

**Die Glukosylglycerolphosphat-  
synthase aus dem Cyanobakterium  
*Synechocystis* sp. PCC 6803:  
Mechanismus der  
Aktivitätsregulation**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Benjamin Michael Emil Roenneke  
aus Köln

Berichterstatter: Prof. Dr. Reinhard Krämer  
(Gutachter) Prof. Dr. Ulf Ingo Flügge

Tag der mündlichen Prüfung : 23.01.2014

# Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung.....	1
Abstract .....	2
1. Einleitung.....	3
1.1 Osmotischer Stress.....	3
1.2 Osmoregulation in <i>Escherichia coli</i> .....	4
1.3 Osmoregulation in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	6
1.4 Osmoregulation in Cyanobakterien .....	7
1.5 Die Synthese von kompatiblen Soluten in <i>Synechocystis</i> .....	10
1.5.1 Synthese von Glukosylglycerol .....	10
1.5.2 Synthese von Saccharose .....	13
1.6 Ziele der Arbeit .....	14
2. Material und Methoden .....	15
2.1 Verwendete Plasmide .....	15
2.2 Verwendete Oligonukleotide .....	16
2.3 Verwendete Bakterienstämme .....	17
2.4 Kultivierung .....	17
Kultivierung von <i>Synechocystis</i> .....	17
Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	19
Kultivierung von <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	20
2.5 Molekularbiologische Methoden .....	21
Polymerase Kettenreaktion (PCR) (Mullis <i>et al.</i> 1987).....	21
Agarosegelelektrophorese .....	21
Restriktion von DNA.....	22
Plasmidisolation aus <i>E. coli</i> .....	22
Isolation von PCR Fragmenten aus Agarosegelen .....	22
Ligation von DNA.....	22
DNA/RNA Konzentrationsbestimmung .....	23
Transformation von <i>E. coli</i> .....	23
Transformation von <i>E. coli</i> .....	23
Herstellung elektrokompetenter <i>Corynebacterium glutamicum</i> Zellen .....	24
Transformation von <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	24
Punktmutagenese .....	25

2.6 Proteinbiochemische Methoden.....	26
Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) .....	26
Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry <i>et al.</i> 1951) .....	26
SDS-PAGE (nach Laemmli 1970) .....	27
Färbung von SDS Gelen .....	27
Western Blot.....	28
Anreicherung und Reinigung von Proteinen .....	30
Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) .....	31
Enzymtest zur Messung der Aktivität von Glukosyltransferasen.....	32
2.7 Gaschromatographie.....	33
2.8 Extraktion interner Ionen aus <i>C. glutamicum</i> und Konzentrationsbestimmung mittels Atomemissionsspektrometrie .....	33
2.9 Extraktion und Messung von Glukosylglycerol aus <i>C. glutamicum</i> .....	34
2.10 Messung der Lichtstreuung und Tryptophanfluoreszenz .....	34
3. Ergebnisse .....	36
3.1.1 Mechanismus der Inhibition des GgpS-Proteins .....	36
3.1.2 Einfluss der Substrate des GgpS-Proteins auf die Nukleinsäurebindung.....	39
3.1.3 Effekte von DNA auf die Stabilität des GgpS-Proteins .....	40
3.1.4 Oligomerisierung des GgpS-Proteins.....	41
3.1.5 Kinetik der GgpS-Nukleinsäure-Interaktion .....	43
3.2 Vergleich der Inhibition von GgpS aus <i>Synechocystis</i> mit Glukosyltransferasen anderer Organismen .....	45
3.2.1 Regulation der Aktivität von GgpS aus <i>Synechococcus</i> sp. 7002, WH8102.....	45
3.2.2 Einfluss von Nukleinsäuren auf die TPS aus <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	48
3.2.3 Regulation der TPS aus <i>E. coli</i> und der GgpS aus <i>Thiobacillus denitrificans</i> .....	50
3.3 Identifikation der Bindungsregion für Nukleinsäuren.....	52
3.3.1 Biotinylierung des GgpS-Proteins.....	52
3.3.2 Erstellung von GgpS-Varianten denen einzelne positiv geladene Aminosäurereste fehlen....	58
3.3.3 Reinigung der GgpS Varianten .....	59
3.3.4 Charakterisierung der GgpS-Varianten .....	60
3.3.5 DNA Bindung der GgpS Varianten .....	62
3.3.6: Stabilität der GgpS Varianten .....	64
3.4 Untersuchungen der GgpS-Regulation in einem heterologen <i>in vivo</i> System .....	66
3.4.1 Analyse von Bakterienstämmen, die sich für die GgpS-Untersuchung eignen .....	66
3.4.2 Anreicherung von GgpS und GgpP in <i>C. glutamicum</i> und Analyse der GG Synthese.....	68

3.4.3 GG-Synthese in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	69
3.4.4 Auswirkungen weiterer osmotisch aktiver Substanzen auf die GG Synthese.....	72
3.5 Optimierung der GG-Produktion in <i>C. glutamicum</i> .....	76
3.5.1 Mögliche Verbesserungen der Verfügbarkeit des Substrates ADP-Glukose.....	76
4. Diskussion.....	80
4.1 Das GgpS-Protein wird durch eine nicht kompetitive Inhibition reguliert.....	80
4.2 GgpS weist eine sehr hohe Affinität zu Nukleinsäuren unter Niedrigsalzbedingungen auf .....	81
4.3 GgpS bildet oligomere Komplexe aus.....	82
4.4 Die GgpS aus <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 wird durch NaCl aktiviert und durch Nukleinsäuren inaktiviert .....	83
4.5 Die TPS aus <i>Mycobacterium tuberculosis</i> und die GgpS aus <i>Thiobacillus denitrificans</i> interagieren mit Nukleinsäuren. ....	84
4.6 Die GgpS aus <i>Synechococcus</i> sp. WH8102 wird nicht durch Nukleinsäuren inhibiert und es findet keine Interaktion statt. ....	86
4.7 Die GgpS aus <i>Synechocystis</i> bindet mit mehreren positiv geladenen Aminosäuren an Nukleinsäuren .....	87
4.8 GgpS ist in einem heterologen <i>in vivo</i> System aktiv und wird wie in <i>Synechocystis</i> reguliert....	91
4.9 Glukosylglycerol kann in <i>C. glutamicum</i> in großen Mengen produziert werden.....	94
5. Literaturverzeichnis.....	97
Anhang .....	107
A.1: In dieser Dissertation verwendete DNA und Proteinstandards.....	107
A.2: Ausgewählte Vektorkarten von häufig verwendeten Vektoren .....	108
A.3: Lichtstreuungsmessung zur Erfassung der optimalen Wellenlänge für die Aufnahme der Bindungskinetik.....	109
A.4: Kalibrierungen einzelner Messmethoden.....	110
A.5: Darstellung der technischen Problematik bei der Analyse von Cgl GG Zellen, die mit Sorbitol inkubiert wurden.....	112
A.6: Optimierung der ADP-Glukose Verfügbarkeit in <i>C. glutamicum</i> GG .....	113
Danksagungen .....	114
Erklärung .....	115

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
ad	auf, bis (hinzufügen)
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AG	Arbeitsgruppe
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz
BHI	Brain heart infusion
Bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serum Albumin
°C	Grad Celsius
CCR	Combined chain reaction
CM	Cytoplasmamembran
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
Carb	Carbenicillin
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Cgl	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
d	Tage
DIG	Digoxygenin
DNA	Dexoyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Einstein

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
G3P	Glycerol-3-Phosphat
GB-Aldehyd	Glycinbetinaldehyd
GC	Graschromatograph(ie)
GG	Glucosylglycerol
GG-P	Glucosylglycerolphosphat
GgpP	Glucosylglycerolphosphatphosphatase
GgpS	Glucosylglycerolphosphatsynthase
Gluc	Glukose
h	Stunde
H +	Proton
His	Histidin
HPLC	High performance liquid chromatography
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
m	Meter
m~	Milli~
min.	Minute
mRNA	messenger RNA

MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide
n~	Nano
NAD	Nikotinamiddinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	p-Nitrotetrazoliumblauschlorid
NTP	Nukleosidtriphosphat
NHS-Biotin	N-hydroxysuccinimid-Biotin
OD	optische Dichte
OM	Äußere Membran
ORF	offener Leserahmen
P	Periplasma
~P	Phosphat
p~	pico
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline / Phycobilisomen
PCC	Pasteur Culture Collection
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PD	Peptidoglycanschicht
PM	Plasmamembran
ProtK	Proteinase K
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S6P	Saccharose-6-Phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	kleine interferierende RNA



s. o.	siehe oben
sp.	Species
SPP	Saccharosephosphatphosphatase
SPS	Saccharosephosphatsynthase
Syn	<i>Synechocystis</i>
Strep	Streptavidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA
TBE	Tris Borat EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TES	N-tris(Hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure
TPP	Trehalosephosphatphosphatase
TPS	Trehalosephosphatsynthase
Tre	Trehalose
Tre-6-P	Trehalose-6-Phosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp
(w/v)	Gewichtsanteile pro Volumeneinheit
u. a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
Wt	Wildtyp
μ~	Mikro
ZMMK	Zentrum für molekulare Medizin Köln

## Kurzzusammenfassung

Die Glukosylglycerolphosphatsynthase (GgpS) ist das Schlüsselenzym bei der Synthese des kompatiblen Solut Glukosylglycerol bei hyperosmotischem Stress im Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Die GgpS wird postranslational reguliert. Sie bindet unter Niedrigsalzbedingungen an Nukleinsäuren und wird dadurch inaktiviert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Inhibitionsmechanismus näher untersucht und mehrere Glukosyltransferasen hinsichtlich ihrer Interaktion mit Nukleinsäuren analysiert. Es wurde gezeigt, dass die GgpS über eine nicht kompetitive Hemmung reguliert wird. Dabei weist die GgpS eine sehr hohe Affinität zu Nukleinsäuren auf, was über die Messung der Lichtstreuung und Tryptophanfluoreszenz des Proteins gemessen werden konnte. Die Inhibition durch Nukleinsäuren konnte bei einer GgpS aus einem weiteren Organismus gezeigt werden. Hierbei handelte es sich um die GgpS aus *Synechococcus* sp. 7002. Bei Glukosyltransferasen aus weiteren Organismen konnte eine Interaktion mit Nukleinsäuren gezeigt werden, jedoch wurde keine Inhibition beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die GgpS oligomere Komplexe ausbildet. Es handelt sich dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit um Homotetramere. Der Oligomerisierungsstatus verändert sich nicht während der Interaktion mit Nukleinsäuren oder durch den Einfluss von Ionen. Die Interaktion der GgpS mit Nukleinsäuren findet über eine elektrostatische Wechselwirkung von positiv geladenen Aminosäuren mit dem negativ geladenen Rückgrat der Nukleinsäuren statt. In dieser Arbeit wurden Aminosäurereste gefunden, die an der Interaktion mit Nukleinsäuren beteiligt sein könnten. Dies geschah über die Analyse von GgpS-Varianten, bei denen einzelne positiv geladene Aminosäuren entfernt und durch Alanine ersetzt wurden. Hinweise über die zu analysierenden Aminosäuren lieferte die Untersuchung der GgpS aus *Synechococcus* sp. WH8102, welche nicht an Nukleinsäuren bindet und die an den putativen Nukleinsäureinteraktionsstellen der *Synechocystis* GgpS keine positiven Aminosäurereste trägt. Mehrere GgpS Varianten zeigten eine schwächere Nukleinsäurebindung und wurden nur noch schwach durch Nukleinsäuren inhibiert, was Hinweise über die Lokalisierung der Interaktionsstellen lieferte.

Neben den Untersuchungen des Inhibitionsmechanismus der GgpS wurde die Regulation des Proteins in einem heterologen *in vivo* System analysiert. Die GgpS ist in *Corynebacterium glutamicum* aktiv und wird auch wie in *Synechocystis* reguliert. Dies stellt einen weiteren deutlichen Nachweis der GgpS Inhibition durch die eine sequenzunspezifische Interaktion mit Nukleinsäuren bei Niedrigsalzbedingungen dar. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte

gezeigt werden, dass eine hohe GG-Synthese in diesem Bakterienstamm stattfindet, was zu einer Entwicklung eines GG Produktionsstammes von *C. glutamicum* führte.

