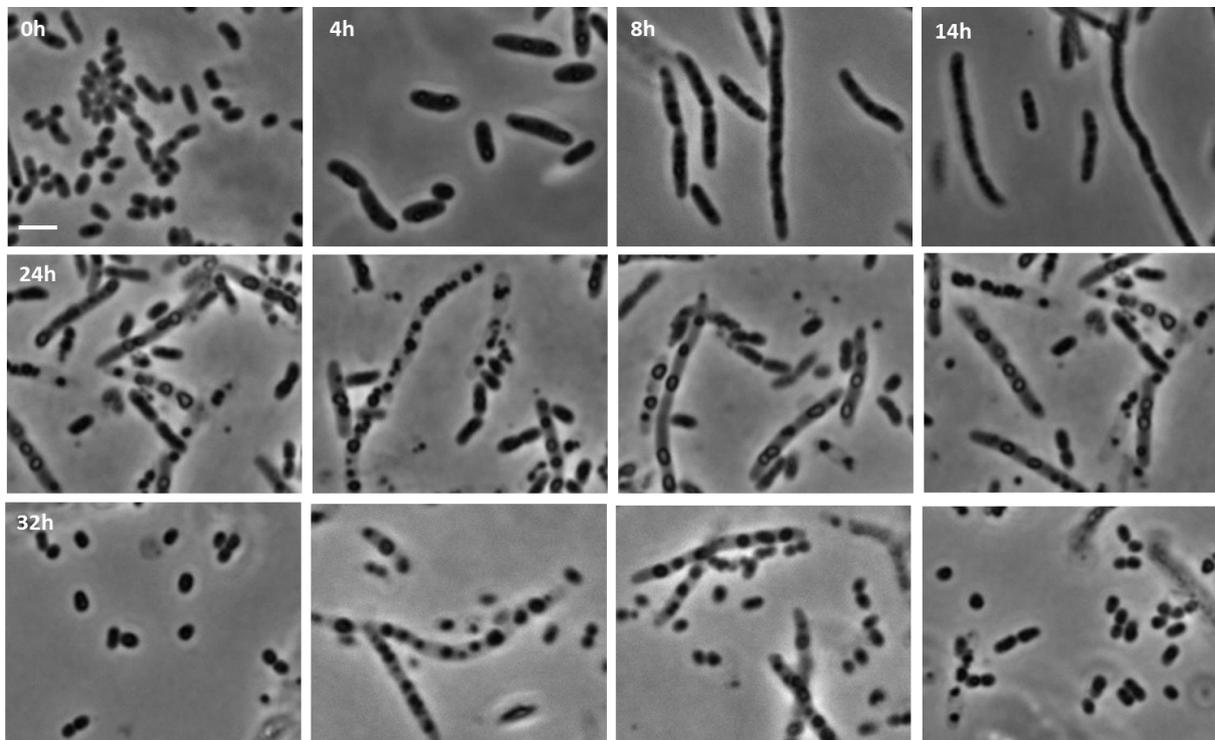
### Abbildung 7: Phänotyp der $\Delta a2274$ Mutante

Wachstum und PHB Gehalt in den Stämmen *R. eutropha* H16 Wildtyp und  $\Delta a2274$  Mutante, wurden in NB-Medium mit 0,2% (w/v) NaGlukonat untersucht. Beide Stämme zeigen ein ähnliches Wachstum (A) und speichern PHB-Granula während der exponentiellen Wachstumsphase (B). Während der Abbauphase (stationären Phase) sinkt der PHB Gehalt bei dem Wildtyp auf 3 %, der PHB Gehalt bei der Mutante dagegen bleibt bei ca. 40 % (B). Mikroskopische Untersuchung beider Stämme nach 20h und 32h Wachstum in NB-Medium mit 0,2% NaGlukonat (C). Die mit Nilrot angefärbten Zellen wurden mit einem Nilrot-Filter betrachtet, auffällig sind die ungewöhnlich langen Zellen mit hoher Anzahl von PHB-Granula bei der Mutante (C, mittleres Bild). Propidiumiodid angefärbte  $\Delta a2274$  Zellen wurden in Phasenkontrast (C, unten rechts) und ebenfalls mit einem Nilrot-Filter (C, unten links) dargestellt, bei den roten Zellen handelt es sich um Zellen die kein Membranpotential besitzen und nicht mehr lebensfähig sind.

Die Werte für die Wachstumsrate, Verdopplungszeit und PHB Gehalt sind Mittelwerte aus biologischen Triplikaten. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen. Bilder wurden mit einer Schwarz-Weiss-Kamera (CoolSnapCF, Photometrics, Tucson, USA) aufgenommen und mit Hilfe der Software MacBiophotonics ImageJ bearbeitet. Der Maßstab entspricht 2  $\mu m$ .

Zusätzlich wurde beobachtet, dass Zellen sehr lang wurden, lysierten und PHB ins Medium freisetzen. Ab 12h konnten bei der Mutante immer häufiger „Geisterzellen“ beobachtet werden (ca. 10% der Gesamtzellen). Diese Zellen erscheinen im Phasenkontrast sehr hell, fast durchsichtig und wie nach einer Propidiumiodidfärbung festgestellt wurde handelt es sich hier um Zellen, die kein Membranpotential besitzen und daher nicht mehr lebensfähig sind. Insbesondere sind das die ungewöhnlich langen Zellen mit hoher Anzahl von PHB-Granula.

Nichtsdestotrotz blieb ein Anteil der Zellen überlebensfähig und konnte wie der Wildtyp PHB abbauen und in die kokkoide Form zurückkehren (Abbildung 7 C, Abbildung 8).



**Abbildung 8: Zellmorphologie der  $\Delta a2274$  Mutante während des Wachstums in NB-Medium mit 0,2% NaGlukonat.**

Zellen von  $\Delta a2274$  wurden nach 0h, 4h, 8h, 14h (Oben), 24h (mittlere Reihe) und 32h (untere Reihe) in Phasenkontrast aufgenommen. Ab 24 h wurden bei der Mutante immer häufiger „Geister Zellen“ beobachtet. Diese Zellen erschienen hell, fast durchsichtig und waren ungewöhnlich lang. Diese Zellen hatten eine hohe Anzahl an PHB-Granula. Zusätzlich wurden Zellen beobachtet, die in die kokkoide Form zurückkehrten.

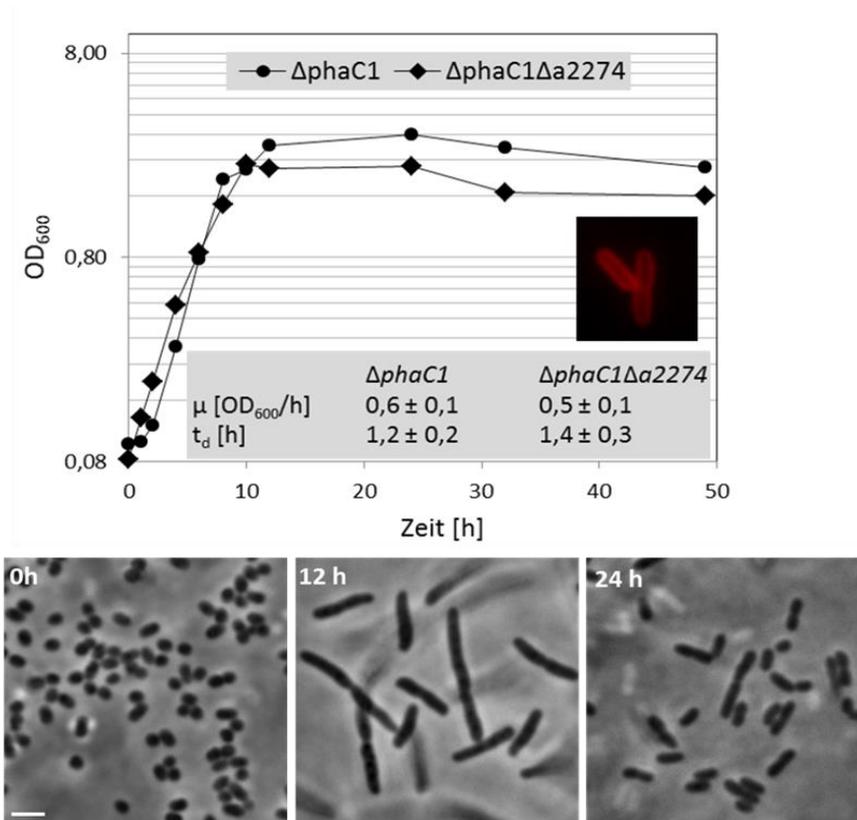
Der Maßstab entspricht 2 $\mu$ m.

### 3.1.4.2 Doppelmutante: $\Delta phaC1\Delta a2274$

Um herauszufinden, in wie weit der beobachtete Phänotyp der  $\Delta a2274$  mit der PHB Speicherung verknüpft ist, wurde eine  $\Delta phaC1\Delta a2274$  Doppelmutante hergestellt und während des Wachstums in NB-Medium + 0,2% (w/v) NaGlukonat im Vergleich zu Wildtyp,  $\Delta a2274$  und  $\Delta phaC1$  untersucht. Dieser Stamm ist durch Deletion des PHB Synthasegens (*phaC1*) nicht mehr in der Lage PHB zu speichern. Die Frage, die sich nun stellte war, ob die Speicherung der PHB Granula bei inhibiertem Abbau für diesen Phänotyp verantwortlich ist. Alternativ wäre es möglich, dass die Veränderung der Zellmorphologie nur mit der Deletion von *a2274* verknüpft ist. Im Vordergrund der Untersuchung lagen der Vergleich des Wachstums sowie die mikroskopischen Beobachtungen der Zellmorphologie und der Zellviabilität. Das Ergebnis war eindeutig. Waren die Zellen des  $\Delta phaC1\Delta a2274$  -Stammes

## Experimente und Ergebnisse

nicht mehr in der Lage PHB zu speichern, konnten keine Unterschiede im Wachstum, keine Veränderungen in der Zellmorphologie und keine Zelllyse wie in dem  $\Delta a2274$ -Stamm, welcher PHB speichern konnte, festgestellt werden. Nach 24h konnte keine Anhäufung der „Geisterzellen“ beobachtet werden (Abbildung 9). Nach einer Propidiumiodidfärbung konnte keine erhöhte Anzahl von Zellen, die kein Membranpotential besitzen und nicht mehr lebensfähig waren, festgestellt werden. Ebenso kamen die ungewöhnlich langen Zellen nicht vermehrt vor. Die bisherigen Ergebnisse zeigen also, dass unter PHB Speicherungsbedingungen in NB-Medium + NaGlukonat, A2274 für normales Wachstum und PHB Metabolismus benötigt wird. Wird die PHB-Synthese durch die Deletion des Synthasegens ausgeschaltet, hat die Deletion von A2274 keine negative Auswirkungen mehr auf die Zellmorphologie.



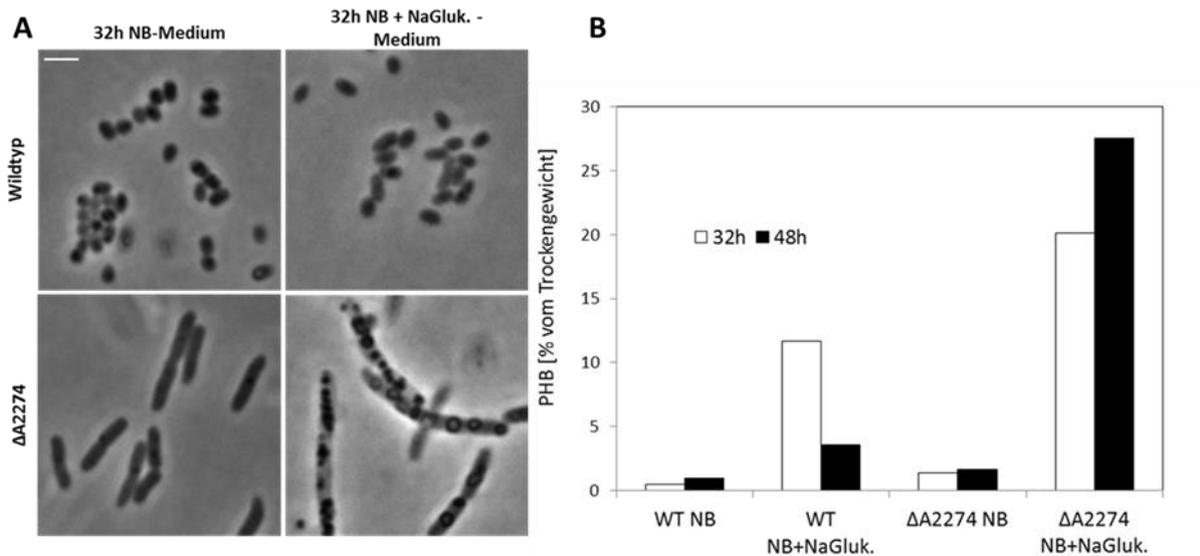
### Abbildung 9: Phänotyp der $\Delta phaC1\Delta a2274$ Mutante

Wachstum (Oben) der Stämme *R. eutropha* H16  $\Delta phaC1$  und  $\Delta a2274\Delta phaC1$  in NB-Medium mit 0,2% NaGlukonat. Beide Stämme zeigen einen ähnlichen Verlauf der Wachstumskurven. Die Zellmorphologie von  $\Delta phaC1\Delta a2274$  (Unten) unterscheidet sich deutlich von der Einzelmutante  $\Delta a2274$ . Der Phänotyp der Zellen zeigt nach 24h wie beim Wildtyp bzw.  $\Delta phaC1$  kurze Stäbchen. Die Werte für die Wachstumsrate und die Verdopplungszeit sind Mittelwerte aus biologischen Triplikaten. Für den Nachweis des PHB negativen Phänotyps wurden die Zellen mit Nilrot angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch geprüft (Abbildung innerhalb des Graphen). Zellen wurden nach 0h, 12h und 24h (untere Reihe) in Phasenkontrast aufgenommen.

Der Maßstab entspricht  $2\mu m$ .

### 3.1.4.3 NB-Medium im Vergleich zu NB + NaGlukonat-Medium

Interessanterweise konnte ein ähnliches Ergebnis (wie mit der Doppelmutante  $\Delta phaC1\Delta a2274$ ) mit dem Stamm  $\Delta a2274$  erzielt werden, wenn kein NaGlukonat zum Medium hinzugegeben würde. Die Zugabe einer zusätzlichen C-Quelle verursacht eine Veränderung des C/N Verhältnisses in *R. eutropha* H16 und ist ein Signal zur erhöhtem Speicherung von PHB. Die  $\Delta a2274$  Mutante in NB-Medium ohne Zugabe von 0,2% (w/v) NaGlukonat speichert PHB ähnlich wie der Wildtyp (Abbildung 10 B). Obwohl die Zellen der Deletionsmutante auch ohne NaGlukonat nach 32h länger waren als bei dem Wildtyp, waren die „Geisterzellen“ nicht mehr erkenntbar. Es ist zu vermuten, dass es sich während der zwei Bedingungen um unterschiedliche Regulationsmechanismen handelt, wobei A2274 nur bei einem eine Rolle zu spielen scheint.



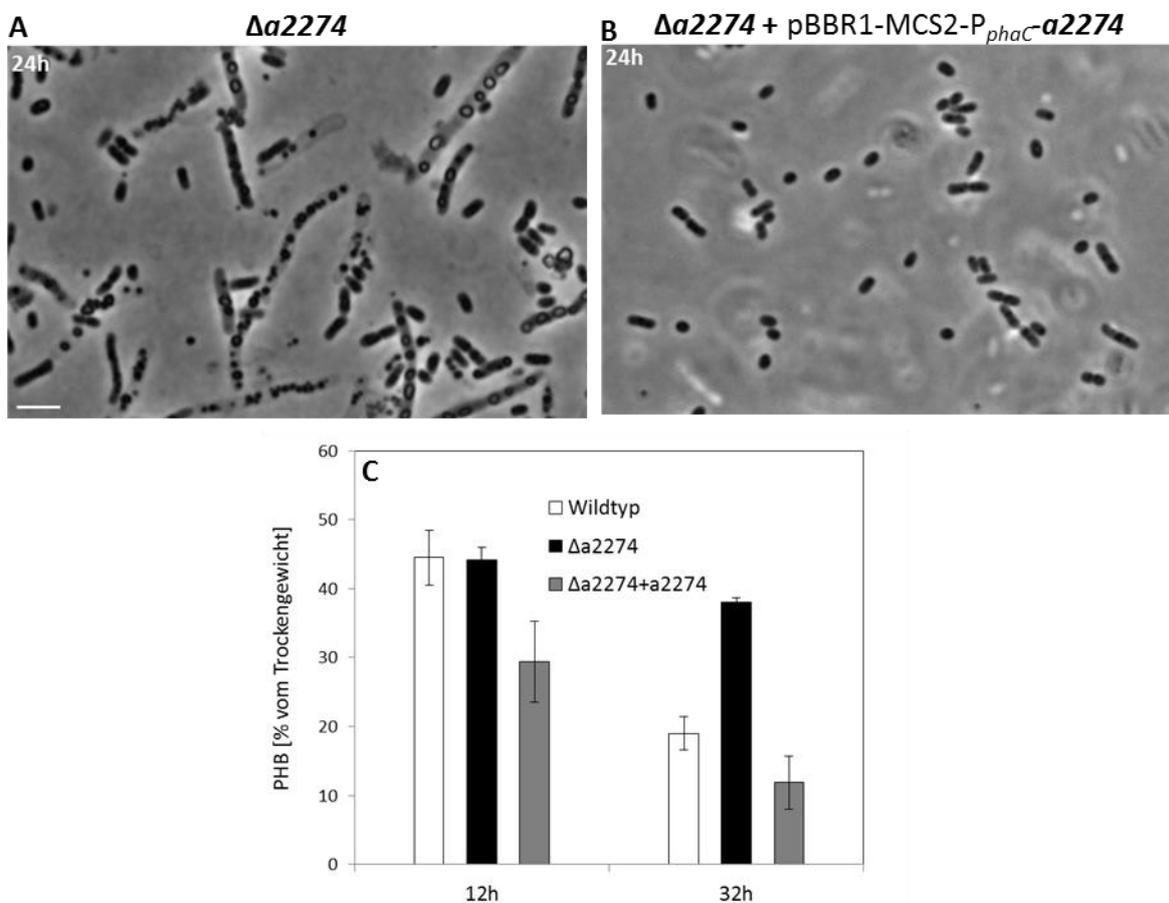
**Abbildung 10: NB-Medium vs. NB-Medium + 0,2% (w/v) Natriumglukonat**

Zellmorphologie (A) und PHB Gehalt (B) in den Stämmen *R. eutropha* H16 Wildtyp und  $\Delta a2274$  Mutante wurden in NB-Medium ohne und mit Zugabe von 0,2% (w/v) NaGlukonat untersucht. Beide Stämme wurden nach 32h Wachstum mikroskopisch mit Phasenkontrast untersucht (A). Die Zellen des Wildtyps sind kleine, kurze Stäbchen. Es ist kein Unterschied in der Morphologie der Zellen in NB mit oder ohne NaGlukonat zu sehen (A, Oben). Die Zellen der Mutante sind im NB Medium viel kürzer und haben weniger PHB (A, unten links) als in NB Medium mit NaGlukonat (A, unten rechts). Der PHB Gehalt wurde mittels Gaschromatographie zu zwei Zeitpunkten (32h, 48h) ermittelt (B). Wildtyp und  $\Delta a2274$  haben einen ähnlichen PHB Gehalt in NB Medium, unterscheiden sich aber deutlich in NB Medium mit NaGlukonat.

Die Werte repräsentieren eine Messung. Der Maßstab entspricht 2  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.4.4 Komplementierung der *a2274* Deletionsmutante

Der Phänotyp der  $\Delta a2274$  Mutante (reduzierter Abbau von PHB und reduzierte Viabilität in der stationären Phase) konnte aufgehoben werden durch Komplementierung mit dem Plasmid pBBR1MCS2-*P<sub>phaC1</sub>-A2274*. Dieser Stamm hat keine Auffälligkeiten in der Zellmorphologie während der stationären Phase gezeigt (Abbildung 11 A, B). Ebenso war der PHB Abbau wieder mit dem des Wildtyps vergleichbar. Während bei der Deletionsmutante der PHB Gehalt nach 32h von 44% der Trockenmasse nur auf 38% absank, sank er bei der komplementierten Mutante nach 32h auf 11% ab. Dies war mit dem Wildtyp vergleichbar (19%) (Abbildung 11 C).



**Abbildung 11: Komplementierung der *a2274* Deletionsmutante.**

Die Zellmorphologie der Deletionsmutante (A) und der Deletionsmutante komplementiert mit dem *a2274* Gen auf dem Plasmid pBBR1-MCS2 unter der Kontrolle des nativen Promotors *PphaC1* (B) wurde im Phasenkontrast untersucht. Dargestellt ist der Zeitpunkt 24h. Der komplementierte Stamm zeigte keine Auffälligkeiten in der Zellmorphologie sowie im PHB Abbau. Zusätzlich wurde zu den Zeitpunkten 12h und 32h der PHB-Gehalt mittels Gaschromatographie bestimmt (C). Der PHB Abbau war in der Komplementierten Mutante mit dem des Wildtyps vergleichbar.

Die Werte sind Mittelwerte aus zwei biologischen Wiederholungen. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen.

### 3.1.5 Speicherung von Polyphosphat in *R. eutropha* H16

Die in der KEGG Datenbank annotierte Funktion des A2274 Proteins ist die Regulation des Phosphattransports. Deshalb war es wichtig den Phänotyp der Deletionsmutante nicht nur bezüglich der PHB-Speicherung und Zellmorphologie zu untersuchen sondern auch in Hinsicht auf den Phosphathaushalt zu erforschen. Zu den annotierten Domänen von A2274 gehört die PhoU-Domäne. In den überwiegenden Fällen wird das *phoU* Gen als ein Teil des *pst*-Operons beschrieben. Dieses besteht aus 5 Genen: *pstSCAB* und *phoU*, wobei *phoU* das einzige Gen ist, dessen Funktion bis dato unbekannt bleibt (Santos-Beneit, 2015; van Veen, 1997) Auch in *R. eutropha* H16 findet man ein putatives *pst*-Operon zusätzlich zu dem *a2274* Gen, das lediglich die PhoU-Domäne besitzt. Aus der Literatur ist es bekannt, dass eine *phoU* Knock-Out Mutante einen erhöhten Polyphosphat Gehalt in der Zelle aufweist als es für *E. coli*, *Synechocystis* sp. (Morohoshi et al., 2002) und *Pseudomonas aeruginosa* (de Almeida et al., 2015) gezeigt worden ist. Inorganisches Polyphosphat (PolyP) ist ein universell vorkommendes lineares Polymer, welches aus  $P_i$  Molekülen besteht, die über energiereiche Phosphoanhydridbindungen miteinander verknüpft sind (Kornberg et al., 1999; Rao et al., 2009). *R. eutropha* H16 ist ausreichend ausgestattet um PolyP zu speichern. Es besitzt zwei putative Phosphataufnahmesysteme: den PitA Transporter mit dem in dieser Arbeit untersuchten A2274 Protein und das Pst-System. Zusätzlich besitzt *R. eutropha* H16 putative Enzyme für die Synthese von PolyP, die PolyP-Kinasen (Ppk1 und Ppk2) sowie für den Abbau, die Exopolyphosphatase (Ppx). Über mikroskopische Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass *R. eutropha* PolyP in Form von Granula speichern kann (Aragno et al., 1977; Beeby et al., 2012).

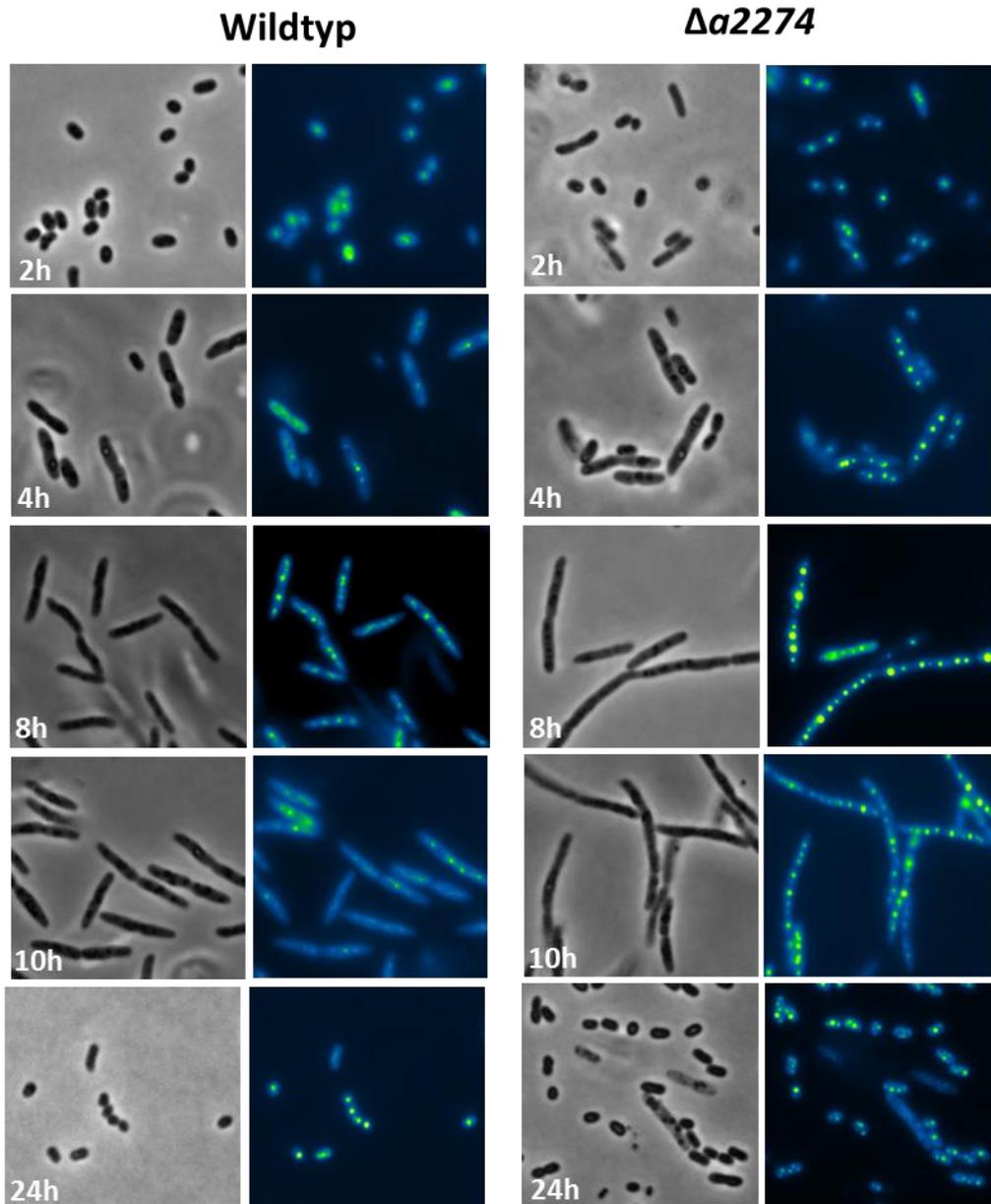
Ziel der weiteren Arbeiten war daher die Untersuchung des Polyphosphatgehaltes von *R. eutropha* H16  $\Delta a2274$  im Vergleich zum Wildtyp.

### 3.1.5.1 Mikroskopische Untersuchungen des DAPI-PolyP Komplexes

PolyP kann mit dem Fluoreszenz-Farbstoff DAPI angefärbt werden und fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden (Tijssen et al., 1982).

Während der Kultivierung in NB-Medium mit 0,2% (w/v) NaGlukonat konnten folgende Unterschiede zwischen  $\Delta a2274$  und dem Wildtyp beobachtet werden. Beide Stämme hatten am Anfang des Wachstums (0h bis 2h nach dem Animpfen) keine bzw. ein PolyP Granulum zumeist in der Mitte der Zelle. Ab 2h Stunden speicherte  $\Delta a2274$  PolyP in Form von mehreren großen PolyP Granula, die in der Zelle verteilt waren, dabei hatte der Wildtyp nachwievor nur ein kleineres Granulum gespeichert, welches sich ebenfalls in der Mitte der Zelle befand. Vor der Zellteilung befanden sich bei dem Wildtyp nun zwei PolyP Granula, die wahrscheinlich nach der Zellteilung auf die Tochterzellen aufgeteilt werden sollten. Ab 12 h nach der Inokulation sank die Anzahl der Granula in beiden Stämmen. Nach 24 h war kein Unterschied bezüglich PolyP Granula zwischen  $\Delta a2274$  und dem Wildtyp erkennbar (Abbildung 12, Abbildung 13).

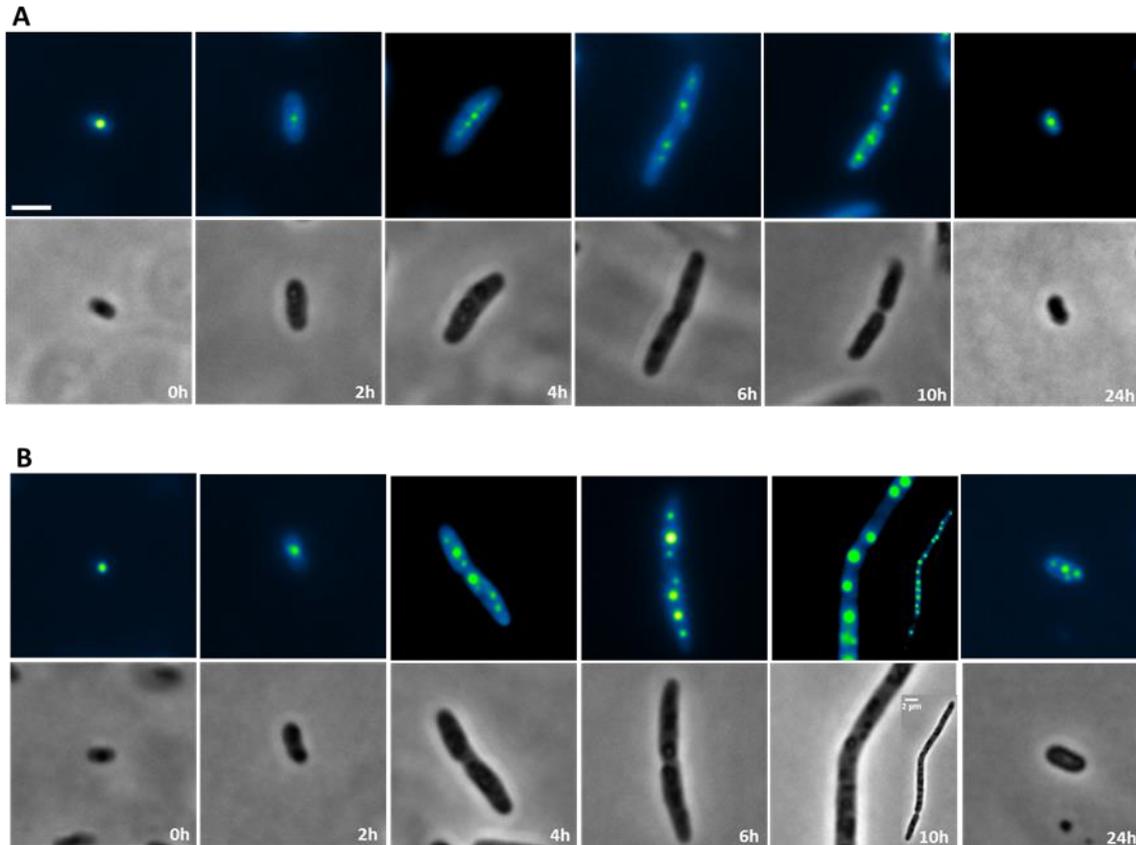
***R. eutropha* H16**



**Abbildung 12: Polyphosphat Speicherung in *R. eutropha* H16 Wildtyp und  $\Delta a2274$  in NB-Medium mit 0,2% NaGlukonat.**

Zellen wurden nach 2h, 4h, 8h, 10h, 24h in Phasenkontrast (links) und nach Anfärben mit DAPI (rechts) fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Beide Stämme hatten am Anfang des Wachstums (2h) kein bzw. ein PolyP Granulum meist in der Mitte der Zelle. Ab 2h Stunden speicherte  $\Delta a2274$  PolyP in Form von mehreren großen PolyP Granula (bis 10h) wobei der Wildtyp meistens nur 1 kleineres Granulum gespeichert hatte (in der Mitte der Zelle). Vor der Zellteilung befanden sich bei dem Wildtyp meistens zwei PolyP Granula von denen vermutlich jede Tochterzelle ein Granulum bekam (4h bis 10h). Ab 12h sank die Anzahl der Granula in beiden Stämmen. Nach 24h war kein Unterschied mehr erkennbar.

Bilder wurden mit einer Schwarz-Weiss-Kamera (CoolSnapCF, Photometrics, Tucson, USA) aufgenommen und mit Hilfe der Software MacBiophotonics ImageJ bearbeitet. Der Maßstab entspricht 2  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 13: Detaillierte Darstellung der Polyphosphatspeicherung in *R. eutropha* H16 Wildtyp und  $\Delta a2274$  in NB-Medium mit 0,2% NaGlukonat.**

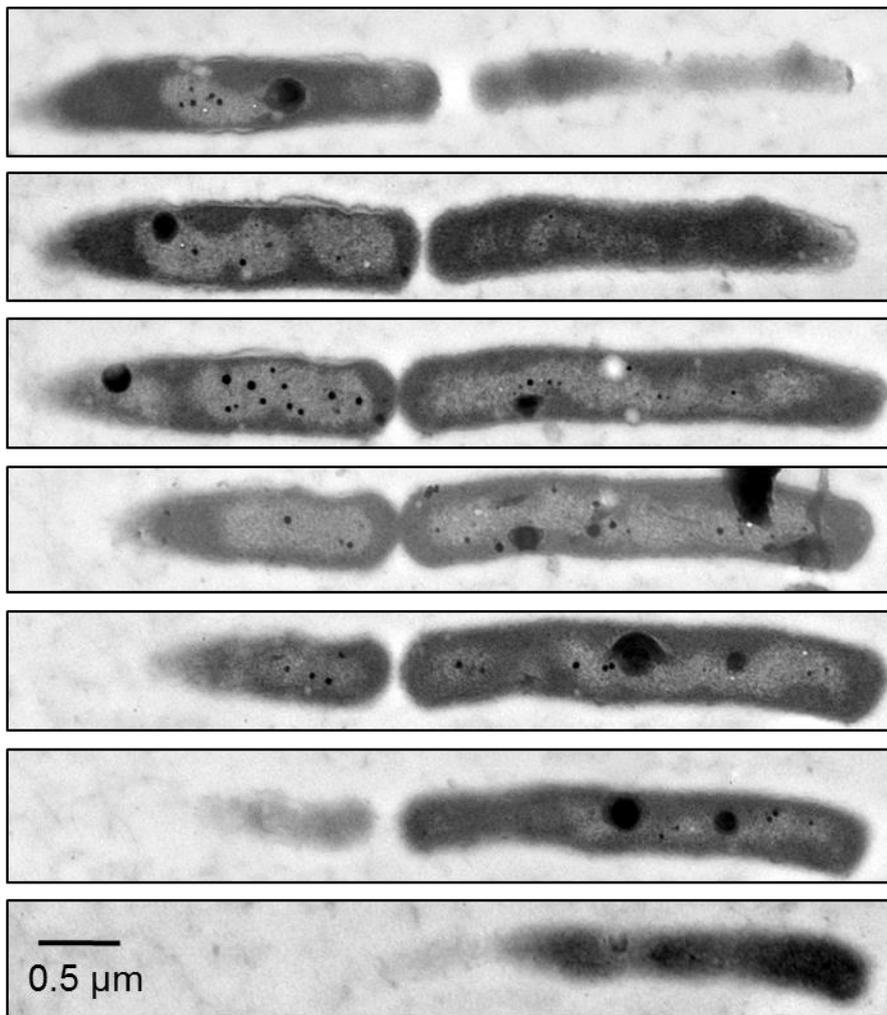
Zur Zeitpunkten 0h, 2h, 4h, 6h, 10h, 24h wurde jeweils eine Zelle des Wildtyps (A) und  $\Delta a2274$  (B) in Phasenkontrast (untere Reihe) und nach Anfärben mit DAPI (obere Reihe) fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Während die Mutante viele PolyP Granula in einer Zelle speichern kann, hat der Wildtyp meist nur eine höchstens aber zwei Granula pro Zelle. Bilder wurden mit einer Schwarz-Weiss-Kamera (CoolSnapCF, Photometrics, Tucson, USA) aufgenommen und mit Hilfe der Software MacBiophotonics ImageJ bearbeitet.

