

**Regulation der Glukosylglycerol-Phosphat-  
Synthase aus dem Cyanobakterium  
*Synechocystis* sp. PCC 6803**

**Inaugural-Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Jens Florian Novak

aus Köln

Köln, Februar 2010

**Berichterstatter:**

Prof. Dr. Reinhard Krämer

Prof. Dr. Günter Schwarz

Tag der Disputation: 22.04.2010

## **Regulation der Glukosylglycerol-Phosphat-Synthase aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803**

Unter hyperosmotischen Bedingungen akkumuliert das phototrophe Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 das kompatible Solut Glukosylglycerol, um das Wasserpotential der Zelle der Osmolarität des externen Mediums anzupassen. Das Schlüsselenzym der *de novo*-Synthese von GG ist die Glukosylglycerol-Phosphat-Synthase, deren biochemische Regulation eine essentielle Rolle bei der Salzanpassung spielt. Bei der schnellen Antwort auf eine erhöhte Salzkonzentration werden präformierte GgpS-Proteine aktiviert und die GG-Synthese setzt ein. Während der zweiten Phase der Salzanpassung wird die Aktivität des Enzyms in Abhängigkeit von der vorliegenden Salzkonzentration moduliert. Die zugrundeliegenden Mechanismen der biochemischen Inaktivierung der GgpS bei niedrigen Salzkonzentrationen und die salzabhängige Einstellung der Enzymaktivität während der Akklimatisierung waren bisher unverstanden.

In dieser Arbeit konnte ausgeschlossen werden, dass die Inaktivierung des GgpS-Enzyms unter salzarmen Bedingungen durch ein regulatorisches Protein oder eine posttranslationale Modifikation verursacht wird. Es konnte gezeigt werden, dass eine hochaffine Bindung an Nukleinsäuren stattfindet, die eine Hemmung der GgpS-Aktivität verursacht. Die Inhibition der GgpS durch DNA wurde dabei von der Salzkonzentration moduliert. Die Hypothese einer salzabhängigen Bindung des GgpS-Proteins an Nukleinsäuren unter *in vivo*-Bedingungen konnte durch SPINE-Experimente unterstützt werden. Da eine Inhibition der GgpS Aktivität auch durch Heparin verursacht wurde und die Bindung von Heparin an das GgpS-Protein gezeigt werden konnte, beruht die Interaktion der GgpS mit Nukleinsäuren vermutlich auf einer unspezifischen, ionischen Wechselwirkung von positiv geladenen Bereichen auf der Proteinoberfläche mit dem negativ geladenen Rückgrat der Polyanionen. Die Hemmung der Enzymaktivität durch DNA wird hierbei nicht durch einen kompetitiven Mechanismus verursacht. Eine erhöhte Stabilität des Proteins bei einem trypsinolytischen Abbau weist eher darauf hin, dass bei der Bindung an DNA eine Konformationsänderung des Proteins stattfindet, die für die Hemmung verantwortlich sei könnte.

Sowohl die schnelle Antwort der GG-Synthese als auch die Anpassung von *Synechocystis* an längerfristig erhöhte Salzkonzentrationen wird durch die salzmodulierte Bindung des GgpS-Proteins an Nukleinsäuren vermittelt. Dieser Mechanismus der Aktivitätsregulation stellt ein bisher nicht beschriebenes Prinzip auf dem Gebiet der Osmoregulation dar.

## **Regulation of the glucosylglycerol phosphate synthase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803**

Under hyperosmotic conditions the phototrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 accumulates the compatible solute glucosylglycerol to balance the osmotic differences between the cytoplasm and the external medium. The key enzyme involved in *de novo* synthesis of GG is the glucosylglycerol phosphate synthase. The biochemical regulation of the GgpS enzyme plays an essential role in the adaptation process towards increased salt concentrations. The rapid response of the cell is mediated by the activation of preformed GgpS protein leading to a maximal rate of GG-synthesis. During steady-state acclimatisation the enzyme activity is modulated depending on the salt concentration. The mechanisms of the biochemical inactivation of the GgpS enzyme at low salt concentrations and the salt-dependent adjustment of enzyme activity under steady-state conditions remained unclear by now.

The obtained results rule out that the inactivation of the GgpS enzyme at low salt concentrations is mediated by a regulatory protein or by posttranslational modification. It could be shown that a binding of the GgpS protein to nucleic acids takes place resulting in inhibition of enzyme activity. This binding and therefore the inhibition of GgpS activity is modulated by the salt concentration. The hypothesis of an *in vivo* interaction between the GgpS protein and nucleic acids was furthermore supported by *in vivo* crosslinking experiments. Since a comparable inhibition of GgpS activity by heparin and binding of the protein to this polyanion was also observed, we concluded that the binding is caused by an unspecific electrostatic interaction of positively charged areas on the protein surface and the negatively charged sugar-phosphate backbone of the polyanions. The inhibition of enzyme activity by DNA is not mediated by a competitive mechanism. The elevated stability of the protein towards proteolytic degradation rather points to a conformational change of the GgpS upon binding to DNA. This structural change could be responsible for the inhibitory effect of DNA.

The rapid response of GG synthesis and the steady-state acclimatisation of *Synechocystis* to elevated salt concentrations is mediated by the salt-modulated binding of the GgpS enzyme to nucleic acids. This mechanism of activity regulation represents a novel principle in the field of osmoregulation.

# I Inhaltsverzeichnis

<b>I Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>i</b>
<b>II Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>v</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Akkumulation von kompatiblen Soluten in Cyanobakterien.....	5
1.2 Die Anpassung von <i>Synechocystis</i> an Salzstress.....	7
1.3 Die Regulation der GG-Synthese in <i>Synechocystis</i> .....	9
1.3.1 Die schnelle Antwort von <i>Synechocystis</i> auf Salzstress.....	9
1.3.2 Die <i>steady-state</i> -Anpassung von <i>Synechocystis</i> .....	10
1.3.3 Bisherige Untersuchungen zur biochemischen Regulation der GgpS.....	12
1.4 Zielsetzung .....	14
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.1 Verwendete Organismen und Stämme.....	15
2.1.1 Organismen .....	15
2.1.2 Stämme.....	15
2.2 Verwendete Plasmide und Oligonukleotide.....	16
2.2.1 Plasmide .....	16
2.2.2 Oligonukleotide .....	16
2.3 Kultivierungsbedingungen .....	17
2.3.1 Kultivierung von <i>Synechocystis</i> .....	17
2.3.2 Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	19
2.4 Molekularbiologische Methoden .....	19
2.4.1 Isolierung von genomischer DNA .....	19
2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	20
2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	20
2.4.4 Restriktion von Plasmiden.....	20
2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
2.4.6 Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese.....	22
2.4.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	22
2.4.8 Ligation von DNA-Fragmenten.....	22
2.4.9 DNA-Sequenzanalyse .....	23
2.4.10 Herstellung von RNA-Fragmenten durch <i>in vitro</i> -Transkription .....	23

2.5 Techniken zur Manipulation von Zellen.....	24
2.5.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	24
2.5.2 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	25
2.5.3 Transformation von <i>Synechocystis</i> -Zellen .....	25
2.5.4 Transformation von <i>B. subtilis</i> -Zellen .....	26
2.6 Produktion von heterologen und homologen Proteinen in <i>E. coli</i> .....	26
2.7 Proteinbiochemische Methoden .....	27
2.7.1 Affinitätschromatographische Reinigung von rekombinanten Proteinen .....	27
2.7.2 Untersuchungen zur Bindung des GgpS-Proteins an Heparin.....	28
2.7.3 Herstellung von Zellextrakten verschiedener Organismen .....	28
2.7.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford.....	29
2.7.5 Trennung von Proteinen mittels Gelelektrophorese.....	29
2.7.6 Coomassiefärbung von SDS-Gelen .....	29
2.7.7 Silberfärbung von SDS-Gelen .....	30
2.7.8 Immunologische Detektion von Proteinen mittels Western-Blot .....	30
2.7.9 Formaldehyd-Crosslinking von rekombinantem GgpS-Protein .....	31
2.7.10 <i>In vivo</i> -Crosslinking mittels SPINE.....	31
2.7.11 Limitierte Proteolyse durch Trypsin .....	32
2.7.12 Zirkular-Dichroismus-Messungen (CD) .....	32
2.7.13 EMSA-Experimente ( <i>electrophoretic mobility shift assay</i> ) .....	33
2.8 Enzymtest zur Bestimmung der Aktivität von Glukosyltransferasen.....	33
2.9 Nachweis niedermolekularer Substanzen mittels Gaschromatographie .....	34
2.10 Untersuchung zur Regulation der GgpS-Transkription in <i>Synechocystis</i> .....	35
2.11 Identifikation der Nukleinsäurebindestellen des GgpS-Proteins.....	35
2.12 <i>In vivo</i> -Lokalisierung von GgpS-GFP-Proteinen in <i>Bacillus subtilis</i> .....	36
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1 Optimierung der Versuchsbedingungen.....	37
3.1.1 Optimierung der GgpS-Expression.....	37
3.1.2 Optimierung der Enzymaktivitätstests .....	38
3.2 Regulation des GgpS-Proteins durch niedermolekulare Substanzen.....	40
3.3 Regulation der GgpS durch einen unbekanntem Faktor im Zellextrakt .....	45
3.3.1 Identifikation des inhibitorischen Faktors .....	45
3.3.2 Charakterisierung der Inhibition der GgpS durch Nukleinsäuren und Polyanionen.....	52

3.3.3 Charakterisierung der GgpS-Interaktion mit Nukleinsäuren .....	57
3.3.4 <i>In vivo</i> -Untersuchungen der GgpS-DNA-Bindung .....	60
3.3.5 Untersuchungen zum Wirkmechanismus der GgpS-Inhibition durch DNA .....	63
3.3.6 Studien zur Regulation der <i>ggsS</i> -Transkription durch das GgpS-Protein .....	66
3.4 Untersuchungen zur Universalität der Regulation von Glukosyltransferasen .....	68
3.4.1 Expression und Reinigung von Glukosyltransferasen verschiedener Organismen .....	69
3.4.2 Charakterisierung verschiedener Glukosyltransferasen .....	70
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>75</b>
4.1 Die Regulation der GgpS durch Glukose-haltige Osmolyte könnte durch einen allosterischen Feedback-Mechanismus erfolgen .....	75
4.2 Der Inhibitor der Osmolytsynthese ist kein Protein, sondern Nukleinsäuren .....	78
4.3 Die schnelle Antwort und die steady-state-Regulation der Osmolytsynthese wird durch die Hemmung der GgpS-Aktivität durch Nukleinsäuren vermittelt .....	80
4.4 Die Inhibition der GgpS-Aktivität wird durch eine Bindung des Proteins an das Nukleinsäurerückgrat verursacht .....	81
4.5 Die Nukleinsäuren hemmen nicht durch eine Interaktion mit dem aktiven Zentrum der GgpS .....	84
4.6 Das GgpS-Protein reguliert nicht die Transkription des <i>ggsS</i> -Gens, könnte aber die Transkription anderer Gene beeinflussen .....	87
4.7 Die Interaktion mit DNA beeinflusst auch die Aktivität anderer Glukosyltransferasen .....	89
4.8 Modell zur Regulation der Osmolytsynthese in <i>Synechocystis</i> .....	90
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>93</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>95</b>



## II Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ad	auf/bis (hinzufügen)
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AHT	Anhydrotetracyclin
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
C	Cytosin
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-Propansulfonsäure
Carb	Carbenicillin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenyl-Indol
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
EK	Endkonzentration
ETP	Enzymtestpuffer
FA	Formaldehyd
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
G	Guanin
G3P	Glycerol-3-Phosphat
GC	Gaschromatographie
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GG	Glukosylglycerol
GGP	Glukosylglycerol-Phosphat
GgpP	Glukosylglycerol-Phosphat-Phosphatase
GgpS	Glukosylglycerol-Phosphat-Synthase

## Abkürzungsverzeichnis

---

H <sup>+</sup>	Proton
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-1-Thio-β-D-Galaktopyranosid
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria-Bertani
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MSTFA	N-Methyl-N-Trimethylsilyl-Fluoroacetamid
NBT	p-Nitrotetrazoliumblausäure
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD <sub>600/750</sub>	Optische Dichte bei 600 nm bzw. 750 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PIPES	Piperazin-1,4-Bis-(2-ethansulfonsäure)
RNA	Ribonukleinsäure
S6P	Saccharose-6-Phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spec	Spectinomycin
SPINE	<i>strep protein interaction experiment</i>
ss	einzelsträngig ( <i>single stranded</i> )
StpA	<i>salt tolerance protein A</i>
T	Thymin
TES	N-tris-(Hydroxymethyl)methyl-2-Aminoethansulfonsäure
TPS	Trehalose-Phosphat-Synthase
TPP	Trehalose-Phosphat-Phosphatase
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	Uridin-5'-Diphosphat
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

Weiterhin wurden die üblichen Abkürzungen des Internationalen Einheitensystems (*système international d'unités*, SI) verwendet.

## 1. Einleitung

Alle Lebewesen werden im Laufe ihrer Entwicklung mit den verschiedensten Stresssituationen konfrontiert. Diese werden in den jeweiligen Habitaten durch die Änderungen der Umweltbedingungen verursacht und beinhalten zahlreiche Faktoren wie z.B. den pH-Wert, die Limitation von Nährstoffen, Stickstoff-, Schwefel- und Phosphat-haltigen Verbindungen oder Spurenelementen. Um das Überleben zu sichern, haben sich sowohl in prokaryotischen als auch eukaryotischen Lebewesen Mechanismen entwickelt, um den jeweiligen Stress zu sensieren und die schnelle Reaktion der Zelle auszulösen (Hengge-Aronis, 1999; Hecker und Völker, 1990).

Neben der Verfügbarkeit von lebensnotwendigen Substraten spielen in den meisten Lebensräumen weitere Stressbedingungen eine Rolle. Hierbei stellt die Verfügbarkeit von Wasser den wichtigsten abiotischen Faktor dar. Insbesondere bei einzelligen Mikroorganismen ist die Regulation des zellulären Wasserhaushalts überlebenswichtig, da für das Wachstum der Zellen ein bestimmter Innendruck, der Turgor, aufrechterhalten werden muss (Kempf und Bremer, 1998). Der Ein- oder Ausstrom von Wasser wird hierbei über den Unterschied zwischen dem Wasserpotential der Zelle und dem umgebenden Medium bestimmt. Der Wasserfluss erfolgt hierbei immer zum negativeren Wasserpotential. Das Wasserpotential setzt sich in Zellen aus dem osmotischen Potential  $\Psi_S$ , dem Druckpotential  $\Psi_P$  und dem Matrixpotential  $\Psi_M$  zusammen:

$$\Psi_W = \Psi_S + \Psi_P + \Psi_M$$

Alle Komponenten dieser Gleichung beeinflussen das Wasserpotential der Zelle. Das Druckpotential  $\Psi_P$  gibt den hydrostatischen Druck in der Zelle an, der in Bakterien primär durch die Zellwand bestimmt wird. Dieser Druck wirkt dem Wassereinstrom entgegen und wird Turgor genannt. Das Matrixpotential  $\Psi_M$  beschreibt die Bindung von Wassermolekülen durch die strukturellen Komponenten der Zelle. Diese Interaktion wirkt ebenfalls dem Ausstrom von Wasser entgegen, kann aber in den meisten Fällen vernachlässigt werden. Da sich in den meisten Fällen weder die Struktur der Zellhülle noch das Matrixpotential schnell ändert, ist die Konzentration der gelösten Teilchen der maßgebliche Faktor bei der Kontrolle des Wasserhaushalts. Das osmotische Potential gibt den Einfluss gelöster Substanzen auf das Wasserpotential an. Es kann durch die van't Hoffsche Gleichung wie folgt beschrieben werden:

$$\Psi_s = -RTc_s$$

Das osmotische Potential ist also direkt von der Temperatur (T) und der Konzentration der gelösten, osmotisch aktiven Teilchen ( $c_s$ ) abhängig. wobei R die Gaskonstante ist. Der Ausdruck  $c_s$  gibt hierbei also die Osmolarität der Lösung an. Bei der Osmolarität wird jedoch lediglich die Konzentration und nicht die Wechselwirkung der Teilchen untereinander berücksichtigt. Da diese Wechselwirkung nicht nur von der Konzentration, sondern auch von der Natur der Substanzen abhängig ist, kann die sogenannte osmotische Aktivität oder Osmolalität lediglich experimentell bestimmt werden. Dies ist vor allem bei Mischungen von gelösten Stoffen wichtig. Die van't Hoffsche Gleichung erlaubt jedoch in den meisten Fällen eine gute Abschätzung des osmotischen Potentials.

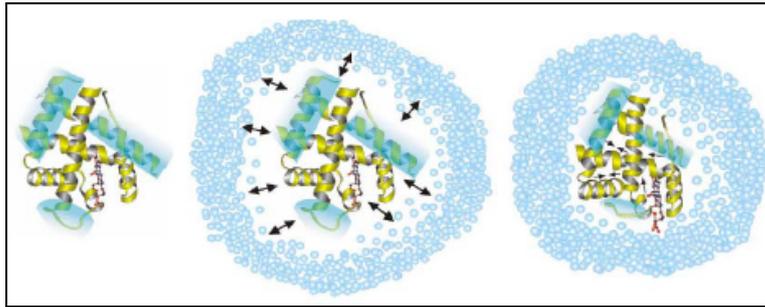
In lebenden Zellen ist das Wasserpotential aufgrund von Aminosäuren, Metaboliten, Ionen und anderen osmotisch aktiven Substanzen üblicherweise negativ. Der maximale Turgordruck beträgt bei Gram-negativen Bakterien 1-5 bar (Csonka und Epstein, 1996) und bei Gram-positiven sogar bis zu 20 bar (Whatmore *et al.*, 1990).

Bei einer drastischen Änderung der Teilchenkonzentration im umgebenden Medium spricht man von osmotischem Stress. Dabei unterscheidet man zwei unterschiedliche Formen. Ist die Osmolarität des externen Mediums geringer, liegt hypoosmotischer Stress vor. Das negativere Wasserpotential der Zelle verursacht einen Wassereinstrom, der einen Anstieg des Turgordrucks verursacht (Booth und Louis, 1999). Bis zu einem gewissen Grad wird dieser von der elastischen Zellmembran ausgeglichen, ist jedoch ein bestimmter Punkt überschritten, könnte die Zelle bersten. Bei im Vergleich mit dem Zytoplasma erhöhten Osmolaritäten kommt es zu einem Auström von Wasser entlang des osmotischen Gradienten. Dieser sogenannte hyperosmotische Stress führt zu einer Dehydratation der Zelle (Ingraham und Marr, 1996; Potts, 1994) und stört den Metabolismus und die Zellteilung, da der Turgordruck nicht aufrechterhalten werden kann (Kempf und Bremer, 1998). Beide Formen des osmotischen Stresses sind lebensbedrohlich und machen eine schnelle Reaktion der Bakterienzelle notwendig.

Um dem Wassereinstrom bei hypoosmotischen Bedingungen entgegenzuwirken, werden osmotisch aktive Substanzen wie Metaboliten und Ionen aus der Zelle freigesetzt. Dies geschieht durch die Öffnung von mechanosensitiven Kanälen, die einen schnellen Ausstrom der zytoplasmatischen Komponenten vermitteln (Berrier *et al.*, 1992; Sukharev *et al.*, 1997). An der Osmoregulation beteiligte mechanosensitive Kanäle konnten in Prokaryoten nachgewiesen werden (Morris, 1990) und wurden in *E. coli* anhand ihrer Porengröße in drei Gruppen eingeteilt: MscM, MscS und MscL (*mechanosensitive channel of mini, small, und*

*large conductance*, Berrier *et al.*, 1996). Diese Membranproteine reagieren auf die Membranspannung und werden bei der Überschreitung eines für die jeweilige Gruppe definierten Schwellenwerts aktiviert (Berrier *et al.*, 1996). Durch die sequentielle Öffnung von verschiedenen Kanälen kann der Ausstrom von Osmolyten in Abhängigkeit von der anliegenden Membranspannung reguliert werden, um einen übermäßigen Verlust von Metaboliten zu vermeiden.

Während der Efflux von Osmolyten in den meisten Organismen die einzige Möglichkeit darstellt, um auf einen hypoosmotischen Stress zu reagieren, haben sich in Hinblick auf eine erhöhte externe Osmolarität, insbesondere bei der Anpassung an hohe Salzkonzentrationen, verschiedene Mechanismen entwickelt (Galinski und Trüper, 1994; Oren, 1990). Bei den Gruppen der *Halobacteriales* und der *Haloanaerobiales* wird die sogenannte „salt-in“-Strategie bevorzugt. Diese beinhaltet die evolutionäre Anpassung der zellulären Komponenten an eine hohe interne Ionenkonzentration. Diese ermöglicht es den halophilen Bakterien, bei Salzkonzentrationen von bis zu 5 M NaCl zu wachsen (Madigan und Oren, 1999; Oren, 1999). Durch diese Anpassung benötigen die intrazellulären Prozesse permanent hohe Ionenkonzentrationen, was das Wachstum dieser Bakterien auf bestimmte ökologische Nischen begrenzt. Im Gegensatz dazu verfolgen jedoch die meisten Archaeen, Bakterien, Pilze und höhere Organismen wie Pflanzen und Tiere (da Costa *et al.*, 1998; Hohmann, 1997; McNeil *et al.*, 1999; Burg *et al.*, 1997) die sogenannte „salt-out“-Strategie, bei der hohe intrazelluläre Ionenkonzentrationen vermieden werden. Dies wird durch die Akkumulation von niedermolekularen Osmolyten realisiert, die auch in hohen Konzentrationen den Stoffwechsel nicht negativ beeinflussen (Csonka und Epstein, 1996; Miller und Wood, 1996; Rhodes und Hanson, 1993). Dieser Mechanismus erlaubt den Organismen eine flexible Anpassung an sich ändernde osmotische Bedingungen. Die sogenannten kompatiblen Solute sind osmotisch aktive organische Moleküle, die bei physiologischen pH-Werten keine Nettoladung tragen und gut in Wasser löslich sind (Brown, 1976). Sie gehören zu verschiedenen Stoffklassen und beinhalten dabei Polyole (Glycerol, Inositol), Zucker (Trehalose, Saccharose), Zuckerderivate (Glukosylglycerol, Isofloridoside), Aminosäuren und ihre Derivate (Prolin, Ectoin) oder Methylamine (Glycinbetain, Glutamatbetain, Prolinbetain). Neben dem Ausgleich zwischen der Osmolalität der Zelle und dem umgebenden Medium haben diese Osmolyte auch einen stabilisierenden Effekt auf die Makromoleküle der Zelle. Die Wirkung auf Proteine wird durch den Ausschluss der kompatiblen Solute von der Proteinoberfläche verursacht und durch das „preferential exclusion“-Modell beschrieben (siehe Abbildung 1.1; Arakawa und Timasheff, 1985; Baskakov und Bolen, 1998).



**Abbildung 1.1:** „Preferential Exclusion“-Modell nach Aragawa und Timasheff.

In diesem Modell ist der stabilisierende Effekt von kompatiblen Soluten (blaue Kugeln) auf Proteinstrukturen schematisch dargestellt. Durch den Ausschluss der Osmolyte von der Proteinoberfläche wird das Protein in einer kompakten, nativen Konformation gehalten (Aragawa und Timasheff, 1985).

Hierbei ergeben sich energetisch ungünstige Wechselwirkungen der Osmolyte mit dem Peptidrückgrat und diese werden von der Hydrathülle ausgeschlossen (Bolen und Baskakov, 2001). Dadurch wird die Proteinkonformation in eine kompaktere Struktur gezwungen, was der Denaturierung entgegenwirkt (Potts, 1994). Diese Eigenschaft der kompatiblen Solute macht man sich auch in der Proteinbiochemie zu Nutze, um bei der Überexpression von Proteinen in einem heterologen System die Bildung von nativ gefalteten Proteinen zu verbessern. Dies konnte in *E. coli* sowohl durch die Zugabe als auch die Synthese von Trehalose vermittelt werden (Schultz *et al.*, 2007). Zusätzlich zu der Wirkung dieser Osmolyte auf Proteine wurde auch eine Stabilisierung von Membranen nachgewiesen (Crowe *et al.*, 1984). Kompatible Solute spielen dementsprechend eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung von zellulären Prozessen und sind bei der Anpassung an sich hohe Salzkonzentrationen unerlässlich.

Die Akkumulation dieser Osmolyte kann entweder durch Aufnahme oder Neusynthese erfolgen. Sind im externen Medium kompatible Solute vorhanden, wird die Aufnahme gegenüber der Synthese bevorzugt, da sie schneller und energetisch günstiger ist (Kemble und McPherson, 1954). Transportsysteme für kompatible Solute wurden detailliert untersucht und konnten in vielen Organismen nachgewiesen werden. Hierbei sind insbesondere die Transporter ProP, ProU und BetT aus *E. coli* (Faatz *et al.*, 1988; Culham *et al.*, 1993; Lucht und Bremer, 1994; MacMillan *et al.*, 1999) und die Transporter BetP, EctP und ProP aus *C. glutamicum* (Farwick *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 1998a; Peter *et al.*, 1998b) zu nennen, die zu den am besten verstandenen Aufnahmesystemen gehören.

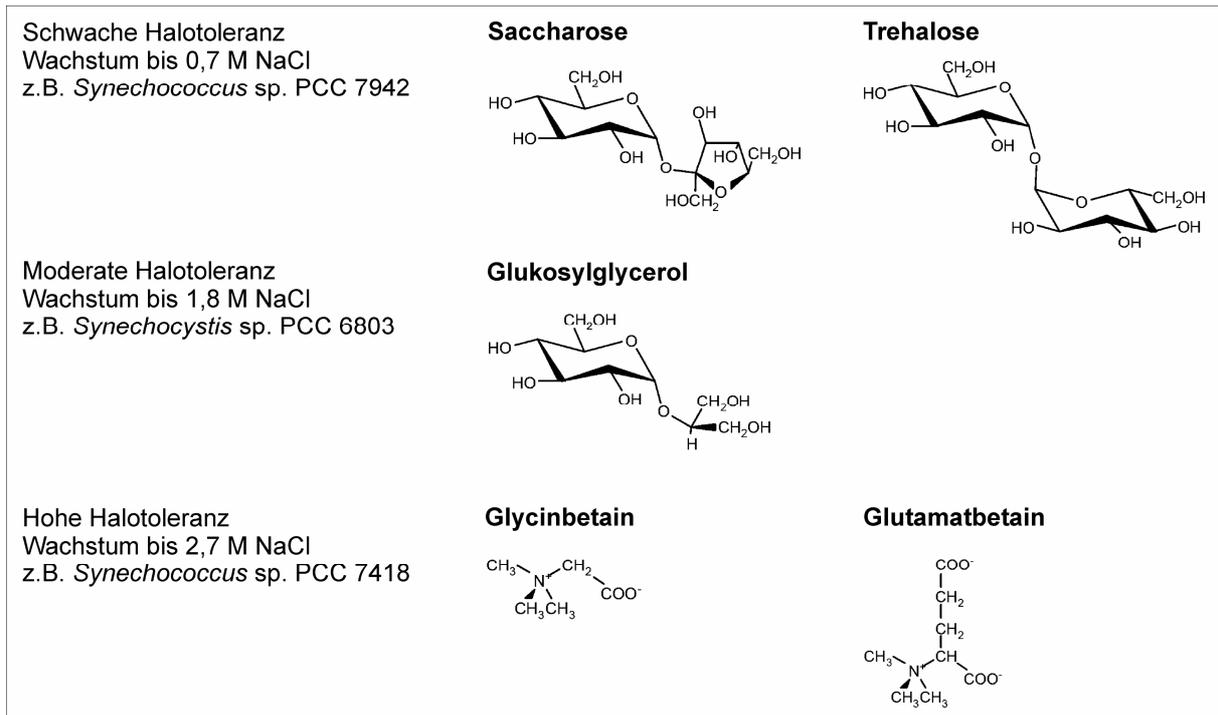
Falls keine kompatiblen Solute in der Umgebung zugänglich sind, muss die Zelle diese synthetisieren. In *C. glutamicum* wird die Synthese von Prolin ausgehend von Glutamat durch die Genprodukte von *proA*, *proB* und *proC* katalysiert (Ankri *et al.*, 1996). Unter

hyperosmotischen Bedingungen konnte bei diesen Genen eine Erhöhung der mRNA-Menge nachgewiesen werden, was auf eine Regulation auf der Ebene der Transkription hinweist (Ley, 2001). Dies konnte auch für Vertreter der Familie der Glukosyltransferasen gezeigt werden, wie z.B. für die Trehalose-Phosphat-Synthase aus *E. coli* oder die in dieser Arbeit untersuchte Glukosylglycerol-Phosphat-Synthase aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (im Folgenden *Synechocystis*). Diese Enzyme sind an der Synthese der kompatiblen Solute Trehalose und Glukosylglycerol beteiligt und die Transkription der kodierenden Gene wird bei erhöhten Salzbedingungen induziert (Giaever *et al.*, 1988; Marin *et al.*, 2002).

Neben der Erhöhung der Transkriptionsrate bei erhöhten Salzkonzentrationen gibt es bei vielen Osmolyt-synthetisierenden Systemem Hinweise darauf, dass eine biochemische Regulation der Enzyme auf Ebene der Aktivität stattfindet. Die Mechanismen der salzabhängigen Einstellung des Osmolytpools sind jedoch bisher unverstanden.

### 1.1 Die Akkumulation von kompatiblen Soluten in Cyanobakterien

Cyanobakterien sind phototrophe Mikroorganismen und sind in fast allen belichteten Lebensräumen auf der Erde zu finden. Darunter befinden sich sowohl terrestrische als auch marine oder Süßwasserhabitats (Fogg *et al.*, 1973). Aufgrund vielfältiger Mechanismen sind sie in der Lage, sich an unterschiedlichste Umweltbedingungen anzupassen. Das macht sie insbesondere an extremen Standorten zu den vorherrschenden Organismen. Vor allem die Anpassung an hyperosmotische Bedingungen ist bei diesen Bakterien gut untersucht, da viele Vertreter dieser Gruppe sowohl in Süß- als auch Salzwasser vorkommen. Hinsichtlich ihrer Toleranz gegenüber erhöhten Salzkonzentrationen wurde vorgeschlagen, Cyanobakterien in drei verschiedene Gruppen einzuteilen (Reed *et al.*, 1986). Dabei korreliert die Salztoleranz mit der Art der aufgenommenen oder synthetisierten kompatiblen Solute. Gering halotolerante Stämme können bei einer NaCl-Konzentration von bis zu 0,7 M wachsen und akkumulieren primär Saccharose und Trehalose. Cyanobakterien, die eine Konzentration von bis zu 1,8 M NaCl überleben, sind moderat halotolerant und synthetisieren Glukosylglycerol. Die höchste Salztoleranz von bis zu 2,7 M NaCl ist bei den halophilen Cyanobakterien nachweisbar. Diese Stämme akkumulieren die Methylamine Glycin- oder Glutamatbetain (siehe Abbildung 1.2). Die Akkumulation von Aminosäuren spielt im Gegensatz zu vielen heterotrophen Mikroorganismen während der Anpassung an Salzstress in Cyanobakterien keine signifikante Rolle.



**Abbildung 1.2: Einteilung von Cyanobakterien nach ihrer Toleranz gegenüber NaCl.**

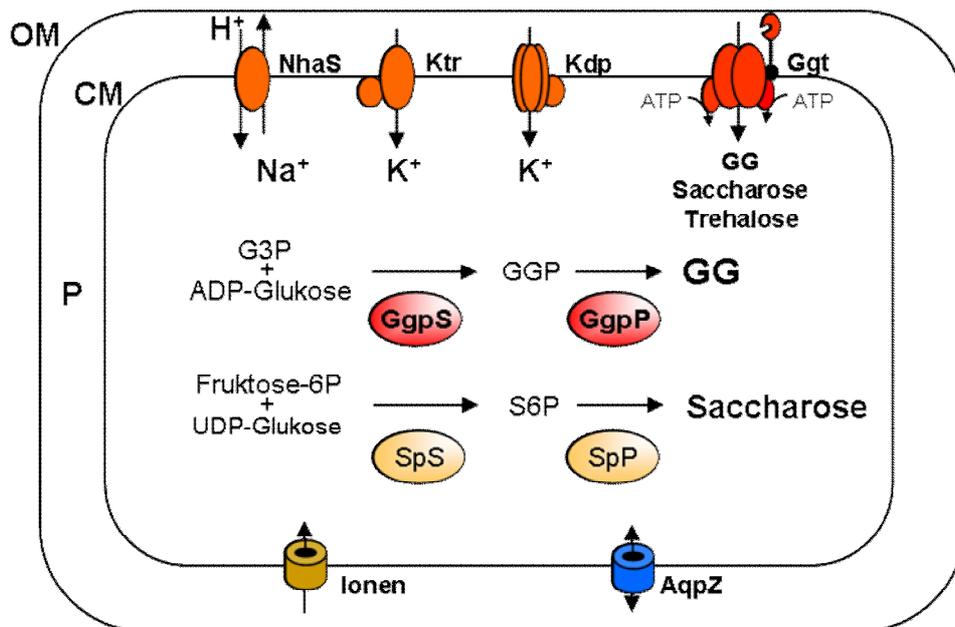
Gezeigt sind die Toleranzgruppen, die in diesen Cyanobakterien akkumulierten kompatiblen Solute mit Strukturformel und Modellorganismen der jeweiligen Gruppen (nach Reed *et al.*, 1986).

Neben der Akkumulation spielt auch der Ionentransport eine wichtige Rolle bei der Anpassung von Mikroorganismen an erhöhte Salzkonzentrationen. So konnte gezeigt werden, dass die Übertragung eines Gens, das für einen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter aus einem halophilen Cyanobakterium kodiert, die Resistenz eines salzsensitiven Cyanobakteriums gegenüber NaCl erhöhen konnte (Waditee *et al.*, 2002).

Das in dieser Arbeit untersuchte Cyanobakterium *Synechocystis* besitzt eine moderate Halotoleranz und kann bei NaCl-Konzentrationen von bis zu 1,2 M kultiviert werden (Reed und Stewart, 1985). Innerhalb dieser Toleranzgruppe stellt dieser Stamm den am besten untersuchten phototrophen Organismus dar, da das Genom bereits frühzeitig vollständig sequenziert wurde (Kaneko *et al.*, 1996). Zusätzlich besitzt es eine natürliche Kompetenz für die Aufnahme von Fremd-DNA, was es für genetische Studien gut zugänglich macht. *Synechocystis* gehört zur Ordnung der *Chroococcales* und hat einen Durchmesser von 2 - 3  $\mu\text{m}$ . Die Zellen sind mobil und können sowohl unter rein photoautotrophen als auch photoheterotrophen Bedingungen wachsen. Insbesondere auf dem Gebiet der Osmoregulation dient dieser Stamm als Modellorganismus. Dabei wurden die Reaktionen der Zelle auf einen hyperosmotischen Stress detailliert untersucht und die intrazellulären Vorgänge sind gut verstanden.

## 1.2 Die Anpassung von *Synechocystis* an Salzstress

Die Reaktion von *Synechocystis* auf eine schnelle Erhöhung der Salzkonzentration, einen sogenannten Salzschock, kann ebenso wie bei anderen Mikroorganismen in drei Phasen eingeteilt werden (Reed *et al.*, 1985a). Die an der diesen Vorgängen beteiligten Komponenten der Zelle sind in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt.



**Abbildung 1.3: Komponenten der Salzanpassung von *Synechocystis*.**

Diese schematische Darstellung zeigt die an der Anpassung an erhöhte Salzkonzentrationen beteiligten Komponenten in *Synechocystis*-Zellen. OM: Äußere Zellmembran; P: Periplasma; CM: Innere Zellmembran; GG: Glukosylglycerol; G3P: Glycerol-3-Phosphat; GGP/S6P: Glukosylglycerolphosphat/Saccharose-6-Phosphat. Alle weiteren Komponenten und ihre Funktionen werden im Text beschrieben.

Unmittelbar nach dem Salzschock mit NaCl kommt es aufgrund der Unterschiede im Wasserpotential zu einem schnellen Strom von Wasser aus der Zelle. Dieser wird nach ca. 200 ms durch den Einstrom von Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Ionen gestoppt, die den osmotischen Gradienten ausgleichen. Das abgegebene Wasser fließt wieder in die Zelle zurück und das zelluläre Volumen wird wiederhergestellt (Reed *et al.*, 1985a). Der Ein- und Ausstrom von Wasser wird durch Aquaporine (AqpZ) vermittelt (Shapiguzov *et al.*, 2005). Nach ca. 120 Sekunden ist die maximale Konzentration an Na<sup>+</sup>-Ionen in der Zelle erreicht (Blumwald *et al.*, 1983).

Vor allem hohe Konzentrationen von Na<sup>+</sup>-Ionen wirken sich toxisch auf den Zellmetabolismus aus (Reed *et al.*, 1985a). Um einen Zusammenbruch der zellulären Prozesse zu verhindern, findet ein Austausch von Na<sup>+</sup>-Ionen gegen K<sup>+</sup>-Ionen statt. Der Export der Na<sup>+</sup>-Ionen wird vermutlich primär durch Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antipporter durchgeführt. In *Synechocystis* konnten die Gene für fünf dieser sekundären Transporter identifiziert werden (*nhaS* 1-5).

Diese weisen vermutlich eine funktionelle Redundanz auf, da das Ausschalten einzelner Gene keinen salzsensitiven Phänotyp erzeugt (Inaba *et al.*, 2001; Elanskaya *et al.*, 2002). Der gleichzeitige Import von  $K^+$ -Ionen wird durch den Protonengradienten energetisiert und durch einen Transporter vom Ktr-Typ vermittelt. Das in *Synechocystis* vorhandene ATP-abhängige Kdp-System scheint bei der Aufnahme von  $K^+$ -Ionen bei Salzstress keine Rolle zu spielen (Matsuda und Uozumi, 2006; Berry *et al.*, 2003). Da sich auch  $K^+$ -Ionen in hohen Konzentrationen negativ auf den Metabolismus auswirken, werden diese in der dritten Phase der Salzanpassung durch kompatible Solute ersetzt. Der Ausgleich des osmotischen Gradienten wird nun durch diese Osmolyte übernommen und die  $K^+$ -Ionen aus der Zelle entfernt.

Ebenso wie andere Mikroorganismen besitzt *Synechocystis* ein Aufnahmesystem für kompatible Solute. Sind GG, Saccharose oder Trehalose im umgebenden Medium verfügbar, werden diese durch den ABC-Transporter Ggt aufgenommen. Der ATP-abhängige Transporter besteht aus den zwei membranständigen Komponenten GgtC und GgtD, dem periplasmatischen Substratbindeprotein GgtB und der zytosolischen ATP-bindenden Untereinheit GgtA (Mikkat *et al.*, 1996; Mikkat *et al.*, 1997). Wie bei vielen an der Salzanpassung beteiligten Systemen konnte auch bei den Genen des Ggt-Transporters bei erhöhten Salzkonzentrationen eine verstärkte Transkriptionsrate nachgewiesen werden (Hagemann *et al.*, 1997; Mikkat und Hagemann, 2000).

Können keine Osmolyte aufgenommen werden, synthetisiert *Synechocystis* das Heterosid Glukosylglycerol (im Folgenden GG) und transient auch geringfügige Mengen Saccharose (Hagemann und Erdmann, 1994; Hagemann und Marin, 1999). Die Akkumulation von GG stellt hierbei den wichtigsten Faktor bei der Salzanpassung dar (Hagemann und Erdmann, 1994). Mutanten von *Synechocystis*, die kein GG akkumulieren, können bei hohen Salzkonzentrationen nicht überleben (Hagemann und Zuther, 1992; Hagemann *et al.*, 1996a; Marin *et al.*, 1998).

Die Synthese dieses Osmolyts findet in einer zweistufigen Reaktion statt. Im ersten Schritt werden die Substrate ADP-Glukose und Glycerol-3-Phosphat unter Abspaltung von ADP und einem Phosphatrest von der Glukosylglycerol-Phosphat-Synthase (im Folgenden GgpS) zu GG-Phosphat verknüpft. Die Dephosphorylierung dieses Intermediats wird durch die Glukosylglycerolphosphat-Phosphatase (GgpP oder StpA) vermittelt. Das GgpS-Protein stellt in dieser Reaktion das Schlüsselenzym dar (Marin *et al.*, 1998). Es gehört zur Familie der Glukosyltransferasen und besitzt eine hohe Sequenzähnlichkeit zu anderen Enzymen dieser Klasse. Viele Vertreter dieser Gruppe sind an der Synthese von kompatiblen Soluten bei

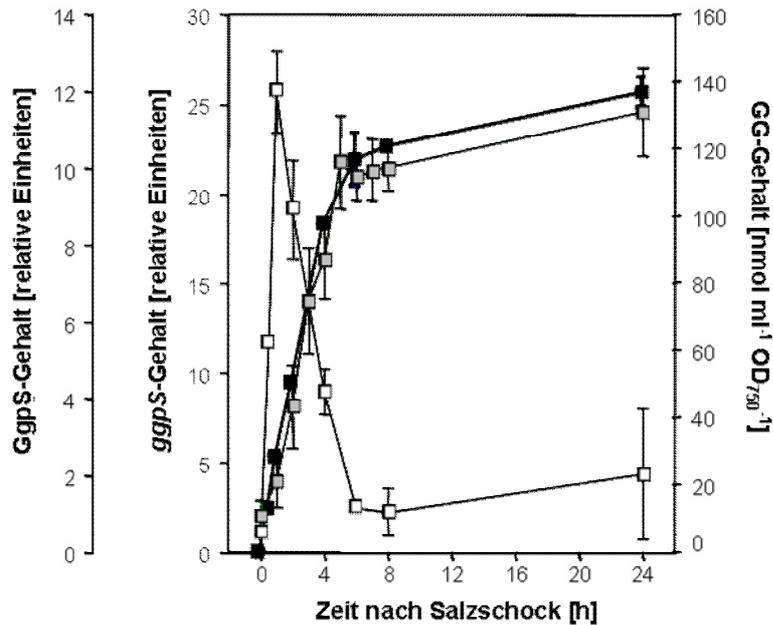
hyperosmotischen Bedingungen beteiligt, wie z.B. die Trehalosephosphat-Synthasen von *E. coli* oder *S. cerevisiae* oder die Isofloridosid-Synthase aus *Poteroiochromonas malhamensis* (Giaever *et al.*, 1988; Hounsa *et al.*, 1998; Kauss, 1978). Bei diesen Enzymen und anderen Vertretern der Glukosyltransferasen konnte gezeigt werden, dass eine biochemische Regulation der Aktivität im Rahmen der Salzanpassung stattfindet. Die zugrundeliegenden Mechanismen der Regulation von Glukosyltransferasen wurden detailliert untersucht, konnten bisher jedoch nicht aufgeklärt werden.