## Abstract

The glucosylglycerolphosphatase (GgpS) is the key enzyme in the synthesis of the compatible solute glucosylglycerol in response to hyperosmotic stress in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. The GgpS is mainly regulated at the posttranslational level. The enzyme binds at low salt concentrations to nucleic acids and becomes inactivated. The inhibition mechanism was investigated in more detail during this thesis. The interaction of glucosyltransferases with nucleic acids was investigated. It was shown that GgpS is regulated via a non competitive inhibition mechanism. GgpS has a very high affinity to nucleic acids, which was shown via measurement of light scattering and tryptophan fluorescence. Inhibition by nucleic acids was shown for the GgpS protein from *Synechococcus* sp. 7002. GgpS forms homotetrameric complexes. The oligomerisation state is not changing upon interaction with nucleic acids or NaCl. Positively charged amino acid residues of the GgpS interact electrostatically with the negatively charged backbone of the nucleic acid. Amino acid residues involved in the interaction were found in this thesis. This was achieved by the exchange of positively charged amino acids for alanine residues. Important hints for putative target amino acids were also provided by results of the analysis of GgpS from *Synechococcus* sp. WH8102. This GgpS protein did not bind to nucleic acids, since amino acids which could be involved in nucleic acid binding by GgpS from *Synechocystis* are not present in the *Synechococcus* GgpS. Several tested GgpS variants have shown a weaker nucleic acid binding and the inhibition was impaired.

Besides analysis of the inhibition mechanism of GgpS, regulation of the enzyme was analysed in a heterologous *in vivo* system. It could be shown, that GgpS is active and regulated in *Corynebacterium glutamicum* like in *Synechocystis*. This proves a sequence unspecific inhibition of the protein by nucleic acids under low salt concentrations. In this system a high GG synthesis rate was detected. These results led to the development of a *C. glutamicum* GG production strain.

## 1. Einleitung

### 1.1 Osmotischer Stress

Bakterien sind häufig unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt. Sie haben daher verschiedene Mechanismen entwickelt, um sich verändernden Bedingungen anzupassen. Bei drastischeren Veränderungen der Umgebung, die für die Zelle schädlich sein können, wird von Stress gesprochen. Wenn sich beispielsweise die Teilchenzahl in der Umgebung drastisch verändert, wird dies als osmotischer Stress bezeichnet.

Es wird zwischen zwei verschiedenen Formen von osmotischem Stress unterschieden. Bei hypoosmotischem Stress sinkt die Osmolytkonzentration im umgebenden Medium der Zelle stark ab. Daher kommt es zu einem Wassereinstrom in die Zelle und der Turgordruck erhöht sich. Dies kann im extremen Fall zum Bersten der Zelle führen (Kempf und Bremer 1998). Um hypoosmotischen Bedingungen entgegenzuwirken, werden Ionen und Metabolite über mechanosensitive Kanäle aus den Zellen ausgeschleust (Berrier *et al.* 1992, Sukharev *et al.* 1997). In *Escherichia coli* werden die mechanosensitiven Kanäle nach ihrer Porengröße eingeteilt, namentlich MscM, MscS und MscL (mechanosensitive channel of minimal/small/large conductance) (Berrier 1996, Booth und Blount 2012). Wird eine gewisse Spannung der Zellmembran erreicht, werden diese Kanäle geöffnet und Metabolite und Ionen in das Außenmedium entlassen. (Berrier *et al.* 1996).

Bei hyperosmotischem Stress findet eine starke Erhöhung der Osmolytkonzentration im umliegenden Medium der Zelle statt. Dies führt zu einem Wasserausstrom und im extremen Falle zur Dehydration der Zelle (Ingraham und Marr 1996, Potts 1994). Der Turgor in der Zelle ist nicht mehr konstant und dadurch sind oftmals der Metabolismus und die Zellteilung gestört (Kempf und Bremer 1998).

Die Reaktion auf hyperosmotische Bedingungen fällt, je nach Organismus, unterschiedlich aus. Bei der "Salt in" Strategie, wie sie bei *Halobacteriales* und *Haloanaerobiales* beobachtet wurde, findet eine Anpassung bei den intrazellulären Prozessen an permanent hohe Ionenkonzentrationen statt, was ein Überleben bei Salzkonzentrationen von bis zu 5 M NaCl ermöglicht. (Madigan und Oren 1999, Oren 1999).

Bei der "Salt out" Strategie, welche die häufigste Form der Anpassung darstellt (Hagemann 2011), werden hohe intrazelluläre Salzkonzentrationen vermieden, indem niedermolekulare Osmolyte akkumuliert werden (Csonka und Epstein 1996, Miller und Wood 1996, Rhodes und Hanson 1993). Diese werden auch als kompatible Solute bezeichnet. Es handelt dabei um

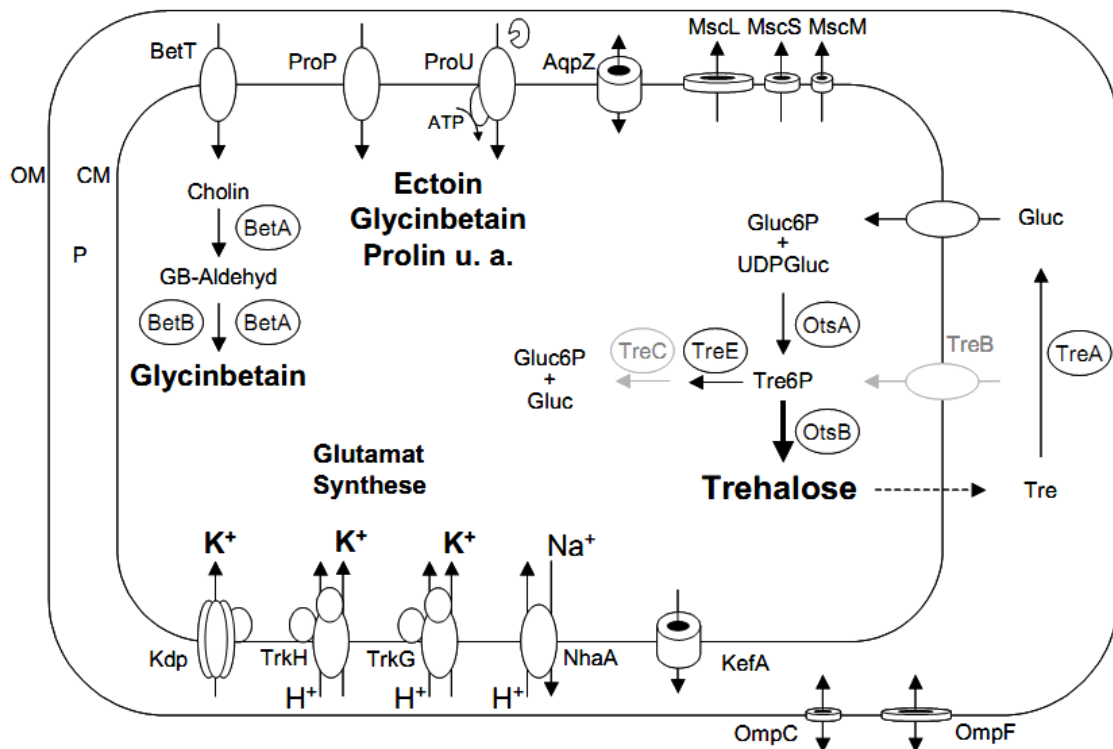
osmotisch aktive organische Moleküle, die bei physiologischen pH-Werten keine Nettoladung aufweisen und in Wasser gut löslich sind (Brown 1976). Sie sorgen, neben ihrer Funktion als interne Osmolyte, für die Stabilisierung der Membranen und Proteine. Im Gegensatz zu Ionen haben kompatible Solute keinen negativen Einfluss auf die Hydrathülle dieser Moleküle, wodurch sie deren Stabilität bei osmotischem Stress erhöhen (Bremer und Krämer 2000). Die Erhöhung der Stabilität von Proteinen kann anhand des "preferential exclusion" Modells erklärt werden. Proteine schließen die kompatiblen Solute von ihrer Oberfläche aus, was aufgrund energetisch ungünstiger Wechselwirkungen des Peptidrückgrats mit den Soluten geschieht (Bolen und Baskakov 2001). Dadurch gehen die Proteine in eine kompaktere Form über, was einer Denaturierung entgegenwirkt (Potts 1994).

Die kompatiblen Solute gehören verschiedenen Stoffklassen an. Diese beinhalten dabei Polyole (Glycerol, Inositol), Zucker (Trehalose, Saccharose), Zuckerderivate (Glukosylglycerol, Isofloridoside), Aminosäuren und ihre Derivate (Prolin, Ectoin) oder Methylamine (Glycinbetain, Glutamatbetain, Prolinbetain). Die kompatiblen Solute können entweder aus dem Außenmedium aufgenommen oder in der Zelle neu synthetisiert werden. Die Aufnahme ist dabei schneller und auch energetisch günstiger (Kemble und McPherson, 1954). Über die Regulation der für die Synthese von kompatiblen Soluten zuständigen Enzyme ist bislang nicht viel bekannt. In mehreren Organismen wurde die Akklimatisierung an osmotischen Stress untersucht. Die folgenden Beispiele sollen für einen Überblick der verschiedenen Prozesse sorgen.

### **1.2 Osmoregulation in *Escherichia coli***

Im gram-negativen Enterobakterium *Escherichia coli* sind viele Prozesse bereits beschrieben worden. Bei diesem Darmbakterium, welches aber auch außerhalb des Darms lebensfähig ist, handelt es sich um einen der am besten untersuchten Mikroorganismen. Bei hyperosmotischem Stress werden Kaliumionen akkumuliert und Glutamat synthetisiert (Csonka und Epstein 1996, Kempf und Bremer 1998). Glutamat fungiert dabei als Gegenion für die Kaliumaufnahme. Auf die Ionenaufnahme folgt die Synthese von kompatiblen Soluten. *E. coli* kann diese über eine Aufnahme aus dem Außenmedium akkumulieren (Kempf und Bremer 1998). Einige dieser Solute sind in Abb. 1 dargestellt. *E. coli* synthetisiert unter hohen Salzkonzentrationen Trehalose (Gibson *et al.* 2002). Die Synthese wird vom OtsAB System katalysiert. Die Proteine OtsA und OtsB werden auch als Trehalosephosphat synthase (TPS) und Trehalosephosphatphosphatase (TPP) bezeichnet. Aus

UDP-Glukose und Glukose-6-P wird Trehalose-P gebildet (katalysiert durch die TPS). Anschließend wird Trehalose-P durch die TPP dephosphoryliert (Gibson *et al.* 2002). Es ist jedoch nicht bekannt, durch welches Signal die Trehalosesynthese letztlich ausgelöst wird bzw. wie die TPS auf biochemischem Wege reguliert wird. Es wurde gezeigt, dass die Trehalosesynthese auch unter Einfluss von Chloramphenicol stattfindet, was auf eine Synthese von präformierten Enzymen hinweist (Dinnbier *et al.* 1988).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung ausgewählter Prozesse und Komponenten der Salzanpassung in *Escherichia coli* nach Kempf und Bremer 1998 (modifiziert). OM: äußere Membran, CM: Cytoplasmamembran, P: Periplasma, GB-Aldehyd: Glycinbetain-Aldehyd, Gluc6P: Glukose-6-Phosphat, Gluc: Glukose, Tre6P: Trehalose-6-Phosphat, Tre: Trehalose, UDP-Gluc: UDP-Glukose.

Die Gene *otsA* und *otsB* werden bei osmotischem Stress stärker exprimiert, was durch den Transkriptionsfaktor RpoS induziert wird (Kempf und Bremer 1998). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass nur die intern gebildete Trehalose als kompatibles Solut fungiert. Im Außenmedium befindliche Trehalose wird durch TreA (eine Trehalase) gespalten. Trehalose wird nur unter Niedrigsalzbedingungen aufgenommen, da *treA* unter diesen Bedingungen nicht exprimiert wird. Der Transporter TreB ist für die Aufnahme der Trehalose zuständig, welche anschließend im Zellinneren gespalten wird (Kempf und Bremer 1998).