Der Maßstab entspricht 2  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.5.2 Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Untersuchung

Zusätzlich zu den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden TEM Aufnahmen der Deletionsmutante  $\Delta a2274$  von der Kooperationsgruppe AG Hoppert in Georg-August-Universität Göttingen gemacht. Diese bestätigen, dass der Stamm  $\Delta a2274$ , im Gegensatz zum Wildtyp der meistens nur eine bzw. zwei Granula besaß, in der Lage war eine große Anzahl der PolyP Granula zu speichern. Interessant war die Beobachtung, dass PolyP Granula in der  $\Delta a2274$ -Mutante fast immer nahe der Nukleoidregion zu finden waren. Dieses ist in den TEM Aufnahmen im Vergleich zum umgebenden Zytoplasma als weniger Kontrastmaterial aufnehmende und damit heller erscheinende Struktur zu erkennen. Besonders in den ersten drei Schnitten (Abbildung 14) ist deutlich zu erkennen, dass PolyP kaum außerhalb der näheren Umgebung des Chromosoms zu finden war. Bereits die Fluoreszenzaufnahmen von

den Wildtyp Zellen suggerierten, dass die PolyP Granula an DNA gebunden sind oder sich in räumlicher Nähe befinden. Kleine Zellen besitzen meistens nur ein Granulum, welches stets zentral in der Zelle positioniert ist. Stäbchenförmige Zellen dagegen, die sich kurz vor der Zellteilung befinden haben meistens zwei PolyP Granula ähnlich der zwei Schwesterchromosomen die an die Tochterzellen weitergegeben werden.



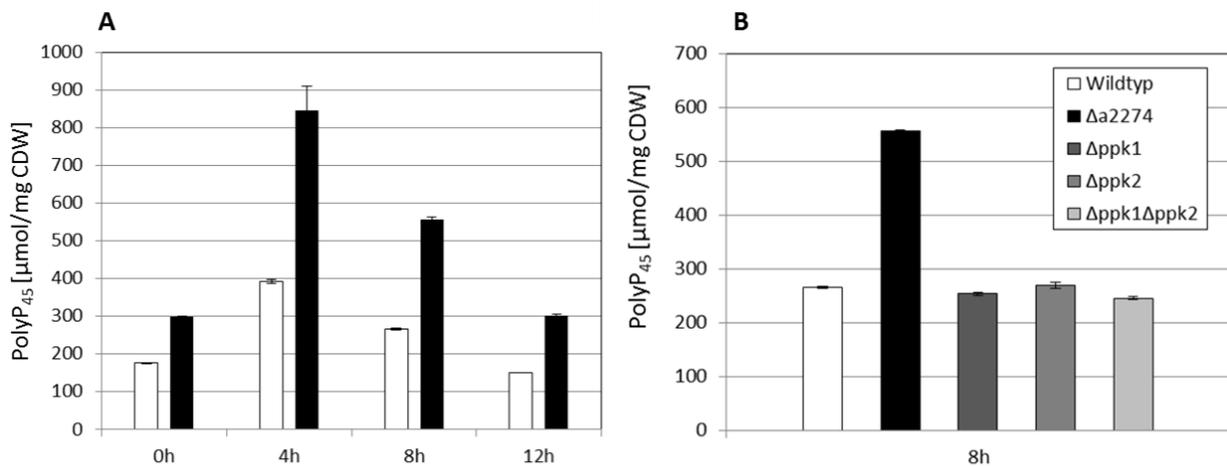
**Abbildung 14: TEM Aufnahmen der Deletionsmutante *a2274***

Schnittserie durch zwei Zellen der Deletionsmutante *a2274*. Zellen wurden nach Kultivierung in NB-Medium im Elektronenmikroskop betrachtet. Dieser Stamm speichert eine große Anzahl an kleinen PolyP Granula ( $0,1 \mu\text{m}$ ) und einige Große PolyP Granula ( $0,3 \mu\text{m}$ ), die als schwarze, runde Punkte erkennbar sind. Interessanterweise scheinen sich die PolyP Granula fast immer in der Nukleoidregion zu befinden. Dieses ist in der TEM Aufnahmen als heller Fleck zu erkennen.

### 3.1.5.3 Polyphosphat: Quantitative Bestimmung

In weiteren Arbeiten wurde eine quantitative Bestimmung des PolyP-Gehalts für alle vorhandenen Mutanten am Fluorometer durchgeführt (2.15). Die Ergebnisse bestätigen die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen. Sowohl die Deletionsmutante als auch der

Wildtyp speicherten in der exponentiellen Wachstumsphase PolyP, wobei der maximale Gehalt bei der Mutante (bei 4h) mehr als doppelt so hoch war wie beim Wildtyp (847 bei der Mutante bzw. 393 beim Wildtyp [ $\mu\text{mol P}_{45}/\text{mg}$  Zelltrockenmasse]). Nach ca. 10h begann der Gehalt abzunehmen bis nur noch wenige Zellen mit einzelnen PolyP Granula vorhanden waren. Dies spiegelte sich auch in der Fluoreszenzmessung wieder. Nach 12h hat die Fluoreszenz bei beiden Stämmen abgenommen ( $\Delta a2274$  um 46%, Wildtyp um 63%) (Abbildung 15 A). Um die quantitative Bestimmung des PolyP zu vervollständigen, wurden zwei neue Deletionsmutanten hergestellt. Ausgeschaltet wurden zwei putative Polyphosphatkinasen Ppk1 und Ppk2, die vermutlich für die Synthese von PolyP verantwortlich sind. Weiterhin wurde eine Doppelmutante in beiden *ppk* Genen hergestellt. Diese Mutanten sollten keine bzw. weniger PolyP speichern und als Negativkontrollen für die PolyP-Bestimmung genutzt werden. Das Ausschalten der beiden Gene führte nicht zu einer vollständigen Reduktion des Polyphosphatsgehalts. Die Fluoreszenzwerte waren bei allen drei neuen Mutanten vergleichbar mit dem Wildtyp (Abbildung 15 B).



#### Abbildung 15: Quantitative Bestimmung des Polyphosphatgehalts

Zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten (0h, 4h, 8h und 12h) in NB-Medium mit 0,2% (w/v) NaGlukonat wurden Wildtyp und  $\Delta a2274$  Zellen (A) mittels Fluoreszenzmessung bei einer Excitation von 415 nm und Emission bei 550 nm auf ihren PolyP-Gehalt hin untersucht. Die Zellen wurden vor der Messung mit DAPI (10  $\mu\text{M}$ ) angefärbt und 10 min bei RT inkubiert. Sowohl die Deletionsmutante als auch der WT speichern in der exponentiellen Wachstumsphase PolyP, wobei der maximale Gehalt bei der Mutante (bei 4h) mehr als doppelt so hoch ist als beim Wildtyp. Nach ca. 10 Stunden fängt der Gehalt bei beiden Stämmen an abzunehmen.

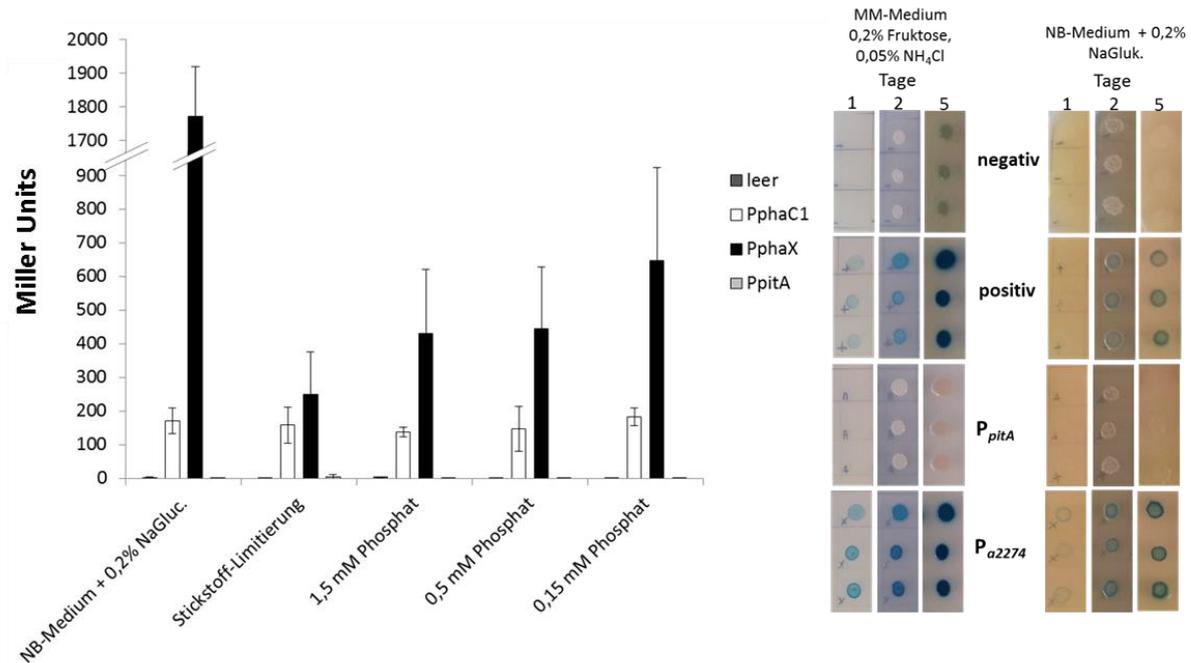
Zum Zeitpunkt 8h wurden zusätzlich die Stämme  $\Delta ppk1$ ,  $\Delta ppk2$ , und die Doppelmutante  $\Delta ppk1\Delta ppk2$  untersucht (B). Diese unterscheiden sich im PolyP-Gehalt nicht vom Wildtyp.

Die Werte sind Mittelwerte aus zwei biologischen Wiederholungen. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen.

### 3.1.6 Promotor-Aktivitätsmessung

Die Ergebnisse der Proteomanalyse (siehe 3.1.3.2) haben bereits gezeigt, dass das Protein A2274 exprimiert wurde und überwiegend mit der Membran assoziiert war. Weiterhin sollte der Promotor von A2274 auf seine Aktivität hin untersucht werden. Diese Studien sollten Hinweise auf die Expressionstärke und Abhängigkeit der Expression von verschiedenen Medien und Phosphatkonzentration liefern. Das  $\beta$ -Galactosidase Gen (*lacZ*) wurde als Reporter für die Bestimmung der Promotoraktivität von *a2274* und *pitA* verwendet. Das Reporter-Gen wurde unter der Kontrolle des Zielpromotors exprimiert und die  $\beta$ -Galactosidase Aktivität wurde mit Hilfe eines Plattentests bzw. quantitativ bestimmt (Miller-Assay) (3.1.6). Als Positivkontrolle wurde ein konstitutiver Promotor  $P_{phaC1}$ , der bekanntlich eine starke Genexpression in *R. eutropha* H16 induziert, eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde ein promotorloses  $\beta$ -Galactosidase Gen verwendet. Für den Promotorbereich wurde ein 300 bp großes Fragment *upstream* von *a2274* und *pitA* in einen entsprechenden Vektor, vor die  $\beta$ -Galactosidase, inkloniert. Für den Plattentest wurden NB-Medium Platten (2.2.1) mit Zugabe von 0,2% (w/v) NaGlukonat und Mineralmedium-Platten (2.2.2) mit 0,2% (w/v) NaGlukonat als C-Quelle und 0,05% (w/v)  $NH_4Cl$  als N-Quelle (Stickstoff-Limitierung). Die Farbentwicklung wurde nach einem, nach zwei und nach fünf Tagen dokumentiert (Abbildung 16). Nur der *R. eutropha* H16 Stamm in dem die Expression des *lacZ* Gens unter der Kontrolle des *a2274* Promotors lag, zeigte eine Blaufärbung, die mit der Positivkontrolle vergleichbar war. Die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase wurde in den gleichen Medien mit Hilfe von Miller-Assay bestimmt (Abbildung 16, erste zwei Bedingungen). Die Werte der Positivkontrolle lagen bei ca. 160 MU, die der Negativkontrolle bei nur 2 MU. Wie bereits vermutet enthielt das Fragment *upstream* von *pitA* keinen aktiven Promotor. Alle durchgeführten Assays ergaben mit dem Fragment *upstream* von *pitA* ein negatives Ergebnis (Aktivität ca. 1,5 MU). Die konservierte Position des *pitA* Gens stromaufwärts von *a2274* und die ebenso konservierte Nähe beider Gene (in *R. eutropha* 12 bp) deuten auf eine funktionelle Verwandtschaft und Bildung eines Operons hin. Die höchste Aktivität für den Promotor von A2274 wurde in NB-Medium mit Zugabe von 0,2% (w/v) NaGlukonat gemessen (1717  $\pm$ 148). Im Phosphat-Medium war die Aktivität deutlich niedriger. Zusätzlich wurde im Tris-Medium (2.17) überprüft ob Phosphatkonzentration ein Einfluss auf die Aktivität hat. Die unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen (0,15 – 1,5 mM) hatten kein Einfluss auf die Aktivität (Abbildung 16). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich im Falle von *a2274* und *pitA* vermutlich um ein Operon mit einem starken Promotor handelt, wobei die Expression im Komplexmedium stärker als im Minimalmedium war.

## Experimente und Ergebnisse



### Abbildung 16: Promotor-Aktivitätsmessung

Promotorbereiche für *a2274*, *pitA* und als Positivkontrolle *phaC1* wurden auf dem pBBR1MCS3 Plasmid vor das *lacZ* Gen einkloniert. Die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase wurde in *R. eutropha* mit den jeweiligen Konstrukten auf Indikatorplatten (X-Gal) bzw. quantitativ (ONPG) gemessen. Die Plattentests zeigen, dass  $P_{a2274}$  sowohl in MM Medium als auch in NB Medium eine Expression induziert. Das Fragment *upstream* von *pitA* enthält vermutlich keinen Promotor, hier war keine Farbentwicklung zu sehen. Die höchste Aktivität für den Promotor von *a2274* wurde in NB-Medium mit Zugabe von NaGlukonat gemessen. Im Phosphat- (2.2.2) bzw. Tris-Medium (2.14) war die Aktivität deutlich niedriger. Die unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen hatten keinen Einfluss auf die Aktivität.

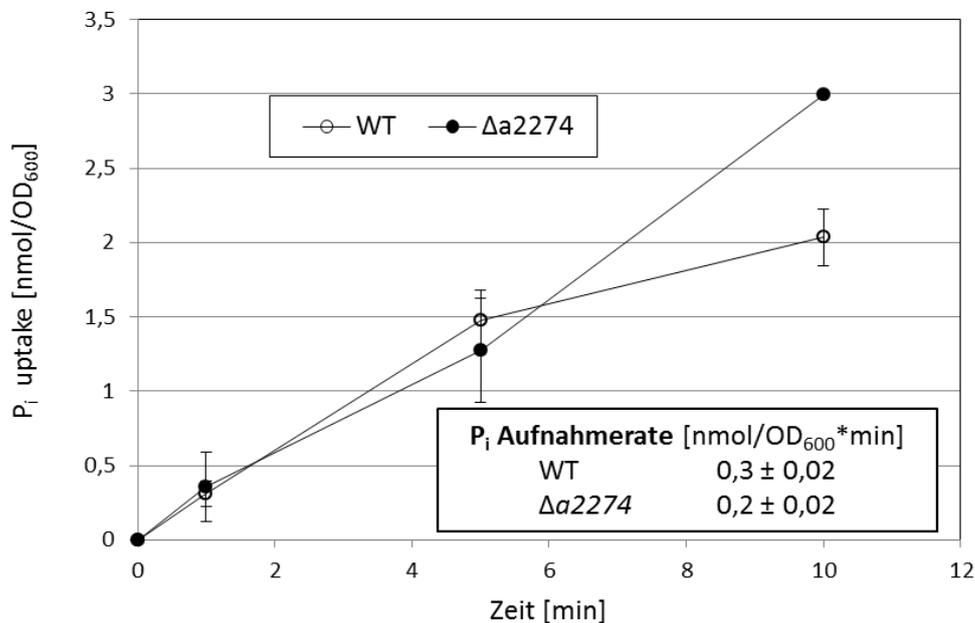
Die Werte sind Mittelwerte aus biologischen Triplikaten. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen.

### 3.1.7 Phosphataufnahme assay

Die bisherigen Ergebnisse lieferten Grund zu der Annahme, dass A2274 eine Rolle im Phosphatmetabolismus spielt. Zum einen die AS Sequenz, zum anderen die unmittelbare Nähe zum putativen Phosphattransporter waren hierfür Indizien. Den wichtigsten Hinweis lieferte aber der Phänotyp der Deletionsmutante. Dieser Stamm war in der Lage große Mengen Polyphosphat in granulärer Form zu speichern (3.1.5). Ein erhöhter Polyphosphatgehalt könnte durch veränderte Phosphataufnahme verursacht worden sein. Um zu beweisen, dass der  $\Delta a2274$ -Stamm innerhalb des Phosphataufnahmesystems verändert ist, wurde ein Phosphataufnahmeassay mit  $^{33}\text{P}_i$  durchgeführt. Hierzu wurden zwei Testansätze mit zwei unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen durchgeführt. Wenn Zellen vor dem Assay 4h in Tris-Medium ohne Phosphat vorinkubiert wurden (um Phosphatreserven zu verbrauchen) (siehe 2.14) und dann Phosphat (30  $\mu\text{M}$ ) zugegeben wurde, erfolgte eine

## Experimente und Ergebnisse

schnelle Aufnahme bei beiden Stämmen. Die Aufnahme rate des Wildtyps und des  $\Delta a2274$ -Stammes lagen bei etwa  $0,2 \text{ nmol P}_i / \text{OD}_{600} \cdot \text{min}$ . Eine Erklärung hierfür könnte die Aktivierung des Pst-Systems sein, welches durch die Depletion von Phosphat verursacht wurde. Das Pst-System spielt bei der Phosphatlimitierung z.B. in *E.coli* eine wichtige Rolle und entscheidet somit über die Aktivierung eines hochaffinen Phosphattransporters. Um die Induktion des Pst-Systems zu verhindern wurden auf die Vorinkubation in Phosphatfreiem Medium verzichtet und die Zellen direkt nach dem Wachen und resuspendieren verwendet (2.14). Bei einer Start-Konzentration von  $300 \mu\text{M}$  Phosphat wurde zwischen den Stämmen eine unterschiedliche Aufnahme charakteristik beobachtet. Innerhalb von den ersten 5 min sind die Aufnahme rates beider Stämme vergleichbar. Während bei dem Wildtypstamm die Aufnahme dann langsamer wird nehmen die  $\Delta a2274$  Zellen nach 10 min 1,5-mal mehr Phosphat auf als der Wildtyp (Abbildung 17). Die Aufnahme konnte mit einem ATPase-Hemmer (DCC (Dicyclohexylcarbodiimid),  $0,2 \text{ mM}$ ) inhibiert werden wobei die Hemmung im Falle von  $\Delta a2274$  viel stärker war. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Phosphataufnahme in der Deletionsmutante verändert wurde und die Veränderung möglicherweise durch die Aktivität des hochaffinen Phosphataufnahmesystems verursacht wird.



**Abbildung 17: P<sub>i</sub> - Aufnahme in *R. eutropha* H16 Wildtyp und *a2274* Deletionsmutanten.**

Phosphat wurde zu einer Endkonzentration von  $300 \mu\text{M}$  zugegeben (Stammlösung  $10 \text{ mM}$  (davon  $[^{33}\text{P}] = 30 \mu\text{Ci}$ )). Dargestellt sind die Ergebnisse für *R. eutropha* H16 (Wildtyp) ( $\circ$ ) und  $\Delta a2274$  ( $\bullet$ ). Beide Stämme nehmen Phosphat anfänglich mit einer ähnlichen Rate auf. Nach 10 min haben die  $\Delta a2274$  Zellen allerdings 1,5-mal mehr Phosphat aufgenommen als der Wildtyp, bei dem die Aufnahme nach 10 min. reduziert wurde.

Die Werte sind Mittelwerte von Zweifachtests. Die Aufnahme rate wurde im linearen Bereich zwischen 1 min. und 5 min. bestimmt.

### 3.1.8 Proteomanalyse

Für den  $\Delta a2274$  Stamm wurden ebenfalls Proteom-Analysen durchgeführt. Ähnlich wie beim Wildtyp wurden die Zellen in Fraktionen aufgeteilt. In diesem Fall wurden nur eine lösliche- und eine PHB-Fraktion pro Stamm isoliert und über LC-ESI-MS/MS analysiert. Mit Hilfe dieses Ansatzes sollten Proteine identifiziert werden deren Expression durch die Deletion von  $a2274$  verändert wurde. Dies sollte wiederum Hinweise auf die Funktionsweise von  $A2274$  liefern. Insgesamt wurden 714 Proteine in der löslichen Fraktion identifiziert. Davon war die Expression von 78 Proteinen in der  $\Delta a2274$  Mutante im Vergleich zum Wildtyp verändert (bei 45 Proteinen 3-fach und mehr). Auffällig waren vor allem die hochregulierten Proteine B2398 (Phosphatase, 53,4 fach), A2439 (PhoB, 48,4 fach) und A2444 (PstS, 32,8 fach) (Tabelle 14). Zwei der ersten vier Treffer sind Proteine aus dem Phosphataufnahmesystem. Es handelt sich hierbei um ein putatives hochaffines Pst (phosphate-specific transport) System das aus dem PstSCAB Operon (PstS periplasmatisches Phosphatbindeprotein, PstC und PstA Membrankanal, PstB ATPase) besteht. In *E. coli* ist die Expression von dem Phosphatgehalt im Medium abhängig (wird durch Phosphatmangel induziert) (Aguena et al., 2002). Das Pst-Operon ist ein Teil des Pho-Regulons unter der Kontrolle des Zweikomponentensystems: PhoB /PhoR. Die phosphorylierte Form von PhoB ist direkt an der Aktivierung bzw. Repression einer großen Anzahl von Genen durch Bindung an eine als „Pho Box“ bekannte DNA-Sequenz beteiligt (Santos-Beneit, 2015). Die hohe Überexpression von PstS und PhoB deutet in der  $\Delta a2274$  Mutante auf die Aktivität des hochaffinen Phosphataufnahmesystems hin. Dies würde die erhöhte Polyphosphatkonzentration in der Mutante erklären.

Der Vergleich der PHB-Proteome aus *R. eutropha* Wildtyp und  $\Delta a2274$  hat keine Veränderungen in der Zusammensetzung der PGAPs gezeigt (Tabelle 15).

### 3.2 PHB-Depolymerasen

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung des Abbaus von PHB. Im ersten Teil wurde das neu identifizierte Protein A2274, das als Interaktionspartner der PhaZa1 Depolymerase und der Phasine PhaP2 und PhaP3 gefunden wurde, charakterisiert. Zusätzlich zu der komplexen Struktur des PHB-Granulums, an dessen Oberfläche sich eine Reihe von Proteinen befindet, verursacht die Existenz mehrerer putativer PHB-Depolymerasen eine Schwierigkeit im Verständnis des Abbaus. In diesem Teil der Arbeit wurden zwei dieser Enzyme genauer untersucht genommen. Bisher wurden neun putative PHB abbauende Enzyme (Tabelle 1) beschrieben. Basierend auf dem Vergleich der Aminosäuresequenz, konnten die Genprodukte in drei Klassen aufgeteilt werden: Depolymerasen mit der DepA-Domäne (PhaZa1 zu PhaZa5), Depolymerasen mit der LpqC Domäne (PhaZd1 und PhaZd2) und zwei 3HB-Oligomerhydrolasen (PhaZb, Phac) (Reinecke und Steinbüchel, 2009).

Bis jetzt ist jedoch nur wenig über die *in vivo*-Aktivität dieser Genprodukte bekannt. Studien mit *phaZ* Deletionsmutanten zeigten, dass PhaZa1, PhaZa2 und PhaZd1 zum intrazellulären Abbau von PHB beitragen (Abe et al., 2005; Handrick et al., 2000; Uchino et al., 2008; York et al., 2003).

Aus einer vorangegangener Arbeit (Diplomarbeit, Daniela Lauprecht) waren bereits Lokalisierungsdaten für alle putative PHB Depolymerasen als eYfp Fusionen in *R. eutropha* HF39 vorhanden. Interessanterweise akkumulierten Zellen, in denen entweder PhaZd1 (H16\_B2073) oder PhaZd2 (H16\_B2401) als eYfp Fusionen unter der Kontrolle des konstitutiven *PphaC1* Promotors exprimiert wurde, sehr wenig PHB Granula. Dies deutete auf eine hohe PHB Abbauaktivität dieser Enzyme hin. Diese Beobachtung hatte mein Interesse an den zwei Depolymerasen geweckt und führte zu einer ausführlichen Studie über die Funktion dieser Enzyme in *R. eutropha* H16. Die Ergebnisse dieser Experimente werden in diesem Teil der Arbeit vorgestellt.

PhaZd1 wurde bereits als *in vitro* hochaktive PHB Depolymerase beschrieben (Abe et al., 2005). Obwohl die Autoren einen leicht erhöhten PHB-Gehalt in der *phaZd1*-Deletionsmutante während der PHB Akkumulationsphase beobachten konnten, konnte keine nachweisbare Wirkung auf die Mobilisierung von PHB festgestellt werden. Daher bleibt die physiologische Funktion der PhaZd1 Depolymerase bei der Mobilisierung von PHB unklar.

Das *R. eutropha* H16 Genom enthält eine zusätzliche putative PHB Depolymerase (H16\_B2401, PhaZd2), die der PhaZd1 (H16\_B2073) Depolymerase zu 33 % identisch und zu 37% ähnlich ist. Beide Gene werden einzeln exprimiert und sind nicht Teil eines Operons. Es sind bislang keine experimentellen Daten zu Funktion und Eigenschaften der PhaZd2

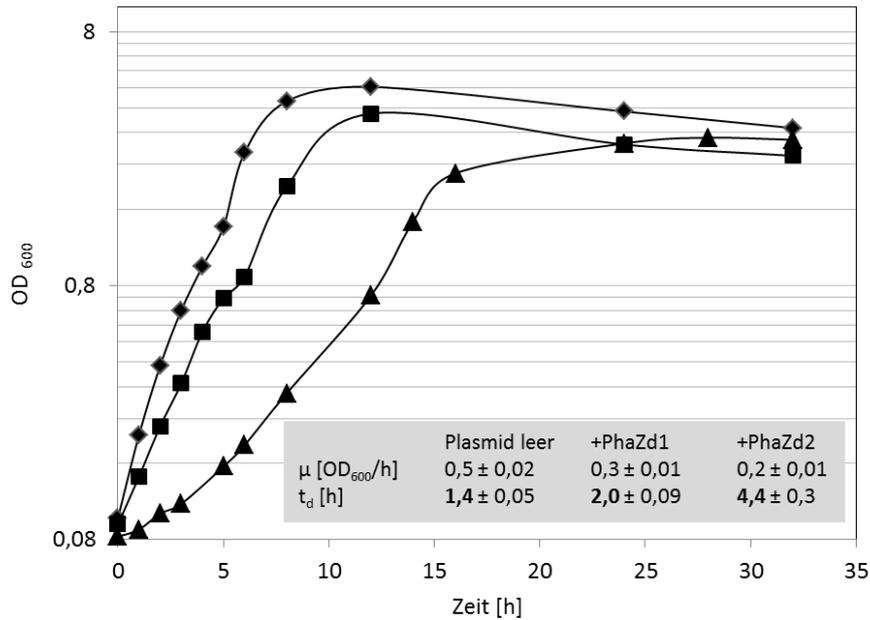
Depolymerase verfügbar. Damit war das Ziel dieses Teils der Arbeit eine gründliche Charakterisierung der beiden PHB Depolymerasen PhaZd1 und PhaZd2 durchzuführen.

### **3.2.1 Einfluss der Expression von PhaZd1 und PhaZd2 auf die Speicherung von PHB**

#### **3.2.1.1 Konstitutive Expression**

Die Ergebnisse aus den Lokalisierungsversuchen (Diplomarbeit, Daniela Lautprecht) lieferten die ersten Hinweise auf die *in vivo*-Aktivität von PhaZd1 und PhaZd2. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die Gene *phaZd1* und *phaZd2* in das *broad host range*-Plasmid pBBR1MCS2 unter der Kontrolle des konstitutiven  $P_{phaC}$  Promotors inkloniert, in den *E. coli* S17-1 Stamm transformiert und über Konjugation in den *R. eutropha* H16 Stamm übertragen. Die Akkumulierung von PHB wurde in den so gewonnenen Transkonjuganten während der Kultivierung unter PHB Speicherungsbedingungen (Wachstum auf NB-Medium mit 0,2% (w/v) NaGlukonat) untersucht. Bezüglich des Wachstums konnte ein negativer Einfluss der Expression von PhaZd1 und PhaZd2 beobachtet werden. Die Wachstumsrate war bei den Überexpressionsmutanten auf  $0,3 \pm 0,01$  OD<sub>600</sub>/h (bei der PhaZd1) und  $0,2 \pm 0,01$  OD<sub>600</sub>/h (bei der PhaZd2) im Vergleich zum Wildtyp mit einem leeren Plasmid, der eine Wachstumsrate von  $0,5 \pm 0,01$  OD<sub>600</sub>/h erreicht hatte, reduziert (Abbildung 18).

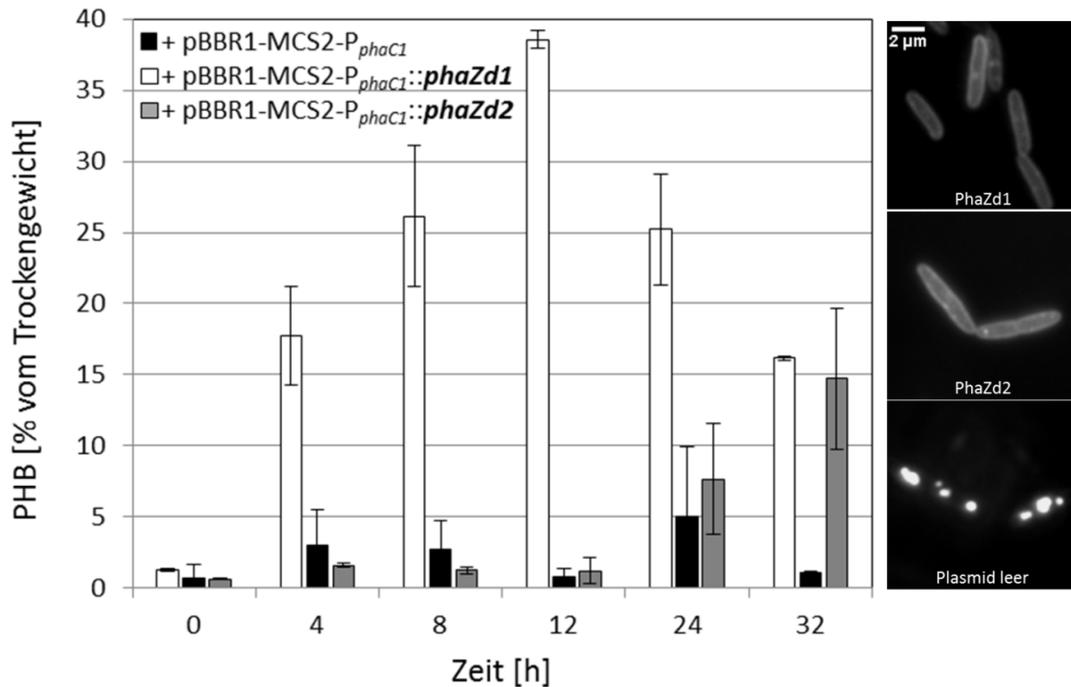
## Experimente und Ergebnisse



**Abbildung 18: Einfluss der Expression von PhaZd1 und PhaZd2 in *R. eutropha* H16 auf den Verlauf der Wachstumskurven.**

Die OD<sub>600</sub> Werte wurden in *R. eutropha* H16 Stämmen mit dem Plasmid pBBR1-MCS2-PphaC1 ohne Insert (◆), pBBR1-MCS2-PphaC1::*phaZd1* (■) und pBBR1-MCS2-PphaC1::*phaZd2* (▲) während der Kultivierung in NB-Medium mit 0,2% (w/v) NaGlukonat gemessen. Es konnte ein negativer Einfluss der Expression von PhaZd1 und PhaZd2 auf das Wachstum der Stämme beobachtet werden. Die Werte für die Wachstumsrate und Verdopplungszeit sind Mittelwerte aus biologischen Triplikaten.

Die konstitutive Überexpression hatte einen noch gravierenderen Einfluss auf den PHB Gehalt. Keine oder nur eine geringe Menge von PHB wurde durch die *R. eutropha* Zellen gespeichert, wenn entweder PhaZd1 oder PhaZd2 exprimiert wurden, während der Wildtyp mit dem leeren pBBR1MCS2-Plasmid wie gewöhnlich PHB akkumulierte. Bei dem Wildtyp war der PHB-Gehalt während der exponentiellen Wachstumsphase von 1% bis zu einem Zeitpunkt von 12h kontinuierlich bis auf einen Wert von 38 % PHB angestiegen. Danach sank der PHB-Gehalt auf 16% nach 32h. Der PHB-Gehalt in dem PhaZd1 überexprimierenden Stamm verblieb sowohl in der exponentiellen als auch stationären Wachstumsphase beinahe unverändert bei einem sehr geringen Wert von ca. 2%. In dem PhaZd2 überexprimierenden Stamm stieg der PHB Gehalt lediglich in der stationären Wachstumsphase und erreichte 15% nach 32h (Abbildung 19). Diese Ergebnisse weisen auf eine starke Depolymeraseaktivität *in vivo* hin.



**Abbildung 19: Einfluss der Expression von PhaZd1 und PhaZd2 in *R. eutropha* H16 auf den PHB Gehalt**

Der PHB Gehalt wurde mittels Gaschromatographie in *R. eutropha* Stämmen mit dem Plamid pBBR1-MCS2-P<sub>phaC1</sub> ohne Insert, pBBR1-MCS2-P<sub>phaC1</sub>::*phaZd1* und pBBR1-MCS2-P<sub>phaC1</sub>::*phaZd2* während der Kultivierung in NB-Medium mit 0,2% (w/v) NaGlukonat bestimmt. Sowohl bei PhaZd1 wie auch bei PhaZd2 hat die Expression zu drastischer Verringerung des PHB Gehalts geführt. Alle Stämme wurden nach 6h mikroskopisch untersucht (Abbildung, rechts). Nur bei dem Stamm mit dem leeren Plasmid erkennt man (bei den mit Nilrot angefärbten Zellen) fluoreszierende Granula (untere Abbildung). Die anderen zwei Stämme speichern kaum PHB (oben und mitte).

Die Werte für den PHB Gehalt sind Mittelwerte aus biologischen Triplikaten. Fehlerbalken zeigen Standard Abweichungen.

Der Maßstab entspricht 2 µm.