### 1.3 Die Regulation der GG-Synthese in *Synechocystis*

Die an der Salzanpassung beteiligten Komponenten der Zelle und die bei hyperosmotischen Bedingungen ausgelösten Prozesse wurden in *Synechocystis* und vielen anderen Mikroorganismen untersucht und sind gut verstanden. Trotzdem sind die Mechanismen der schnellen Aktivierung der Osmolyt-synthetisierenden Systeme nach einem Salzschock und der Regulation der Enzyme bei der Akklimatisierung an längerfristig erhöhte Salzkonzentrationen, der sogenannten *steady-state*-Anpassung, bisher unklar.

#### 1.3.1 Die schnelle Antwort von *Synechocystis* auf Salzstress

Die schnelle Antwort der Zelle auf eine Erhöhung der externen Salzkonzentration findet sowohl auf der Ebene der Transkription des *ggsS*-Gens als auch bei der Aktivitätsregulation der GgpS statt. Bereits bei niedrigen NaCl-Konzentrationen liegen präformierte GgpS-Proteine in der Zelle vor, diese sind allerdings durch einen bisher unbekanntem Mechanismus inaktiviert (Marin *et al.*, 2002). Sind die Zellen einem Salzschock ausgesetzt, werden diese Enzyme vollständig aktiviert und initialisieren die Osmolytsynthese (Hagemann *et al.*, 1996b). Weiterhin steigt unmittelbar nach dem Salzschock die Transkriptmenge des *ggsS*-Gens um das 25fache an und eine *de novo*-Synthese des GgpS-Proteins beginnt nach ca. 30 min (siehe Abbildung 1.4; Marin *et al.*, 2002). Dies spielt jedoch eher eine Rolle bei den späteren Phasen der Salzanpassung, da eine Hemmung der Translation durch Chloramphenicol keinen Effekt auf die GG-Akkumulation in den ersten 2 h nach dem Salzschock hat (Hagemann *et al.*, 1990).



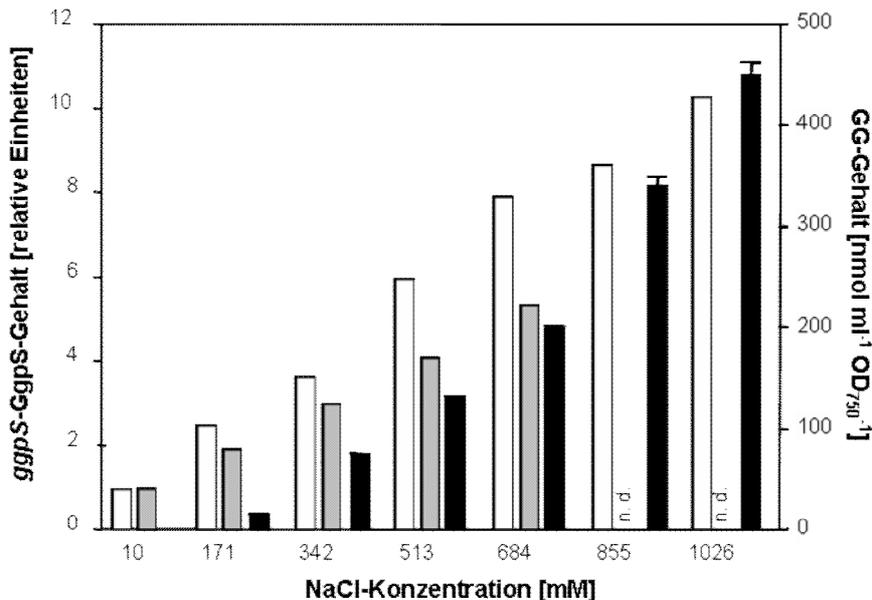
**Abbildung 1.4: Zellinterner Gehalt von *ggpS*-mRNA, GgpS-Protein und GG nach einem Salzschock.** Der Gehalt von *ggpS*-mRNA (weiss), GgpS-Protein (grau) und GG (schwarz) wurde in *Synechocystis*-Zellen über einen Zeitraum von 24 h nach einem Salzschock von 684 mM bestimmt (nach Marin *et al.*, 2002).

Bei der schnellen Anpassung der Zelle ist also eher die Regulation der GgpS-Aktivität als die *de novo*-Synthese maßgeblich. Die Aktivierung von präformierten Enzymen wurde auch bei der Akkumulation von Trehalose in *E. coli* oder Prolin in *B. subtilis* nachgewiesen. Auch hier hatte die Zugabe von Chloramphenicol keine Auswirkung auf die schnelle Antwort der Mikroorganismen bei einer Erhöhung der Salzkonzentration (Dinnbier *et al.*, 1988; Whatmore und Reed, 1990). Dies könnte somit einen universellen Mechanismus bei der Synthese von kompatiblen Soluten darstellen. Die Bereitstellung von inaktivem GgpS-Protein in *Synechocystis* ist durchaus sinnvoll, da nach einem Salzschock die Translation fast vollständig blockiert wird und sich erst während der Akkumulation von kompatiblen Soluten erholt (Hagemann *et al.*, 1990). Wäre die Zelle auf eine Neusynthese des Proteins angewiesen, würde eine Anpassung mehr Zeit in Anspruch nehmen oder im ungünstigsten Fall zum Tod der Zelle führen. Eine weitere wichtige Eigenschaft des GgpS-Proteins ist, dass seine Aktivität des GgpS-Proteins bis zu einer NaCl-Konzentration von 500 mM nicht beeinträchtigt ist, was *Synechocystis* auch bei hohen Salzkonzentrationen zu einer Synthese von GG befähigt (Schoor, 1996).

### 1.3.2 Die *steady-state*-Anpassung von *Synechocystis*

Im Gegensatz zu der schnellen Antwort auf einen Salzschock, bei dem die GG-Synthese maximal aktiviert wird, muss die Zelle bei längerfristig erhöhten Salzkonzentrationen den

internen Osmolytpool an die jeweilige externe Osmolarität anpassen. Es konnte gezeigt werden, dass in *Synechocystis* und auch in anderen Cyanobakterien die interne Ionenkonzentration in an Salz akklimatisierten Zellen direkt von der externen Salzkonzentration abhängig ist (Hagemann *et al.*, 1994; Reed *et al.*, 1985b). Das bedeutet, dass auch zytosolische Proteine als Sensoren für Salzstress unter *steady-state*-Bedingungen dienen können.



**Abbildung 1.5: Zellinterner Gehalt von *ggpS*-mRNA, GgpS-Protein und GG nach einem Salzschock.** Der Gehalt von *ggpS*-mRNA (weiss), GgpS-Protein (grau) und GG (schwarz) wurde bei an verschiedene Salzkonzentrationen akklimatisierten *Synechocystis*-Zellen bestimmt (nach Marin *et al.*, 2002).

In *Synechocystis* steigt die *ggpS*-Transkriptmenge und der GgpS-Proteingehalt in Abhängigkeit von der externen Salzkonzentration linear an. Dies wurde auch für die Akkumulation von GG nachgewiesen (siehe Abbildung 1.5; Marin *et al.*, 2002). Bei einer maximalen Aktivität der GgpS-Proteine würde der GG-Pool exponential ansteigen, dies ist nicht der Fall. Die GgpS-Aktivität muss also auf einer posttranslationalen Ebene inhibiert werden. Die Erhöhung von Transkription und Translation dient hier eher zur Bereitstellung von aktiven Enzymen und ist nicht direkt an der Einstellung des Osmolyt-Pools beteiligt.

Die Bedeutung der biochemischen Regulation wurde auch durch die Überexpression des GgpS-Proteins in der *ggpS*<sup>+</sup>-Mutante gezeigt. In dieser Mutante lag das GgpS-Protein konstitutiv in hohen Mengen vor, die Regulation des Osmolytpools bei der Akklimatisierung an verschiedene Salzkonzentrationen war jedoch mit der des Wildtyps vergleichbar (Stirnberg, 2006).

Ein wichtiger Faktor bei der Inhibition der GgpS unter *steady-state*-Bedingungen scheint eine negative Rückkopplung ausgehend von GG zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass GG eine dosisabhängige Hemmung der GgpS auslöst. Diese Inhibition wird bei höheren Salzkonzentrationen abgeschwächt, was eine Rolle bei der Anpassung des Osmolytpools an die vorliegende Salzkonzentration spielen könnte. Eine solche modulierte Hemmung konnte in *Synechocystis* auch für Trehalose nachgewiesen werden. Dabei wird durch die Akkumulation von Trehalose durch Aufnahme oder *de novo*-Synthese eine fast vollständige Hemmung der GG-Synthese ausgelöst (Mikkat *et al.*, 1997; Stirnberg, 2006). Aufgrund der ähnlichen Struktur und Größe der beiden kompatiblen Solute wurde hierbei die kompetitive Hemmung durch eine Interaktion mit dem aktiven Zentrum der GgpS in Betracht gezogen (Stirnberg, 2006).

### 1.3.3 Bisherige Untersuchungen zur biochemischen Regulation der GgpS

Die Regulation der GgpS-Aktivität spielt bei der Antwort auf einen Salzschock und bei *steady-state*-Anpassung an erhöhte Salzkonzentrationen die maßgebliche Rolle. Durch die Etablierung eines *in vitro*-Enzymtests durch Schoor (1995) konnte die Charakterisierung der GgpS in einem vereinfachten System durchgeführt werden. Die NaCl-modulierte Hemmung durch GG und Trehalose konnte in diesem Testsystem nachgewiesen werden, was die Beteiligung anderer zellulärer Komponenten bei diesem Mechanismus ausschließt (Stirnberg, 2006). Die Inaktivierung der GgpS in Zellen, die bei geringen Salzkonzentrationen kultiviert wurden, konnte auch in Proteinextrakten von *Synechocystis* gezeigt werden (Schoor *et al.*, 1999; Marin *et al.*, 1998). Hierbei kommt es erst bei einer Erhöhung der Salzkonzentration zu einer messbaren GG-Synthese. Dieser Effekt kann nicht nur durch NaCl, sondern auch durch andere Salze ausgelöst werden. Die aktivierende Wirkung der Ionen korreliert hierbei mit der Hofmeister-Reihe (Schoor *et al.*, 1999). Bei der Aktivierung der GgpS scheint der ionische Charakter des Osmolyts von entscheidender Bedeutung zu sein, da der Zuckeralkohol Sorbitol weder *in vivo* noch *in vitro* einen Effekt auf die Enzymaktivität hat (Marin *et al.*, 2002; Marin *et al.*, 2006). Eine Hemmung konnte bei der Zugabe von Zellextrakt auch bei gereinigtem GgpS-Protein beobachtet werden. Dabei spielte es keine Rolle, ob das Protein aus *Synechocystis* isoliert oder heterolog in *E. coli* hergestellt wurde (Hagemann *et al.*, 2001).

Die salzabhängige Inhibition der GgpS in Anwesenheit von Zellextrakt wurde einem inhibitorischen Protein zugeschrieben, das durch eine direkte Interaktion oder eine posttranslationale Modifikation die Enzymaktivität hemmt (Hagemann und Erdmann, 1994).

Um die Hemmung durch den Zellextrakt aufzuklären, wurden zahlreiche Studien durchgeführt. Dabei kamen verschiedene regulatorische Mechanismen in Frage. Für die Trehalose-Phosphat-Synthase aus *S. cerevisiae* und die Saccharose-Phosphat-Synthase aus Maisblättern konnte die Regulation der Enzyme durch Proteinphosphorylierungen nachgewiesen werden (Londesborough und Vuorio, 1991; Huber und Huber, 1992). Der Phosphorylierungsstatus der GgpS wurde von Jana Huckauf untersucht, dabei konnte ein Einfluss dieser posttranslationalen Modifikation auf die Enzymaktivität nicht eindeutig gezeigt werden (Huckauf, 2003). Eine Rolle bei der Regulation hätte ebenfalls eine proteolytische Modifikation der GgpS spielen können. Dieser Mechanismus führt zu einer Aktivierung der Isofloridosid-Synthase aus *Proterioochromonas malhamensis* (Kauss *et al.*, 1978). Diese konnte jedoch nachträglich ausgeschlossen werden, da die Inhibition der GgpS durch die Zugabe und Entfernung des Zellextraktes mehrfach hintereinander durchgeführt werden konnte (Schoor *et al.*, 1999). Ebenfalls wäre eine direkte Interaktion mit einem regulatorischen Protein denkbar, wie dies z.B. bei Saccharose-Phosphat-Synthasen aus höheren Pflanzen der Fall ist (Huber *et al.*, 1996). Die Beteiligung eines regulatorischen Proteins wurde von Jana Huckauf untersucht, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Huckauf, 2003).

In den vor dieser Arbeit durchgeführten Studien konnte die Ursache für die Inaktivierung der GgpS bei geringen Salzkonzentrationen in der Zelle oder *in vitro* bei der Zugabe von Zellextrakt nicht aufgeklärt werden. Die aufgestellte Hypothese nimmt die Interaktion mit einem inhibitorischen Protein oder eine posttranslationale Modifikation der GgpS an. Der putative inhibitorische Faktor konnte bisher nicht identifiziert werden.

Ebenfalls konnte bisher nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass die Feedback-Inhibition der GgpS durch GG den einzigen Mechanismus bei der *steady-state*-Anpassung darstellt. Hierbei könnte der inhibitorische Faktor aus dem Zellextrakt ebenfalls eine Rolle spielen.

### 1.4 Zielsetzung

Die Anpassung des Cyanobakteriums *Synechocystis* an erhöhte Salzkonzentrationen findet in zwei Phasen statt. Die schnelle Antwort erfolgt durch die Aktivierung von präformierten GgpS-Proteinen. Das Enzym wird bei niedrigen Salzkonzentrationen durch einen bisher unbekanntem Mechanismus inhibiert. In dieser Arbeit sollte die Wechselwirkung mit einem putativen inhibitorischen Faktor in einem grundlegenden systematischen Ansatz nachgewiesen und der Mechanismus der Hemmung aufgeklärt werden. Diese Experimente sollten auf der Basis von *in vitro*-Enzymtests mit gereinigtem GgpS-Protein stattfinden und der Einfluss von verschiedenen als hemmende Faktoren in Frage kommende Komponenten der Zelle oder posttranslationale Mechanismen auf die Enzymaktivität untersucht werden. Nach der Identifikation eines oder mehrerer inhibitorischen Faktoren sollte der zugrundeliegende Mechanismus durch biochemische Studien und kinetische Messungen aufgeklärt werden.

Bei der *steady-state*-Anpassung der Zelle wird die Aktivität der GgpS in Abhängigkeit von der Salzkonzentration des Mediums moduliert, um den internen GG-Pool einzustellen. Dabei könnte die salzmodulierte Inhibition des Enzyms durch GG und auch Trehalose eine wichtige Rolle spielen. Um den Mechanismus dieser negativen Rückkopplung besser zu verstehen, sollten die kinetischen Parameter des GgpS-Enzyms in Anwesenheit dieser Osmolyte untersucht werden. Weiterhin sollte der Effekt von anderen Osmolyten und kompatiblen Soluten auf die GgpS-Aktivität bestimmt werden, da dies zu einem tiefergehenden Verständnis der Hemmung führen könnte.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit sollte ein Modell aufgestellt werden, das die bisher unverstandenen Mechanismen der Salzanpassung bei der schnellen Antwort und der Akklimatisierung von *Synechocystis* an längerfristig erhöhte Salzkonzentrationen beschreibt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Organismen und Stämme

#### 2.1.1 Organismen

Bei allen Arbeiten mit *Synechocystis* sp. PCC6802 (nachfolgend *Synechocystis*) wurde der Glukose-tolerante Wildtyp untersucht, der für die Sequenzierung des Genoms verwendet wurde (Kaneko *et al.*, 1996; CyanoBase: <http://www.kazusa.or.jp/cyano/Synechocystis/>).

Bei Arbeiten mit *Escherichia coli* (nachfolgend *E. coli*) wurde der Stamm DH5 $\alpha$  mcr (Grant *et al.*, 1990) für die Vermehrung von Plasmid-DNA verwendet. Die Produktion von rekombinanten Proteinen wurde in dem Stamm BL21(DE3) (Novagen, Darmstadt) durchgeführt.

#### 2.1.2 Stämme

In der folgenden Tabelle sind alle verwendeten *Synechocystis*- und *E. coli*-Stämme aufgeführt. Bei allen Arbeiten mit *E. coli* wurden keine Dauerkulturen von Plasmid-tragenden Stämmen angelegt.

**Tabelle 2.1:** Liste der in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Synechocystis*, *E. coli* und *B. subtilis*.

Stamm	Beschreibung/Genotyp	Referenz
<i>Synechocystis</i>		
ggpS+	durch Transformation des Wildtyps mit dem Vektor pAll-ggpS-Spec erzeugt	Stirnberg, 2006
ggpS+-Strep	durch Transformation des Wildtyps mit dem Vektor pAll-ggpS-Strep-Spec erzeugt	Stirnberg, 2006
$\Delta$ GDS	durch Einfügen des Spec <sup>R</sup> -Resistenzgens in die <i>Sna</i> BI/ <i>Stu</i> I-Deletion inaktiviertes <i>ggpS</i> -Gen	Stirnberg, 2006
wt pIGA -303/+458	durch Transformation des Wildtyps mit dem Vektor pIGA -303/+458 erzeugt	diese Arbeit
$\Delta$ GDS pIGA -303/+458	durch Transformation der $\Delta$ GDS-Mutante mit dem Vektor pIGA -303/+458 erzeugt	diese Arbeit
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$ mcr	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi$ 80d/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, hsdR17( <i>r</i> <sub>K</sub> <sup>-</sup> <i>m</i> <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), $\lambda$ -	Grant <i>et al.</i> , 1990
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> ( <i>r</i> <sub>B</sub> <sup>-</sup> <i>m</i> <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) $\lambda$ (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ])	Novagen, Darmstadt
<i>B. subtilis</i>		
1154-GgpS	durch Transformation des Wildtyps mit dem Vektor pSG1154-GgpS erzeugt	diese Arbeit
1729-GgpS	durch Transformation des Wildtyps mit dem Vektor pSG1729-GgpS erzeugt	diese Arbeit

## 2.2 Verwendete Plasmide und Oligonukleotide

### 2.2.1 Plasmide

In der folgenden Tabelle sind alle Plasmide angegeben, die in dieser Arbeit für die Klonierung von Genen und zur heterologen Expression von rekombinanten Proteinen verwendet wurden. Alle Gene wurden vor der Ligation in den Zielvektor zur Sequenzierung in den pDrive-Vektor subkloniert.

**Tabelle 2.2:** Liste der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pDrive	Klonierungsvektor, Carb <sup>R</sup>	Qiagen, Hilden
pASK-IBA3	Vektor zur Expression von Genen in <i>E. coli</i> , Carb <sup>R</sup>	IBA GmbH, Göttingen
pIBA3-ggpS	pASK-IBA3 mit <i>ggpS</i> -Gen aus <i>Synechocystis</i> , Carb <sup>R</sup>	Stirnberg, Dissertation
pIBA5-TPS Myco	pASK-IBA5 mit <i>otsA</i> -Gen aus <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , Carb <sup>R</sup>	Gaffry, Diplomarbeit
pIBA3-TPS Yeast	pASK-IBA3 mit <i>tps1</i> -Gen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Carb <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIBA3-TPS Coryne	pASK-IBA3 mit <i>otsA</i> -Gen aus <i>Corynebacterium glutamicum</i> , Carb <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIBA3-TPS Coli	pASK-IBA3 mit <i>otsA</i> -Gen aus <i>E. coli</i> , Carb <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET16b-GgpS	pET16b mit <i>ggpS</i> -Gen aus <i>Synechocystis</i> , Carb <sup>R</sup>	Anja Wittmann
pIGA -303/+458	Integrationsvektor für <i>Synechocystis</i> , enthält den Bereich von -303 bis +458 des <i>ggpS</i> -Gens, als Reportergen für die Expression dient ein GFP-Gen	Stephan Klähn, Rostock
pSG1154	Vektor zur Expression von GFP-Fusionsproteinen in <i>Bacillus subtilis</i>	Lewis <i>et al.</i> , 1999
pSG1729	Vektor zur Expression von GFP-Fusionsproteinen in <i>Bacillus subtilis</i>	Lewis <i>et al.</i> , 1999
pSG1154-GgpS	Vektor zur Expression des GgpS-GFP-Fusionsproteins in <i>Bacillus subtilis</i> 168	diese Arbeit
pSG1729-GgpS	Vektor zur Expression des GFP-GgpS-Fusionsproteins in <i>Bacillus subtilis</i> 168	diese Arbeit

### 2.2.2 Oligonukleotide

Die nachfolgende Tabelle enthält alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide, die zur Kontrolle, Sequenzierung oder Klonierung von Genen eingesetzt wurden. Diese Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

**Tabelle 2.3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.**

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')
M13 for	CAAAGGGTCAGTGCTGC
M13 rev	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC
Coli for	GCTCTAGAGCATGAGTCGTTTAGTCGTAGT
Coli rev	GCCCTCGAGCGGCGCAAGCTTTGGAAAGGTAG
Coryne for	GCTCTAGAGCATGGATGATTCCAATAGCTT
Coryne rev	GCCCTCGAGCGGTGAGTTTTCTCCCGACTGTG
Yeast for	GCTCTAGAGCATGACTACGGATAACGCTAA
Yeast rev	GCCCTCGAGCGGGTTTTTGGTGGCAGAGGAGC
pIGA RS5-ins1	AGGCTTCTCCTCCGGCATTG
pIGA RS3-ins2	GATTACCAAATGCCCCGTA
1154 for	GCGCTCGAGATGAACTCATCCCTTGTGAT
1154 rev	CGCGAATTCCATTTGGGGGGGCTCTCCCA
1729 for	GCGCTCGAGAACTCATCCCTTGTGATCCT
1729 rev	CGCGAATTCCTACATTTGGGGGGGCTCTC
rnpB-T7-for	GAGAGTTAGGGAGGGAGTTGC
rnpB-T7-rev	AAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAAAAAAGAGAGTTAGTCG

## 2.3 Kultivierungsbedingungen

### 2.3.1 Kultivierung von *Synechocystis*

Die Kultivierung von *Synechocystis* erfolgte unter phototrophen Bedingungen bei einer Temperatur von 30°C entweder auf BG11-Agarplatten bei kontinuierlicher Belichtung mit 30 µE, in BG11-Flüssigmedium bei einer Lichtintensität von 30 µE und kontinuierlichem Schütteln von 150 Upm (r = 35 mm) oder in BG11-Flüssigmedium bei einer Lichtintensität von 100 µE und einer kontinuierlichen Begasung mit einem 5%igen (v/v) CO<sub>2</sub>/Luftgemisch. Nach Zugabe von 200 µl DMSO zu 800 µl Zellsuspension konnten die Zellen bei -80°C gelagert werden.

#### **BG11-Medium (pH 8.0):**

##### Stocklösung 1:

Citronensäure, Monohydrat	0,3 g
Ammonium-Eisen(III)-Citrat (braun)	0,3 g
Na <sub>2</sub> EDTA	0,05 g
ad 100 ml A. dest	

##### Stocklösung 2:

NaNO <sub>3</sub>	30 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,78 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,5 g
ad 1000 ml A. dest	



Die Zelldichte von *Synechocystis* wurde durch Bestimmung der Extinktion der Kulturen bei 750 nm gegen H<sub>2</sub>O als Referenz dokumentiert.

Eine Kontamination einer *Synechocystis*-Kultur durch andere Mikroorganismen wurde durch einen Ausstrich von ca. 200 µl Zellsuspension auf LB-Agarplatten und mindestens 48stündiger Inkubation im Dunkeln bei 30°C überprüft.

### 2.3.2 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 37°C entweder in LB-Flüssigmedium unter ständigem Schütteln bei 125 Upm oder auf LB-Agarplatten bei 37°C im Brutschrank.

#### **LB-Medium (Luria-Bertani):**

Hefeextrakt	5 g
Trypton	10 g
NaCl	10 g
ad 1000 ml A. dest.	

Für die Kultivierung von *E. coli* auf LB-Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren Agar (15 g/l) zugesetzt. Zur Selektion Plasmid-tragender *E. coli*-Zellen wurden dem Medium entsprechende Antibiotika in den folgenden Konzentration zugesetzt:

Carbenicillin	50 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

Für die Blau-Weiß-Selektion wurde dem Agar vor dem Gießen zusätzlich 50 µM IPTG und 80 g/ml X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid) zugesetzt.

Um die Zelldichte von *E. coli*-Kulturen zu bestimmen, wurde die Extinktion bei 600 nm gemessen (Sambrook *et al.*, 1989). Eine optische Dichte von 1 entspricht einer Zelldichte von  $8 \times 10^8$  Zellen/ml.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Isolierung von genomischer DNA

In dieser Arbeit wurde genomische DNA aus *Synechocystis*, *E. coli*, *Corynebacterium glutamicum* (nachfolgend *C. glutamicum*) und *Saccharomyces cerevisiae* (nachfolgend

*S. cerevisiae*) isoliert, um entweder eine vollständige genomische Integration von Plasmiden nachzuweisen oder die Gene von Glukosyltransferasen zu amplifizieren.

Von allen Organismen wurden jeweils 1 ml einer Kultur abzentrifugiert (1 min, 10000 x g) und das Pellet in 200 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung für 20 min. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 20000 x g) und der Überstand für die jeweiligen Zwecke eingesetzt. Die Kultivierung von *Synechocystis* fand in BG11-Medium statt, Zellen von *E. coli*, *C. glutamicum* und *S. cerevisiae* wurden in LB-Medium kultiviert.

### 2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe des Kits Nucleo-Spin<sup>®</sup> Plasmid Quick Pure der Firma Macherey und Nagel (Düren) durchgeführt. Diese Methode kombiniert die alkalische Lyse der Bakterienzelle mit der Aufreinigung der Plasmid-DNA durch Bindung an eine Kieselgel-Matrix, die sich in einer kleinen Säule befindet. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte mit H<sub>2</sub>O. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde anschließend für weitere Experimente eingesetzt.

### 2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA oder RNA wurde entweder durch den Vergleich mit dem Größenstandard (GeneRuler<sup>™</sup> 1 kb DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Roth) auf einem Agarosegel oder photometrisch bestimmt. Bei 260 nm gegen H<sub>2</sub>O als Referenz entspricht eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 µg DNA/ml bzw. 40 µg RNA/ml. Der Quotient der Absorption bei 260/280 lässt Rückschlüsse auf die Reinheit der Nukleinsäuren zu.

### 2.4.4 Restriktion von Plasmiden

Für die Restriktion von Plasmiden wurden die jeweiligen Restriktionsenzyme von Fermentas (St. Leon-Roth) oder New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main) und die vom Hersteller empfohlenen Puffer und Reaktionsbedingungen verwendet. Plasmid-DNA wurde mit 1-2 Units/µg DNA mindestens 1-3 h geschnitten. Um eine Religation von Plasmiden zu verhindern, wurden diese am 5'-Ende durch Zugabe von 5 U einer antarktischen Phosphatase (Antarctic Phosphatase, NEB) für 30 min bei 37°C dephosphoryliert. Die antarktische Phosphatase wurde anschließend bei 75°C für 10 min hitzeinaktiviert.

#### 2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können spezifische DNA-Fragmente, die von zwei Oligonukleotid-Bindestellen flankiert werden, durch die *Taq*-DNA-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) amplifiziert werden. Diese Methode wurde von Mullis (1987) entwickelt.

Die Reaktion erfolgt in drei Schritten mit unterschiedlicher Inkubationstemperatur, die 25 - 35 Mal wiederholt werden. Beim ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA durch Hitze denaturiert (Denaturierungsphase). Während der zweiten Phase können die Primer (kurze, einzelsträngige DNA-Oligonukleotide) durch Absenken der Temperatur spezifisch an die DNA binden (Annealing). Die Annealing-Temperatur ist hierbei von der Zusammensetzung der Primer abhängig und muss an deren Schmelztemperatur angepasst werden. Im darauf folgenden Schritt wird ausgehend von den freien 3`OH-Enden der Primer jeweils ein vollständig komplementärer DNA-Strang synthetisiert (Elongation). Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments und entspricht typischerweise 1 min/1 kB. Die zyklische Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Elongation ermöglicht eine exponentielle Amplifikation der Ziel-DNA, da auch die synthetisierte DNA jeweils als neues Zielmolekül fungiert. Für eine anschließende Klonierung können mittels der Primer beliebige Sequenzen wie z.B. Restriktionsschnittstellen angefügt werden.

Für PCR-Reaktionen, die lediglich zur Kontrolle der Anwesenheit einer bestimmten DNA-Sequenz dienen, wurden 0,1 - 0,5 µg Template-DNA und je 10 pmol der beiden Primer mit einem Ansatz der Firma Qiagen (Hilden) vermischt, der bereits dNTP`s, Puffer mit Mg<sup>2+</sup>-Ionen und die thermostabile *Taq*-Polymerase enthielt. Alle PCR-Reaktionen, deren Produkte nachfolgend kloniert und sequenziert wurden, wurden mit der Phusion-DNA-Polymerase (Finnzymes Oy, Espoo, Finnland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Mastercycler Personal (Eppendorf) nach dem folgenden Schema eines typischen PCR-Ansatzes durchgeführt.

#### **Standard-PCR-Programm:**

1.	5 min	94°C	Denaturierung
2.	30 - 45 sec	94°C	Denaturierung
3.	30 - 45 sec	52 - 70°C	Annealing
4.	0,5 - 2 min	72°C	Elongation
5.	7 min	72°C	Elongation von unfertigen DNA-Fragmenten

Hierbei wurden die Schritte 2 - 4 zyklisch 25 - 35 Mal wiederholt.

Nachdem die PCR-Reaktion beendet war, wurde der Reaktionsansatz mit 6x Gelladepuffer (Fermentas, St. Leon-Roth) versetzt und auf einem Agarosegel aufgetrennt.

#### 2.4.6 Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe erfolgte in Elektrophoresekammern (Biometra, Göttingen) mit 1%igen TAE-Agarosegelen. Die DNA-Proben wurden nach Zusatz von 6x-Gelladepuffer (Fermentas, St. Leon-Roth) auf das Gel aufgetragen. Die Trennung der DNA erfolgte bei einer maximalen Spannung von 8 V/cm. Zum Anfärben der DNA-Fragmente wurde das Gel in eine wässrige Lösung mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/µl gegeben. Durch die Einlagerung des Ethidiums in die Doppelhelix konnte die DNA auf einem UV-Licht-Transilluminator (2UV Transilluminator, UVP, Cambridge, England) sichtbar gemacht und dokumentiert werden. Als Größenstandard wurde die GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet.

#### **TAE-Puffer:**

TRIS/Acetat	40 mM
Natrium-Acetat	1 mM
EDTA	0,1 mM

mit Essigsäure (HAc) auf pH 7,8 einstellen

#### 2.4.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen unter Verwendung des Nucleo Spin® Extract Kits der Firma Macherey und Nagel (Düren) isoliert, wobei die selektive Adsorption der DNA an Glasperlen in Anwesenheit chaotroper Agentien genutzt wird.

Die jeweilige DNA-Bande wurde unter UV-Bestrahlung mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und entsprechend der Angaben des Kits behandelt. Die gereinigte DNA wurde mit 15 - 25 µl H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert und anschließend für Ligationen eingesetzt.

#### 2.4.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung zweier DNA-Enden wird als Ligation bezeichnet. Mittels der T4-DNA-Ligase wird eine Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe des einen DNA-Fragments und der 3'-OH-Gruppe eines zweiten Fragments geschlossen.

PCR-Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Isolierung aus dem Agarosegel mit dem linearisierten Vektor pDrive (Qiagen, Hilden) ligiert. Der kommerziell erhältliche Vektor besitzt 3'-terminale Thymin-Überhänge, die durch eine

terminale Transferase angefügt wurden. Bei der PCR von DNA-Fragmenten entstehen bei Verwendung der *Taq*-DNA-Polymerase 3'-Adenin-Überhänge, so dass eine Ligation der Vektoren und der PCR-Fragmente möglich ist. Bei PCR-Fragmenten, die mittels der Phusion-DNA-Polymerase (Finnzymes Oy, Espoo, Finnland) hergestellt wurden, wurden die Adenin-Überhänge durch Inkubation von 10 min bei 72°C in Anwesenheit der *Taq*-DNA-Polymerase nachträglich angefügt. Die Ligation erfolgte in einem Reaktionsansatz mit 2x-Ligationspuffer, der die T4-DNA-Ligase enthält. Bei Ansätzen, in denen geschnittene Fragmente und Vektoren mit kompatiblen Überhängen ligiert wurden, wurden 5 U T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Roth) und der entsprechende Reaktionspuffer eingesetzt. Die Reaktionen wurden für 2 h oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Das Verhältnis zwischen Insert und Vektor betrug 3:1.

### 2.4.9 DNA-Sequenzanalyse

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von GATC (Konstanz) durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden nach der Kettenabbruchmethode durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Hierbei wird die Zielsequenz, ausgehend von einem spezifischen Primer, durch die *Taq*-Polymerase amplifiziert, wobei gleichzeitig zufallsgemäß Didesoxynukleotide (ddNTPs) eingebaut werden. Da dem Didesoxynukleotid eine freie 3'-OH-Gruppe zur weiteren Reaktion fehlt, wird der DNA-Strang nicht weiter verlängert. Um den Abbruch der Kettenverlängerung nicht in jedem Zyklus an dergleichen Base zu verursachen, müssen die ddNTPs in einer viel geringeren Konzentration (1000 mal geringer) zugesetzt werden als die dNTPs. Bei dieser Methode sind die ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Die Detektion der vier unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffe und die Umsetzung in Chromatogramme erforderte einen Computer-gestützten Kapillar-Sequenzierer (ABI Prism 310) mit entsprechender Software.

Die Chromatogramme wurde anhand des Programmes Chromas (Version, 1.45, Southport, Queensland, Australia) analysiert, die Sequenzvergleiche erfolgten über das Programm SECentral.

### 2.4.10 Herstellung von RNA-Fragmenten durch *in vitro*-Transkription

In dieser Arbeit wurde ein RNA-Fragment für den Nachweis einer Bindung des GgpS-Proteins an RNA hergestellt. Diese wurden von einer RNA-Polymerase durch *in vitro*-Transkription unter Zugabe von unmarkierten Nukleotiden und DIG-markierten UTP

synthetisiert und markiert. Als DNA-Vorlage wurde eine 250 Bp lange Teilsequenz des *rnpB*-Gens aus *Synechocystis* ausgewählt, die mittels PCR mit den Primern *rnpB*-T7-for und *rnpB*-T7-rev synthetisiert wurde. Über einen Primer wurde der Sequenz ein Promotor für die T7-RNA-Polymerase angefügt. Das PCR-Produkt wurde anschließend als Template für die *in vitro*-Transkription verwendet.

**Ansatz für die *in vitro*-Transkription (20 µl):**

5 µg	Template-DNA
2 µl	RNA-Labeling Mix (Roche Diagnostics, Mannheim)
2 µl	10x Transkriptionspuffer
2 µl	T7-RNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main)

Die Transkription erfolgte bei 37°C. Nach 2 h wurde RNase freie DNase (Roche Diagnostics, Mannheim) zum Abbau der Template-DNA hinzugegeben und erneut bei 37°C für mindestens 20 min inkubiert.

## 2.5 Techniken zur Manipulation von Zellen

### 2.5.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Induktion der Kompetenz von *E. coli*-Zellen zur Aufnahme von Fremd-DNA wurde erstmals von Sambrook *et al.* (1989) beschrieben. Durch Zugabe des Salzes CaCl<sub>2</sub> in der exponentiellen Wachstumsphase erhöht sich die Zellpermeabilität für Fremd-DNA und inaktiviert wahrscheinlich membranassoziierte Nukleasen. Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der Methode von Inoue *et al.* (1990) hergestellt. Dazu wurden 20 ml LB-Medium mit einer Kolonie des gewünschten Stammes angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden 250 ml SOB-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft und bis zu einer Dichte von 0,2 - 0,3 schüttelnd bei Raumtemperatur kultiviert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (2000 x g, 4°C, 10 min) und das Pellet in 80 ml eiskalten TB-Puffer resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und das Pellet in 20 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde unter leichten Schütteln tropfenweise DMSO hinzugegeben (EK: 7%). Die Zellsuspension wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

**TB-Puffer (200 ml):**

PIPES (pH 6,7)	10 mM
KCl	250 mM
CaCl <sub>2</sub>	15 mM
MnCl <sub>2</sub>	55 mM
Sterilfiltrieren	

**SOB-Medium (250 ml):**

Trypton	5 g
Hefeextrakt	1,25 g
NaCl	0,125 g
KCl (1 M)	625 µl
Nach dem Autoklavieren	1,25 ml
1 M MnCl <sub>2</sub> -Lösung	hinzufügen

### 2.5.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Die bei -80°C gelagerten chemisch kompetenten *E. coli*-Stämme DH5α mcr oder BL21(DE3) wurden auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz versetzt. Der Ansatz wurde auf Eis 30 min inkubiert, bevor die Zellen einem Hitzeschock von 42°C für 60 - 90 sek ausgesetzt wurden. Anschließend wurden 400 µl LB-Medium zugefügt und der Ansatz bei 37°C für 45 min inkubiert. Die Selektion der Plasmid-tragenden Klone erfolgte durch das Ausstreichen auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten.

### 2.5.3 Transformation von *Synechocystis*-Zellen

Da *Synechocystis* eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von Fremd-DNA besitzt, war eine Vorbehandlung der Zellen nicht notwendig. Zur Transformation von *Synechocystis* wurden 2 ml einer Kultur mit einer OD<sub>750</sub> von ca. 2 (mind. 10<sup>9</sup> Zellen) zentrifugiert (1000 x g, 30°C, 2 min). Der Großteil des Überstandes wurde verworfen und die Zellen in ca. 200 µl Rücklauf resuspendiert. Die Plasmid-DNA wurde in einer Menge von 500 - 1000 ng zugesetzt und die Zellen anschließend bei 30°C im Dunkeln über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf BG11-Agarplatten ausplattiert und nach ca. 2 - 3 Tagen mit dem entsprechenden Antibiotikum in einer Endkonzentration von 15 µg/ml unterschichtet. Nachdem die Wildtypzellen in der Regel nach einigen Tagen lysiert waren, wurden die ersten resistenten Zellkolonien auf der Agarplatte sichtbar. Durch mehrmaliges Unterschichten mit steigenden Antibiotika-Konzentrationen wurde der Selektionsdruck über mehrere Tage erhöht. Da *Synechocystis* 10-12 Kopien des Genoms enthält, ist ein starker Selektionsdruck notwendig, um eine vollständige Integration von Plasmiden in alle Kopien zu erhalten. Die vollständige Integration wurde durch PCR-Analysen überprüft.

#### 2.5.4 Transformation von *B. subtilis*-Zellen

Es wurden 10 ml MD-Medium mit 50 µl CAA (20%, *Casamino Acids*) mit dem *B. subtilis* Wildtyp inokuliert und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 - 1,5 kultiviert. Dann wurde die gleiche Menge an MD-Medium ohne CAA zugegeben. Die Zellen wurden anschließend für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Für jede Transformation wurden 800 µl der Zellsuspension verwendet, mit 1 µg Plasmid-DNA/ml versetzt und 20 min schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 25 µl 20% CAA hinzugegeben und der Transformationsansatz für 1 h bei 37°C geschüttelt. Abschließend wurden die Zellen auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

##### MD-Medium (50 ml):

10x PC	5 ml
40% (w/v) Glukose	1,25 ml
Tryptophan (2 mg/ml)	1,25 ml
Eisen(III)-Ammoniumcitrat (2,2 mg/ml)	0,25 ml
L-Aspartat (50 mg/ml, pH 7,0)	2,5 ml
MgSO <sub>4</sub> (1 M)	0,15 ml

##### 10x PC:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	21,4 g
KH <sub>2</sub> -PO <sub>4</sub>	12 g
Na <sub>3</sub> -Citrat, 5xH <sub>2</sub> O	10 g

#### 2.6 Produktion von heterologen und homologen Proteinen in *E. coli*

Zur Produktion von verschiedenen homologen oder heterologen Proteinen wurde ausschließlich der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) verwendet. Alle Medien enthielten die entsprechenden Antibiotika und die Kultivierung fand bei 37°C statt. Die Überexpressionsplasmide wurden BL21(DE3)-Zellen transformiert und auf LB-Agarplatten über Nacht inkubiert. Von diesen Platten wurde eine LB-Vorkultur mit 5 - 10 Kolonien angeimpft und über Nacht bei 125 Upm kultiviert. Aus dieser Vorkultur wurde die Expressionskultur in einem Verhältnis von 1/10 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 - 1 bei 125 Upm kultiviert. Anschließend wurde zur Induktion der Expression in Abhängigkeit des Vektorsystems entweder Anhydrotetracyclin (AHT, EK: 2 µg/ml), oder IPTG (EK: 1 mM) zugegeben. Bei den verwendeten pASK-IBA-Vektoren steht die Transkription der klonierten Gene unter der Kontrolle des Tetracyclin-Promotors, diese kann durch das nicht antibiotisch wirkende Analogon AHT induziert werden. Bei dem verwendeten pET-Vektor unterliegt die Transkription des gewünschten Gens der Kontrolle des viralen T7-Promotors. Der Promotor kann nicht von endogenen RNA-Polymerasen erkannt werden und benötigt die T7-RNA-Polymerase. Diese ist in BL21(DE3)-Zellen genomisch kodiert und die Expression kann durch IPTG induziert werden. Nach der Induktion wurden die Kulturen für 3 h (pET-

Vektoren) oder 6 h (pASK-IBA-Vektoren) kultiviert, die Zellen wurden dann durch Zentrifugation (5°min, 7000 x g) geerntet. Das Zellpellet konnte dann bei -20°C eingefroren und gelagert werden.