Neben der Trehalosesynthese, welche meist in Minimalmedium stattfindet, kann *E. coli* kompatible Solute aufnehmen. Hierbei handelt es sich um Prolin, Glycinbetain und Ectoin

(Giaever *et al.* 1988, Kempf und Bremer 1998). An diesen Prozessen sind in erster Linie zwei Aufnahmesysteme beteiligt. Der Transporter ProP weist ein sehr großes Substratspektrum auf. Einige Beispiele sind u. a. Glycinbetain, Prolinbetain, Prolin, Carnitin oder Ectoin (Csonka und Epstein 1996, Kempf und Bremer 1998). Neben ProP ist der ABC-Transporter ProU für die Aufnahme von kompatiblen Soluten verantwortlich. Dieser Transporter weist ein etwas geringeres Substratspektrum als ProP auf. Es werden Glycinbetain, Prolinbetain, Prolin Carinitin und Cholin transportiert (Haardt *et al.* 1994, Gouesbet *et al.* 1994). Beide genannten Transporter werden unter hyperosmotischem Stress verstärkt exprimiert und erfahren eine Aktivitätssteigerung (Kempf und Bremer 1998). Im Falle von Glycinbetain ist es *E. coli* auch möglich dieses zu synthetisieren. Dabei wird Cholin durch ProU oder den Transporter BetT aufgenommen und zu Glycinbetinaldehyd umgewandelt, was durch das Enzym BetA katalysiert wird (Lamark *et al.* 1991). Anschließend wird das Zwischenprodukt oxidiert und dadurch zu Glycinbetain umgewandelt, was durch das Enzym BetB katalysiert wird (Lamark *et al.* 1996)

### 1.3 Osmoregulation in *Corynebacterium glutamicum*

*Corynebacterium glutamicum* ist einer der wichtigsten Mikroorganismen im Bereich der biotechnologischen Aminosäureproduktion, was insbesondere auf L-Glutamat und L-Lysin zutrifft (Leuchtenberger 1997, Eggeling und Sahm 1999). Es wurde 1957 im Rahmen eines Screenings für aminosäureproduzierende Bakterien in einem Zoo in Tokyo isoliert (Kinoshita *et al.* 1957). Es handelt sich um ein apathogenes Gram-positives Bakterium, welches zu den mycolsäurehaltigen Actinomycenten gehört. Es weist eine enge Verwandtschaft zu den pathogenen Organismen *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae* auf, was von Interesse für die Pathogenforschung ist.

Bei *Corynebacterium glutamicum* handelt es sich ebenfalls um einen, in Bezug auf Osmoregulation, gut verstandenen Organismus. Da es sich bei *C. glutamicum* um ein Bodenbakterium handelt, ist es häufig schwankenden osmotischen Bedingungen ausgesetzt (Krämer 2009).

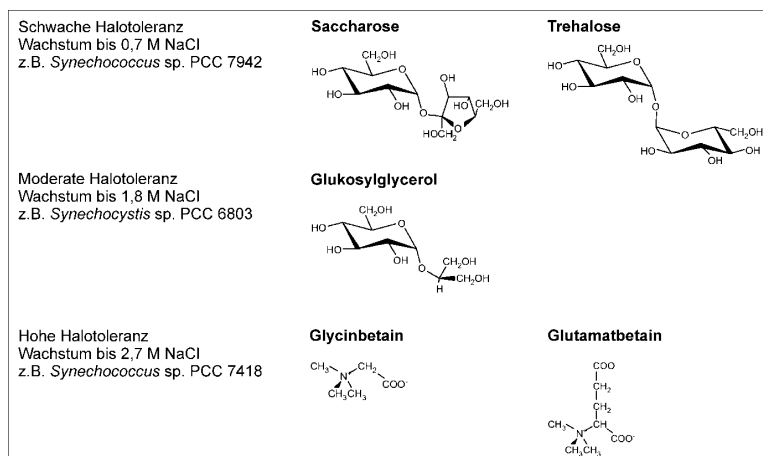
Bei hyperosmotischem Stress werden zunächst positive Ionen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) in die Zelle transportiert, die einem Wasserefflux entgegenwirken sollen. Als nächste Reaktion folgt die Akkumulation von kompatiblen Soluten wie Glycinbetain, Ectoin und Prolin (Krämer 2009). Betain und Ectoin, werden jedoch nicht selbst synthetisiert, sondern aus dem Außenmedium

aufgenommen. Für die Erkennung von hyperosmotischen Bedingungen ist unter anderem das MtrAB System verantwortlich (Möker *et al.* 2004). Es handelt sich um ein 2-Komponenten System, welches unter anderem die Expression diverser Aufnahmesysteme für kompatible Solute steigert. Darunter befindet sich ebenfalls der Transporter für Glycinbetain BetP, der für die Akkumulation von Glycinbetain verantwortlich ist (Krämer 2009). BetP selbst wird bei osmotischem Stress aktiviert. Die Aktivität des Transporters wird dabei über eine Konformationsänderung, bei hohen Osmolytkonzentrationen, gesteigert (Krämer 2009).

*C. glutamicum* kann auch Trehalose synthetisieren. Dies geschieht u. a. durch das OtsAB System, welches sich aus den Enzymen TPS und TPP zusammensetzt. Zunächst wird aus UDP-Glukose und Glukose-6-P Trehalose Phosphat gebildet, welches dann durch die TPP dephosphoryliert wird. Bei TPS handelt es sich um eine Glukosyltransferase, welche in vielen heterotrophen Mikroorganismen verbreitet ist (siehe auch *E. coli*). Jedoch wird der Trehalose Synthese in *C. glutamicum* nur eine kleinere Rolle für die Akklimation an osmotischen Stress zugesprochen (Krämer 2009). Über die biochemische Aktivitätsregulation der TPS ist bisher nur wenig bekannt.

#### 1.4 Osmoregulation in Cyanobakterien

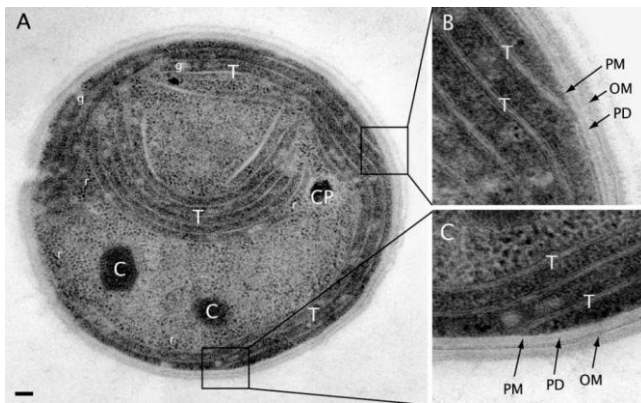
Da Cyanobakterien in allen belichteten Habitaten der Erde vorkommen können, weisen die verschiedenen Arten auch unterschiedliche Toleranzen gegenüber Salzstress auf. Cyanobakterien können in drei Gruppen, entsprechend ihrer Toleranz gegenüber Salz im Außenmedium eingeteilt werden. Jede Gruppe unterscheidet sich dabei in der Art der kompatiblen Solute, die diese bei Salzstress synthetisieren (s. Abb. 2). Jedoch ist diese Einteilung nur bedingt anwendbar, da die Übergänge zwischen den einzelnen Gruppen fließend sind.



**Abb. 2:** Darstellung der Einteilung von Cyanobakterien entsprechend ihrer Halotoleranz. Auf der rechten Seite sind die den Gruppen zugehörigen kompatiblen Solute dargestellt (nach Hagemann 2011)



*Synechocystis* sp. PCC 6803 (von hier an *Synechocystis* genannt) stellt unter den Cyanobakterien einen Modellorganismus für die Osmoregulation dar. Es wird der Gruppe der moderat halotoleranten Cyanobakterien zugeteilt und kann in einer Umgebung mit NaCl-Konzentrationen von bis zu 1,2 M überleben (Reed und Stewart 1985). Der Organismus gehört der Ordnung *Croococcales* an und weist einen Zelldurchmesser von 2-3  $\mu\text{m}$  auf. Das 3.573.471 Bp große Genom wurde bereits 1996 sequenziert (Kaneko *et al.* 1996). *Synechocystis* besitzt eine natürliche Kompetenz für die Aufnahme von Fremd-DNA, was eine genetische Manipulation des Stammes relativ einfach gestaltet. Neben der Fähigkeit der Photosynthese ist es diesem Organismus möglich, heterotroph zu wachsen. Im Gegensatz zu vielen weiteren Cyanobakterien kann *Synechocystis* keinen molekularen Stickstoff fixieren.



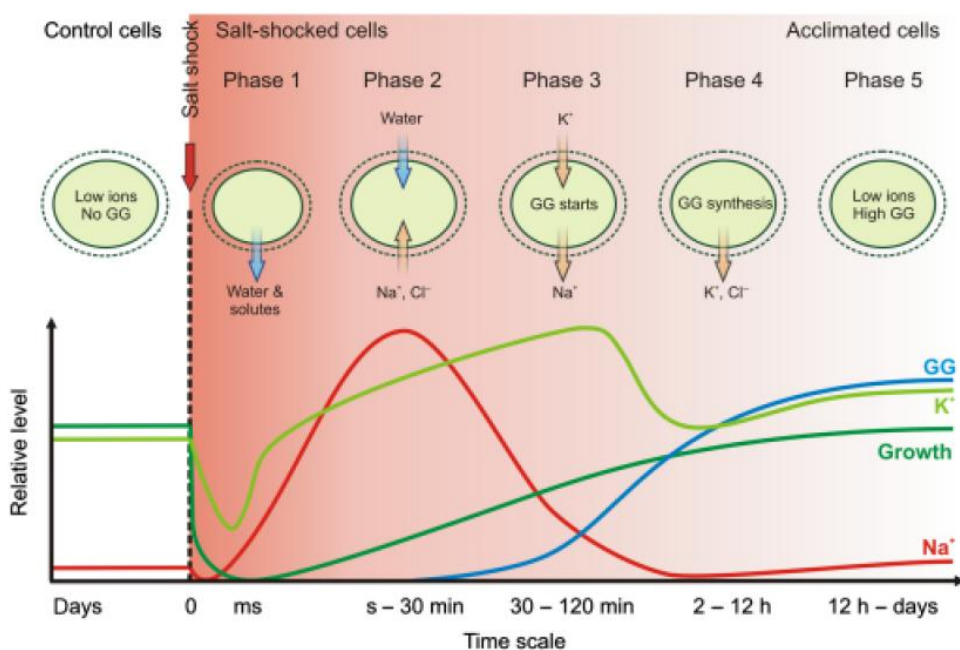
**Abb. 3:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von einer *Synechocystis* Zelle. T=Thylakoidmembran; C=Carboxysom, CP=Cyanophycingranula; PM=Plasmamembran; PD=Peptidoglykanschicht; OM=Äußere Membran. Die Schwarze Leiste entspricht 100 nm (Liberton *et al.* 2006)

Es konnten bereits viele Erkenntnisse über die *in vivo* Reaktion des Bakteriums auf osmotischen Stress gewonnen werden (Hagemann 2011), die im Folgenden näher beschrieben werden sollen.

In *Synechocystis* durchläuft die Akklimation an Salzstress fünf Phasen. Zunächst wird Wasser aus der Zelle entlassen. Dies geschieht durch Aquaporine, für die das Gen *apqZ* kodiert (Akai *et al.* 2012) In der 2. Phase werden Ionen wie  $\text{Na}^+$  aufgenommen, um zunächst einem Wasser-Efflux entgegenzuwirken. Da Natriumionen jedoch toxisch auf die Zelle wirken müssen sie gegen Kaliumionen ausgetauscht werden (Reed *et al.* 1985). Für den Export des Natriums sind  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter zuständig. Es existieren fünf Gene für solche Exporter in *Synechocystis* (*nha1-5*). Diese Gene haben wahrscheinlich eine redundante Funktion, da die Mutation eines dieser Gene nicht zu einem salzsensitiven Phänotyp führt

(Inaba *et al.* 2001, Elanskaya *et al.* 2002). Die Kaliumionen werden entlang des Protonengradienten aufgenommen. Als Aufnahmesystem wird ein Transporter des Ktr-Typs diskutiert (Hagemann 2011).