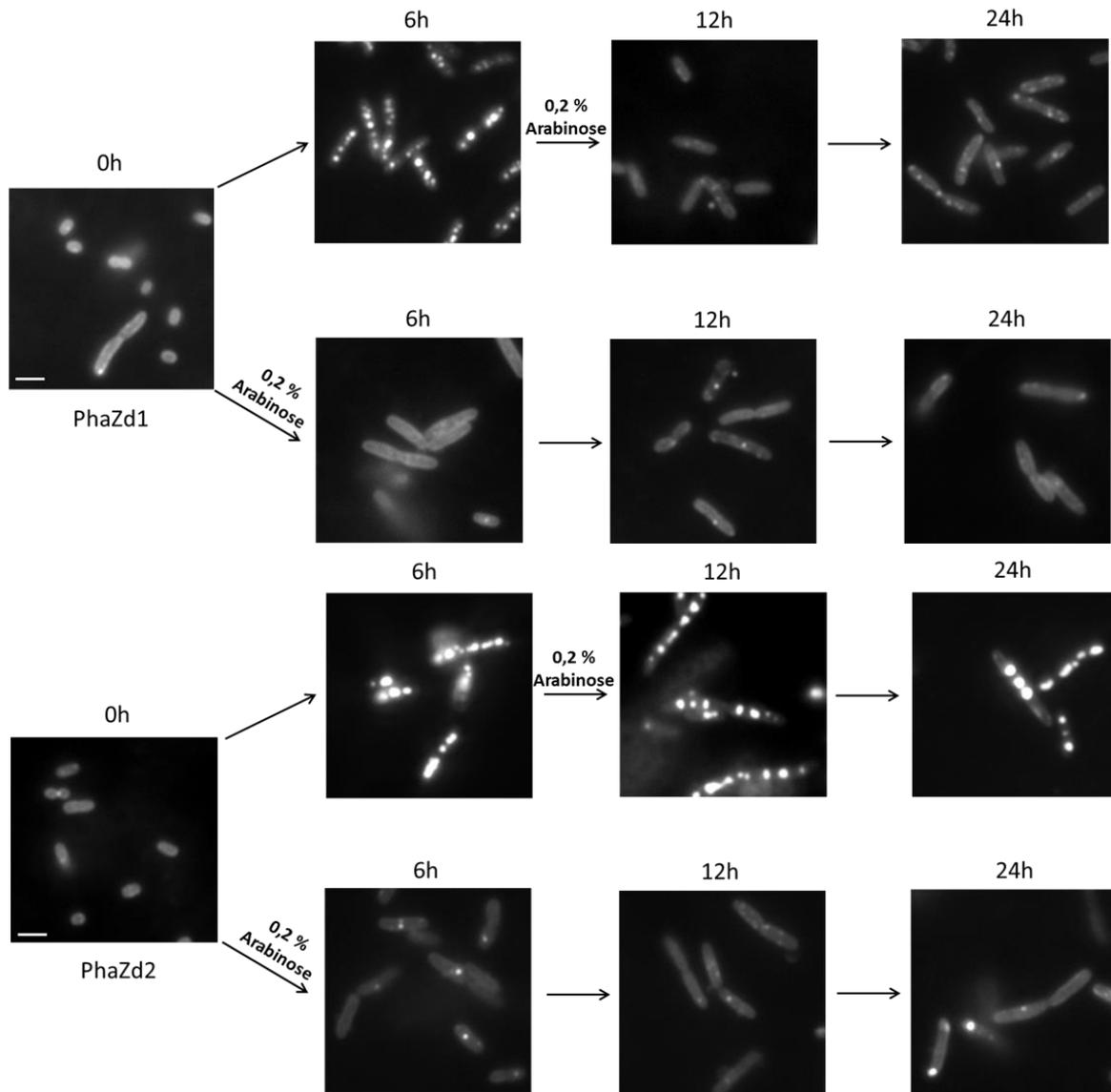
### 3.2.1.2 Induzierbare Expression

Die Tatsache, dass die Überexpression von PhaZd1 bzw. PhaZd2 so effizient zum Abbau von PHB führte, ist insofern erstaunlich, dass dies bisher für keine andere Depolymerase beschrieben wurde (Brigham et al., 2012a). Allerdings muss beachtet werden, dass sich die Expression unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors (*PphaC1*) befand. Es wurde bereits gezeigt, dass die Anwesenheit der Enzyme für die Abwesenheit der Granula während der Überexpression verantwortlich war. Ungeklärt blieb allerdings, ob durch die konstitutive Anwesenheit des Enzyms in der Zelle die Granulasynthese verhindert wird. Dies könnte dadurch erfolgen, dass die PhaZds die noch „nackten“ Granula angreifen. Alternativ könnten die Enzyme in der Lage sein vollständig ausgebildete Granula mit assoziierten Proteinen an der Oberfläche ebenso erfolgreich anzugreifen. Um diese Frage zu beantworten wurden beide

## Experimente und Ergebnisse

Depolymerasen unter Kontrolle eines induzierbaren Arabinose Promotors ( $P_{BAD}$ ) exprimiert. Als Vektor wurde das pBBR1MCS2 Plasmid verwendet welches über Konjugation in *R. eutropha* gebracht wurde. Die Depolymerasen wurden als eYfp-Fusionen exprimiert, so konnte die Stärke der Expression und die Lokalisierung der Enzyme anhand der grünen Fluoreszenz verfolgt werden. Im Vordergrund dieser Untersuchung stand der PHB Gehalt, der quantitativ mittels Gaschromatografie gemessen wurde. Die Stämme, die bereits beim Animpfen der Hauptkultur mit 0,2% (w/v) Arabinose induziert wurden, bildeten kein bzw. nur geringe Mengen ( $< 15\%$  des Zelltrockengewichtes) PHB während des gesamten Wachstums. Als Kontrolle wurde ein nicht induzierter Stamm kultiviert, der bis zu 40% PHB speichern konnte. Während des Hauptversuches wurden die Stämme 6h in NB + 0,2% NaGlukonat (PHB-Speicherungsmedium) kultiviert bis der PHB-Gehalt mindestens 20% erreicht hatte, dann wurde Arabinose (0,2% (w/v)) zugegeben. Folgend wurde der PHB Gehalt nach weiteren 6 h erneut bestimmt. Die PhaZd1 Depolymerase konnte innerhalb von 6 h den PHB Gehalt in der Zelle auf unter 5% reduzieren. Hierbei handelte sich um ein Enzym das vermutlich in der Lage ist PHB in seiner nativen Form sehr schnell zu hydrolysieren. Es konnte auch die Lokalisierung des Proteins am PHB Granulum gezeigt werden. Die PhaZd2 Depolymerase konnte, wie zuvor gezeigt, die PHB Synthese inhibieren bzw. reduzieren wenn ihre Expression zu Beginn der Hauptkultur induziert wird. Eine spätere Induktion führte in den ersten 6h zu keiner Abnahme des PHB-Gehalts. Nach 12h war der PHB Gehalt im Vergleich zum nicht induzierten Stamm um 50% reduziert. In diesem Fall hatte das Enzym Schwierigkeiten die ausgebildeten, mit Proteinen bedeckte PHB Granula abzubauen.

## Experimente und Ergebnisse



**Abbildung 20: Einfluss der induzierten Expression der PhaZd1 und PhaZd2 Depolymerase in *R. eutropha* H16 auf den PHB Gehalt**

Der *R. eutropha* H16 Stamm mit dem Plasmid pBBR1-MCS2- $P_{BAD}::eYfp\text{-}phaZd1$  und  $phaZd2$  wurde in NB-Medium mit 0,2% (w/v) NaGlukonat kultiviert. Der Versuch wurde mit PHB leeren Zellen gestartet (0h). Nach 6h Kultivierung konnten die Zellen bis zu 20% (vom Trockengewicht) PHB speichern. Nach Zugabe von Arabinose und Induktion der Expression wurde das PHB innerhalb von 6h von PhaZd1 vollständig abgebaut (12h, 24h unten) aber nicht nach der Induktion von PhaZd2. Wurde direkt zu Beginn der Kultivierung induziert, waren in beiden Stämmen keine bzw, nur einzählne PHB-Granula sichtbar. Zur Sichtbarmachung von PHB wurden die Granula mit dem Fluoreszenzfarbstoff Nilrot angefärbt und die Zellen mit einem Nilrot-Filter betrachtet. Der Maßstab entspricht 2  $\mu\text{m}$ .

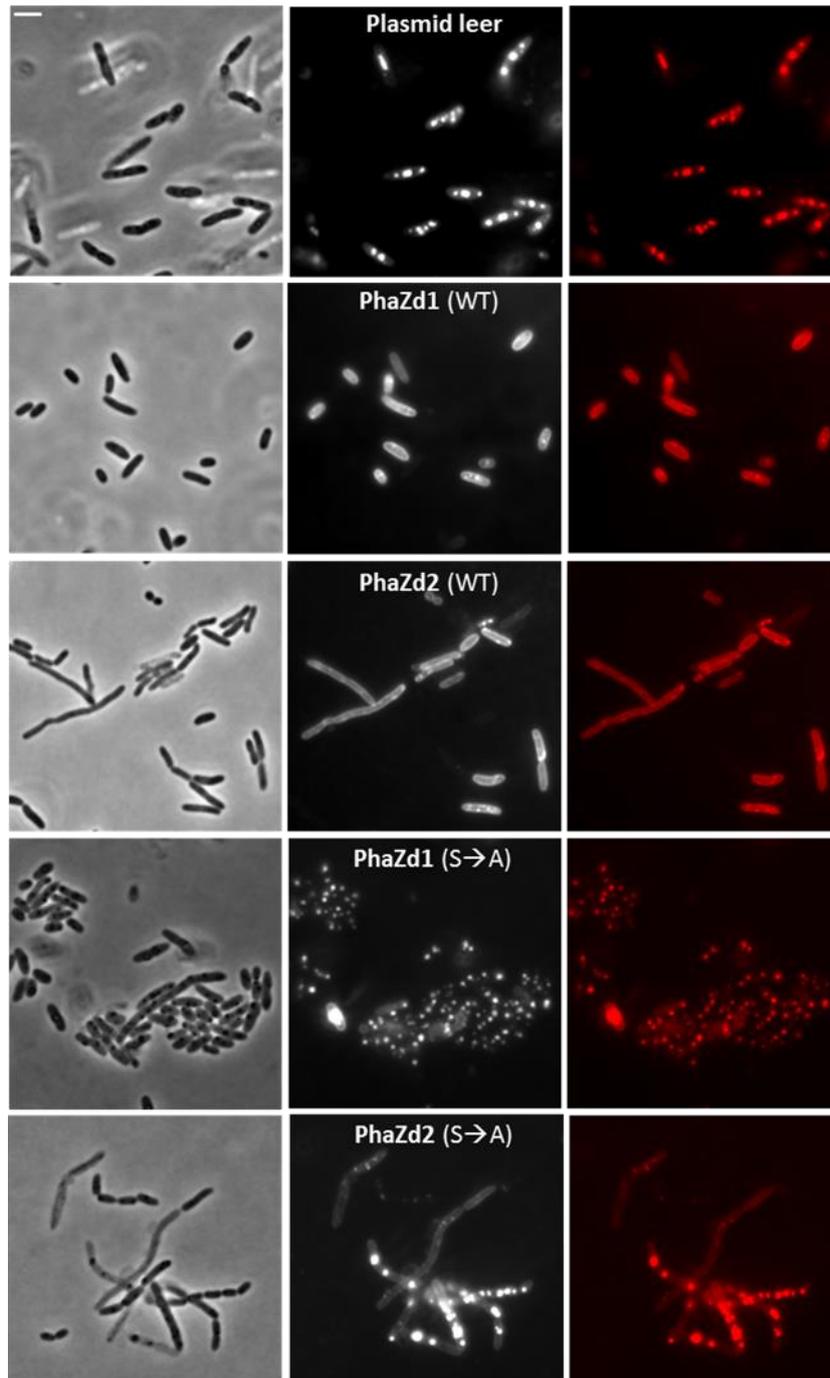
### 3.2.1.3 Expression inaktiver Enzyme

Aus den beschriebenen Versuchen konnten bereits die ersten Hinweise gewonnen werden, dass es sich bei PhaZd1 und PhaZd2 um echte PHB Depolymerasen handelt.

Um zu untersuchen, ob tatsächlich die Aktivität der Depolymerasen oder vielleicht alleine die Anwesenheit oder andere Aktivität für den verringerten PHB-Gehalt in den Stämmen

## Experimente und Ergebnisse

verantwortlich ist, wurden inaktive Formen der Enzyme (mutiert im aktiven Zentrum) in *R. eutropha* exprimiert. PhaZd1 und PhaZd2 gehören beide zu den Serin Hydrolasen mit einer Lipase-Box-Sequenz (GMS<sub>190</sub>AG und GLS<sub>193</sub>AG für PhaZd1 und PhaZd2) als aktives Zentrum, mit dem katalytisch aktiven Serin. Um festzustellen, ob die Enzymaktivitäten der PhaZd1 und PhaZd2 Depolymerasen in der Tat für den PHB-negativen Phänotyp der überexprimierenden Stämme verantwortlich ist, wurde das katalytisch aktive Serin aus dem Lipase Box gegen Alanin ausgetauscht (PhaZd1 (GMA<sub>190</sub>AG) und PhaZd2 (GLA<sub>193</sub>AG)). Für die Herstellung der Mutanten wurde die Quick Change Mutagenese durchgeführt (2.13.7.2) Mutierte Gene wurden in das pBBR1MCS2-P<sub>phaC1</sub>-Plasmid eingebracht. So hergestellte Plasmide wurden in *R. eutropha* H16 mittels Konjugation übertragen und während eines Wachstumsversuchs auf den PHB Gehalt untersucht. Dies wurde sowohl mikroskopisch nach Anfärben der Granula mit dem Fluoreszenzfarbstoff Nilrot als auch mittels Gaschromatographie untersucht. *R. eutropha* H16 Zellen, die die inaktive Varianten von PhaZd1 oder PhaZd2 exprimierten, akkumulierten wieder PHB auf einem Niveau vergleichbar mit dem des Wildtyps. Nach Anfärben der Zellen mit dem Farbstoff Nilrot konnten unter Mikroskop PHB Granula nachgewiesen werden (Abbildung 21). Die GC Messung bestätigte, dass die Expression der inaktiven Varianten kein gravierenden Einfluss auf den PHB Gehalt hatte (max. Gehalt: 31% Wildtyp, 26% Expression inaktiver PhaZd1, 5% Expression aktiver PhaZd1, 38% Expression inaktiver PhaZd2, 15% Expression aktiver PhaZd2). Dieses Ergebnis bestätigte, dass der PHB-negative Phänotyp von *R. eutropha* auf die Depolymeraseaktivität der intakten PhaZd1 und PhaZd2 Proteine zurückzuführen ist. Die Aktivität bzw. das Fehlen der Aktivität wurden *in vitro* in den jeweiligen Zellextrakten bestätigt. Wie auch schon bei den aktiven Varianten führte die Expression der inaktiven Varianten, insbesondere bei PhaZd2, zu verringerter Wachstumsrate und veränderter Zellmorphologie (längere Zellen).



**Abbildung 21: Akkumulierung von PHB in *R. eutropha* Stämmen nach Überexpression von PhaZd1 und PhaZd2 Varianten.**

Zellen von *R. eutropha* mit dem leeren Plasmid (pBBR1-MCS2- $P_{phaC1}$ ) und mit folgenden Inserts: PhaZd1 (WT), katalytisch inaktiver PhaZd1 (S190A), PhaZd2 (WT) und katalytisch inaktiver PhaZd2 (S193A) wurden nach 4 Stunden Wachstum in NB-Medium mit 0,2% NaGlukonat im Phasenkontrast (links) und fluoreszenzmikroskopisch nach Anfärbung mit Nilrot (mitte, rechts) untersucht. *R. eutropha* Zellen, die die inaktive Varianten PhaZd1 (S190A) oder PhaZd2 (S193A) exprimierten, akkumulierten wieder PHB auf einem Niveau vergleichbar mit dem des Wildtyps.

Der Maßstab entspricht 2  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.2 Expression der PhaZd1 und PhaZd2 Depolymerasen in *E. coli* BL21-Zellen und Aufreinigung

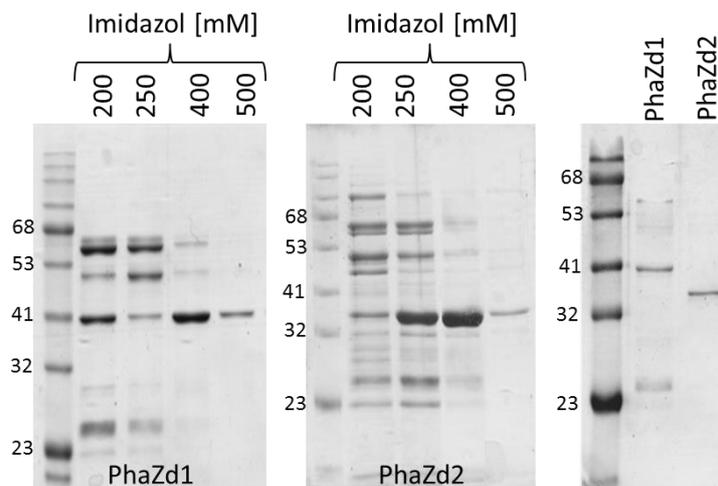
PhaZd1 und PhaZd2 wurden mit einem N-terminalem Hexahistidin-Tag in einem rekombinanten *E.coli* Stamm exprimiert. Auf eine ungefähr zehnstündige Vorkultur in 20 ml LB-Kan-Medium folgte die Hauptkultur in jeweils vier 400 ml-Ansätzen LB-Kan. Bei  $OD_{600} = 0,6$  erfolgte die Zugabe von 0,1 mM IPTG und die weitere Inkubation über 6 h. Alle Schritte erfolgten bei 30°C. Die Zellausbeute nach Zentrifugation für 15 min bei 6000 rpm (Ja-10-Rotor, Beckman Avanti-35 Centrifuge) lag bei ungefähr 5 g Feuchtgewicht. Die Aufreinigung erfolgte über eine standardisierte Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Säulen. Das Eluieren des Proteins erfolgte mit stufenweise steigendem Imidazolgehalt. Für den genaueren Ablauf und verwendete Puffer (siehe 2.9). Die gewonnenen Fraktionen wurden anschließend mit Hilfe eines SDS-Gels (siehe Abbildung 22) auf PhaZd1 und PhaZd2 getestet. In den Eluationsfraktionen 400 mM und 500 mM Imidazol konnten die entsprechenden Banden für die PhaZd1 und PhaZd2 in einer ausreichender Reinheit identifiziert werden. Die Proteine haben ein apparentes Molekulargewicht von 41 kDa (PhaZd1) und 37 kDa (PhaZd2). Die Eluationsfraktionen 400 mM und 500 mM Imidazol wurden gepoolt und das Imidazol mittels Gelfiltrationssäulen PD-10 (GE Healthcare) entfernt. Mit Hilfe eines Bradford-Tests konnte anschließend der Proteingehalt der PhaZd1- und PhaZd2-Pools bestimmt werden. Mit BSA-Standards wurde die dazu nötige Kalibriergerade erstellt (2.10.1). Die Untersuchung ergab folgende Proteinkonzentrationen: 177  $\mu\text{g/ml}$  PhaZd1 und 239  $\mu\text{g/ml}$  PhaZd2.

Nachdem die Expression der Depolymerasen erfolgreich war und die Aufreinigung genug Enzym mit ausreichender Konzentration geliefert hatte, galt es nun zu überprüfen, ob die gereinigten Depolymerasen tatsächlich PHB-Granula zu hydrolysieren vermögen. Hierfür wurden *in vitro*- Aktivitätstests durchgeführt. In Abhängigkeit von der Struktur des jeweiligen PHB-Substrates wird zwischen intrazellulären Depolymerasen, für den Abbau nativer PHB-Granula (nPHB) und extrazellulären Depolymerasen, für den Abbau denaturierter PHB-Granula (dPHB), unterschieden. Aus diesem Grunde war es interessant als erstes zu überprüfen, ob eine Aktivität für den Abbau der nPHB bzw. dPHB Granula vorliegt. Es wurde ein Trübungstest (2.11.1) mit nativen und denaturierten *R. eutropha* PHB Granula als Substrat durchgeführt. Die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit wurde anhand der Geradensteigung ermittelt. Die Berechnung der Enzymaktivitäten erfolgt nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz unter Einbeziehung des apparenten Extinktionskoeffizienten für die native PHB Granula ( $\epsilon =$

## Experimente und Ergebnisse

1,2  $\mu\text{l} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). Die Aktivität der Depolymerasen wurde Units (U) angegeben, wobei 1 U als 1  $\mu\text{g}$  umgesetztes nPHB pro Minute definiert wurde.

Die Messung für die Kontrolle mit Granulasuspension ohne Zugabe von Depolymeraselösung zeigte keine nennenswerte Trübungsabnahme. Für die Enzymlösungen konnte dagegen eine spezifische Aktivität von 12000 (PhaZd1) und 850 (PhaZd2) U/mg für die Hydrolyse nPHB bestimmt werden. Keine der beiden Depolymerasen zeigte Aktivität mit dPHB. Diese Ergebnisse bestätigten die postulierte Funktion von PhaZd1 und PhaZd2 als iPHB Depolymerasen und stimmen bezüglich PhaZd1 mit den veröffentlichten Daten für PhaZd1 überein (Abe et al., 2005).



**Abbildung 22: SDS-PAGE der rekombinanten PhaZd1 und PhaZd2 Depolymerasen nach der Aufreinigung über NiNTA Säule.**

Der erste Spur repräsentiert den Proteinmarker (BlueStar Prestained Protein Marker, Nippon Genetics) (5  $\mu\text{l}$ ), gefolgt von Wasch- bzw. Elutionsfraktionen mit verschiedenen Konzentrationen Imidazol (200mM, 250mM, 400mM, 500mM) (je 5 $\mu\text{l}$ ). Das letzte Gel (rechts) zeigt je 2  $\mu\text{g}$  des aufgereinigten Enzyms. Alle Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

### 3.2.3 Biochemische Charakterisierung von PhaZd1 und PhaZd2

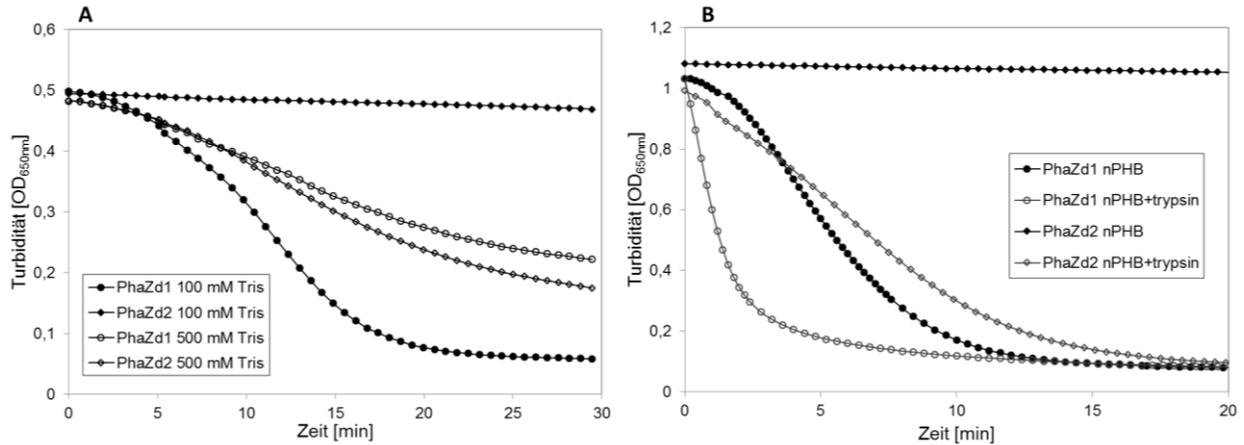
#### 3.2.3.1 Untersuchung des Einflusses von Ionenstärke und Trypsin auf die nPHB Depolymeraseaktivität

Nachdem eine eindeutige hydrolytische Aktivität gegenüber nPHB festgestellt wurde, konnte eine weitere biochemische Charakterisierung für beide Enzyme durchgeführt werden. Wie bereits angegeben wies gereinigtes PhaZd1 eine deutlich höhere nPHB Depolymerase Aktivität in 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 als PhaZd2 auf. PhaZd1 hydrolysierte eine PHB Suspension mit einem  $\text{OD}_{650}$  Wert von 1 fast vollständig in nur 20 min (Abbildung 23A),

ähnlich den extrazellulären PHB Depolymerase wie z.B. PhaZ7 von *Paucimonas lemoignei* (Handrick et al., 2001). Interessant war eine Lag-Phase von ca. 5 min, bevor die maximale Hydrolyserate erreicht wurde. Das Enzym braucht vermutlich einige Minuten, um die Oberflächenstruktur der nPHA-Granula für den Abbau zugänglich zu machen. Im Gegensatz dazu hatte PhaZd2 unter gleichen Bedingungen (0,1M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5) niedrigere spezifische nPHB Depolymerase-Aktivität (850 U/mg). Wenn jedoch die Versuchsbedingungen wie z.B. die Ionenstärke verändert wurden (Puffer mit 0.5M Tris-HCl bei pH 8,5 anstelle von 0,1M Tris) oder wenn nPHB Granula aus einem *R. eutropha* H16  $\Delta phaP1$  oder  $\Delta (phaP1-phaP5)$  Stamm verwendet wurden, kam es bei PhaZd2 zu einer starken Erhöhung der nPHB Depolymerase Aktivität. Es konnte eine bis zu 21-fache Steigerung gemessen werden (16800 U/mg) (Abbildung 23, Tabelle 10).

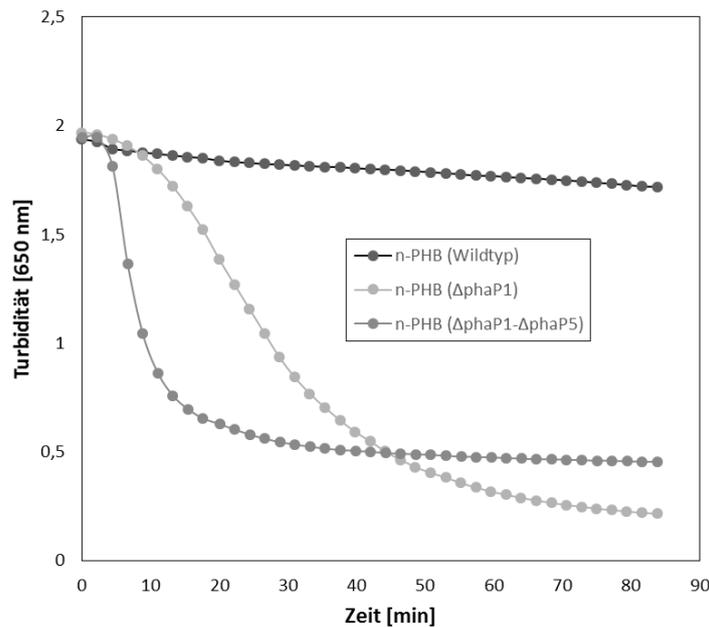
In intrazellulären, nativen PHB-Granula liegen die Polymerketten ungeordnet in einem amorphen Zustand vor und sind von Proteinen umgeben. Es ist bekannt, dass einige PHB Depolymerasen nach der Vorbehandlung der PHB Granula mit Trypsin eine höhere nPHB Depolymerase-Aktivität aufweisen. Dies ist wahrscheinlich auf eine bessere Zugänglichkeit des Polymers zurückzuführen, da ein Teil der proteinhaltigen Oberflächenschicht enzymatisch entfernt wurde (Handrick et al., 2004b; Merrick und Doudoroff, 1964). Die bereits charakterisierten intrazellulären PHB Depolymerasen wie z.B. PhaZa1 aus *R. eutropha* oder PhaZ aus *B. thuringiensis* brauchen eine Vorbehandlung der Granula mit Trypsin, um die PHB Hydrolyse zu ermöglichen (Tseng et al., 2006; Uchino et al., 2008). Es wurde daher der Einfluss der Trypsin Behandlung von nPHB Granula auf die Aktivität der PhaZd1 und PhaZd2 Depolymerasen untersucht. PhaZd1 hydrolysiert Trypsin-behandelte nPHB Granula mit fast doppelter Aktivität (24000 U/mg) und PhaZd2 zeigt eine 15-fach höhere Aktivität gegenüber unbehandelten nPHB Granula (13000 U/mg) in 0,1M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 (Abbildung 23 B). Bemerkenswert ist, dass sowohl bei PhaZd1 als auch bei PhaZd2, keine Lag-Phase bei der Hydrolyse von Trypsin-aktivierten Granula beobachtet wurde.

## Experimente und Ergebnisse



**Abbildung 23: Trübungstest zur Aktivitätsmessung der aufgereinigten PhaZd1 und PhaZd2 Depolymerasen**

PHB Depolymerase Aktivität wurde gemessen als Trübungsabnahme einer PHB Suspension bei 650 nm, 30°C und einem pH-Wert von 8,5. Die Aktivität der PhaZd1 und PhaZd2 wurden im Tris/HCl Puffer mit unterschiedlicher Konzentration (100 mM und 500 mM) verglichen (A). Einfluss von Trypsin auf die Depolymeraseaktivität wurde in 100 mM Tris/HCl Puffer untersucht (B). Die Aktivität der PhaZd2 Depolymerase konnte durch Veränderung der Pufferkonzentration (von 0,1 M auf 0,5 M) um das 21-fache gesteigert werden. Die Behandlung mit Trypsin hatte auf beide Enzyme einen positiven Einfluss.



**Abbildung 24: Trübungstest der aufgereinigten PhaZd2 Depolymerase mit nPHB Granula aus einem *R. eutropha* H16  $\Delta phaP1$  oder  $\Delta(phaP1-phaP5)$  Stamm**

PHB Depolymerase Aktivität wurde als Trübungsabnahme einer nPHB Suspension bei 650 nm, 30°C und einem pH-Wert von 8,5 in 100mM Tris/HCl Puffer gemessen. Es wurden nPHB Granula aus dem *R. eutropha* H16 Wildtyp,  $\Delta phaP1$  oder  $\Delta(phaP1-phaP5)$  Stamm als Substrat verwendet. Wenn Granula ohne den Phasinen eingesetzt wurden, kam es bei PhaZd2 zu einer starken Erhöhung der nPHB Depolymerase Aktivität.

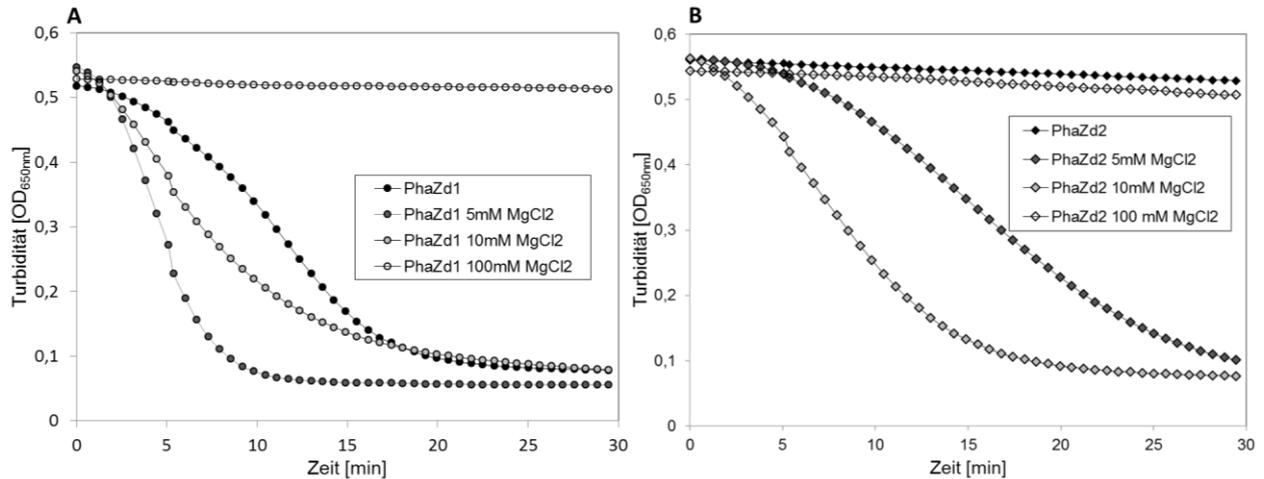
### 3.2.3.2 pH-Stat

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Depolymeraseaktivität um die Ergebnisse des Trübungstests zu bestätigen, ist die Messung der Säurefreisetzung im pH-Stat (3.2.3.2). Zum Starten der Hydrolyse wurden 12 µg der aufgereinigten PhaZd1 bzw. PhaZd2 Depolymerase zum Testansatz, bestehend aus, 1 mM Tris-HCl-Puffer mit Trypsin behandelten nPHB Granula, zugegeben. Der pH-Wert im Reaktionsgefäß wurde kontinuierlich gemessen und durch Zugabe von 50 mM KOH konstant gehalten von 8,5. Über deren Verbrauch lässt sich direkt die Säurefreisetzung feststellen. Bei beiden Enzymen stellte sich eine deutliche Säurefreisetzung-Rate ein, die über mindestens 30 Minuten mit konstanter Rate verlief. Tris-HCl-Puffer bindet bei pH-Werten größer als 7 Kohlenstoffdioxid aus der Luft. Die daraus resultierende Ansäuerung verursacht neben der Säurefreisetzung durch hydrolysiertes nPHB, einen zusätzlichen pH-Abfall. Diesem muss über Zutitration von KOH entgegengewirkt werden. Daher wurde in einem weiteren Versuch zusätzlich eine Blindrate der Ansäuerung des Puffers ohne Enzym bestimmt und von der erhaltenen Gesamtrate abgezogen. Mit dieser Methode konnte eine Freisetzungsrate von 83 bzw. 190 µmol Säure / min / mg Protein für PhaZd1 und PhaZd2 bei einem pH-Wert 8,5 bestimmt werden.

### 3.2.3.3 Salze

Ein unerwartetes Ergebnis zeigte sich, bei der Untersuchung der Abhängigkeit der PhaZd1 oder PhaZd2 Aktivität von Salzen. Niedrige Konzentrationen (1 bis 5 mM) von zweiwertigen Kationen ( $MgCl_2$  oder  $CaCl_2$ ) erhöhten die Depolymerase Aktivität von PhaZd1 2- bis 4-fach und die der PhaZd2 2- bis 11-fach (Abbildung 25). Die Aktivität von PhaZd1 war entgegen der von PhaZd2, bei einer Konzentration der zweiwertigen Salze von 10 mM niedriger als bei einer Konzentration von 5 mM. Bei PhaZd2 konnte weitere Erhöhung beobachtet werden. Hier lag eine 2- bis 3- fach höhere Aktivität als bei 5 mM und 30- bis 37- fach höhere als im Puffer ohne Salze vor. Bei 100 mM  $MgCl_2$  oder  $CaCl_2$ , war PhaZd1 fast inaktiv und die Aktivität der PhaZd2 wurde auf die Werte, die in Abwesenheit von Salzen gemessen wurden, reduziert (Abbildung 25). Einwertige Ionen (KCl) hatten weniger drastische Auswirkungen bei einer Konzentration von 10 oder 100 mM. Zusammenfassend benötigt sowohl PhaZd1 als auch PhaZd2 Salze (1-10 mM) für die maximale Depolymerase Aktivität, allerdings werden beide von einer hohen Salzkonzentration gehemmt (100 mM). Der Einfluss der Salze auf die Aktivität von PhaZd2 war signifikant höher als bei der PhaZd1.

## Experimente und Ergebnisse



**Abbildung 25: Einfluss von Salzen auf die Depolymeraseaktivität von PhaZd1 und PhaZd2**

PHB Depolymerase Aktivität wurde gemessen als Trübungsabnahme einer PHB Suspension bei 650 nm in 100 mM Tris/HCl Puffer pH=8,5 und 30°C. Dargestellt ist der Einfluss der verschiedenen Konzentrationen von MgCl<sub>2</sub> auf die Aktivität von PhaZd1 (A) und PhaZd2 (B). Die Zugabe von 5 mM MgCl<sub>2</sub> führte bei beiden Enzymen zur Erhöhung der Aktivität. Weitere Erhöhung der MgCl<sub>2</sub> Konzentration auf 10 mM hatte nur bei PhaZd2 einen positiven Effekt. Die Zugabe von 100 mM MgCl<sub>2</sub> hatte eine inhibierende Wirkung auf PhaZd1 und keinen Einfluss auf PhaZd2.

### 3.2.3.4 Esterase Aktivität

Wie bereits beschrieben, wiesen die PhaZd1 und PhaZd2 Depolymerasen eine auf nPHB Granula begrenzte Aktivität auf. Eine deutliche Erhöhung der Aktivität und Verkürzung der Lag-Phase konnte durch Zugabe von Trypsin erreicht werden. Der gleiche Effekt konnte durch Verwendung Phasin-loser Granula ( $\Delta(\text{phaP1-phaP5})$ ) erzielt werden (Abbildung 24). Auch Salze schienen einen positiven Einfluss zu haben. Besonders interessant ist die Aktivitätscharakteristik von PhaZd2, da hier die Aktivität um das 15- bis 37-fache erhöht werden konnte. Ob der Effekte der Salze direkt mit der Veränderung der PHB Granula, durch z.B. Erhöhung der Zugänglichkeit verknüpft ist, wurde überprüft indem die Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacylester gemessen wurde. Wie auch andere PHB Depolymerasen oder andere hydrolytische Enzyme sind PhaZd1 und PhaZd2 in der Lage substratverwandte *p*-Nitrophenylacylester umzusetzen, wenn auch mit nur geringer Aktivität.

Hier hatten Salze keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der PhaZd1 und PhaZd2 bei der Hydrolyse von *p*-Nitrophenylbutyrat (*p*NPB). PhaZd1 konnte *p*NPB mit einer spezifischen Aktivität von 207,1 U/g bzw. nach Zugabe von 1mM CaCl<sub>2</sub> von 182,6 U/g und PhaZd2 mit 51,6 bzw. 64,2 U/g.