## 2.7 Proteinbiochemische Methoden

### 2.7.1 Affinitätschromatographische Reinigung von rekombinanten Proteinen

In dieser Arbeit wurde die Glukosylglycerolphosphat-Synthase aus *Synechocystis* (GgpS) und die Trehalose-Phosphat-Synthasen (TPS) aus *C. glutamicum*, *M. tuberculosis*, *E. coli* und *S. cerevisiae* exprimiert (siehe 2.6) und mittels Affinitätschromatographie gereinigt.

Hierzu wurden die Proteine mit verschiedenen Affinitäts-Tags versehen. Bei der Verwendung von pASK-IBA-Vektoren wurde der Proteinsequenz entweder N- oder C-terminal die Plasmid-kodierte Strep-Tag II-Sequenz angefügt. Diese besteht aus 8 Aminosäuren (WSHPQFEK) und wird durch die starke Interaktion mit der Strep-Tactin-Matrix (IBA GmbH, Göttingen) zur Reinigung von rekombinanten Proteinen eingesetzt. Diese Interaktion beruht prinzipiell auf der Bindung von Biotin an Avidin.

Zusätzlich wurde zu Beginn dieser Arbeit das mit einem 10x-His-Tag versehene GgpS-Protein über die Interaktion mit einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix gereinigt. Dazu bilden jeweils zwei Histidine mit einem Zink-Ion eine Chelatbindung aus und können aufgrund dieser Interaktion gereinigt werden. Alle gezeigten Enzymtests wurden nachfolgend jedoch mit Strep-Tag-Fusionsproteinen durchgeführt.

Alle Schritte der Proteinreinigung wurden ausschließlich auf Eis oder bei 4°C durchgeführt.

Für die Reinigung der Strep-Tag-Fusionsproteine wurde das Pellet der Expressionskultur zunächst in 15 - 25 ml Waschpuffer I (100 mM TRIS/HCl, pH 8, 150 mM NaCl) mit 0,1 mg DNaseI/ml (Roche, Mannheim) aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend durch dreimaliges Passagieren durch eine FRENCH<sup>®</sup>-Press-Zelle (SLM Aminco, USA) bei einem Druck von 18000 x psi aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 15000 x g für 20 min abzentrifugiert und der den Gesamtproteinextrakt enthaltende Überstand konnte direkt auf eine Strep-Tactin-Sepharose-Säule aufgetragen werden. Nach der Bindung der Proteine an die Matrix wurde die Säule zunächst mit 15 Säulenvolumen (SV) Waschpuffer II (100 mM TRIS/HCl, pH 8, 500 mM NaCl) und anschließend mit 5 SV Waschpuffer III (100 mM TRIS/HCl, pH 8) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 5 mM Desthiobiotin in Waschpuffer I. Die Elutionen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Reinigung der His-Tag-Proteine wurde das *E. coli*-Pellet in Waschpuffer I mit 50 mM Imidazol aufgenommen und der Gesamtproteinextrakt analog zur Strep-Tag-Reinigung hergestellt. Für die Reinigung wurde eine His-Trap<sup>TM</sup>-Matrix und das FPLC-System Äkta (beide GE Healthcare, München) eingesetzt. Nach der Bindung der Fusionsproteine an die Matrix wurde die Säule mit 20 SV Waschpuffer I mit 200 mM Imidazol gewaschen, um unspezifische Proteine zu entfernen. Die Elution erfolgte mit 500 mM Imidazol in Waschpuffer I. Die Proteine wurden analog zur Strep-Tag-Reinigung behandelt.

### 2.7.2 Untersuchungen zur Bindung des GgpS-Proteins an Heparin

Um die Bindung der GgpS an Heparin zu untersuchen, wurden 210 µg des gereinigten Proteins mit 300 µl einer Heparin-Sepharose-Matrix (GE Healthcare, München) für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Matrix wurde anschließend mit 20 ml Puffer A (20 mM TRIS/Maleat, pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen und das Protein in Puffer A mit steigenden NaCl-Konzentrationen (0 - 2 M) eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

### 2.7.3 Herstellung von Zellextrakten verschiedener Organismen

Für einen nachfolgenden Einsatz in Enzymaktivitätstests wurden Zellextrakte von *Synechocystis*, *E. coli*, *C. glutamicum* und *B. subtilis* hergestellt. Dazu wurden Zellen in Enzymtestpuffer (ETP, 20 mM TRIS/Maleat, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) mit 0,1 mg DNaseI/ml resuspendiert und anschließend mittels einer FastPrep<sup>®</sup> (Thermo-Savant) durch schnelles Schütteln mit Glasperlen (Ø 0,2 – 0,3 mm) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 20000 x g für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde über eine PD10 Desalting column (GE Healthcare, München) gegeben, um niedermolekulare Substanzen zu entfernen. Die Proteinkonzentration wurde abschließend mit ETP auf 10 µg/µl eingestellt. Für bestimmte Enzymtests wurde der Zellextrakt verschiedenen Behandlungen unterzogen. Die Proben wurden entweder gekocht (1 h, 95°C) oder mit Trypsin (EK: 40 µg/ml) für 96 h oder ProteinaseK (EK: 400 µg/ml) für 24 h bei 37°C inkubiert, die Proteasen wurden anschließend hitzeinaktiviert (1 h, 95°C). Ausserdem wurde eine Acetonfällung des Zellextraktes durchgeführt. Dazu wurde dem Zellextrakt das 5fache Volumen an eiskaltem Aceton (80%) hinzugefügt, für 4 h bei -20°C inkubiert und danach zentrifugiert (25000 x g, 30 min). Der Überstand und das Pellet wurden zur Entfernung des Aceton in einer Speed-Vac (Eppendorf Concentrator 5301) bis zur Trockne abgedampft und in ETP aufgenommen. Außerdem wurde

der Zellextrakt einer Auftrennung über ein HPLC-System unterzogen (HP series 1100, Hewlett-Packard, Waldbronn). Dabei wurde die Säule Nucleodur RP-18 (Macherey und Nagel, Düren) verwendet. Die einzelnen Fraktionen wurden abgedampft und das Pellet in ETP aufgenommen.

#### 2.7.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen von Lösungen wurden nach Bradford (1976) bestimmt. Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde mit Hilfe des Roti<sup>®</sup>-Nanoquant-Reagenz (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Kalibrierung der Proteinkonzentration diente Rinderserumalbumin (BSA, *bovine serum albumin*).

#### 2.7.5 Trennung von Proteinen mittels Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht erfolgte in 10 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli (1970) in „Minigel-Twin“-Kammern (Biometra, Göttingen). Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 4x-SDS-Probenpuffer versetzt, und für 5 min bei 95°C inkubiert, um eine vollständige Bindung des SDS an die Proteine zu gewährleisten. Die Proteine wurden bei maximal 30 mA aufgetrennt. Als Größenstandard diente der PageRuler<sup>™</sup> plus (Fermentas, St. Leon-Roth).

Je nach weiterem Verwendungszweck wurden die Gele anschließend einer Coomassie-Färbung (siehe 2.7.5), einer Silberfärbung (siehe 2.7.6) oder einer Western Blot-Analyse (siehe 2.7.7) unterzogen.

#### **4x-SDS-Probenpuffer:**

SDS	8%
TRIS/HCl, pH 6,8	200 mM
Glycerin	40%
β-Mercaptoethanol	4%
Bromphenolblau	0,04%

#### 2.7.6 Coomassiefärbung von SDS-Gelen

SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese einer Coomassie-Färbung in Anlehnung an Sambrook *et al.* (1989) unterzogen. Dabei wurden die Proteingele für mindestens 30 min in Coomassie-Färbelösung (0,2% Serva Blue R, 30% Ethanol, 10% Essigsäure) geschüttelt.

Anschließend wurden die Gele in 10% Essigsäure entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar waren.

### 2.7.7 Silberfärbung von SDS-Gelen

Für die Silberfärbung von SDS-Gelen wurden diese nach der Elektrophorese zunächst in Fixierlösung (50% Methanol, 12% Essigsäure, 0,05% Formaldehyd) für 1 h inkubiert. Anschließend wurde das Gel 3 Mal für jeweils 20 min in 50% Ethanol gewaschen. Dann wurde das Gel in Natriumthiosulfat-Lösung (0,2 g/l) inkubiert und danach 3 Mal 20 min mit Wasser gespült. Zur Färbung wurde das Gel in Entwicklungslösung (60 g/l  $\text{Na}_2\text{O}_3$ , 0,05% Formaldehyd) inkubiert, bis die gewünschte Intensität erreicht war. Zum Stoppen der Reaktion wurde das Gel in Stopp-Lösung (50% Methanol, 12% Essigsäure) überführt und für 20 min geschüttelt.

### 2.7.8 Immunologische Detektion von Proteinen mittels Western-Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinproben wurden die Proteine gegebenenfalls mit Hilfe eines semi-dry-Blots aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$ , Millipore, Bedford) übertragen. Dazu wurde die Membran in Methanol aktiviert, in Transferpuffer (10 mM CAPS, pH 11, 10% Methanol) äquilibriert und dann in einer *semi-dry*-Blotapparatur (Biometra, Göttingen) auf einen Stapel aus drei in Transferpuffer getränkten Whatman 3 mm-Filter-Papieren (Whatman GmbH, Dassel) gelegt. Darauf wurde das Proteingel luftblasenfrei gelegt und mit einem weiteren Stapel bestehend aus drei Whatman-Papieren bedeckt. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Oberfläche für 1 h. Nach dem Transfer wurde die Membran für 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blockierungslösung (3% BSA in PBS-T) inkubiert, der jeweilige erste Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:5000 in PBS-T zugegeben und für weitere 60 min geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für je 5 min wurde der entsprechende zweite Antikörper (Verdünnung 1:10000 in PBS-T) auf die Membran gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für die spätere Detektion wurde die an  $\alpha$ -Maus-oder  $\alpha$ -Kaninchen-IgG konjugierte alkalische Phosphatase (Sigma-Aldrich, Darmstadt) genutzt. Nach dreimaligem Waschen wurde auf die Membran ein NBT/BCIP-Gemisch (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in Entwicklungspuffer gegeben und abgedunkelt bis zur gewünschten Signalstärke inkubiert.

**10x PBS-T (1000 ml):**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,44 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	32 g
NaCl	77 g
Tween-80	10 ml
pH mit KOH auf 7,0 einstellen	

**Entwicklungspuffer:**

TRIS/HCl (pH 9,4)	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

### 2.7.9 Formaldehyd-Crosslinking von rekombinantem GgpS-Protein

Um den Oligomerisierungsstatus des GgpS-Proteins zu untersuchen, wurden Crosslinking-Studien mit Formaldehyd (FA) durchgeführt. Die eingesetzte FA-Konzentration wurde vor der Zeitreihe über eine Konzentrationsreihe ermittelt. In einem Ansatz von 20 µl mit einer GgpS-Konzentration von 0,5 µg/µl wurde eine Formaldehyd-Konzentration von 0,75% eingestellt, bei Raumtemperatur inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten Proben abgenommen. Diese wurden sofort mit 4x-SDS-Probenpuffer versetzt und in einem 12% igen SDS-Gel aufgetrennt. Die aufgetragene GgpS-Menge betrug dabei 2,5 µg pro Ansatz. Der Nachweis des GgpS-Proteins fand entweder durch Coomassie-Färbung oder Western-Blot statt. Bei Versuchen mit DNA wurden 8 bp lange, einzel-oder doppelsträngige Oligonukleotide (GACCTGAA und/oder TTCAGGTC) in einer Konzentration von 0,05 µg/µl zugesetzt.

### 2.7.10 *In vivo*-Crosslinking mittels SPINE

Für das *in vivo*-Crosslinking wurde die SPINE-Methode (*strep protein interaction experiment*) nach Herzberg *et al.* (2007) angewendet. Bei dieser Technik wurde der *Synechocystis*-Stamm ggpS+-Strep verwendet, der das GgpS-Protein mit einem Strep-Tag überexprimiert. Die Zellen wurden bei 30°C in BG11-Medium bis zu einer OD<sub>750</sub> von 1,5 kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen mit dem Crosslinker Formaldehyd (FA, EK: 1%) versetzt. Das FA ist membrangängig und vernetzt eng benachbarte Bestandteile der Zelle. Dadurch könnten eventuelle Interaktionspartner zusammen mit dem GgpS-Protein gereinigt und identifiziert werden. Die Zellen wurden 30 min inkubiert und danach abzentrifugiert (2000 x g, 10 min, 4°C). Zur Entfernung des FA wurden die Zellen 3 Mal in 20 ml BG11-Medium aufgenommen, abzentrifugiert und wieder resuspendiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in Lysispuffer (100 mM TRIS/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl) aufgenommen und durch FRENCH<sup>®</sup>-Press-Behandlung aufgeschlossen. Das Strep-getagte GgpS-Protein wurde anschließend analog zu 2.7.1 gereinigt. Auf das Kochen

der Proben wurde dabei verzichtet, da das FA-Crosslinking hitzereversibel ist. Die Proteinproben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und das SDS-Gel einer Silberfärbung (siehe 2.7.6) unterzogen. Dabei wurden 15 µg Protein pro Spur geladen.

### 2.7.11 Limitierte Proteolyse durch Trypsin

Um zu überprüfen, ob bei der Interaktion des GgpS-Proteins mit Glukose, dem Zellextrakt oder Nukleinsäuren eine Strukturveränderung eintritt, wurden Versuche mittels limitierter Proteolyse mit Trypsin durchgeführt. Bei einer Strukturveränderung kann sich dabei ein Unterschied im Abbaumuster ergeben, weil Proteaseschnittstellen maskiert werden. Für den Versuch wurde in einem Volumen von 400 µl mit einer GgpS-Konzentration von 0,5 µg/µl in ETP angesetzt. Die Proteolyse wurde bei 37°C durchgeführt und mit der Zugabe von Trypsin (EK: 20 µg/ml) gestartet. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 4x-SDS-Probenpuffer und einer Inkubation für 10 min bei 95°C gestoppt. Anschließend wurden die Proben in 12%igen SDS-Gelen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die aufgetragene GgpS-Menge betrug je Probe 2,5 µg.

Bei den Versuchen mit gekochtem Zellextrakt (*E. coli*) wurde in dem Ansatz eine Konzentration von 5 µg/µl eingestellt. Bei allen Angaben zum Zellextrakt wird die Menge oder Konzentration an Protein angegeben, die der Extrakt vor dem Kochen hatte. Die tatsächliche Proteinkonzentration betrug nach dem Kochen nur noch lediglich ~ 7% des anfänglichen Proteingehaltes. Bei den Versuchen mit DNA wurde Lachssperma-DNA (Invitrogen, Karlsruhe) in einer Konzentration von 2,5 µg/µl eingesetzt. Bei der limitierten Proteolyse mit Glukose wurde eine Konzentration von 200 mM eingestellt.

### 2.7.12 Zirkular-Dichroismus-Messungen (CD)

Diese spektroskopische Methode kann zur Bestimmung von Sekundärstrukturen wie  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und *random coil*-Bereichen in Proteinen verwendet werden. Hierbei spielt auch die Lage der jeweiligen Strukturen zueinander eine Rolle, was auch die Analyse von Konformationsänderungen erlaubt. Zur Messung der CD-Spektren des GgpS-Proteins wurde das Spektropolarimeter Jasco J-715 (Japan Spectroscopic Co., Ltd, Japan) verwendet. Die Messungen wurden in einem Kaliumphosphat-Puffer (5 mM) durchgeführt und 150 µg/ml GgpS-Protein eingesetzt. Es wurden verschiedene Ansätze analysiert, die zusätzlich zum GgpS-Protein auch 600 mM NaCl und/oder 70 µg/ml Lachssperma-DNA enthielten. Für die Messungen wurde eine Küvette mit einer Schichtdicke von 1 mm eingesetzt. Die Messung

erfolgte in einem Wellenlängenbereich von 180 - 250 nm. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit 50 nm/min und einem Abstand der Messpunkte von 1 nm.

### 2.7.13 EMSA-Experimente (*electrophoretic mobility shift assay*)

Die EMSA-Technik wurde angewendet, um eine Interaktion der zu untersuchenden Glukosyltransferasen mit Nukleinsäuren nachzuweisen. Eine Bindung der Proteine an DNA- oder RNA-Fragmente definierter Größe sollte bei der Auftrennung in einem Agarose-Gel das Laufverhalten der Nukleinsäuren verändern. Dies würde sich durch einen apparenten Größenzuwachs des Fragments äußern. Um eine Bindung zu untersuchen, wurden unterschiedliche Mengen an Protein mit 100 - 113 ng eines DNA-Fragments (233 Basenpaare, Bp) oder 50 ng eines RNA-Fragments (250 Nukleotide) bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert und anschließend in TA-Agarose-Gelen (2%, TAE ohne EDTA) aufgetrennt. Bei Versuchen mit NaCl enthielten sowohl Gel- als auch Laufpuffer 200 mM NaCl. Für eine Quantifizierung der Bandenintensität wurde das Programm PC-BAS (Raytest) verwendet.

## 2.8 Enzymtest zur Bestimmung der Aktivität von Glukosyltransferasen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Enzymtests durchgeführt, um die Aktivität von Glukosyltransferasen bei verschiedenen Bedingungen zu bestimmen. Alle Substrate für den Test wurden von Sigma-Aldrich (München) erworben. Der Test wurde auf der Basis der Ergebnisse von Schoor (1996) durchgeführt, musste jedoch grundlegend optimiert werden (siehe Ergebnisse). Alle Ansätze hatten dabei ein Gesamtvolumen von 80 µl, die eingesetzte Enzymmenge betrug je nach Enzym 0,1 - 1 µg. Im ersten Teil des Tests wurde die Verknüpfung der beiden Substrate XDP-Glukose (ADP-Glukose oder UDP-Glukose) und Glycerol-3-Phosphat (GgpS) oder Glukose-6-Phosphat (TPS) zu Glukosylglycerolphosphat bzw. Trehalose-Phosphat durch die jeweiligen Glukosyltransferasen katalysiert. Diese Reaktion fand bei der jeweiligen optimalen Wachstumstemperatur der Organismen statt, aus denen die Enzyme stammten. Diese Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung (10 min, 95°C) der Enzyme nach 10-15 min gestoppt. Die phosphorylierten Zwischenprodukte wurden durch Zugabe von 1 U einer alkalischen Phosphatase (FastAP, Fermentas, St. Leon-Roth) für 30 min bei 30°C dephosphoryliert. Zur Ausfällung der Proteine wurde 400 µl eiskaltes Aceton (80%) hinzugegeben, das den internen Standard Ribitol enthielt (200 µg/ml). Die Proben wurden mindestens 1 h bei -20°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert (20 min,

4°C, 20000 x g). Der Überstand wurde überführt und mittels einer SpeedVac (Eppendorf Concentrator 5301) bis zur Trockne eingedampft. Die nachzuweisenden Substanzen aus dem Pellet wurden in 200 µl 100% Ethanol extrahiert und die Proben erneut abzentrifugiert (20 min, RT, 20000 x g). Der Überstand wurde in Gaschromatographie (GC)-Gefäße überführt und das Ethanol unter Druckluftstrom abgedampft. Die eingetrockneten Proben wurden anschließend für die GC derivatisiert (siehe 2.9).

## 2.9 Nachweis niedermolekularer Substanzen mittels Gaschromatographie

Um die Osmolyte Glukosylglycerol und Trehalose sowie den internen Standard Ribitol mittels Gaschromatographie nachweisen zu können, mussten die Hydroxylgruppen dieser Substanzen zunächst silyliert werden. Dabei werden diese Substanzen durch die kovalente Bindung von Trimethylsilanen an die OH-Gruppen hitzestabilisiert und die Verdampfungstemperatur herabgesetzt. Für diese Derivatisierung wurde MSTFA eingesetzt (Macherey und Nagel, Düren).

Die eingetrockneten Proben wurden mit 50 µl MSTFA und 50 µl Pyridin versetzt und für 1 h (Glukosylglycerol) oder 4 h (Trehalose) bei 65°C inkubiert. Anschließend konnten die Proben in einem Gaschromatographen (TRACE GC 2000 *series*, Thermo Finnigan, Mailand, Italien) analysiert werden. Zur Auftrennung wurde eine Kapillarsäule des Typs SE-54 der Firma Mega (Legnano, Italien) verwendet, wobei als mobile Phase bzw. Trägergas Stickstoff diente. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors.

Die Trennung erfolgte bei folgendem Temperaturprogramm:

2 min	60°C
Anstieg von	30°C/min
3 min	280°C
Anstieg von	30°C/min
5 min	320°C

Die Menge der zu analysierenden Osmolyte konnte durch die Fläche des Peaks bestimmt werden, die in ein Verhältnis zur Peakfläche des bekannten internen Standards gesetzt wurde. Die resultierenden Osmolytmengen konnten dann zur Berechnung der Enzymaktivitäten verwendet werden.

## 2.10 Untersuchung zur Regulation der GgpS-Transkription in *Synechocystis*

In dieser Arbeit wurde das Plasmid pIGA -303/+458 in das Genom des Wildtyps und einer Mutante ( $\Delta$ GDS), die kein GgpS-Enzym synthetisieren kann, inseriert (siehe 2.5.3). Das Plasmid enthält neben einer Spectinomycinresistenzkassette zur Selektion ein GFP-Gen, dessen Transkription unter der Kontrolle des nativen GgpS-Promotors steht. Wenn, wie vermutet, das GgpS-Protein seine eigene Transkription reguliert, sollte in der  $\Delta$ GDS-Mutante die GFP-Expression im Vergleich zum Wildtyp dereguliert sein. Um die GFP-Expression nachweisen zu können, wurden Zellen der jeweiligen Stämme durch eine FastPrep-Behandlung aufgeschlossen. Anschließend wurden die löslichen Proteine durch Ultrazentrifugation (30 min, 200000 x g) von den Membranproteinen getrennt. Die Konzentration der löslichen Proteine wurde auf 3  $\mu$ g/ $\mu$ l eingestellt und die GFP-Fluoreszenz mittels eines Fluoreszenzspektrometers (Aminco-Bowman Series 2, SLM-Aminco) analysiert. Dabei wurde das GFP-Protein bei 395 nm angeregt und die Fluoreszenz über einen Bereich von 450 - 600 nm gemessen. Die maximale Fluoreszenz von GFP liegt bei 509 nm. Bei diesen Messungen betrug die Verstärkung 605 V ( $\Delta$ GDS-Mutante) bzw. 710 V (Wildtyp), die Spaltbreite lag sowohl bei Anregung als auch Emission bei 8 nm.

Die GFP-Expression wurde sowohl bei einer niedrigen Salzkonzentration angezogenen Zellen als auch bei über 3 Tage bei 3% Salz kultivierten Zellen untersucht.

## 2.11 Identifikation der Nukleinsäurebindestellen des GgpS-Proteins

Die Versuche zur Identifikation der Nukleinsäurebindestellen wurde mit Modifikationen nach Ori *et al.* (2009) durchgeführt. Bei dieser Technik werden die primären Amine der Lysine auf der Proteinoberfläche durch die Zugabe von NHS-Biotin (Sigma-Aldrich, München) kovalent modifiziert. Da davon ausgegangen wird, dass die Nukleinsäure/GgpS-Interaktion unter anderem über die Bindung des Nukleinsäurerückgrats an oberflächlich gelegene Lysine stattfindet, sollte die Modifikation dieser Aminosäuren durch NHS-Biotin in Anwesenheit von DNA verhindert werden. Nach einer Proteolyse des GgpS-Proteins und einer anschließenden MALDI-TOF-Massenspektrometrie (*matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight*) sollten nun die biotinylierten Peptide nachgewiesen werden können. Durch den Vergleich der Ansätze ohne bzw. mit DNA würde man die Bindestellen identifizieren können.

Für den Versuch wurde das GgpS-Protein mittels einer PD10 Desalting column (GE Healthcare, München) in 50 mM Kaliumphosphatpuffer umgepuffert. Jeder Ansatz enthielt

dabei 0,1 µg/µl GgpS-Protein, ein Ansatz zusätzlich 6 µg Lachssperma-DNA (Invitrogen, Karlsruhe). Die Ansätze wurden mit H<sub>2</sub>O auf 37,25 µl aufgefüllt und die Reaktion wurde durch Zugabe von 2,75 µl NHS-Biotin (in DMSO, EK: 10 mM) gestartet. Die Reaktionen wurden nach 5 min oder 30 min durch Zugabe von TRIS (EK: 100 mM, pH 7,5) gestoppt. Die Proben wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel mit Coomassie gefärbt und die Proteinbanden ausgestochen. Die Proben wurden dann für die MALDI-TOF-Analyse zum Zentrum für molekulare Medizin (ZMMK, Köln) geschickt.

### 2.12 *In vivo*-Lokalisierung von GgpS-GFP-Proteinen in *Bacillus subtilis*

Für die *in vivo*-Lokalisierung in *B. subtilis* wurden zunächst Plasmide kloniert, auf denen GgpS-GFP-Fusionsproteine kodiert sind. Dabei wurden sowohl Konstrukte für eine C-terminale (pSG1154-GgpS) als auch eine N-terminale (pSG1729-GgpS) Fusion des GFP hergestellt. Die Expression konnte durch die Zugabe von Xylose induziert werden. Mittels dieser Vektoren wurden Stämme von *B. subtilis* hergestellt, die das jeweilige Fusionsprotein exprimieren (1154-GgpS oder 1729-GgpS). Diese Stämme wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,1 in LB-Medium kultiviert, mit Xylose (EK: 1%) induziert und 1 h schüttelnd inkubiert. Die genomische DNA wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenyl-Indol, 1 µg/ml, Sigma-Aldrich, München). Die Lokalisierung der GgpS-GFP-Proteine konnte dann durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Dazu wurde ein Zeiss AxioImager M1 verwendet, der mit einer Zeiss AxioCam HRm-Kamera versehen war. Die GFP-Fluoreszenz wurde mit dem Filterset 38HE, eGFP gemessen, die DAPI Fluoreszenz mit dem Filterset 49. Bei den Versuchen wurden sowohl Zellen ohne Zugabe von NaCl als auch 5 min nach einem Salzschock von 2 M NaCl analysiert.

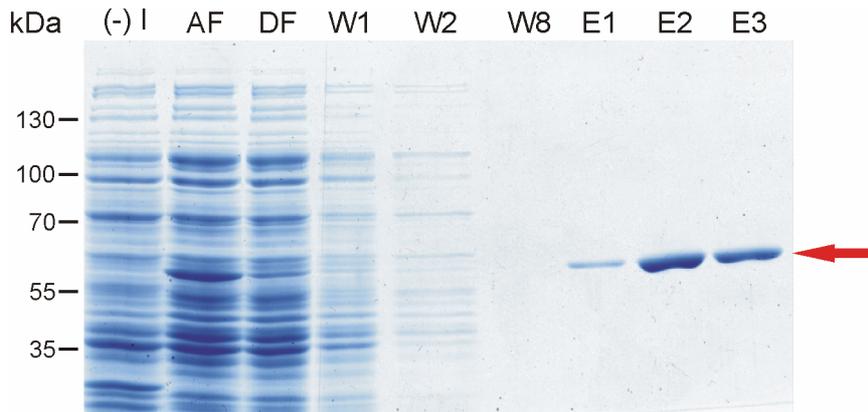
### 3. Ergebnisse

Während die einzelnen Komponenten von Osmolyt-synthetisierenden Systemen bereits in vielen Organismen identifiziert werden konnten, sind die Mechanismen ihrer Regulation bisher unverstanden. Im Falle von *Synechocystis* wird die Synthese des kompatiblen Solut GG durch die Glukosylglycerol-Phosphat-Synthase GgpS und einer Phosphatase, der GgpP, katalysiert, wobei die Regulation auf Ebene der GgpS stattfindet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die biochemische Regulation des GgpS-Proteins untersucht, um zu verstehen, wie die schnelle Antwort der Osmolytsynthese nach einem Salzschock als auch die *steady-state*-Anpassung bei längerfristig erhöhten Salzkonzentrationen verwirklicht ist.

#### 3.1 Optimierung der Versuchsbedingungen

##### 3.1.1 Optimierung der GgpS-Expression

Zur Durchführung von biochemischen Untersuchungen werden teilweise große Enzymmengen benötigt. Das Protein muss zusätzlich in einem hohen Reinheitsgrad vorliegen. Um dies im Falle der GgpS zu erreichen, mussten die Expressionsbedingungen optimiert werden. Dazu wurde zunächst anstelle von DH5 $\alpha$  mcr-Zellen der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) für die Produktion des rekombinanten Enzyms verwendet. Der Wechsel des Expressionsstamms hatte eine deutliche Steigerung der Expressionseffizienz zu Folge. Weiterhin wurde die Konzentration des Induktors AHT um den Faktor 10 auf 2  $\mu\text{g/ml}$  erhöht, was ebenfalls zu einer höheren Proteinausbeute führte. Letzlich konnte durch diese Änderungen eine Gesamtausbeute von 16 mg GgpS/l Kultur erreicht werden, was einer Steigerung um den Faktor 6 entspricht. (siehe Abbildung 3.1).



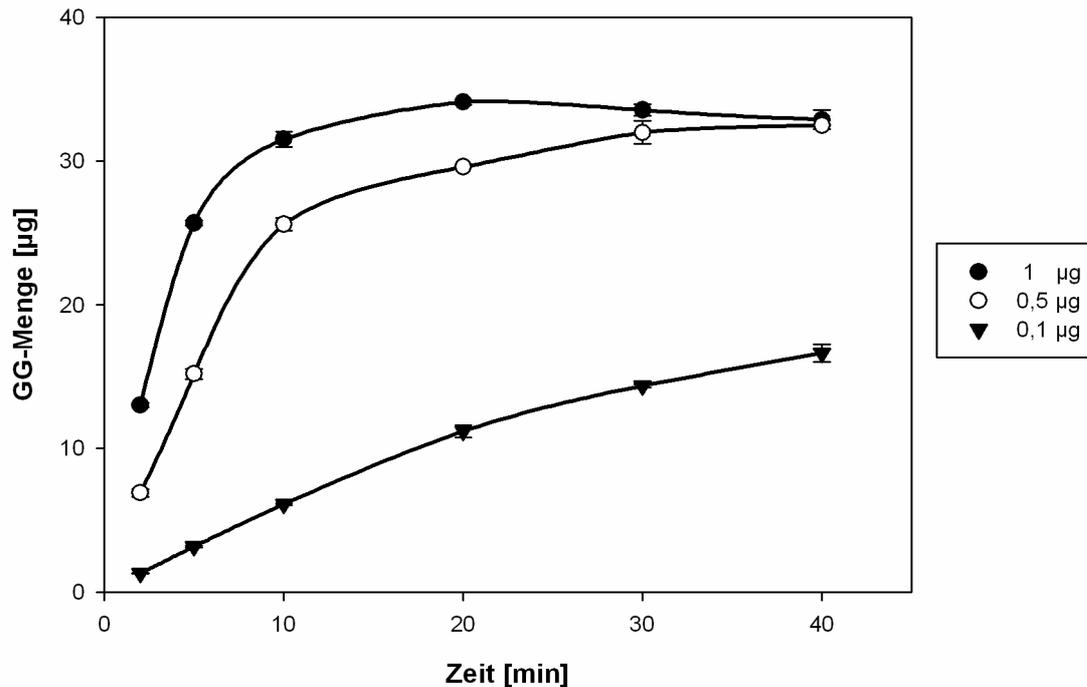
**Abbildung 3.1: Reinigung des GgpS-Proteins.**

Gezeigt ist das Coomassie-Blau-gefärbte SDS-Gel der Strep-Tactin-Reinigung des rekombinanten Strep-GgpS-Proteins (roter Pfeil). (-) I: Zellextrakt vor Induktion, AF: Säulenauftrag, DF: Durchflussfraktion, W1-2, Waschschrte 1-2, W8: letzter Waschschrte, E1-3: Elutionsfraktionen 1-3. Die Expression wurde in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) durchgeführt und die Reinigung erfolgte über eine Strep-Tactin-Matrix.

Nach der Induktion durch AHT kann eine deutliche Überexpressionsbande des GgpS-Proteins nachgewiesen werden (58 kDa, Spur AF). In der Durchflussfraktion (Spur DF) verschwindet diese Bande, was auf eine vollständige Bindung des rekombinanten Proteins an die Säulenmatrix hindeutet. Nach den Waschschrten konnte das Protein in apparenter Homogenität gereinigt werden (Spuren E1-E3, roter Pfeil). Das GgpS-Protein konnte nun in ausreichender Menge und Reinheit für die Durchführung von biochemischen Experimenten hergestellt werden. Zusätzlich wurden polyklonale Antikörper gegen das GgpS-Protein in Zusammenarbeit mit der Firma Eurogentec (Köln) hergestellt. Dabei wurden Kaninchen mit gereinigtem Protein immunisiert, bis eine ausreichende Konzentration der Antikörper im Blutplasma nachweisbar war (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.2 Optimierung der Enzymaktivitätstests

Um stabile Enzymaktivitäten und eine Reproduzierbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurde der Enzymtest zunächst optimiert. Da im Rahmen dieser Arbeit die GgpS-Aktivität in Bezug auf einen hemmenden Effekt von verschiedenen Substanzen untersucht werden sollte, würden solche Fehler eine Fehlbestimmung der inhibitorischen Wirkung zur Folge haben. Deshalb wurde zunächst der Einfluss der GgpS-Menge im Enzymtest untersucht. Dafür wurden GgpS-Mengen von 0,1  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$  und 1  $\mu\text{g}$  eingesetzt und das gebildete GG über einen Zeitraum von 0 - 40 min gemessen (siehe Abbildung 3.2).

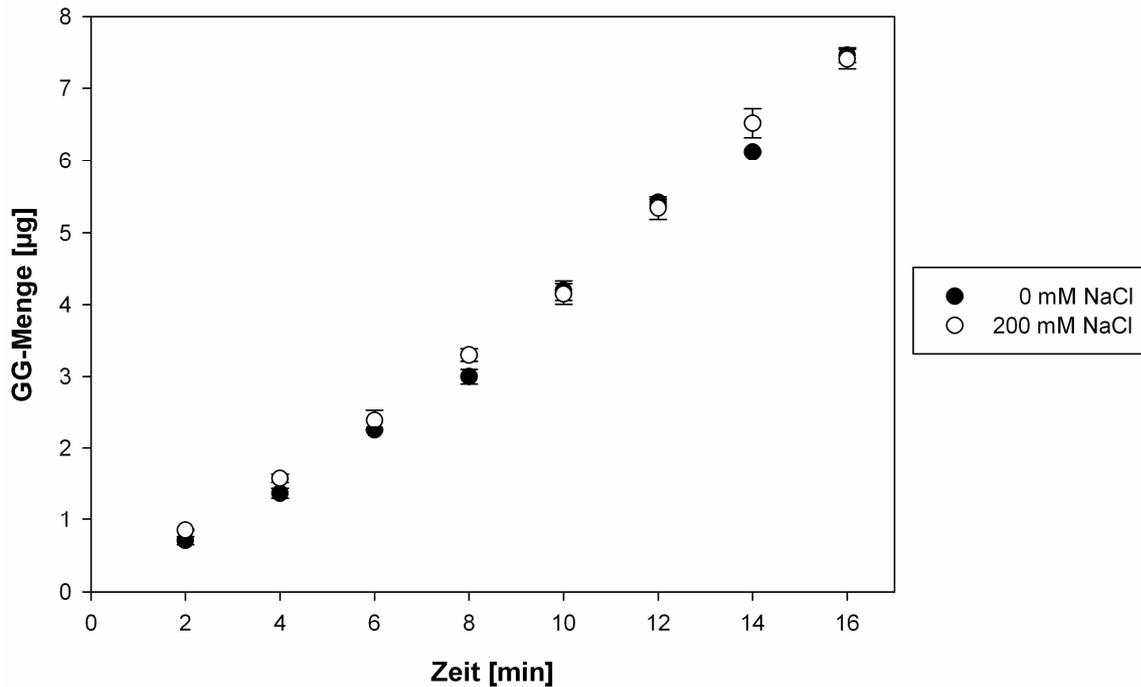


**Abbildung 3.2: Gebildetes GG-in Abhängigkeit von der GgpS-Menge und der Zeit.**

Gezeigt ist die im Enzymtest gebildete Menge an GG bei GgpS-Mengen von 1 µg (●), 0,5 µg (○) und 0,1 µg (▲) über einen Zeitraum von 40 min.

Es ist deutlich erkennbar, dass die Enzymaktivität bei einer Menge von 1 µg GgpS bereits nach ~ 5 min keinem linearen Verlauf mehr folgt. Auch bei einer Menge von 0,5 µg Protein ist die Aktivität lediglich bis zu einem Zeitpunkt von ca. 10 min linear. Lediglich bei einer GgpS-Menge von 0,1 µg ist eine Linearität der Aktivität über einen Zeitraum von mindestens 15 min gegeben. Zusätzlich wurde untersucht, ob die bisher verwendete Substratkonzentration von jeweils 3 mM ADP-Glukose und Glycerol-3-Phosphat für die Experimente geeignet war (Daten nicht gezeigt). Wie zuvor beschrieben, zeigte das GgpS-Enzym bei dieser Konzentration eine maximale Aktivität, höhere Konzentrationen hemmten die GG-Synthese (Schoor, 1996). Unter den optimierten Bedingungen ergeben sich GgpS-Aktivitäten von bis zu 700 nkatal/mg Protein, alle bisher veröffentlichten Aktivitäten lagen bei 60 - 80 nkatal/mg, dies entspricht einer zehnfachen Erhöhung. Die folgenden Daten der GgpS-Aktivität sind als prozentuale Werte angegeben, da die Enzymaktivitäten aufgrund von Ungenauigkeiten bei der Proteinbestimmung oder von verschiedenen Proteinpräparationen in einem Bereich von 300 - 700 nkatal/mg GgpS lagen. Dabei blieb die Regulation der GgpS jedoch unverändert.

Ein weiterer wichtiger Faktor für die nachfolgenden Experimente war die Stabilität der Enzymaktivität bei erhöhten Salzkonzentrationen. Dazu wurden Enzymtests mit 0,1 µg GgpS über einen Zeitraum von 16 min durchgeführt, die Ansätze enthielten dabei entweder kein NaCl oder es wurde eine NaCl-Konzentration von 200 mM eingestellt (siehe Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3: Gebildete GG-Menge in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration und der Zeit.**

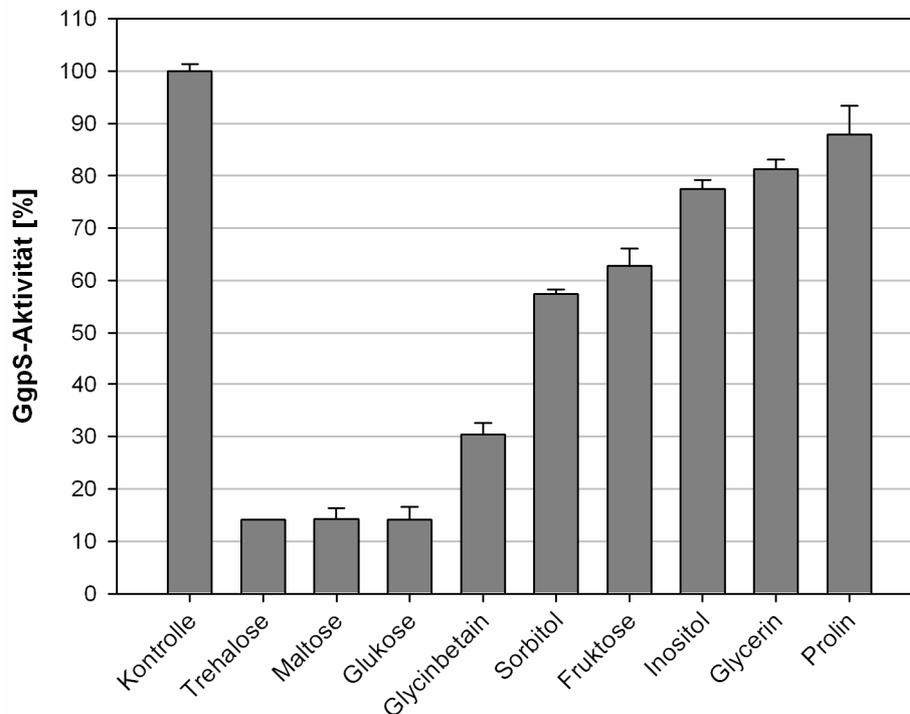
Gezeigt ist die im Enzymtest gebildete Menge an GG bei einer GgpS-Menge von 0,1 µg in Anwesenheit von 0 mM (●) bzw. 200 mM NaCl (○) über einen Zeitraum von 16 min.

Auch bei den optimierten Testbedingungen hatte die NaCl-Konzentration keinen Einfluss auf die gebildete GG-Menge. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Enzymtest für alle in dieser Arbeit gemessenen GgpS-Aktivitäten mit einer GgpS-Menge von 0,1 µg über einen Zeitraum von 10 - 12 min durchgeführt.