In der 4. Phase werden kompatible Solute aufgenommen oder synthetisiert (s. auch Abb. 2 u. 4). Als kompatible Solute fungieren in *Synechocystis* Glukosylglycerol (GG), in geringerem Maße Saccharose und Trehalose, wobei letzteres nicht synthetisiert, sondern lediglich aufgenommen wird (Hagemann und Erdmann 1994, Hagemann und Marin 1999). Es wurde jedoch beobachtet, dass Trehalose das GG im Zellinneren ersetzt, wenn es im Außenmedium in hohen Mengen vorhanden ist (Mikkat *et al.* 1997).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der fünf Phasen der Reaktion von *Synechocystis* auf hohe Salzkonzentrationen (Hagemann 2011)

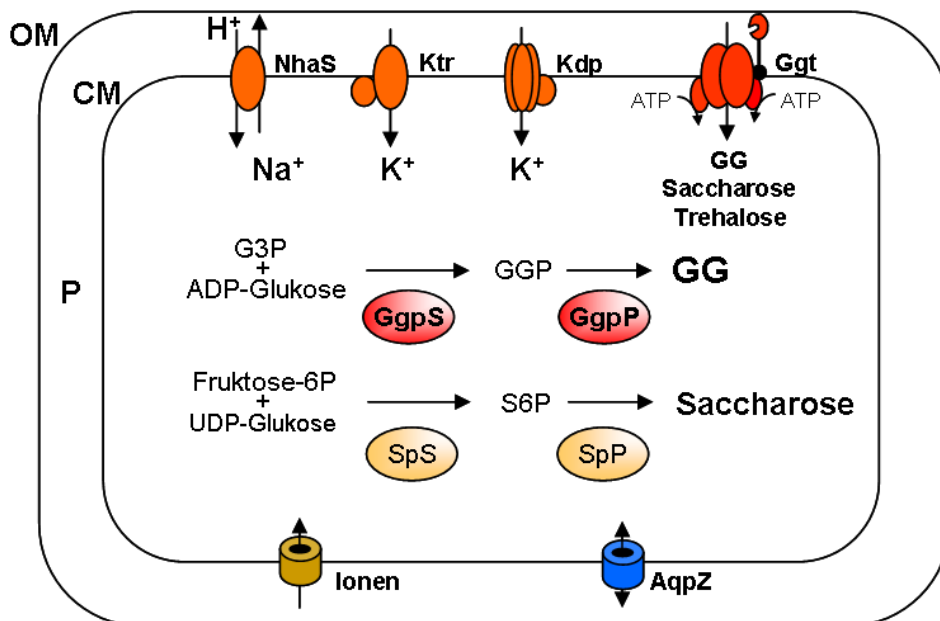
Glukosylglycerol fungiert dabei als das wichtigste kompatible Solut in *Synechocystis* (Hagemann 2011). Es kann ebenfalls auf zwei Wegen akkumuliert werden. Es kann aus dem Außenmedium aufgenommen werden, was durch den ABC-Transporter Ggt ermöglicht wird (Mikkat *et al.* 1996). Die Gene *ggtABCD* werden salzabhängig exprimiert (Hagemann 2011). Ggt transportiert neben GG auch Saccharose und Trehalose. Der Transporter selbst besteht aus 4 Untereinheiten. GgtA fungiert dabei als ATP-Bindeprotein. GgtB ist als Substratbindeprotein beschrieben. Die Untereinheiten GgtC und GgtD sind als Transmembransegmente des Transporters identifiziert worden (Mikkat und Hagemann 2000).

### 1.5 Die Synthese von kompatiblen Soluten in *Synechocystis*

In Cyanobakterien wird oft die *de novo* Synthese von kompatiblen Soluten einer Aufnahme aus dem Außenmedium vorgezogen (Hagemann 2011). Jedoch ist dies im Falle von *Synechocystis* nicht bewiesen worden. Die Tatsache, dass Trehalose, welche nicht von *Synechocystis* synthetisiert wird, das GG in den Zellen ersetzt, weist auf eine bevorzugte Aufnahme von kompatiblen Soluten hin (Hagemann 2011).

#### 1.5.1 Synthese von Glukosylglycerol

Die *de novo* Synthese von Glukosylglycerol geschieht in *Synechocystis* in zwei Schritten. Glukosylglycerolphosphat (GG-P (Vorstufe von GG)) wird in *Synechocystis* durch die Glukosylglycerolphosphatsynthase (im folgenden GgpS) synthetisiert (Schoor 1996). Anschließend wird GG-P durch die Glukosylglycerol-Phosphat Phosphatase (GgpP oder StpA) dephosphoryliert (Hagemann *et al.* 1997).

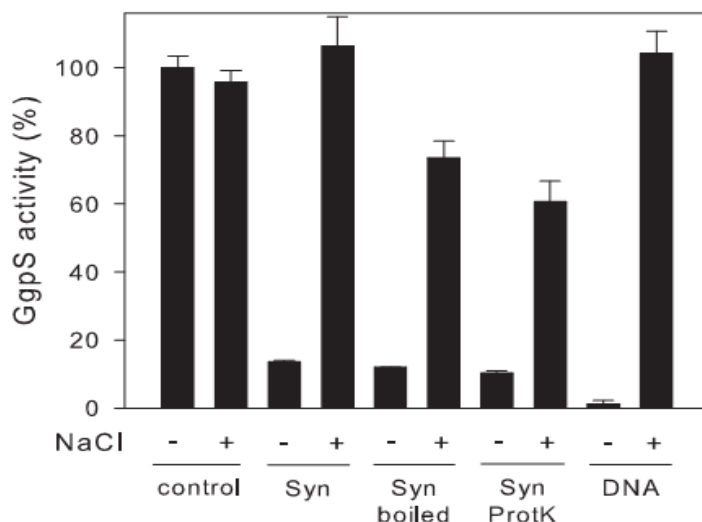


**Abb. 5:** Schematische Darstellung der an Anpassung an erhöhte Salzkonzentrationen beteiligten Komponenten in *Synechocystis*. OM: Äußere Zellmembran; P: Periplasma; CM: Innere Zellmembran; GG: Glukosylglycerol; G3P: Glycerol-3-Phosphat; GGP/S6P: Glukosylglycerolphosphat/Saccharose-6-Phosphat (Hagemann 2011).

Es wurde beobachtet, dass die Transkriptmenge des *ggsS*-Gens und auch die Aktivität des Enzyms bei einem Salzschock ansteigt (Marin *et al.* 2002). Die GG Synthese findet jedoch nur bei einem durch Salze induzierten osmotischen Schock statt. Nichtionische Substanzen

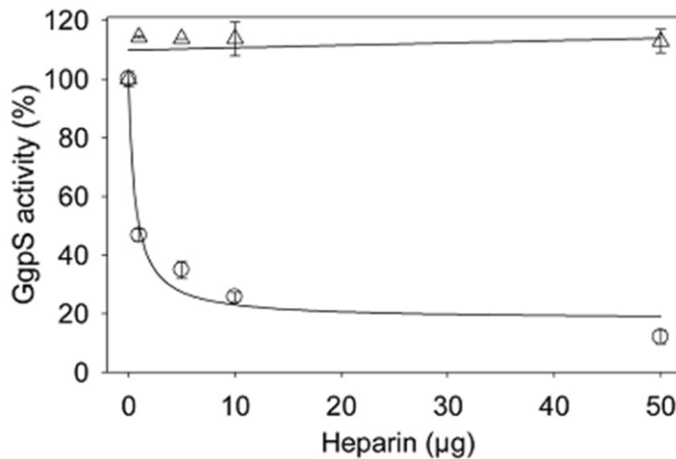
wie Sorbitol oder Maltose haben keinen Einfluss auf die GG Synthese in *Synechocystis* (Marin *et al.* 2006).

Das GgpS-Protein wird jedoch nicht erst bei einem Salzschock synthetisiert. Es liegt schon präformiert in der Zelle vor (Marin *et al.* 2002, Novak *et al.* 2010). Da die Translation bei hohen Ionenkonzentrationen gestört ist (Blumwald *et al.* 1983), ist es wichtig, dass GgpS bereits in der Zelle präformiert vorliegt. Es wurde gezeigt, dass GG auch in Zellen gebildet wird, die mit Chloramphenicol behandelt wurden. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zu unbehandelten Zellen (Hagemann *et al.* 1990). GgpS muss daher hauptsächlich postranslational reguliert werden. Es wurde über einen längeren Zeitraum ein inhibitorischer Faktor gesucht, der die GgpS bei niedrigen Salzkonzentrationen inaktiviert. Es wurde letztlich beobachtet, dass GgpS durch Nukleinsäuren inhibiert wird (Novak *et al.* 2010 Abb. 6). Es konnte gezeigt werden, dass das GgpS Protein bei niedrigen Salzkonzentrationen an Nukleinsäuren bindet und die Aktivität des Proteins dadurch sinkt. Nach einer Zugabe von Salz wird diese Interaktion beendet und GgpS geht in seine aktive Form über (Novak *et al.* 2010, Abb. 6). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von GgpS mit Nukleinsäuren nicht von der Basensequenz der Nukleinsäuren abhängig ist (Novak *et al.* 2010). Sinkt die Ionenkonzentration in der Zelle wieder, wird mehr GgpS an die Nukleinsäuren gebunden. Dadurch ist es möglich, sehr flexibel auf verschiedenen Ionenkonzentrationen zu reagieren (Novak *et al.* 2010).



**Abb. 6:** Auswirkungen verschieden behandelter Zellextrakte auf die GgpS Aktivität. (Novak *et al.* 2010). Syn = *Synechocystis* Zellextrakt. ProtK = Proteinase K behandelt.

Das negativ geladene Rückgrat der Nucleinsäuren interagiert wahrscheinlich mit positiv geladenen Aminosäureresten des GgpS-Proteins. Die GgpS bindet an Heparin bzw. wird durch Heparin inhibiert (Novak *et al.* 2010). Bei Heparin handelt es sich um ein Struktur analogon des Rückgrates der DNA. Die Inhibition des Enzyms durch Heparin stellt daher einen deutlichen Hinweis auf eine Interaktion des Proteins mit dem negativen Rückgrat von Nucleinsäuren dar (Abb. 7).



**Abb. 7:** Auswirkungen von Heparin (Kreise) auf die GgpS Aktivität  $\pm$  NaCl (Dreiecke) (Novak *et al.* 2010).

Dies ist ein Argument für die sequenzunspezifische Interaktion des GgpS Proteins mit Nucleinsäuren.

GgpS gehört zur Proteinfamilie der Glukosyltransferasen, welche in verschiedenen Organismen zu finden sind. Die Trehalosephosphatsynthase TPS aus *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* oder *Corynebacterium glutamicum* synthetisieren aus UDP-Glukose und Glukose-6-Phosphat Trehalosephosphat (Wolf *et al.* 2003). Die Glycerolglyceratphosphat-synthase (GgaS) aus *Synechococcus* sp. PCC 7002 und *Prochlorococcus marinus* SS120, die zu den Primärproduzenten des Ozeans gehören (Partensky *et al.* 1999, Scanlan *et al.* 2009), bildet aus ADP-Glukose und 3-Phosphoglycerat Glucosylglyceratphosphat. *Synechococcus* sp. PCC 7002 besitzt ebenfalls ein GgpS Enzym (Engelbrecht *et al.* 1999). Diese weist sehr hohe Ähnlichkeiten zur GgpS in *Synechocystis* auf (Cyanobase).

Über die Regulation dieser Enzyme ist bisher noch nicht viel bekannt. Diese Enzyme könnten einem ähnlichen Regulationsmechanismus unterliegen (Novak 2010). Für die TPS aus *C. glutamicum* konnte beispielsweise eine Hemmung durch DNA gezeigt werden. Ebenfalls konnte die Bindung des TPS Proteins aus *Mycobacterium tuberculosis* an DNA gezeigt

werden (Brühl 2010). Ebenfalls wurde eine Bindung des Enzyms an Heparin gezeigt (Pan *et al.* 2002). Eine Hemmung des Enzyms ist bisher jedoch nicht nachgewiesen worden.

### 1.5.2 Synthese von Saccharose

Neben Glukosylglycerol wird Saccharose in *Synechocystis* als kompatibles Solut synthetisiert (Hagemann 2011). Saccharose wird in nahezu allen Cyanobakterien als ein solches Solut gebildet. Jedoch wird es meist nur als sekundäres kompatibles Solut neben einem oder mehreren weiteren verwendet. Lediglich einige Stämme der Gattung *Nostoc* und *Anabaena* mit einer schwachen Halotoleranz bilden Saccharose als einziges kompatibles Solut aus (Reed *et al.* 1984, Hagemann 2011).

Die Synthese von Saccharose in *Synechocystis* verläuft ähnlich wie bei Glukosylglycerol. Aus Fruktose-6-P und UDP-Glukose wird, katalysiert durch die Saccharosephosphatsynthetase (SPS), Saccharose-P gebildet. Anschließend wird dieses Intermediat durch die Saccharosephosphatphosphatase (SPP) dephosphoryliert (Hagemann und Marin 1999). Saccharose wird eine Schutzfunktion für Membranen bei osmotischem Stress zugesprochen (Potts 2004). Es wurde gezeigt, dass Saccharose in *Synechocystis* direkt nach einem Salzschock gebildet wird und die Syntheserate sogar höher ist als bei Glukosylglycerol. Jedoch wird diese relativ früh wieder eingestellt und Glukosylglycerol liegt dann in höheren Mengen vor (Reed *et al.* 1985). In salzakklimatisierten Zellen ist Saccharose fast gar nicht zu finden (Reed *et al.* 1985, Marin *et al.* 2004, Desplats *et al.* 2005). Saccharose ist möglicherweise auch an der Reaktion auf andere Stressformen beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass bei erhöhten Temperaturen der Saccharosegehalt in den Zellen ansteigt. Es wird davon ausgegangen, dass die Saccharose auch hier am Schutz der Membranen unter diesen Bedingungen beteiligt ist (Hinchu und Hagemann 2004).

Eine *sps*-Mutante zeigt keinen salzsensitiven Phänotyp, was für eine eher untergeordnete Rolle der Saccharosesynthese bei hyperosmotischem Stress spricht (Hagemann und Marin 1999).