### 3.2.3.5 Einfluss anderer Substanzen

Für den Abbau der nPHB Granula wurde für beide untersuchten PHB Depolymerasen der Esterspaltungsmechanismus der Serin-Hydrolase angenommen. Für einen experimentellen Nachweis wurde ein Hemmtest mit einem Serin-Hydrolase-Inhibitor durchgeführt. Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) wurde auf eine mögliche inhibitorische Wirkung untersucht. Bei einer Konzentration von 10 mM konnte eine fast vollständige Hemmung der Enzymaktivität bei PhaZd1 gemessen werden. Bei PhaZd2 verursachte die gleiche Konzentration eine Verminderung der Aktivität um ca. 40%. Zur Detektion von Gruppen, die für die katalytische Funktion möglicherweise essentiell sind, wurde mit weiteren Agentien gearbeitet. Um eine Beteiligung von Cysteinresten an einer möglichen Stabilisierung des Enzyms über Disulfidbrücken zu prüfen, wurden bis zu 4 mM DTT oder DTE, als Reduktionsmittel zugesetzt. PhaZd1 wurde in Gegenwart von 1 mM DTT bzw. DTE signifikant gehemmt (siehe Tabelle 10). Die inhibitorische Wirkung war bei PhaZd2 erst ab einer Konzentration von 4 mM bemerkbar. Eine Alkylierung von Cysteinseitenketten durch Jodacetamid beeinflusste die hydrolytische Aktivität ebenfalls negativ. Gegenüber ionischen (SDS) und nichtionische Detergentien (TritonX100) erwies sich PhaZd1 und PhaZd2 als sehr sensitiv. Die nPHB-Hydrolyse wurde bereits in Gegenwart von 0,01% (v/v) vollständig gehemmt. Die Auswirkungen aller getesteten Substanzen auf die Aktivität der PhaZd1 und PhaZd2 sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

## Experimente und Ergebnisse

**Tabelle 10: Eigenschaften von Depolymerasen PhaZd1 und PhaZd2**

relative Aktivität [%]	PhaZd1	PhaZd2	PhaZd1	PhaZd2
<b>Substrat/Puffer</b>	0,1 M Tris	0,1 M Tris	0,5 M Tris	0,5 M Tris
n-PHB	100	100	40 ± 1	2100 ± 56
n-PHB+trypsin	190 ± 1	1540 ± 34	ND	ND
d-PHB	<4	<4	ND	ND
	PhaZd1	PhaZd2	PhaZd1	PhaZd2
<b>Detergentien:</b>		<b>0.01%</b>		<b>0.1%</b>
Triton X-100	<4	<4	<4	<4
SDS	<4	<4	<4	<4
<b>Salze:</b>		<b>1 mM</b>		<b>5 mM</b>
MgCl <sub>2</sub>	210 ± 5	690 ± 23	250 ± 15	870 ± 17
CaCl <sub>2</sub>	380 ± 24	260 ± 54	380 ± 48	1100 ± 620
<b>Salze:</b>		<b>10 mM</b>		<b>100 mM</b>
MgCl <sub>2</sub>	100 ± 3	3700 ± 320	<4	140 ± 2
CaCl <sub>2</sub>	360 ± 17	3000 ± 760	<4	110 ± 8
KCl	100 ± 1	110 ± 12	190 ± 10	330 ± 4
<b>Komplexbildner:</b>		<b>1 mM</b>		<b>5 mM</b>
EDTA	120 ± 3	130 ± 4	260 ± 4	180 ± 11
EDTA+MgCl <sub>2</sub> (2 mM)	160 ± 5	100 ± 33	150 ± 1	29 ± 1
EDTA+CaCl <sub>2</sub> (2 mM)	130 ± 2	260 ± 16	110 ± 4	190 ± 1
<b>Redox-Mittel:</b>		<b>1 mM</b>		<b>4 mM</b>
DTE *	17 ± 1	100 ± 6	10 ± 1	41 ± 3
DTT*	18 ± 2	84 ± 8	11 ± 1	83 ± 9
<b>Alkylierende Substanzen:</b>		<b>1 mM</b>		<b>10 mM</b>
Iodoacetamide *	61 ± 2	83 ± 6	63 ± 3	76 ± 7
<b>Serinhydrolasehemmerstoffe :</b>		<b>1 mM</b>		<b>10 mM</b>
PMSF *	31 ± 1	100 ± 9	12 ± 1	64 ± 6

**PhaZd1** 100% Aktivität ist 12400 U/mg

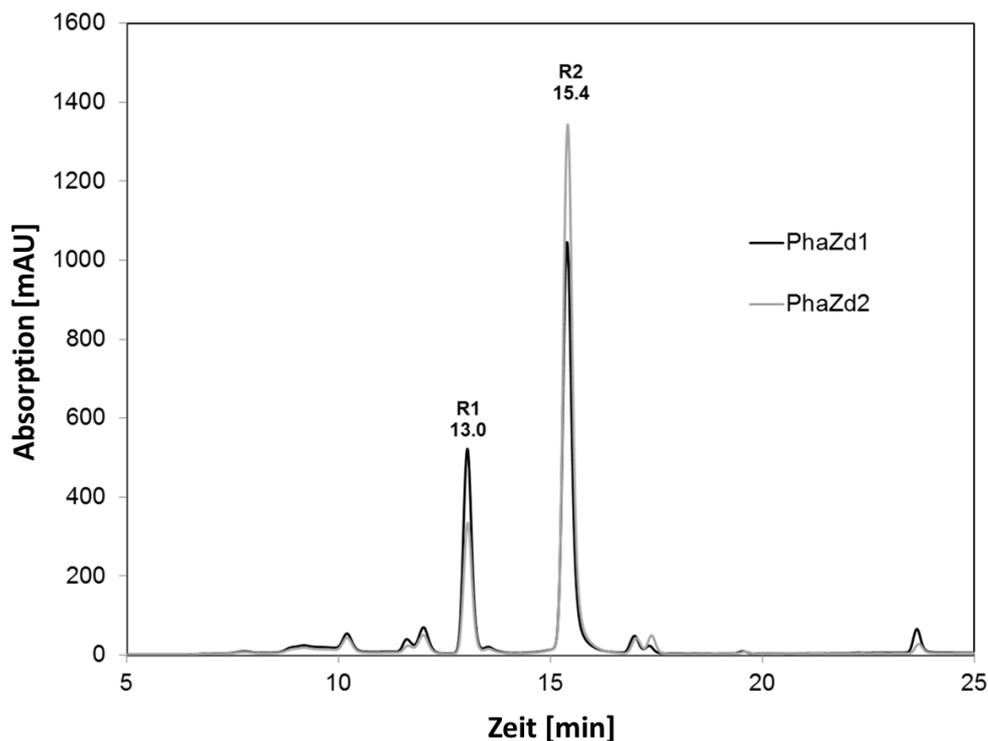
**PhaZd2** 100% Aktivität ist 850 U/mg

1 U = 1 µg PHB/min

\* Trypsin-aktivierte native PHB Granula

### 3.2.3.6 Identifizierung der Abbauprodukte mittels HPLC

Zur Ermittlung der Produkte des enzymatischen Polymer-Abbaus wurden die Depolymerasen mit dem Substrat (nPHB-Granula) inkubiert bis die Trübung der milchigen nPHB-Suspensionen nahezu vollständig verschwunden war. Die Abbauprodukte wurden mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) bestimmt. Die Produkte der PHB-Hydrolyse wurden für den Nachweis mit Bromophenacylbromid (BPB) derivatisiert (2.12). Als Standards wurden derivatisiertes 3-Hydroxybutyrat-Monomer (R1) und Dimer (R2) verwendet. Beide PHB Depolymerasen bildeten eine Mischung aus dem 3-Hydroxybutyrat Monomer und Dimer im Falle von PhaZd1 in einem 1:3 Verhältnis und bei PhaZd2 in einem Verhältnis von 1:4. Dieses Ergebnis war früher erhobenen Daten für PhaZd1 ähnlich (Abe et al., 2005) Trimere und höhere Oligomere konnten nach vollständig abgelaufener Hydrolyse nicht nachgewiesen werden (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Auftrennung der Produkte von PhaZd1 und PhaZd2 nach Hydrolyse von nPHB mittels HPLC.**

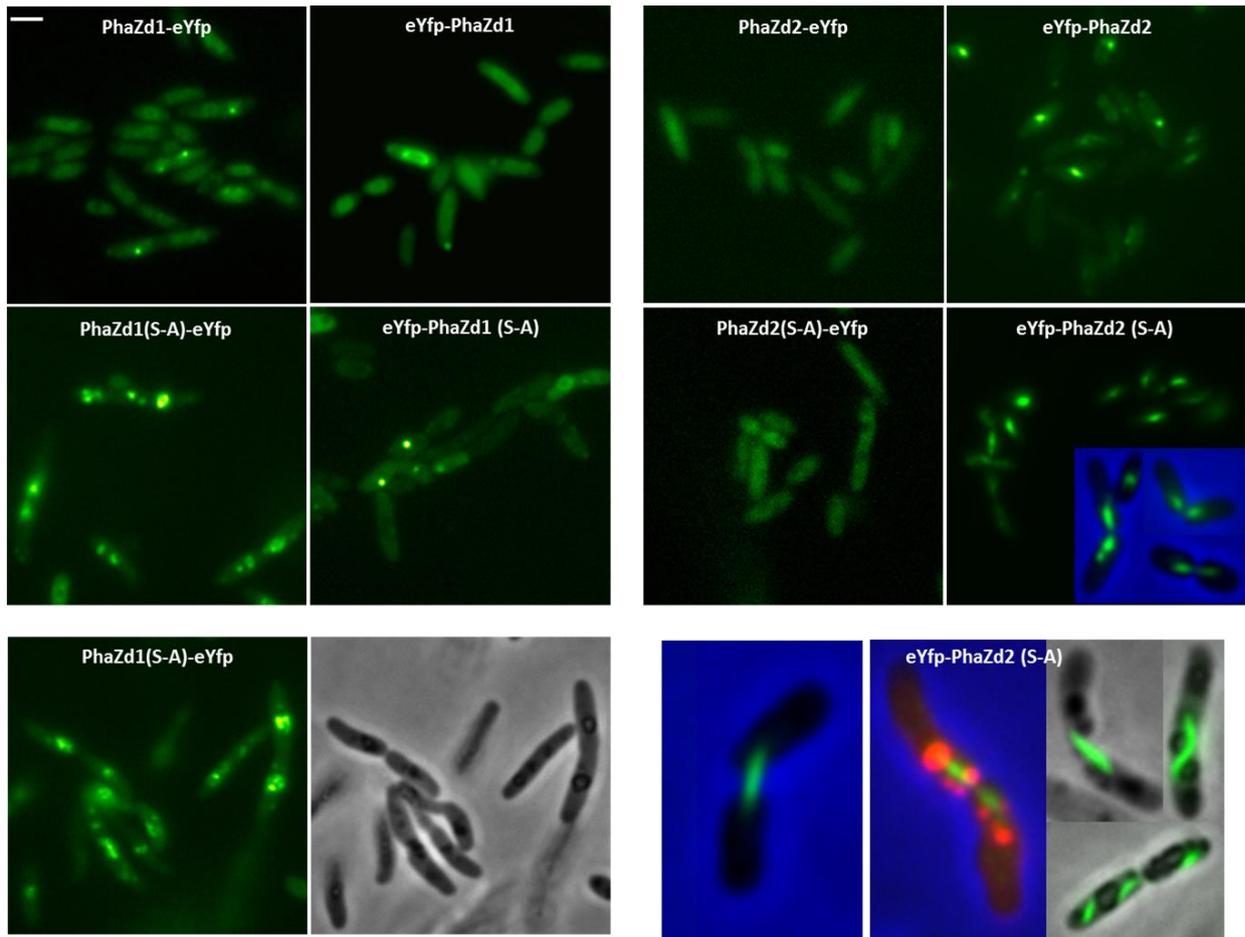
Die Reaktion wurde in einem Volumen von 1 ml in 0,1 M Tris/HCl Puffer, pH=8,5 und einer anfänglichen  $OD_{650}$  ca.1 durchgeführt. Lösliche Produkte wurden nach einer 20 min Reaktionszeit und Abtrennung durch Zentrifugation mit Bromophenacylbromid derivatisiert und mittels HPLC getrennt. Die Elutionszeiten der 3-Hydroxybutyrat Monomer (R1) und Dimer (R2) Derivate betrug 13,0 bzw. 15,4 min. PhaZd1 und PhaZd2 stellten eine Mischung aus 3- Hydroxybutyrat Monomeren und Dimeren her.

### 3.2.4 Intrazelluläre Lokalisierung von PhaZd1 und PhaZd2

Für den Fall, dass die physiologische Funktion von PhaZd1 und PhaZd2 die Mobilisierung der akkumulierten PHB Granula wäre, sollten die Enzyme ebenso in der Lage sein an nPHB Granula *in vivo* zu binden, wie es zuvor für andere iPHB Depolymerasen beschrieben wurde (Sznajder und Jendrossek, 2011; Uchino et al., 2008). Modifikation der Oberfläche der PHB Granula durch Proteine mit Depolymerase Aktivität könnte ein Weg sein, die Synthese und den Abbau des gespeicherten PHB zu regulieren. Um die Lokalisierung der Enzyme *in vivo* zu untersuchen, wurden Fusionen von PhaZd1 und PhaZd2 mit eYfp konstruiert. Das fluoreszenzierende Protein eYfp wurde sowohl am C- als auch am N-Terminus von PhaZd1 und PhaZd2 fusioniert und alle vier Fusionen wurden auf dem *broad host range*-Plasmid pBBR1MCS2, in den *E. coli* S17-1 Stamm transformiert und über Konjugation in den *R. eutropha* H16 Stamm übertragen. Die Akkumulierung von PHB wurde in den so gewonnenen Transkonjuganten während der Kultivierung unter PHB Speicherungsbedingungen (Wachstum auf NB-Medium mit 0,2% (w/v) NaGlukonat) untersucht. Die Expression der katalytisch aktiven Fusionsproteine (PhaZd1-eYfp, eYfp-PhaZd1, PhaZd2-eYfp und eYfp-PhaZd2) unter der Kontrolle des konstitutiven  $P_{phaC}$  Promotors, wurde über den Nachweis der Depolymerase-Aktivitäten in den jeweiligen Zellextrakten bestätigt. Zum Nachweis der PHB Granula wurde die Anfärbung der Zellen mit dem Farbstoff Nilrot verwendet. Dies ergab, dass die meisten Zellen, in den ersten 10h des Wachstums, kaum PHB enthielten. Erst nach 12h und bei späteren Wachstumsstadien war eine geringe Menge an PHB Granula in den Zellen nachweisbar. Offenbar ist die Expression der Fusionsproteine für die *in vivo* Depolymerase Aktivität, ähnlich wie bei den Proteinen welche nicht als Fusion exprimiert wurden (Abbildung 27), verantwortlich. Das akkumulierte PHB wurde rasch durch die Depolymerasen abgebaut. Im Prinzip wurde das gleiche Ergebnis erhalten, wenn PhaZd1 und PhaZd2 Fusionen unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors exprimiert ( $P_{BAD}$ ) wurden. Abhängig vom Zeitpunkt der Induktion mit Arabinose, wurde der PHB-Gehalt der Zellen mit Fusionsproteinen (PhaZd1-eYfp, eYfp-PhaZd1, PhaZd2-eYfp und eYfp-PhaZd2) schnell verringert (Studienarbeit, Anja Frank). Aufgrund der raschen Hydrolyse von PHB, ausgelöst durch die Expression der Fusionsproteine PhaZd1 und PhaZd2, konnte eine potenzielle Kollokalisierung von PHB-Granula mit den Depolymerasen PhaZd1 und PhaZd2 nicht untersucht werden. Eine Möglichkeit, die Bindung an die PHB Granula zu untersuchen, wäre die Arbeit mit inaktivierten Enzymen, in denen lediglich die Hydrolyse des Polymers inaktiviert, aber die Bindekapazität an die Oberfläche des Polymers nicht verändert wurde. Deshalb wurden die aktiven Zentren der Depolymerasen (GMS<sub>190</sub>AG [PhaZd1] und

## Experimente und Ergebnisse

GLS<sub>193</sub>AG[PhaZd2] verändert indem, in allen vier Fusionsproteinen, Serin gegen Alanin ausgetauscht wurde. Die Akkumulierung von PHB wurde in den so gewonnenen Stämmen während der Kultivierung unter PHB Speicherungsbedingungen wiederholt. Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ergab für alle rekombinanten Stämme, dass die Zellen wieder in der Lage waren PHB in Form von mehreren Granula pro Zelle, ähnlich dem Wildtyp, zu speichern. Dies konnte mit der Nilrotfärbung nachgewiesen werden. Offenbar sind die inaktiven PhaZd1- und PhaZd2-Fusionen nicht mehr in der Lage, das gespeicherte PHB zu hydrolysieren. Wenn die intrazelluläre Lokalisierung der PhaZd1(S190A)-eYfp und eYfp- PhaZd1(S190A) Fusionen untersucht wurde, konnte festgestellt werden, dass das Fluoreszenzsignal der Fusionsproteine mit den PHB-Granula kolokalisiert vorlag (Abbildung 27). Dies deutet darauf hin, dass PhaZd1 die Fähigkeit besitzt an die PHB Granulaoberfläche *in vivo* zu binden. Schwache Fluoreszenz wurde jedoch auch im Zytoplasma der Zellen beobachtet. Anscheinend bindet nur ein Teil des exprimierten Proteins an die Granula und das restliche verbleibt in Lösung. Vermutlich führte die konstitutive Expression der Fusionsproteine zu mehr PHB Depolymerase Molekülen als auf der Oberfläche der PHB-Granula binden konnten. Wenn der gleiche Versuch mit der inaktiven C-terminalen Fusion von PhaZd2 (PhaZd2- eYfp) durchgeführt wurde, war die Fluoreszenz nur im Zytoplasma vorhanden und die PHB-Granula wurden nicht markiert (Abbildung 27). Gelegentlich wurden Fluoreszenz-*Foci* beobachtet, die nicht mit den PHB-Granula kolokalisiert waren. Diese stellten möglicherweise Aggregate oder Einschlusskörper dar. Eine interessante Beobachtung wurde gemacht wenn die intrazelluläre Lokalisation der inaktiven N-terminalen Fusion von PhaZd2 (eYfp-PhaZd2) untersucht wurde. In diesem Fall war die grüne Fluoreszenz in Form von fadenartigen Strukturen reproduzierbar beobachtbar (Abbildung 27). Die Fäden wurden zum Beginn des Wachstums oft in der Zellmitte sichtbar. In den späteren Wachstumsstadien befanden sich diese Strukturen oft in der Nähe des Zellpols nicht selten an der Einschnürungsstelle also zwischen den Tochterzellen nach der Zellteilung (Abbildung 27). Kolokalisierung mit den PHB-Granula wurde nicht beobachtet. Abschließend lässt sich sagen, dass beide PHB Depolymerasen PhaZd1 und PhaZd2 PHB Granula *in vivo* hydrolysieren konnten. Es konnte jedoch nur für die inaktive Variante von PhaZd1 eine Kolokalisierung mit PHB-Granula *in vivo* bestätigt werden. Die Bedeutung der fadenartigen Strukturen für eYfp-PhaZd2 ist unbekannt.



**Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der intrazellulären Lokalisierung von PhaZd1 und PhaZd2**

Proteinfusionen von eYFP (N- und C-terminal) mit PhaZd1 und inaktivem PhaZd1 (S190A) (oben, links) sowie mit PhaZd2 und inaktivem PhaZd2 (S193A) (oben, rechts) wurden nach 4h Wachstum in NB-Medium mit 0,2% NaGlukonat mikroskopisch untersucht. Die Kolokalisierung der Fusion PhaZd1(S190A)-eYfp mit den PHB-Granula ist unten rechts zu sehen. Für die Fusion eYfp-PhaZd2 (S-A) sind zusätzlich vergrößerte Aufnahmen dargestellt (Bilder mit blauem Hintergrund). Hier bildet die Fusion spindelartige Strukturen. Auf dem mittleren Bild unten rechts ist die Zelle mit dem Farbstoff Nilrot angefärbt um die PHB Granula sichtbar zu machen.

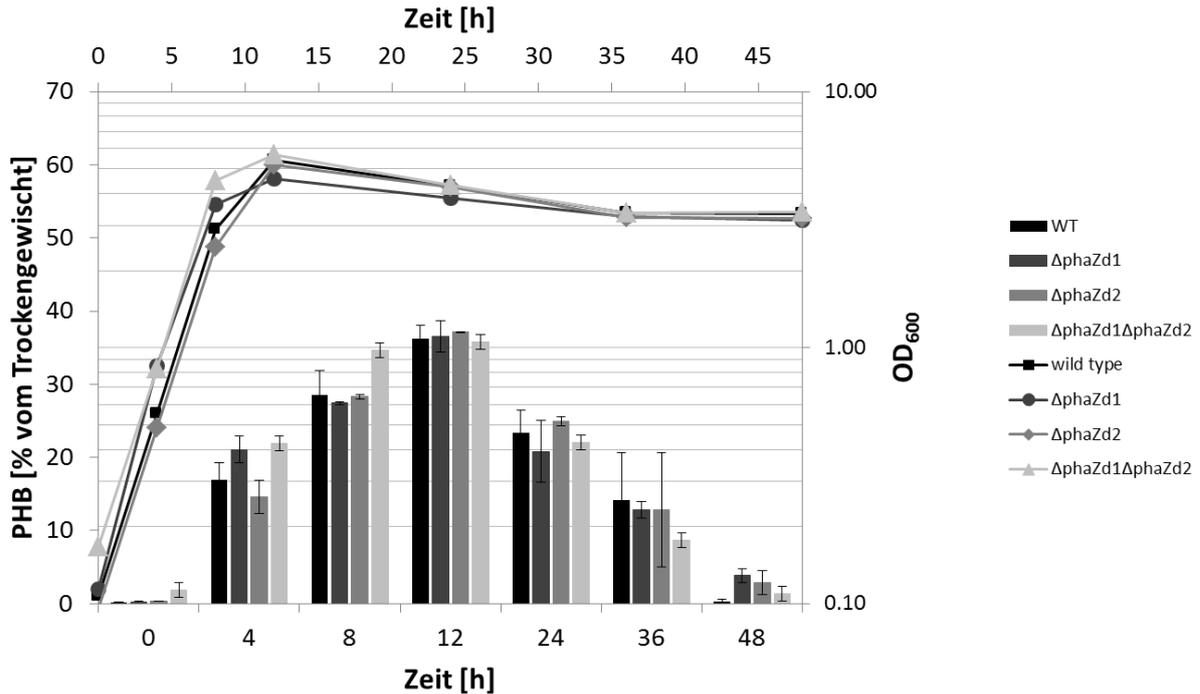
Bilder wurden mit einer Schwarz-Weiss-Kamera (CoolSnapCF, Photometrics, Tucson, USA) aufgenommen und mit Hilfe der Software MacBiophotonics ImageJ bearbeitet.

Der Maßstab entspricht 2µm.

### 3.2.5 Deletion der *phaZd1* und *phaZd2* Gene

Bisherige Ergebnisse liefern starke Hinweise auf eine hohe Aktivität der PhaZd1 und PhaZd2 Depolymerasen *in vitro* und *in vivo*. In bereits durchgeführten Experimenten wurden die untersuchten Enzyme, mit dem Ziel die Auswirkung auf den PHB Gehalt zu untersuchen und die Lokalisierung durchzuführen, in aktiver bzw. inaktiver Form in *R. eutropha* H16 Zellen exprimiert. Eine wichtige Methode zur Ermittlung der Funktion eines putativen Enzyms ist die Herstellung eine Deletionsmutante und Beschreibung des Phänotyps. Die Deletionsmutante für die PhaZd1 Depolymerase wurde bereits in der Arbeit von (Abe et al.,

2005) beschrieben. Die Autoren konnten zeigen, dass die Deletion zu einer leichten Zunahme des PHB Gehaltes während der Akkumulierungsphase geführt hat. Der Abbau aber war überraschenderweise unter Abbaubedingungen nicht betroffen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass der Phänotyp der *phaZd1* Deletionsmutante durch das Vorhandensein einer zusätzlichen Depolymerase wie vielleicht PhaZd2 unterdrückt wird. Zwar konnte bereits gezeigt werden, dass beide Depolymerasen eine eindeutige hydrolytische Aktivität gegenüber nPHB aufwiesen, allerdings war die Expression entweder konstitutiv (unter Kontrolle des  $P_{phac}$  Promotors) oder wurde mit Arabinose induziert ( $P_{BAD}$ ). Um den Einfluss der Wildtyp Expression von *phaZd1* und *phaZd2* auf die Mobilisierung des gespeicherten PHB zu untersuchen und zusätzlich den Aufhebungseffekt des *phaZd2* Gens bei der *phaZd1* Deletion zu überprüfen, wurden chromosomale Einzeldelentionsmutanten  $\Delta phaZd1$  und  $\Delta phaZd2$  sowie eine Doppelmutante  $\Delta phaZd1\Delta phaZd2$  konstruiert (2.13.8). Diese drei Mutantenstämme und der Wildtyp wurden in NB-Medium mit 0,2% NaGlukonat über 48h kultiviert. Während des Wachstums wurde die optische Dichte bei 600 nm und der PHB Gehalt mittels Gaschromatographie verfolgt. Der Verlauf der Wachstumskurven, die Wachstumsraten (0,4 [OD<sub>600</sub>/h]) sowie der PHB Gehalt waren bei den Deletionsmutanten ähnlich der des Wildtyps. Auch nach Wiederholungsversuchen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp Stamm und den untersuchten Mutanten festgestellt werden. Ein folgender Verlauf von der Synthese und dem Abbau war bei allen der untersuchten Stämme erkennbar: eine Zunahme des PHB Gehaltes von unter 10% bis zu einem maximalem Wert von ca. 37% nach 12h und kontinuierliche Abnahme bis auf unter 5% nach 48h. Bemerkenswert war vor allem, dass alle drei Mutanten keinen Unterschied in dem Abbau von PHB während der stationären Wachstumsphase zeigten. Zwar hatte die Doppelmutante  $\Delta phaZd1\Delta phaZd2$  einen leicht erhöhten PHB Gehalt zum Zeitpunkt 4h und 8h, allerdings verschwand dieser Unterschied komplett während der Abbauphase. Diese Daten zeigten, dass weder *phaZd1* noch *phaZd2* eine signifikante Auswirkung auf die PHB Akkumulation hatten und keiner von ihnen für die Mobilisierung von PHB in *R. eutropha* erforderlich war.



**Abbildung 28: Verlauf der Wachstumskurven und PHB Gehalt in den Stämmen *R. eutropha* H16 Wildtyp,  $\Delta phaZd1$ ,  $\Delta phaZd2$  und  $\Delta phaZd1\Delta phaZd2$**

Wildtyp und alle Deletionsmutanten wurden in NB-Medium mit 0,2% NaGlukonat untersucht. Alle Stämme zeigen ein Ähnliches Wachstum (Wachstumsrate ca. 0,4 [OD<sub>600</sub>/h], Verdopplungszeit ca. 1,7h) und PHB Gehalt. Die Werte für den PHB Gehalt sind Mittelwerte aus biologischen und technischen Duplikaten. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen.

### 3.2.6 Bestimmung des Molekulargewichtes der Granula

Bezüglich des Wachstums und des PHB Gehaltes während der Synthese und des Abbaus wurde in den Deletionsmutanten  $\Delta phaZd1$ ,  $\Delta phaZd2$  und in der Doppelmutante kein Unterschied festgestellt. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass andere Veränderungen, die mikroskopisch bzw. mittels GC nicht nachweisbar sind, am Granulum stattgefunden haben. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Enrique Galindo Fentanes aus dem Instituto de Biotecnología in Mexico wurde das Molekulargewicht der Granula mittels Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) bestimmt (die Zellen wurden in NB-Medium + 0,2% (w/v) NaGlukonat bis zu einem OD<sub>600</sub> von 4 kultiviert (PHB-Gehalt ca. 30% ), abzentrifugiert und gefriergetrocknet). Es sollte überprüft werden ob das Fehlen von PhaZd1 bzw. PhaZd2 an der Oberfläche des PHB Granulums zur Änderung im Molekulargewicht und Polydispersität des Polymers führt. Für den Wildtyp, lag die Molekularmasse zwischen 3970 - 5030 kDa. Außerdem wies die Polydispersität (PD) mit einem Wert von 1,93 auf die Heterogenität von PHB hin. Bei einem PD Wert um 1,0 ist das Polymer monodispers, je größer die PD, desto breiter ist die Molekulargewichtsverteilung. Das PHB bestand aus Fraktionen von 400 kDa

bis 30000 kDa. In dem Stamm  $\Delta phaZd1$  wurden in den untersuchten Proben deutlich unterschiedliche Durchschnittsmolekularmassen bestimmt. Das extrahierte PHB bestand aus Fraktionen von 600 kDa bis 20000 kDa für die Probe 1 und von 200 - 20000 kDa für das biologische Duplikat. Beide Proben lagen in einem dem Wildtyp ähnlichen Bereich. Die PD war dem Wildtyp ebenfalls ähnlich. Im Stamm  $\Delta phaZd2$  war die Molekularmasse im Vergleich zur Kontrolle (H16 Wildtyp) höher. Der Wert der Polydispersität war niedriger als beim Wildtyp, was bedeutet, dass das durch den Stamm hergestellte PHB eine geringere Heterogenität aufwies. Diese Beobachtung konnte im  $\Delta phaZd1\Delta phaZd2$  Stamm trotz der leicht erhöhten Polydispersität (PD) ebenso gemacht werden. Das Deletieren von  $phaZd2$  hatte einen leichten Einfluss auf die Molekularmasse des gebildeten PHB, allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant. Zusammenfassend kann man sagen, dass alle Mutanten wie auch der Wildtyp eine ähnliche PHB Molekularmasse von ca. 4500 kDa und PD von ca. 1,8 aufzeigten.

**Tabelle 11: Molekulargewicht der Granula aus den Stämmen *R. eutropha* H16 Wildtyp,  $\Delta phaZd1$ ,  $\Delta phaZd2$  und  $\Delta phaZd1\Delta phaZd2$**

	Wildtyp		$\Delta phaZd1$		$\Delta phaZd2$		$\Delta phaZd1\Delta phaZd2$	
	Probe1	Probe2	Probe1	Probe2	Probe1	Probe2	Probe1	Probe2
$M_w$ [kDa]	3970	5030	2987	4530	5022	5110	4498	5056
$M_n$ [kDa]	2053	2623	1343	2545	3112	3457	2268	2716
PD	1,93	1,92	2,22	1,78	1,61	1,48	1,98	1,86

$M_w$ = apparente Molekularmasse, ein statistischer Mittelwert der relativen Molekülmasse von Makromolekülen, die das Polymer bilden

$M_n$ = mittlere Molekularmasse, die Gesamtmasse der Polymermoleküle in einer Probe, geteilt durch die Gesamtanzahl von Polymermolekülen

PD (Polydispersität) =  $M_w/M_n$

### 3.2.7 Expressionskontrolle, LacZ-Reporter Assays

Es gibt einige Hinweise dafür, dass es sich bei PhaZd1 und PhaZd2 um physiologische PHB Depolymerasen handelt. Interessanterweise zeigten die Deletionsmutanten keine Veränderung im PHB Gehalt, wenn sie in NB-Medium + 0,2% NaGlukonat kultiviert wurden. Eine wichtige Frage ist, ob diese Enzyme überhaupt in *R. eutropha* H16 exprimiert werden und wenn ja, wie es zu einer PHB Akkumulation kommen kann, während zeitgleich zur Synthese sehr aktive Depolymerasen exprimiert werden. Sowohl für PhaZd1 als auch für PhaZd2 gibt es DNA-Microarray Daten, die zeigen, dass beide Gene transkribiert werden (Brigham et al., 2010; Peplinski et al., 2010). Diese Versuche wurden allerdings unter anderen Bedingungen durchgeführt. Alle vorhandenen Ergebnisse stammen aus Experimenten in Minimalmedium

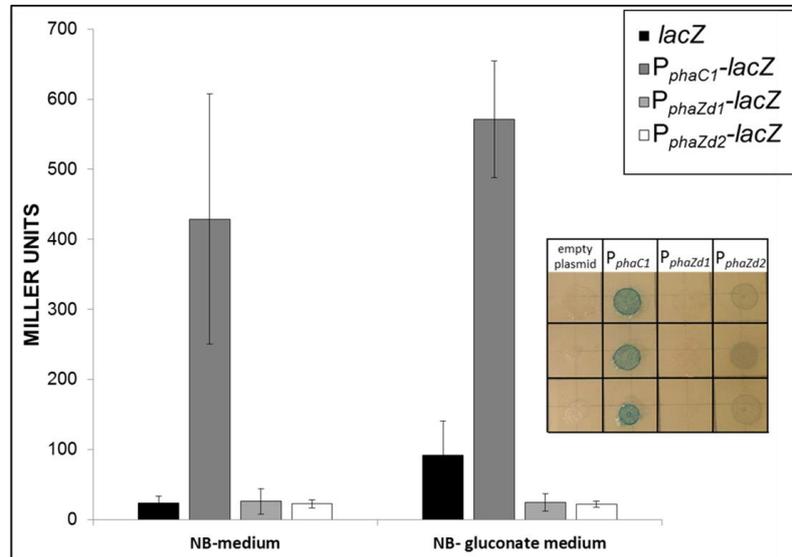
## Experimente und Ergebnisse

mit einem Überschuss von C-Quellen und unter Stickstofflimitierung bzw. in der Abwesenheit einer exogenen C-Quelle. Im Gegensatz dazu wurden alle Versuche dieser Arbeit in NB-Medium mit Zugabe von NaGlukonat durchgeführt.

Um zu untersuchen, in wie weit sich die Promotoraktivität der *phaZd1* bzw. *phaZd2* Gene unter den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen ändert, sollte die Promotoraktivität mit Hilfe des Reportergenes *lacZ* untersucht werden. Das Reportergen wurde an den Promotor des jeweiligen Gens fusioniert (transkriptionelle Fusion), so dass auch der Reporter exprimiert wird. Als Plasmid wurde das pBBR1MCS3-*lacZ* (Fried et al., 2012) verwendet. Als Negativkontrolle wurde das promotorlose Plasmid verwendet und als Positivkontrolle wurde der konstitutive Promotor der PHB-Synthase an die  $\beta$ -Galaktosidase fusioniert. Die Suche nach den Promotorbereichen wurde mit Hilfe eines im Internet verfügbaren Suchprogramms durchgeführt (BPROM). Die etwa 300 bp großen stromaufwärts der Zielgene liegenden Fragmente wurden aus der genomischen DNA von *R. eutropha* amplifiziert und in das pBBR1MCS3-*lacZ* Plasmid inkloniert. Die Ribosomenbindestelle die sich auf dem Plasmid befand wurde durch eine native Sequenz aus *R. eutropha* ersetzt. Nach abgeschlossener Klonierung wurden die erstellten Plasmide zuerst in den *E. coli* Stamm S17-1 gebracht. Auf LB-Platten mit 2% (w/v) X-Gal wurde nur die positive Kontrolle blau. Die Negativkontrolle sowie die Stämme mit den Promotoren aus beiden Depolymerasen blieben weiß. Folgend wurden die Plasmide mittels Konjugation in *R. eutropha* gebracht. Als erstes wurden die Stämme auf Agar-Platten beobachtet. Hierfür wurden für jeden Stamm 3 Vorkulturen (in NB-Medium) angeimpft (biologische Triplikate) aus denen nach einer 12 stündigen Inkubation 3  $\mu$ l auf eine Agar-Platte aufgetropft wurden. Die Platten wurden 7 Tage inkubiert und jeden Tag ausgewertet. Im erstem Ansatz wurde das Wachstum auf NB-Platten entweder mit 0,2 % (w/v) NaGlukonat (Induktion der PHB-Synthese im Komplexmedium) oder ohne (normales Wachstum auf Komplexmedium) untersucht. Alle Platten enthielten zusätzlich 2% (w/v) X-Gal. Auf den NB-Platten wurde bereits nach dem ersten Tag, unabhängig davon ob mit oder ohne NaGlukonat, nur die Positivkontrolle blau. Der Stamm mit der Negativkontrolle sowie mit dem Promotor von *PhaZd1* Depolymerase wurde nicht blau. Bei dem Stamm mit dem Promotor von *PhaZd2* konnte eine hellblaue Färbung nach 5 Tagen bei 30°C beobachtet werden. Die Promotoren der Depolymerasen zeigten keine bzw. nur sehr schwache Aktivität auf NB-Medium. Anschließend wurden die Ergebnisse dieser Plattentest mit Hilfe eines enzymatischen Assays für die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase quantifiziert (2.16.3). Damit konnten die Ergebnisse der Plattentests bestätigt werden (Abbildung 29). Somit konnte die Expression der beiden Depolymerasen während des Wachstums auf NB-NaGlukonat Medium

## Experimente und Ergebnisse

nicht nachgewiesen werden. Beide Promotoren waren während des Wachstums in NB-Medium mit Zugabe von NaGlukonat inaktiv. Dieses Ergebnis impliziert, dass PhaZd1 und PhaZd2 offenbar keine physiologische Funktion im PHB Stoffwechsel während des Wachstums von *R. eutropha* H16 in NB-Medium + NaGlukonat haben.



### Abbildung 29: Promotor-Aktivitätsmessung

Promotorbereiche für *phaZd1*, *phaZd2* und als positiv Kontrolle *phaC1* wurden auf dem pBBR1MCS3 Plasmid vor den *lacZ* Gen einkloniert. Die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase wurde in *R. eutropha* mit den jeweiligen Konstrukten auf Indikatorplatten (X-Gal) nach 3 Tagen bei 30°C bzw. quantitativ (ONPG) in NB- oder NB- + 0,2 % NaGlukonat Medium nach 8 h, gemessen. Die Promotoren der Depolymerasen zeigten keine bzw. nur sehr schwache Aktivität auf NB-Medium. Die Werte sind Mittelwerte aus biologischen Triplikaten. Fehlerbalken zeigen Standard Abweichungen.

### 3.2.8 Proteomanalyse

Die Ergebnisse für NB-Medium wurden zusätzlich mittels Proteomanalyse bestätigt. Der *R. eutropha* H16 Stamm wurde im NB-Medium + 0,2 % NaGlukonat kultiviert und nach dem Zellaufschluss in 4 verschiedene Fraktionen aufgeteilt, die mit LC-ESI-MS/MS analysiert wurden (2.18). Es wurden PHB-Granula isoliert, die Membranfraktion aufgetrennt, die Carbonatfraktion vorbereitet in der sich die peripheren Membranproteine befinden und der Rohextrakt analysiert (vorbereitet durch Daniel Pfeifer). In keiner der Fraktionen konnte PhaZd1 bzw. PhaZd2 gefunden werden was daraufhin deutete, dass diese Enzyme nicht unter den verwendeten Bedingungen exprimiert wurden.

### 3.3 Weitere Versuche zur Erforschung des PHB Granulums

Ziel dieser Arbeit war es das PHB Granulum zu untersuchen, wobei der Polymerabbau im Vordergrund stand. Zwei unterschiedliche Ansätze wurden bereits erfolgreich durchgeführt und haben aufschlussreiche Erkenntnisse, die zum allgemeinen Verständnis des Aufbaus der PHB-Granula-Oberfläche und insbesondere zum PHB Abbau beitragen, geliefert. Zum einen wurde ein bakterieller Two-Hybrid Assay verwendet, um potenzielle Interaktionspartner der PHB Depolymerasen zu suchen und anschließend zu untersuchen, zum anderen wurden zwei der putativen PHB Depolymerasen *in vivo* und *in vitro* intensiv auf deren Funktion hin erforscht. Der dritte Ansatz, der zur weiteren Aufklärung auf dem Gebiet der PHB gewählt wurde und in diesem Teil der Arbeit beschrieben wurde, ist die Suche nach neuen PGAPs.