### 3.2 Regulation des GgpS-Proteins durch niedermolekulare Substanzen

Unter *steady-state*-Bedingungen muss die interne Osmolyt-Konzentration an die externe Salzkonzentration angepasst werden. Dazu ist eine genaue Modulierung der GgpS-Aktivität notwendig. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die Aktivität der GgpS durch erhöhte Konzentrationen des Endproduktes dieses Osmolytsyntheseweges, GG, inhibiert wird. Diese sogenannte Feedback- oder Endprodukt-Hemmung konnte durch Marit Stirnberg (2006) gezeigt werden. Im Falle des GgpS-Proteins konnte *in vitro* zusätzlich nachgewiesen werden, dass die durch GG ausgelöste Inhibition bei einer Erhöhung der NaCl-Konzentration aufgehoben wird. Um den molekularen Mechanismus dieser Inhibition besser zu verstehen, wurde untersucht, ob neben GG auch andere osmotisch aktive Substanzen eine vergleichbare Inhibition der GgpS-Aktivität bewirken. Neben den Zuckern Glukose, Fruktose, Maltose und Trehalose wurden die Polyole Sorbitol, Glycerol und Inositol untersucht. Außerdem wurden

die in vielen Organismen unter Salzstress akkumulierten kompatiblen Solute Prolin und Glycinbetain eingesetzt, die zu der Gruppe der Aminosäuren bzw. Aminosäurederivate gehören. In diesen Enzymtests wurde die Konzentration der jeweiligen Osmolyte auf 400 mM eingestellt und der Effekt auf die GgpS-Aktivität beobachtet (siehe Abbildung 3.4).



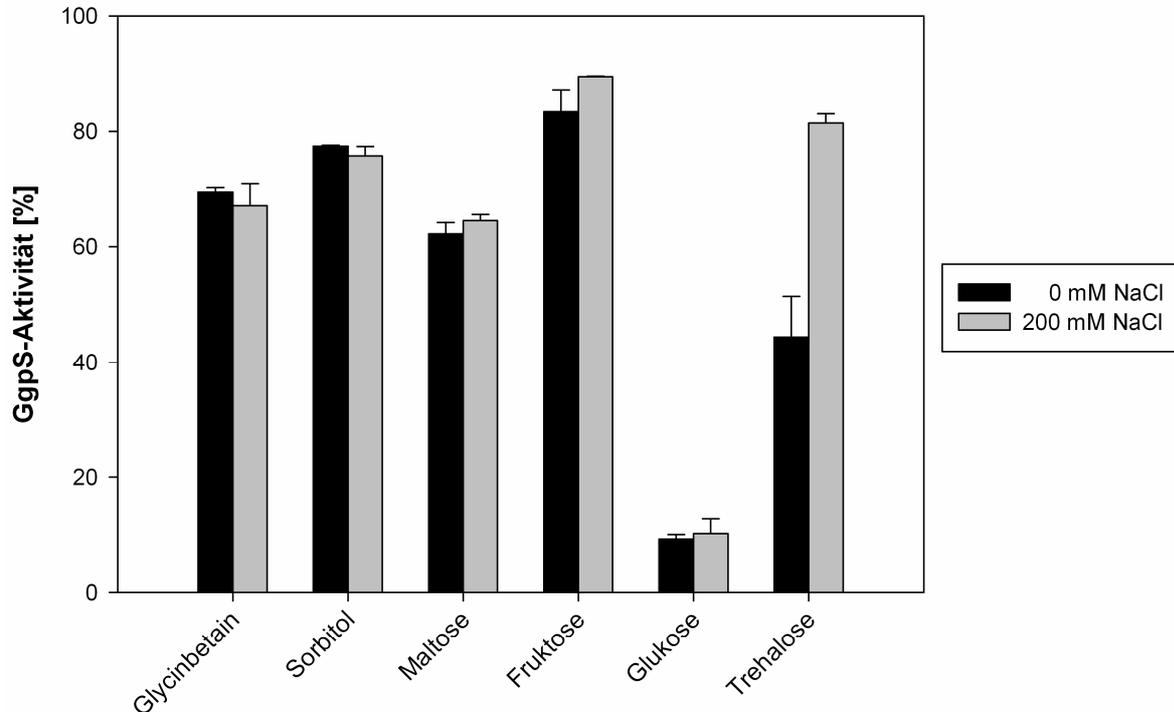
**Abbildung 3.4: Einfluss von verschiedenen Osmolyten auf die GgpS-Aktivität.**

Gezeigt ist die relative Aktivität der GgpS bei einer Osmolytkonzentration von 0 mM (Kontrolle) bzw. 400 mM. Untersucht wurden die Osmolyte Trehalose, Maltose, Glukose, Glycinbetain, Sorbitol, Fruktose, Inositol, Glycerin und Prolin.

Bei den untersuchten Osmolyten zeigten die Zucker Trehalose, Maltose und Glukose die stärkste Inhibition auf unter 20% der Gesamtaktivität, gefolgt von Glycinbetain mit 30% Hemmung. Eine mittlere Inhibition von 60% Restaktivität ließ sich bei Fruktose und Inositol beobachten. Glycerol und Prolin zeigten lediglich geringe hemmende Effekte. Diese Unterschiede in der inhibierenden Wirkung konnten dabei nicht auf die jeweiligen osmotischen Aktivitäten der verschiedenen Osmolyte zurückgeführt werden. Diese lagen in einem vergleichbaren Bereich von 0,4 - 0,48 Osmol/kg und korrelierten nicht mit den beobachteten Ergebnissen.

Im Weiteren wurde bei den am stärksten hemmenden Substanzen untersucht, ob die Inhibition des GgpS-Proteins durch eine Erhöhung der NaCl-Konzentration abgeschwächt oder aufgehoben werden kann. Dies würde auf einen Mechanismus hinweisen, der mit der NaCl-modulierten GG-Inhibition vergleichbar wäre. Dazu wurde im Enzymtest die Konzentration

von Glycinbetain, Sorbitol, Maltose, Fruktose, Glukose und Trehalose auf 200 mM eingestellt und eine Reaktivierung des GgpS-Proteins bei 200 mM NaCl untersucht (siehe Abbildung 3.5).

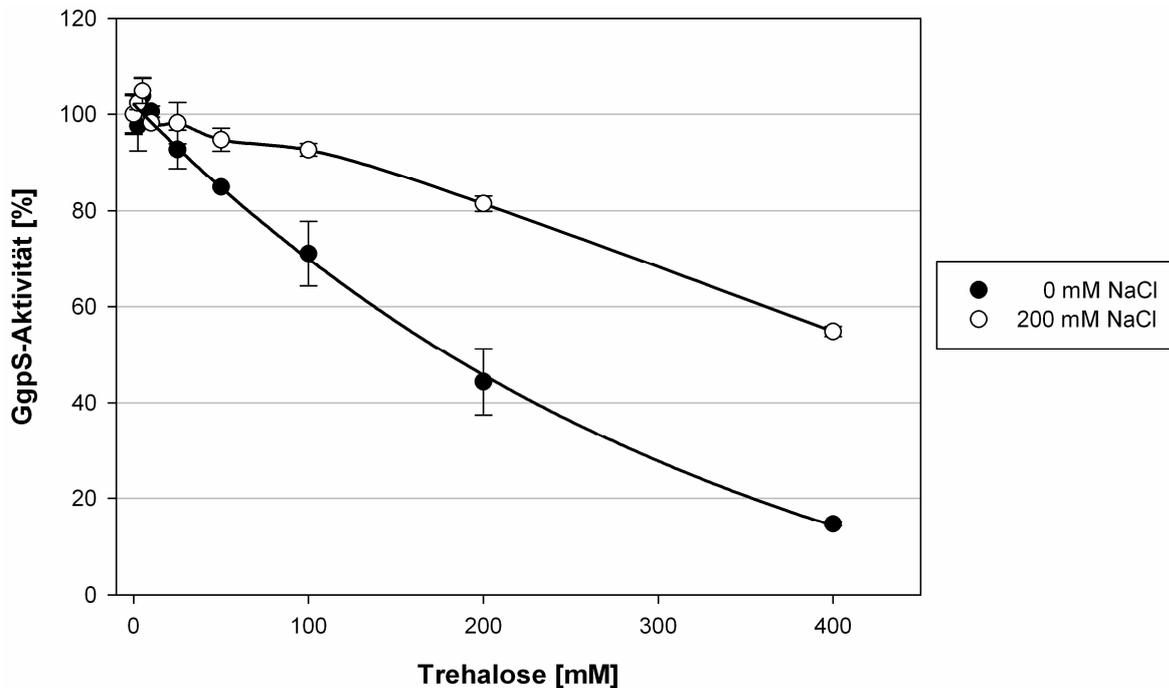


**Abbildung 3.5: Reaktivierung der GgpS-Aktivität durch NaCl.**

Gezeigt ist die relative Aktivität der GgpS bei einer Osmolytkonzentration von 200 mM in Anwesenheit von 0 mM oder 200 mM NaCl. Untersucht wurden die Osmolyte Glycinbetain, Sorbitol, Maltose, Fruktose, Glukose und Trehalose.

Diese Versuchsreihe verdeutlicht, dass lediglich bei der Inhibition durch Trehalose ein reaktivierender Effekt von NaCl auftritt. Die Hemmung aller anderen untersuchten Osmolyte ist unabhängig von der NaCl-Konzentration.

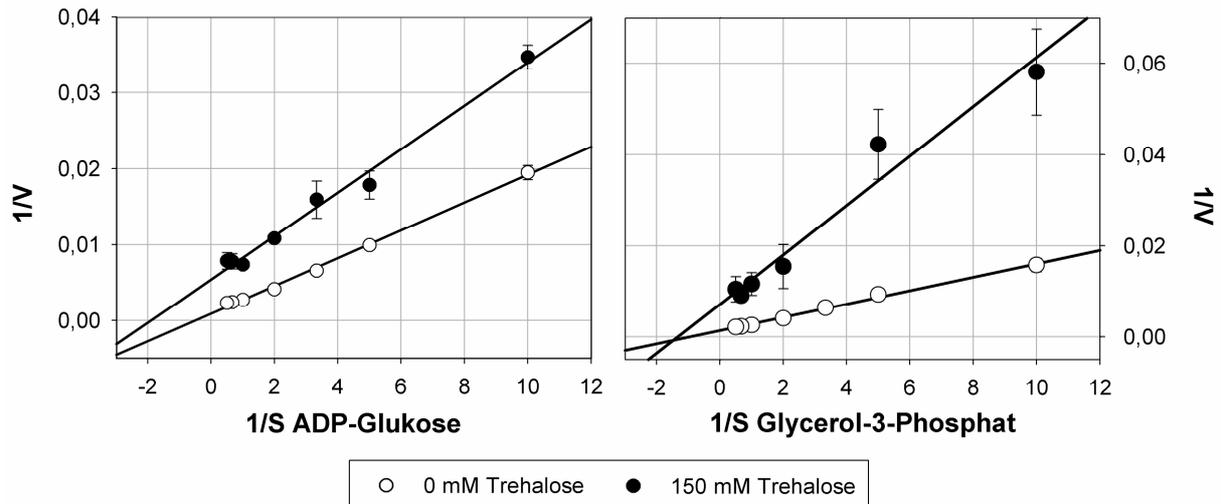
Im folgenden Versuch wurde die Hemmung des GgpS-Proteins durch Trehalose und die Reaktivierung durch NaCl näher charakterisiert. Dazu wurden Trehalose-Konzentrationen von 0 - 400 mM Trehalose eingesetzt, dieser Test wurde jeweils in An- oder Abwesenheit von 200 mM NaCl durchgeführt (siehe Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6: Einfluss von Trehalose auf die GgpS-Aktivität bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen.** Gezeigt ist die relative Aktivität der GgpS bei Zugabe von 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200 und 400 mM Trehalose. Dabei wurde die NaCl-Konzentration im Enzymtest auf 0 mM (●) oder 200 mM (○) eingestellt.

Hierbei zeigt die Hemmung durch Trehalose in Abwesenheit von NaCl einen dosisabhängigen Verlauf. Die halbmaximale Inhibition ( $K_i$ -Wert) wird bei ca. 200 mM Trehalose erreicht. In Anwesenheit von NaCl ist ebenfalls eine Abhängigkeit der GgpS-Aktivität von der Trehalosekonzentration erkennbar, jedoch ist hierbei die Hemmung signifikant geringer. Der  $K_i$ -Wert hat sich stark zu höheren Osmolytkonzentrationen auf über 400 mM verschoben.

Um zu untersuchen, ob die Feedback-Hemmung der GgpS einem kompetitiven Mechanismus folgt, wurden die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  für die beiden Substrate ADP-Glukose und Glycerol-3-Phosphat bestimmt. Dieses Experiment wurde in An- oder Abwesenheit von 150 mM Trehalose durchgeführt. Bei den Versuchen wurde die Konzentration des einen Substrates konstant gehalten und die Konzentration des anderen schrittweise erhöht. Anschließend wurden die Aktivitätsdaten in einem doppelt-reziproken Lineweaver-Burke-Diagramm dargestellt (siehe Abbildung 3.7). Im Falle einer kompetitiven Hemmung durch Trehalose sollte ein Anstieg der Substratkonzentration die hemmende Wirkung der Trehalose vermindern. Dabei würde sich der apparente  $K_m$ -Wert für das jeweilige Substrat ändern, die maximale Enzymaktivität ( $V_{max}$ ) sollte jedoch gleich bleiben.



**Abbildung 3.7: Bestimmung der kinetischen Parameter der GgpS in Anwesenheit von Trehalose.**

Gezeigt ist die doppelt reziproke Lineweaver-Burke-Auftragung der GgpS-Aktivitäten bei steigenden Konzentrationen von ADP-Glukose (links) und Glycerol-3-P (rechts). Dabei wurden die Aktivitäten ohne Trehalose (○) bzw. in Anwesenheit von 150 mM Trehalose (●) untersucht.

Berechnet man die kinetischen Parameter für ADP-Glukose, so ergibt sich für die Proben ohne Trehalose ein  $K_m$ -Wert von 2 mM und ein  $V_{max}$ -Wert von 1111 nkatal/mg GgpS. Bei der Versuchsreihe mit Trehalose konnten die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte zu 0,5 mM bzw. 185 nkatal/mg GgpS bestimmt werden. Beide Parameter ändern sich bei Trehalosezugabe, somit liegt keine Kompetition vor. Auch für das zweite Substrat Glycerol-3-Phosphat konnte dies nicht gezeigt werden. Bei den Messungen ohne Trehalose betrug der  $K_m$ -Wert 1,1 mM und der  $V_{max}$ -Wert 714 nkatal/mg GgpS. Auch hier ändern sich in Anwesenheit von Trehalose beide Parameter auf  $K_m=0,6$  mM und  $V_{max}=111$  nkatal/mg GgpS. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Hemmung der GgpS durch Trehalose keinem kompetitiven Mechanismus folgt. Die kinetischen Parameter für die GG-Inhibition konnten bisher nicht ermittelt werden, da unter den optimierten Testbedingungen die Nachweisgrenze für den dafür benötigten gekoppelten Enzymtest zur Bestimmung des freigesetzten ADP unterschritten wurde.

Die hemmenden Effekte der Osmolyte könnten durch eine Konformationsänderung des GgpS-Proteins verursacht werden. Dies wurde mittels limitierter Proteolyse untersucht. Dabei wurden die GgpS in Ansätzen ohne Glukose oder nach Zugabe von 200 mM Glukose mit Trypsin (EK: 20 µg/ml) verdaut. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen und das Abbaumuster mittels SDS-PAGE analysiert (Daten nicht gezeigt). Da sich in diesem Versuch keine Unterschiede bei dem Abbau des Proteins ergaben, konnte eine Konformationsänderung der GgpS in Anwesenheit von Glukose nicht bestätigt werden.

Das GgpS-Protein wird nicht nur durch GG inhibiert, sondern ebenfalls durch andere osmotisch wirksame Substanzen. Dabei hat die osmotische Aktivität keinen Einfluss auf die

hemmende Wirkung. Die stärkste Hemmung wird durch Glukose-haltige Zucker ausgelöst und im Falle von Trehalose nicht durch einen kompetitiven Mechanismus verursacht. Auch die Inhibition durch Trehalose wird durch NaCl moduliert und könnte durch den gleichen Mechanismus verursacht werden wie die Feedback-Hemmung durch GG. Eine Konformationsänderung in Anwesenheit von Glukose konnte nicht nachgewiesen werden.

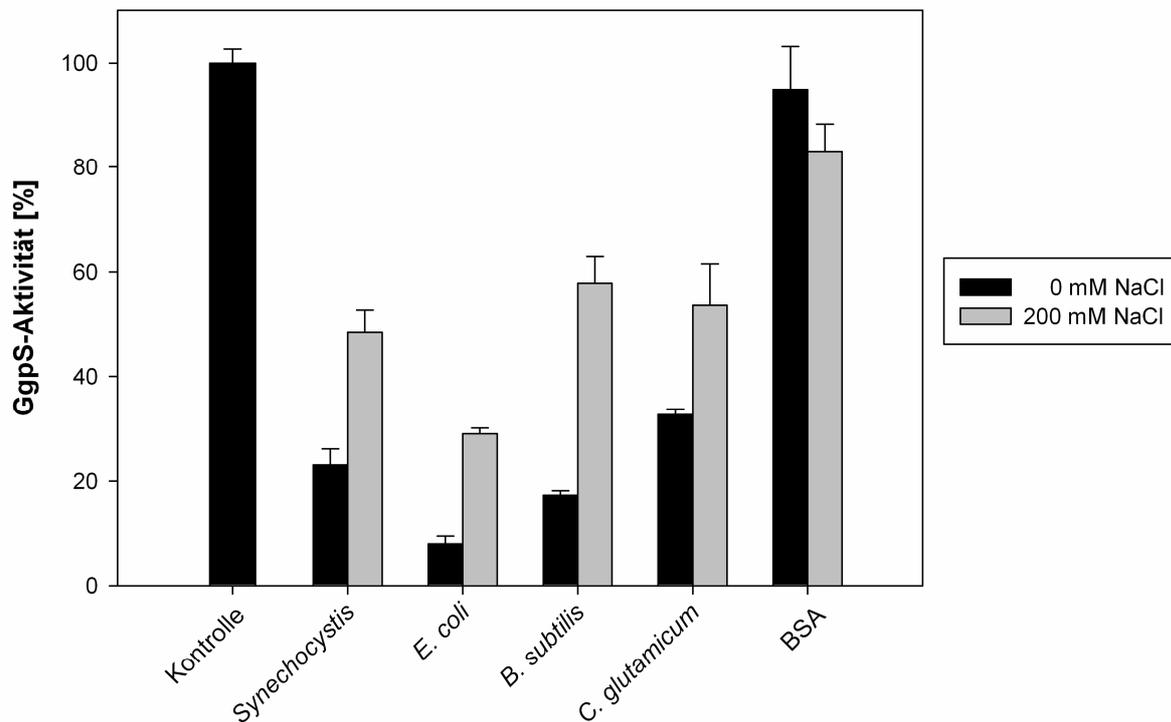
### 3.3 Regulation der GgpS durch einen unbekanntem Faktor im Zellextrakt

Das GgpS-Protein kann auch bei niedrigen Salzkonzentrationen in *Synechocystis*-Zellen nachgewiesen werden, ist jedoch nicht aktiv. Da unter diesen Bedingungen kein GG in den Zellen vorhanden ist, muss diese Inhibition durch einen anderen Faktor ausgelöst werden. Bei einer Erhöhung der Salzkonzentration wird das Enzym aktiviert und die GG-Synthese initialisiert. Dies konnte auch *in vitro* durch Zugabe von Gesamtzellextrakt gezeigt werden. Dabei löst der Zellextrakt eine starke Hemmung der GgpS-Aktivität aus, die durch Zugabe von NaCl aufgehoben werden kann. Es wurden Versuche unternommen, um einen inhibierenden Faktor aus dem Zellextrakt zu identifizieren. Dabei wurde angenommen, dass dieser Hemmung eine Interaktion mit einem regulatorischen Protein oder eine posttranslationale Modifikation der GgpS zugrunde liegt. Im Folgenden wird diese Hypothese widerlegt und die Identifikation und Charakterisierung dieses lange gesuchten Faktors beschrieben.

#### 3.3.1 Identifikation des inhibitorischen Faktors

Zur Identifikation des inhibitorischen Faktors aus dem Zellextrakt wurden zahlreiche Experimente im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführt. Dabei sind insbesondere die Versuche von Jana Huckauf (2003) zu nennen. Es wurde versucht, den Mechanismus der Inhibition in Anwesenheit von Zellextrakt durch detaillierte Untersuchungen des Phosphorylierungsstatus der GgpS aufzuklären. Weiterhin wurde unter anderem mittels Yeast-Two-Hybrid-Experimenten, einer Fraktionierung des Zellextraktes und Antikörper-Kopräzipitation versucht, ein mit der GgpS interagierendes Protein zu finden. Dieses Protein sollte dabei die Inhibition verursachen. Diese Experimente führten jedoch nicht zu der Identifikation des inhibitorischen Faktors. Da nicht bestätigt werden konnte, dass die vorliegende Inhibition durch ein Protein oder eine posttranslationale Modifikation der GgpS verursacht wird, wurden zunächst grundlegende Studien zur Identifikation der Natur des hemmenden Faktors durchgeführt.

In einem ersten Ansatz wurde untersucht, ob die Hemmung der GgpS nicht nur durch den *Synechocystis*-Zellextrakt, sondern auch durch Zellextrakte von anderen Mikroorganismen ausgelöst werden kann. Hierbei wurden die Zellextrakte von *Synechocystis*, *E. coli*, *B. subtilis* und *C. glutamicum* eingesetzt (siehe Abbildung 3.8). Es wurden unterschiedliche Mengen zugegeben, da bei der Herstellung der Zellextrakte verschiedene Proteinausbeuten erreicht wurden. Ebenfalls wurde eine Reaktivierung der GgpS durch 200 mM NaCl untersucht, um eine Vergleichbarkeit der Inhibition mit den zuvor beschriebenen Beobachtungen zu gewährleisten. Als Kontrolle wurde BSA anstelle des Extrakts zugegeben.



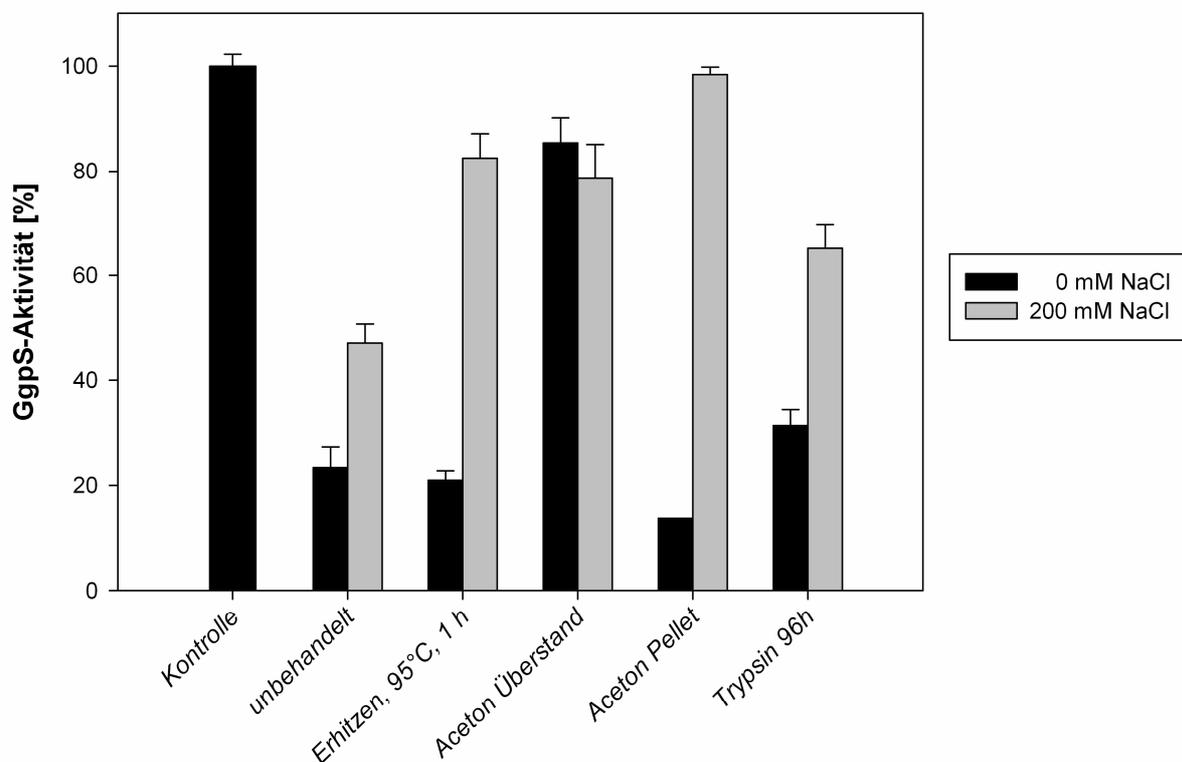
**Abbildung 3.8: Wirkung der Zellextrakte verschiedener Mikroorganismen auf die GgpS-Aktivität.**

Gezeigt ist die relative Aktivität der GgpS bei Zugabe verschiedener Zellextrakte in Abwesenheit von NaCl (schwarz) oder bei 200 mM NaCl (grau). Die zugegebenen Zellextraktmengen entsprechen 180 µg (*Synechocystis* und *E. coli*), 110 µg (*B. subtilis*) und 90 µg Protein (*C. glutamicum*). Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit Zugabe von 200 µg BSA gemessen.

Aufgrund der unterschiedlichen Mengen an eingesetztem Extrakt kann keine quantitative Aussage über die hemmende Wirkung getroffen werden. Dennoch wird deutlich, dass auch die Zellextrakte der anderen Mikroorganismen eine starke Inhibition der GgpS-Aktivität verursachen. Diese Hemmung wird nicht durch die alleinige Zugabe von Fremdprotein ausgelöst, da BSA keine Wirkung zeigt. Die Inhibition gleicht dem Effekt des *Synechocystis*-Zellextrakts, da auch hier eine Reaktivierung durch NaCl gezeigt werden kann. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass ein oder mehrere hemmende Faktoren auch in den Extrakten anderer Bakterienzellen vorhanden sein müssen. Es ist hierbei unwahrscheinlich, dass in allen

Organismen ein Protein vorkommt, das einen so starken Effekt auf die GgpS-Aktivität hat. Da diese Möglichkeit trotzdem in Betracht gezogen werden musste, wurde in weiteren Experimenten versucht, ein Protein als inhibitorischen Faktor zweifelsfrei auszuschließen. Dazu wurde der Zellextrakt verschiedenen Behandlungen unterzogen, um die enthaltenen Proteine vollständig zu entfernen. Für diese Ansätze wurde der Zellextrakt von *E. coli* verwendet, da dieser die stärkste Inhibition zeigte und in großen Mengen leicht verfügbar war.

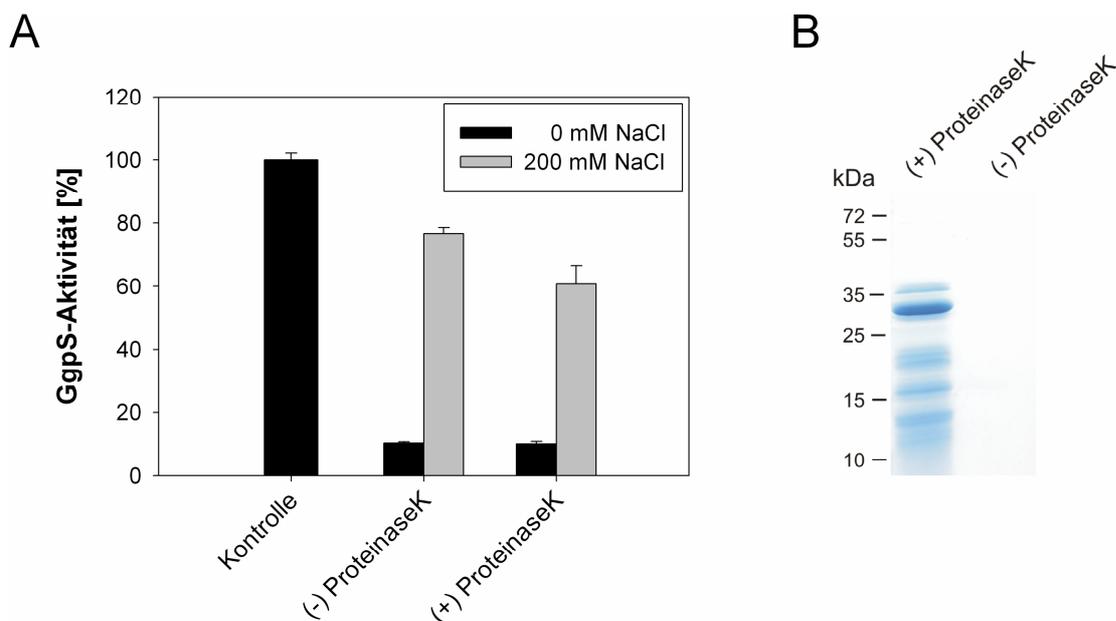
Zunächst wurde untersucht, ob die Inhibition durch das Erhitzen des Zellextrakts auf 95°C aufgehoben werden kann. Dadurch sollte ein Großteil der Proteine aggregieren und durch Zentrifugation entfernt werden können. Weiterhin wurde der gekochte Extrakt mit Aceton behandelt, um Proteine vollständig auszufällen. Untersucht wurden dabei nach Abdampfen des Acetons sowohl die Substanzen im Pellet als auch im Überstand. Ausserdem wurde der gekochte Zellextrakt 96 h mit Trypsin inkubiert, um die restlichen Proteine durch Abbau zu entfernen. Diese vorbehandelten Extrakte (je 200 µg Proteinmenge vor dem Erhitzen) wurden anschließend in Ab- oder Anwesenheit von 200 mM NaCl im Enzymtest eingesetzt (siehe Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9: Einfluss des unterschiedlich behandelten Zellextrakts auf die GgpS-Aktivität.**

Gezeigt ist die relative Aktivität der GgpS bei Zugabe von unterschiedlich behandeltem *E. coli*-Zellextrakt in Abwesenheit (schwarz) oder nach Zugabe von 200 mM NaCl (grau). Eingesetzt wurde jeweils Zellextrakt, der vor der Behandlung 200 µg Protein enthielt. Alle Zellextraktproben bis auf die unbehandelte wurden vor der Behandlung für 1 h auf 95°C erhitzt.

Das Erhitzen des Zellextraktes zeigt keinen deutlichen Effekt auf die GgpS-Inhibition. Es ist jedoch erkennbar, dass sich die GgpS bei dieser Probe auf ~80% reaktivieren ließ. Die Reaktivierung bei unbehandeltem Zellextrakt betrug lediglich ~50%. Durch das Erhitzen wurden die meisten Proteine gefällt, eine Proteinbestimmung zeigte jedoch, dass 7% der Proteine hitzestabil waren und sich nicht entfernen ließen. Auch die Acetonfällung hat Auswirkungen auf den Zellextrakt. Bei der Untersuchung des Acetonüberstandes lässt sich lediglich eine geringe Hemmung beobachten. Der inhibitorische Faktor lässt sich also durch Aceton ausfällen, da das in Enzymtestpuffer aufgenommene Pellet die beschriebenen Hemmungs- und Reaktivierungscharakteristika zeigt. Der Trypsinverdau hatte keinen signifikanten Einfluss auf den hemmenden Effekt des Zellextraktes. Durch die Inkubation mit Trypsin wurde der Proteingehalt von 7% nach dem Erhitzen zusätzlich auf 1,3% verringert, der Gesamtansatz enthielt also noch 2,6 µg *E. coli*-Proteine. Der putative inhibitorische Faktor ist also hitzestabil, lässt sich nicht durch einen Trypsinverdau entfernen und übersteht eine Fällung durch Aceton unbeschadet. Auch diese Ergebnisse sprechen ebenso wie die Hemmung durch die verschiedenen Zellextrakte gegen ein Protein als inhibitorischen Faktor. Da aber alle Ansätze nicht in der Lage waren, alle Proteine aus dem Zellextrakt zu entfernen, wurde ein zusätzlicher Test mit gekochtem Zellextrakt durchgeführt, der mit ProteinaseK behandelt wurde. Diese Protease ist sowohl endo- als auch exoproteolytisch wirksam und sollte alle Proteine entfernen können.



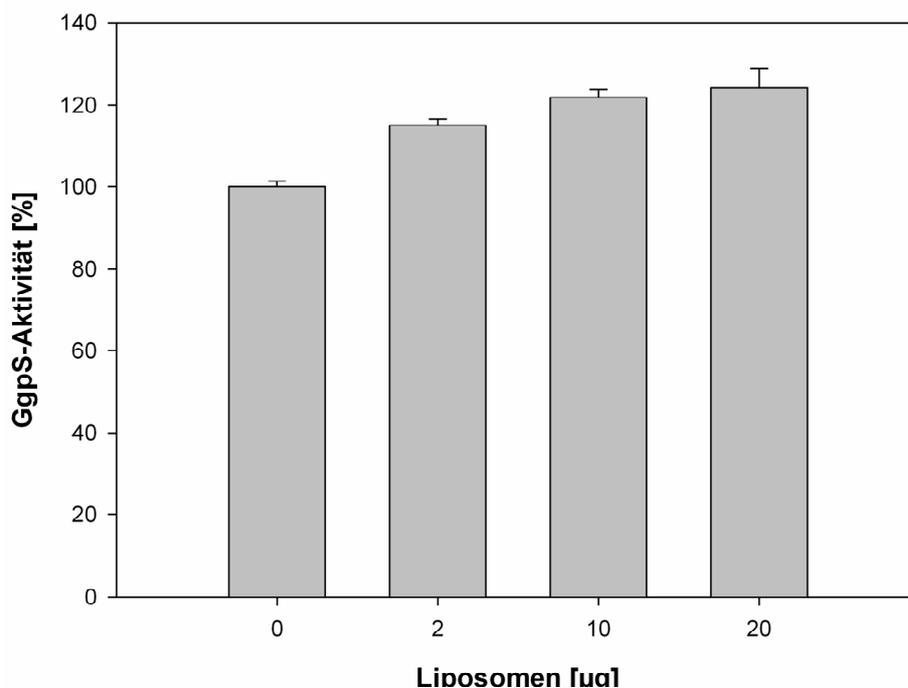
**Abbildung 3.10: Wirkung von mit ProteinaseK behandeltem Zellextrakt auf die GgpS-Aktivität.**

**A:** Gezeigt ist die relative Aktivität der GgpS bei Zugabe von *E. coli*-Zellextrakt, der nicht oder 24 h mit ProteinaseK inkubiert wurde. Dies fand jeweils in Abwesenheit von NaCl (schwarz) oder bei einer NaCl-Konzentration von 200 mM NaCl statt (grau). Eingesetzt wurde jeweils Zellextrakt, der vor dem Erhitzen 200 µg Protein enthielt. **B:** SDS-Gel der Zellextraktproben, die nicht oder 24 h mit ProteinaseK behandelt wurden.

Auch nach Inkubation mit ProteinaseK übt der Zellextrakt eine unverminderte Hemmung auf die GgpS-Aktivität aus (siehe Abbildung 3.10, A). Dabei konnte durch Proteinbestimmungen (Daten nicht gezeigt) und einer SDS-PAGE-Analyse (siehe Abbildung 3.10, B) nachgewiesen werden, dass jegliche proteinogenen Bestandteile des Zellextraktes entfernt werden konnten. Ein Protein als inhibitorischer Faktor kann somit ausgeschlossen werden.

Nachdem die ursprüngliche Hypothese bezüglich einer GgpS-Regulation durch ein Protein widerlegt werden konnte, wurden zusätzliche Experimente durchgeführt, um die Größe des hemmenden Faktors näher einzugrenzen. Zunächst wurde untersucht, ob die Entsalzung des Zellextraktes über die PD-10-Säule (Größenausschluss 5 kDa) einen Effekt auf die Inhibition der GgpS hat (Daten nicht gezeigt). Dies war nicht der Fall. Der Inhibitor muss dementsprechend ein höhermolekularer Bestandteil sein und somit können Substanzen wie Osmolyte oder Ionen ausgeschlossen werden.

Neben den Proteinen enthält der Zellextrakt nach dem Aufschluss noch weitere Bestandteile der Zelle. Insbesondere Membranfragmente sind in großen Mengen vorhanden. Die Interaktion mit diesen Komponenten könnte eine Hemmung der GgpS auslösen. Um dies zu untersuchen, wurden aus *E. coli*-Phospholipiden (Avanti, Alabaster, USA) hergestellte Liposomen im Enzymtest eingesetzt (siehe Abbildung 3.11).

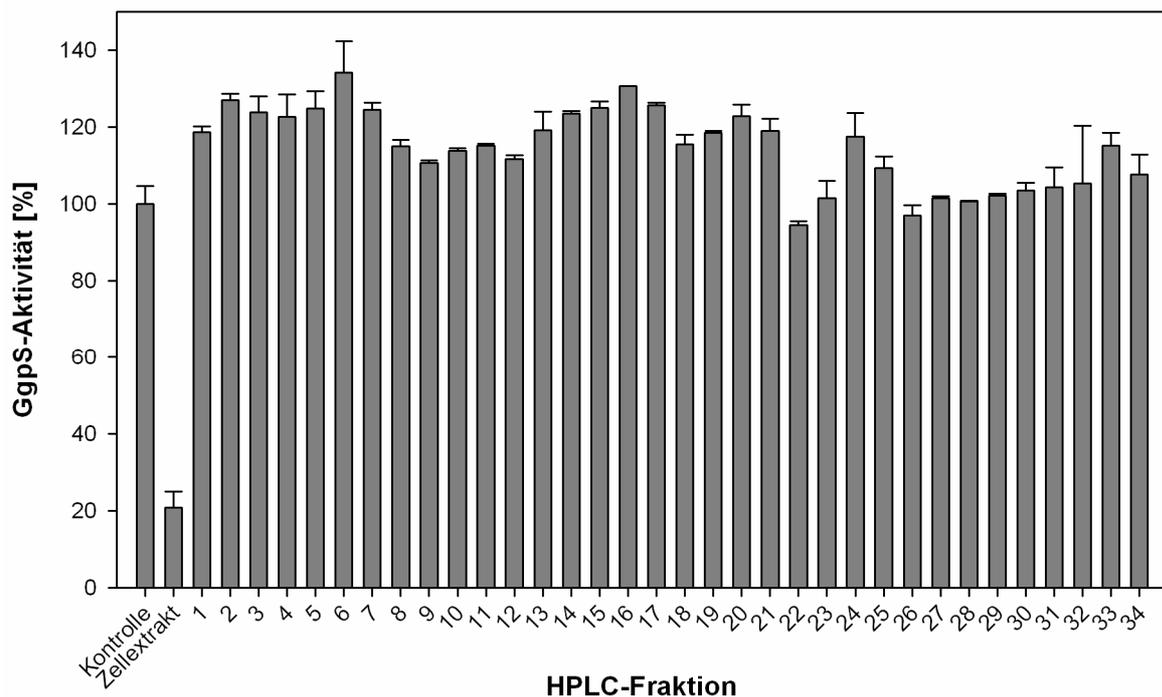


**Abbildung 3.11: Einfluss von Liposomen auf die GgpS-Aktivität.**

Gezeigt ist die relative GgpS-Aktivität in Anwesenheit von 0 µg, 2 µg, 10 µg und 20 µg Liposomen aus *E. coli*-Lipiden.

Es wird deutlich, dass die Liposomen auch in höheren Mengen keinen inhibierenden Einfluss auf die GgpS-Aktivität haben, die Aktivität steigt sogar geringfügig an. Damit können auch Membranbestandteile als inhibierender Faktor ausgeschlossen werden.

Da der Zellextrakt vermutlich eine Vielzahl an Substanzen enthält, wurde im folgenden Experiment versucht, den Zellextrakt mittels HPLC aufzutrennen und die verschiedenen Fraktionen auf den hemmenden Faktor hin zu untersuchen. Die Bestandteile der hemmenden Fraktionen sollten anschließend durch gekoppelte Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Studien (LC/MS) identifiziert werden. Die Fraktionen wurden im Enzymtest eingesetzt und auf eine inhibitorische Wirkung hin untersucht (siehe Abbildung 3.12). Eine durch die Methode verursachte starke Verdünnung des Zellextraktes konnte hierbei ausgeschlossen werden, da die Fraktionen nach der Auftrennung abgedampft und die Proben im eingesetzten Volumen aufgenommen wurden. Auch das Eindampfen hatte keinen Effekt auf die inhibitorische Wirkung des Faktors, wie bei der Acetonfällung gezeigt werden konnte.

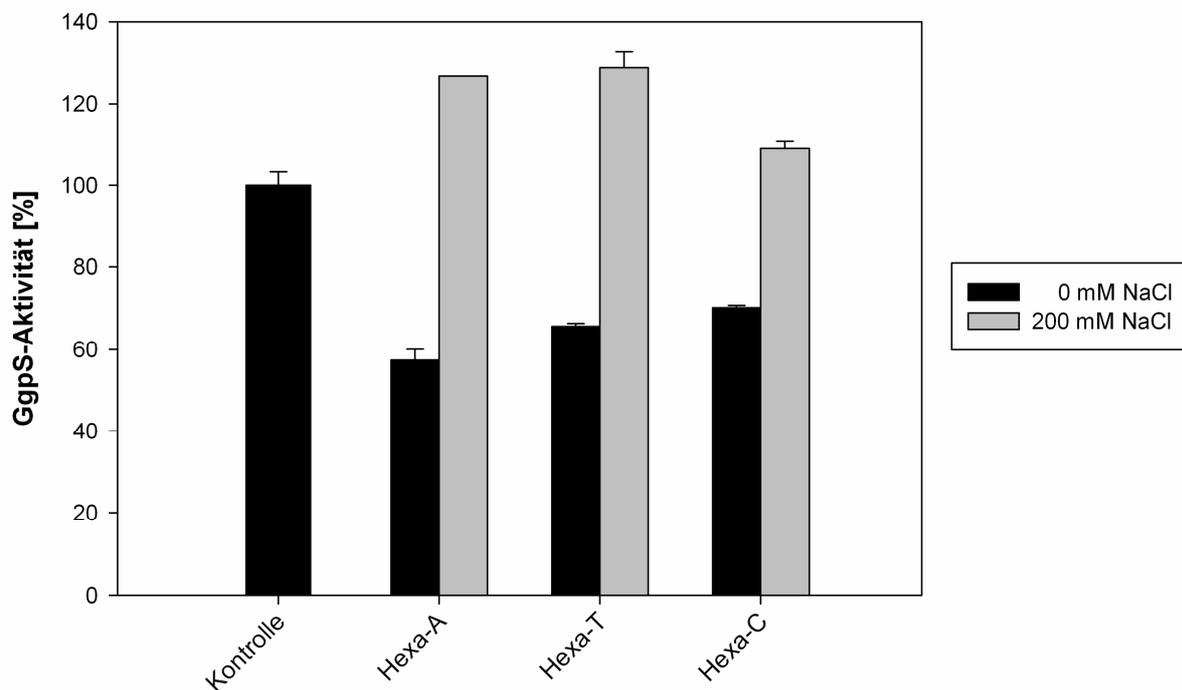


**Abbildung 3.12: Wirkung von mittels HPLC aufgetrenntem Zellextrakt auf die GgpS-Aktivität.** Gezeigt ist die relative GgpS-Aktivität ohne Zugabe (Kontrolle) von *E. coli*-Zellextrakt, in Anwesenheit von 200 µg Zellextrakt und nach Zugabe eines entsprechenden Volumens der HPLC-Fractionen 1-34.