---

## 1.6 Ziele der Arbeit

Die bisherigen Arbeiten zur Regulation der Glukosylglycerolphosphatsynthase legten ihren Fokus auf die Suche nach einem Inhibitor des Proteins unter Niedrigsalzbedingungen, welche erfolgreich in der Arbeit von Jens Novak abgeschlossen wurde (Novak *et al.* 2010).

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung des molekularen Mechanismus der Interaktion der GgpS mit Nukleinsäuren und der damit einhergehenden Inhibition. Dies umfasste die Bestimmung der Affinität des Proteins zu Nukleinsäuren als auch die Art der Inhibition, die die GgpS durch die Interaktion mit Nukleinsäuren erfährt.

Bisher sind die Nukleinsäureinteraktionsstellen am GgpS-Protein unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Position der Interaktionsstellen gesucht werden.

Bisher wurde die Inhibition des GgpS-Proteins durch Nukleinsäuren nur in *Synechocystis* beobachtet. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob diese Art der Inhibition auch bei weiteren Glukosyltransferasen aus anderen Organismen vorkommt.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Analyse der GgpS-Regulation *in vivo*. Für diese Untersuchungen sollte ein *in vivo* Testsystem entwickelt werden, welches eine einfache Analyse der GgpS-Regulation zulässt und damit auch die sequenzunspezifische Interaktion der GgpS mit Nukleinsäuren belegt. Diese *in vivo* Analysen schlossen auch die Suche nach einer Möglichkeit ein, ob sich Glukosylglycerol in einem heterotrophen System in größeren Mengen produzieren lässt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Plasmide

**Tab. 1:** In dieser Dissertation verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
pASK IBA-3	Expressionsplasmid mit C-terminalem Strep Tag	IBA GmbH
pASK IBA-5	Expressionsplasmid mit N-terminalem Strep Tag	IBA GmbH
pASK IBA-3-ggpS	<i>sll 1566</i> in IBA 3 Expressionsvektor mit C-terminalem Strep Tag	Stirnberg 2006
pASK IBA-3-ggpS 7002	<i>ggpS</i> aus <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 in IBA 3 Expressionsvektor mit C-terminalem Strep Tag	Brühl 2010
pASK IBA-3-ggpS 8102	<i>ggpS</i> aus <i>Synechococcus</i> WH8102 in IBA 3 Expressionsvektor mit C-terminalem Strep Tag	Brühl 2010
pASK IBA-5 TPS Myco	<i>otsA</i> aus <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in IBA 5 Expressionsvektor mit N-terminalem Strep Tag	Gaffry iplomarbeit
pASK IBA-3 TPS <i>E. coli</i>	<i>otsA</i> in IBA 3 Expressionsvektor mit C-terminalem Strep Tag	Brühl 2010
pASK IBA-3 ggpS R270A	<i>sll 1566</i> in IBA 3 Expressionsvektor mit C-terminalem Strep Tag Arg270 wurde gegen Alanin getauscht	Diese Arbeit
pASK IBA-3 ggpS K275A	<i>sll 1566</i> in IBA 3 Expressionsvektor mit C-terminalem Strep Tag Lys275 wurde gegen Alanin getauscht	Diese Arbeit
pASK IBA-3 ggpS K281A	<i>sll 1566</i> in IBA 3 Expressionsvektor mit C-terminalem Strep Tag Lys281 wurde gegen Alanin getauscht	Diese Arbeit
pASK IBA-3 ggpS K286A	<i>sll 1566</i> in IBA 3 Expressionsvektor mit C-terminalem Strep Tag Lys286 wurde gegen Alanin getauscht	Diese Arbeit
pASK IBA-3 ggpS K281A/K286A	<i>sll 1566</i> in IBA 3 Expressionsvektor mit C-terminalem Strep Tag Lys281 und Lys286 wurden jeweils gegen Alanin getauscht	Diese Arbeit
pASK IBA-3 ggpS K308A	<i>sll 1566</i> in IBA 3 Expressionsvektor mit C-terminalem Strep Tag Lys308 wurde gegen Alanin getauscht	Diese Arbeit
pASK IBA-3 ggpS K336A	<i>sll 1566</i> in IBA 3 Expressionsvektor mit C-terminalem Strep Tag Lys336 wurde gegen Alanin getauscht	Diese Arbeit
pASK IBA-3 ggpS K364A	<i>sll 1566</i> in IBA 3 Expressionsvektor mit C-terminalem Strep Tag Lys364 wurde gegen Alanin getauscht	Diese Arbeit
pASK IBA-3 ggpS	<i>sll 1566</i> in IBA 3 Expressionsvektor mit C-terminalem Strep Tag	Diese Arbeit



## 2. Material und Methoden

R80A	Arg80 wurde gegen Alanin getauscht	
pASK IBA-3 ggpS R345A	<i>sll 1566</i> in IBA 3 Expressionsvektor mit C-terminalem Strep Tag Arg345 wurde gegen Alanin getauscht	Diese Arbeit
pASK IBA-3 ggpS R353A	<i>sll 1566</i> in IBA 3 Expressionsvektor mit C-terminalem Strep Tag Arg353 wurde gegen Alanin getauscht	Diese Arbeit
pASK IBA-3 ggpS R485A	<i>sll 1566</i> in IBA 3 Expressionsvektor mit C-terminalem Strep Tag Arg485 wurde gegen Alanin getauscht	Diese Arbeit
pEKEx2	Expressionsplasmid für <i>Corynebacterium Glutamicum</i>	Eikmanns <i>et al.</i> 1991
pEKEx3	Expressionsplasmid für <i>Corynebacterium Glutamicum</i>	Lindner <i>et al.</i> 2011
pEKEx2 GG	pEKEx2 Vektor mit den Genen <i>sll1566</i> (Strep Tag C-terminal) und <i>slr0746</i> (6xHistag C-terminal)	Diese Arbeit
pEKEX3 GG	pEKEx3 Vektor mit den Genen <i>sll1566</i> (Strep Tag C-terminal) und <i>slr0746</i> (6xHistag C-terminal)	Diese Arbeit

### 2.2 Verwendete Oligonukleotide

**Tab. 2:** In dieser Dissertation verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz
ggpS_CCR_5'	GGATCCATGAATTCATCCCTTGTGATCC
ggpS_CCR_3'	CTGCAGCATTGGGGGGCTCTCCCAG
ggpS_R270A	GGCACCAATCCGGCAAATATCGCGGCGATCGTGGCCAAAG
ggpS_K275A	GGGCGATCGTGCCGCGAAAGTGTGCAACAAAAAGTTGC
ggpS_K281A	GTGGCCAAAGAAAGTGTGCAACAAGCGGTTGCTGAAATTA
ggpS_K286A	AAAAGTTGCTGAAATTGCGCAAGATTTAGGCGGTAAGAGG
ggpS_4x_270 275 281 286	AAATATCGCGGCGATCGTGCCGCGAGAAAGTGTGCAACAAGCAGTTGCTGAAATT GCACAAGAT
ggpS_K61A	GATCGTTGTACGGTGGCGCGGGTGC
ggpS_K308A	ATTACGTGAAGGGCACCGCGGAAAT
ggpS_K336A	TAGTCCCCGTAGCCGCGGCCGCTGA
ggpS_K364A	TAACGGTCGCTTTGCCGCGCTGTCC
ggpS_R80A	AGGTTTCGCCGAAGCAAGCGGATGA
ggpS_R215A	TTTGTCGCGTGGCCGCGAGTCTCA

## 2. Material und Methoden

ggpS_R345A	AATGCGTATTTATGCGAACGCCAAAACGA
ggpS_R353A	CGCCAAAACGAAATTGAAGCGCTGGCAGG
ggpS_R485A	CCAATCACCTACTGGCGGAAGCCTA
ggpS_5'_cgl	GCCTGCAGAGGAGAGGGCAAAAATGAATTCATCCC
ggpS_3'_cgl	GCGGATCCTCACTTCACAGGTCAAGCTTAT
ggpP_5'_cgl	GCGGTACCAGGAGGAGGCTAATAATGGTATTACACCAACAAC
ggpP_3'_cgl	GCGAATTCTTGCTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGGAAAAATGGACTCTTCGGCGCT GGGCCGCCTGCT
M13_for	CATCGGCTCGTATAATGTGT
M13_rev	CCGCTTCTGCGTTCTGATTT

### 2.3 Verwendete Bakterienstämme

**Tab. 3:** In dieser Dissertation verwendete Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032	Wildtyp	Laborstamm AG Krämer
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Deletionsmutante, der das Gen <i>ilvA</i> fehlt	Sahm und Eggeling 1999
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ mer	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> M15 ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169, hsdR17 (rK <sup>-</sup> mK <sup>+</sup> ), $\lambda$ <sup>-</sup>	Grant <i>et al.</i> 1990
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdSB(rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Novagen, Darmstadt

### 2.4 Kultivierung

#### Kultivierung von Synechocystis

Die Zellen wurden in BG-11 Medium bei 30°C bei Lichtintensitäten von 25  $\mu$ E und 150  $\mu$ E angezogen. Die Kultivierung erfolgte entweder in Erlenmeyerkolben (ohne Schikanen) oder in Glasröhren, die mit 5% CO<sub>2</sub> begast wurden.

#### Medien zur Kultivierung:

##### BG-11 Medium:

Lösung 1:

## 2. Material und Methoden

---

- Zitronensäure 0,3 g
- Ammoniumeisen(III)citrat 0,3 g
- Na<sub>2</sub>EDTA 0,05 g
- H<sub>2</sub>O *ad* 100 ml

### Lösung 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
- H<sub>2</sub>O *ad* 1000 ml

### Lösung 3:

- CaCl<sub>2</sub> 1,9 g
- H<sub>2</sub>O *ad* 100 ml

### A<sub>6</sub> Lösung:

- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2,86 g
- MnCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O 1,81 g
- ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,22 g
- CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O 0,08 g
- Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O 0,021 g
- Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O 0,0494 g
- H<sub>2</sub>O *ad* 1000 ml

### Puffer:

1M TES-KOH pH 8,0 u. pH 7,0

1M MES-KOH (pH 6,5)

0,5M CHES/KOH (pH 8,8)

### Herstellung des BG-11 Mediums (Beispiel pH 8,0):

- Lösung 1: 2 ml
- Lösung 2: 50 ml
- Lösung 3: 2 ml
- A<sub>6</sub> Lösung: 1 ml
- 1 M TES-KOH (pH 8,0): 20 ml
- H<sub>2</sub>O *ad* 1000 ml

Für BG-11 Platten wurden folgende Zusammensetzungen verwendet:

2 x BG-11

- Lösung 1: 1 ml
- Lösung 2: 25 ml
- Lösung 3: 1 ml
- A<sub>6</sub> Lösung: 0,5 ml
- 1 M TES-KOH (pH 8,0): 10 ml
- H<sub>2</sub>O *ad* 250 ml

2 x Agar Lösung:

- Bactoagar: 7,5 g
- H<sub>2</sub>O *ad* 250 ml

Die Lösungen wurden autoklaviert und gemischt. Anschließend wurden die Lösungen in Petrischalen gegossen.

### Kultivierung von E. coli

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C. Die Inkubation erfolgte entweder in flüssigem LB Medium, im Schüttelkolben mit Schikanen oder auf LB Agar Platten.

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde SOB Medium verwendet (Nach Sambrook Band 3 1989).

Medien zur Kultivierung:

### LB Medium

- Trypton 10 g
- Hefeextrakt 5 g
- NaCl 10 g

Es wurde mit Wasser auf 1 l aufgefüllt und die Lösung autoklaviert. Für feste Medien wurde zu den Komponenten 15 g Bactoagar gegeben.

### SOB Medium

- Trypton: 5 g
- Hefeextrakt: 1,25 g
- NaCl: 0,125 g
- KCl (1M Stock): 625 µl

Mit Wasser wurde auf 250 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert und anschließend 1,25 ml einer 2M MgCl<sub>2</sub> Lösung versetzt.

### M9 Minimalmedium

#### 5X Salze

- 64 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O
- 15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 2,5 g NaCl
- 5 g NH<sub>4</sub>Cl

Die Lösung wurde auf 1 l mit Wasser aufgefüllt und autoklaviert

#### M9 Medium

- 200 ml 5x Salze + 750 ml steriles Wasser
- 20 ml einer 20%igen Lösung der C – Quelle

Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert

### Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum*

Die Kultivierung (in Vollmedium) erfolgte bei 30°C in BHI Medium, im Schüttelkolben mit Schikanen, oder auf BHI Agar Platten. Als Minimalmedium wurde CGXII Medium verwendet.