#### 3.3.1 Proteomanalyse des Granulums

Die Methode zur Untersuchung der Proteinzusammensetzung aus Zellfraktionen ist etabliert und besteht vereinfacht aus drei Schritten: SDS-PAGE zur Auftrennung der Proteine, einem Trypsinverdau und Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie (LC-MS). Diese Methode wurde bereits verwendet um PHB Granula aus anderen Organismen zu untersuchen wie z.B. für die Identifizierung von Proteinen aus den PHB Granula, die aus *Herbaspirillum seropedicae* isoliert wurden (Tirapelle et al., 2013). Das PHB Proteom für *R. eutropha* H16 wurde ebenso bestimmt. Ein großer Anteil der gefundenen Proteine, war bereits für die Funktion im PHB Metabolismus bekannt. Eine erhebliche Anzahl an Membranproteinen aber auch viele andere Proteine mit diversen Funktionen wurden ebenfalls in der untersuchten PHB Fraktion gefunden (Insgesamt 404 Treffer). Es ist relativ unwahrscheinlich, dass hunderte von Proteinen an die Oberfläche des Granulums binden. Vermutlich handelt es sich um Proteine, die artifiziell nach dem Zellaufschluss und während der Probenvorbereitung mit der Oberfläche des Polymers assoziierten. Um diese falsch positiven Treffer zu erkennen und aus der Liste der PGAPs zu entfernen, wurde das Proteom der übrigen Komponenten der *R. eutropha* Zelle bestimmt. Dafür wurde eine Fraktionierung in drei zusätzlichen Fraktionen, der Membranfraktion, der Carbonatfraktion mit den membranassoziierten Proteinen und der Cytoplasmafraktion mit den löslichen Proteinen durchgeführt (Tabelle 16). Als nächstes wurden alle vier Proteome miteinander verglichen und nur die Treffer ausgewählt die ausschließlich in der PHB Fraktion vorgekommen sind und dementsprechend in den restlichen drei Fraktionen nicht auffindbar waren. Diese Proteine sollten die Gruppe der echten PGAPs darstellen. Die Zusammenfassung der bisher bekannten PGAPs und die

## Experimente und Ergebnisse

aktualisierte Liste der PGAPs nach der Proteomanalyse ist in Tabelle 12 und Tabelle 13 zu sehen.

**Tabelle 12: Zusammenfassung der bekannten PGAPs vor der Proteomanalyse**

PGAPs	Referenz
PHB-Synthase PhaC1	(Peoples and Sinskey, 1989; Pfeiffer and Jendrossek, 2014; Schubert et al., 1988)
PHB-Synthase PhaC2	(Pfeiffer and Jendrossek, 2012; Pohlmann et al., 2006)
Sieben Phasine (PhaP1 - PhaP7)	(Pfeiffer and Jendrossek, 2011, 2012; Pötter et al., 2004)
Sieben intrazelluläre PHB Depolymerasen (PhaZa1-PhaZa5, PhaZd1, PhaZd2)	Abe et al., 2005; Brigham et al., 2012b; Handrick et al., 2000; Pohlmann et al., 2006; Saegusa et al., 2001; Uchino et al., 2007, 2008; York et al., 2003
Zwei 3-hydroxybutyrat Oligomer Hydrolasen (PhaZb, PhaZc)	(Kobayashi and Saito, 2003; Kobayashi et al., 2005)
PhaR und PhaM	(Pfeiffer et al., 2011; Pötter et al., 2002; Wahl et al., 2012; York et al., 2002)

**Tabelle 13: Aktualisierte Liste der PGAPs**

Locus tag	PGAP
A1381	PhaP1*
PHG202	PhaP2
B2021	PhaP4
B1632	$\alpha/\beta$ -Hydrolase
A2172	PhaP3
A1437	PhaC1*
B1934	PhaP5
A1150	PhaZa1
A0671	$\alpha/\beta$ -Hydrolase
A0225	Phospholipase
A2001	hyp. Protein
B2326	PhaP7
B1988	PhaP6
A2003	PhaC2
A1440	PhaR*
A0141	PhaM*

\*diese Proteine wurden auch in anderen Fraktionen gefunden

Sehr interessante Ergebnisse wurden für die putativen PHB Depolymerasen erhalten. Bis jetzt gibt es nur für eine der neun PHB Depolymerase-Kandidaten, für die PhaZa1 Depolymerase, ausreichend Hinweise dafür, das Enzym zu den physiologisch relevanten PHB Depolymerasen zu zählen (Saegusa et al., 2001; Uchino et al., 2008). Unsere Ergebnisse liefern sogar starke Hinweise dafür, dass es sich hier gar um das wichtigste Enzym für die Hydrolyse bzw. Thiolyse von PHB in *R. eutropha* handelt. Unter standardmäßig von uns verwendeten Bedingungen für den PHB Aufbau- und Abbauzyklus (NB-Medium + 0,2% NaGlukonat, ca. 50h bei 30°C) konnte die Deletionsmutante  $\Delta phaZa1$ , akkumuliertes PHB nicht abbauen. Der PHB Gehalt betrug nach 12h  $44\% \pm 2$  [% vom Zelltrockengewicht] und ist nach weiteren 44 h Inkubation nicht gesunken ( $46\% \pm 2$  %). Die Ergebnisse der Proteomanalyse verstärken diese Aussage. PhaZa1 war das einzige der neun Proteine, das an der Oberfläche des Granulums detektiert wurde. Die restlichen vier Isoenzyme (PhaZa2 bis PhaZa5) konnten nicht identifiziert werden. Sie wurden unter den verwendeten PHB-Speicherungsbedingungen nicht nachweisbar exprimiert. Ein gleiches Ergebnis wurde für die zweite Gruppe der Depolymerasen (PhaZd1 und PhaZd2) erzielt. Diese Beobachtung wurde bereits im Abschnitt 3.2.8 behandelt. Überraschenderweise wurden die Proteine weder in der PHB Fraktion sondern auch in keiner der anderen drei Fraktionen gefunden. Anders sah dies bei den PHB Oligomerhydrolasen PhaY1 und PhaY2 aus. Diese wurden identifiziert, waren aber nicht spezifisch in der PHB Fraktion zu finden. PhaY1 wurde größtenteils in der Membranfraktion nachgewiesen (wenige Peptide in der PHB- und Cytoplasmafraktion) und PhaY2 ausschließlich in der löslichen Fraktion. Zusammenfassend ist PhaZa1 Depolymerase das einzige bekannte Enzym, das *in vivo* in NB-NaGlukonat-Medium an PHB bindet.

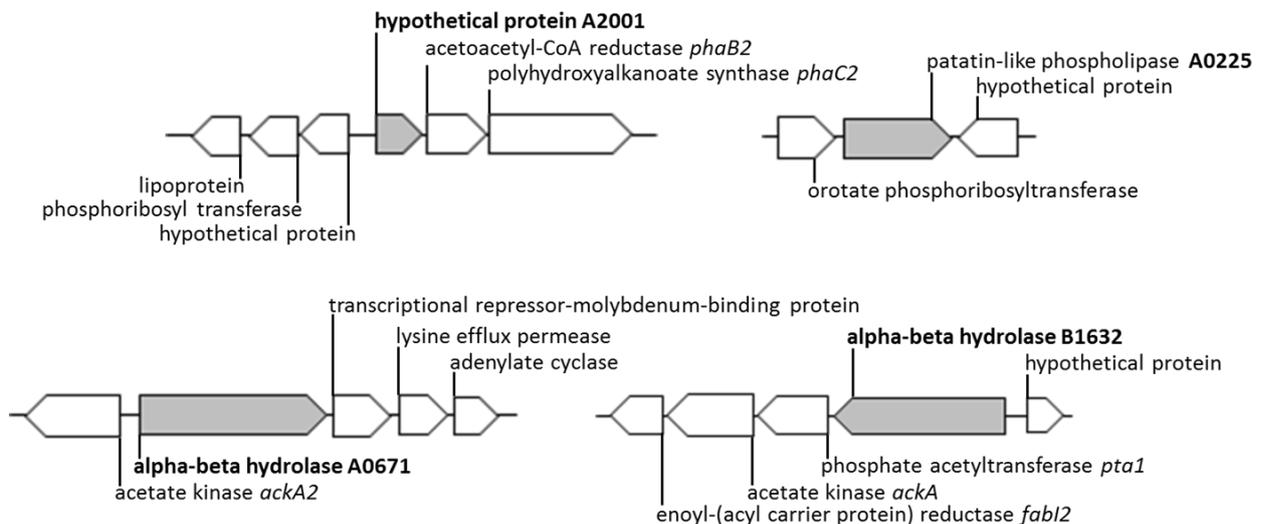
### **3.3.2 Vier neue PHB assoziierte Proteine: A0225, A0671, A2001 und B1632**

Die verwendete Methode, um spezifisch an PHB gebundene Proteine zu identifizieren, hat sich als ein wertvolles Werkzeug für die Bestimmung des echten Repertoires von PGAPs erwiesen. So konnte gezeigt werden, dass die meisten, der in der Vergangenheit beschriebenen PHB Depolymerasen und Oligomerhydrolasen nicht zum PHB Proteom gehören. Um nicht nur die Beteiligung einiger Enzyme ausschließen zu können hat sich diese Methode als hilfreich erwiesen. Lediglich acht der spezifisch an PHB gebundenen Proteine waren bereits als PGAPs bekannt. Dies sind: die PhaZa1 Depolymerase, die Phasine PhaP2 – PhaP7 und das zweite PHB-Synthase Isoenzym PhaC2. Zusätzlich wurden vier PHB Proteine die außer am PHB auch in anderen Fraktionen vorkommen können identifiziert. Das sind die PHB Synthase PhaC1, das Phasin PhaP1 und zwei Enzyme mit einer regulatorischen

## Experimente und Ergebnisse

Funktion PhaR und PhaM. Erstaunlicherweise waren die restlichen vier, der spezifisch an PHB gebundenen Proteine, unbekannt und wurden zum erstem mal auf dem PHB Granulum identifiziert. Diese vier Proteine sind: A2001 (Protein unbekannter Funktion), A0225 (putative patatin-like Phospholipase), A0671 und B1632 (putative  $\alpha/\beta$  Hydrolasen).

Das Protein A2001 besteht aus einer relativ kurzen Sequenz von 159 Aminosäuren (17,8 kDa). Die KEGG Datenbank gibt keine Informationen bezüglich der Funktion bzw. konservierten Motive, die auf eine Funktion hindeuten könnten. Das *a0225* Gen kodiert für ein 51 kDa großes Polypeptid. Die Aminosäuresequenz enthält ein Patatin-Motiv, charakteristisch für *Patatin-like* Phospholipasen. Die Genprodukte A0671 und B1632 sind als putative  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen annotiert und enthalten eine Domäne mit unbekannter Funktion (Duf 3141), welche auch in Proteinen vieler anderer Proteobakterien gefunden wird. A0671 (84 kDa) und B1632 (86 kDa) zeigen eine Identität von 46% und Ähnlichkeit von 62% zueinander. Kurze Sequenzen von ca. 100 Aminosäuren zeigen Ähnlichkeit zu PHB-Synthasen von Typ I und zur Untereinheit der PhaC PHA Synthasen vom Typ III. Eine BlastP Analyse zeigte PHB-Synthasen/Depolymerasen als beste Treffer (zusätzlich zu den Orthologen A0671 und B1632 Proteinen aus anderen Proteobakterien).



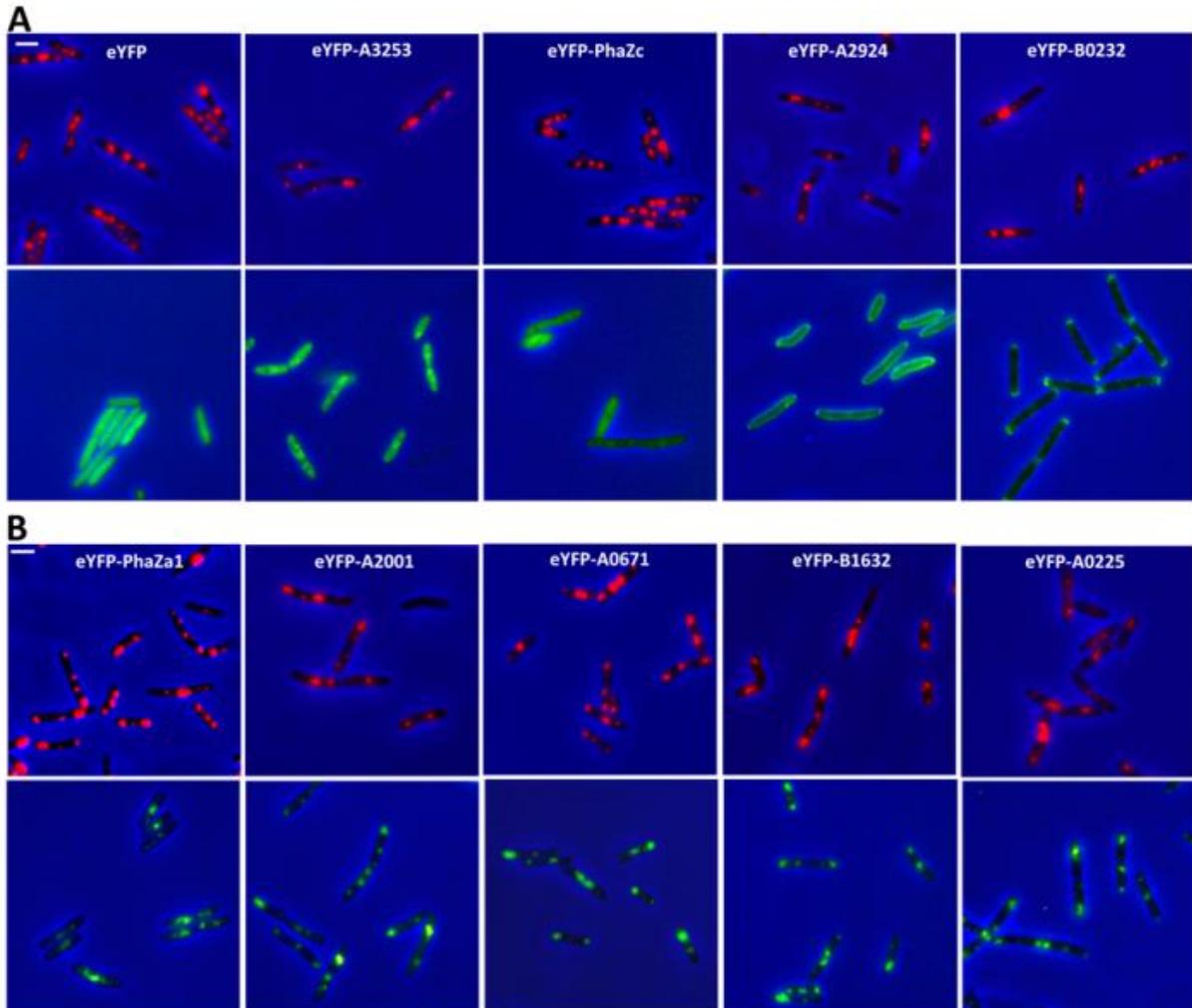
**Abbildung 30: Genomischer Kontext der identifizierten Gene: *a2001*, *a0225*, *a0671*, *b1632***

Das *a2001* Gen befindet sich in einem putativen Operon auf Chromosom 1 mit den Genen *a2002* (codierend für die Acetoacetyl-CoA-Reduktase (PhaB2)) und *A2003* (codierend für die PHB Synthase (PhaC2)). *a0225*, *a0671* und *b1632* liegen hingegen einzeln. Bemerkenswert ist, dass *b1632* in direkter Nachbarschaft zu einem putativen Operon aus Phosphatacetyltransferase, Acetat Kinase und Enoyl-(Acyl Carrier Protein) Reduktase liegt.

Die Bezeichnung der Gene wurde nach der KEGG Datenbank vorgenommen

### 3.3.3 Lokalisierung von A0225, A0671, A2001 und B1632

Um die Ergebnisse der Proteomanalyse zu bestätigen, wurden Fusionsproteine mit eYfp hergestellt. Das Fluoreszenzprotein eYfp wurde N-Terminal an A0225, A2001, A0671 und B1632 fusioniert. Alle vier Fusionen wurden auf dem *broad host range*-Plasmid pBBR1MCS2 in den *E. coli* S17-1 Stamm transformiert und über Konjugation in den *R. eutropha* H16 Stamm übertragen. Zusätzlich zu den interessanten neuen PHB-assoziierten Proteinen wurden ausgewählte Proteine für die eine spezifische Lokalisation in den übrigen Zellkompartimenten vorhergesagt wurde, als Kontrollen mitgeführt. Die intrazelluläre, räumliche Verteilung dieser Konstrukte wurde nach Überexpression unter Kontrolle eines konstitutiven  $P_{phaC1}$  Promotors in *R. eutropha* untersucht. Mit den Kontrollproteinen wurden folgende Ergebnisse erzielt. eYfp ist ein lösliches Fluoreszenzprotein. Dementsprechend führt die Expression von freiem eYfp zu Fluoreszenz in der gesamten Zelle (Abbildung 31 A). Das gleiche Ergebnis wurde erhalten, wenn ein anderes, zufällig ausgewähltes Protein (A3253, Hexaprenyltransferase), für welches eine Lokalisierung in der löslichen Fraktion in der Proteomanalyse gezeigt wurde, untersucht wurde. Die Lokalisierungsanalyse der 3HB Oligomerhydrolase (PhaZc) (dieses Protein wurde in der Proteomstudie ausschließlich in der löslichen Fraktion gefunden) ergab eine lösliche Lokalisierung, und es konnte keine Kolo-kalisierung mit PHB-Granula nachgewiesen werden. A2924 und B0232 sind zwei Proteine für die eine Membranlokalisierung vorhergesagte wurde. Eine Fusionsanalyse mit eYFP bestätigte auch hier die Lokalisierung an der Zellmembran. Das B0232 wurde als Methyl-akzeptierendes Chemotaxisprotein annotiert und sollte daher in der Nähe der Zellpole lokalisiert sein. Bemerkenswert ist, dass die eYfp Fusion in der Tat eine Zellpol-spezifische Lokalisierung zeigte. Schließlich wurde die PHB Depolymerase PhaZa1 als eYfp Fusion zur Positivkontrolle für ein Protein, welches am PHB Granulum lokalisiert ist. PhaZa1 ist die einzige der sieben PHB Depolymerasen, die mit Hilfe der Proteomanalyse an der Oberfläche des Granulums detektiert wurde. Sie war nach der Expression als eYfp-Fusion eindeutig mit PHB Granulum kolo-kalisiert. Zusammengekommen zeigten alle Kontrollproteine die erwartete intrazelluläre Lokalisierung und bestätigten damit die Ergebnisse der Proteomanalyse (Abbildung 31 A). Anschließend wurde die Lokalisierung der vier neuen Proteine (A0225, A0671, A2001, und B1632), die spezifisch in der PHB Fraktion gefunden wurden, untersucht. Alle vier Konstrukte waren mit PHB Granula kolo-kalisiert. Dieses Ergebnis bestätigte, dass alle vier *in vivo* PHB gebundene Proteine repräsentieren (Abbildung 31 B) und dass A2001, A0232, A0671 und B1632 zu den neuen PGAPs in *R. eutropha* H16 gezählt werden können.



**Abbildung 31: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der intrazellulären Lokalisierung von A0225, A0671, A2001, und B1632**

eYfp allein wie auch Kontrollfusionen von eYfp mit Hexaprenyltransferase (A3253) für eine Lokalisierung in der löslichen Fraktion, mit der 3HB Oligomerhydrolase (PhaZc) ebenfalls löslich, mit A2924 für eine Membranlokalisierung und mit Methyl-akzeptierenden Chemotaxisprotein B0232 für eine Zellpol spezifische Lokalisierung wurden dargestellt (**A**). PHB Depolymerase PhaZa1 wurde als Positivkontrolle für die Lokalisierung am PHB verwendet (**B**). Die vier neuen Proteine (A0225, A0671, A2001, und B1632), waren mit PHB Granula kolokalisiert (**B**). Alle Stämme wurden nach 4h Wachstum in NB-Medium mit 0,2% NaGlukonat fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Bilder in der ersten Reihe zeigen Zellen, die mit Nilrot angefärbt wurden und mit einem Nilrot-Filter betrachtet wurden. Die zweite Reihe repräsentiert Zellen die mit einem eYfp Filter aufgenommen wurden. Bilder wurden mit einer Schwarzweiss-Kamera (CoolSnapCF, Photometrics, Tucson, USA) aufgenommen und mit Hilfe der Software MacBiophotonics ImageJ bearbeitet. Der Maßstab entspricht 2 $\mu$ m.

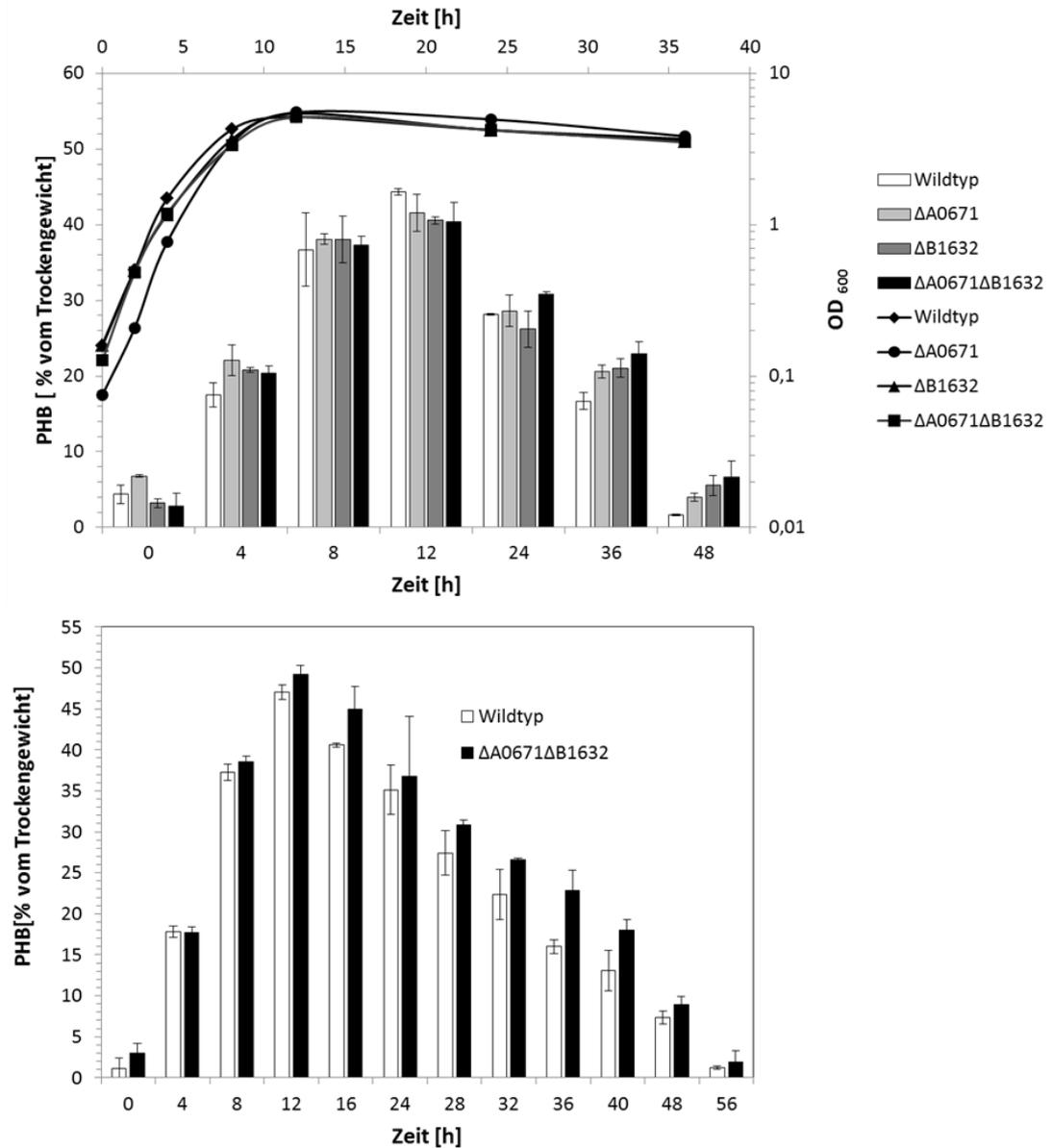
### 3.3.4 Einfluss der Deletion von A0672 und B1632 auf die PHB-Speicherung

Es ist erstaunlich, dass trotz jahrelanger Erforschung des PHB Granulums immer noch neue Aspekte ans Licht kommen. Nach der Entdeckung der vier neuen Proteine war jetzt die Frage, welche Funktionen die identifizierten Proteine haben könnten. Die Aminosäuresequenzen von A0671 und B1632 zeigen eine gewisse Ähnlichkeit zu den PHB Synthasen und PHB

## Experimente und Ergebnisse

Depolymerasen. Eine Funktion als PHB Synthase ist eher unwahrscheinlich. Eine Deletion des PHB Synthase *phaCI* führt zum kompletten Verlust der PHB-Speicherung von PHB. Aus diesem Grund ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei den zwei Genen um PHB Synthasen handelt. Anderweitig würde deren Aktivität den Phänotyp der Deletionsmutante komplementieren. Es wurde bereits gezeigt, dass eine zeitgleiche Deletion der wichtigen Depolymerase PhaZa1 mit den restlichen Depolymerasen aus der Gruppe PhaZa1-PhaZa5 eine gravierende Inhibierung des Abbaus verursacht, eine Restaktivität verbleibt jedoch. Die Beteiligung der Enzyme aus der zweite Klasse (PhaZd1 und PhaZd2) wurde bereits in dieser Arbeit ausgeschlossen. Die andere naheliegende Möglichkeit ist also, dass es sich bei den neuen Proteinen um PHB Depolymerasen handelt. Um Hinweise auf die Beteiligung der beiden Proteine am PHB Stoffwechsel zu gewinnen, wurden die kodierenden Gene für A0671 und B1632 deletiert und zusätzlich eine Doppelmutante konstruiert. Der Wildtyp, die Einzelmutanten ( $\Delta a0671$  oder  $\Delta b1632$ ) und die Doppelmutante ( $\Delta a0671\Delta b1632$ ) wurden in NB-Medium mit 0,2% NaGlukonat über 48h kultiviert. Während des Wachstums wurde die optische Dichte bei 600 nm und der PHB Gehalt mittels Gaschromatographie verfolgt. Der Verlauf der Wachstumskurven und die Wachstumsraten waren bei den Deletionsmutanten dem Wildtyp ähnlich. Ebenso war der PHB Gehalt nicht signifikant abweichend von dem des Wildtyps. Wenn die PHB Akkumulationsraten der Stämme während der exponentiellen Wachstumsphase verglichen wurden, zeigte sich für alle Stämme eine vergleichbare Rate von 3,4 bis 3,7% (vom Zelltrockengewicht) von akkumulierten PHB pro Stunde. Dies deutete darauf hin, dass weder A0671 noch B1632 maßgeblich an der PHB-Synthese beteiligt waren (Abbildung 32). Es wurde jedoch ein kleiner, aber dennoch signifikanter Unterschied im PHB Gehalt während der Mobilisierungsphase (t = 12 bis 48 h) für die Mutanten beobachtet, sowohl Einzelmutanten als auch Doppelmutante konnten zuvor akkumuliertes PHB mobilisieren. Allerdings war der Restgehalt an PHB am Ende des Versuches im Vergleich zum Wildtyp etwas höher. Insbesondere der PHB-Gehalt der Doppelmutante war deutlich höher als der des Wildtyps (Abbildung 32).

## Experimente und Ergebnisse

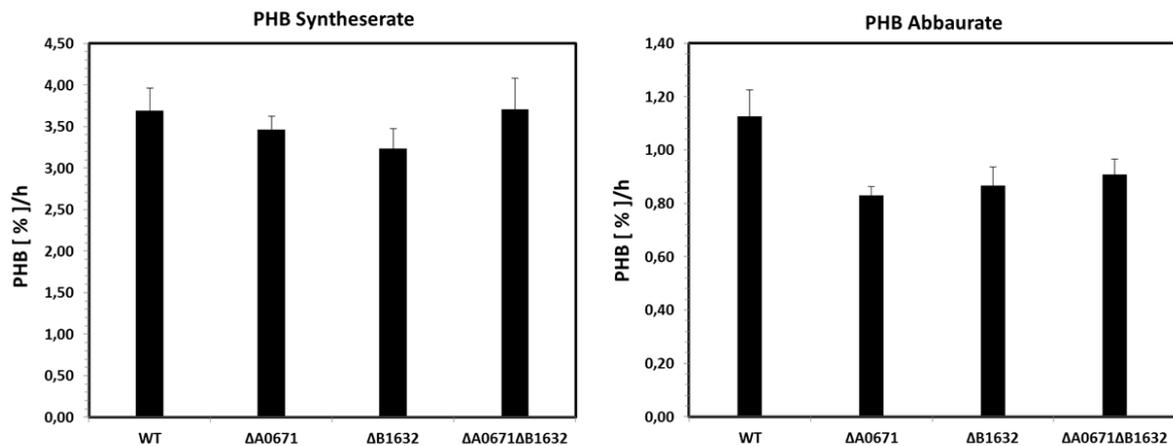


**Abbildung 32: Verlauf der Wachstumskurven und PHB Gehalt in den Stämmen *R. eutropha* H16 Wildtyp,  $\Delta a0671$ ,  $\Delta b1632$ ,  $\Delta a0671 \Delta b1632$**

Wildtyp und alle Deletionsmutanten wurden in NB-Medium mit 0,2% NaGlukonat untersucht. Alle Stämme zeigen ähnliches Wachstum (Wachstumsrate ca. 0,5 [ $OD_{600}/h$ ], Verdopplungszeit ca. 1,4h) und PHB Gehalt (A). Bei genauerem Betrachten der Abbauphase (B) konnte ein kleiner Unterschied in dem PHB Gehalt zwischen dem Wildtyp und der  $\Delta a0671 \Delta b1632$  Mutante beobachtet werden. Die Werte für den PHB Gehalt sind Mittelwerte aus biologischen und technischen Duplikaten. Fehlerbalken zeigen Standard Abweichungen.

Wenn die Mobilisierung der akkumulierten PHB durch Bestimmung der Abbauraten während der stationären Wachstumsphase quantifiziert wurde, waren die Werte für die drei Mutanten (0,82 bis 0,90% (vom Trockengewicht) mobilisiertes PHB pro Stunde) im Vergleich zum Wildtyp (1,12% (vom Trockengewicht) mobilisiertes PHB pro Stunde) niedriger (Abbildung 33).

## Experimente und Ergebnisse



**Abbildung 33: PHB Synthese- und Abbauraten für die Stämme *R. eutropha* H16 Wildtyp,  $\Delta a0671$ ,  $\Delta b1632$ ,  $\Delta a0671\Delta b1632$**

Die Syntheseraten wurden zwischen 0h und 12h und die Abbauraten zwischen 12h und 48h bestimmt. Kein Unterschied in den Syntheseraten war zwischen den Stämmen *R. eutropha* H16 Wildtyp,  $\Delta a0671$ ,  $\Delta b1632$ ,  $\Delta a0671\Delta b1632$  erkennbar. Ein geringer jedoch signifikanter Unterschied war in den Abbauraten feststellbar. Besonders die  $\Delta a0671\Delta b1632$  Mutante mobilisierte das gespeicherte PHB langsamer als der Wildtyp.

Die Werte für den PHB Gehalt sind Mittelwerte aus biologischen Triplikaten. Fehlerbalken zeigen Standard Abweichungen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Fähigkeit, das akkumulierte PHB zu mobilisieren in den Mutanten leicht reduziert ist und lassen vermuten, dass A0671 und B1632 teilweise (direkt oder indirekt) zur PHB Mobilisierungsaktivität beitragen.

## 4 Diskussion

Es ist mittlerweile anerkannt, dass es sich bei Bakterien um hochorganisierte Zellen handelt. Dies ist weit von der ursprünglichen Idee entfernt die Bakterien lediglich als einen geschlossenen Raum mit zufällig verteilten Makromolekülen und anderen Zellkomponenten darzustellen. Von Bedeutung ist unter anderem die exakte Positionierung von bestimmten Proteinen in bzw. an intrazellulären Organellen. Beispiel eines solchen Organells ist Polyhydroxybutyrat (PHB), ein bakterielles Polymer, das in Form von Granula intrazellulär gespeichert werden kann. Die Oberflächenstruktur besteht aus Proteinen und die Beteiligung von anderen Komponenten wie Phospholipiden wird aktuell weiter erforscht. Der PHB Kern wird gemeinsam mit der Oberflächenschicht als Carbonosom bezeichnet (Jendrossek, 2009) und ist komplex aufgebaut.

Der Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Tatsache, dass trotz großem Interesse an PHB und jahrelanger Forschung immer noch Aspekte des PHB Stoffwechsels ungeklärt bleiben. Zu Beginn der Arbeiten wurden einzelne Enzyme bzw. Gruppen von Proteinen, die bei einem Prozess, wie z.B. der Synthese des Polymers, eine Rolle spielten, untersucht. Da PHB ein Organell mit einer spezifischen Zusammensetzung von Proteinen ist, ist es essentiell das Granulum als einen Komplex und nicht nur die einzelnen Komponenten zu betrachten. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit, welche sich mit dem Thema des PHB Abbaus befasst, nicht nur die beteiligten Enzyme sondern auch die Interaktionspartner der Proteine sowie die Gesamtheit der Proteine, also das PHB Proteom, untersucht.

#### 4.1 A2274, ein Interaktionspartner der PhaZa1 Depolymerase

Die Proteine des PHB Stoffwechsels können, wie z.B. das regulatorische Protein PhaM mit der PHB Synthase PhaC1, miteinander wechselwirken (Pfeiffer et al., 2011). Für die PHB Depolymerase PhaZa1 wurde mit Hilfe eines bakteriellen Two-Hybrid Systems eine Interaktion mit einem Protein, dessen Funktion eine putative Regulation der Phosphataufnahme ist, gefunden. Interessanterweise zeigte der Assay auch Interaktionen durch andere Proteine aus der PGAP Familie mit dem gleichen Protein. Dies waren die Phasine PhaP2 und PhaP3. Diese Interaktionen konnten in Folgeversuchen für PhaP3 leider nicht und für PhaP2 nur teilweise bestätigt werden (siehe Abschnitt 3.1.1). Bei den festgestellten Interaktionen der Proteine könnte es sich um falsch-positive Ergebnisse handeln. Es ist bekannt, dass die Two-Hybrid Methode einen hohen Anteil falsch-positiver Ergebnisse liefern kann (Legrain und Selig, 2000). Laut einer Arbeit von Deane et al., 2002 könnte der Anteil an falsch-positiven bis zu 70 Prozent ausmachen. Grund dafür sind unter anderem die direkte Aktivierung des Reportergens durch einige Enzyme oder die Sekundärstruktureigenschaften mancher Proteine, welche zu Wechselwirkungen mit anderen Proteinen führen (Serebriiskii und Golemis, 2001). Nur für PhaZa1 konnte in weiteren Experimenten, Protein- Protein-Wechselwirkung mit A2274 bestätigt werden (siehe 3.1.1). Um die Interaktion mit PhaP2 und PhaP3 weiter verifizieren zu können, wären weitere Experimente, wie z.B. die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (Pfeiffer and Jendrossek, 2013) für den *in vivo* Nachweis oder Pulldown-Assays wie z.B. SPINE (Herzberg et al., 2007), notwendig.

Die Interaktion von A2274 mit einer PHB Depolymerase suggeriert für A2274 eine Rolle im Abbauprozess von PHB in *R. eutropha* H16. Um eine putative Verbindung von A2274 zum PHB Metabolismus anzudeuten, wurde das neu identifizierte Protein PhaX genannt. Eine Möglichkeit die Beteiligung am PHB Stoffwechsel zu untersuchen, war die Herstellung einer Deletionsmutante und der Vergleich mit dem Wildtyp Stamm in Bezug auf Speicherung und Abbau von PHB. Beide Stämme konnten PHB synthetisieren, allerdings blieb der PHB Gehalt während der Abbauphase im  $\Delta phaX$  Stamm ungewöhnlich hoch. Dies war der erste Hinweis darauf, dass PhaX für den Abbau von PHB notwendig ist. Allerdings waren nicht alle Zellen gleichermaßen betroffen. Ein Teil der Zellen hatte in der Abbauphase keine Auffälligkeiten bezüglich des PHB Gehalts gezeigt. Der zweite Hinweis dafür, dass der Phänotyp der  $\Delta phaX$  Mutante tatsächlich mit dem PHB Metabolismus verknüpft war, war die Untersuchung einer *R. eutropha* H16 Mutante, die zusätzlich zum *phaX* auch in *phaC1*, der PHB Synthase, deletiert war. Dieser Stamm war nicht mehr in der Lage PHB zu

## Diskussion

synthetisierten. Laut der zuvor aufgestellten Hypothese, müsste dieser Stamm wieder normal wachsen können und PHB abbauen. Diese wurde dadurch gestützt, da keine Veränderungen der Zellmorphologie, kein erhöhter Anteil an toten Zellen und kein erhöhter Anteil an Zellen mit erhöhtem PHB Gehalt nachweisbar waren. Diese beiden Versuche zeigten also, dass *R. eutropha* H16 den gewöhnlichen Auf- und Abbauzyklus von PHB im Komplexmedium, (NB-Medium) supplementiert mit einem Überschuss an C-Quelle, nur in Anwesenheit des *phaX* Gens durchführen kann. Dementsprechend war der  $\Delta$ *phaX* Stamm in NB-Medium ohne Zugabe einer C-Quelle ebenso wie die  $\Delta$ *phaC1**phaX* Mutante nicht betroffen. So kann man sagen, dass der Phänotyp (hoher PHB Gehalt während der Abbauphase, elongierte Zellen und erhöhter Anteil an lysierten Zellen) in direkter Verbindung mit der PHB-Synthese steht, da das Ausschalten der Speicherung bzw. fehlende Induktion der Speicherung durch die Zugabe einer C-Quelle den Phänotyp aufheben konnte.