Bei Betrachtung der Versuchsreihe ist klar erkennbar, dass keine der untersuchten Fraktionen eine Hemmung der GgpS-Aktivität auslöst. Während der Trennung des Zellextraktes muss der inhibitorische Faktor also entweder zerstört oder so stark verdünnt worden sein, dass keine Hemmung mehr messbar war. Eine starke Verdünnung könnte durch das

Vorhandensein von mehreren Faktoren erklärt werden, die bei der HPLC-Auftrennung ein unterschiedliches Retardierungsmuster zeigen. Nach dem Ausschluss von niedermolekularen Substanzen, Proteinen und Membranbestandteilen als inhibitorische Faktoren konnten nun lediglich Nukleinsäuren in Frage kommen. Der beschriebene Effekt könnte durch Oligonukleotide erklärt werden, die bei dem Verdau der genomischen DNA durch DNaseI entstanden wären. Bei einem unvollständigen Abbau könnten DNA-Fragmente entstanden sein, die groß genug sind, um bei der Trennung über die PD10-Säule nicht abgetrennt zu werden. Weiterhin würden diese Fragmente aufgrund ihrer verschiedenen Größen und einer unterschiedlichen Basenzusammensetzung in einer HPLC-Auftrennung ein variables Laufverhalten zeigen und somit stark verdünnt werden. Dies ist ebenso für RNA denkbar.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden Oligonukleotide bestehend aus Hexameren von Adenin-, Thymin- oder Cytosin-Nukleotiden im Enzymtest eingesetzt. Dabei wurde eine Nukleotid-Konzentration von 4 mM eingestellt und zusätzlich die Reaktivierung der GgpS bei 200 mM NaCl untersucht (siehe Abbildung 3.13).



**Abbildung 3.13: Einfluss von Hexanucleotiden auf die GgpS-Aktivität.**

Gezeigt ist die relative GgpS-Aktivität nach Zugabe von 4 mM der Oligonucleotide Hexa-A, Hexa-T oder Hexa-C in Abwesenheit (schwarz) oder nach Zugabe von 200 mM NaCl (grau).

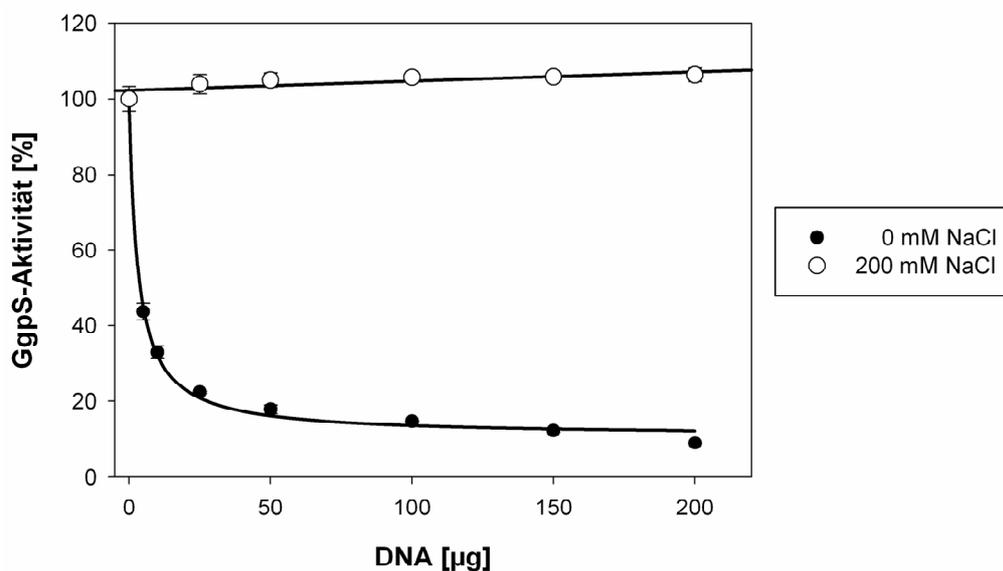
Wie man klar erkennen kann, lösen alle Hexanucleotide eine Inhibition der GgpS auf 60 - 70% Restaktivität aus. Dabei scheint keine Sequenzspezifität vorzuliegen, da alle Nucleotide einen vergleichbaren Effekt zeigen. Die Hemmung kann durch Zugabe von 200 mM NaCl

aufgehoben werden. Damit zeigt die Hemmung durch Oligonukleotide die gleichen Charakteristika wie die Inhibition durch den Zellextrakt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration des gekochten Zellextrakts durchgeführt, dieser enthielt ca. 1,5 µg Nukleinsäuren/µl.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Zellextrakt-Hemmung des GgpS-Proteins durch die enthaltenen Nukleinsäuren ausgelöst wird. Im Folgenden wird die Inhibition durch Nukleinsäuren weitergehend charakterisiert.

### 3.3.2 Charakterisierung der Inhibition der GgpS durch Nukleinsäuren und Polyanionen

Bei dem hemmenden Faktor des Zellextraktes um Nukleinsäuren handelt es sich um Nukleinsäuren. Im Folgenden wurde diese Inhibition der GgpS näher untersucht. Dazu wurde zunächst die Hemmung der GgpS-Aktivität in Abhängigkeit von der DNA-Menge bestimmt. Für dieses und die folgenden Experimente wurde Lachssperma-DNA (Sigma-Aldrich) eingesetzt, die nach Ultraschallbehandlung in Fragmentgrößen von 800 - 1200 Bp vorlag. Es wurden DNA-Mengen von 5 - 200 µg eingesetzt und zusätzlich der Einfluss von 200 mM NaCl untersucht (siehe Abbildung 3.14).



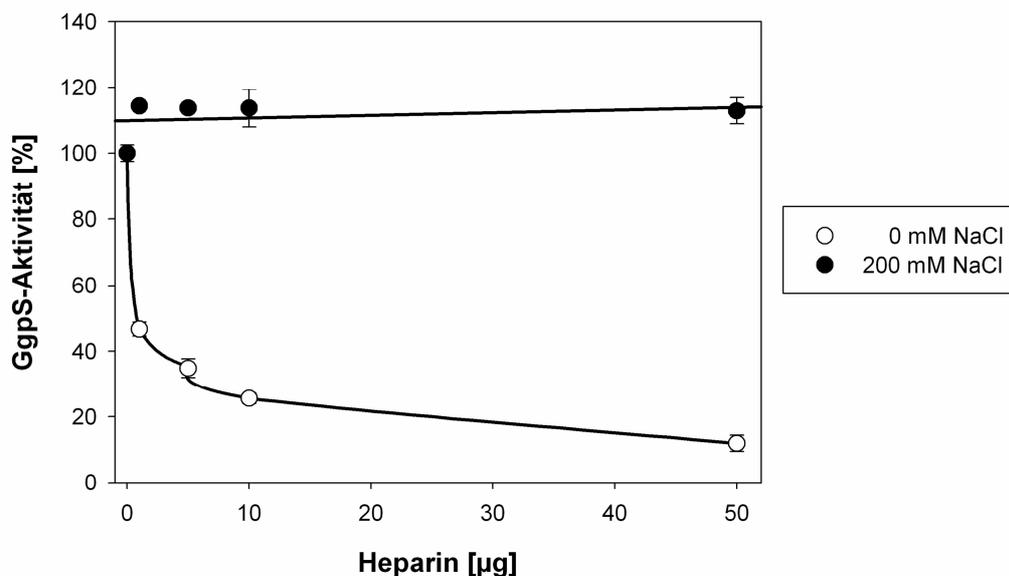
**Abbildung 3.14: Einfluss von Lachssperma-DNA auf die GgpS-Aktivität.**

Gezeigt ist die relative GgpS-Aktivität in Abhängigkeit von der DNA-Menge. Die Graphen zeigen die GgpS-Aktivität in Abwesenheit (●) und bei Zugabe von 200 mM NaCl (○). Es wurden DNA-Mengen von 5 - 200 µg eingesetzt.

Auch die verwendete Lachssperma-DNA verursacht eine starke Inhibition der GgpS-Aktivität. Dabei folgt die Inhibition einem dosisabhängigen Verlauf mit einem  $K_i$ -Wert von ca. 4 µg. In Anwesenheit von 200 mM NaCl kann dieser Effekt vollständig aufgehoben werden. Die

Größe der Fragmente spielt dabei keine Rolle, da auch mit DnaseI behandelte Lachssperma-DNA vergleichbare Effekte zeigte (Daten nicht gezeigt).

Um den zugrundeliegenden Mechanismus der Hemmung der GgpS-Aktivität durch DNA aufzuklären, wurden weitere Experimente durchgeführt. DNA ist ein Polyanion, dessen Aufbau durch bestimmte Charakteristika gekennzeichnet ist. Hierbei könnte die Hemmung der GgpS entweder durch eine Interaktion mit einem bestimmten Sequenzmotiv von Nukleinsäuren oder mit dem negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrat verursacht werden. Um dies näher zu bestimmen, wurde der Effekt von Heparin auf die GgpS-Aktivität untersucht. Heparin ist ein helikales Polyanion, das aus negativ geladenen Glukosaminen und Glukuronsäuren zusammengesetzt ist. Das Polysaccharid ähnelt somit in Bezug auf die Struktur und die Ladungsverteilung dem DNA-Rückgrat. Im folgenden Versuch wurde der Einfluss von 1 - 50  $\mu\text{g}$  Heparin auf die GgpS-Aktivität in An- oder Abwesenheit von 200 mM NaCl untersucht (siehe Abbildung 3.15).

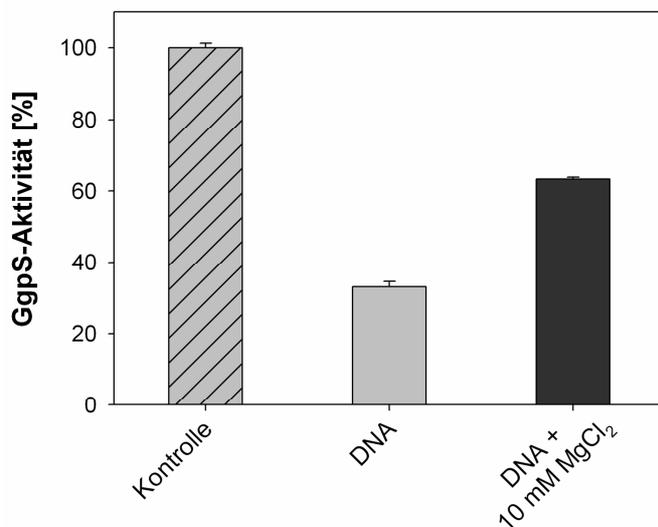


**Abbildung 3.15: Einfluss von Heparin auf die GgpS-Aktivität.**

Gezeigt ist die relative GgpS-Aktivität in Abhängigkeit von der Heparin-Menge ohne Zugabe von NaCl ( $\circ$ ) oder in Anwesenheit von 200 mM NaCl ( $\bullet$ ). Es wurden Heparin-Mengen von 1 - 50  $\mu\text{g}$  eingesetzt.

Es wird deutlich, dass Heparin eine dosisabhängige Inhibition der GgpS-Aktivität verursacht. Dabei wird eine halbmaximale Hemmung bereits bei ca. 1  $\mu\text{g}$  Heparin erreicht. In Anwesenheit von 200 mM NaCl wird die GgpS-Aktivität vollständig wiederhergestellt. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit der Inhibition durch DNA und könnte durch den gleichen Mechanismus ausgelöst werden.

Da sowohl DNA als auch Heparin eine stark negative Ladung tragen, könnte die beobachtete Inhibition auch dadurch ausgelöst werden, dass diese Moleküle die im Enzymtest enthaltenen  $Mg^{2+}$ -Ionen binden und deren Verfügbarkeit verringern. Das GgpS-Enzym benötigt eine Konzentration von 10 mM  $Mg^{2+}$ -Ionen für eine optimale Aktivität (Schoor, 1996). Geht man davon aus, dass die DNA im Enzymtest die vorhandenen  $Mg^{2+}$ -Ionen bindet, sollten bei einer DNA-Menge, die keine vollständige Hemmung der GgpS auslöst, immer noch freie Ionen verfügbar sein. Die Bindekapazität der DNA für  $Mg^{2+}$ -Ionen sollte dann jedoch gesättigt sein. Eine Verdopplung der  $MgCl_2$ -Menge im Assay von 10 mM auf 20 mM würde dann eine  $Mg^{2+}$ -Konzentration von über 10 mM sicherstellen. Wenn nun die vollständige Aktivität der GgpS nicht wiederhergestellt wird, kann die Wirkung der DNA nicht auf einem Mangel an  $Mg^{2+}$ -Ionen beruhen. Im folgenden Versuch wurde getestet, ob bei einer DNA-Menge von 10  $\mu g$  eine vollständige Reaktivierung der GgpS durch Zugabe von 10 mM  $MgCl_2$  (EK: 20 mM im Test) erreicht werden kann (siehe Abbildung 3.16).



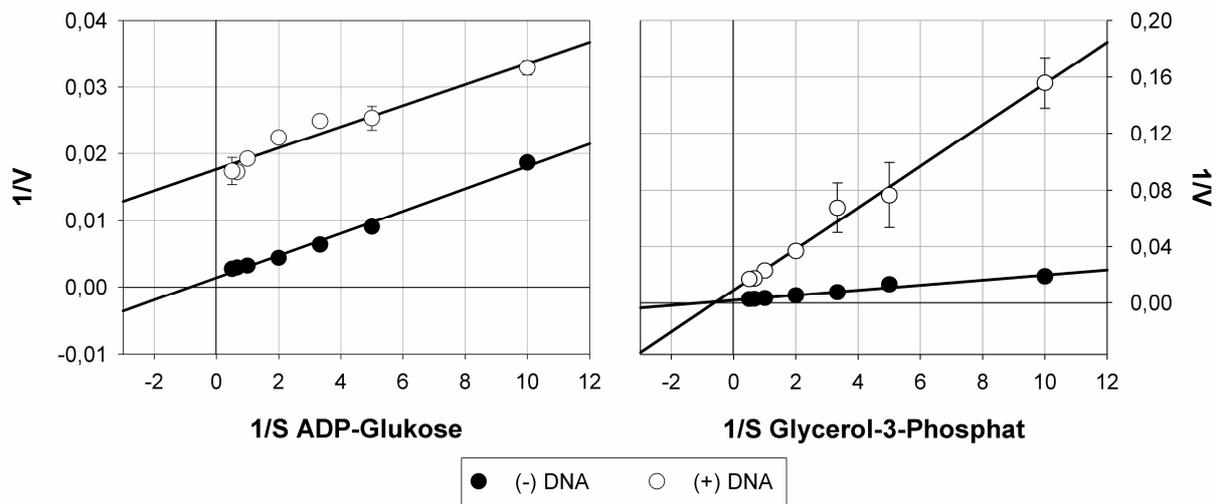
**Abbildung 3.16: Einfluss der  $Mg^{2+}$ -Verfügbarkeit auf die GgpS-Inhibition durch DNA.**

Gezeigt ist die GgpS-Aktivität bei einer Inhibition durch 10  $\mu g$  DNA in Abwesenheit (grau) oder bei Zugabe von 10 mM  $MgCl_2$  (EK: 20 mM im Test, schwarz). Die Kontrolle ist grau-gestreift dargestellt.

In diesem Versuch konnte eine Verdopplung der  $MgCl_2$ -Konzentration keine vollständige Reaktivierung der GgpS bei der Inhibition durch DNA bewirken. Die Hemmung wird durch  $MgCl_2$  zwar abgeschwächt, dies wird jedoch vermutlich durch einen unspezifischen reaktivierenden Effekt der zugegebenen Ionen verursacht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Verfügbarkeit von  $Mg^{2+}$ -Ionen bei der Inhibition der GgpS durch DNA keine massgebliche Rolle spielt.

Nachdem ein Einfluss der  $Mg^{2+}$ -Ionenkonzentration ausgeschlossen werden konnte, wurde untersucht, ob eine kompetitive Hemmung durch DNA am aktiven Zentrum des GgpS-Enzyms

vorliegt. Dazu wurde die Enzymaktivität in Ab- oder Anwesenheit von 2  $\mu\text{g}$  DNA bei einer steigenden Substratkonzentration gemessen. Dieses wurde für die beiden Substrate ADP-Glukose und Glycerol-3-P durchgeführt, die Enzymaktivitäten wurden anschließend in der doppelt reziproken Lineweaver-Burke-Auftragung ausgewertet und die kinetischen Parameter bestimmt (siehe Abbildung 3.17).



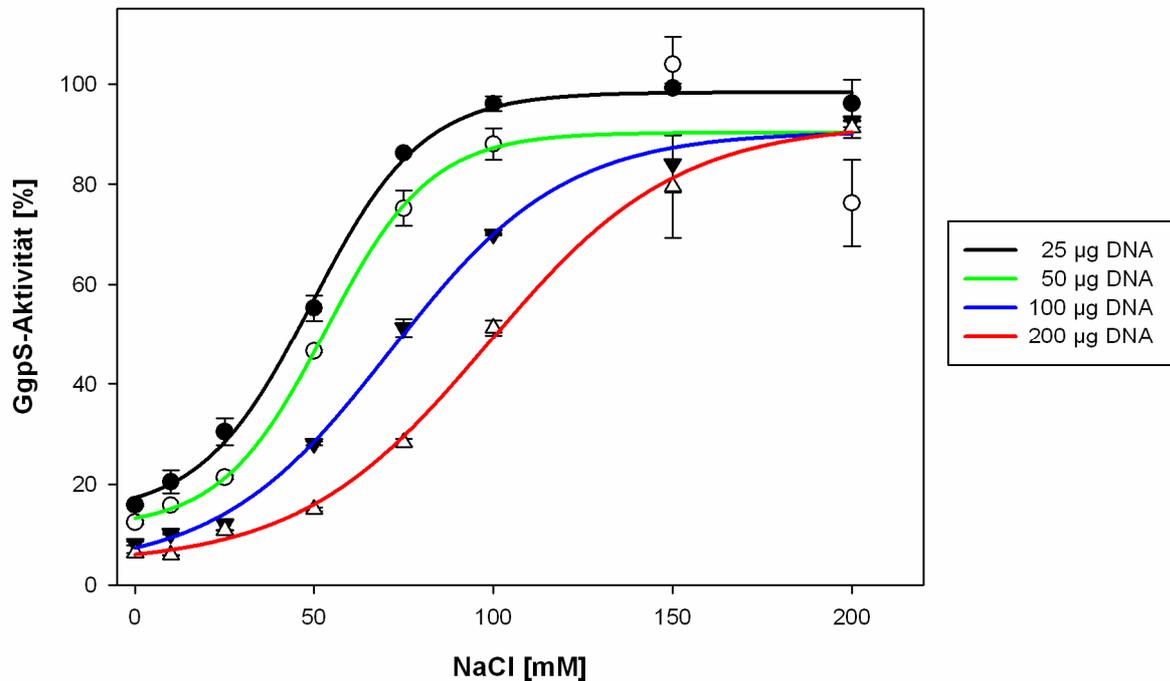
**Abbildung 3.17: Bestimmung der kinetischen Parameter der GgpS bei Inhibition durch DNA.**

Gezeigt ist die doppelt reziproke Lineweaver-Burke-Auftragung der GgpS-Aktivitäten bei steigenden Konzentrationen von ADP-Glukose (links) und Glycerol-3-Phosphat (rechts). Dabei wurden die Aktivitäten ohne DNA (●) bzw. nach Zugabe von 2  $\mu\text{g}$  DNA (○) analysiert.

Bei Berechnung der kinetischen Parameter wird deutlich, dass im Falle der DNA-Inhibition keine kompetitive Hemmung vorliegt. Für ADP-Glukose ergeben sich ohne DNA ein  $K_m$ -Wert von 1,2 mM und ein  $V_{\max}$ -Wert von 714 nkatal/mg GgpS. Nach Zugabe von DNA ergeben sich Werte von 0,09 mM bzw. 57 nkatal/mg GgpS. Hierbei haben sich sowohl der  $K_m$ - als auch der  $V_{\max}$ -Wert drastisch geändert, dies spricht für eine gemischte Inhibition. Bei dem zweiten Substrat Glycerol-3-Phosphat konnten die Parameter im Ansatz ohne DNA zu  $K_m = 1,06$  und  $V_{\max} = 588$  nkatal/mg GgpS bestimmt werden. Nach Zugabe von DNA betrug der  $K_m$ -Wert 0,95 mM und der  $V_{\max}$ -Wert 77 nkatal/mg GgpS. Da sich in diesem Fall lediglich die maximale Enzymaktivität ändert, kann man davon ausgehen, dass bei diesem Substrat eine nicht-kompetitive Hemmung vorliegt. Da für beide Substrate eine kompetitive Hemmung ausgeschlossen werden kann, scheint die DNA die Substratbindung nicht direkt zu beeinflussen.

Um näher zu untersuchen, inwieweit die Enzymaktivität in Anwesenheit von DNA durch die Salzkonzentration beeinflusst wird, wurde die GgpS-Aktivität bei einer Hemmung durch verschiedene DNA-Mengen in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration bestimmt. Dabei

wurden 25 - 200 µg DNA eingesetzt und NaCl-Konzentrationen von 0 - 200 mM eingestellt (siehe Abbildung 3.18).



**Abbildung 3.18: Modulation der GgpS-Aktivität durch NaCl und DNA.**

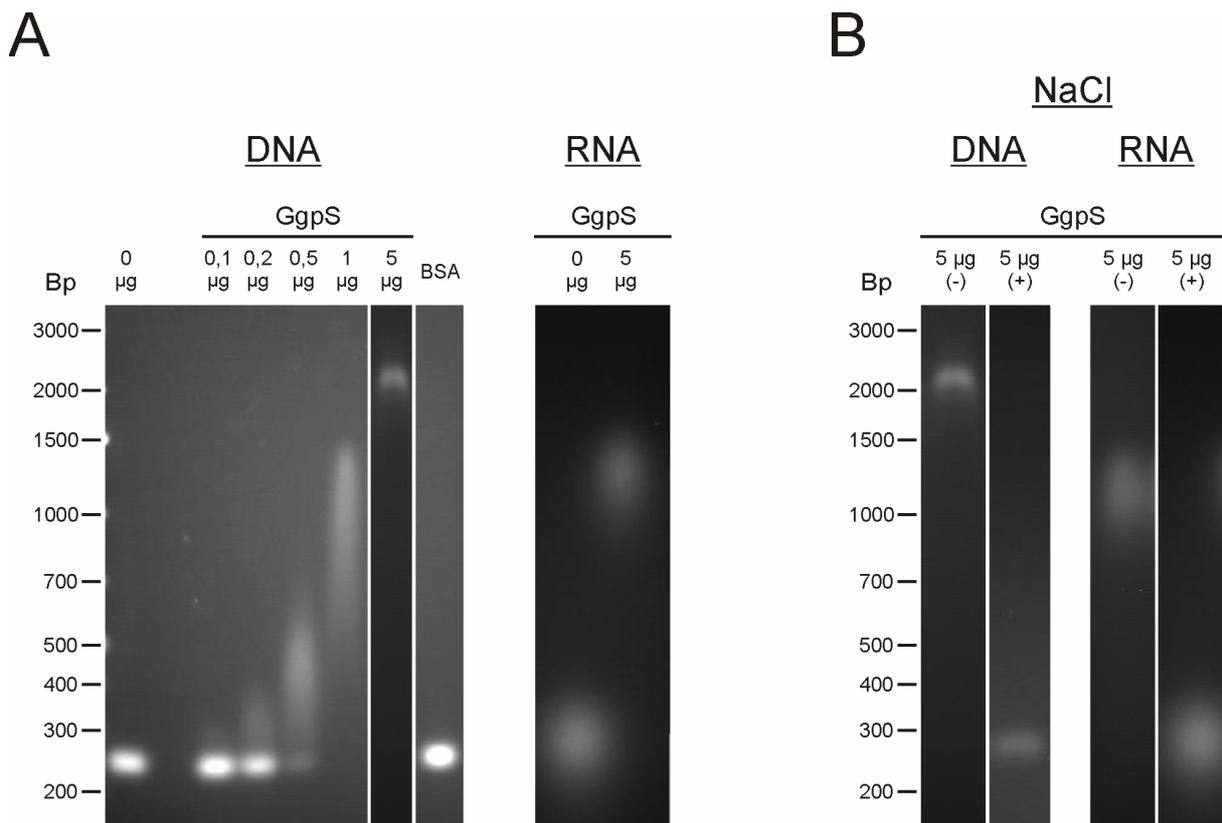
Gezeigt ist die GgpS-Aktivität in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration. Die Graphen zeigen die GgpS-Aktivitäten bei DNA-Mengen von 25 µg (●, schwarz), 50 µg (○, grün), 100 µg (▼, blau) und 200 µg (Δ, rot).

Es ist erkennbar, dass mit steigenden NaCl-Konzentrationen die Aktivität der GgpS dosisabhängig zunimmt. Der sigmoidale Anstieg ist bei höheren DNA-Mengen in Richtung höherer NaCl-Konzentrationen verschoben. Dies wird ebenfalls durch die Änderung der  $K_i$ -Werte deutlich. Bei einer DNA-Menge von 25 µg beträgt der  $K_i$ -Wert ca. 40 mM. Die halbmaximale Reaktivierung der GgpS bei 50 µg DNA wird erst bei ca. 60 mM erreicht und erhöht sich in Anwesenheit von 100 µg und 200 µg auf 75 mM bzw. 100 mM NaCl. Es besteht also eine klare Abhängigkeit der Modulation der GgpS-Aktivität durch NaCl von der eingesetzten DNA-Menge.

Es konnte nachgewiesen werden, dass DNA eine dosisabhängige Hemmung der GgpS-Aktivität verursacht. Einen vergleichbaren Effekt hatte auch Heparin. Die Hemmung durch beide Polyanionen konnte durch die Zugabe von NaCl aufgehoben werden. Die Inhibition in Anwesenheit von DNA findet nicht durch einen kompetitiven Mechanismus statt und wird nicht durch einen Mangel von  $Mg^{2+}$ -Ionen ausgelöst. Die GgpS-Aktivität bei dieser Hemmung wird durch NaCl moduliert, was eine genaue Einstellung der GG-Menge in Anwesenheit von verschiedenen Salzkonzentrationen erlauben würde.

### 3.3.3 Charakterisierung der GgpS-Interaktion mit Nukleinsäuren

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die GgpS durch die Anwesenheit von DNA in ihrer Aktivität gehemmt wird. Dafür könnte eine Bindung des Enzyms an die DNA verantwortlich sein. Die DNA ist stark negativ geladen und die GgpS sollte anhand von Strukturmodellen auf der Moleküloberfläche mehrere positiv geladene Bereiche besitzen. Eine Bindung könnte also über eine ionische Wechselwirkung stattfinden. Dies wurde mittels der EMSA-Technik (*electrophoretic mobility shift assay*) untersucht. Dabei wurden 100 ng eines DNA-Fragments oder 50 ng eines RNA-Fragments mit Größen von 233 Bp bzw. 250 Nukleotiden eingesetzt. Eine Bindung des GgpS-Proteins an diese Fragmente sollte das Laufverhalten der Banden verändern. Es wurden GgpS-Mengen von 0,1 - 5 µg mit den jeweiligen Nukleinsäurefragmenten inkubiert und der Ansatz in Agarosegelen aufgetrennt. Zusätzlich wurde der Effekt von 200 mM NaCl auf die GgpS-Nukleinsäure-Bindung untersucht (siehe Abbildung 3.19).

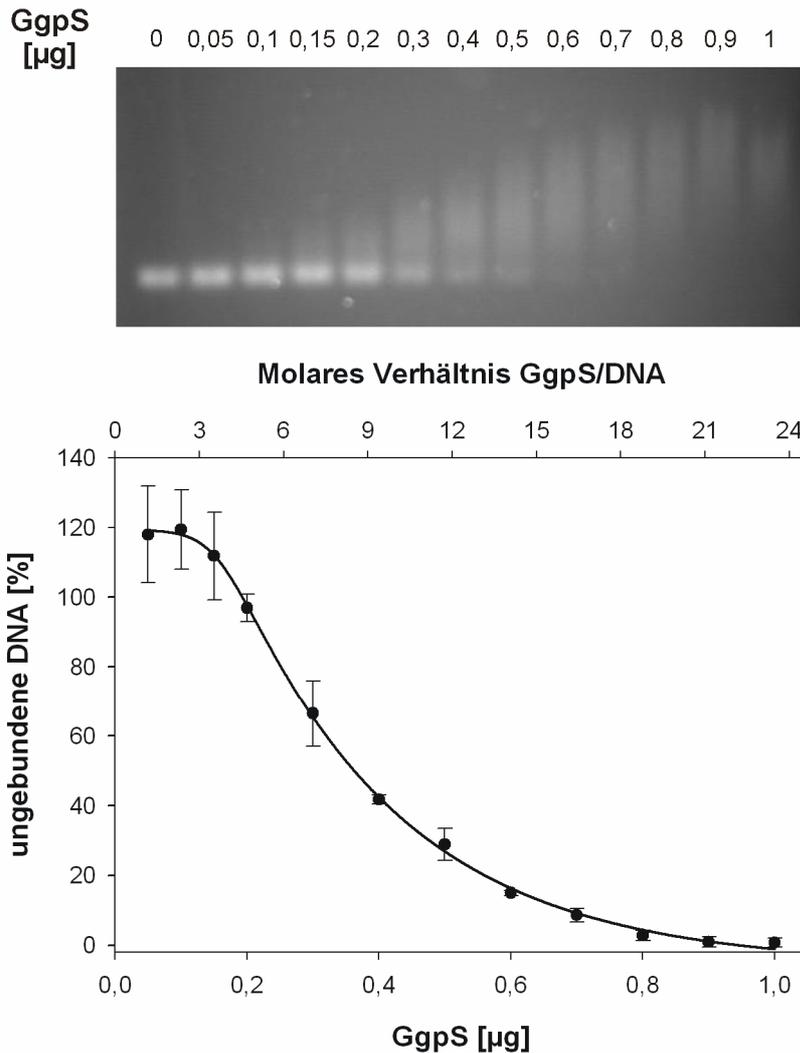


**Abbildung 3.19: EMSA-Studien der GgpS-Bindung an Nukleinsäuren.**

A: Gezeigt sind die Agarosegele (2%) der EMSA-Untersuchungen. Dabei wurden 100 ng eines DNA-Fragments mit 0,1 - 5 µg GgpS versetzt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Kontrolle wurde zu der DNA 1 µg BSA gegeben. Außerdem wurden 50 ng eines RNA-Fragment mit 0 µg bzw. 5 µg GgpS versetzt. B: Hier wurde die GgpS-Nukleinsäure-Bindung in Abwesenheit ((-)) oder nach Zugabe von 200 mM NaCl ((+)) untersucht.

Man kann deutlich erkennen, dass eine Bindung der GgpS an die DNA stattfindet (A, links). Die DNA-Bande wird ab einer GgpS-Menge von 0,1 µg zu höheren Molekulargewichten verschoben. In Anwesenheit von 1 µg GgpS hat jedes Fragment zumindest ein GgpS-Molekül gebunden. Die diffuse Verteilung der DNA und die massive Größenveränderung lässt jedoch darauf schließen, dass auf dem DNA-Fragment mehrere Bindestellen für das GgpS-Protein vorhanden sind. Bei einer bis wenigen Bindestellen würden einzelne Banden sichtbar sein. Bei 5 µg GgpS erscheint die DNA-Bande wieder scharf abgegrenzt, was auf eine vollständige Sättigung der DNA mit GgpS hinweist. Bei einer vollständigen GgpS-Bindung läuft die DNA-Bande bei ca. 2200 Bp, was ungefähr dem 10fachen der vorherigen Größe entspricht. Bei Betrachtung des Ansatzes mit dem RNA-Fragment erkennt man, dass die GgpS in vergleichbarer Weise auch an diese Nukleinsäure bindet (A, rechts). In Anwesenheit von 200 mM NaCl findet diese Bindung an DNA und RNA nicht mehr statt (B).

Um die Bindung der GgpS an DNA näher zu untersuchen, wurden weitere EMSA-Experimente durchgeführt. Hierbei sollte die Affinität der GgpS-DNA-Bindung bestimmt werden. Dazu wurde eine gleichbleibende Menge an DNA (113 ng, 233 Bp) mit steigenden Mengen an GgpS inkubiert (0,05 - 1 µg) und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die nicht an GgpS-Proteine gebundene DNA quantifiziert und mit der Menge an GgpS-Protein korreliert (siehe Abbildung 3.20).



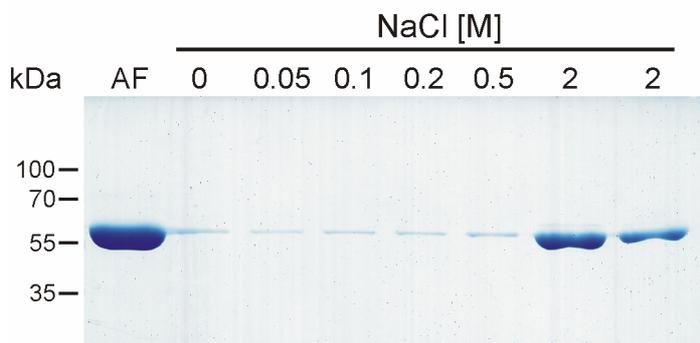
**Abbildung 3.20: Untersuchung der Affinität der GgpS-Bindung an DNA mittels EMSA.**

Gezeigt ist ein ausgewähltes Agarosegel (2%) der EMSA-Untersuchungen (oben). Für den DNA-Shift wurde ein 233 Bp großes Fragment verwendet. Es wurden 113 ng der DNA-Fragmente mit steigenden Mengen des GgpS-Proteins versetzt (0,05 - 1 µg). Im unteren Diagramm wurde die Abnahme der DNA-Bandenintensität gegen die GgpS-Menge und das molare Verhältnis zwischen GgpS und DNA aufgetragen. Die Bandenintensitäten wurden mit dem Programm PC-BAS analysiert.

Im oberen Bereich ist ein ausgewähltes Agarosegel des EMSA-Experiments gezeigt. Es ist erkennbar, dass das eingesetzte DNA-Fragment mit ansteigenden GgpS-Mengen zu höheren Molekulargewichten verschoben ist. Die Abnahme der DNA-Bandenintensität wurde quantifiziert und gegen die GgpS-Menge aufgetragen. Die Menge an ungebundener DNA nimmt mit steigender GgpS-Menge ab und die Kurve zeigt einen sigmoidalen Verlauf. Dies deutet auf einen kooperativen Bindungsmechanismus hin. Bei einer GgpS-Menge von 0,3 µg ist bereits die Hälfte der DNA an das Protein gebunden, eine vollständige Bindung wird bei 0,8 µg erreicht. Betrachtet man die molaren Verhältnisse zwischen DNA und GgpS, so erkennt man, dass die GgpS/DNA-Bindung eine starke Affinität zeigt. Bereits bei einem 20fachen molaren Überschuss der GgpS hat an jedem DNA-Fragment zumindest ein GgpS-

Protein gebunden, eine größere Anzahl ist bei Betrachtung des Agarose-Gels aber eher wahrscheinlich.

In vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Heparin einen vergleichbaren Effekt auf die GgpS-Aktivität auslöst wie DNA. Im Folgenden wurde überprüft, ob auch hierbei eine Bindung der GgpS an das Polyanion stattfindet. Dazu wurde gereinigtes GgpS-Protein mit einer Heparin-Sepharose-Matrix inkubiert und anschließend das Protein mit steigenden NaCl-Konzentrationen von 0 - 2 M von der Matrix eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 3.21).



**Abbildung 3.21: Interaktion des GgpS-Proteins mit Heparin.**

Gezeigt ist das Coomassie-gefärbte SDS-Gel des Heparin-Bindungs-Experiments. Dazu wurde gereinigtes GgpS-Protein mit einer Heparin-Sepharose-Matrix inkubiert und das GgpS-Protein mit NaCl-Konzentrationen von 0 - 2 M eluiert. Für die SDS-PAGE wurden gleiche Volumina der Elutionsfraktionen aufgetragen. AF: Probe vor der Inkubation mit der Heparin-Matrix.

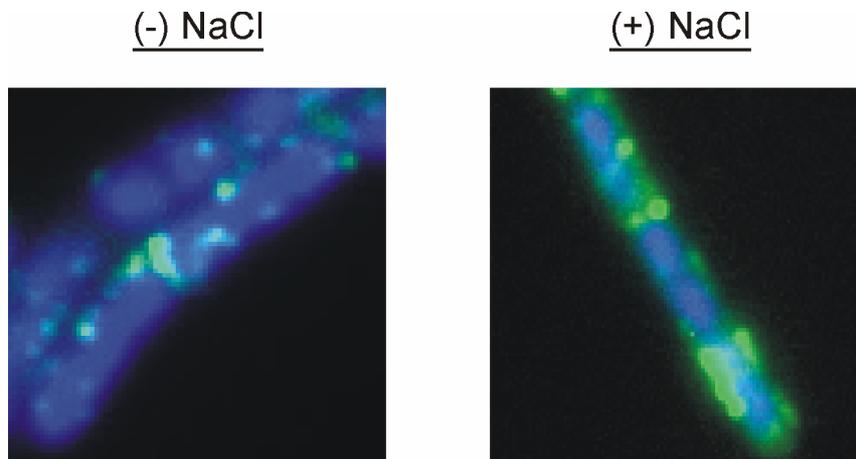
Dieses Experiment zeigt, dass das GgpS-Protein an Heparin bindet. Bei Konzentrationen von 0 - 500 mM lösen sich nur geringe Mengen des Proteins von der Matrix. Erst bei 2 M NaCl kann das Protein eluiert werden. Dies spricht für eine hohe Affinität der GgpS-Bindung an Heparin.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Bindung der GgpS an DNA und RNA stattfindet. In Anwesenheit von NaCl ist diese Interaktion nicht nachweisbar. Dies weist darauf hin, dass die Bindung durch eine ionische Wechselwirkung mit dem Rückgrat der Nucleinsäuren ausgelöst werden könnte. Diese Hypothese wird auch durch die Bindung des GgpS-Proteins an das Polyanion Heparin unterstützt.

### 3.3.4 *In vivo*-Untersuchungen der GgpS-DNA-Bindung

Um zu untersuchen, ob die Bindung der GgpS an DNA auch in einem *in vivo*-System nachweisbar ist, wurden zusätzliche Studien durchgeführt. Zunächst wurde versucht, die GgpS als GFP-Fusionsprotein zu exprimieren und eine Ko-Lokalisierung des Proteins mit der

genomischen DNA durch Fluoreszenzmikroskopie zu zeigen. Diese Versuche wurden in *B. subtilis*-Zellen durchgeführt, da dieser Mikroorganismus für fluoreszenzmikroskopische Studien gut zugänglich ist und zahlreiche GFP-Fusionsvektoren verfügbar sind. Eine Lokalisierung von GFP in *Synechocystis* würde durch die zahlreichen Pigmente und das Thylakoidmembransystem gestört werden. Für diesen Versuch wurden die entsprechenden Vektoren konstruiert und in das Genom des *B. subtilis*-Wildtyps inseriert. Dabei wurde sowohl eine N- als auch C-terminale GFP-Fusion untersucht. Die Expression der Fusionsproteine wurde mit 1% Xylose induziert und die GFP-Fluoreszenz der Zellen analysiert (siehe Abbildung 3.22). Die genomische DNA wurde dabei mit dem Farbstoff DAPI sichtbar gemacht. Dieser Versuch wurde ohne Zugabe von NaCl und 5 min nach einem Salzschock von 2,5 M NaCl durchgeführt.



**Abbildung 3.22: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der GgpS-GFP-Lokalisierung in *B. subtilis*.** Gezeigt sind *B. subtilis*-Zellen, die das Konstrukt für die Expression eines N-terminalen GFP-GgpS-Fusionsproteins enthalten. Die Zellen wurden entweder ohne Zugabe von NaCl (links) oder 5 min nach einem Salzschock von 2,5 M NaCl (rechts) fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die genomische DNA (blau) wurde hierbei mit dem Farbstoff DAPI gefärbt. Die natürliche GFP-Fluoreszenz (grün) wurde mit dem entsprechenden Filtersystem gemessen.

Es ist erkennbar, dass die gezeigten Zellen GFP-Fluoreszenz aufweisen. Dabei zeigen sich sowohl ohne Zugabe von Salz als auch nach dem Salzschock fluoreszierende GFP-Foci, die sich primär im Bereich der Zellmembran befinden. Eine klare Ko-Lokalisierung mit der genomischen DNA ist nicht sichtbar. Auch nach dem Salzschock lässt sich keine Änderung der GFP-Lokalisierung erkennen. Die leichten Unterschiede in der Anzahl der GFP-Foci wurden hierbei nicht durch den Salzschock ausgelöst, sondern durch eine generelle Varianz der Zellen. Die gezeigten Zellen enthalten das N-terminale GFP-GgpS-Konstrukt, für die C-terminale Fusion wurden vergleichbare Ergebnisse beobachtet (Daten nicht gezeigt). Bei diesen Ergebnissen ist fraglich, ob die Beobachtungen die tatsächlichen physiologischen

Gegebenheiten widerspiegeln, da GFP bei einer Überexpression aggregieren kann und dann häufig in der Nähe der Zellmembran nachweisbar ist (persönliche Mitteilung, Dr. Marc Bramkamp).