### BHI Medium

- Brain heart infusion: 37 g/l

### CGXII Medium

- Ammoniumsulfat 20 g/l
- Harnstoff 5g/l
- Kaliumdihydrogenphosphat 1 g/l
- Dikaliumhydrogenphosphat 1g/l
- Magnesiumsulfat 0,25 g/l
- MOPS 42 g/l
- Protocatechuat 0,003 g/l

- Kalziumchlorid 0,01 g/l
- Biotin 0,0002 g/l

### Spurensalze

- FeSO<sub>4</sub> 0,01 g/l
- MnSO<sub>4</sub> 0,013 g/l
- ZnSO<sub>4</sub> 0,001 g/l
- CuSO<sub>4</sub> 0,0003 g/l
- NiCl<sub>2</sub> 0,00002 g/l

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### Polymerase Kettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.* 1987)

In der PCR werden definierte DNA Bereiche (Templates) exponentiell vermehrt. Hierzu werden thermostabile DNA Polymerasen, wie die taq- oder Fusion Polymerase eingesetzt. Um einen definierten DNA Bereich anreichern zu können, werden Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, die das zu amplifizierende Fragment flankieren.

Für die PCR wird ein Thermocycler (Eppendorf) verwendet, der automatisch die Temperaturen nach definierten Zeiten ändert.

Ein typischer PCR Ansatz:

- 1  $\mu$ L Template DNA
- 1  $\mu$ L 5' Primer
- 1  $\mu$ L 3' Primer
- 10  $\mu$ L 2x Master Mix (z. B. taq Polymerase, dNTPs, Polymerase Puffer, MgCl<sub>2</sub>)
- 7  $\mu$ L H<sub>2</sub>O
- 10  $\mu$ l

### Agarosegelelektrophorese

Zur Größenbestimmung unterschiedlicher DNA-Fragmente wurden diese über eine Flachbrettelektrophoreseapparatur in 1% (w/v) 1x TAE-Agarosegelen aufgetrennt. Aliquots der DNA- Proben wurden mit 6 x Gel-Beladungspuffer (0,25 % Bromphenolblau, 40 % (w/v) Saccharose in H<sub>2</sub>O) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Die größenabhängige Auftrennung der DNA erfolgte bei einer maximalen Spannung von 5 V/cm. Daraufhin wurde das Gel in einer wässrigen Lösung mit 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l

Ethidiumbromid für 20 min zur Anfärbung der DNA inkubiert. Durch die Einlagerung des Ethidiums in der DNA-Doppelhelix kann diese auf einem UV-Licht-Transilluminator ( $\lambda=312$  nm) sichtbar gemacht werden. Als Größenstandard diente die 1 kbp Leiter (Fermentas).

### 10x TAE-Puffer

- 400 mM Tris-Acetat
- 20 mM Natrium-Acetat
- 10 mM EDTA

Der pH wurde auf 7,8 mit Essigsäure eingestellt.

### Restriktion von DNA

Für die Restriktion von DNA werden spezielle Enzyme eingesetzt, die DNA an definierten Stellen schneiden. Dabei werden, je nach Enzym, überhängende- oder glatte Enden gebildet. Dies kann genutzt werden um zwei mit dem gleichen Enzym behandelte DNA Fragmente zu verbinden (z. B. ein PCR Fragment mit einem Vektor (s. Ligation)). Es wurden Enzyme und entsprechende Puffer der Firma Fermentas verwendet.

### Plasmidisolation aus *E. coli*

Für die Plasmidisolation wurde das Nucleospin Plasmid Kit von Macherey-Nagel (Düren) verwendet. In diesem Protokoll wird die alkalische Lyse von Bakterienzellen mit der Aufreinigung der Plasmid DNA über eine Kieselgelsäule kombiniert. Für die Elution von der Säule wurde steriles Wasser oder der mitgelieferte Elutionspuffer verwendet.

### Isolation von PCR Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Fragmentelution wurde das Nucleospin Extract II Kit von Macherey – Nagel (Düren) verwendet. Hierbei wird die selektive Adsorption von DNA an Glasperlen, in Anwesenheit chaotroper Salze, genutzt.

Die Reinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Elution der Fragmente von der Säule erfolgte mit sterilem Wasser oder dem Elutionspuffer des Herstellers.

### Ligation von DNA

Die kovalente Verknüpfung von zwei DNA Enden wird als Ligation bezeichnet. Hierbei werden Enzyme eingesetzt, die als Ligasen bezeichnet werden. In dieser Arbeit wurde die T4-Ligase eingesetzt, die eine Phosphodiesterbindung einer 5' Phosphatgruppe des einen und einer 3' OH Gruppe des zweiten Fragments bildet.

Es wurden z. B. ein Fragment und ein Vektor ligiert, die beide mit demselben Restriktionsenzym behandelt wurden. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers verwendet (Rapid Ligation Kit der Firma Fermentas; St. Leon-Rot)

Der Ligationsansatz wurde für eine Transformation in *E. coli* eingesetzt (s. Transformation von *E. coli*).

### DNA/RNA Konzentrationsbestimmung

Die Nukleinsäurekonzentration wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die Absorption einer Lösung bei 260 nm bestimmt. Um eine Information über die Reinheit der gereinigten Nukleinsäuren zu erhalten wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen. Der Quotient Abs. 280/260 gibt Auskunft über die Reinheit. Dieser Wert sollte bei DNA Bestimmungen im Bereich von 1,6-2 liegen. Für die Messungen wurde das Photometer Ultraspec 2100 Pro der Firma GE Healthcare/Amersham (Freiburg) eingesetzt.

### Transformation von *E. coli*

Als Transformation wird die Aufnahme von DNA durch Bakterien bezeichnet. Um diesen Vorgang nutzen zu können, müssen die Zellen für die Aufnahme kompetent gemacht werden. Hierzu wurde die Methode nach Inoue *et al.* 1990 angewendet. Die Zellpermeabilität wird durch die Zugabe von CaCl<sub>2</sub> erhöht und gleichzeitig die membranassoziierten Nukleasen inaktiviert.

Die Zellen wurden bei -80°C bis zur Transformation gelagert.

### Transformation von *E. coli*

Die kompetenten Zellen wurden mit der Plasmid DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen einem Hitzeschock, bei 42°C, ausgesetzt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden zu den Zellen 500 µl LB Medium gegeben und die Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden nun per Zentrifugation pelletiert und in ca. 50 µl LB Medium resuspendiert. Die Zellen wurden auf LB – Platten ausgestrichen. Für die Selektion auf Klone, die das gewünschte Plasmid aufgenommen haben, wurden Antibiotika eingesetzt, welche durch eine Resistenzkassette auf dem Plasmid unwirksam werden. Folgende Konzentrationen der Antibiotika wurden verwendet:

- Kanamycin - 50 µg/ml
- Carbenicillin - 100 µg/ml auf LB Platten bzw. 50 µg/ml in Flüssigkulturen



### Herstellung elektrokompetenter *Corynebacterium glutamicum* Zellen

Um die Zellen für eine Transformation mittels Elektroporation vorzubereiten, wurde die zu behandelnden Zellen für einen Tag in BHI Medium bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 200 ml LB-I Medium mit diesen Zellen beimpft und dabei eine optische Dichte von 0,2-0,3 eingestellt. Nach einer Inkubation bei 20°C bei Raumtemperatur wurden die Zellen für 10 min. auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C für 5 min. zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3-4 Durchgängen mit 80 ml eiskaltem Glycerin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 1 ml 10% Glycerin aufgenommen. Die Lösung wurde zu je 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Transformation wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

- LB-I

- Trypton	2 g
- Hefeextrakt	1 g
- NaCl	1 g
- Glycin	5 g
- Isonicotinsäurehydrazid	0,8 g
- TWEEN 80	200 µl
- 200 ml H <sub>2</sub> O	

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

- Glycerin 10% (autoklaviert)

### Transformation von *Corynebacterium glutamicum*

Für die Transformation von *Corynebacterium glutamicum* wurde eine Elektroporation durchgeführt. Die elektrokompetenten Zellen wurden in eine Elektroporationsküvette gegeben und die Elektroporation in einem BIORAD Gene pulser bei 600 Ohm, 25 µF, 2,5 kV durchgeführt. Anschließend wurde 1 ml kaltes BHIS Medium zu den Zellen gegeben und diese in neue Reaktionsgefäße überführt. Nach zweistündiger Inkubation bei 30°C wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl verworfen. Das Zellpellet wurde im restlichen Medium resuspendiert und anschließend auf BHI-Agarplatten ausgestrichen.

- BHIS Medium:

- 7,2 g BHI
- 18,2 g Sorbitol
- 200 ml H<sub>2</sub>O

Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert.

Punktmutagenese

Um einzelne definierte Aminosäuren am GgpS-Protein auszutauschen, wurde eine Punktmutation in das *ggpS* Gen eingeführt. Hierzu wurde eine Methode namens „combined chain reaction“ (CCR) (Hames *et al.* 2005, Bi und Stambrook 1998) durchgeführt. In dieser Methode wird die bekannte PCR Reaktion mit einer Verknüpfung von 5'phosphorylierten Primern durch das Enzym Ampligase kombiniert. Der Primer enthält dabei den gewünschten Austausch an Nukleotiden, was zu einem Austausch einer Aminosäure des Proteins führt.

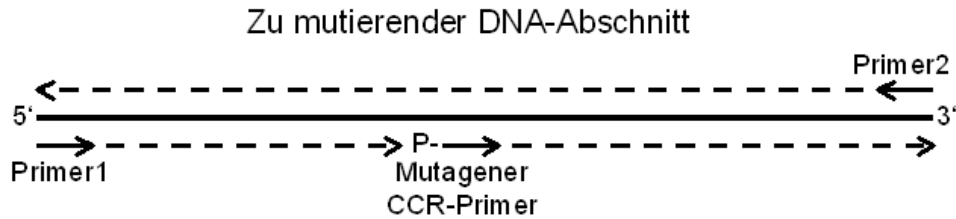


Abb. 8: Schema zur CCR Methode (aus Protokoll für CCR AG Schnetz)

Reaktionsansatz für CCR (50 µl)

- 1 µl 5' Primer 1 (10 pmol/µl)
- 1 µl 3' Primer 2 (10 pmol/µl)
- 4 µl 5'phosphorylierter Mutagenese Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl Template-DNA (100 ng Plasmid-DNA)
- 5 µl 10x CCR-Polymerase-Puffer
- 0,2 µl Fusion-Polymerase (= 5 units)
- 3 µl Ampligase (= 15 units)
- 0,2 µl dNTP Lösung (je 10 mM)
- 2 µl BSA (10 mg/ml)
- H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> add 50 µl

PCR Programm

- |                   |      |          |        |
|-------------------|------|----------|--------|
| 1. Denaturierung  | 95°C | 5 min    |        |
| 2. Denaturierung  | 95°C | 30 sec   | } x 34 |
| 3. Primer Bindung | AT   | 30 sec   |        |
| 4. Verlängerung   | 65°C | 2 min/kb |        |

5. Finale Verlängerung                      65°C   5 min

### 10 × CCR-Polymerase-Puffer

200 mM Tris-HCl (pH 8.5)  
30 mM MgCl<sub>2</sub>  
500 mM KCl  
5 mM NAD<sup>+</sup>

## **2.6 Proteinbiochemische Methoden**

### Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976)

Es wurde eine BSA Eichreihe von 1-25 µg/µl erstellt. 3 µl der Proben wurden mit Wasser auf 200 µl aufgefüllt und 800 µl Bradfordreagenz zugegeben. Das Reagenz beinhaltet den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250, der an basische und aromatische Aminosäurereste bindet. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm. Gemessen wurden, nach 5 min Inkubation die Absorptionen bei 450 und 590 nm. Anschließend wurde der Quotient der Absorptionen 590 nm/450 nm berechnet. Die Quotienten wurden in die Formel der Eichgeraden eingesetzt und die Proteinmenge in µg berechnet. Anschließend wurde durch das Volumen der eingesetzten Proteinlösung dividiert um die Konzentration µg/µl zu erhalten.

### Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry *et al.* 1951)

Es wurde eine BSA Eichreihe erstellt (2-20 µg/µl BSA). Vor der Messung wurden 100 µl Probe mit 20 µl SDS (100 mM) und 1 ml Lowry Reagenz (1 x Lösung A (2% NaCO<sub>3</sub> + 0,4 % NaOH) + 1/50 Lösung B (2% Natriumtartrat) + 1/50 Lösung C (CuSO<sub>4</sub>)) gemischt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Es kommt dabei zu einer Komplexbildung der Kupferionen mit den Peptidbindungen der Proteine. Dabei wird Kupfer von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> reduziert.

Nach der Inkubation wurden 100 µl Folinreagenz zu den Ansätzen gegeben und diese für 30 min bei 37°C erneut inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei 650 nm am Photometer gemessen und die Konzentrationen anhand der Eichreihe bestimmt.