Was würde in einer Zelle passieren, die nicht mehr in der Lage ist PHB abzubauen? Es ist bekannt, dass während der Speicherung von PHB die Transkription vieler Gene aus verschiedenen Gruppen herunterreguliert wird. Dazu gehören unter anderem Gene welche verantwortlich für die Zellteilung, DNA Replikation, Translation, Biogenese der Zellmembran (Brigham et al., 2012a) sind. Man könnte also spekulieren, dass Zellen, die nicht in die PHB Abbauphasen übergehen, diese zellulären Prozesse nicht wieder reaktivieren können und keine Zellteilung bzw. Zellwachstum mehr durchführen. Es kann stattdessen beobachtet werden, dass es zur Zelllyse kommt. Um diese These zu überprüfen wurden die  $\Delta$ *phaX* Zellen mit Propidiumiodid angefärbt und es konnte gezeigt werden, dass tatsächlich > 90% der Zellen, welche nach 32h immer noch PHB enthielten abgestorben waren. Diese Zellen waren nicht nur durch Propidiumiodid anfärbbar und hatten eine ungewöhnlich hohen PHB Gehalt, sondern wiesen zusätzlich eine elongierte Zellform auf. Nichtsdestotrotz verblieb ein erheblicher Anteil an Zellen, die keinen Unterschied zum Wildtyp aufwiesen. Es wurde gezeigt, dass PHB an DNA synthetisiert wird; dabei dient das Nukleoid vermutlich als Gerüst für die Synthese (Wahl et al., 2012). Der Wildtyp speichert einige Granula und nach Verbrauch der Kohlenstoffquelle wird akkumuliertes PHB wieder abgebaut. In den langen  $\Delta$ *phaX* Zellen verbleibt aber das PHB intrazellulär und am Nukleoid. Darum ist es vielleicht nicht möglich, dass die regulatorische Proteine binden und die Zellteilung wieder stattfindet. Da aber die Verteilung der Granula an der DNA nicht in allen Zellen gleich ist, gibt es immer noch Zellen, in denen trotz der Granula die Bindestellen verfügbar sind. Diese können sich dann wieder teilen und das vorhandene PHB an Tochterzellen verteilen. Eine andere Erklärung für diese phänotypische Variabilität in der isogenen Zellpopulation könnte die

## Diskussion

stochastische Genexpression sein. Nicht bei allen Zellen wird die Inhibierung der Zellteilung während der PHB Synthese gleichzeitig induziert. So können einzelne Zellen sich weiter teilen, akkumulieren aber nicht so viel PHB. Diese Zellen wären von der Deletion des *phaX* Gens nicht so drastisch betroffen wie die andere Zellpopulation. Der Prozess der stochastischen Genexpression ist in Verbindung mit einer Erhöhung von Überlebenschancen unter bakteriellen Populationen in fluktuierenden Umweltbedingungen bekannt, bei dem sich einzelne Zellen innerhalb einer Population differenzieren (Thattai und van Oudenaarden, 2004). Da die Speicherung von PHB auch zu einer Überlebensstrategie gezählt werden kann, ist es nicht ausgeschlossen, dass es sich hierbei um einen solchen Prozess handeln könnte. Die einzige Möglichkeit diese Hypothesen zu bestätigen wären Untersuchungen auf Einzelzellbasis. Hierzu müssten genetische Regulationsprozesse durch Ermittlung der Expressionsstärke für einzelne Zellen aufgeklärt werden. Solche Experimente könnten Hinweise auf die Koexistenz verschiedener Differenzierungszustände in einer mikrobiellen Population liefern.

Welche Funktion könnte PhaX für den PHB Metabolismus haben? Wenn es in der Zelle durch Deletion nicht mehr vorhanden ist, kommt es zu erhöhtem PHB Gehalt während der Abbauphase. Auch nach fast 50h, während der Wildtyp kein PHB mehr enthält, war bei der  $\Delta$ *phaX* Mutante noch >30% PHB (vom Trockengewicht) zu beobachten. Ein gewisser Anteil davon wird durch das Lysieren der Zellen und Freisetzung des Polymers ins Medium zu Stande kommen. *R. eutropha* H16 verfügt nicht über extrazelluläre Depolymerasen, die in der Lage wären das freigesetzte PHB zu mobilisieren. Zusätzlich gibt es aber auch Zellen, die zu späteren Zeitpunkten große Mengen an PHB enthalten. Würde man PhaX als Regulator betrachten, wäre eine mögliche Funktion eine Aktivierung der PhaZa1 Depolymerase. Die Wechselwirkung beider Proteine konnte bereits gezeigt werden. Zwar benötigt eine der PHB Depolymerasen aus *Rhodospirillum rubrum* einen Aktivator allerdings bindet dieser direkt an PHB und macht es für die Hydrolyse zugänglich (Handrick et al., 2004b). Bis jetzt sind keine anderen Regulatoren der PHB Mobilisierung in *R. eutropha* H16 bekannt.

Die Untersuchung der eYfp-Fusion ergab keine Hinweise auf eine Bindung von PhaX an PHB. Eine Proteomanalyse der verschiedenen zellulären Fraktionen aus *R. eutropha* H16 zeigte, dass die meisten PhaX-Peptide sich in der Membranassoziierten-Fraktion befanden. Dies würde zu der annotierten Funktion von PhaX passen. Als Regulator der Phosphataufnahme könnte es direkt an den Phosphattransporter binden. In der Tat liegt das *phaX*-Gen auf dem Chromosom 1 direkt neben einem putativen Phosphattransporter PitA sodass vermutlich beide

## Diskussion

Gene ein Operon bilden. Einige andere Hinweise deuten ebenfalls auf eine Funktion im Phosphatmetabolismus hin. Zu den annotierten Domänen von PhaX gehört die PhoU-Domäne. Das *phoU* Gen ist ein Teil des Pho-Regulons, welches aus *pstSCAB* und *phoU* besteht, wobei PhoU für die Repression des Pho-Regulons bei hohen Phosphat Konzentration notwendig ist. Aus der Literatur ist es bekannt, dass eine *phoU knock-out* Mutante einen erhöhten Polyphosphat Gehalt in der Zelle zeigt (de Almeida et al., 2015; Morohoshi et al., 2002). *R. eutropha* H16 besitzt alle Gene aus dem *pst*-Operon inklusive dem *phoU* Gen auf dem Chromosom 1. Dies liegt wiederum in direkter Nachbarschaft zu den 2 Genen aus dem Polyphosphat Metabolismus (*ppk1* und *ppx*). *R. eutropha* H16 besitzt also ein „echtes“ *phoU* Gen innerhalb des *pst*-Operons und zusätzlich das *phaX*-Gen mit dem PhoU-Motif im Operon mit einem Phosphattransporter PitA. Die Frage die sich ergibt ist, ob jedes Phosphataufnahmesystem ein eigenes PhoU Protein besitzt? Bis jetzt deutet lediglich der Phänotyp der *phaX* Deletionsmutante darauf hin, dass PhaX und PhoU eine ähnliche Funktion haben könnten. Wie bereits erwähnt kann die *phoU* Deletionsmutante mehr PolyP speichern als der Wildtyp (de Almeida et al., 2015; Morohoshi et al., 2002). Dies wurde auch in *R. eutropha* für den  $\Delta$ *phaX* Stamm untersucht. Mit Hilfe einer DAPI Färbung konnte mikroskopisch der PolyP Gehalt im Wildtyp Stamm und in der *phaX* Deletionsmutante untersucht werden. Wie die  $\Delta$ *phoU* Mutanten aus anderen Organismen, speichert die  $\Delta$ *phaX*-Mutante ebenfalls mehr PolyP in Form von Granula. Dies wurde zusätzlich quantitativ mit Hilfe einer fluorometrischen Messung bewiesen.

Obwohl Gene ähnlich dem *phaX* in sehr vielen Organismen zu finden sind und diese interessanterweise immer in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem putativen Phosphat Transporter Gen *pitA* liegen, gibt es nur eine einzige Arbeitsgruppe um Prof. Finan von der McMaster University in Ontario, Canada, die auf das Gen aufmerksam geworden ist (Bardin et al., 1998). In seiner Arbeit wird aber nur erwähnt, dass *pitA* mit einem *phaX* ähnlichen Gen ein Operon bildet. Diese Arbeit gibt ebenfalls keine Aufklärung über die Funktion von PhaX, aber es wurde zum ersten mal ein Protein gefunden, das eine Verknüpfung zwischen PHB und Polyphosphat darstellt. Diese Entdeckung war nicht nur für das PHB-Gebiet wichtig, sondern erweckte unser Interesse an PolyP und eröffnete ein ganz neues Forschungsgebiet mit *R. eutropha* H16 als Modelorganismus. Somit ist diese Arbeit ein Ausgangspunkt zur Untersuchung des Polyphosphatmetabolismus in *R. eutropha* H16 geworden und wird in einer weiteren Doktorarbeit (Tony Tumlrirsch) fortgesetzt (Tumlrirsch et al., 2015).

## 4.2 PHB-Depolymerasen PhaZd1 und PhaZd2

Der Fokus des zweiten Teils dieser Doktorarbeit wurde auf die direkte Untersuchung der PHB Depolymerasen gelegt. Die Existenz von mehreren putativen PHB-Depolymerasen verursacht eine Schwierigkeit im Verständnis des Abbaus. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, ist es immer noch nicht geklärt, welche der neun identifizierten Enzyme für die Mobilisierung von PHB in *R. eutropha* H16 tatsächlich eine Rolle spielen. In dieser Arbeit wurden zwei PHB Depolymerasen, PhaZd1 und PhaZd2, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* genau charakterisiert. PhaZd1 wurde bereits als aktive PHB Depolymerase beschrieben (Abe et al., 2005) allerdings ohne das ein nachweisbarer Einfluss auf die Mobilisierung von PHB detektiert werden konnte. Somit wurde die physiologische Funktion der PhaZd1 Depolymerase noch nicht aufgeklärt. Das *R. eutropha* H16-Genom enthält eine zusätzliche putative PHB Depolymerase (H16\_B2401, PhaZd2) mit einer Aminosäure-Identität zu PhaZd1 (H16\_B2073) von 37%. Zu Beginn dieser Arbeit waren keine experimentellen Daten zu Funktion und Eigenschaften der PhaZd2 Depolymerase verfügbar.

Eine konstitutive Überexpression beider Enzyme hatte eine erhebliche Auswirkung auf den PHB-Gehalt von *R. eutropha* H16. Keine oder nur eine geringe Menge an PHB wurde von den *R. eutropha* Zellen gespeichert. Diese Ergebnisse waren die ersten Hinweise auf eine starke Depolymerase-Aktivität dieser Proteine *in vivo*. Ein so effizienter Abbau von PHB durch die Überexpression von PhaZd1 oder PhaZd2 war überraschend, und wurde in der Vergangenheit noch nie für eine Depolymerase beschrieben (Brigham et al., 2012b). Auch wenn die Induktion der Expression zu späteren Zeitpunkten der PHB Synthese stattfand (PHB-Gehalt von 20%) konnte PhaZd1 die gebildeten PHB Granula vollständig abbauen und auch PhaZd2 den PHB-Gehalt deutlich reduzieren. PhaZd2 kann vollständig mit Proteinen bedeckte Granula nicht vollständig abbauen. Die Überexpression von inaktiven Formen der Enzyme (mutiert im aktiven Zentrum) hatten keine Auswirkung auf den PHB-Gehalt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die PHB Depolymerasen PhaZd1 und PhaZd2 eine besonders hohe Aktivität *in vivo* aufweisen wenn sie artifiziell in *R. eutropha* H16 exprimiert werden. Ähnliche Ergebnisse wurden mit aufgereinigten Enzymen *in vitro* erzielt. Beide Enzyme hatten eine ungewöhnlich hohe PHB Depolymerase Aktivitäten für den Abbau von nPHB Granula. Die einzigen bekannten iPHB Depolymerasen mit vergleichbar hohen spezifischen Aktivitäten sind die Proteine aus *Bacillus thuringiensis* und *Bacillus megaterium* (Chen et al., 2009; Tseng et al., 2006). Jedoch waren die PHB Depolymerase Aktivitäten stark von der Ionenstärke des Puffers und von der Anwesenheit bzw. Abwesenheit von PHB-Granula assoziierten Proteinen abhängig. Besonders PhaZd2 zeigte eine deutlich niedrigere Aktivität

## Diskussion

in 0,1M Tris oder in Abwesenheit von Salzen (Tabelle 10). Die Pufferzusammensetzung hatte ausschließlich auf die PHB Depolymerase-Aktivität und nicht auf der Hydrolyse von p-Nitrophenylbutyrat einen starken Einfluss. Dies zeigte, dass vermutlich die Integrität der PHB-Granulums durch die Salze verändert wird und das Substrat durch Verlust der Oberflächenschicht zugänglicher wird. Diese Aussage konnte zusätzlich durch Versuche mit Granula aus Stämmen, die in den Genen codierend für Oberflächenproteine (PhaP1 bis PhaP5) deletiert waren, bestätigt werden. Hier war die Aktivität ebenso höher als mit den Wildtyp-Granula. Der gleiche Effekt konnte durch Vorbehandlung der Granula mit der Protease Trypsin erzielt werden. Daraus ergab sich die Annahme, dass die Veränderungen in der PHB Depolymerase Aktivität eher durch einen Salzeffekt auf das Substrat (nPHB Granula) verursacht werden und keine echte Abhängigkeit der beiden Depolymerase von Salzen reflektieren. Da die konstitutive Expression der PhaZd1 oder der PhaZd2 den PHB-Gehalt der Zellen drastisch reduzieren konnte, gehen wir davon aus, dass die *in vivo* Salzkonzentration ausreichen für eine hohe *in vivo*-Aktivität der beiden Enzyme ist.

Aufgrund der raschen Hydrolyse von PHB durch die Expression der PhaZd1 und PhaZd2 konnten keine Lokalisierungsversuche mit den aktiven eYfp-Fusionen durchgeführt werden. Ein Weg, um die Bindung an die PHB-Granula zu untersuchen, war die Herstellung der Fluoreszenzfusionen mit den inaktivierten Enzymen. Durch den Austausch des katalytisch aktiven Serin gegen Alanin sollte die Abbauaktivität der Depolymerasen ausgeschaltet werden dabei aber die Bindekapazität erhalten bleiben. Die mit eYfp fusionierte inaktive PhaZd1 hatte die Fähigkeit, an PHB Granula *in vivo* zu binden. Schwache Fluoreszenz war zudem auch im Zytoplasma zu beobachten. Offenbar bindet nur ein Teil des exprimierten Proteins an die Granula. Vermutlich führte die konstitutive Expression der Fusionsproteine dazu, dass überschüssiges Protein nicht an PHB binden konnte und willkürlich in der Zelle verteilt war.

Wenn das gleiche Experiment mit der inaktiven C-terminalen Fusion von PhaZd2 durchgeführt wurde, war die Fluoreszenz nur im Zytoplasma vorhanden. Eine interessante Beobachtung wurde mit der inaktiven N-terminalen Fusion von PhaZd2 gemacht. In diesem Fall wurde die grüne Fluoreszenz in Form von spindelförmigen Gebilden reproduzierbar beobachtet. Die Fäden wurden oft in der Zellmitte zum Beginn des Wachstums sichtbar und zum Zeitpunkt der Zellteilung oft in der Teilungsebene. Seit der Entdeckung, dass das PhaM Protein in der Lage ist PHB-Granula mit dem Nukleoid zu verknüpfen (Wahl et al., 2012) können wir spekulieren, dass es sich im Fall von PhaZd2 ebenfalls um ein Protein mit der Fähigkeit zur Bindung an das Nukleoid oder ein Element des Cytoskeletts handelt. Die hohe

## Diskussion

PHB Depolymerase Aktivität der PhaZd2 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* lässt aber erwarten, dass wenigstens ein Teil des Fusionsproteins am Substrat binden würde. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlicher, dass es sich bei den fadenartigen Strukturen eher um Artefakte der Markierung mit eYfp handelt. Es ist mittlerweile bekannt, dass GFP und die verbesserten Muteine einige Nachteile bei der Lokalisierung der Proteine mit sich bringen. Zu einem kann die Verlängerung eines der Termini durch Einbringen eines Fluoreszenzproteins die Funktion des Proteins stören indem die Zugänglichkeit der endständigen Domäne verringert wird. So könnte die Störung der PHB Bindungsdomäne bei PhaZd2 zu Bildung von Polymeren führen, die in Form von fadenförmigen Strukturen in der Zelle vorliegen. Bei Membranproteinen ist es bekannt, dass die Entfernung der Membranbindedomäne zu Erhöhung der Polymerisierung führen kann. Zum anderem kann die Dimerisierung des angehängtes GFP-Tags möglicherweise die Oligomerisierung des untersuchten Proteins begünstigen (Margolin, 2012).

Um ein Enzym als physiologische iPHB Depolymerase klassifizieren zu können, müssen folgende Kriterien erfüllt werden: das Protein sollte PHB Depolymerase-Aktivität mit nPHB Granula als Substrat aufweisen, die Lokalisierung der Depolymerase sollte *in vivo* am PHB Granulum sein, eine Deletion des Depolymerase Gens sollte eine nachweisbare Reduzierung der PHB Mobilisierung als Folge haben und das Protein sollte natürlich während der Akkumulierung und Mobilisierung exprimiert werden. PhaZd1 und PhaZd2 erfüllen sicherlich das erste Kriterium. Beide Enzyme haben eine sehr hohe nPHB Depolymerase-Aktivität *in vitro*. PhaZd1 erfüllt auch das zweite, da die eYfp-Fusion *in vivo* an nPHB bindet. Die hohe Aktivität der PhaZd2 Depolymerase *in vitro* zeigt, dass PhaZd2 ebenso in der Lage ist an PHB zu binden. Warum die eYfp-Fusion nicht am PHB lokalisiert ist wurde bereits oben diskutiert. Darüber hinaus führt die homologe Überexpression beider Enzyme zu einer drastischen Reduktion des PHB Gehalts. Die Deletion beider Gene *phaZd1*, *phaZd2* hatte dagegen keine Auswirkung auf die PHB Mobilisierung. Außerdem konnte die Expression der beiden Depolymerasen während des Wachstums auf NB-NaGlukonat Medium nicht nachgewiesen werden. In einer Proteomanalyse wurden keine Peptide der beiden Depolymerasen gefunden. Ebenso waren beide Promotoren während des Wachstums in NB-Medium mit Zugabe von NaGlukonat, wie mit Hilfe des  $\beta$ -Galaktosidase Gens als Reporter gezeigt worden ist, inaktiv. Bakterien besitzen die Fähigkeit die Expression der Proteine an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen. Dies geschieht überwiegend auf der Ebene der Transkription aber auch die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression über sRNA

spielt eine wichtige Rolle. Deshalb kamen wir zu dem Schluss, dass trotz hoher PHB Depolymerase Aktivität *in vitro* und trotz einer starken Reduktion des PHB Gehalts *in vivo* bei homologer Überexpression, PhaZd1 und PhaZd2 offenbar keine physiologische Funktion im PHB Stoffwechsel während des Wachstums von *R. eutropha* in NB-Medium + NaGlukonat haben. Wir können aber nicht ausschließen, dass unter Bedingungen bei denen PhaZd1 und / oder PhaZd2 in der Zelle exprimiert werden, eine Funktion im PHB Stoffwechsel vorhanden ist. Diese Bedingungen sind jedoch noch nicht identifiziert worden. Eine Existenz von mehreren PHB Depolymerasen mit unterschiedlicher Affinität und Aktivität gegenüber PHB könnte eine Regulationsstrategie darstellen, die eine flexible Reaktion auf die Veränderungen der Umweltbedingungen ermöglichen würde. Dies könnte dann durch die Expression des passenden Enzyms erzielt werden. Wenn man in Betracht zieht, dass die Synthese von PHB konstitutiv ist, ist es durchaus vorstellbar, dass die Regulation auf der Ebene der Mobilisierung des Polymers stattfindet. Man sollte auch die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass ein Enzym mit Depolymerase-Aktivität bei der Hydrolyse von komplexen PHB (cPHB) oder PHB-ylated Proteinen (oligo-PHB) beteiligt sein könnte. cPHB und Oligo-PHB sind in geringen Mengen in allen bis jetzt untersuchten prokaryotischen und eukaryontischen Organismen gefunden worden (Huang und Reusch, 1996; Reusch, 1995, 2012).

### **4.3 Weitere Versuche zur Erforschung des PHB Granulums**

In dieser Arbeit wurde die Synthese und Mobilisierung von PHB in *R. eutropha* H16 im NB-Medium mit Zugabe von NaGlukonat zur Induktion der PHB Bildung untersucht. Es ist bekannt, dass eine Reihe von Proteinen assoziiert mit der Oberfläche des Granulums vorliegen. Für einige dieser Proteine wurde die Bindung an PHB bereits experimentell bestätigt. Für andere ist die Lokalisierung am PHB lediglich postuliert worden (Jendrossek und Pfeiffer, 2014). Für die Untersuchung des PHB Stoffwechsels ist es von Bedeutung die Proteinzusammensetzung der PHB Oberflächenschicht, genannt PGAPs, unter den verwendeten Bedingungen zu kennen. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit bereits gezeigt haben, befinden sich während der Kultivierung nicht alle PGAPs zum gleichen Zeitpunkt am PHB. Pfeiffer und Jendrossek, 2011 konnte zeigen, dass auch Interaktionen zwischen PGAPs eine wichtige Rolle für die Regulation des PHB Stoffwechsels einnehmen. Diese Arbeit beschreibt den ersten Interaktionspartner mit einer Funktion außerhalb des PHB-Metabolismus. Diese Beispiele zeigen wie wichtig die Betrachtung des Granulums als Ganzes, mitsamt der Wechselwirkungen der am PHB Stoffwechsel beteiligten Proteine sowie der Proteine

## Diskussion

außerhalb des PHB Metabolismus, ist. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Gesamtheit der PGAPs in NB-Medium + NaGlukonat bestimmt.

Eine überraschend hohe Anzahl von 20 PGAPs mit nachgewiesener oder postulierte Funktion in PHB Stoffwechsel wurden bereits für *R. eutropha* H16 beschrieben. Diese PGAPs sind in der Tabelle 12 zusammengefasst.

Das PHB Proteom wurde für *R. eutropha* H16 bestimmt. Neben den bisher bekannten PGAPs wurde eine große Anzahl an Membran- und *outer membrane*-Proteinen (Omp) aber auch an anderen Proteinen mit diversen Funktionen in der untersuchten PHB Fraktion gefunden (Insgesamt 404 Treffer). Es ist relativ unwahrscheinlich, dass hunderte von Proteinen an die Oberfläche des Granulums binden. Vermutlich sind isolierte PHB-Granula stark von Proteinen anderer Zellfraktionen kontaminiert, die artifiziell nach dem Zellaufschluss und während der Probenvorbereitung mit der Oberfläche des Polymers assoziierten. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich auch bei putativen Membranproteinen in Wirklichkeit um falsch annotierte PHB-Proteine handelt. Die wissenschaftliche Debatte, ob die PHB Oberflächenschicht aus einer Phospholipid-Monoschicht bestehen könnte, ist immer noch nicht abgeschlossen. Die Bindung von Membranproteinen könnte als ein Argument dafür sprechen. Jedoch fehlen im Fall dieser Proteine überzeugende Beweise für eine echte *in-vivo*-Lokalisierung auf der PHB Oberflächenschicht.

Um die falsch positiven Treffer zu erkennen wurde ein umfangreicher Proteom-Ansatz in *R. eutropha* H16 durchgeführt. Dafür wurde eine Fraktionierung in vier intrazelluläre Fraktionen durchgeführt: Dies sind die Membranfraktion, Carbonatfraktion mit den membranassoziierten Proteinen, Cytoplasmafraktion mit den löslichen Proteinen und die PHB Fraktion. Als nächstes wurden alle vier Proteome miteinander verglichen und nur die Treffer ausgewählt, die ausschließlich in der PHB Fraktion vorgekommen sind und dementsprechend in den restlichen drei Fraktionen nicht auffindbar waren. Von den über 2500 identifizierten Proteinen waren nur vierzehn spezifisch in der PHB-Fraktion vorhanden. Die Anzahl erhöht sich auf sechzehn, wenn PhaR und PhaM dazugezählt wurden Tabelle 13. Beide Proteine können zusätzlich zu PHB an DNA binden.

Zehn der vierzehn PGAPs repräsentieren bekannte Proteine aus dem PHB Stoffwechsel: PHB-Synthasen PhaC1 und PhaC2, alle beschriebenen sieben Phasine (PhaP1-PhaP7) und die intrazelluläre PHB Depolymerase PhaZa1. Für die putativen PHB Depolymerasen wurden sehr interessante Ergebnisse erhalten. PhaZa1 war das einzige der neun Proteine, das an der

## Diskussion

Oberfläche des Granulums detektiert wurde. Die restlichen vier Isoenzyme (PhaZa2 bis PhaZa5) konnten nicht identifiziert werden. Sie wurden unter den verwendeten PHB-Speicherungsbedingungen nicht nachweisbar exprimiert. Ein ähnliches Ergebnis wurde für die zweite Gruppe der Depolymerasen (PhaZd1 und PhaZd2) erzielt. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass PhaZd1 und PhaZd2 an den PHB Granula *in vivo* lokalisiert sind und zwei sehr aktive intrazelluläre PHB Depolymerasen *in vitro* repräsentieren. Allerdings wurden die Proteine weder in der PHB Fraktion noch in den anderen drei Fraktionen gefunden. Anders sah dies bei den PHB Oligomerhydrolasen PhaY1 und PhaY2 aus. Diese wurden identifiziert, waren aber nicht spezifisch in der PHB Fraktion zu finden. PhaY1 wurde größtenteils in der Membranfraktion nachgewiesen (wenige Peptide in der PHB- und Cytoplasmafraktion) und PhaY2 ausschließlich in der löslichen Fraktion. Die lösliche Lokalisierung einer Oligomerhydrolase ist nicht besonders verwunderlich da, nach der Mobilisierung des Polymers entstandene Oligomere so weiter abgebaut werden können. Hier sollte zusätzlich an die Möglichkeit erinnert werden, dass ein unbekanntes Enzym mit Depolymerase-Aktivität bei der Hydrolyse von komplexen PHB (cPHB) oder PHB-ylated Proteinen (oligo-PHB) beteiligt sein könnte. Dies könnte die Membranlokalisierung der PhaY1 erklären.

Wie zuvor erwähnt waren lediglich zehn der vierzehn identifizierten Proteine aus dem PHB Stoffwechsel bereits bekannt. Somit wurden vier neue Proteine in der PHB Granulafraktion identifiziert. Diese vier Proteine sind: A0671 und B1632 (putative  $\alpha/\beta$  Hydrolasen), A2001 (Protein unbekannter Funktion) und A0225 (putative patatin-like Phospholipase). Die Genprodukte *a0671* und *b1632* sind als putative  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen annotiert und enthalten eine Domäne mit unbekannter Funktion (Duf 3141), welche auch in Proteinen vieler anderer Proteobakterien gefunden werden kann. A0671 (84 kDa) und B1632 (86 kDa) zeigen eine Identität von 46% und Ähnlichkeit von 62% zueinander. Kurze Sequenzen von ca. 100 Aminosäuren zeigen Ähnlichkeit zu PHB-Synthasen vom Typ I und zur Untereinheit der PhaC PHA Synthasen vom Typ III. Eine BlastP Analyse zeigte PHB-Synthasen/Depolymerasen als beste Treffer (zusätzlich zu den Orthologen A0671 und B1632 Proteinen aus anderen Proteobakterien). Interessanterweise zeigen A0671 und B1632 eine Ähnlichkeit zu einer intrazellulären PHB Depolymerase aus *A. vinelandii* (Avin03910; D. Segusa und L. Adaya, persönliche Mitteilung). Eine Insertionsmutante in Avin03910 speichert mehr PHB als der Wildtyp. Studien mit Deletionsmutanten von A0671 und B1632 zeigen, dass die Fähigkeit, das akkumulierte PHB zu mobilisieren leicht reduziert ist und lassen vermuten, dass A0671 und B1632 zur PHB Mobilisierungsaktivität beitragen.

## Diskussion

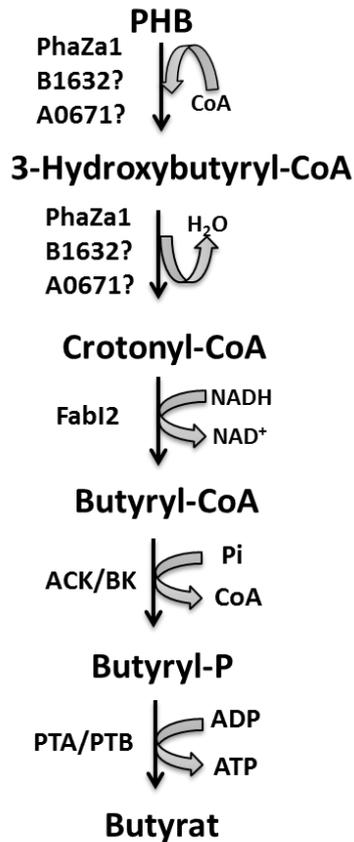
Wir gehen davon aus, dass A0671 und B1632 sowie Avin03910 eine neuartige intrazelluläre PHB Depolymerasen-Familie, mit hohen Molekülmassen (80-90 kDa) und keiner Aminosäuren-Ähnlichkeit zu anderen bekannten intra- oder extrazellulären PHB-Depolymerasen, darstellen. Obwohl B1632 und A0671 keine Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit zu PhaZa1 zeigen, haben sie eines gemeinsam, nämlich die konservierte Sequenz der Lipasebox mit katalytisch aktivem Cystein und nicht Serin wie bei den meisten bis dato beschriebenen extrazellulären und intrazellulären PHB Depolymerasen. Dies lässt vermuten, dass PHB-Granula von *R. eutropha* H16 drei Enzyme mit der Fähigkeit zur thioltyischer PHB Mobilisierung besitzen und dass B1632 und A0671 für die verbleibende PHB Abbauaktivität von  $\Delta$ phaZa1 Mutantenstämmen verantwortlich sind (Handrick et al., 2000). Somit wäre die Thioltyse in *R. eutropha* H16 die einzige Reaktion zum Abbau von PHB in NB Medium + NaGlukonat. Der Vorteil dieses Mechanismus gegenüber der Hydrolyse ist die Speicherung der Energie der Esterbindung in Form des energiereichen Thioesters. Wir schlagen vor, B1632 und A0671 (und Avin03910) in eine neue Untergruppe der intrazellulären PHB Depolymerasen (Untergruppe PhaZe) zu klassifizieren und die neuen Genprodukte als PhaZe1 (A0671) und PhaZe2 (B1632) zu benennen.

Die Lokalisierung von *b1632* auf dem Chromosom 2 ist von besonderem Interesse (Abbildung 30). Das *b1632* Gen liegt in direkter Nachbarschaft (nur 63 Nukleotide entfernt) von drei weiteren offenen Leserahmen (*b1632* bis *b1629*), die zusammen oder vielleicht auch mit *b1632* ein putatives Operon bilden. Die putativen Genprodukte der Nachbargene sind als eine Phosphat Acetyl-Transferase (Phosphotransacetylase, Pta1, B1631), eine putative Acetat-Kinase (AckA, B1630) und eine putative Enoyl-Reduktase (FabI2, B1629) annotiert. Ein ähnlicher Gencluster mit der gleichen Annotation von Genen ist in Genomen vieler anderer sequenzierter Proteobakterien, welche ein B1632 Ortholog besitzen, enthalten (einschließlich *A. vinelandii*). Alle drei Gene (B1629 bis B1631) werden in NB-Medium + NaGlukonat exprimiert. Zusammen mit B1632 könnten diese Proteine einen folgenden Abbauweg katalysieren. Das Cystein innerhalb der Lipasebox von B1632 legt nahe, dass B1632 das PHB (wie die PhaZa1 Depolymerase) thioltyisch zu 3-Hydroxybutyryl-CoA (3HB-CoA) und weiter zu Crotonyl-CoA umwandeln kann (Eggers und Steinbüchel, 2013; Uchino und Saito, 2006). Anschließend könnte die Reduktion zu Butyryl-CoA mit Hilfe von FabI2 oder über eine andere Acyl-CoA-Dehydrogenase, von denen viele im *R. eutropha* Genom vorhanden sind, stattfinden. Butyryl-CoA würde dann zu Butyryl-phosphat umgewandelt (Phosphotransacetylase, Pta1, B1631) und schließlich könnten dann ATP und Butyrat in eine Acetat-Kinase Reaktion gebildet werden (Acetat-Kinase, AckA, B1630). Die Bildung von

## Diskussion

ATP über den PTA-ACK Weg könnte auch mit den von PhaZa1 gebildeten 3HB-CoA/Crotonyl-CoA stattfinden. Allerdings sind PTA-ACK bekannt für die Dissimilation von Acetat zur Gewinnung von ATP. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Genprodukte in der Genbank falsch annotiert worden sind. Phosphotransbutyrylase (PTB) und Butyrat-Kinase (BK) bilden zusammen ein System für die Umwandlung von Butyryl-CoA zu Butyrat als eine wichtige ATP Quelle. Butyrat kann als Endprodukt der Fermentation von einigen *Clostridium*-Arten, wie *Clostridium butyricum*, *Clostridium thermobutyricum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium acetobutylicum* und *Clostridium pasteurianum* produziert werden (Jang et al., 2013; Zhang et al., 2009). Auch hier wird Butyryl-CoA zum Butyryl-Phosphat umgewandelt und anschließend die Phosphatgruppe auf ADP übertragen. Die Phosphotransacetylase PTA und Phosphotransbutyrylase PTB sind sehr ähnliche Proteine und deshalb ist es durchaus möglich, dass es ohne experimentelle bzw. strukturelle Daten zu einer unpräzisen Annotierung kommen kann. Bei Untersuchung der konservierten Domänen (NCBI) findet man zwar PTA als besten Treffer, aber auch die Ähnlichkeit zu PTB ist sehr hoch. Beide Enzyme gehören zu der Superfamilie der Phosphate Acetyl/Butyryl Transferasen. *Colostridien* sind obligate Anaerobier und nutzen PTB-BK und vorangehende Reaktionen zur Energiegewinnung und Regeneration von  $\text{NAD}^+$ . Auch *R. eutropha* exkretiert unter Sauerstofflimitierung Fermentationsprodukte wie Ethanol, 1-Propanol, 2-methyl-1-Propanol, 2,3-Butandiol und Säuren wie 3-Hydroxybutyrat und Butyrat ins Medium (Vollbrecht et al., 1978, 1979) und speichert gleichzeitig PHB. Dies könnte durch die Aktivität der Enzyme aus dem B1632 bis B1629 Operon erklärt werden. Acetat Exkretion ins Medium tritt auch aerob auf, wenn das Wachstum auf überschüssiger Glukose (oder anderen C-Quellen) die Respiration hemmt, dieses Phänomen wird bakterieller Crabtree –Effekt genannt (Crabtree, 1929; Doelle et al., 1982). Als Folge des Crabtree-Effekts, kann bis zu 15 % der Glucose als Acetat ausgeschieden werden (Holms, 1986). Dieser Effekt wurde auch für *R. eutropha* nach Zugabe von Glukonat beschrieben (Vollbrecht et al., 1979). Direkt nach der Zugabe von Glukonat und Erhöhung der Konzentration an gelöstem Sauerstoff wurde die Atmungsrate verringert was suggeriert, dass die Atmung teilweise durch die Zugabe von Glukonat gehemmt wurde. Somit wäre es denkbar, dass unter den verwendeten Bedingungen, NB Medium mit Zugabe von 0,2 % NaGlukonat ein Carbtree Effekt und nicht Sauerstoffmangel zur erhöhten Speicherung von PHB führt. Während der exponentiellen Wachstumsphase wird überschüssiges Acetyl-CoA zu PHB umgesetzt. Nach dem Verbrauch der C-Quelle wird PHB über Thiolyse mobilisiert, ATP anschließend über Substrat-Phosphorylierung regeneriert und Butyrat als Endprodukt ausgeschieden. Dieser Vorgang würde das Überleben der Zellen in

der stationären Phase verbessern. Diese Spekulationen könnten in einfacher Messung der Metabolite während der Kultivierung von *R. eutropha* H16 in NB-Medium + Glukonat überprüft werden.



**Abbildung 34: Schema des vermutlichen Abbauweges von PHB via Thiolyse und BK/PTB System**

Bemerkenswerterweise liegt neben dem Gen A0671 (*phaZe2*) eine weitere Acetat-Kinase (AckA2) und neben *ackA2* ein Gen mit einem Acetattransferase Motiv.