Um unter *in vivo*-Bedingungen eine Bindung der GgpS an Nukleinsäuren in *Synechocystis* nachzuweisen, wurde die SPINE-Methode (*strep protein interaction experiment*) eingesetzt. Bei dieser Technik werden Zellen, die das zu untersuchende Protein mit einem Strep-Tag exprimieren, mit dem Crosslinker Formaldehyd (FA) versetzt. Das Formaldehyd dringt in die Zellen ein und vernetzt eng benachbarte Zellbestandteile miteinander. Nach einem Zellaufschluss kann das zu untersuchende Protein und alle daran gebundenen Bestandteile, wie z.B. Proteine oder DNA, affinitätschromatographisch gereinigt werden. In diesem Experiment wurde die ggpS+-Strep-Mutante verwendet, die ein Strep-markiertes GgpS-Protein unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors überexprimiert. Für die Versuche wurden Zellen verwendet, die entweder bei niedrigen Salzkonzentrationen kultiviert wurden oder an 3% NaCl akklimatisiert waren. Als Kontrolle wurde der Versuch ohne Zugabe von Formaldehyd durchgeführt. Für das Crosslinking wurde 1% Formaldehyd eingesetzt. Nach der Reinigung des GgpS-Proteins wurde der Nukleinsäuregehalt der Proteinfraktionen photometrisch bestimmt (siehe Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1: Protein- und Nukleinsäure-Konzentrationen der Proteinfraktionen nach SPINE.**

Gezeigt sind die Protein- und Nukleinsäure-Konzentrationen der Elutionsfraktionen nach dem SPINE-Crosslinking und einer affinitätschromatographischer Reinigung des GgpS-Proteins. Die Zellen wurden bei 0% oder 3% NaCl kultiviert. Dann wurde entweder als Kontrolle kein Formaldehyd ((-) FA) oder 1% Formaldehyd ((+) FA) zugesetzt.

Ansatz	(-) FA 0% NaCl	(+) FA 0% NaCl	(+) FA 3% NaCl
Proteinkonzentration [µg/µl]	0,359	0,077	0,09
Nukleinsäurekonzentration [µg/µl]	0	0,303	0,135

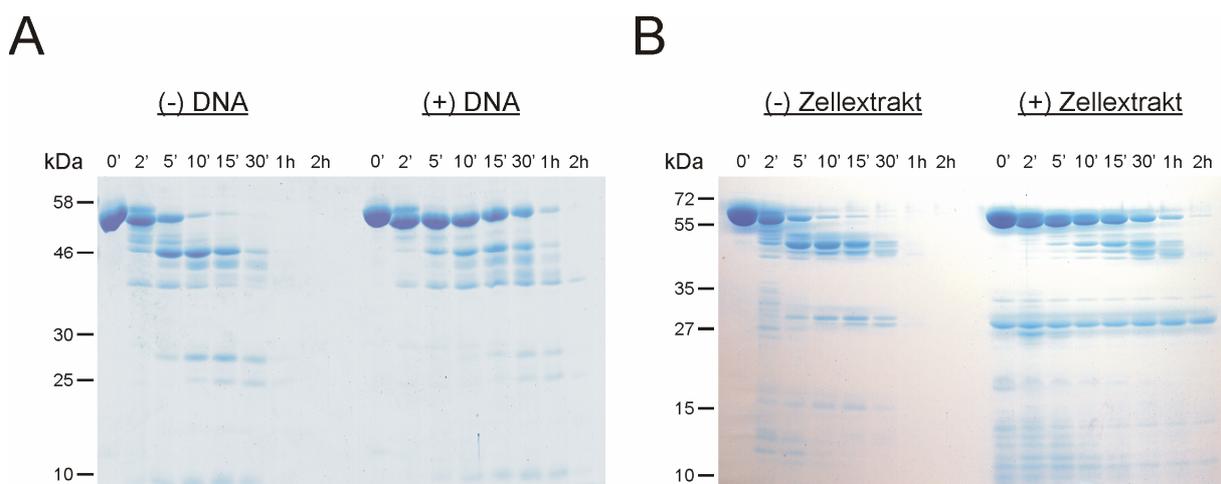
In allen Ansätzen konnte das GgpS-Protein affinitätschromatographisch gereinigt werden. Dabei enthielten die gereinigten GgpS-Proben, die mit Formaldehyd versetzt wurden, Nukleinsäuren. Bei der Kontrolle ohne Formaldehyd war dies nicht der Fall. Eine allgemeine Verunreinigung durch DNA oder RNA, die bei der Reinigung aufgetreten sein könnte, kann damit ausgeschlossen werden. Zusätzlich sind deutliche Unterschiede zwischen Zellen zu beobachten, die bei 0% NaCl bzw. 3% NaCl kultiviert wurden. Während bei niedrigen Salzkonzentrationen das Verhältnis zwischen Nukleinsäuren und GgpS bei ca. 4 lag, ergab

sich bei 3% NaCl lediglich ein Wert von 1,5. Damit können weniger an das GgpS-Protein gebundene Nukleinsäuren gereinigt werden, wenn die Salzkonzentration des externen Mediums erhöht ist.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass auch *in vivo* eine NaCl-abhängige Bindung der GgpS an Nukleinsäuren stattfinden könnte.

### 3.3.5 Untersuchungen zum Wirkmechanismus der GgpS-Inhibition durch DNA

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Inhibition der GgpS-Aktivität in Anwesenheit von DNA durch einen allosterischen Mechanismus ausgelöst werden könnte. Dabei könnte eine Konformationsänderung des Proteins stattfinden. Um diese nachzuweisen, wurde eine limitierte Proteolyse mit Trypsin durchgeführt. Eine Änderung der Proteinstruktur durch die Bindung von DNA könnte Trypsinschnittstellen entweder zugänglich machen oder maskieren. Dabei würde sich bei einem Trypsinabbau das Bandenmuster der Abbaufragmente im Vergleich zu einem Ansatz ohne DNA ändern. Es wurden in einem Ansatz mit jeweils 0,5 µg/µl GgpS entweder eine Lachssperma-DNA-Konzentration von 2,5 µg/µl eingestellt oder eine entsprechende Menge Testpuffer zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Trypsin (EK: 20 µg/ml) gestartet und es wurden nach verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen. Diese wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abbildung 3.23). Dieses Experiment wurde auch in Anwesenheit von Zellextrakt durchgeführt, um die vorherigen Ergebnisse zu bestätigen. Als Kontrolle wurde bei dem Abbau BSA zugesetzt.



**Abbildung 3.23: Limitierte Proteolyse des GgpS-Proteins mit Trypsin.**

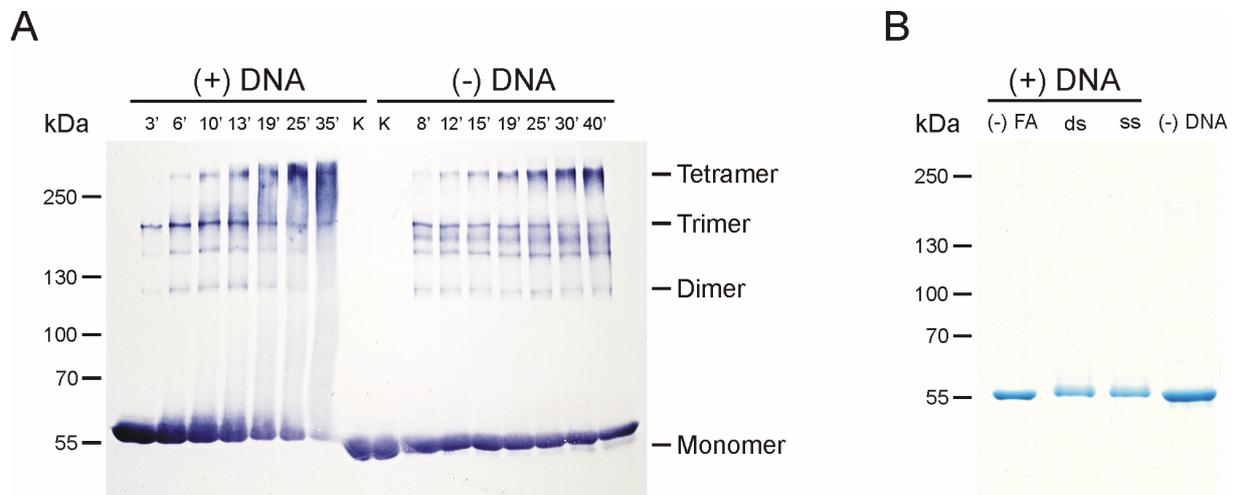
Gezeigt sind die mit Coomassie-gefärbten SDS-Gele der limitierten Proteolyse des GgpS-Proteins mit Trypsin (EK: 20 µg/ml). Im linken Teil der Gele ist jeweils die Proteolyse des gereinigten GgpS-Proteins ohne Zugabe von DNA oder Zellextrakt, im rechten in Anwesenheit von 2,5 µg/µl Lachssperma-DNA (A) oder 10 µg/µl *E. coli*-Zellextrakt (B) dargestellt. Es wurden Proben aufgetrennt, die nach den angegebenen Zeitpunkten abgenommen wurden. Dabei wurden jeweils 2,5 µg GgpS-Protein aufgetragen. Die Probe 0' wurde vor Zugabe von Trypsin abgenommen.

In Teil A sieht man auf der linken Seite des SDS-Gels bei einer Größe von 58 kDa das GgpS-Protein vor Zugabe von Trypsin (0'). Nach 15 - 30 min ist kein vollständiges GgpS-Protein mehr vorhanden. Vergleicht man das gesamte Abbaumuster mit dem des Ansatzes mit DNA auf der rechten Seite, so kann man keine Änderung des Bandenmusters erkennen. Dennoch wird deutlich, dass der Abbau der GgpS in Anwesenheit von DNA stark verzögert ist. Die Bandenstärke der GgpS nach 5 min im Ansatz ohne Zellextrakt entspricht ungefähr dem Abbau im Ansatz mit DNA von 30 min. Auch nach 2 h ist in Anwesenheit von DNA noch eine GgpS-Bande sichtbar, diese ist bei der Kontrolle ohne DNA bereits nach 30 min nicht mehr nachweisbar. Ein genereller Effekt von DNA auf die Proteolyse kann ausgeschlossen werden, da der Abbau von BSA nicht durch die DNA beeinträchtigt wurde (Daten nicht gezeigt). In Anwesenheit von *E. coli*-Zellextrakt (Teil B) kann eine vergleichbare Stabilisierung des GgpS-Proteins gegenüber dem Trypsin-Verdau nachgewiesen werden. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Effekte des Zellextraktes auf das GgpS-Protein durch die enthaltenen Nukleinsäuren ausgelöst werden.

Die Zugabe von DNA oder Zellextrakt verursacht keine nachweisbaren Unterschiede im Bandenmuster der GgpS. Dies deutet darauf hin, dass keine Trypsinschnittstellen exponiert oder maskiert wurden. Der verzögerte Abbau deutet jedoch auf eine verringerte Zugänglichkeit der Schnittstellen für die Protease hin. Dies könnte entweder durch eine kompaktere Struktur des Proteins oder durch die Bindung an Nukleinsäuren verursacht werden.

Die Ergebnisse vorheriger Versuche deuten darauf hin, dass bei der Bindung der GgpS ein kooperativer Bindungsmechanismus vorliegen könnte (siehe Abbildung 3.20). Dabei ist eine Interaktion von mehreren GgpS-Proteinen denkbar. Dafür sprechen auch Yeast-Two-Hybrid-Experimente, die auf eine Wechselwirkung von GgpS-Proteinen hindeuten (Stirnberg *et al.*, 2007). Bereits vor Beginn dieser Arbeit wurde eine Oligomerisierung von GgpS-Proteinen als ein möglicher Regulationsmechanismus in Betracht gezogen (mündliche Mitteilung Dr. Kay Marin). Um die Bildung von GgpS-Oligomeren zu untersuchen, wurden Crosslinking-Experimente mit Formaldehyd durchgeführt. Außerdem wurde untersucht, ob die Anwesenheit von DNA eine Rolle bei der Ausbildung von Homooligomeren spielt. Dazu wurde gereinigtes GgpS-Protein entweder ohne DNA oder mit einer äquimolaren Menge von 8 Nukleotiden langen DNA-Fragmenten inkubiert und mit 0,75% Formaldehyd (FA) versetzt. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und über SDS-PAGE aufgetrennt. Das GgpS-Protein wurde anschließend im Western-Blot sichtbar gemacht (siehe Abbildung 3.24, A). In einem weiteren Versuch wurde das GgpS-Protein entweder mit

doppelsträngiger (ds) oder einzelsträngiger (ss) DNA, die ebenfalls 8 Bp bzw. Nukleotide lang war, gemischt und sofort durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abbildung 3.24, B).



**Abbildung 3.24: Crosslinking der GgpS mittels Formaldehyd in Abhängigkeit von DNA.**

Gezeigt sind die Crosslinking-Experimente der GgpS mit Formaldehyd. Dazu wurden 2 µg (A) oder 0,8 µg GgpS (B) ohne DNA oder in Anwesenheit von 8 Bp langen DNA-Fragmenten (EK: 0,05 µg/µl) mit 0,75% Formaldehyd (FA) versetzt und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. In Teil A ist der Western-Blot eines Zeitverlaufs des Crosslinkings gezeigt (K: Kontrolle ohne Zugabe von FA). In Teil B ist ein Coomassiegefärbtes SDS-Gel zu sehen, bei dem die Proben mit doppelsträngigen (ds) oder einzelsträngigen (ss) DNA-Fragmenten gemischt wurden. Bei diesem Versuch war die Inkubationszeit sehr kurz.

Zunächst muss darauf hingewiesen werden, dass sich bei dem Zeitverlauf des Crosslinkings die Zeitpunkte der verschiedenen Proben voneinander unterscheiden. Die Proben mit DNA wurden in diesem Versuch kürzer inkubiert als die Proben ohne DNA. Im Western-Blot (A) ist klar erkennbar, dass mit fortschreitender Zeit das GgpS-Monomer durch das Formaldehyd zu höhermolekularen Oligomeren verbunden wird. Dabei werden Dimere, Trimere und Tetramere gebildet. Vergleicht man die Spuren der Proben mit DNA und ohne DNA, kann man klar erkennen, dass die Anwesenheit von DNA die Bildung von Oligomeren stark beschleunigt, wenn man die Abnahme von GgpS-Monomeren betrachtet. Während in dem DNA-haltigen Ansatz fast das gesamte GgpS-Monomer quervernetzt wurde, ist in der Probe ohne DNA immer noch ein Großteil des Monomers vorhanden. In Teil B ist das Coomassiegefärbte SDS-Gel mit weiteren Crosslinking-Proben zu sehen. Hierbei wurden geringere Proteinmengen aufgetragen, um die sehr geringe Größenveränderung der GgpS nach Bindung an das kleine DNA-Fragment sichtbar zu machen. Es ist zu erkennen, dass die Ansätze, die neben der GgpS sowohl FA als auch DNA enthielten, einen kleinen, aber dennoch deutlichen Größenunterschied im Vergleich mit den Kontrollproben aufweisen. Dies bedeutet, dass bereits nach wenigen Sekunden alle GgpS-Moleküle durch das FA an die DNA gebunden wurden.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte die Ausbildung von Homooligomeren der GgpS in Anwesenheit von Formaldehyd nachgewiesen werden. Die Oligomerisierung wird dabei in Anwesenheit von DNA stark beschleunigt. Die Bindung der GgpS an die DNA-Fragmente findet sehr schnell statt. Dies spricht für eine hohe Affinität der Interaktion. Eine Konformationsänderung des Proteins, die aufgrund der Bindung an DNA ausgelöst werden könnte, konnte nicht bestätigt werden.

### 3.3.6 Studien zur Regulation der *ggpS*-Transkription durch das GgpS-Protein

Es wurde gezeigt, dass eine affine Bindung der GgpS an DNA stattfindet. Dabei könnte diese Interaktion nicht nur die GgpS-Aktivität salzabhängig modulieren, sondern auch bei der Bindung an DNA die Transkription von salzregulierten Genen steuern. Insbesondere im Falle des *ggpS*-Gens wäre eine solche Regulation bemerkenswert, da das GgpS-Protein dann nicht nur den Osmolyt-Pool in Abhängigkeit von der Salzkonzentration einstellen, sondern zusätzlich auch seine eigene Synthese regulieren würde. Die bisherigen Experimente weisen zwar darauf hin, dass das GgpS-Protein unabhängig von der Sequenz an DNA bindet, dennoch konnte eine Sequenzspezifität nicht vollständig ausgeschlossen werden.

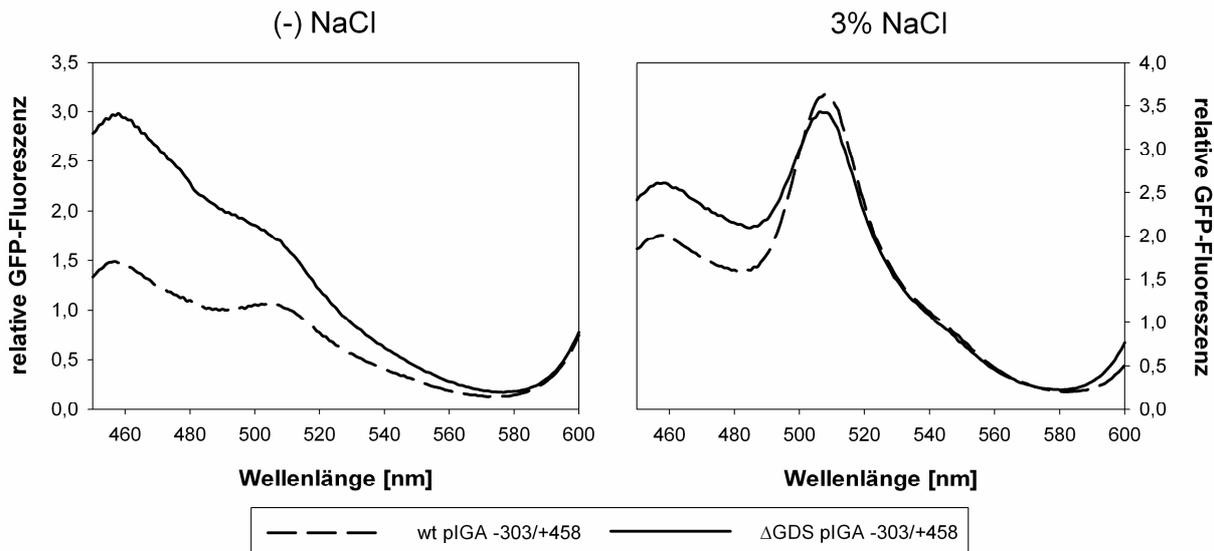
Bei einer Transkriptionsregulation des *ggpS*-Gens durch die GgpS könnten bestimmte DNA-Sequenzen im Promotorbereich des Gens vorhanden sein, an die das Protein bindet. Dabei sollte eine Steigerung der Bindungsaffinität im Vergleich zu den bisherigen Versuchen mit unspezifischen DNA-Fragmenten nachweisbar sein. Um dies näher zu untersuchen, wurden mittels PCR 300 Bp lange DNA-Fragmente aus der Region von -900 Bp vor dem Startcodon bis +600 Bp nach dem Startcodon amplifiziert und in EMSA-Experimenten eingesetzt. Bei einer höheren Affinität der GgpS zu bestimmten regulatorischen Sequenzen sollte sich das Ausmaß der Größenveränderung unterscheiden. Für alle Fragmente konnte eine GgpS-Bindung nachgewiesen werden. Dabei war jedoch keine höhere Affinität zu einem der Fragmente festzustellen (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Experiment wurde *in vivo* untersucht, ob die Anwesenheit des GgpS-Proteins für die salzabhängige Regulation des *ggpS*-Promotors notwendig ist. Dies würde für eine Regulation der *ggpS*-Transkription durch das GgpS-Protein sprechen. Hierfür wurde das pIGA-Vektorsystem verwendet, mit dem die Transkription von Promotoren durch eine gekoppelte GFP-Fluoreszenz untersucht werden kann (Kunert *et al.*, 2000). Dazu wird der zu untersuchende Promotor, in diesem Fall der GgpS-Promotor, vor das *gfp*-Gen in den Vektor kloniert. Die Transkription des *gfp*-Reportergens steht dann unter Kontrolle des verwendeten Promotors. Der Vektor besitzt flankierende Genomsequenzen, über die das Promotor-

Reportergenkonstrukt und eine Kanamycin-Resistenzgenkassette in das Genom von *Synechocystis* inseriert werden. Die Insertion des Reportervektors pIGA-303/+458 in das *Synechocystis*-Genom, der den vollständigen *ggsS*-Promotorbereich enthielt, wurde sowohl für den Wildtyp (wt pIGA-303/+458) als auch für eine Mutante durchgeführt, die kein GgsS-Protein synthetisieren kann ( $\Delta$ GDS pIGA-303/+458).

Sollte nun das GgsS-Protein für die Repression der *ggsS*-Transkription bei niedrigen Salzkonzentrationen selber verantwortlich sein, dann sollte bei einem Stamm, dem das GgsS-Protein fehlt ( $\Delta$ GDS pIGA-303/+458), die GFP-Expression konstitutiv eingeschaltet sein. Durch einen Vergleich mit dem Wildtyp-Stamm (wt pIGA-303/+458), in dem keine GFP-Fluoreszenz sichtbar sein sollte, könnte man Aussagen über eine Beteiligung des GgsS-Proteins bei der Kontrolle der *ggsS*-Transkription treffen. Der Vektor für diese Versuche wurde freundlicherweise von Stephan Klähn (AG Hagemann, Universität Rostock) zur Verfügung gestellt, die Hauptarbeit bei der Insertionsmutagenese von *Synechocystis* wurde in unserer Arbeitsgruppe von Anja Wittmann durchgeführt. Die vollständige Segregation der Insertion in alle Kopien des Genoms konnte mittels PCR verifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Für den Nachweis der GFP-Fluoreszenz wurden die Zellen aufgeschlossen und die cytoplasmatischen Proteine durch Ultrazentrifugation isoliert. Anschließend wurden die Proben fluoreszenzspektrometrisch analysiert, wobei das Maximum der GFP-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 509 nm liegt. Hierbei wurden Zellen verwendet, die entweder bei niedrigen Salzkonzentrationen kultiviert oder über 3 Tage an 3% NaCl akklimatisiert wurden (siehe Abbildung 3.25).



**Abbildung 3.25: Untersuchungen zur Regulation des *ggsS*-Promotors mittels GFP-Reporterkonstrukten.** Gezeigt ist die relative GFP-Fluoreszenz von cytoplasmatischen Extrakten der Reportergeren-Stämme wt pIGA-303/+458 (unterbrochene Linie) und  $\Delta$ GDS pIGA-303/+458 (durchgehende Linie). Hierbei wurden *Synechocystis*-Zellen untersucht, die entweder ohne Zugabe von NaCl kultiviert ((-) NaCl, links) oder über 3 Tage an 3% NaCl akklimatisiert wurden (3% NaCl, rechts). Das GFP-Protein wurde bei einer Wellenlänge von 395 nm angeregt und die Fluoreszenz über einen Bereich von 450 - 600 nm gemessen.

Trotz des höheren Hintergrundsignals des  $\Delta$ GDS pIGA-303/+458-Stammes wird deutlich, dass im Vergleich zum wt pIGA-303/+458-Stamm keine signifikanten Unterschiede in der GFP-Expression bei niedrigen Salzkonzentrationen nachweisbar sind. In beiden Fällen ist um die Wellenlänge von 509 nm ein schwaches GFP-Signal sichtbar, das auf eine leichte Aktivität des *ggsS*-Promotors in Abwesenheit von NaCl hindeutet. Bei den an 3% NaCl akklimatisierten Zellen lässt sich eine starke Induktion des GFP-Signals erkennen. Dabei ist die Signalstärke der GFP-Fluoreszenz beider Stämme vergleichbar.

Sowohl die schwache Aktivität bei niedrigen Salzkonzentrationen als auch die starke Induktion des *ggsS*-Promotors bei einer NaCl-Konzentration von 3% gleicht den physiologischen Gegebenheiten der *ggsS*-Transkription. Damit konnte gezeigt werden, dass dieses Testsystem dafür geeignet ist, die Transkriptionsregulation des *ggsS*-Gens zu untersuchen. Zusammengenommen deuten jedoch die Ergebnisse der EMSA-Experimente und der GFP-Messungen darauf hin, dass das GgpS-Protein keine Rolle bei der Transkriptionsregulation des *ggsS*-Gens spielt.

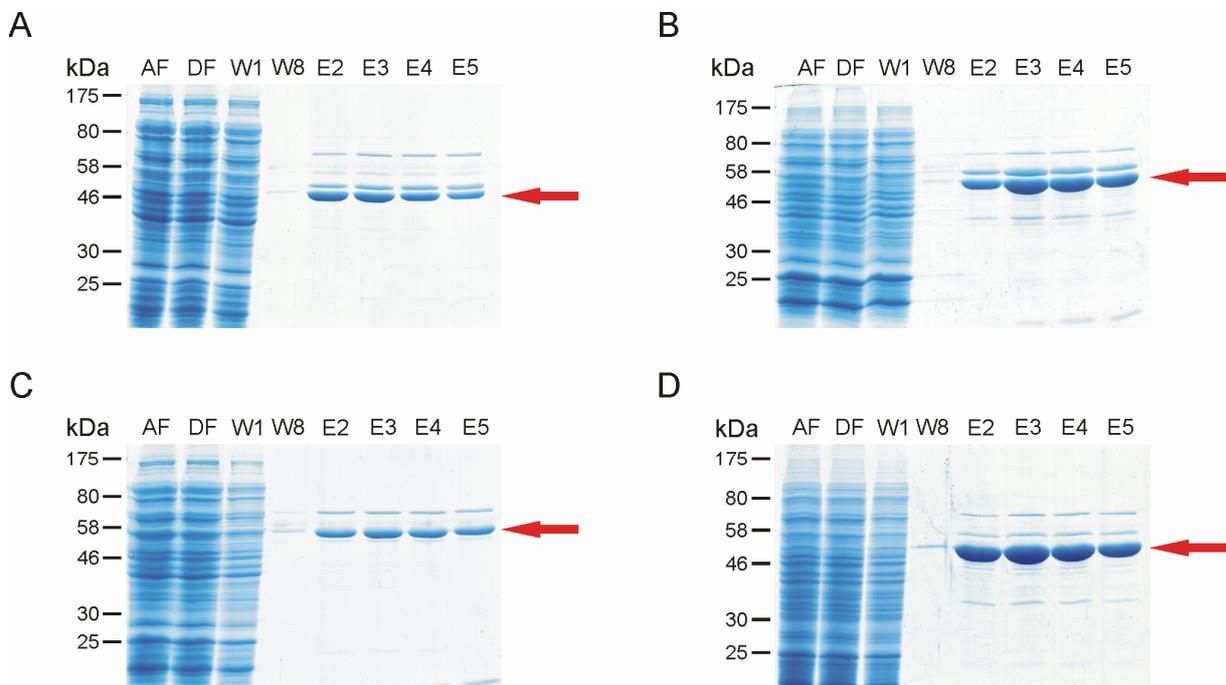
### 3.4 Untersuchungen zur Universalität der Regulation von Glukosyltransferasen

Das GgpS-Protein gehört zu der Familie der Glukosyltransferasen und besitzt eine hohe Sequenzähnlichkeit zu anderen Vertretern dieser Enzymklasse. Insbesondere die Trehalose-

Phosphat-Synthasen sind hierbei interessant, da Trehalose in vielen Organismen ebenso wie GG als kompatibles Solut bei erhöhten Salzkonzentrationen akkumuliert wird. Da der Reaktionsmechanismus bei der Osmolytsynthese dem der GgpS sehr stark ähnelt, könnte auch bei diesen Enzymen die Interaktion mit Nukleinsäuren eine regulatorische Rolle übernehmen. Im Folgenden wurden verschiedene Glukosyltransferasen hinsichtlich ihrer Regulation untersucht.

### 3.4.1 Expression und Reinigung von Glukosyltransferasen verschiedener Organismen

Um zu untersuchen, ob die Regulation der GgpS durch Nukleinsäuren auch auf andere Glukosyltransferasen übertragbar ist, wurden zunächst die Gene der Trehalose-Phosphat-Synthasen aus den Mikroorganismen *E. coli*, *C. glutamicum* und *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) sowie der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) in den Vektor pASK-IBA3 kloniert und sequenziert (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde die Sequenz für ein Strep-Tag hinzugefügt. Anschließend wurden die Proteine in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen hergestellt und über eine Strep-Tactin-Matrix gereinigt (siehe Abbildung 3.26).



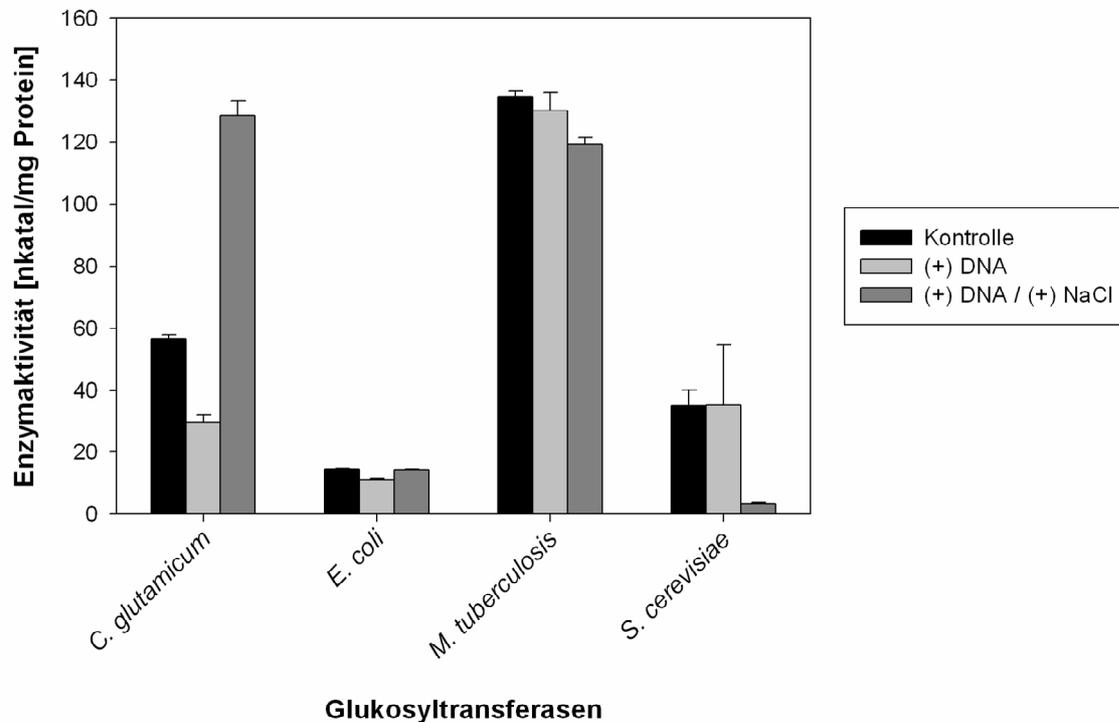
**Abbildung 3.26: Reinigungen verschiedener Trehalose-Phosphat-Synthasen.**

Gezeigt sind die Coomassie-Blau-gefärbten SDS-Gele der Reinigungen der mit einem Strep-Tag versehenen Trehalose-Phosphat-Synthasen aus *E. coli* (A), *C. glutamicum* (B), *M. tuberculosis* (C) und *S. cerevisiae* (D). AF: Säulenauftrag; DF: Durchflussfraktion; W1, W8: erste und letzte Waschfraktion; Spuren E2-E5: Elutionsfraktionen. Die Expression wurde in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) durchgeführt und die Reinigung erfolgte über eine Strep-Tactin-Matrix. Die gereinigten Proteine sind durch rote Pfeile markiert.

Im Vergleich zu der GgpS-Reinigung sind keine klaren Überexpressionsbanden der rekombinanten Proteine sichtbar. Dennoch konnten alle Glukosyltransferasen mit nur leichten Verunreinigungen eluiert werden (rote Pfeile). Die gereinigten Proteine lagen in ausreichender Menge für die Enzymtests und andere biochemische Untersuchungen vor.

### 3.4.2 Charakterisierung verschiedener Glukosyltransferasen

Die gereinigten Glukosyltransferasen konnten nun in Enzymtests analysiert werden. Dabei wurde der Einfluss von Lachssperma-DNA auf die Aktivität und eine reaktivierende Wirkung von NaCl untersucht. Hierfür wurden 200 µg DNA und 200 mM NaCl eingesetzt (siehe Abbildung 3.27).



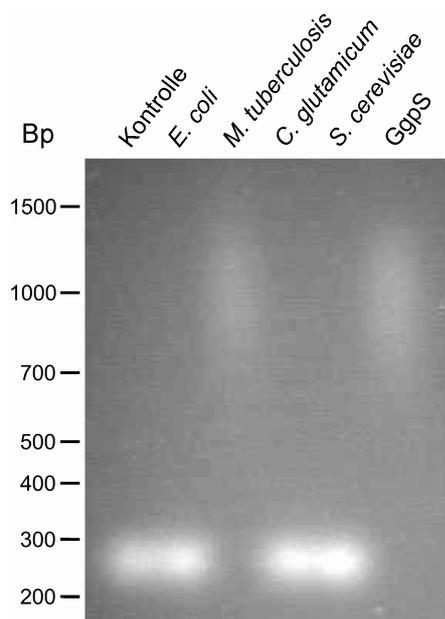
**Abbildung 3.27: TPS-Aktivitäten in Abhängigkeit von DNA und NaCl**

Gezeigt sind die Aktivitäten der Glukosyltransferasen aus *C. glutamicum*, *E. coli*, *M. tuberculosis* und *S. cerevisiae*. Die Enzymaktivitäten wurden dabei unter Kontrollbedingungen (schwarz), in Anwesenheit von 200 µg DNA (hellgrau) sowie bei Zugabe von DNA und 200 mM NaCl (dunkelgrau) bestimmt.

Bei der TPS aus *C. glutamicum* lässt sich eine Inhibition der Aktivität durch DNA auf ca. 50% beobachten. Dies ähnelt dem Effekt von DNA auf das GgpS-Protein. Interessant ist hierbei, dass die Hemmung durch DNA bei der Zugabe von NaCl nicht nur aufgehoben wird, sondern ein Anstieg der Aktivität auf über 200% ausgelöst wird. Bei der TPS aus *E. coli* zeigt sich lediglich eine basale Aktivität, die keine Rückschlüsse auf die Regulation zulässt. Das Enzym aus *M. tuberculosis* zeigt bei allen Bedingungen eine stabile, hohe Aktivität. Bei der

TPS aus *S. cerevisiae* ist eine geringe, aber signifikante Aktivität messbar. Es konnte hierbei kein Effekt von DNA beobachtet werden, aber anscheinend wird dieses Enzym durch hohe NaCl-Konzentrationen inaktiviert.

In einem weiteren Versuch wurde in EMSA-Experimenten eine Bindung der verschiedenen Trehalose-Phosphat-Synthasen an DNA untersucht. Dazu wurden 75 ng des bereits zuvor verwendeten DNA-Fragmentes (233 Bp) mit jeweils 0,75 µg der Trehalose-Phosphat-Synthasen inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Kontrolle wurde das GgpS-Protein eingesetzt (siehe Abbildung 3.28).



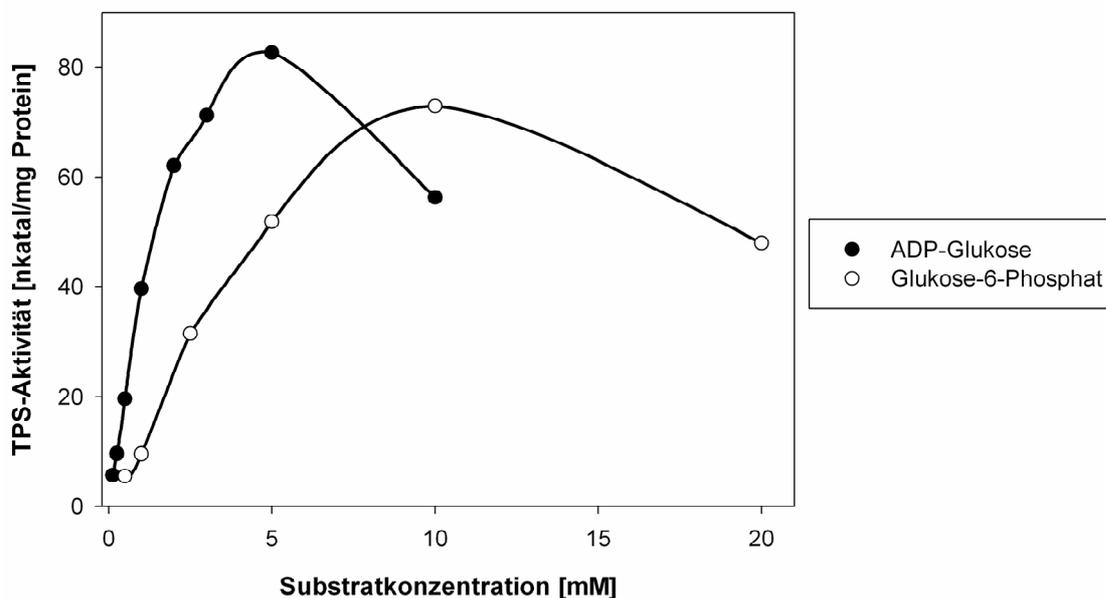
**Abbildung 3.28: Untersuchung der Bindung der Trehalose-Phosphat-Synthasen an DNA.**

Gezeigt ist das Agarosegel (2%) der EMSA-Studien. Dabei wurden 75 ng eines DNA-Fragments ohne (Kontrolle) oder mit jeweils 0,75 µg der Trehalose-Phosphat-Synthasen aus *E. coli*, *M. tuberculosis*, *C. glutamicum* und *S. cerevisiae* inkubiert. Als weitere Kontrolle wurde das DNA-Fragment mit 0,75 µg GgpS versetzt.

In diesem Experiment zeigt neben der GgpS lediglich die TPS aus *M. tuberculosis* eine Bindung an das DNA-Fragment. Dabei ist die Größenverschiebung der DNA-Bande mit dem Effekt des GgpS-Proteins vergleichbar.

In den vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der TPS aus *C. glutamicum* durch DNA beeinflusst wird und für die TPS aus *M. tuberculosis* eine Bindung an DNA nachweisbar ist. Beide Beobachtungen könnten auf einen zur GgpS-Regulation vergleichbaren Mechanismus hindeuten. In den folgenden Versuchen wurde zunächst die TPS aus *C. glutamicum* näher untersucht.

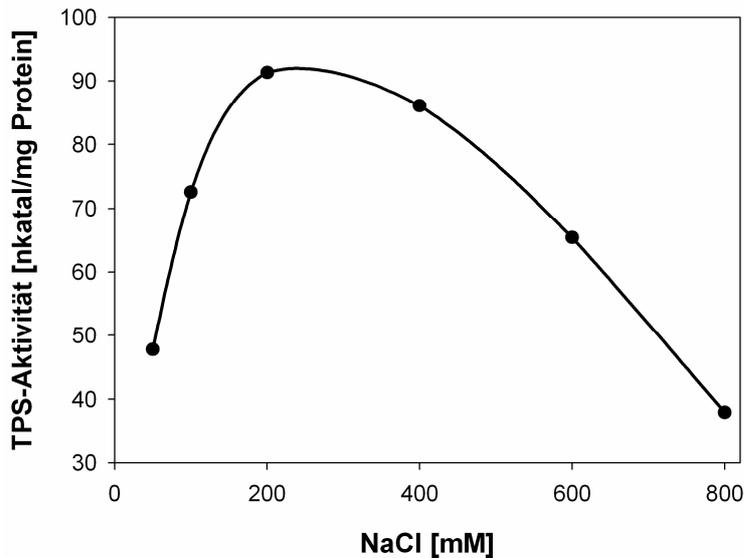
Da dieses Enzym bisher nicht biochemisch charakterisiert wurde, mussten zuerst die optimalen Versuchsbedingungen ermittelt werden. Im folgenden Versuch wurde getestet, welche Konzentrationen der Substrate ADP-Glukose und Glukose-6-Phosphat für eine optimale Aktivität eingesetzt werden mussten. Dazu wurden steigende Konzentrationen der Substrate eingestellt und der Enzymtest mit 0,5  $\mu\text{g}$  TPS durchgeführt (siehe Abbildung 3.29). Die Konzentration des jeweiligen zweiten Substrats wurde dabei konstant gehalten. Nach 12 min wurde der Test gestoppt. Die Enzymaktivität war bei dieser Proteinmenge über einen Zeitraum von 30 min linear (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.29: Untersuchungen zur optimalen Substratkonzentration der TPS aus *C. glutamicum*.** Gezeigt ist die Aktivität der TPS aus *C. glutamicum* in Abhängigkeit von der Konzentration der Substrate ADP-Glukose (●) und Glukose-6-Phosphat (○). Für das jeweilige zweite Substrat wurde eine konstante Konzentration von 10 mM (Glukose-6-Phosphat) oder 5 mM (ADP-Glukose) eingestellt.

Die Aktivitätskurve für ADP-Glukose zeigt, dass eine maximale Enzymaktivität von ca. 80 nkatal/mg TPS bei einer Substratkonzentration von 5 mM erreicht wird. Dabei beträgt der  $K_m$ -Wert 1 mM. Bei höheren Konzentrationen wird die Aktivität inhibiert. Die optimale Konzentration von Glukose-6-Phosphat liegt bei 10 mM, für dieses Substrat liegt der  $K_m$ -Wert bei 4,5 mM. Auch hier hemmen höhere Substratkonzentrationen die Aktivität der TPS. In den weiteren Versuchen wurden die hier ermittelten Konzentrationen von 5 mM für ADP-Glukose und 10 mM für Glukose-6-Phosphat eingesetzt.

Da in vorherigen Experimenten NaCl einen aktivierenden Effekt auf die TPS-Aktivität gezeigt hat, wurde im folgenden Experiment die Enzymaktivität bei NaCl-Konzentrationen von 50 - 800 mM untersucht (siehe Abbildung 3.30).