Das reduzierte Kupfer reduziert die im Folinreagenz enthaltenen Heteropolysäuren zu Wolframblau und Molybdänblau. Die Absorption der blauen Farbstoffe ist proportional zur Proteinkonzentration.

### SDS-PAGE (nach Laemmli 1970)

Die SDS PAGE wird unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, d.h. die Proteine in den Proben wurden durch Erhitzen (95°C) denaturiert und zusätzlich wurde SDS zugegeben. Dadurch wurde erreicht, dass die Trennung in den Acrylamid-Gelen nur vom Molekulargewicht der Proteine abhängig ist.

Herstellung der Gele (12%):

- Sammelgel:

- 625 µl 4x Sammelgelpuffer (125 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,3% SDS)
- 12,5 µl 10% APS
- 2,5 µl TEMED
- 58 µl Acrylamid (30%)
- 1,42 ml H<sub>2</sub>O

- Trenngel:

- 1,25 ml 4x Trenngelpuffer (3,75 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,3% SDS)
- 16 µl 10% APS
- 5 µl TEMED
- 1,88 ml Acrylamid (30%)
- 1,88 ml H<sub>2</sub>O

- Laufpuffer

- 250 mM Tris/HCl pH 8,8
- 1,92 M Glycin
- 1% SDS

- Probenpuffer:

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

### Färbung von SDS Gelen

Um die Proteine, die in der SDS PAGE aufgetrennt wurden zu detektieren wurden die Proteine in den Gelen angefärbt:

### Coomassie Färbung

Die SDS Gele wurden für 30 min in der Färbelösung, auf einem Schüttler (25 rpm) inkubiert. Anschließend wurden sie, bis die Proteinbanden klar erkennbar waren in der Entfärbungslösung auf dem Schüttler gehalten. Alternativ konnte die Entfärbung auch über Nacht erfolgen. Hierzu wurde statt der Entfärbungslösung 10% Essigsäure verwendet.

#### - Färbelösung

- 30% Ethanol
- 10% Essigsäure
- 0,2% Coomasie Brilliant Blue R 250

#### - Entfärbungslösung

- 30% Ethanol
- 10% Essigsäure

#### - 10% Essigsäure

Die SDS Gele wurden für 30 min in der Färbelösung, auf einem Schüttler (25 rpm) inkubiert. Anschließend wurden sie, bis die Proteinbanden klar erkennbar waren in der Entfärbungslösung auf dem Schüttler gehalten. Alternativ konnte die Entfärbung auch über Nacht erfolgen. Hierzu wurde statt der Entfärbungslösung 10% Essigsäure verwendet.

### Western Blot

Mit dieser Methode werden Proteine von SDS Gelen auf eine PVDF Membran übertragen. Es wird ein zum Gel senkrechtes elektrisches Feld angelegt, was letztendlich zu der Übertragung führt. An der Membran bleiben die Proteine, aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. In dieser Arbeit wurde die „Semi dry“ Variante durchgeführt. Die PVDF Membran wurde in Methanol aktiviert und auf vier Lagen Whatman Papier in eine Blottingkammer gelegt. Das Papier wurde mit Blotpuffer befeuchtet. Auf der Membran wurde nun das Gel platziert und schließlich erneut vier feuchte Lagen Whatman Papier darauf gelegt. Die Blottingkammer wurde geschlossen, an ein Stromaggregat angeschlossen und die Spannung angelegt. Nach einer Stunde wurde die Apparatur abgebaut und die Proteine auf der Membran mit Ponceau Rot gefärbt.

Die Membran wurde gewaschen (PBS Puffer) und einer 5% Milchpulverlösung bzw. 3% BSA Lösung blockiert. Dies ist wichtig, um spätere unspezifische Bindungen der eingesetzten Antikörper (s. unten) zu vermeiden.

Nun wurde die Membran mit PBS Puffer gewaschen und der erste Antikörper auf die Membran gegeben. Dieser bindet z.B. spezifisch an einen His- oder Strep Tag.

Nach einstündiger Inkubation wurde die Membran erneut gewaschen mit einem zweiten Antikörper, der spezifisch an den ersten Antikörper bindet, mit den Proteinen auf der Membran inkubiert.

An dem zweiten Antikörper ist das Enzym Alkalische Phosphatase kovalent gebunden. Diese setzt katalysiert durch 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (BCIP) Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) um, was die Bildung eines blauen Farbstoffes zur Folge hat. Die Banden, an denen der erste und zweite Antikörper gebunden hat, werden dadurch angefärbt.

- Blotpuffer:

- 10 mM CAPS pH11
- 10% Methanol

- 10 x PBST Puffer:

- 3,44 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 32 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 77 g NaCl

Der pH wurde mit NaOH auf 7 eingestellt

- 10 ml Tween 80
- 

- Methanol (100%)

- Ponceau Rot

- 1. Antikörper

- 2. Antikörper

- Western Blot Entwicklungspuffer:

- 100 mM Tris/HCl pH p,4
- 100 mM NaCl
- 5 mM  $\text{MgCl}_2$

### Anreicherung und Reinigung von Proteinen

Um die in dieser Arbeit verwendeten Proteine anzureichern wurde eine Überexpression der entsprechenden Gene in *E. coli* B121 durchgeführt. Der *E. coli* Stamm wurde mit einem Expressionsvektor transformiert (pASK-IBA-3/5, IBA GmbH Göttingen).

Die Zellen wurden in einer Übernachtskultur (100 ml LB Medium) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 ml LB Medium auf eine optische Dichte von 0,2 angeimpft und die Zellen bis zu einer optischen Dichte von 0,8-1 bei 37°C inkubiert. Nach dem Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Überexpression, der auf dem Vektor befindlichen Gene, mit 2 µg/ml Anhydrotetracyclin induziert. Die Kulturen wurden für 6 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend via Zentrifugation geerntet.

Die geernteten Zellen wurden in 15-30 ml Waschpuffer 1 resuspendiert und anschließend in einer French Press bei 1200 Psi aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden anschließend via Zentrifugation von den löslichen Bestandteilen getrennt. Anschließend wurden die Überstände auf eine StrepTactin (IBA GmbH Göttingen) Säule gegeben. Die Säule wurde mit den Waschpuffern 2 und 3 gewaschen und anschließend mit dem Elutionspuffer behandelt. Je ein halbes Säulenvolumen wurde für 5 min. auf der Säule inkubiert. Anschließend wurde die Lösung aufgefangen. Die Proteinmenge in den Elutionen wurde mittels einer Proteinbestimmung nach Bradford oder Lowry bestimmt.

#### - Waschpuffer 1

- 100 mM Tris/HCl pH 8
- 150 NaCl

#### - Waschpuffer 2

- 100 mM Tris/HCl pH 8
- 500 mM NaCl

#### - Waschpuffer 3

- 100 mM Tris/HCl pH 8

#### - Elutionspuffer

- 100 mM Tris/HCl pH 8
- 150 mM NaCl

#### - StrepTactin Matrix (IBA GmbH Göttingen)

### Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Diese Methode diente dem Nachweis einer Interaktion von Proteinen mit Nukleinsäuren. Es wurden zwei verschiedene Varianten durchgeführt:

#### 1. EMSA in 2% Agarosegelen:

Die DNA wurde mit unterschiedlichen Proteinmengen für 20 min. bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf das Gel geladen. Das Gel wurde bei 70 V laufen gelassen. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiombromid gefärbt.

#### - TA Puffer:

- 400 mM Tris-Acetat
- 20 mM Natrium-Acetat

Der pH Wert wurde auf 7,8 mit Essigsäure eingestellt

#### - 2% Agarose in TA Puffer

#### 2. EMSA in 8% Polyacrylamidgelen

Die zu untersuchenden Proteine wurden mit 25 ng DNA versetzt und in 1 x Bindungspuffer für 30 min. bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 8% Acrylamidgel geladen. Die Taschen des Gels wurden zuvor mit 6 µl 0,5x Ladepuffer (Fermentas) beladen um das Auftragen der Proben zu erleichtern. Das Gel wurde bei 4°C laufen gelassen (200 V). Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt.

#### Bindungspuffer 1x

- 20 mM Tris-HCl pH7.5
- 100 mM KCl
- 2 mM DTT
- 10% Glycerol

#### TBE 10x

- 890 mM Tris
- 890 mM Borsäure
- 20 mM EDTA

Der pH Wert wurde auf 8 eingestellt



### 5 x 8% Acrylamidgele

- 6,6 ml Acrylamid (Stammlösung 30%)
- 1,25 ml 10 x TBE
- 17,25 ml H<sub>2</sub>O
- 250 µl 10% APS
- 20 µl TEMED

### Enzymtest zur Messung der Aktivität von Glukosyltransferasen

Um die Aktivität von Glukosyltransferasen zu messen wurden 0,1 µg Enzym mit einer auf das Enzym abgestimmten Substratmenge inkubiert (bei GgpS 10 mM ADP-Glukose und 10 mM Glycerol-3-P).

Die Inkubation erfolgte bei 30°C für 10-12 min. Nach der Inkubation wurde die Reaktion bei 95°C abgestoppt. Anschließend wurden die Proben mit alkalischer Phosphatase behandelt um das synthetisierte Glukosylglycerol-P zu dephosphorylieren. Die Proteine wurden mit 80% Aceton aus der Lösung gefällt. Die Aceton Lösung enthielt zusätzlich 200 µg/ml Ribitol, welches als interner Standard für die spätere GC Messung diente. Nach einstündiger Inkubation bei -20°C wurden die Proben mit Speed Vac Konzentrator (Modell 5301, Eppendorf AG, Hamburg) eingengt. Nach dem Einengen wurden die Pellets in 100% Ethanol resuspendiert und bei 65°C für 5 min. inkubiert. Die Proben wurden für 20 min. zentrifugiert (14.000 g) und anschließend die Überstände bei 65°C eingedampft. Auf die eingedampften Proben wurde ein 1:1 Gemisch aus Pyridin und MSTFA gegeben um die Proben für die gaschromatografische Messung (siehe unten) zu derivatisieren. Die Proben wurden für 1 Stunde bei 65°C inkubiert und anschließend in der GC vermessen. Um eine Hemmung des Proteins durch Nukleinsäuren zu testen, wurde Lachsperma DNA (Invitrogen GmbH, Darmstadt) eingesetzt.

### - Enzymtestpuffer

- 20 mM Tris/Maleat pH 7,5
- 20 mM MgCl<sub>2</sub>
- 80% Aceton mit 200 µg/ml Ribitol
- 100% Ethanol
- MSTFA
- Pyridin

### 2.7 Gaschromatographie

Um die Substanzen Glukosylglycerol, Trehalose oder Ribitol mittels Gaschromatographie nachweisen zu können, mussten diese zunächst silyliert werden. Dabei wurden 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) (s. auch Abschnitt 2.6). Es wurde ein 1:1 Gemisch aus MSTFA und Pyridin verwendet (je 50 µl je Probe). Es folgte eine Inkubation bei 65°C für eine Stunde. Die Proben wurden anschließend für die Gaschromatographie eingesetzt. Es wurde dazu das System Trace GC von der Firma Thermo Finnigan verwendet. Zur Auftrennung der einzelnen Substanzen wurde eine Kapillarsäule des Typs SE-54 verwendet (Mega, Legnano, Italien). Als Trägergas/mobile Phase diente dabei Stickstoff. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors.

Die Trennung erfolgte bei folgendem Temperaturprogramm:

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

Der Vergleich mit einem Standard, der bekannte Substanzen enthielt, konnten die Substanzen der Proben identifiziert werden. Anhand der Peakflächen konnten die Mengen der untersuchten Substanz bestimmt werden.

### 2.8 Extraktion interner Ionen aus *C. glutamicum* und Konzentrationsbestimmung mittels Atomemissionsspektrometrie

Zur Extraktion der internen Ionen Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> wurden 1,8 ml *C. glutamicum* Zellen als Probe verwendet. Diese wurden in bei 20.000 g zentrifugiert und die Niederschläge in 1,7 ml Wasser resuspendiert. Anschließend wurden die Lösungen für 45 min. bei 80°C im Ultraschallbad inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (20.000 g) konnten die Proben im Flammenphotometer vermessen werden. Für die Bestimmung der Ionen K<sup>+</sup> und Na<sup>+</sup> wurde ein Flammenphotometer verwendet (Eppendorf, Hamburg).