Die Vorhersage der Funktionen der beiden anderen Proteinen A2001 und A0225 ist deutlich schwieriger als im Fall von A0671 und B1632. Die Analyse der Aminosäuresequenz des Proteins A2001 gibt keine Ansatzpunkte für die putative Funktion des Proteins. Eine Blastp Analyse hingegen erkennt eine Domäne mit dem TIM-Barrel Phosphatbindemotiv. Dieses ist charakteristisch für TIM-Barrel Proteine, die aus acht geschlossenen  $\beta/\alpha$  Fassstrukturen bestehen. Im Fall von A2001 handelt es sich nicht um TIM-Barrel Protein (ein negatives Ergebniss mit dem TIM-Finder (<http://202.112.170.199/TIM-Finder/>) (Si et al., 2009)) allerdings kann eine Phosphatbinde-Funktion nicht ausgeschlossen sein. Welche Beitrag dies am PHB Metabolismus haben könnte bleibt unbekannt. Interessant ist die Position des Gens

## Diskussion

auf dem Chromosom 1. A2001 ist ein Teil eines putativen Operons, zu dem zusätzlich A2002 und A2003 gehören (Abbildung 30). A2002 codiert für die Acetoacetyl-CoA-Reduktase (PhaB2) und A2003 für die PHB Synthase (PhaC2). Beide Gene wurden bereits in der Vergangenheit mit dem PHB Metabolismus in Verbindung gebracht und diskutiert (Budde et al., 2010; Pfeiffer und Jendrossek, 2012). Die Suche nach ähnlichen Proteinen im gleichen genomischen Kontext ergab zwei Treffer. Das als hypothetisches Protein annotierte N234\_08700 aus *Ralstonia pickettii* DTP0602 zeigt eine Identität zu A2001 von 94%. Auch hier bildet das Protein ein Operon mit einer Acetoacetyl-CoA-Reduktase sowie PHB Synthase. Der zweite Treffer ist ein hypothetisches Protein aus *Ralstonia metallidurans* (Rmet\_5124). Die Identität beträgt in diesem Fall nur 27% (Ähnlichkeit 43%), interessanterweise enthält dieses Protein aber ein Phasin\_2 Motiv. Auch hier bildet das Protein ein Operon mit einer Acetoacetyl-CoA-Reduktase und einer PHB Synthase.

Das *a0225* Gen kodiert für ein 51 kDa großes Polypeptid. Die Aminosäuresequenz enthält ein Patatin-Motiv, charakteristisch für *Patatin-like* Phospholipasen. Diese Familie besteht aus verschiedenen Patatin Glykoproteinen in Pflanzen. Patatin-Proteine machen bis zu 40% des Gesamtproteins in der Kartoffelknolle aus. Patatin ist nicht nur ein Speicherprotein, sondern hat auch die enzymatische Aktivität der Lipid-Acyl-Hydrolasen, die die Spaltung von Fettsäuren von den Membranlipiden katalysieren (Scherer et al., 2010). *Patatin-like* Phospholipasen werden auch in Bakterien häufig gefunden (Banerji und Flieger, 2004). Die Beteiligung der Phospholipide am PHB Granulum ist ein kontrovers diskutiertes Thema. Die Entdeckung einer putativen Phospholipase macht die Diskussion noch interessanter. Ein interessanter Phänotyp für eine Transposon-Mutante von *Legionella pneumophila* in einem Operon aus 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase und *Patatin-like* Phospholipase wurde beschrieben. Die Insertionsmutante im 3HB-Dehydrogenase-Gen wurde in der Expression beider Gene des Operons beeinträchtigt was eine verringerte Phospholipaseaktivität verursachte. Interessanterweise hatten die Mutantenzellen einen erhöhten PHB-Gehalt (Aurass et al., 2009). Eine *Patatin-like* Phospholipase aus *Haloferax mediterranei* wurde als PHB Depolymerase charakterisiert (Liu et al., 2015). Es ist nicht klar, ob Phospholipide ein Teil des Granulums sind und ob A0225 an der Synthese bzw. Abbau dieser beteiligt ist. Beide Proteine und deren Funktion im PHB Stoffwechsel werden als Teil einer Doktorarbeit (Stefanie Bresan) weiter erforscht.

## 5 Literatur

- Abe, T., Kobayashi, T., and Saito, T. (2005). Properties of a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase with high specific activity (PhaZd) in *Wautersia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* *187*, 6982–6990.
- Aguena, M., Yagil, E., and Spira, B. (2002). Transcriptional analysis of the *pst* operon of *Escherichia coli*. *Mol. Genet. Genomics* *268*, 518–524.
- Ahn, K., and Kornberg, A. (1990). Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *J. Biol. Chem.* *265*, 11734–11739.
- Akiyama, M., Crooke, E., and Kornberg, A. (1992). The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein. *J. Biol. Chem.* *267*, 22556–22561.
- Akiyama, M., Crooke, E., and Kornberg, A. (1993). An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. *J. Biol. Chem.* *268*, 633–639.
- de Almeida, L.G., Ortiz, J.H., Schneider, R.P., and Spira, B. (2015). *phoU* inactivation in *Pseudomonas aeruginosa* enhances ppGpp and polyphosphate accumulation. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Anderson, A.J., and Dawes, E.A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* *54*, 450–472.
- Aragno, M., Walther-Mauruschat, A., Mayer, F., and Schlegel, H.G. (1977). Micromorphology of Gram-negative hydrogen bacteria. I. Cell morphology and flagellation. *Arch. Microbiol.* *114*, 93–100.
- Aurass, P., Pless, B., Rydzewski, K., Holland, G., Bannert, N., and Flieger, A. (2009). *bdhA-patD* operon as a virulence determinant, revealed by a novel large-scale approach for identification of *Legionella pneumophila* mutants defective for amoeba infection. *Appl. Environ. Microbiol.* *75*, 4506–4515.
- Banerji, S., and Flieger, A. (2004). Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiology (Reading, Engl.)* *150*, 522–525.
- Bardin, S.D., Voegelé, R.T., and Finan, T.M. (1998). Phosphate assimilation in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*: identification of a pit-like gene. *J. Bacteriol.* *180*, 4219–4226.
- Beeby, M., Cho, M., Stubbe, J., and Jensen, G.J. (2012). Growth and localization of polyhydroxybutyrate granules in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* *194*, 1092–1099.
- Blackall, L.L., Crocetti, G.R., Saunders, A.M., and Bond, P.L. (2002). A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek* *81*, 681–691.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* *72*, 248–254.

## Literatur

- Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W., and Fuller, R.C. (1988). *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly(beta-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. *Appl. Environ. Microbiol.* *54*, 1977–1982.
- Brigham, C.J., Budde, C.F., Holder, J.W., Zeng, Q., Mahan, A.E., Rha, C., and Sinskey, A.J. (2010). Elucidation of beta-oxidation pathways in *Ralstonia eutropha* H16 by examination of global gene expression. *J. Bacteriol.* *192*, 5454–5464.
- Brigham, C.J., Speth, D.R., Rha, C., and Sinskey, A.J. (2012a). Whole-genome microarray and gene deletion studies reveal regulation of the polyhydroxyalkanoate production cycle by the stringent response in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl. Environ. Microbiol.* *78*, 8033–8044.
- Brigham, C.J., Reimer, E.N., Rha, C., and Sinskey, A.J. (2012b). Examination of PHB Depolymerases in *Ralstonia eutropha*: Further Elucidation of the Roles of Enzymes in PHB Homeostasis. *AMB Express* *2*, 26.
- Budde, C.F., Mahan, A.E., Lu, J., Rha, C., and Sinskey, A.J. (2010). Roles of multiple acetoacetyl coenzyme A reductases in polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* *192*, 5319–5328.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., and Righetti, P.G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* *25*, 1327–1333.
- Chen, H.-J., Pan, S.-C., and Shaw, G.-C. (2009). Identification and characterization of a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase of *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.00621–09.
- Chung, C.T., Niemela, S.L., and Miller, R.H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *86*, 2172–2175.
- Claros, M.G., and von Heijne, G. (1994). TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput. Appl. Biosci.* *10*, 685–686.
- Crabtree, H.G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.* *23*, 536–545.
- Deane, C.M., Salwiński, Ł., Xenarios, I., and Eisenberg, D. (2002). Protein interactions: two methods for assessment of the reliability of high throughput observations. *Mol. Cell Proteomics* *1*, 349–356.
- Dennis, D., Sein, V., Martinez, E., and Augustine, B. (2008). PhaP is involved in the formation of a network on the surface of polyhydroxyalkanoate inclusions in *Cupriavidus necator* H16. *J. Bacteriol.* *190*, 555–563.
- Diaz, J.M., and Ingall, E.D. (2010). Fluorometric quantification of natural inorganic polyphosphate. *Environ. Sci. Technol.* *44*, 4665–4671.
- Doelle, H.W., Ewings, K.N., and Hollywood, N.W. (1982). Regulation of glucose metabolism in bacterial systems. In *Microbial Reactions*, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–35.

- Doi, Y., Kawaguchi, Y., Nakamura, Y., and Kunioka, M. (1989). Nuclear Magnetic Resonance Studies of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Polyphosphate Metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *Appl Environ Microbiol* 55, 2932–2938.
- Eggers, J., and Steinbüchel, A. (2013). Poly(3-Hydroxybutyrate) Degradation in *Ralstonia eutropha* H16 Is Mediated Stereoselectively to (S)-3-Hydroxybutyryl Coenzyme A (CoA) via Crotonyl-CoA. *J. Bacteriol.* 195, 3213–3223.
- Eugenio, L.I. de, García, P., Luengo, J.M., Sanz, J.M., Román, J.S., García, J.L., and Prieto, M.A. (2007). Biochemical Evidence That phaZ Gene Encodes a Specific Intracellular Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate Depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442 CHARACTERIZATION OF A PARADIGMATIC ENZYME. *J. Biol. Chem.* 282, 4951–4962.
- Foster, L.J.R., Lenz, R.W., and Fuller, R.C. (1994). Quantitative determination of intracellular depolymerase activity in *Pseudomonas oleovorans* inclusions containing poly-3-hydroxyalkanoates with long alkyl substituents. *FEMS Microbiology Letters* 118, 279–282.
- Foster, L.J.R., Stuart, E.S., Tehrani, A., Lenz, R.W., and Fuller, R.C. (1996). Intracellular depolymerase and polyhydroxyoctanoate granule integrity in *Pseudomonas oleovorans*. *International Journal of Biological Macromolecules* 19, 177–183.
- Fried, L., Lassak, J., and Jung, K. (2012). A comprehensive toolbox for the rapid construction of lacZ fusion reporters. *J. Microbiol. Methods* 91, 537–543.
- Gao, D., Maehara, A., Yamane, T., and Ueda, S. (2001). Identification of the intracellular polyhydroxyalkanoate depolymerase gene of *Paracoccus denitrificans* and some properties of the gene product. *FEMS Microbiol. Lett* 196, 159–164.
- García-Hidalgo, J., Hormigo, D., Arroyo, M., and de la Mata, I. (2013). Novel extracellular PHB depolymerase from *Streptomyces ascomycinicus*: PHB copolymers degradation in acidic conditions. *PLoS ONE* 8, e71699.
- Gebauer, B., and Jendrossek, D. (2006). Assay of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase activity and product determination. *Appl. Environ. Microbiol* 72, 6094–6100.
- Gebhard, S., Ekanayaka, N., and Cook, G.M. (2009). The low-affinity phosphate transporter PitA is dispensable for in vitro growth of *Mycobacterium smegmatis*. *BMC Microbiol.* 9, 254.
- Grage, K., Jahns, A.C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I.A., Atwood, J.A., and Rehm, B.H.A. (2009). Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules* 10, 660–669.
- Griebel, R.J., and Merrick, J.M. (1971). Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate: effect of mild alkaline extraction on native poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules. *J. Bacteriol.* 108, 782–789.
- Griebel, R., Smith, Z., and Merrick, J.M. (1968). Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. I. Purification, composition, and properties of native poly-beta-hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry* 7, 3676–3681.
- Handrick, R., Reinhardt, S., and Jendrossek, D. (2000). Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* 182, 5916–5918.

- Handrick, R., Reinhardt, S., Focarete, M.L., Scandola, M., Adamus, G., Kowalczyk, M., and Jendrossek, D. (2001). A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short chain-length hydroxyalkanoic acids. *J. Biol. Chem.* 276, 36215–36224.
- Handrick, R., Reinhardt, S., Kimmig, P., and Jendrossek, D. (2004a). The “intracellular” poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases. *J. Bacteriol.* 186, 7243–7253.
- Handrick, R., Technow, U., Reichart, T., Reinhardt, S., Sander, T., and Jendrossek, D. (2004b). The activator of the *Rhodospirillum rubrum* PHB depolymerase is a polypeptide that is extremely resistant to high temperature (121 degrees C) and other physical or chemical stresses. *FEMS Microbiol. Lett* 230, 265–274.
- Haywood, G.W., Anderson, A.J., and Dawes, E.A. (1989). The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters* 57, 1–6.
- Herzberg, C., Weidinger, L.A.F., Dörrbecker, B., Hübner, S., Stülke, J., and Commichau, F.M. (2007). SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions in vivo. *Proteomics* 7, 4032–4035.
- Hesselmann, R.P., Werlen, C., Hahn, D., van der Meer, J.R., and Zehnder, A.J. (1999). Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 454–465.
- Holms, W.H. (1986). The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Curr. Top. Cell. Regul.* 28, 69–105.
- Huang, R., and Reusch, R.N. (1996). Poly(3-hydroxybutyrate) is associated with specific proteins in the cytoplasm and membranes of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 271, 22196–22202.
- Huisman, G.W., Wonink, E., Meima, R., Kazemier, B., Terpstra, P., and Witholt, B. (1991). Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. *J. Biol. Chem.* 266, 2191–2198.
- Jang, Y.-S., Woo, H.M., Im, J.A., Kim, I.H., and Lee, S.Y. (2013). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for enhanced production of butyric acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9355–9363.
- Jendrossek, D. (2005). Extracellular Polyhydroxyalkanoate (PHA) Depolymerases: The Key Enzymes of PHA Degradation. In *Biopolymers Online*, (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA),.
- Jendrossek, D. (2009). Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *J. Bacteriol.* 191, 3195–3202.

- Jendrossek, D., and Handrick, R. (2002). Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu. Rev. Microbiol* 56, 403–432.
- Jendrossek, D., and Pfeiffer, D. (2014). New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environ. Microbiol.* 16, 2357–2373.
- Jendrossek, D., Schirmer, A., and Schlegel, H.G. (1996). Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 451–463.
- Kaddor, C., and Steinbüchel, A. (2011a). Effects of homologous phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system proteins on carbohydrate uptake and poly(3-Hydroxybutyrate) accumulation in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3582–3590.
- Kaddor, C., and Steinbüchel, A. (2011b). Implications of various phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system mutations on glycerol utilization and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation in *Ralstonia eutropha* H16. *AMB Express* 1, 16.
- Kaddor, C., Voigt, B., Hecker, M., and Steinbüchel, A. (2012). Impact of the core components of the phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system, HPr and EI, on differential protein expression in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Proteome Res.* 11, 3624–3636.
- Kaltwasser, H., and Schlegel, H.G. (1959). [Demonstration and quantitative determination of polyphosphate in hydrogen oxidizing bacteria]. *Arch Mikrobiol* 34, 76–92.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *PNAS* 95, 5752–5756.
- Karstens, K., Zschiedrich, C.P., Bowien, B., Stülke, J., and Görke, B. (2014). Phosphotransferase protein EIIANtr interacts with SpoT, a key enzyme of the stringent response, in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology (Reading, Engl.)* 160, 711–722.
- Keshavarz, T., and Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 321–326.
- Kobayashi, T., and Saito, T. (2003). Catalytic triad of intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase (PhaZ1) in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Biosci. Bioeng.* 96, 487–492.
- Kobayashi, T., Shiraki, M., Abe, T., Sugiyama, A., and Saito, T. (2003). Purification and Properties of an Intracellular 3-Hydroxybutyrate-Oligomer Hydrolase (PhaZ2) in *Ralstonia eutropha* H16 and Its Identification as a Novel Intracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase. *J. Bacteriol.* 185, 3485–3490.
- Kobayashi, T., Nishikori, K., and Saito, T. (2004). Properties of an intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase (PhaZ1) from *Rhodobacter spheroides*. *Curr. Microbiol.* 49, 199–202.
- Kobayashi, T., Uchino, K., Abe, T., Yamazaki, Y., and Saito, T. (2005). Novel intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase in *Wautersia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* 187, 5129–5135.

- Kornberg, A., Kornberg, S.R., and Simms, E.S. (1956). Metaphosphate synthesis by an enzyme from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 20, 215–227.
- Kornberg, A., Rao, N.N., and Ault-Riché, D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 89–125.
- Kortstee, G.J., Appeldoorn, K.J., Bonting, C.F., van Niel, E.W., and van Veen, H.W. (1994). Biology of polyphosphate-accumulating bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 137–153.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Steven Hill, D., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., and Peterson, K.M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175–176.
- Kulakova, A.N., Hobbs, D., Smithen, M., Pavlov, E., Gilbert, J.A., Quinn, J.P., and McGrath, J.W. (2011). Direct quantification of inorganic polyphosphate in microbial cells using 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Environ. Sci. Technol.* 45, 7799–7803.
- Kuroda, A., and Kornberg, A. (1997). Polyphosphate kinase as a nucleoside diphosphate kinase in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 439–442.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lawrence, A.G., Schoenheit, J., He, A., Tian, J., Liu, P., Stubbe, J., and Sinskey, A.J. (2005). Transcriptional analysis of *Ralstonia eutropha* genes related to poly-(R)-3-hydroxybutyrate homeostasis during batch fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 68, 663–672.
- Legrain, P., and Selig, L. (2000). Genome-wide protein interaction maps using two-hybrid systems. *FEBS Lett.* 480, 32–36.
- Lenz, O., and Friedrich, B. (1998). A novel multicomponent regulatory system mediates H<sub>2</sub> sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 12474–12479.
- Liu, G., Hou, J., Cai, S., Zhao, D., Cai, L., Han, J., Zhou, J., and Xiang, H. (2015). A patatin-like protein associated with the polyhydroxyalkanoate (PHA) granules of *Haloferax mediterranei* acts as an efficient depolymerase in the degradation of native PHA. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 3029–3038.
- Ma, W.-T., Lin, J.-H., Chen, H.-J., Chen, S.-Y., and Shaw, G.-C. (2011). Identification and characterization of a novel class of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Bacillus* sp. strain NRRL B-14911. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7924–7932.
- Madison, L.L., and Huisman, G.W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 21–53.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kawamoto, T., Yamada, M., and Nakata, A. (1989). Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J. Mol. Biol.* 210, 551–559.
- Margolin, W. (2012). The price of tags in protein localization studies. *J. Bacteriol.* 194, 6369–6371.

## Literatur

- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H.G., Gerits, J., Charles, P., and Van Gijsegem, F. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* *162*, 328–334.
- Merrick, J.M., and Doudoroff, M. (1964a). Depolymerization of poly-beta-hydroxybutyrate by intracellular enzym system. *J. Bacteriol.* *88*, 60–71.
- Merrick, J.M., Lundgren, D.G., and Pfister, R.M. (1965). Morphological changes in poly-beta-hydroxybutyrate granules associated with decreased susceptibility to enzymatic hydrolysis. *J. Bacteriol.* *89*, 234–239.
- Morohoshi, T., Maruo, T., Shirai, Y., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., and Kuroda, A. (2002). Accumulation of inorganic polyphosphate in *phoU* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 4107–4110.
- Müller, H.-M., and Seebach, D. (1993). Poly(hydroxyfettsäureester), eine fünfte Klasse von physiologisch bedeutsamen organischen Biopolymeren? *Angewandte Chemie* *105*, 483–509.
- Peplinski, K., Ehrenreich, A., Döring, C., Bömeke, M., Reinecke, F., Hutmacher, C., and Steinbüchel, A. (2010). Genome-wide transcriptome analyses of the “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism. *Microbiology (Reading, Engl.)* *156*, 2136–2152.
- Pfeiffer, D., and Jendrossek, D. (2011). Interaction between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins as revealed by two-hybrid analysis and identification of a new phasin in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology (Reading, Engl.)* *157*, 2795–2807.
- Pfeiffer, D., and Jendrossek, D. (2012). Localization of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granule-associated proteins during PHB granule formation and identification of two new phasins, PhaP6 and PhaP7, in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* *194*, 5909–5921.
- Pfeiffer, D., and Jendrossek, D. (2013). Development of a transferable bimolecular fluorescence complementation system for the investigation of interactions between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins in Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* *79*, 2989–2999.
- Pfeiffer, D., and Jendrossek, D. (2014). PhaM is the physiological activator of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha*. *Appl. Environ. Microbiol.* *80*, 555–563.
- Pfeiffer, D., Wahl, A., and Jendrossek, D. (2011). Identification of a multifunctional protein, PhaM, that determines number, surface to volume ratio, subcellular localization and distribution to daughter cells of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Mol. Microbiol.* *82*, 936–951.
- Pfennig, N. (1974). *Rhodopseudomonas globiformis*, sp. n., a new species of the Rhodospirillaceae. *Arch. Microbiol.* *100*, 197–206.
- Pohlmann, A., Fricke, W.F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Pötter, M., Schwartz, E., et al. (2006). Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat. Biotechnol.* *24*, 1257–1262.

- Pötter, M., and Steinbüchel, A. (2005). Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules* 6, 552–560.
- Pötter, M., Madkour, M.H., Mayer, F., and Steinbüchel, A. (2002). Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology (Reading, Engl.)* 148, 2413–2426.
- Pötter, M., Müller, H., Reinecke, F., Wieczorek, R., Fricke, F., Bowien, B., Friedrich, B., and Steinbüchel, A. (2004). The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. *Microbiology* 150, 2301–2311.
- Pötter, M., Müller, H., and Steinbüchel, A. (2005). Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology (Reading, Engl.)* 151, 825–833.
- Pries, A., Priefert, H., Krüger, N., and Steinbüchel, A. (1991). Identification and characterization of two *Alcaligenes eutrophus* gene loci relevant to the poly(beta-hydroxybutyric acid)-leaky phenotype which exhibit homology to ptsH and ptsI of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173, 5843–5853.
- Rangarajan, E.S., Nadeau, G., Li, Y., Wagner, J., Hung, M.-N., Schrag, J.D., Cygler, M., and Matte, A. (2006). The structure of the exopolyphosphatase (PPX) from *Escherichia coli* O157:H7 suggests a binding mode for long polyphosphate chains. *J. Mol. Biol.* 359, 1249–1260.
- Rao, N.N., Gómez-García, M.R., and Kornberg, A. (2009). Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 605–647.
- Rehm, B.H.A. (2003). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem J* 376, 15–33.
- Reinecke, F., and Steinbüchel, A. (2009). *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 16, 91–108.
- Reusch, R.N. (1995). Low molecular weight complexed poly(3-hydroxybutyrate): a dynamic and versatile molecule in vivo. *Can. J. Microbiol.* 41 Suppl 1, 50–54.
- Reusch, R.N. (2012). Physiological importance of poly-(R)-3-hydroxybutyrates. *Chem. Biodivers.* 9, 2343–2366.
- Reusch, R.N., Huang, R., and Bramble, L.L. (1995). Poly-3-hydroxybutyrate/polyphosphate complexes form voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels in the plasma membranes of *Escherichia coli*. *Biophys. J.* 69, 754–766.
- Saegusa, H., Shiraki, M., Kanai, C., and Saito, T. (2001). Cloning of an intracellular poly[D(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. *J. Bacteriol* 183, 94–100.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

- Santos-Beneit, F. (2015). The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Front Microbiol* 6, 402.
- Schembri, M.A., Bayly, R.C., and Davies, J.K. (1995). Phosphate concentration regulates transcription of the *Acinetobacter* polyhydroxyalkanoic acid biosynthetic genes. *J. Bacteriol.* 177, 4501–4507.
- Scherer, G.F.E., Ryu, S.B., Wang, X., Matos, A.R., and Heitz, T. (2010). Patatin-related phospholipase A: nomenclature, subfamilies and functions in plants. *Trends Plant Sci.* 15, 693–700.
- Schlegel, H.G., Kaltwasser, H., and Gottschalk, G. (1961a). [A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies]. *Arch Mikrobiol* 38, 209–222.
- Schlegel, H.G., Gottschalk, G., and Von Bartha, R. (1961b). Formation and Utilization of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyric Acid by Knallgas Bacteria (*Hydrogenomonas*). *Nature* 191, 463–465.
- Schwartz, E., Henne, A., Cramm, R., Eitinger, T., Friedrich, B., and Gottschalk, G. (2003). Complete Nucleotide Sequence of pHG1: A *Ralstonia eutropha* H16 Megaplasmid Encoding Key Enzymes of H<sub>2</sub>-based Lithoautotrophy and Anaerobiosis. *Journal of Molecular Biology* 332, 369–383.
- Serebriiskii, I.G., and Golemis, E.A. (2001). Two-hybrid system and false positives. Approaches to detection and elimination. *Methods Mol. Biol.* 177, 123–134.
- Si, J.-N., Yan, R.-X., Wang, C., Zhang, Z., and Su, X.-D. (2009). TIM-Finder: a new method for identifying TIM-barrel proteins. *BMC Struct. Biol.* 9, 73.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat Biotech* 1, 784–791.
- Steinbüchel, A., and Valentin, H.E. (1995). Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters* 128, 219–228.
- Steinbüchel, A., Hustede, E., Liebergesell, M., Pieper, U., Timm, A., and Valentin, H. (1992). Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 9, 217–230.
- Steinbüchel, A., Aerts, K., Babel, W., Follner, C., Liebergesell, M., Madkour, M.H., Mayer, F., Pieper-Furst, U., Pries, A., and Valentin, H.E. (1995). Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Can. J. Microbiol* 41 Suppl 1, 94–105.
- Suzuki, T., Yamane, T., and Shimizu, S. (1986). Kinetics and effect of nitrogen source feeding on production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fed-batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 24, 366–369.
- Sznajder, A., and Jendrossek, D. (2011). Biochemical characterization of a new type of intracellular PHB depolymerase from *Rhodospirillum rubrum* with high hydrolytic activity on native PHB granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 89, 1487–1495.

## Literatur

- Thattai, M., and van Oudenaarden, A. (2004). Stochastic gene expression in fluctuating environments. *Genetics* 167, 523–530.
- Thibodeau, S.A., Fang, R., and Joung, J.K. (2004). High-throughput beta-galactosidase assay for bacterial cell-based reporter systems. *BioTechniques* 36, 410–415.
- Tijssen, J.P., Beekes, H.W., and Van Steveninck, J. (1982). Localization of polyphosphates in *Saccharomyces fragilis*, as revealed by 4',6-diamidino-2-phenylindole fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 721, 394–398.
- Tirapelle, E.F., Müller-Santos, M., Tadra-Sfeir, M.Z., Kadowaki, M.A.S., Steffens, M.B.R., Monteiro, R.A., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., and Chubatsu, L.S. (2013). Identification of proteins associated with polyhydroxybutyrate granules from *Herbaspirillum seropedicae* SmR1--old partners, new players. *PLoS ONE* 8, e75066.
- Tseng, C.-L., Chen, H.-J., and Shaw, G.-C. (2006). Identification and characterization of the *Bacillus thuringiensis* phaZ gene, encoding new intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase. *J. Bacteriol.* 188, 7592–7599.
- Tumlirsch, T., Sznajder, A., and Jendrossek, D. (2015). Formation of Polyphosphate by Polyphosphate kinases and its Relationship to PHB Accumulation in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Uchino, K., and Saito, T. (2006). Thiolytic cleavage of poly(3-hydroxybutyrate) with polyhydroxyalkanoate synthase from *Ralstonia eutropha*. *J. Biochem.* 139, 615–621.
- Uchino, K., Saito, T., Gebauer, B., and Jendrossek, D. (2007). Isolated poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme A (CoA) and degradation of PHB to acetyl-CoA. *J. Bacteriol.* 189, 8250–8256.
- Uchino, K., Saito, T., and Jendrossek, D. (2008). Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZa1 is involved in mobilization of accumulated PHB in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1058–1063.
- van Veen, H.W. (1997). Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 72, 299–315.
- Vollbrecht, D., Nawawy, M.A., and Schlegel, H.G. (1978). Excretion of metabolites by hydrogen bacteria I. Autotrophic and heterotrophic fermentations. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 6, 145–155.
- Vollbrecht, D., Schlegel, H.G., Stoschek, G., and Janczikowski, A. (1979). Excretion of metabolites by hydrogen bacteria: IV. Respiration rate-dependent formation of primary metabolites and of poly-3-hydroxybutanoate. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 7, 267–276.
- Wahl, A., Schuth, N., Pfeiffer, D., Nussberger, S., and Jendrossek, D. (2012). PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*. *BMC Microbiol.* 12, 262.
- Weber, K., and Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406–4412.

## Literatur

- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103–119.
- York, G.M., Stubbe, J., and Sinskey, A.J. (2002). The *Ralstonia eutropha* PhaR protein couples synthesis of the PhaP phasin to the presence of polyhydroxybutyrate in cells and promotes polyhydroxybutyrate production. *J. Bacteriol.* 184, 59–66.
- York, G.M., Lupberger, J., Tian, J., Lawrence, A.G., Stubbe, J., and Sinskey, A.J. (2003). *Ralstonia eutropha* H16 encodes two and possibly three intracellular Poly[D-(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase genes. *J. Bacteriol.* 185, 3788–3794.
- Yuan, Z., Pratt, S., and Batstone, D.J. (2012). Phosphorus recovery from wastewater through microbial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 878–883.
- Yuan, Z.-C., Zaheer, R., and Finan, T.M. (2006). Regulation and properties of PstSCAB, a high-affinity, high-velocity phosphate transport system of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 188, 1089–1102.
- Zhang, C., Yang, H., Yang, F., and Ma, Y. (2009). Current progress on butyric acid production by fermentation. *Curr. Microbiol.* 59, 656–663.

## 6 Anhang

**Tabelle 14: Auflistung der Proteine, deren Expression in  $\Delta a2274$  im Vergleich zum Wildtyp um mindestens das 3fache verändert waren.**

Accession	Locus Tag	Protein Name	Peptides used for quantitation	Anova (p)	Max fold change	Fractions	Highest mean condition
116696334	H16_B2398	phosphatase	5	1,43E-03	53,4	3	deltaA_2274
113868407	H16_A2439	response regulator(PhoB)	2	1,08E-01	48,4	5	deltaA_2274
113868412	H16_A2444	ABC transporter periplasmic protein (PstS)	22	4,02E-06	32,8	5	deltaA_2274
498508998	H16_A2315	polyferredoxin	4	3,84E-02	27,9	1	deltaA_2274
113867593	H16_A1582	DNA segregation ATPase FtsK/SpoIIIE related protein	2	2,81E-02	14,9	1	deltaA_2274
113869411	H16_A3464	preprotein translocase subunit SecY	2	4,41E-02	12,0	1	deltaA_2274
38637912	PHG251	transcription regulator	4	2,54E-02	11,6	1	deltaA_2274
241664772	H16_A3643	FOF1 ATP synthase subunit A	2	3,38E-02	11,4	1	deltaA_2274
113869069	H16_A3115	preprotein translocase subunit SecD	4	2,71E-02	8,9	1	deltaA_2274
113869541	H16_A3604	cation/multidrug efflux pump	7	2,23E-02	6,7	1	deltaA_2274
116694187	H16_B0232	methyl-accepting chemotaxis protein	2	2,29E-02	6,7	3	deltaA_2274
116694050	H16_B0090	L-lactate permease	3	1,98E-02	5,7	1	deltaA_2274
116696176	H16_B2240	chemotaxis signal transduction protein	3	1,43E-03	4,0	5	deltaA_2274
113868294	H16_A2319	cbb3-type cytochrome oxidase, subunit I	2	3,86E-02	3,4	1	deltaA_2274
38638003	PHG342	hypothetical protein PHG342	6	1,13E-02	3,3	5	deltaA_2274
113868590	H16_A2629	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	5	4,94E-02	3,1	5	deltaA_2274
116696213	H16_B2277	cytochrome cd1 nitrite reductase (NirS)	6	1,85E-03	3,0	3	deltaA_2274
113867093	H16_A1073	bo3-type quinol oxidase, subunit III	2	1,54E-03	3,0	1	deltaA_2274
116694717	H16_B0766	extra-cytoplasmic solute receptor	7	8,52E-07	45,8	5	wt
113869458	H16_A3520	phenylacetate-CoA oxygenase subunit PaaA	2	1,15E-04	25,8	5	wt
116695301	H16_B1358	phenylacetic acid degradation protein	6	8,65E-03	16,6	4	wt
116695806	H16_B1870	K,phenylacetaldehyde dehydrogenase	25	1,51E-03	14,3	3	wt
113869539	H16_A3602	sulfoacetaldehyde acetyltransferase	19	7,10E-04	8,0	4	wt
113867954	H16_A1974	pyruvate kinase	5	4,82E-05	7,3	3	wt
113869261	H16_A3313	Acetyl/propionyl-CoA carboxylase, alpha subunit	3	5,87E-03	6,6	4	wt
113869591	H16_A3655	phenylacetate-CoA ligase	4	3,70E-03	5,9	4	wt
113868963	H16_A3009	ABC-type transporter, periplasmic component	15	9,42E-03	5,2	3	wt
116695134	H16_B1189	aspartate aminotransferase	3	1,69E-02	4,8	5	wt
113867613	H16_A1602	enoyl-CoA hydratase	2	3,87E-02	4,7	3	wt
116695047	H16_B1102	arylsulfatase A or related enzyme	17	3,33E-02	4,5	3	wt
116695631	H16_B1692	Acetyl-CoA synthetase	9	3,49E-02	4,3	4	wt
113869294	H16_A3346	putative aminotransferase	3	3,02E-02	4,2	4	wt
116694106	H16_B0146	saccharopine dehydrogenase [NADP+,L-glutamate-forming]	7	7,15E-03	3,7	4	wt
116694740	H16_B0794	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	7	1,67E-03	3,7	5	wt
113869293	H16_A3345	TRAP-type transporter, periplasmic component	6	7,75E-04	3,6	4	wt
116695570	H16_B1631	aldehyde dehydrogenase	2	4,19E-02	3,5	5	wt
116695619	H16_B1680	phosphate acetyltransferase	13	3,71E-02	3,4	4	wt
116695136	H16_B1191	lysine/ornithine N-monooxygenase	15	1,86E-02	3,3	4	wt
113869189	H16_A3235	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	119	4,76E-03	3,2	1;2;3	wt
116694129	H16_B0174	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	4	2,00E-03	3,2	4	wt
116695625	H16_B1686	acyl-CoA synthetase	27	1,13E-02	3,2	2;3	wt
113868347	H16_A2373	non-ribosomal peptide synthetase	4	3,17E-02	3,2	3	wt
116695622	H16_B1683	RNA polymerase sigma factor RpoS	39	3,48E-02	3,0	2	wt
116695620	H16_B1681	non-ribosomal peptide synthetase modules and related proteins	38	3,14E-02	3,0	4;5	wt
		siderophore biosynthesis related protein/acetyltransferase or N-acetylase of ribosomal proteins (CO					

## Anhang

**Tabelle 15: Identifizierte PGAPs aus der PHB-Proteomanalyse aus *R. eutropha* H16 und  $\Delta a2274$**

Identifizierte Proteine	Locus tag	Anzahl der identifizierten Peptide (3 biologische Replikate)					
		WT_1	WT_2	WT_3	$\Delta a2274_1$	$\Delta a2274_2$	$\Delta a2274_3$
PhaP1	A1381	26	28	32	34	29	32
hypothetical protein	B1632	38	38	39	21	23	25
PhaP2	PHG202	18	16	23	22	20	19
PhaC1	A1437	26	24	24	28	26	27
hypothetical protein	A0671	25	22	24	22	21	24
PhaZa1	A1150	20	20	22	25	24	24
$\alpha/\beta$ Hydrolase	A0671	17	20	18	19	16	17
PhaP4	B2021	10	11	11	11	11	10
PhaP3	A2172	12	10	12	11	11	12
hypothetical protein	A2001	10	13	13	11	11	11
PhaP5	B1934	14	15	17	12	12	11
PhaR	A1440	8	9	9	7	8	9
PhaP7	B2326	5	3	5	2	2	3
PhaM	A0141	2	3	2	3	3	2

