**Abbildung 3.30: Einfluss der NaCl-Konzentration auf die Aktivität der TPS aus *C. glutamicum*.** Gezeigt ist die Aktivität der TPS *C. glutamicum* in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration. Es wurde ein Bereich von 50 - 800 mM NaCl untersucht.

Es ist erkennbar, dass eine Erhöhung der Salzkonzentration einen deutlichen Effekt auf die Aktivität der TPS aus *C. glutamicum* hat. Die Enzymaktivität steigt dabei abhängig von der NaCl-Konzentration an und erreicht ein Maximum von 90 nkatal/mg Protein bei 200 mM NaCl. Bei höheren Konzentrationen löst NaCl eine Verringerung der Enzymaktivität aus. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass diese Trehalose-Phosphat-Synthase die Aktivität direkt an die vorliegende NaCl-Konzentration anpassen kann.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Trehalose-Phosphat-Synthasen aus *M. tuberculosis* und *C. glutamicum* eine Interaktion mit DNA eingehen oder ihre Aktivität durch das Polyanion beeinflusst wird. Im Rahmen der Bachelorarbeit von Frau Natalie Brühl, die an dieses Thema angegliedert wurde, wird der Effekt von DNA auf diese und weitere Glukosyltransferasen weitergehend untersucht. Unter den dabei untersuchten Enzymen befinden sich auch GgpS-Proteine, die aus marinen Cyanobakterien stammen und die Synthese von GG als Antwort auf erhöhte Salzkonzentrationen katalysieren.

Die bisherigen Ergebnisse der Bachelorarbeit weisen darauf hin, dass bei den TPS aus *M. tuberculosis* und *C. glutamicum* ein Einfluss von DNA auf die Enzymaktivität nachweisbar ist, dieser unterscheidet sich jedoch von dem Regulationsmechanismus des GgpS-Proteins (Daten nicht gezeigt).

Neben der Regulation der GgpS durch Polyanionen wird auch die Aktivität der Trehalose-Phosphat-Synthasen aus *M. tuberculosis* und *C. glutamicum* durch DNA beeinflusst. Die Regulation der Enzymaktivität durch eine salzmodulierte Nukleinsäure-Bindung wird zur Zeit

auch bei anderen Glukosyltransferasen untersucht, um eine Universalität des für die GgpS beschriebenen Mechanismus zu bestätigen.

## 4. Diskussion

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung der Regulation der GgpS-Aktivität in *Synechocystis* bei niedrigen Salzkonzentrationen und bei der Anpassung des Cyanobakteriums an höhere Salzkonzentrationen. Der Mechanismus einer salzabhängigen Einstellung des Osmolytpools wurde in vielen Organismen weitreichend untersucht, konnte jedoch bisher nicht aufgeklärt werden. In dieser Arbeit werden die experimentellen Grundlagen für ein Modell vorgestellt, das sowohl die schnelle Antwort der Osmolyt-Synthese in *Synechocystis* nach einem Salzschock als auch die *steady-state*-Regulation des internen Osmolytpools in Abhängigkeit von der externen Salzkonzentration erklärt. Dabei stellt die zugrunde liegende Hemmung des GgpS-Proteins durch die Bindung an Nukleinsäuren ein bisher unbeschriebenes Prinzip auf dem Gebiet der Osmoregulation dar.

### 4.1 Die Regulation der GgpS durch Glukose-haltige Osmolyte könnte durch einen allosterischen Feedback-Mechanismus erfolgen

Die Regulation der GgpS-Aktivität unter *steady-state*-Bedingungen wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit von Marit Stirnberg untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass GG eine Feedback-Inhibition der GgpS-Aktivität verursacht. Die Regulation von Enzymen durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus ist weit verbreitet, um die übermäßige Synthese oder Aufnahme von Metaboliten zu verhindern. Der Mechanismus besteht dabei in der dosisabhängigen Regulation, bei der die Aktivität der Enzyme an die vorliegende Konzentration des Metaboliten angepasst wird (Pardee und Reddy, 2003). Ein Beispiel für diese Aktivitätsmodulation im Bereich der Osmoregulation stellt der Transporter QacT aus *Lactobacillus plantarum* dar, der bei erhöhten Salzkonzentrationen den zellinternen Osmolyt-Pool durch die Aufnahme von Glycinbetain und Prolin aus dem externen Medium steuert (Glaasker *et al.*, 1998). Die Aufnahmerate dieses Systems wird dabei direkt durch die Konzentration der Osmolyte in der Zelle reguliert. Diese Regulation konnte auch für die Glycinbetain-Aufnahme in *Staphylococcus aureus* gezeigt werden (Pourkomialian und Booth, 1994; Stimeling *et al.*, 1994). Eine dosisabhängige Inhibition der GgpS-Aktivität durch GG wurde auch für die GgpS beschrieben (Stirnberg, 2006).

Im Falle der GgpS konnte die Feedback-Hemmung durch GG *in vitro* durch die Zugabe von NaCl aufgehoben werden (Stirnberg, 2006). Durch diese modulierte Inhibition sollte die Einstellung des GG-Pools unter *steady-state*-Bedingungen in Abhängigkeit der NaCl-

Konzentration erfolgen. Unter *in vivo*-Bedingungen wurde ebenfalls beobachtet, dass eine Akkumulation von Trehalose in den Zellen die Synthese von GG unterbindet. Dies wurde sowohl für die Aufnahme durch den ABC-Transporter GgtA als auch die *de novo*-Synthese von Trehalose in *Synechocystis* untersucht (Mikkat *et al.*, 1997; Stirnberg, 2006). Dabei wurde die Bildung von Trehalose durch ein chimäres Protein aus der Trehalose-Phosphat-Synthase aus *M. tuberculosis* und der Trehalose-Phosphat-Phosphatase aus *E. coli* in *Synechocystis* katalysiert. Die Aktivität des Trehalose-synthetisierenden Systems wurde hierbei an die externe Salzkonzentration angepasst, wie dies auch für die GG-Synthese der Fall ist. Die Hemmung der GgpS durch Trehalose konnte auch *in vitro* gezeigt werden (Stirnberg, 2006).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Inhibition der GgpS durch Trehalose und GG ein vergleichbarer Mechanismus zugrunde liegt. Auch die in dieser Arbeit gezeigte Modulation der Trehalose-Inhibition in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration unterstützt diese Hypothese (siehe Abbildung 3.6).

Es wurde bisher angenommen, dass die beobachtete Feedback-Inhibition der GgpS durch einen kompetitiven Mechanismus hervorgerufen wird. Dabei sollte GG im aktiven Zentrum der GgpS binden und somit die Umsetzung der beiden Substrate verhindern. Für diesen Mechanismus spricht auch, dass die stärkste Hemmung der GgpS durch die Osmolyte Trehalose, Maltose und Glukose ausgelöst wurde (siehe Abbildung 3.4). Im Vergleich mit GG haben diese annähernd die gleiche Größe, zudem enthalten alle einen Glukose-Rest. Aufgrund dieser Charakteristika könnten diese Substanzen ein oder beide Substrate aus dem katalytischen Zentrum der GgpS kompetitiv verdrängen. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde der Mechanismus der Hemmung durch die Bestimmung der kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  näher untersucht. Bei einer kompetitiven Hemmung sollte sich lediglich der apparente  $K_m$ -Wert ändern, da die Bindung der Substrate durch den Kompetitor beeinflusst wird. Die maximale Enzymaktivität wird bei dieser Hemmung nicht beeinträchtigt. Für beide Substrate konnte nachgewiesen werden, dass sich sowohl der  $K_m$ - als auch der  $V_{max}$ -Wert in Anwesenheit von Trehalose ändert (siehe Abbildung 3.7). Eine Konkurrenz kann somit ausgeschlossen werden, die Ergebnisse deuten eher auf eine gemischte Inhibition hin. Die bisher angenommene Bindung der Osmolyte an das aktive Zentrum kann somit widerlegt werden.

Anhand dieser Ergebnisse kommen zwei mögliche Inhibitionsmechanismen in Frage. Die Hemmung könnte zum einen durch die Bindung der Osmolyte an ein oder mehrere allosterische Zentren der GgpS ausgelöst werden. Dies könnte eine Konformationsänderung

der GgpS bewirken und die Aktivität des Enzyms hemmen. Zum anderen könnte die generelle Interaktion von kompatiblen Soluten mit Proteinoberflächen für die Inhibition verantwortlich sein. Kompatible Solute haben zwar in den meisten Fällen einen stabilisierenden Effekt auf Proteine und andere Zellstrukturen wie z.B. Membranen (Crowe *et al.*, 1984; Singer und Lindquist, 1998), dennoch wäre es im Falle der GgpS möglich, dass diese Interaktion eine Inhibition der Enzymaktivität zur Folge hat. Anhand der vorliegenden Daten kann letztere Hypothese für den Effekt der kompatiblen Solute ausgeschlossen werden. Bei den untersuchten Substanzen löste Glycinbetain zwar eine starke Inhibition der GgpS aus, aber die kompatiblen Solute Glycerin, Prolin und auch Inositol zeigten keinen signifikanten Effekt (siehe Abbildung 3.4). Da der Wirkmechanismus der kompatiblen Solute prinzipiell über eine Stabilisierung der Hydrathülle zustande kommt (Bolen und Baskakov, 2001), müssten alle diese Substanzen eine ähnliche Hemmung hervorrufen. Dies ist nicht der Fall. Im Gegensatz dazu ist eine allosterische Interaktion wahrscheinlicher. Die am stärksten hemmenden Osmolyte waren Glukose, Trehalose und Maltose. Aufgrund der gemeinsamen Charakteristika dieser Substanzen in Bezug auf Struktur und Größe kann man zu dem Schluss kommen, dass eine spezifische Bindung der Osmolyte die Hemmung der GgpS-Aktivität auslöst. Dabei scheint insbesondere der Glukoserest eine wichtige Rolle zu spielen, den diese Substanzen gemeinsam haben. Zusammengefasst weisen die vorgelegten Ergebnisse darauf hin dass die beobachtete Hemmung der GgpS durch GG und auch Trehalose durch die Bindung dieser Osmolyte an eine oder mehrere allosterische Bindestellen verursacht wird. Mittels limitierter Proteolyse durch Trypsin wurde versucht, eine dabei ausgelöste Konformationsänderung der GgpS nachzuweisen. Durch diese Methode konnte auch eine Änderung der Proteinstruktur der Nikotinsäure-Phosphoribosyltransferase aus *Salmonella typhimurium* aufgrund einer ATP-Bindung identifiziert werden (Rajavel *et al.*, 1996). Das Abbaumuster des GgpS-Proteins wurde in An- oder Abwesenheit von Glukose untersucht, ein Unterschied konnte unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht nachgewiesen werden. Dennoch sollte eine Konformationsänderung in weiteren Experimenten, die auch den Nachweis von geringen strukturellen Veränderungen ermöglichen, untersucht werden. Dazu könnte eine limitierte Proteolyse mit anderen Proteasen, wie z.B. Chymotrypsin, durchgeführt werden. Da das GgpS-Protein auch bei Raumtemperatur und in hohen Konzentrationen über mehrere Tage stabil ist, käme auch eine Strukturaufklärung durch Röntgenstrukturanalyse in Frage.

Die Hemmung der GgpS-Aktivität durch Trehalose und vermutlich auch durch GG wird nicht durch einen kompetitiven Mechanismus verursacht. Eine allosterische Hemmung ist hierbei

wahrscheinlich. Insbesondere die Modulation dieser Hemmung durch Salz könnte eine wichtige Rolle bei der Anpassung der GgpS-Aktivität bei der Akklimatisierung an die externe Salzkonzentration spielen und stellt einen bisher nicht beschriebenen Mechanismus der Aktivitätsregulation dar.

#### 4.2 Der Inhibitor der Osmolytsynthese ist kein Protein, sondern Nukleinsäuren

Bereits bei der Entdeckung der GG-Synthese in *Synechocystis* wurde beobachtet, dass die Enzymaktivität im Zellextrakt sehr gering war (Hagemann *et al.*, 1994). Die GG-Synthese konnte dabei durch die Zugabe von NaCl um mindestens den Faktor 50 gesteigert werden. Daraus wurde gefolgert, dass der Zellextrakt einen hemmenden Faktor enthalten musste, dessen Effekt durch Salz aufgehoben wird. Auch nach der Identifikation des GgpS-Proteins als Mediator der Osmolytsynthese durch Marin (1998) wurde diese Hypothese aufrechterhalten. Weiterhin wurde gezeigt, dass der inhibitorische Faktor nach der Reinigung der GgpS durch Ionenaustausch-, Größenausschluss- oder Affinitätschromatographie verloren geht und die Enzymaktivität keine Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration mehr zeigt (Hagemann *et al.*, 2001). Anhand dieser Ergebnisse wurde die direkte Interaktion mit einem regulatorischen Protein oder eine posttranslationale Modifikation der GgpS als Mechanismus für den Effekt des Zellextraktes postuliert. Diese Hypothese war durchaus gerechtfertigt, da bereits für verschiedene Glukosyltransferasen aus Spinat oder der Bäckerhefe *S. cerevisiae* gezeigt werden konnte, dass der Phosphorylierungsstatus der Proteine bei deren Regulation eine Rolle spielt (Toroser und Huber, 1997; Londesborough und Vuorio, 1991).

Der Einfluss des Phosphorylierungsstatus der GgpS auf die Enzymaktivität wurde von Jana Huckauf untersucht, dabei konnte jedoch kein Zusammenhang mit der Aktivitätsregulation nachgewiesen werden (Dissertation, 2003). Weiterhin wurde versucht, das putative regulatorische Protein durch Immunopräzipitation, Fraktionierung des Zellextraktes und Yeast-Two-Hybrid-Experimente nachzuweisen. Auch diese Versuche führten nicht zur Identifikation des inhibitorischen Faktors.

In dieser Arbeit wurde ein systematischer Ansatz durchgeführt, um zunächst die biochemische Natur des hemmenden Faktors einzugrenzen. Einen wichtigen Hinweis darauf lieferte die Inhibition der GgpS durch die Zellextrakte von anderen Mikroorganismen (siehe Abbildung 3.8). Diese war mit der Hemmung durch *Synechocystis*-Zellextrakt vergleichbar und konnte auch durch die Zugabe von NaCl aufgehoben werden. Dies deutet darauf hin, dass der Effekt durch den gleichen Mechanismus ausgelöst wird. Weiterhin macht diese

Beobachtung auch die Hemmung durch ein Protein unwahrscheinlich, da dieses in allen getesteten Mikroorganismen vorkommen und zusätzlich ein Enzym aus einem phylogenetisch weit entfernten Cyanobakterium hemmen müsste. Um diese Möglichkeit zweifelsfrei auszuschließen, wurden alle proteinogenen Bestandteile des Zellextraktes entfernt. Dies gelang durch den Einsatz von ProteinaseK, ein Trypsinverdau führte nur zu einem unvollständigen Abbau. Die Hemmung durch den unbekanntem Faktor wurde davon nicht beeinflusst (siehe Abbildung 3.10). Dies zeigt, dass ein Protein als negativer Regulator nicht in Frage kommt. Gleichzeitig kann auch die posttranslationale Modifikation der GgpS ausgeschlossen werden. Diese lange verfolgte Hypothese kann anhand dieser Ergebnisse widerlegt werden.

Der hemmende Faktor muss dementsprechend ein anderer Bestandteil des Zellextraktes sein. Die unterschiedlichen Behandlungen des Zellextraktes zeigen, dass der Faktor sehr stabil sein muss, da er beim Erhitzen und auch bei der Fällung durch Aceton seine hemmende Wirkung nicht verliert (siehe Abbildung 3.9). Ausserdem konnte er keine niedermolekulare Substanz sein, da diese durch die Entsalzung mittels der PD10-Säule entfernt wurden. Der Inhibitor muss in großen Mengen in der Zelle vorliegen. Darauf deuten Ergebnisse von Marit Stirnberg hin, da bei einer Überexpression der GgpS in der  $ggs^+$ -Mutante das Protein zwar in hohen Konzentrationen vorlag, dabei aber unter salzarmen Bedingungen ebenso wie im Wildtyp inaktiv war. Das Protein konnte durch einen Salzschock aktiviert werden und die Rate der GG-Synthese war höher als im Wildtyp. Dies spricht dafür, dass das Protein nicht durch die starke Überexpression beeinflusst wurde, sondern durch den gleichen Faktor wie im Wildtyp inhibiert wurde. Nach diesen Überlegungen konnte prinzipiell lediglich die Interaktion mit den Membranbestandteilen oder den Nukleinsäuren eine Rolle spielen. Ein Effekt von *E. coli*-Liposomen (siehe Abbildung 3.11) konnte nicht nachgewiesen werden. Auch die Entfernung der Membranbestandteile durch Ultrazentrifugation hatte keinen Einfluss auf die hemmende Wirkung des Zellextraktes (Daten nicht gezeigt). Die Membranen spielen dementsprechend keine Rolle bei der Hemmung der GgpS-Aktivität.

Nachdem auch Membranen als inhibitorische Faktoren ausgeschlossen werden konnten, wurde der Einfluss von Nukleinsäuren auf die GgpS-Aktivität untersucht. Der Zellextrakt wurde zwar mit DnaseI behandelt, ein unvollständiger Verdau der genomischen DNA könnte jedoch Oligonukleotide entstehen lassen. Das Vorhandensein solcher Oligonukleotide könnte auch erklären, warum keine der HPLC-Fractionen eine Hemmung ausgelöst hat (siehe Abbildung 3.12). Die Oligonukleotide würden aufgrund ihrer verschiedenen Größen und Nukleinsäuresequenzen unterschiedlich aufgetrennt werden, was zu einer starken Verdünnung

führen würde. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde die GgpS-Aktivität in Anwesenheit von Hexanukleotiden untersucht (siehe Abbildung 3.13). Tatsächlich lösten die Oligonukleotide eine Hemmung der Enzymaktivität aus. Diese konnte durch die Zugabe von NaCl aufgehoben werden und weist dementsprechend die gleichen Charakteristika wie die Inhibition durch den Zellextrakt auf. Eine photometrische Messung ergab, dass der Zellextrakt tatsächlich eine hohe Konzentration an Nukleinsäuren enthielt, die für den hemmenden Effekt verantwortlich waren.

Die Ergebnisse belegen, dass es sich bei dem inhibitorischen Faktor des Zellextraktes, der für die *in vitro*-Inaktivierung der GgpS verantwortlich ist, um Nukleinsäuren handelt. Damit konnte der hemmende Faktor erfolgreich identifiziert werden.

#### 4.3 Die schnelle Antwort und die *steady-state*-Regulation der Osmolytsynthese wird durch die Hemmung der GgpS-Aktivität durch Nukleinsäuren vermittelt

Die Regulation der GgpS-Aktivität in *Synechocystis* unter erhöhten Salzbedingungen wird in zwei Phasen eingeteilt. Bei einem Salzschock werden zunächst präformierte GgpS-Proteine vollständig aktiviert. Diese sogenannte schnelle Antwort führt zu einer maximalen GG-Syntheserate. Bei der Akklimatisierung an längerfristig erhöhte NaCl-Konzentrationen wird die Aktivität der GgpS an die vorliegende Salzkonzentration angepasst. Dadurch wird die Osmolalität zwischen externem Medium und dem Cytoplasma durch die Einstellung des GG-Pools ausgeglichen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Interaktion der GgpS mit Nukleinsäuren einen Regulationsmechanismus für beide Phasen darstellen könnte. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von DNA eine dosisabhängige Hemmung der GgpS-Aktivität verursacht. Dies wurde von Jana Huckauf und im Rahmen dieser Arbeit (Daten nicht gezeigt) bei der Inhibition durch den Zellextrakt ebenfalls beobachtet und unterstützt zusätzlich die Schlussfolgerung, dass die GgpS-Hemmung ausschließlich durch die enthaltenen Nukleinsäuren verursacht wird. Bei Zugabe von NaCl findet die Inhibition durch DNA nicht mehr statt (siehe Abbildung 3.14). Überträgt man dieses Ergebnis auf die physiologische Ebene, kann damit die schnelle Antwort der Osmolytsynthese erklärt werden. Das GgpS-Protein wird bei geringen Salzkonzentrationen in den Zellen durch die Anwesenheit von Nukleinsäuren gehemmt. Da diese in hohen Konzentrationen vorliegen, kann diese Hemmung auch bei einer Überexpression des GgpS-Proteins beobachtet werden (Stirnberg, 2006). Nach einem Salzschock steigt die interne Ionenkonzentration stark an

(Blumwald *et al.*, 1983). Dieser Anstieg hebt die Interaktion zwischen der GgpS und den Nukleinsäuren auf und aktiviert die GG-Synthese.

Auch die Regulation der GG-Synthese unter *steady-state*-Bedingungen ist durch die GgpS/Nukleinsäure-Interaktion erklärbar. Dabei ist insbesondere die Modulation der GgpS-Aktivität in Abhängigkeit von der Salzkonzentration grundlegend. Es konnte gezeigt werden, dass die GgpS nicht ab einem bestimmten Schwellenwert maximal aktiv war, sondern die Aktivität in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration moduliert wird (siehe Abbildung 3.18). Dies bedeutet, dass bei jeder Salzkonzentration eine bestimmte GgpS-Aktivität eingestellt wird. Da die interne Ionenkonzentration in salzakklimatisierten Zellen direkt vom Salzgehalt des Mediums abhängig ist, (Hagemann *et al.*, 1994; Reed *et al.*, 1985b), kann durch diesen Mechanismus der interne GG-Pool an unterschiedliche Salzkonzentrationen angepasst werden. Im Rahmen der durchgeführten Versuche konnten DNA-Konzentrationen von 0,3125 - 2,5 µg/µl eingesetzt werden. Die tatsächliche Nukleinsäurekonzentration in *Synechocystis*-Zellen liegt jedoch mit ca. 28 µg/µl deutlich höher (Hagemann *et al.*, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktivierung der GgpS durch NaCl direkt von der DNA-Konzentration abhängig ist. Unter physiologischen Bedingungen wird also vermutlich eine weitaus höhere NaCl-Konzentration als 200 mM für eine vergleichbare Reaktivierung benötigt. Dies würde eine Anpassung an die höheren Salzkonzentrationen erlauben, die in salzakklimatisierten Zellen bei bis zu 800 mM (Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Ionen) liegen können (Hagemann *et al.*, 1994).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die salzmodulierte Interaktion der GgpS mit Nukleinsäuren sowohl bei der schnellen Antwort auf einen Salzschock als auch bei der Akklimatisierung von *Synechocystis* an erhöhte Salzkonzentrationen eine wichtige, wenn nicht sogar die hauptsächliche Rolle spielt. Damit wäre die GgpS nicht nur Sensor des Salzstresses, sondern auch der direkte Regulator des Osmolytpools.

#### 4.4 Die Inhibition der GgpS-Aktivität wird durch eine Bindung des Proteins an das Nukleinsäurerückgrat verursacht

Die Interaktion der GgpS mit Nukleinsäuren spielt bei der Anpassung von *Synechocystis* an Salzstress eine wichtige Rolle. Der biochemische Mechanismus, der dieser Interaktion zugrunde liegt, ist jedoch unbekannt. Die naheliegendste Erklärung für die bisherigen Ergebnisse wäre eine Bindung der GgpS an DNA oder auch RNA. Diese Hypothese wurde in EMSA-Experimenten untersucht und tatsächlich konnte eine Bindung des GgpS-Proteins

sowohl an DNA als auch RNA nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.19). Diese Bindung fand in Anwesenheit von NaCl nicht statt. Dies weist darauf hin, dass die beobachtete Hemmung der GgpS-Aktivität durch die Bindung an Nucleinsäuren verursacht wird.

Beim Mechanismus dieser Interaktion kommen zwei unterschiedliche Möglichkeiten in Frage. Zum Einen könnte ein bestimmtes Sequenzmotiv eine Rolle spielen, wie dies z.B. bei Transkriptionsfaktoren der Fall ist. Ebenfalls ist die unspezifische Bindung des Proteins an die DNA oder RNA denkbar. Ein Beispiel für eine unspezifische Interaktion mit DNA ist das Protein ParA<sub>1</sub>. Diese ATPase spielt eine wichtige Rolle bei der Chromosomensegregation in *C. glutamicum* und bindet unabhängig von der Sequenz an das Chromosom des Bakteriums (Schwaiger, 2009).

Die gezeigten Daten deuten stark darauf hin, dass im Falle des GgpS-Proteins ebenfalls eine unspezifische Bindung an Nucleinsäuren vorliegt. In Bezug auf die GgpS-Aktivität konnte beobachtet werden, dass die untersuchten Hexanukleotide unabhängig von der Sequenz eine vergleichbare Hemmung ausgelöst haben. Auch die EMSA-Experimente unterstützen diese Hypothese. Das in Abschnitt 3.3.3 eingesetzte DNA-Fragment besteht aus einer Teilsequenz des lacZ-Gens, das in *Synechocystis* nicht vorhanden ist. Selbst wenn dieses Fragment zufällig das Bindemotiv für die GgpS enthalten würde, könnte dadurch trotzdem nicht die massive Größenzunahme und die diffuse Verteilung der DNA erklärt werden. Bei der Bindung von einem oder wenigen GgpS-Molekülen würden sich klar abgegrenzte Banden ergeben und auch die Veränderung der Größe wäre geringer, wie z.B. im Falle des Transkriptionsfaktors RamA (Cramer und Eikmanns, 2007). Die diffuse DNA-Verteilung stellt eher Zwischenstufen von Fragmenten mit einer unterschiedlichen Anzahl an gebundenen GgpS-Molekülen dar. Einzelne spezifische Bindemotive können in diesem Versuch dementsprechend ausgeschlossen werden.

Die sequenzunabhängige Bindung legt nahe, dass eine Interaktion mit dem negativ geladenen Rückgrat der Nucleinsäuren stattfindet. Die GgpS enthält 67 Histidin-, Lysin- und Argininreste, die bei physiologischen pH-Werten positiv geladen sind. Diese befinden sich hauptsächlich an der Oberfläche des Proteins und bilden dabei positiv geladene Bereiche (Strukturvorhersage, Daten nicht gezeigt). Eine elektrostatische Wechselwirkung des negativ geladenen DNA-Rückgrats und der GgpS-Oberfläche ist also möglich. Für diese Hypothese spricht ebenfalls, dass die Bindung in Anwesenheit von NaCl nicht zustande kommt. Bei einer Erhöhung der Ionenstärke durch Zugabe von NaCl würde die ionische Wechselwirkung zwischen der GgpS und der DNA geschwächt und das Protein freigesetzt werden.

Bei der beschriebenen Interaktion scheint jedoch nicht nur die negative Ladung, sondern auch die Struktur der DNA eine Rolle zu spielen. Die untersuchten *E. coli*-Liposomen besitzen zwar ebenfalls eine hauptsächlich negativ geladene Oberfläche, hatten jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität der GgpS. Im Gegensatz dazu gleicht die Hemmung der GgpS durch Heparin dem Effekt von DNA (siehe Abbildung 3.15). Dieses Polyanion ähnelt in seiner Ladungsverteilung der DNA und ist ebenfalls in der Lage, eine helikale Struktur auszubilden. Diese scheint bei der Bindung der GgpS neben der negativen Ladung eine wichtige Rolle zu spielen. Auch im Fall von Heparin konnte eine hochaffine Bindung des GgpS-Proteins nachgewiesen werden, die vermutlich ebenso wie bei den untersuchten Nukleinsäuren für den hemmenden Effekt verantwortlich ist (siehe Abbildung 3.21).

Die Bindung an Heparin wurde auch schon für die Trehalose-Phosphat-Synthasen aus *S. cerevisiae* und *M. smegmatis* gezeigt (Londesborough *et al.*, 1993; Pan *et al.*, 1996). Die Interaktion mit Polyanionen könnte somit charakteristisch für die Enzymklasse der Glukosyltransferasen sein.

Während die spezifische Bindung von Proteinen an DNA und auch RNA in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht wurde, existieren nur wenige Beispiele einer unspezifischen Wechselwirkung. Über einen langen Zeitraum wurde angenommen, dass primär die spezifische Bindung bei der Funktionalität von Protein-DNA-Wechselwirkung wichtig ist, weswegen die Forschung an einer sequenzunabhängigen Interaktion vernachlässigt wurde. Dennoch bestehen Hinweise darauf, dass die elektrostatische Wechselwirkung von Proteinen mit Nukleinsäuren oder anderen Polyanionen wie z.B. Actin, Tubulin oder Proteoglycanen im Zytoplasma oder der extrazellulären Matrix der Zelle eine Rolle bei verschiedenen Regulationsmechanismen spielen könnte (Salamat-Miller *et al.*, 2006). Für verschiedene Mitglieder einer großen Gruppe von eukaryotischen Wachstumsfaktoren, den FGFs (*fibroblast growth factor*), wurde die Bindung an das Polyanion Heparin nachgewiesen, wie bei FGF-1 und FGF-2 aus Chondrosarkom-Zellen (Shing *et al.*, 1984). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Interaktion mit Heparin die mitogene Aktivität des FGF-1, wenn auch nur leicht, steigert (Pye *et al.*, 2000). Im Falle des FGF-1 wurde die Bindung an das Polyanion Heparansulfat auch durch Röntgenstrukturanalyse gezeigt (Yeh *et al.*, 2002). Diese Polyanionen-bindenden Proteine (PABs) stellen dabei keinesfalls eine Ausnahme dar. Bei Microarray-Versuchen wurden 4895 humane Proteine hinsichtlich der Bindung an Polyanionen getestet, dabei wurden über 700 als Polyanionen-Bindeproteine identifiziert. Zusätzliche Untersuchungen belegen, dass auch bei diesen Proteinen wie im Falle der GgpS die Bindung an Polyanionen durch NaCl vermindert wird (Salamat-Miller *et al.*, 2007). Trotz

der Identifikation dieser Proteine als PABs konnte jedoch lediglich bei dem FGF-1-Protein eine schwache Korrelation der Proteinaktivität mit der Bindung an Heparin nachgewiesen werden. Im Fall der GgpS konnte im Gegensatz dazu ein starker Zusammenhang der Aktivität mit der Bindung an Polyanionen wie DNA und Heparin gezeigt und dieser Interaktion eine physiologische Rolle zugeordnet werden. Damit stellt die GgpS bezüglich der Aktivitätsregulation das zur Zeit am besten charakterisierte Polyanionen-Bindeprotein dar.

Neben den bisher diskutierten *in vitro*-Untersuchungen der GgpS-Aktivität konnte auch in *Synechocystis*-Zellen eine Bindung des Proteins an Nukleinsäuren nachgewiesen werden. In den beschriebenen SPINE-Experimenten konnten nach einem Formaldehyd-Crosslinking erhebliche Mengen an Nukleinsäuren zusammen mit dem GgpS-Protein gereinigt werden (siehe Tabelle 3.1). In Übereinstimmung mit der Hypothese der salzabhängigen Bindung wurde tatsächlich bei an 3% NaCl akklimatisierten Zellen ein geringeres Verhältnis zwischen gereinigtem GgpS-Protein und der Menge an Nukleinsäuren nachgewiesen als bei Zellen, die bei niedrigen Salzkonzentrationen kultiviert wurden. Für eine *in vivo*-Bindung sprechen auch Ergebnisse von Jana Huckauf, in denen bei einer Auftrennung von *Synechocystis*-Zellextrakt mittels einer nativen PAGE das GgpS-Protein in einem höhermolekularen Komplex nachweisbar war (Huckauf, 2003). Dieser wurde als Homooligomer des GgpS-Proteins oder Heterooligomer der GgpS mit anderen Proteinen interpretiert. Auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse ist jedoch die Bindung an genomische DNA wahrscheinlicher, da der beobachtete Komplex sehr groß war.

Das GgpS-Protein bindet sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an Nukleinsäuren und Heparin. Diese unspezifische Interaktion beruht vermutlich auf einer elektrostatischen Wechselwirkung der GgpS-Oberfläche mit den negativ geladenen Bereichen dieser Moleküle und wird durch die Anwesenheit von NaCl beeinflusst. Zusätzlich scheint die helikale Struktur der Interaktionspartner eine Rolle zu spielen. Die Bindung der GgpS an Polyanionen ist dabei die Ursache für die beobachtete Inhibition der Enzymaktivität durch DNA und Heparin. Aufgrund dieser Charakteristika gehört das GgpS-Protein zu den Polyanionen-Bindeproteinen und stellt den zur Zeit am besten untersuchten Vertreter dieser großen Gruppe dar.

#### 4.5 Die Nukleinsäuren hemmen nicht durch eine Interaktion mit dem aktiven Zentrum der GgpS

Nach der Identifikation der Polyanionen-Bindung als Ursache für die Inhibition der GgpS sollte der Mechanismus dieses Effekts aufgeklärt werden. Die Bindung der GgpS an das DNA-

Fragment zeigte in den EMSA-Experimenten einen sigmoidalen Verlauf, dies konnte auch bei der NaCl-Reaktivierung der GgpS-Aktivität bei Inhibition durch DNA beobachtet werden (siehe Abbildung 3.20 bzw. 3.18). Dies deutet auf einen kooperativen Mechanismus hin. Dabei könnte die Ausbildung von Homooligomeren des GgpS-Proteins eine Rolle bei der Regulation spielen. Eine Interaktion von GgpS-Proteinen konnte auch zuvor in Yeast-Two-Hybrid-Experimenten nachgewiesen werden (Stirnberg *et al.*, 2007).

Die Oligomerisierung und der Einfluss von DNA auf diesen Prozess wurde durch Crosslinking-Experimente mit Formaldehyd untersucht (siehe Abbildung 3.24). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die GgpS in Abwesenheit von DNA unter den gewählten Versuchsbedingungen Di-, Tri- und Tetramere ausbildet. Der Anteil der nachgewiesenen Oligomere ist jedoch in Bezug auf die eingesetzte GgpS-Menge relativ gering, da auch nach 40 min noch der Großteil des Proteins als Monomer vorliegt. Im Gegensatz dazu wird nach Zugabe von DNA die Oligomerisierung stark beschleunigt, nach 25-35 min ist bereits der Großteil der GgpS-Proteine zu höheren Oligomeren vernetzt. Da in der Zelle hohe Konzentrationen von Nukleinsäuren und anderen Polyanionen vorliegen, könnte dieser Effekt durchaus eine physiologische Rolle spielen. Auch für FGF-1 und den spezifischen Rezeptor FGFR aus Chondrosarkom-Zellen wird angenommen, dass Heparin die Bindung der beiden Proteine und nachfolgend eine Dimerisierung des Rezeptors begünstigt (Pellegrini *et al.*, 2000). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse könnte auch die Oligomerisierung der GgpS in Anwesenheit von DNA einen Faktor bei der Aktivitätsregulation der GgpS darstellen und sollte näher untersucht werden.

Die Hemmung der GgpS durch DNA könnte ebenfalls die direkte Interaktion des Polyanions mit dem aktiven Zentrum des Enzyms verursacht werden. Dies wurde durch die Messung der kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  in Anwesenheit von DNA untersucht. Dabei konnte eine kompetitive Inhibition, also eine Verdrängung der Substrate aus dem aktiven Zentrum der GgpS, ausgeschlossen werden.

Die bisherigen Beobachtungen könnten durch die Bindung von Polyanionen an einen regulatorischen Bereich des Proteins und eine dadurch verursachte Konformationsänderung erklärt werden. Dies könnte z.B. die Aktivität durch eine Veränderung der Substratbindetasche beeinflussen. Auch für die Trehalose-Phosphat-Synthasen aus *M. tuberculosis* und *M. smegmatis* konnte ein Einfluss von Heparin auf die Substratspezifität gezeigt werden (Pan *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 1996). Dies könnte ebenfalls durch eine Verzerrung des aktiven Zentrums dieser Enzyme hervorgerufen werden.

Die postulierte Konformationsänderung der GgpS konnte durch limitierte Proteolyse (siehe Abbildung 3.23) und auch Zirkular-Dichroismus-Messungen (Daten nicht gezeigt) nicht zweifelsfrei gezeigt werden. Dennoch muss gesagt werden, dass geringe Konformationsänderungen durch diese Methoden nicht nachgewiesen werden können. Bei der limitierten Proteolyse konnte zwar kein Unterschied im Abbaumuster beobachtet werden, dennoch ist die Stabilität des GgpS-Proteins deutlich erhöht. Eine höhere Stabilität gegenüber Trypsin wurde auch bei dem eukaryotischen  $\alpha$ -Synuclein-Protein bei einer Bindung von Fettsäuren festgestellt und mit einer Konformationsänderung des Proteins in Zusammenhang gebracht (De Francheschi *et al.*, 2009). Dies wird auch für weitere Proteine angenommen (Fontana *et al.*, 2004).

Im Falle der GgpS könnte die verringerte Zugänglichkeit für Trypsin durch die reversible Blockierung von Proteaseschnittstellen durch die gebundene DNA oder eine kompaktere Konformation des Proteins verursacht werden.

Da anhand der vorliegenden Ergebnisse beide Möglichkeiten in Frage kommen, sollte eine Konformationsänderung der GgpS in weiteren Experimenten untersucht werden. Auch hier würde eine Kristallisation der GgpS in Anwesenheit von Polyanionen oder die limitierte Proteolyse mit anderen Proteasen in Frage kommen.

Die Bindestellen für Polyanionen auf der Proteinoberfläche können durch Biotinylierungsexperimente identifiziert werden. Mittels dieser Methode konnten auch schon die Bindestellen für Heparin bei dem FGF-2-Protein, dem *platelet factor-4* und Pleiotrophin nachgewiesen werden (Ori *et al.*, 2009). Anhand der bisherigen Ergebnisse ist eine Wechselwirkung der positiven Aminosäuren auf der GgpS-Oberfläche für die Bindung von Polyanionen verantwortlich. Das NHS-Biotin-Reagenz reagiert mit primären Aminen und sollte damit die zugänglichen Lysine kovalent modifizieren. Die Bindung von DNA an die positiv geladenen Lysine sollten diese vor der Biotinylierung schützen. Nach einem Proteaseverdau könnten so Peptide massenspektrometrisch nachgewiesen werden, die im Vergleich zu den Proben ohne DNA einen Unterschied im Biotinylierungsmuster aufweisen. Vorläufige Versuche mit dem GgpS-Protein zeigen, dass die Biotinylierung und der Nachweis der jeweiligen Peptide funktioniert. Zur Zeit werden weitere Experimente mit optimierten Parametern durchgeführt und könnten zur Identifikation der Polyanionen-Bindestellen führen. Die Hemmung der GgpS-Aktivität durch DNA wird nicht durch einen kompetitiven Mechanismus ausgelöst, bei dem die Substrate aus dem aktiven Zentrum des Enzyms verdrängt werden. Eine Konformationsänderung des Proteins ist eher wahrscheinlich. Dabei könnte eine strukturelle Veränderung der Substratbindetasche involviert sein. Ebenfalls

könnte eine Oligomerisierung der GgpS eine Rolle bei der Regulation des Proteins spielen. Die Identifizierung der Polyanionen-Bindestellen wird zur Zeit durchgeführt und könnte wichtige Hinweise auf den Mechanismus der GgpS-Regulation liefern. Die Bindung an diese Bereiche könnte dann weiterführend durch den Austausch von positiv geladenen Aminosäuren bestätigt werden.

#### 4.6 Das GgpS-Protein reguliert nicht die Transkription des *ggpS*-Gens, könnte aber die Transkription anderer Gene beeinflussen

In den durchgeführten EMSA-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Bindung der GgpS an DNA eine hohe Affinität besitzt. Bereits bei einem ca. 20fachen Überschuss des Proteins hatte zumindest ein GgpS-Molekül an das DNA-Fragment gebunden (siehe Abbildung 3.20). Hierbei ist das Vorhandensein von vielen Bindestellen auf dem DNA-Fragment wahrscheinlich, da sich bei den EMSA-Versuchen keine klaren einzelnen Banden ergeben, sondern lediglich eine diffuse DNA-Wolke. Trotz der Unterschiede im Bindungsmechanismus ist die Affinität der unspezifischen Wechselwirkung der GgpS mit DNA mit der Affinität von Transkriptionsfaktoren zu ihren spezifischen Erkennungsmotiven vergleichbar. Der Transkriptionsfaktor RamA benötigt bei der Bindung eines Bereichs des Succinat-Dehydrogenase-Operons, das zwei Bindestellen enthält, einen molaren Überschuss von  $\sim 15/1$  (Cramer und Eikmanns, 2007). Der Transkriptionsfaktor GlxR benötigt *in vitro* bei der Bindung seiner Erkennungssequenz im selben Promotor sogar einen Überschuss von über  $50/1$  (Bussmann *et al.*, 2009). Diese Vergleiche weisen darauf hin, dass auch die GgpS als Transkriptionsregulator aktiv sein könnte. Auch wenn alle bisherigen Versuche darauf hindeuten, dass eine sequenzunabhängige Bindung der GgpS an Nukleinsäuren stattfindet, könnte die salzabhängige Interaktion vor allem bei unter Salzstress induzierten Genen eine Rolle bei der Transkriptionsregulation spielen. Die Transkription des *ggpS*-Gens wird nach einem Salzschock um das 25-fache gesteigert. In verschiedenen Ansätzen wurde untersucht, ob die Transkription des *ggpS*-Gens durch das von ihm kodierte Protein beeinflusst wird. Dies würde einen seltenen Mechanismus der Transkriptionsregulation darstellen und konnte bisher nur für wenige Proteine gezeigt werden, wie z.B. im Falle der sogenannten *trigger*-Enzyme BirA oder PutA aus *E. coli* (Rodionov *et al.*, 2002; Ostrovsky de Spicer und Maloy; 1993). Dieser Überbegriff wurde von Stülke geprägt und beschreibt Proteine, die neben einer Stoffwechselfunktion durch eine Bindung an DNA oder RNA auch die Regulation der Transkription bzw. Translation steuern (Commichau und Stülke, 2008).

Bei der Untersuchung des Promotorbereiches des *ggsS*-Gens durch EMSA-Experimente konnte keine bevorzugten DNA-Sequenzen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies unterstützt die Hypothese einer unspezifischen Bindung.