# Anhang

113867014	H16_A0992	hypothetical protein H16_A0992	0	0	0	4	4	6	0	0	0	0	6	8	6
113867015	H16_A0993	hypothetical protein H16_A0993	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	6	4	7
113867020	H16_A0999	fructose-1,6-bisphosphatase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	10	14
113867021	H16_A1000	aminopeptidase N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	27	22
113867022	H16_A1001	hypothetical protein H16_A1001	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113867023	H16_A1002	malic enzyme	0	0	0	0	0	14	10	9	8	0	37	34	32
113867025	H16_A1004	outer membrane protein (porin)	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	2	0	0
113867026	H16_A1005	hypothetical protein H16_A1005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2
113867027	H16_A1006	xylanase/chitin deacetylase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	2
113867030	H16_A1009	transthyretin-like protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3
113867031	H16_A1010	hypothetical protein H16_A1010	0	0	0	5	4	4	0	0	0	0	0	0	0
113867033	H16_A1012	fatty acid desaturase	0	0	0	11	10	11	3	2	0	0	0	0	0
113867034	H16_A1013	guanine deaminase	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	4	4
113867035	H16_A1014	adenosine deaminase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	8	8
113867037	H16_A1016	xanthine dehydrogenase, subunit B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	4	3
113867038	H16_A1017	xanthine dehydrogenase, iron-sulfur cluster and FAD-binding subunit A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4
113867040	H16_A1019	ABC transporter periplasmic protein	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	4	0	0
113867041	H16_A1020	methylate-binding domain-containing protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	5
113867043	H16_A1022	ABC-type transporter involved in lysophospholipase L1 biosynthesis, permease component	0	0	0	8	7	6	0	0	0	0	0	0	0
113867045	H16_A1024	hypothetical protein H16_A1024	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	4
113867046	H16_A1025	Rossmann fold nucleotide-binding protein / lysine decarboxylase family protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2
113867047	H16_A1026	TetR/AcrR family transcriptional regulator	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	5
113867055	H16_A1034	RNA polymerase factor sigma-70	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113867056	H16_A1035	acetolactate synthase 3 catalytic subunit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	12	11
113867057	H16_A1036	acetolactate synthase 3 regulatory subunit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7
113867058	H16_A1037	ketol-acid reductoisomerase	8	8	8	5	5	3	0	0	0	23	26	24	0
113867059	H16_A1038	phosphatidylserine decarboxylase	0	0	0	7	9	8	0	0	0	0	2	0	0
113867060	H16_A1039	phosphatidylserine synthase	0	0	0	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0
113867061	H16_A1040	LysM domain/BON superfamily protein	0	0	0	7	7	8	8	8	8	5	9	8	8
113867062	H16_A1041	2-isopropylmalate synthase	0	2	2	2	2	2	0	0	0	14	12	15	0
113867063	H16_A1042	lipoprotein	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
113867064	H16_A1043	ABC transporter periplasmic protein	3	3	3	0	0	0	0	0	0	9	12	7	0
113867065	H16_A1044	30S ribosomal protein S15	4	7	3	4	4	3	0	0	0	6	7	7	0
113867066	H16_A1045	polynucleotide phosphorylase/polyadenylase	17	15	15	6	4	5	0	0	0	32	35	35	0
113867067	H16_A1046	Zn-dependent oxidoreductase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	13	10	0
113867068	H16_A1047	triosephosphate isomerase	0	0	0	0	0	2	0	0	0	12	9	10	0
113867071	H16_A1051	NADH dehydrogenase subunit B	4	4	4	2	2	4	0	0	0	0	2	0	0
113867072	H16_A1052	NADH dehydrogenase subunit C	13	14	14	4	5	4	0	0	2	5	4	2	0
113867073	H16_A1053	NADH dehydrogenase subunit D	23	22	21	11	12	11	3	0	2	2	4	3	0
113867074	H16_A1054	NADH dehydrogenase subunit E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3	4	0
113867075	H16_A1055	NADH dehydrogenase chain F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	5	5	0
113867076	H16_A1056	NADH dehydrogenase subunit G	0	0	0	2	0	0	0	0	0	22	24	20	0
113867077	H16_A1057	NADH dehydrogenase subunit H	0	0	0	3	4	4	0	0	0	0	0	0	0
113867078	H16_A1058	NADH dehydrogenase subunit I	2	2	2	8	7	9	0	0	0	3	3	0	0
113867079	H16_A1059	NADH dehydrogenase subunit J	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
113867080	H16_A1060	NADH dehydrogenase subunit K	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
113867081	H16_A1061	NADH dehydrogenase subunit L	0	0	0	7	7	7	0	0	2	0	0	0	0
113867082	H16_A1062	NADH dehydrogenase subunit M	0	0	0	0	6	6	2	0	2	0	0	0	0
113867083	H16_A1063	NADH dehydrogenase subunit N	0	0	0	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0
113867085	H16_A1065	NTP pyrophosphohydrolase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0
113867087	H16_A1067	Acyl-CoA dehydrogenase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	10	10	0
113867088	H16_A1068	Acyl-CoA dehydrogenase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	14	11	0
113867089	H16_A1069	acyl dehydratase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	0
113867090	H16_A1070	acyl dehydratase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	3	0
113867091	H16_A1071	bo3-type quinol oxidase, subunit II	0	0	0	9	9	8	3	2	4	4	2	3	0
113867092	H16_A1072	bo3-type quinol oxidase, subunit I	0	0	0	9	10	9	3	3	0	0	0	0	0
113867093	H16_A1073	bo3-type quinol oxidase, subunit III	0	0	0	4	4	4	2	0	0	2	2	2	0
113867107	H16_A1087	urea amidohydrolase (urease) / regulatory and maturation protein UreG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	0
113867110	H16_A1090	glutathione S-transferase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	8	6	0
113867111	H16_A1091	FadE2-like Acyl-CoA dehydrogenase (ACAD)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	7	4	0
113867118	H16_A1098	gamma-glutamyltransferase 1	2	0	0	13	13	13	10	7	8	0	0	0	0
113867119	H16_A1099	aminoglycoside phosphotransferase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	14	13	0
113867121	H16_A1101	enoyl-CoA hydratase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	0
113867122	H16_A1102	3-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	12	14	0
113867123	H16_A1103	glutathione S-transferase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	8	8	0
113867124	H16_A1104	aminotransferase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	0	0





# Anhang

	6	7	18	18	19	12	12	12	12	10	9	10
113868015	H16_A2036	membrane protease subunits, stomatin/prohibitin homologs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868017	H16_A2038	phosphoenolpyruvate synthase	0	0	0	0	0	0	0	0	39	39
113868018	H16_A2039	hypothetical protein H16_A2039	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
113868019	H16_A2040	23S rRNA methyltransferase	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7
113868020	H16_A2041	ribonuclease HI	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
113868021	H16_A2042	lipid-A-disaccharide synthase	4	2	3	3	3	3	3	0	0	0
113868022	H16_A2043	UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase	0	0	0	0	0	0	0	0	11	11
113868023	H16_A2044	(3R)-hydroxymyristoyl-ACP dehydratase	0	0	0	0	0	0	0	0	12	12
113868024	H16_A2045	UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl) glucosamine N-acyltransferase	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
113868025	H16_A2046	hypothetical protein H16_A2046	4	4	6	5	3	3	3	13	15	14
113868026	H16_A2047	outer membrane protein, surface antigen OMA87	0	0	0	28	31	27	9	10	0	0
113868027	H16_A2048	membrane-associated Zn-dependent protease 1	0	0	0	15	15	13	0	0	0	0
113868032	H16_A2053	uridylylase kinase	3	5	5	5	6	7	0	0	9	9
113868033	H16_A2054	elongation factor Ts	0	0	0	0	0	0	0	0	25	25
113868034	H16_A2055	30S ribosomal protein S2	18	16	14	18	20	18	4	2	22	22
113868035	H16_A2056	methionine aminopeptidase	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
113868036	H16_A2057	Pil uridylyl-transferase	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
113868037	H16_A2058	16S rRNA uridine-516 pseudouridylylase synthase	12	4	7	0	0	0	0	0	4	4
113868040	H16_A2061	hypothetical protein H16_A2061	0	0	0	3	3	3	0	0	0	0
113868041	H16_A2062	chromosome segregation ATPase	0	0	0	0	0	0	0	0	34	30
113868044	H16_A2065	succinyl-diaminopimelate transaminase	0	0	0	0	0	0	0	0	9	7
113868045	H16_A2066	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-carboxylate N-succinyltransferase	0	0	0	0	0	0	0	0	20	19
113868046	H16_A2067	hypothetical protein H16_A2067	0	0	0	2	3	3	0	0	0	0
113868047	H16_A2068	arsenate reductase	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
113868048	H16_A2069	succinyl-diaminopimelate desuccinylase	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3
113868049	H16_A2070	N5-glutamine S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase	2	2	2	0	0	0	0	0	11	10
113868069	H16_A2091	membrane-associated Ser/Thr and Tyr protein phosphatase (dual specificity)	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0
113868070	H16_A2092	lysophospholipase	0	2	0	13	10	13	0	0	0	0
113868071	H16_A2093	CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate3-phosphatidyltransferase	0	0	0	4	2	4	0	0	0	0
113868072	H16_A2094	hypothetical protein H16_A2094	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
113868074	H16_A2096	D-aminopeptidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868075	H16_A2097	D-aminopeptidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868076	H16_A2098	ABC transporter permease	0	0	0	4	4	4	0	0	0	0
113868077	H16_A2099	ABC transporter permease	0	0	0	4	3	0	0	0	0	0
113868078	H16_A2100	ABC transporter periplasmic protein	28	25	28	7	9	8	8	5	24	25
113868079	H16_A2101	ABC transporter ATPase	15	12	13	14	15	18	0	0	0	0
113868080	H16_A2102	L-asparaginase	0	0	0	0	0	0	0	0	9	11
113868081	H16_A2103	GlnR family transcriptional regulator	0	3	3	3	0	2	0	0	3	2
113868082	H16_A2104	ABC transporter ATPase	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
113868091	H16_A2113	alanine racemase	0	0	0	0	0	0	0	0	6	7
113868095	H16_A2117	ribosomal-protein-alanine acetyltransferase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868096	H16_A2118	O-sialoglycoprotein endopeptidase	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2
113868097	H16_A2119	Acyl-CoA-binding protein	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4
113868099	H16_A2121	hypothetical protein H16_A2121	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4
113868100	H16_A2122	arylesterase protein	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
113868103	H16_A2125	ABC transporter periplasmic protein	2	5	5	0	0	0	0	0	14	12
113868105	H16_A2129	Zn-dependent hydrolase	0	0	0	3	4	2	0	0	0	0
113868137	H16_A2161	universal stress protein	0	0	0	0	0	0	0	0	10	8
113868138	H16_A2162	extra-cytoplasmic solute receptor	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
113868147	H16_A2171	acetoacetyl-CoA reductase	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2
113868148	H16_A2172	phasin (PHA-granule associated protein) [Php3]	0	0	0	0	0	0	9	9	0	0
113868153	H16_A2177	protein-tyrosine-phosphatase	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3
113868154	H16_A2178	protein-tyrosine-phosphatase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
113868162	H16_A2186	cobalt-zinc-cadmium resistance membrane-fusion protein	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
113868163	H16_A2187	cobalt-zinc-cadmium resistance efflux pump	0	0	0	5	5	5	0	0	0	0
113868187	H16_A2211	isocitrate lyase	0	0	0	0	0	0	0	0	20	18
113868189	H16_A2213	non-heme haloperoxidase	0	0	0	0	0	0	0	0	12	14
113868190	H16_A2214	amidase related to nictinamidases	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
113868191	H16_A2215	dienelactone hydrolase or related enzyme	0	0	0	0	0	0	0	0	8	6
113868193	H16_A2217	malate synthase	0	0	0	0	0	0	0	0	35	33
113868194	H16_A2218	HAD superfamily hydrolase	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3
113868196	H16_A2220	universal stress protein	0	0	0	3	3	2	0	0	6	7
113868197	H16_A2221	Zn-dependent protease with chaperone function	11	11	10	20	19	19	14	15	16	14
113868203	H16_A2227	isocitrate lyase	0	0	0	0	0	0	0	0	10	12
113868206	H16_A2230	ribonuclease activity regulator protein RraA	0	0	0	0	0	0	0	0	7	9
113868207	H16_A2231	thiamine pyrophosphate protein	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2



# Anhang

113868328	H16_A2354	adenylosuccinate synthetase	3	3	2	11	14	14	0	0	0	0	0	0	19	18	21
113868329	H16_A2355	ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	8	9
113868330	H16_A2356	membrane protease subunit stomatyl/prohibitin-like protein	0	0	0	20	21	20	7	5	4	0	0	0	0	0	0
113868331	H16_A2357	membrane protease subunit stomatyl/prohibitin-like protein	2	0	0	28	30	26	10	7	6	0	0	0	0	0	0
113868332	H16_A2358	GTPase	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
113868333	H16_A2359	RNA-binding protein Hfq	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	8	9
113868334	H16_A2360	GTP-binding protein EngA	6	6	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
113868335	H16_A2361	hypothetical protein H16_A2361	0	0	0	19	18	13	9	6	5	0	0	0	0	0	0
113868336	H16_A2362	transmembrane protein	0	0	0	15	16	16	18	4	3	4	4	5	5	6	6
113868337	H16_A2363	histidyl-RNA synthetase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	10	11
113868338	H16_A2364	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	9
113868339	H16_A2365	hypothetical protein H16_A2365	0	0	0	15	12	14	7	7	7	2	2	2	2	2	2
113868340	H16_A2366	Type IV pilus biogenesis protein PilF	0	0	0	6	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868341	H16_A2368	nucleoside diphosphate kinase	0	0	0	3	2	3	0	0	0	0	0	0	12	13	13
113868344	H16_A2370	23S rRNA 5-methyluridine methyltransferase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	9	10
113868346	H16_A2372	3'-5' exonuclease	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	6
113868347	H16_A2373	RNA polymerase sigma factor RpoS	0	0	0	10	10	8	0	0	0	0	0	0	2	2	5
113868348	H16_A2374	M23B subfamily metalloproteinase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868350	H16_A2376	stationary phase survival protein SurE	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868351	H16_A2377	NADPH:quinone oxidoreductase	0	0	0	4	3	3	0	0	0	0	0	0	7	6	4
113868355	H16_A2381	ABC transporter permease	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868356	H16_A2382	ABC transporter ATPase	11	10	15	4	3	3	6	3	0	0	0	0	0	0	3
113868357	H16_A2383	ABC-type transporter, periplasmic component	15	14	15	4	3	3	6	3	4	3	4	17	16	17	17
113868358	H16_A2384	extra-cytoplasmic solute receptor	4	3	3	0	0	2	0	0	0	0	0	12	13	14	14
113868359	H16_A2385	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	11
113868360	H16_A2386	acyl-CoA transferase/carnitine dehydratase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	25	25
113868361	H16_A2387	LysR family transcriptional regulator	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
113868362	H16_A2388	recombinational DNA repair protein (RecF pathway)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	4	5	5
113868363	H16_A2389	DNA polymerase III subunits gamma and tau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	7	4
113868364	H16_A2390	ribonucleotide reductase, coenzyme B12-dependent	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	16	16	16
113868365	H16_A2391	ATP-dependent exoDNase (exonuclease V) beta subunit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	11	15	15
113868366	H16_A2392	hypothetical protein H16_A2392	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
113868368	H16_A2394	thioredoxin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	8	10	10
113868369	H16_A2395	transcription termination factor Rho	10	9	8	11	9	12	0	0	0	0	0	22	19	13	13
113868371	H16_A2397	50S ribosomal protein L31 type B	9	9	9	2	2	0	0	0	0	0	0	9	9	9	9
113868372	H16_A2398	glycosyltransferase	0	0	0	4	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868374	H16_A2403	glutaryl-RNA synthetase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	17
113868377	H16_A2406	ABC transporter ATPase	0	0	0	4	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868379	H16_A2408	ABC transporter permease	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868380	H16_A2409	ABC transporter periplasmic protein	2	2	3	8	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868381	H16_A2410	enoyl-(acyl carrier protein) reductase	0	0	0	7	7	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868397	H16_A2428	GGDEF domain-containing protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868401	H16_A2433	translation initiation factor If-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	4	4
113868402	H16_A2434	phosphohistidine phosphatase	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	3	3
113868404	H16_A2436	eoxypolyphosphatase	0	0	0	3	2	2	0	0	0	0	0	6	4	4	4
113868409	H16_A2441	ABC transporter ATPase	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868412	H16_A2444	ABC transporter periplasmic protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	7	9	9
113868413	H16_A2445	phosphotransferase	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	7	13	15	15
113868415	H16_A2447	FtsH endopeptidase	8	4	7	36	37	35	6	7	7	0	0	2	2	2	2
113868416	H16_A2448	23S rRNA methylase	4	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868417	H16_A2449	RNA-binding protein	3	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	7	8	7	7
113868419	H16_A2451	transcription elongation factor GreA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	10	10
113868420	H16_A2452	carbamoyl phosphate synthase large subunit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	59	54	58	58
113868422	H16_A2454	carbamoyl phosphate synthase small subunit	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	13	12	12
113868423	H16_A2455	YggH family translation initiation inhibitor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	7
113868424	H16_A2456	thioesterase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	4	4
113868425	H16_A2457	2-aminobenzoate-CoA ligase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	19	18	18
113868426	H16_A2458	acyl-CoA dehydrogenase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	14	11	11
113868427	H16_A2459	enoyl-CoA hydratase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	12	12
113868428	H16_A2460	beta-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	11	12	12
113868429	H16_A2461	salicyl-CoA 5-hydroxylase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31	30	24	24
113868430	H16_A2462	propionyl-CoA synthetase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	10	7	7
113868433	H16_A2465	methyltransferase	2	0	0	4	3	3	0	0	0	0	0	2	0	0	0
113868434	H16_A2466	ribonuclease H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868445	H16_A2478	hypothetical protein H16_A2478	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113868458	H16_A2491	hypothetical protein H16_A2491	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	7	5	5	5











# Anhang

113869058	H16_A3104	Type IV pilus twitching motility protein PliT	2	4	3	0	0	0	0	2	4	0	0	2
113869059	H16_A3105	hypothetical protein H16_A3105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3
113869060	H16_A3106	pyrroline-5-carboxylate reductase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	6
113869062	H16_A3108	metalloreduction DNA-binding stress protein	3	3	2	2	0	0	0	0	0	15	14	14
113869063	H16_A3109	catalase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	24	23
113869066	H16_A3112	S-adenosylmethionine:RNA ribosyltransferase-isomerase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	2	4
113869067	H16_A3113	queuine tRNA-ribosyltransferase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
113869068	H16_A3114	preprotein translocase subunit YajC	0	0	4	4	3	3	4	4	3	2	2	2
113869069	H16_A3115	preprotein translocase subunit SecD	0	0	0	29	6	4	5	0	0	0	0	0
113869070	H16_A3116	preprotein translocase subunit SecE	0	0	0	26	5	5	6	0	0	0	0	0
113869071	H16_A3117	response regulator	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	13	10
113869072	H16_A3118	signal transduction histidine kinase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
113869074	H16_A3120	SAM-dependent methyltransferase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	8	8
113869075	H16_A3121	hypothetical protein H16_A3121	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	13
113869076	H16_A3122	hypothetical protein H16_A3122	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	11	12
113869078	H16_A3124	adenylosuccinate lyase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	21	19
113869079	H16_A3125	glutathione S-transferase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	7	7
113869080	H16_A3126	RNA-specific 2-thiouridylase MnmA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2
113869081	H16_A3127	phosphohydrolase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	3
113869082	H16_A3128	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha 1	9	10	11	3	4	2	0	0	0	13	12	8
113869083	H16_A3129	aspartate alpha-decarboxylase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	9	10
113869084	H16_A3130	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha 2	0	0	0	2	2	12	2	0	0	0	0	0
113869085	H16_A3131	NAD(P) transhydrogenase subunit beta	0	0	0	2	11	12	0	0	0	0	0	0
113869086	H16_A3132	response regulator containing an atypical phosphorylation pocket	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	4	4
113869087	H16_A3133	N6-adenine-specific DNA methylase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3
113869088	H16_A3134	2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	5
113869090	H16_A3136	gamma-glutamyl phosphate reductase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
113869091	H16_A3137	DNA polymerase III subunit delta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
113869092	H16_A3138	rare lipoprotein B precursor	0	0	0	6	7	5	2	3	0	0	0	0
113869093	H16_A3139	leucyl-tRNA synthetase fused to ISAE1 Orf2 fusion protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	18	18
113869095	H16_A3141	dihydrodipicolinate reductase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	10	10
113869096	H16_A3142	lipoprotein	0	0	0	5	9	2	0	2	0	2	0	2
113869097	H16_A3143	FUR family transcriptional regulator	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5
113869098	H16_A3144	LysR family transcriptional regulator	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3	4
113869099	H16_A3145	hypothetical protein H16_A3145	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
113869100	H16_A3146	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0	0	0	2	0	0	0	0	0	25	29	27
113869101	H16_A3147	transketolase	30	26	29	12	14	15	2	4	9	14	12	12
113869102	H16_A3148	hypothetical protein H16_A3148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	2
113869105	H16_A3151	hypothetical protein H16_A3151	2	5	3	0	0	0	0	0	0	2	0	2
113869107	H16_A3153	malic enzyme	0	0	9	9	0	0	0	0	0	25	29	27
113869110	H16_A3156	competence-damage protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	6	4
113869111	H16_A3157	oxotidine 5'-phosphate decarboxylase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	8
113869113	H16_A3159	Iwg2+/Coz2 transporter	0	0	0	11	11	10	0	0	0	0	0	0
113869115	H16_A3161	shikimate 5-dehydrogenase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	5	7
113869116	H16_A3162	periplasmic protein TonB, links inner and outer membranes	0	0	0	0	5	4	3	0	0	0	0	0
113869117	H16_A3163	transcriptional regulator	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	7
113869118	H16_A3164	short chain dehydrogenase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	8
113869120	H16_A3166	esterase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
113869121	H16_A3167	UDP-N-acetylmuramate-L-alanine ligase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	6	6
113869123	H16_A3169	thioredoxin-like protein	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0
113869124	H16_A3170	3-dehydroquinate dehydratase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	4
113869126	H16_A3171	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein subunit	2	2	0	0	0	0	0	0	0	5	6	6
113869127	H16_A3173	ribosomal protein L11 methyltransferase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113869128	H16_A3174	hypothetical protein H16_A3174	0	0	0	0	0	4	0	0	0	3	3	5
113869129	H16_A3175	thiol peroxidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	17	17
113869130	H16_A3176	carbohydrate kinase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	10
113869131	H16_A3177	outer membrane lipoprotein	0	0	0	2	2	2	3	0	0	0	0	2
113869132	H16_A3178	histone H1-like protein (alanine/lysine-rich protein)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
113869136	H16_A3182	outer membrane receptor, TonB dependent	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5
113869140	H16_A3186	aldehyde reductase, related to diketoglucuronate reductase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113869142	H16_A3188	hypothetical protein H16_A3188	0	0	3	3	3	3	2	3	2	2	2	2
113869143	H16_A3189	recombination associated protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0
113869145	H16_A3191	extra-cytoplasmic solute receptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0
113869183	H16_A3229	hypothetical protein H16_A3229	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
113869185	H16_A3231	hypothetical protein H16_A3231	3	7	4	12	8	8	11	0	0	3	7	5

# Anhang

113869187	H16_A3233	hypothetical protein H16_A3233	12	10	12	15	11	11	0	0	0	0	0	11	13	10
113869188	H16_A3234	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	19	18
113869189	H16_A3235	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	17	22	14	24	19	21	4	0	0	0	0	85	87	78
113869191	H16_A3237	response regulator	0	0	0	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0	2
113869192	H16_A3238	signal transduction histidine kinase	0	0	0	5	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0
113869195	H16_A3241	signal recognition particle GTPase	7	9	7	9	9	9	0	0	0	0	0	2	4	4
113869196	H16_A3242	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	3
113869200	H16_A3246	proyl-HRNA synthetase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	18	16
113869201	H16_A3247	dinucleoside polyphosphate hydrolase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	4
113869202	H16_A3248	periplasmic protein	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	2	2	2
113869203	H16_A3249	gamma-glutamyl kinase	3	2	2	3	5	2	0	0	0	0	0	6	6	4
113869204	H16_A3250	GTPase ObgE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	8	9
113869206	H16_A3251	50S ribosomal protein L27	5	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0
113869207	H16_A3252	50S ribosomal protein L21	5	5	3	0	0	2	0	0	0	0	0	3	4	4
113869208	H16_A3253	trans-nexaprenyltransferase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	3
113869209	H16_A3255	Type IV pilus assembly protein PilB	0	0	0	3	6	4	0	0	0	0	0	0	0	0
113869210	H16_A3256	Type IV pilus assembly protein PilC	0	0	0	4	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0
113869211	H16_A3257	Type IV pilus prepilin leader peptidase 1	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
113869212	H16_A3258	dephospho-CoA kinase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
113869212	H16_A3259	hypothetical protein H16_A3259	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3	3
113869213	H16_A3260	oligopeptide transporter	0	0	0	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
113869215	H16_A3262	ATPase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	6	4
113869216	H16_A3263	bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	15	17
113869217	H16_A3264	preprotein translocase subunit SecA	6	5	4	17	13	16	0	0	0	0	38	42	43	43
113869219	H16_A3266	UDP-3-O-[ $\beta$ -hydroxymyristoyl]-N-acetylglucosamine deacetylase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	4	4
113869220	H16_A3267	peroxiredoxin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	6
113869221	H16_A3268	cell division protein FtsZ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	15	10
113869222	H16_A3269	cell division protein FtsA	3	3	3	10	9	7	0	0	0	0	18	18	16	16
113869223	H16_A3270	cell division protein FtsQ	0	0	0	6	4	5	0	0	0	0	0	0	0	0
113869224	H16_A3271	D-alanine-D-alanine ligase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	8
113869225	H16_A3272	UDP-N-acetylmuramate-L-alanine ligase	4	2	3	7	5	6	0	0	0	0	0	7	7	7
113869226	H16_A3273	undecaprenyl(diphospho-muramoyl)pentapeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase	0	0	0	10	9	11	0	0	0	0	0	0	0	0
113869227	H16_A3274	cell division protein FtsW	0	0	0	2	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0
113869228	H16_A3275	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate synthetase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	7	9
113869229	H16_A3276	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	0	0	0	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
113869230	H16_A3277	UDP-N-acetylmuramoyl tripeptide-D-alanyl-D-alanine ligase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	14	17
113869231	H16_A3278	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate-2,6-diaminopimelate ligase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	9	6
113869232	H16_A3279	peptidoglycan glycosyltransferase	0	0	0	18	18	18	0	0	0	0	0	0	0	0
113869233	H16_A3280	cell division protein FtsI	0	0	0	3	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0
113869234	H16_A3281	S-adenosyl-methyltransferase MraW	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	4
113869235	H16_A3282	cell division protein MraZ	2	4	3	0	0	0	0	0	0	0	2	2	4	4
113869236	H16_A3283	ubiquinone biosynthesis protein COQ7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
113869237	H16_A3284	outer membrane protein (porin)	0	0	2	13	12	14	10	10	10	0	0	0	0	0
113869238	H16_A3285	extra-cytoplasmic solute receptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
113869239	H16_A3286	MarR family transcriptional regulator	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
113869241	H16_A3288	acyl-CoA synthetase	16	14	10	6	9	7	0	0	0	0	2	2	2	2
113869245	H16_A3292	molybdopterin oxidoreductase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	3	2
113869251	H16_A3298	ABC transporter periplasmic protein	9	12	13	0	3	0	0	0	0	0	19	14	16	16
113869252	H16_A3299	M20 family peptidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	6	6
113869255	H16_A3307	enoyl-CoA hydratase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	17	16	16
113869256	H16_A3308	ABC transporter ATPase	0	0	0	4	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0
113869257	H16_A3309	ABC transporter permease	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113869258	H16_A3310	ABC transporter periplasmic protein	0	0	0	14	12	15	0	0	0	13	8	10	10	10
113869259	H16_A3311	enoyl-CoA hydratase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	6	7
113869260	H16_A3312	phenylacetic acid degradation protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	2
113869261	H16_A3313	phenylacetate-CoA ligase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	10	10	10
113869262	H16_A3314	membrane-bound lytic murein transglycosylase	0	0	0	8	9	6	4	4	0	0	0	0	0	0
113869264	H16_A3316	Apag	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	4
113869265	H16_A3317	ribulose-phosphate 3-epimerase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	4	7	7
113869267	H16_A3319	anthranilate synthase component I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	5	6	6
113869268	H16_A3320	anthranilate synthase component II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4
113869269	H16_A3321	anthranilate phosphoribosyltransferase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	2	2
113869270	H16_A3322	indole-3-glycerol-phosphate synthase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	6	6	6
113869272	H16_A3324	uracil-DNA glycosylase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
113869276	H16_A3328	hypothetical protein H16_A3328	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
113869277	H16_A3329	M61 subfamily peptidase	9	6	6	4	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
113869278	H16_A3330	alcohol dehydrogenase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	5	5

# Anhang

113869279	H16_A3331	protein-disulfide isomerase	4	6	5	0	0	2	0	0	0	0	4	7	6
113869281	H16_A3333	GTP-dependent nucleic acid-binding protein EngD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	10	9
113869282	H16_A3334	hypothetical protein H16_A3334	0	0	0	5	6	3	0	0	0	0	0	0	0
113869284	H16_A3336	hypothetical protein H16_A3336	0	0	0	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0
113869285	H16_A3337	5'-methylthioadenosine 5'-adenosylhomocysteine nucleosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3
113869289	H16_A3341	hypothetical protein H16_A3341	0	0	7	8	8	8	4	3	3	6	5	9	9
113869291	H16_A3343	glutar redoxin-like protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4
113869292	H16_A3344	3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxylase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
113869293	H16_A3345	aldehyde dehydrogenase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	10
113869294	H16_A3346	saccharopine dehydrogenase [NADP <sub>+</sub> -L-glutamate-forming]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11
113869295	H16_A3348	dihydropicolinate reductase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	4
113869297	H16_A3349	hypothetical protein H16_A3349	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
113869298	H16_A3350	extra-cytoplasmic solute receptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	3	3
113869303	H16_A3355	cation/multidrug efflux system outer membrane porin	0	0	7	7	8	8	6	3	2	0	0	0	6
113869304	H16_A3356	cation/multidrug efflux pump	0	0	30	31	30	5	3	2	5	6	6	6	6
113869305	H16_A3357	cation/multidrug efflux system, membrane-fusion component	12	11	7	0	0	0	0	0	0	6	7	7	7
113869306	H16_A3358	periplasmic protein	2	0	0	3	2	4	0	0	0	13	11	14	14
113869308	H16_A3360	ABC transporter ATP-binding protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2
113869311	H16_A3383	hypothetical protein H16_A3383	0	0	9	9	9	9	7	7	0	0	0	0	0
113869332	H16_A3384	hypothetical protein H16_A3384	0	0	3	4	3	3	0	0	0	0	0	0	0
113869339	H16_A3391	hypothetical protein H16_A3391	0	0	15	11	14	0	0	0	0	8	6	5	5
113869341	H16_A3394	CpXP protease specificity-enhancing factor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2
113869342	H16_A3395	stringent starvation protein A (glutathione S-transferase)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	13	13	11
113869343	H16_A3396	ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome c1	3	2	0	12	13	4	4	5	4	5	4	5	4
113869344	H16_A3397	ubiquinol-cytochrome-c reductase, cytochrome b	7	8	7	8	7	6	3	3	2	4	4	2	2
113869345	H16_A3398	ubiquinol-cytochrome-c reductase, iron-sulfur subunit (Rieske Fe-S protein)	0	0	4	3	3	0	0	0	2	2	0	0	0
113869346	H16_A3399	large-conductance mechanosensitive channel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113869347	H16_A3400	hypothetical protein H16_A3400	0	0	13	14	12	2	0	0	0	4	3	4	4
113869348	H16_A3401	trypsin-like serine protease	8	9	9	21	24	27	17	15	12	12	13	8	8
113869349	H16_A3402	outer membrane protein (porin)	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113869350	H16_A3403	Sec-independent protein translocase component TatC	0	0	0	3	4	4	0	0	0	0	0	0	0
113869351	H16_A3404	sec-independent translocase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113869352	H16_A3405	twin arginine translocase protein A	0	0	5	4	5	0	0	0	0	0	0	2	2
113869353	H16_A3406	diadenosine tetraphosphate (Ap4A) hydrolase and other HTT family hydrolases	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	3	3
113869355	H16_A3408	phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5	6	6
113869356	H16_A3409	phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2
113869357	H16_A3410	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HsfB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	11	12	12
113869358	H16_A3411	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	14	12	12
113869360	H16_A3413	transporter	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0
113869361	H16_A3414	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	9	7	7
113869362	H16_A3415	histidinol-phosphate aminotransferase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	6	4	4
113869363	H16_A3416	histidinol dehydrogenase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	10	10
113869364	H16_A3417	ATP-phosphoribosyltransferase catalytic subunit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	8	9	9
113869365	H16_A3418	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	11	9	9
113869366	H16_A3419	BolA family transcriptional regulator	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0
113869368	H16_A3421	ABC transporter ATPase	8	6	6	7	7	6	0	0	0	0	0	2	2
113869370	H16_A3423	ABC-type transporter, auxiliary periplasmic component involved in toluene tolerance	0	0	2	0	0	0	0	0	0	12	10	10	10
113869371	H16_A3424	surface lipoprotein, VacJ-like	0	0	3	4	4	2	0	0	0	0	0	0	0
113869372	H16_A3425	ABC-type transporter, periplasmic component involved in toluene tolerance	0	0	0	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0
113869373	H16_A3426	ABC-type transporter, periplasmic component involved in toluene tolerance	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
113869374	H16_A3427	ABC-type transporter, ATPase component involved in toluene tolerance	0	0	6	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0
113869377	H16_A3430	glutamate synthase subunit beta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	6	10	10
113869378	H16_A3431	glutamate synthase [NADPH], glutamate synthase amidotransferase subunit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	62	59	62	62
113869380	H16_A3433	deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolyase-like protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	5	5
113869381	H16_A3434	3-dehydroquininate synthase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	13	13	13
113869382	H16_A3435	shikimate kinase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
113869383	H16_A3436	pili assembly protein PilQ	0	0	5	6	3	8	5	4	0	0	0	0	0
113869384	H16_A3437	Type IV pilus assembly protein PilP	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
113869385	H16_A3438	Type IV pilus assembly protein PilO	0	0	5	5	2	3	0	0	0	0	0	0	0
113869386	H16_A3439	tfp pilus assembly protein PilN	0	0	8	8	7	0	0	0	0	0	0	0	0
113869388	H16_A3441	periplasmic multimodular transpeptidase/transglycosylase	0	0	28	25	25	2	2	0	0	0	0	0	0
113869390	H16_A3443	diaminopimelate decarboxylase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	11	10	10
113869391	H16_A3444	sulfite oxidase subunit YedY	0	0	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
113869392	H16_A3445	sulfite oxidase subunit YedY	3	3	2	0	0	0	0	0	0	7	4	3	3
113869395	H16_A3448	hypothetical protein H16_A3448	0	0	0	3	4	4	3	2	0	0	0	0	0





















## **v. Danksagung**

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Jendrossek für die Überlassung des Themas und die Betreuung meine Arbeit. Ich danke ihm für sein Vertrauen und Unterstützung. Durch seine offene und freundliche Art war die Arbeitsatmosphäre immer angenehm und familiär was eine große Motivation und Unterstützung während des Laboralltags war.

Großer Dank auch für die Möglichkeit meine Ergebnisse auf Zahlreichen Fachtagung zu präsentieren. Vor allem für den Besuch der Fachtagung ISBP 2012 in Cairns.

Herrn Prof. Dr. Georg Sprenger danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut arbeiten zu können und für die Diskussionen und Anregungen während der Halbjahresbesprechungen.

Ein herzliches Dankeschön allen Mitarbeitern des Institutes für Ihre Hilfsbereitschaft und die nette Atmosphäre

Am meisten danke ich meiner Familie für ihre Glauben an mich und besonders Alex, für seine Liebe, seine Unterstützung, seine Geduld (wenn die Laune mal wieder nicht so gut war) und für die vielen Stunden, die er zum Lesen und korrigieren meiner Arbeit geopfert hat.

## vi. Lebenslauf

### Anna Karolina Sznajder

Heusteigstrasse 108, 70180 Stuttgart

**Persönliche Daten**                      Geburtsdatum                      14 Juli 1983

**Geburtsort**                                      Świdnica, Polen

**Staatangehörigkeit**                      Polnisch

#### Schulische Ausbildung

1990 – 1998                      Grundschule in Świdnica, Polen

1998 – 2001                      Allgemeinbildendes Lyzeums in Świdnica, Polen

2001 – 2002                      Newbattle Community High School in Dalkeith, Schottland  
Abschluss: Scottish Qualifications Certificate

2002 – 2003                      Allgemeinbildendes Lyzeums in Świdnica, Polen  
Abschluss: Abitur

#### Studium

2003 – 2004                      Sprachkurs an der Universität Bielefeld  
Abschluss: DSH (Deutsche Sprachprüfung für den Hochschulzugang)

Ab 09/2004                      Studium an der Universität Stuttgart  
Fach: Technische Biologie

12/2006                                      Vordiplom

Ab 2007                                      Hauptstudium

10/2009 – 04/2010                      Studienarbeit, Medical Research Council, Human Genetics Unit,  
Edinburgh, Scotland

Titel: Investigation of the possible different functions of UBA1 and  
UBA2 domains of Rhp23 in *Schizosaccharomyces pombe*

04/2010 – 04/2011                      Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart  
Titel: Biochemische Charakterisierung einer neuen PHB-Depolymerase  
mit hoher hydrolytischer Aktivität gegenüber native PHB Granula aus  
*Rodospirillum rubrum*

#### Promotion

05/2011 – 07/2015                      Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart  
Titel: Charakterisierung zweier PHB Depolymerasen und  
Identifizierung neuer Proteine des PHB-Granulumkomplexes in  
*Ralstonia eutropha* H16