Um auch *in vivo* einen Einfluss der GgpS auf die Aktivität des *ggsS*-Promotors zu untersuchen, wurden *Synechocystis*-Mutanten des Wildtyps und einer GgpS-defizienten Mutante ( $\Delta$ GDS) hergestellt, bei denen die Expression eines GFP-Proteins unter der Kontrolle des *ggsS*-Promotors steht. Die Ergebnisse zeigen, dass die GFP-Expression in beiden GFP-Mutanten sowohl ohne Zugabe von NaCl als auch bei höheren Salzkonzentrationen vergleichbar war (siehe Abbildung 3.25) und somit das GgpS-Protein nicht an der Regulation des *ggsS*-Gens beteiligt ist. Dennoch könnte die Bindung der GgpS an DNA bei niedrigen Salzkonzentrationen an der Transkriptionsregulation anderer Gene beteiligt sein. Es konnte gezeigt werden, dass bei unter Salzstress kultivierten *Synechocystis*-Zellen eine Vielzahl von Genen induziert wird (Marin *et al.*, 2004). Bei der Analyse der Daten fällt auf, dass sich eine große Anzahl der induzierten Gene in einem Bereich von 300 kBp um das *ggsS*-Gen befinden. Der Anteil dieser Gene an den in der Publikation aufgezählten Genen beträgt nach einem Salzschock 30%, bei an 4% NaCl akklimatisierten Zellen sogar 36%. Da in Bakterien die Transkription von Genen und die Translation der mRNA nicht räumlich getrennt ist, könnte es also sein, dass direkt nach der Synthese das GgpS-Protein unspezifisch an benachbarte Bereiche der genomischen DNA bindet. Dies könnte zumindest anteilig eine verminderte Transkription der betroffenen Gene bei niedrigen Salzkonzentrationen verursachen. Die Ablösung der GgpS von der DNA könnte dann die Induktion dieser Gene unter erhöhten Salzbedingungen erklären. Diese Hypothese könnte durch die Insertion des *ggsS*-Gens in einen genomischen Locus, dessen benachbarte Gene nicht durch Salzstress induziert werden, untersucht werden. Eine zuvor nicht nachweisbare Induktion dieser Gene bei erhöhten Salzkonzentrationen würde dann die Hypothese dieser unspezifischen Transkriptionsregulation unterstützen. Für dieses Experimente könnte die bereits vorhandene *ggsS*<sup>+</sup>-Mutante verwendet werden.

Sollte die Annahme einer unspezifischen Regulation tatsächlich zutreffen, könnte der Gruppe der *trigger*-Enzyme ein neues Mitglied hinzugefügt werden.

#### 4.7 Die Interaktion mit DNA beeinflusst auch die Aktivität anderer Glukosyltransferasen

Das GgpS-Protein gehört zu der Familie der Glukosyltransferasen und besitzt eine hohe Sequenzähnlichkeit zu anderen Vertretern dieser Gruppe (Engelbrecht *et al.*, 1999). Viele dieser Enzyme katalysieren ebenso wie die GgpS die Synthese von kompatiblen Soluten als Antwort auf Salzstress. Dabei ist der Reaktionsmechanismus vergleichbar mit der GG-Synthese. Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten könnte der in dieser Arbeit beschriebene Regulationsmechanismus der GgpS auch bei diesen Enzymen zutreffend sein. Auch der bereits erwähnte Effekt von Heparin bei den Trehalose-Phosphat-Synthase von *M. tuberculosis* und *M. smegmatis* weist auf einen Einfluss von Polyanionen auf die Aktivität der Enzyme hin (Pan *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 1996). Auch für die TPS aus *Propionibacterium freudenreichii* wurde beschrieben, dass sich bei diesem Enzym in Anwesenheit des Zellextraktes die Substratspezifität im Vergleich zum gereinigten Protein ändert (Cardoso *et al.*, 2007). Dies könnte durch die Anwesenheit von Nukleinsäuren verursacht werden. Für die Trehalose-Synthese in *E. coli* durch ein TPS/TPP-System konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der beteiligten Enzyme in mit Toluol permeabilisierten Zellen durch die Zugabe von NaCl um mindestens den Faktor 10 gesteigert wurde (Giaever *et al.*, 1988). Die Toluolbehandlung verursacht dabei lediglich den Ausstrom von niedermolekularen Substanzen, die Struktur der Zelle und die Konzentrationen von höhermolekularen Bestandteilen wie DNA oder Proteinen bleiben unverändert. Die Inhibition der Trehalose-Synthese bei geringen Salzkonzentrationen könnte in diesem Testsystem durch eine Interaktion von einem oder beiden beteiligten Enzymen mit Nukleinsäuren ausgelöst werden, die bei einer Erhöhung der Salzkonzentration aufgehoben wird. Dies deutet darauf hin, dass die Regulation der Trehalose-Synthese in *E. coli* durch den für die GgpS beschriebenen Mechanismus stattfinden könnte.

Aufgrund dieser Hinweise auf einen universellen Mechanismus wurden die Trehalose-Phosphat-Synthasen aus den Bakterien *E. coli*, *C. glutamicum* und *M. tuberculosis* sowie der Hefe *S. cerevisiae* hinsichtlich ihrer Regulation untersucht. Dabei zeigte sich bei der TPS aus *C. glutamicum* ein hemmender Effekt von DNA auf die Enzymaktivität und bei dem Protein aus *M. tuberculosis* konnte eine Bindung an DNA in EMSA-Experimenten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.27 bzw. 3.28). In der an dieses Thema angegliederten Bachelorarbeit wurden diese und weitere Glukosyltransferasen hinsichtlich ihrer Interaktion mit DNA untersucht. Dabei konnte sowohl für die Trehalose-Phosphat-Synthasen aus *C. glutamicum* als auch aus *M. tuberculosis* ein Einfluss von DNA auf die Enzymaktivität

gezeigt werden. Dieser unterscheidet sich jedoch von dem Regulationsmechanismus der GgpS. Die Interaktion mit Nukleinsäuren scheint bei diesen Enzymen keine Rolle bei der Osmoregulation zu spielen.

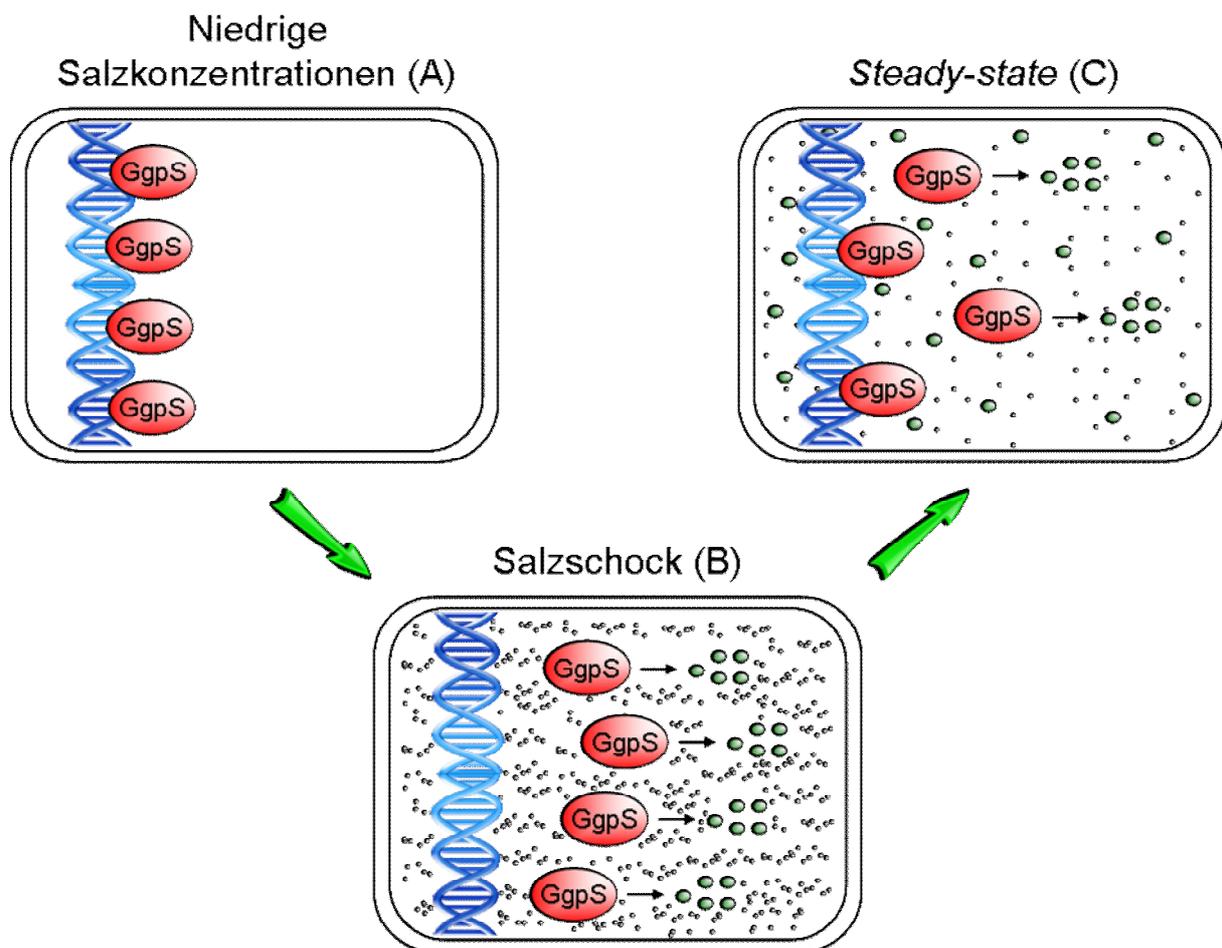
Interessanterweise konnte jedoch beobachtet werden, dass die Enzymaktivität der TPS aus *C. glutamicum* direkt von der NaCl-Konzentration abhängig war (siehe Abbildung 3.30). Das Enzym kann also direkt auf die vorliegende NaCl-Konzentration reagieren und über diesen Mechanismus die Aktivität anpassen. Ein solcher direkter Einfluss von NaCl auf die Enzymaktivität konnte auch bei den Trehalose-Phosphat-Synthasen aus *Ectothiorhodospira halochloris* und *Porphyra perforata* nachgewiesen werden (Lippert *et al.*, 1993; Meng und Srivastava, 1990). Über diesen Mechanismus könnte ebenfalls die Einstellung des Osmolytpools bei erhöhten Salzkonzentrationen vermittelt werden.

Eine salzmodulierte Hemmung durch die Bindung an Nukleinsäuren konnte bei den bisher untersuchten Glukosyltransferasen nicht bestätigt werden. Dennoch hat DNA einen Effekt auf die Aktivität dieser Glukosyltransferasen, was auf ein generelles Charakteristikum bei dieser Enzymklasse hindeutet. In Hinsicht auf die zahlreichen Vertreter dieser Proteinfamilie sollten weitere Enzyme bezüglich ihrer Interaktion mit Polyanionen untersucht werden. Hierbei wären insbesondere Glukosyltransferasen aus Mikroorganismen interessant, bei denen die Synthese von GG oder Trehalose die primäre Antwort auf hyperosmotische Bedingungen darstellt. Für weitere Untersuchungen würden z.B. die Glukosylglycerol-Phosphat-Synthasen aus den Cyanobakterien *Synechococcus* sp. PCC 7002 oder *Synechococcus* sp. WH8102 als Kandidaten in Frage kommen. Diese marinen Mikroorganismen müssen bei konstant hohen Salzkonzentrationen wachsen, was eine biochemische Regulation der GgpS-Proteine essentiell machen könnte.

#### 4.8 Modell zur Regulation der Osmolytsynthese in *Synechocystis*

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass sowohl bei einem Salzschock als auch während der Anpassung an längerfristig erhöhte Salzkonzentrationen die Bindung des GgpS-Proteins an Nukleinsäuren den hauptsächlichen Faktor bei der Reaktion der Zelle darstellen könnte. Bei geringen Salzkonzentrationen liegt präformiertes GgpS-Protein in der Zelle vor. Dieses ist aufgrund der niedrigen Ionenkonzentrationen an Nukleinsäuren gebunden und wird durch diesen neuartigen Mechanismus inaktiviert (siehe Abbildung 4.1, A). Die Bindung wird durch eine elektrostatische Interaktion zwischen positiven Bereichen auf der GgpS-Oberfläche und dem negativen Rückgrat der Nukleinsäuren vermittelt. Wird

nun die externe Salzkonzentration schnell erhöht, strömen Ionen in die Zelle ein. Die Erhöhung der Ionenkonzentration schwächt die ionische Wechselwirkung zwischen GgpS-Molekülen und Nukleinsäuren und die Proteine werden aus dieser Interaktion freigesetzt, was zu einer GG-Synthese mit maximaler Rate führt (siehe Abbildung 4.1, B). Dies löst einen schnellen Anstieg der GG-Konzentration aus. Die Akkumulation von GG gleicht das osmotische Potential des Zytoplasmas und des externen Mediums aus und die für den Metabolismus toxischen Ionen werden aus dem Zytoplasma transportiert.



**Abbildung 4.1: Modell zur Regulation der GgpS-Aktivität durch die Interaktion mit Nukleinsäuren.**

Gezeigt ist eine schematische Darstellung einer *Synechocystis*-Zelle bei den verschiedenen Stadien der Salzanpassung. Bei niedrigen Salzkonzentrationen (A) ist das GgpS-Protein an Nukleinsäuren gebunden und inaktiv. Bei einem Salzschock (B) wird die interne Ionenkonzentration (schwarze Kreise) erhöht, das GgpS-Protein wird von den Nukleinsäuren freigesetzt und synthetisiert GG (grüne Ellipsen). Unter *steady-state*-Bedingungen (C) bestimmt das Verhältnis zwischen gebundener/inaktiver GgpS und freiem/aktivem Enzym die Rate der GG-Synthese.

Dadurch sinkt die Ionenkonzentration wieder, bleibt aber im Vergleich zu geringen externen Salzkonzentrationen dauerhaft erhöht. Die verbleibende interne Ionenkonzentration ist dabei direkt abhängig von der Konzentration im umgebenden Medium. Durch die Verringerung der

Ionenkonzentration kann wieder eine Bindung von GgpS-Proteinen an die Nukleinsäuren stattfinden. Diese binden und werden inaktiviert. Das Verhältnis zwischen gebundenen/inaktiven und ungebundenen/aktiven GgpS-Molekülen bestimmt die Rate der GG-Synthese (siehe Abbildung 4.1, C). Durch diesen Mechanismus wird die interne Osmolytkonzentration unter *steady-state*-Bedingungen an die externe Salzkonzentration angepasst. Die Aktivität von freien GgpS-Molekülen im Zytoplasma wird zusätzlich durch die nichtkompetitive Feedback-Inhibition durch GG oder Trehalose reguliert, was eine zusätzliche Feinmodulation der Osmolytsynthese erlaubt.

Dieses Modell beschreibt einen bisher unbekanntem Regulationsmechanismus auf dem Gebiet der Osmoregulation. Gleichzeitig stellt das GgpS-Protein auch den am besten charakterisierten Vertreter der Gruppe von Polyanionen-Bindeproteinen dar. Die unspezifische Interaktion mit Polyanionen wurde auch für viele Proteine höherer Organismen nachgewiesen und stellt ein attraktives Ziel für die zukünftige Forschung auf dem Gebiet der Enzymregulation dar.

## 5. Zusammenfassung

Die Akkumulation des kompatiblen Soluts Glukosylglycerol stellt in dem Cyanobakterium *Synechocystis* den hauptsächlichen Faktor bei der Anpassung an erhöhte Salzkonzentrationen dar. Die Einstellung des internen Osmolytpools durch eine *de novo*-Synthese dieser osmoprotektiven Substanz ist von der Aktivitätsregulation der Glukosylglycerol-Phosphat-Synthase GgpS abhängig. Dieses Protein kann niedrigen Salzkonzentrationen in *Synechocystis*-Zellen nachgewiesen werden, ist jedoch inaktiv. Bei einer Erhöhung der Salzkonzentration wird das GgpS-Protein vollständig aktiviert, was zur Akkumulation von GG führt. Bei längerfristig erhöhten Salzkonzentrationen wird die GgpS-Aktivität so moduliert, dass der interne GG-Pool an die externe Osmolalität angepasst wird. Im Fokus dieser Arbeit stand die Aufklärung der Mechanismen, die für die Inaktivierung der GgpS bei niedrigen Salzkonzentrationen und die Modulation der Enzymaktivität während der *steady-state*-Anpassung verantwortlich sind.

Durch biochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung des GgpS-Proteins in Anwesenheit von Zellextrakt nicht durch ein Protein oder eine posttranslationale Modifikation ausgelöst wird. Vielmehr ist eine Interaktion mit Nukleinsäuren für die Inhibition des Enzyms verantwortlich. Der hemmende Effekt ist hierbei auf eine affine Bindung der GgpS an diese Makromoleküle zurückzuführen. Diese Bindung kann durch eine Erhöhung der NaCl-Konzentration aufgehoben werden, was auf eine ionische Wechselwirkung von positiv geladenen Bereichen auf der GgpS-Oberfläche mit dem negativ geladenen Rückgrat der Nukleinsäuren hinweist. Diese Hypothese wird auch durch die vergleichbare Hemmung der GgpS-Aktivität durch Heparin unterstützt. Auch hier findet eine starke Bindung der GgpS an das helikale Polyanion statt, das in Bezug auf Ladungsverteilung und Struktur dem Zucker-Phosphat-Gerüst der DNA ähnelt. Die Hemmung der GgpS-Aktivität bei der Bindung an DNA wird nicht durch einen kompetitiven Mechanismus verursacht und könnte eine Konformationsänderung oder eine Oligomerisierung von GgpS-Proteinen beinhalten.

Die schnelle Antwort der GG-Synthese in *Synechocystis*-Zellen nach einem Salzschock wird dementsprechend durch eine Freisetzung der präformierten GgpS-Proteine aus der inhibierenden Wechselwirkung mit Nukleinsäuren vermittelt.

Auch bei der *steady-state*-Anpassung von *Synechocystis* könnte die Bindung des GgpS-Proteins an Nukleinsäuren eine wichtige Rolle übernehmen. In Anwesenheit von DNA wurde die GgpS-Aktivität durch die NaCl-Konzentration moduliert. Da die interne

Salzkonzentration direkt von dem externen Salzgehalt des Mediums abhängig ist, könnte durch diesen Mechanismus die Einstellung des GG-Pools an unterschiedliche externe Osmolalitäten gewährleistet werden. Dabei würde die interne Ionenkonzentration das Verhältnis zwischen an Nukleinsäuren gebundenen und freien GgpS-Proteinen bestimmen und die Gesamtaktivität der GgpS-Proteine und somit die Menge an synthetisiertem GG regulieren. Diese salzabhängige Bindung der GgpS an Nukleinsäuren konnte auch durch *in vivo*-Crosslinking bestätigt werden. Dabei wurden bei erhöhten Salzkonzentrationen weniger Nukleinsäuren zusammen mit dem GgpS-Protein gereinigt.

Einen weiteren wichtigen Faktor bei der *steady-state*-Regulation könnte auch die salzmodulierte Feedback-Inhibition der GgpS durch kompatible Solute darstellen. Bei der Inhibition durch Trehalose konnte gezeigt werden, dass der hemmende Effekt nicht durch einen kompetitiven Mechanismus oder die osmotische Aktivität der untersuchten Substanzen ausgelöst wird. Hierbei könnte eine Bindung des Osmolyts an ein oder mehrere allosterische Zentren des Proteins eine Konformationsänderung des Enzyms auslösen und die beobachtete Hemmung erklären. Die starke Inhibition durch Glukose-haltige Osmolyte unterstützt dabei die Hypothese einer spezifischen Bindung. Diese Ergebnisse könnten auch für den Mechanismus der GG-Hemmung zutreffen.

Das GgpS-Protein gehört zu den Polyanionen-Bindeproteinen und stellt den zur Zeit am besten charakterisierten Vertreter dieser Gruppe dar. Viele dieser Proteine dienen hierbei als Transkriptionsfaktoren. Eine Rolle der GgpS bei der Transkriptionsregulation des *ggpS*-Gens konnte in dieser Arbeit ausgeschlossen werden.

Die in dieser Arbeit beschriebene Aktivitätsregulation des GgpS-Proteins durch eine salzmodulierte Bindung an Nukleinsäuren stellt ein neues Prinzip auf dem Gebiet der Osmoregulation dar. Dabei stellt das GgpS-Protein sowohl den Sensor der Salzkonzentration als auch den Regulator des GG-Pools dar. Ob dieser Mechanismus auch auf weitere Osmolyt-synthetisierende Systeme übertragbar ist, wird zur Zeit untersucht.

## 6. Literaturverzeichnis

**Ankri, S., Serebrijski, I., Reyes, O. und Leblon, G. (1996)** Mutations in the *Corynebacterium glutamicum* proline biosynthesis pathway: a natural bypass of the proA step. *J. Bacteriol.* **178**: 4412-4419

**Arakawa, T. und Timasheff, S. N. (1985)** The stabilization of proteins by osmolytes. *Biochem. J.* **47**: 411-414

**Baskakov, I. und Bolen, D. W. (1998)** Forcing thermodynamically unfolded proteins fold. *J. Biol. Chem.* **273**: 4831-4834

**Berrier, C., Besnard, M., Ajouz, B., Coulombe, A. und Ghazi, A. (1996)** Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure. *J. Membr. Biol.* **151**: 175-187

**Berrier, C., Coulombe, A., Szabo, I., Zoratti, M. und Ghazi, A. (1992)** Gadolinium ion inhibits loss of metabolites induced by osmotic shock and large stress-activated channels in bacteria. *Eur. J. Biochem.* **206**: 559-565

**Berry, S., Esper, B., Karandashova, I., Teuber, M., Elanskaya, I., Rögner, M. und Hagemann, M. (2003)** Potassium uptake in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 mainly depends on a Ktr-like system encoded by *slr1509* (*ntpJ*). *FEBS Letters* **548**: 53-58

**Blumwald E., Mehlhorn, E., Mehlhorn, R. und Packer, L. (1983)** Ionic osmoregulation during salt adaptation of the cyanobacterium *Synechococcus* 6311. *Plant Physiol.* **73**: 377-380

**Bolen, D. W. und Baskakov, I. (2001)** The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J. Mol. Biol.* **310**: 955-963

**Booth, I. R. und Louis, P. (1999)** Managing hypoosmotic stress: aquaporins and mechanosensitive channels in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 166-169

**Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254

**Brown, A. D. (1976)** Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**: 803-846

**Burg, M., Kwon, E. und Kültz, D. (1997)** Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu. Rev. Physiol.* **59**: 437-455

**Bussmann, M., Emer, D., Hasenbein, S., Degraf, S., Eikmanns, B. J. und Bott, M. (2009)** Transcriptional control of the succinate dehydrogenase operon *sdhCAB* of *Corynebacterium glutamicum* by the cAMP-dependent regulator GlxR and the LuxR-type regulator RamA. *J. Biotechnol.* **143**: 173-182

**Cardoso, F. S., Castro, R. F., Borges, N. und Santos, H. (2007)** Biochemical and genetic characterization of the pathways for trehalose metabolism in *Propionibacterium freudenreichii*, and their role in stress response. *Microbiology* **153**: 270-280

**Commichau, F. M. und Stülke, J. (2008)** Trigger enzymes: bifunctional proteins active in metabolism and in controlling gene expression. *Mol. Microbiol.* **67**: 692-702

**Cramer, A. und Eikmanns, B. J. (2007)** RamA, the regulator of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*, is subject to negative autoregulation. *J. Mol. Biotechnol.* **12**: 51-59

**Crowe, J. H., Crowe, L. M. und Chapman, D. (1984)** Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of Trehalose. *Science* **223**: 701-703

**Csonka, L. N. und Epstein, W. (1996)** Osmoregulation. In: Neidhardt, F. C. (ed.). *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. *Washington DC: ASM Press*. p. 1210-1223

**Culham, D. E., Lasby, B., Marangoni, A. G., Milner, J. L., Steer, B. A., van Nues, R. W. und Wood, J. M. (1993)** Isolation and sequencing of *Escherichia coli* proP reveals unusual structural features of the osmoregulatory proline/betaine transporter, ProP. *J. Mol. Biol.* **229**: 268-276

**da Costa, M. S., Santos, H. und Galinski, E. A. (1998)** An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **61**: 117-153

**De Franceschi, G., Frare, E., Bubacco, L., Mammi, S., Fontana, A. und de Laureto, P. P. (2009)** Molecular insights into the interaction between alpha-synuclein and docosahexaenoic acid. *J. Mol. Biol.* **394**: 94-107

**Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R. und Bakker, E. P. (1988)** Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.* **150**: 348-357

**Elanskaya, I. V., Karandashova, I. V., Bogachev, A. V. und Hagemann, M. (2002)** Functional analysis of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter encoding genes of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biochemistry (Mosc)* **67**: 432-440

**Engelbrecht, F., Marin, K. und Hagemann, M. (1999)** Expression of the *ggs* gene, involved in osmolyte synthesis in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002, revealed regulatory differences between this strain and the freshwater strain *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4822-4829

**Faatz, E., Middendorf, A., und Bremer, E. (1988)** Cloned structural genes for the osmotically regulated binding-protein-dependent glycine betaine transport system (ProU) of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **2**: 265-279

**Farwick, M., Siewe, R. M. und Krämer, R. (1995)** Glycine betaine uptake after hypoosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **177**: 4690-4695

**Fogg, G. E., Stewart, W. D. P., Fay, P. und Walsby, A. E. (1973)** The blue-green algae. *Academic Press*, London and New York

**Fontana, A., de Laureto, P. P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P. und Zambonin, M. (2004)** Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim. Pol.* **51**: 299-321

**Galinski, E.A. und Trüper, H. G. (1994)** Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbial. Rev.* **15**: 95-108

**Gjæver, H. M., Styrvold, O. B., Kaasen, I. und Strøm, A. R. (1988)** Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **170**: 2842-2849

**Glaasker, E., Heuberger, E. H., Konings, W. N. und Poolman, B. (1998)** Mechanism of osmotic activation of the quaternary compound transporter (QacT) of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **180**: 5540-5546

**Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R. und Hanahan, D. (1990)** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4645-4649

**Hagemann, M., Effmert, U., Kerstan, T., Schoor, A. und Erdmann, N. (2001)** Biochemical characterization of glucosylglycerol-phosphate synthase of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803: comparison of crude, purified and recombinant enzymes. *Curr. Microbiol.* **43**: 278-283

**Hagemann, M., Fulda, S., und Schubert, H. (1994)** DNA, RNA, and protein synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 adapted to different salt concentrations. *Curr. Microbiol.* **28**: 201-207

**Hagemann, M., Richter, S. und Mikkat, S. (1997)** The *ggtA* gene encodes a subunit of the transport system for the osmoprotective compound glucosylglycerol in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Bacteriol.* **179**: 714-720

**Hagemann, M., Richter, S., Zuther, E. und Schoor, A. (1996a)** Characterization of a glucosylglycerol-phosphate-accumulating, salt-sensitive mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Arch. Microbiol.* **166**: 83-91

**Hagemann, M., Schoor, A. und Erdmann, N. (1996b)** NaCl acts as a direct modulator in the salt adaptive response: Salt-dependent activation of glucosylglycerol synthesis *in vivo* and *in vitro*. *FEMS Microbiol. Letters* **113**: 205-210

**Hagemann, M. und Erdmann, N. (1994)** Activation and pathway of glucosylglycerol synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology.* **140**: 1427-1431

**Hagemann, M. und Marin, K. (1999)** Salt-induced sucrose accumulation is mediated by sucrose phosphate synthase in cyanobacteria. *J. Plant. Physiol.* **155**: 424-430

**Hagemann, M. und Zuther, E. (1992)** Selection and characterization of mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 unable to tolerate high salt concentrations. *Arch. Microbiol.* **158**: 429-434

**Hagemann, M., Wölfel, L. und Krüger, B. (1990)** Alteration of protein biosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 after a salt shock. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1393-1399

**Hecker, M. und Völker, U. (1998)** Non-specific general and multiple stress resistance of growth restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the  $\sigma$ B regulon. *Mol. Microbiol.* **9**: 1129-1136

**Hengge-Aronis, R. (1999)** Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 148-152

**Herzberg, C., Weidinger, L. A., Dörrbecker, B., Hübner, S., Stülke, J. und Commichau, F. M. (2007)** SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions *in vivo*. *Proteomics* **7**: 4032-4035

**Hohmann, S. (1997)** Shaping up: the response of yeast to osmotic stress, p. 101-145. In S. Hohmann and W. H. Mager (ed.), *Yeast stress responses*. Springer, Berlin, Germany

**Hounsa, C. G., Brandt, E. V., Thevelein, J., Hohmann, S. und Prior, B. A. (1998)** Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* **144**: 671-680

**Huber, S.C., Bachmann, M. und Huber, J.L. (1996)** Post-translational regulation of nitrate reductase activity: a role for  $\text{Ca}^{2+}$  and 14-3-3-proteins. *Trends in Plant Science* **1**: 432-438

**Huber, S. C. und Huber, J. L. (1996)** Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 431-444

**Huckauf, J. (2003)** Posttranslationale Regulation der Glucosylglycerolphosphat Synthase im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Dissertation, Universität Rostock, FB Biologie

**Inaba, M., Sakamoto, A. und Murata, N. (2001)** Functional expression in *Escherichia coli* of low affinity and high-affinity ( $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ )/ $\text{H}^+$  antiporters of *Synechocystis*. *J. Bacteriol.* **183**: 1376-1384

**Inoue, H., Nojima, H. und Okajama, H. (1990)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.

**Ingraham, J. L. und Marr, A. G. (1996)** Effect of temperature, pressure, pH, and osmotic stress on growth, In: Neidhardt, F. C. (eds). *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. *Washington DC: ASM Press*. p. 1570-1578

**Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (1996)** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *J. DNA Res.* **3**: 109-136

**Kauss, H., Thompson, K. S., Tetour, M. und Jeblick, W. (1978)** Proteolytic activation of a galactosyl transferase involved in osmotic regulation. *Plant Physiol.* **61**: 35-37

**Kemble, A. R. und McPherson, H. T. (1954)** Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. *Biochem.* **58**: 46-59

**Kempf, B. und Bremer, E. (1998)** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**: 319-330

**Kunert, A., Hagemann, M. und Erdmann, N. (2000)** Construction of promoter probe vectors for *Synechocystis* sp. PCC 6803 using the light-emitting reporter systems GFP and LuxAB. *J. Microbiol. Meth.* **41**: 185-191

**Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

**Lewis, P. J. und Marston, A. L. (1999)** GFP vectors for controlled expression and dual labelling of protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene* **227**: 101-109

**Ley, O. (2001)** Bedeutung der Prolin-Biosynthese bei der Osmoregulation von *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln

**Lippert, K., Galinski, E. A. und Trüper, H. G. (1993)** Biosynthesis and function of trehalose in *Ectothiorhodospira halochloris*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **63**: 85-91

**Londesborough, J. und Vuorio, O. (1991)** Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex from bakers' yeast: purification of a proteolytically activated form. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 323-330

**Londesborough, J. und Vuorio, O. (1993)** Purification of trehalose synthase from baker's yeast. Its temperature-dependent activation by fructose 6-phosphate and inhibition by phosphate. *Eur. J. Biochem.* **216**: 841-848

**Lucht, J. und Bremer, E. (1994)** Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**: 3-20

**MacMillan, S. V., Alexander, D. A., Culham, D. E., Kunte, H. J., Marshall, E. V., Rochon, D. und Wood, J. M. (1999)** The ion coupling and organic substrate specificities of osmoregulatory transporter ProP in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1420**: 30-44

**Madigan, M. T. und Oren, A. (1999)** Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 265-269

**Marin, K., Huckauf, J., Fulda, S. und Hagemann, M. (2002)** Salt-dependent expression of glucosylglycerol-phosphate synthase, involved in osmolyte synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **184**: 2870-2877

**Marin, K., Kanasaki, Y., Los, D. A., Murata, N., Suzuki, I. und Hagemann, M. (2004)** Gene expression profiling reflects physiological processes in salt acclimation of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol.* **136**: 3290-3300

**Marin, K., Stirnberg, M., Eisenhut, M., Krämer, R. und Hagemann, M. (2006)** Osmotic stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803: low tolerance towards nonionic osmotic stress results from lacking activation of glucosylglycerol accumulation. *Microbiology* **152**: 2023-2030

**Marin, K., Zuther, E., Kerstan, T., Kunert, A. und Hagemann, M. (1998)** The *ggpS* gene from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 encoding glucosyl-glycerol-phosphatase synthase is involved in osmolyte synthesis. *J. Bacteriol.* **180** (18): 4843-4849

**Matsuda, N. und Uozumi, N. (2006)** Ktr-mediated potassium transport, a major pathway for potassium uptake, is coupled to a proton gradient across the membrane in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**: 273-275

**McNeil, S. D., Nuccio, M. L. und Hanson, A. D. (1999)** Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol.* **120**: 945-949

**Meng, J. X. und Srivastava, L. M. (1990)** Extraction, assay and some properties of floridoside phosphate synthase from *Porphyra perforata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* **26**: 683-688

**Mikkat, S., Effmert, U. und Hagemann, M. (1997)** Uptake and use of the osmoprotective compounds trehalose, glucosylglycerol and sucrose by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch. Microbiol.* **167**: 112-118

**Mikkat, S., Hagemann, M. und Schoor, A. (1996)** Active transport of glycosylglycerol is involved in salt adaptation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* **142**: 1725-1732

**Mikkat, S. und Hagemann, M. (2000)** Molecular analysis of the *ggtBCD* gene cluster of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 encoding subunits of an ABC transporter for osmoprotective compounds. *Arch. Microbiol.* **174**: 273-282

**Miller, K. J. und Wood, J. M. (1996)** Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 101-136

**Morris, C. E. (1990)** Mechanosensitive ion channels. *J. Membr. Biol.* **113**: 93-107

**Mullis, K. B. (1987)** Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion. *Spektrum der Microbiol.* **42**: 465-488

**Oren, A. (1990)** Formation and breakdown of glycine betaine and trimethylamine in hypersaline environments. *Antonie Leeuwenhoek* **58**: 291-298

**Oren, A. (1999)** Bioenergetic aspects of halophilisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 334-348

**Ori, A., Free, P., Courty, J., Wilkinson, M. C. und Fernig, D. G. (2009)** Identification of heparin-binding sites in proteins by selective labelling. *Mol. Cell. Proteomics* **8**: 2256-2265

**Ostrovsky de Spicer, P. und Maloy, S. (1993)** PutA protein, a membrane-associated flavin dehydrogenase, acts as a redox-dependent transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 4295-4298

**Pan, Y. T., Carrol, J. D. und Elbein, A. D. (2002)** Trehalose-phosphate synthase of *Mycobacterium tuberculosis*: Cloning, expression and properties of the recombinant enzyme. *Eur. J. Biochem.* **269**: 6091-6100

**Pan, Y. T., Drake, R. R. und Elbein (1996)** Trehalose-P synthase of mycobacteria: its substrate specificity is affected by polyanions. *Glycobiology* **6**: 453-461

**Pardee, A. B. und Reddy, G. P. (2003)** Beginnings of feedback inhibition, allostery, and multi-protein complexes. *Gene* **321**: 17-23

**Peter, H., Burkovski, A. und Krämer, R. (1998a)** Osmosensing by N- and C-terminal extensions of the glycine betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **273**: 2567-2574

**Peter, H., Weil, B., Burkovski, A., Krämer, R. und Morbach, S. (1998b)** *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing, and characterization of the ectoine/proline uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J. Bacteriol.* **180**: 6005-6012

**Pellegrini, L., Burke, D. F., von Delft, F., Mulloy, B. und Blundell, T. L. (2000)** Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature* **407**: 1029-1034

**Potts, M. (1994)** Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev.* **58**: 755-805

**Pourkomialian, B. und Booth, I. R. (1994)** Glycine betain transport by *Staphylococcus aureus*: evidence for feedback regulation of the activity of the two transport systems. *Microbiology* **140**: 3131-3138

- Pye, D. A., Vives, R. R., Hyde, P. und Gallagher, J. T. (2000)** Regulation of FGF-1 mitogenic activity by heparin sulphate oligosaccharides is dependent on specific structural features: differential requirements for the modulation of FGF-1 and FGF-2. *Glycobiology* **10**: 1183-1192
- Rajavel, M., Gross, J., Segura, E., Moore, W. T. und Grubmeyer, C. (1996)** Limited proteolysis of *Salmonella typhimurium* nicotinic acid phosphoribosyltransferase reveals ATP-linked conformational change. *Biochemistry* **35**: 3909-3916
- Reed, R. H., Borowitzka, L. J., Mackay, M. A., Chudek, J. A., Foster, R., Warr, S. R. C., Moore, D. J. und Stewart, W. D. P. (1986)** Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 51-56
- Reed, R. H., Richardson, D. L. und Stewart, W. D. P. (1985b)** Na<sup>+</sup> uptake and extrusion in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714 in response to hypersaline treatment. Evidence for transient changes in plasmalemma Na<sup>+</sup> permeability. *Biochim. Biophys. Acta* **814**: 347-355.
- Reed, R. H., Warr, S. R. C., Richardson, D. L. und Stewart, W. D. P. (1985a)** Multiphasic osmotic adjustment in a euryhaline cyanobacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* **28**: 225-229
- Reed, R. H. und Stewart, W. D. P. (1985)** Osmotic adjustment and organic solute accumulation in unicellular cyanobacteria from freshwater and marine habitats. *Mar. Biol.* **88**: 1-9
- Rhodes, D. und Hanson, A.D. (1993)** Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 357-384
- Rodionov, D. A., Mironov, A. A. und Gelfand, M. S. (2002)** Conservation of the biotin regulon and the BirA regulatory signal in eubacteria and archaea. *Genome Res.* **12**: 1507-1516
- Salamat-Miller, N., Fang, J., Seidel, C. W., Smalter A. M., Assenov, Y., Albrecht, M. und Middaugh, C. R. (2006)** A network-based analysis of polyanion-binding proteins utilizing yeast protein arrays. *Mol. Cell. Proteomics* **5**: 2263-2278

**Salamat-Miller, N., Fang, J., Seidel, C. W., Assenov, Y., Albrecht, M. und Middaugh, C. R. (2007)** A network based analysis of polyanion-binding proteins utilizing human protein arrays. *J. Biol. Chem.* **282**: 10153-10163

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*

**Sanger, F., Nickelen, S. und Coulson, A. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467

**Schoor, A. (1996)** Die Synthese des Heterosides Glucosylglycerol im Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803; Methodische und praktische Untersuchungen. Dissertation, Universität Rostock, FB Biologie

**Schoor, A., Erdmann, N., Effmert, H. und Mikkat, S. (1995)** Determination of the cyanobacterial osmolyte glucosylglycerol by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography A* **704**: 755-762

**Schoor, A., Hagemann, M. und Erdmann, N. (1999)** Glucosylglycerol-phosphate synthase: target for ion-mediated regulation of osmolyte synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Arch. Microbiol.* **171**: 101-6

**Schultz, T., Liu, J., Capasso, P. und de Marco, A. (2007)** The solubility of recombinant proteins expressed in *Escherichia coli* is increased by otsA and otsB cotransformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**: 234-239

**Schwaiger, A. (2009)** Zellteilung und Chromosomensegregation in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln, FB Biologie

**Shapiguzov, A., Lyukevich, A. A., Allakhverdiev, S. I., Sergeyenko, T. V., Suzuki, I., Murata, N. und Los, D. A. (2005)** Osmotic shrinkage of cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803 by water efflux via aquaporins regulates osmostress-inducible gene expression. *Microbiology* **151**: 447-455

**Shing, Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J. und Klagsbrun, M. (1984)** Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* **223**: 1296-1299

**Singer, M. A. und Lindquist, S. (1998)** Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cell.* **1**: 639-648

**Stimeling, K. W., Graham, J. E., Kaenjak, A. und Wilkinson, B. J. (1994)** Evidence for feedback (trans) regulation of, and two systems for, glycine betaine transport by *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **140**: 3139-3144

**Stirnberg, M. (2006)** Regulation des Gehaltes der osmoprotektiven Substanz Glucosylglycerol im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Dissertation, Universität zu Köln, FB Biologie

**Stirnberg, M., Fulda, S., Huckauf, J., Hagemann, M., Krämer, R. und Marin, K. (2007)** A membrane-bound FtsH protease is involved in osmoregulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803: the compatible solute synthesizing enzyme GgpS is one of the targets for proteolysis. *Mol. Microbiol.* **65**: 86-102

**Sukharev, S.I., Blount, P. und Kung, C. (1997)** Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities. *Ann. Rev. Physiol.* **59**: 633-657

**Toroser, D. und Huber, S. C. (1997)** Protein phosphorylation as a mechanism for osmotic stress activation of sucrose-phosphate synthase in spinach leaves. *Plant Physiol.* **114**: 947-955

**Waditee, R., Hibino, T., Nakamura, T., Incharoensakdi, A. und Takabe, T. (2002)** Overexpression of a Na<sup>+</sup>H<sup>+</sup> antiporter confers salt tolerance on freshwater cyanobacterium, making it capable of growth in sea water. *PNAS* **99**: 4109-4114

**Whatmoore, A. M., Chudek, J. A. und Reed, R. H. (1990)** The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2527-2535

**Yeh, B. K., Eliseenkova, A. V., Plotnikov, A. N., Green D., Pinnell, J., Polat, T., Gritli-Linde, A., Linhardt, R. J. und Mohammadi, M. (2002)** Structural basis for activation of fibroblast growth factor signalling by sucrose octasulfate. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 7184-7192

---

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Reinhard Krämer am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln betreut worden.

## Teilpublikationen:

**Novak, J.F., Stirnberg, M. und Marin, K. (2010)** A novel mechanism of osmosensing: salt dependent protein-DNA interaction in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* (in Revision)

**Drath, M., Kloft, N., Batschauer, A., Marin, K., Novak, J. und Forchhammer, K. (2008)** Ammonia triggers photodamage of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* **147**: 206-215

Köln, den 08.02.10

Unterschrift: \_\_\_\_\_

(Jens Novak)