Berechnung der internen Ionenkonzentrationen:

Zelltrockenmasse ZTM = V(entnommene Zellkultur)\*OD<sub>600</sub>\*0,36

internes Volumen V<sub>int</sub> [mg] = 1,8 (entnommene Zellkultur) \* ZTM

Gesamtvolumen V<sub>ges</sub> [μl] = 1700 (Probenvolumen nach Lyse)+V<sub>int</sub>+(V<sub>int</sub>\*1,5)

Verdünnungsfaktor Vf = V<sub>ges</sub>/V<sub>int</sub>

interne Ionenkonzentration [mM] c = Messwert [Ion]\*Vf/1000

Bei hohen externen Konzentrationen der zu bestimmenden internen Ionenkonzentration wurde folgende Formel für die Korrekturen verwendet:

$$c[\text{Ion}]_{\text{int}} = (\text{Messwert Ion } [\mu\text{M}] - [\text{Ion}_{\text{ext}}] * 1,03 + 10^{-3} * \text{OD}_{600}) / (\text{OD}_{600} * 6,9 * 10^{-4})$$

### 2.9 Extraktion und Messung von Glukosylglycerol aus *C. glutamicum*

Für die Extraktion von Glukosylglycerol aus *Corynebacterium glutamicum* wurden zu definierten Zeitpunkten Proben gezogen und diese zentrifugiert. Die Zellen wurden in Wasser resuspendiert und anschließend bei 80°C im Ultraschallbad aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben ultrazentrifugiert (80.000 g 30min.). Die Überstände wurden anschließend für eine Ausfällung der löslichen Proteine mit einem fünffachen Überschuss an 80% Aceton behandelt und für 1 h bei -20°C inkubiert. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (20.000 g, 4°C). Die Überstände wurden anschließend mittel SpeedVac (Eppendorf, Hamburg) eingeeengt.

Die Proben wurden nun mit 80% Ethanol behandelt, welches zusätzlich 200 μg/ml Ribitol enthielt. Dieses diente als interner Standard für die abschließende gaschromatografische Messung. Die eingeeengten Niederschläge wurden mittels Ultraschall resuspendiert und anschließend für 5 min. bei 60°C inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation (20.000 g). Die Überstände wurden anschließend bei 65°C eingedampft. Zu den eingedampften Proben wurde ein 1:1 Gemisch aus Pyridin und MSTFA gegeben, welches für die Derivatisierung der Proben eingesetzt wurde. Nach einstündiger Derivatisierung bei 65°C wurden die Proben am Gaschromatographen vermessen. Hierzu wurde das gleiche Programm eingesetzt welches bereits bei en Enzymaktivitätstests verwendet wurde (s. 3.6).

### 2.10 Messung der Lichtstreuung und Tryptophanfluoreszenz

Für die Bestimmung der Lichtstreuung und der Tryptophanfluoreszenz wurde ein Fluorimeter verwendet (Amico Bowman Series 2 luminescence spectrometer). Für die Messung der Lichtbrechung wurde eine Anregungswellenlänge von 333 nm gewählt. Die

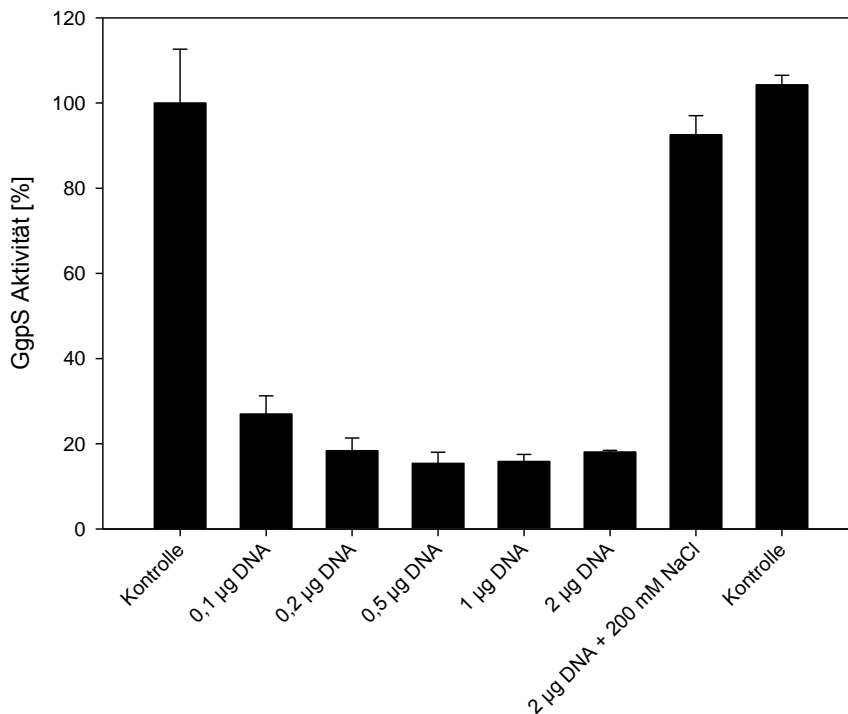
Emissionswellenlänge betrug ebenfalls 333 nm. Durch einen rechten Winkel des Strahlenganges war es möglich die Lichtstreuung zu messen. 10 µg Protein wurden in eine Küvette gegeben und diese mit ansteigenden DNA Mengen versetzt. Durch die Veränderung des Signals konnte eine Bindungskurve aufgenommen werden.

Für die Messung der Tryptophanfluoreszenz musste zunächst die Anregungs- und Emissionswellenlänge bestimmt werden. Tryptophan absorbiert normalerweise bei 280 nm, was jedoch durch die Umgebung der Aminosäure verändert werden kann. Nach der Auswertung der Absorptions- und Emissionsspektren (Daten nicht gezeigt) wurden als Anregungswellenlänge 298 nm und für die Emission 335 nm gewählt. Anschließend wurde analog zur Messung der Lichtstreuung verfahren.

### 3. Ergebnisse

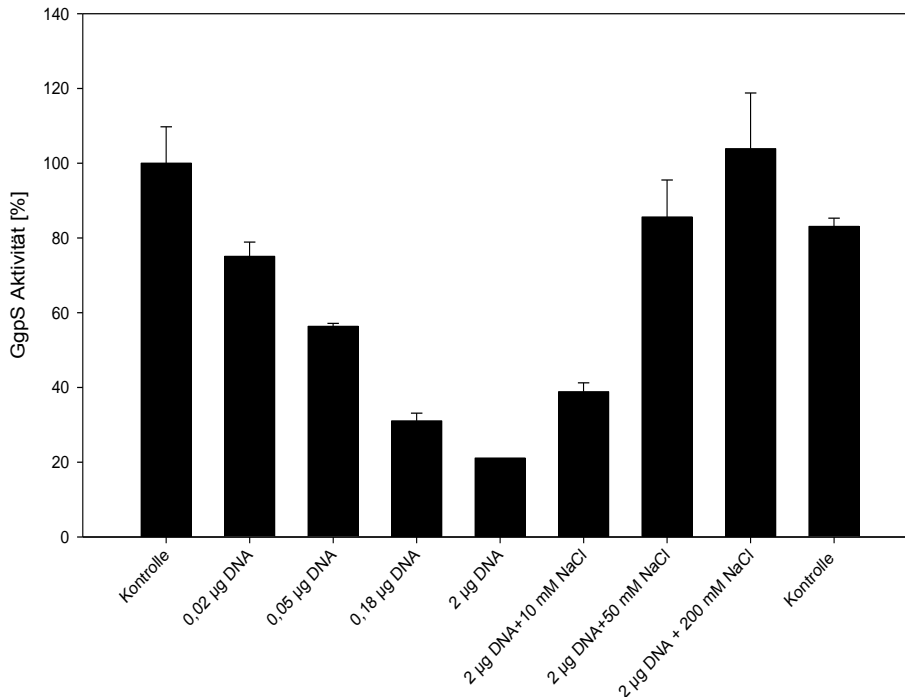
#### 3.1.1 Mechanismus der Inhibition des GgpS-Proteins

Das GgpS-Protein wird durch Nukleinsäuren inhibiert (Novak *et al.* 2010). In dieser Arbeit sollte u. a. der Inhibitionsmechanismus weiter untersucht werden. Es galt die Frage zu beantworten, ob es sich bei der Inhibition um eine Blockierung des aktiven Zentrums des Proteins (kompetitive Inhibition) oder eine vom aktiven Zentrum unabhängige Inhibition (nicht-kompetitive Inhibition) handelt. Hierzu sollten die kinetischen Parameter  $V_{\max}$  und  $K_M$  bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen bestimmt werden. Dabei sollte auch ermittelt werden, bei welchen DNA-Mengen eine Hemmung des Enzyms zu 25%, 50% und 75% erreicht wird. Diese Vorversuche ergaben, dass eine nahezu vollständige Inhibition des Enzyms schon bei sehr viel niedrigeren DNA-Mengen erreicht wurde als bisher angenommen. Bisher wurde die Inhibition bei 200  $\mu\text{g}$  Lachssperma DNA/0,1  $\mu\text{g}$  GgpS als Richtwert für die maximale Inhibition des Enzyms genutzt (Novak 2010). Abb. 9 zeigt jedoch, dass diese Werte zu deutlich niedrigeren DNA-Mengen korrigiert werden müssen.



**Abb. 9:** Aktivitätstest zur Ermittlung der Lachssperma DNA-Mengen, die zur Hemmung des GgpS-Proteins (0,1  $\mu\text{g}$ ) benötigt werden. Die Zahlen im Diagramm geben die zugegebenen DNA-Mengen in  $\mu\text{g}$  an. Die Proben, die mit NaCl gekennzeichnet wurden, enthielten 200 mM NaCl

Bereits bei DNA-Mengen von 0,2  $\mu\text{g}$  wurde eine maximale Hemmung des GgpS-Proteins beobachtet. Es wurde daher versucht, die Inhibition des Enzyms bei noch niedrigeren DNA Mengen zu untersuchen. Das Ziel war dabei die Mengen zu bestimmen, die zu einer Inhibition des Enzyms zu 25%, 50% und 75% führen. Diese DNA Mengen sollten anschließend für eine Analyse der kinetischen Parameter  $K_M$  und  $v_{\text{max}}$  eingesetzt werden.

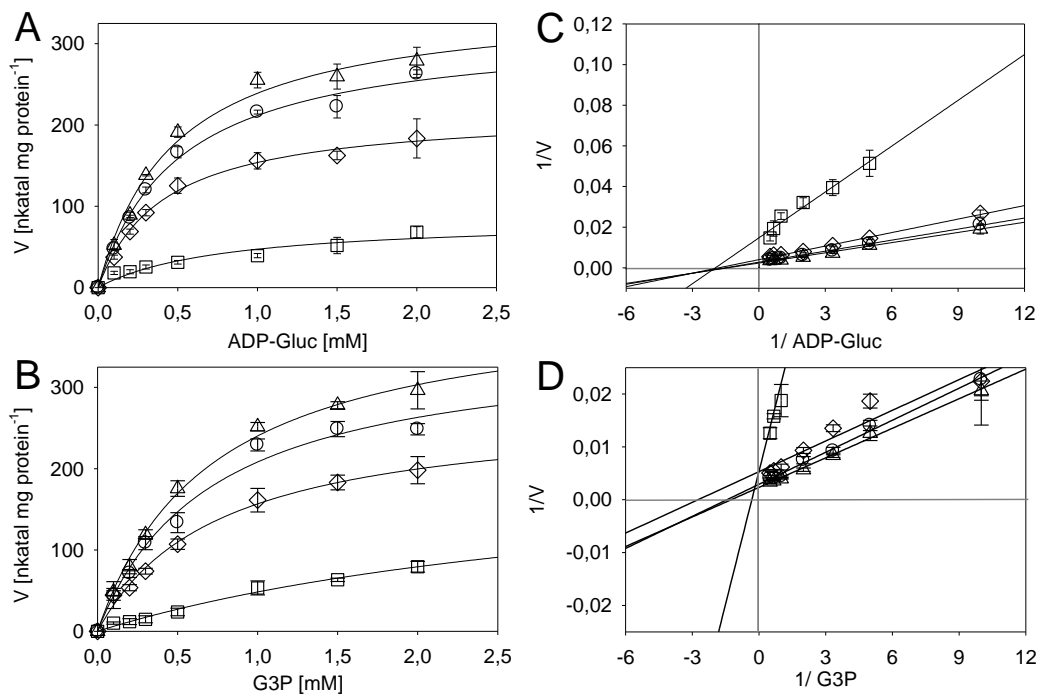


**Abb. 10:** Aktivitätstest des GgpS Proteins (0,1  $\mu\text{g}$ ) zur Bestimmung der DNA Mengen, die zu einer Hemmung des Enzyms zu 25%, 50% und 75% führen. Die Zahlen geben die jeweils eingesetzte DNA Menge in  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  GgpS an. Die Zahlen mit dem Zusatz NaCl geben die eingesetzte NaCl Menge in mM an.

Wie in Abbildung 10 ersichtlich, konnten die gesuchten DNA Mengen bestimmt werden. Bei 0,02  $\mu\text{g}$  DNA/0,1  $\mu\text{g}$  GgpS wies das Protein eine Aktivität von 75% im Vergleich zur Kontrolle auf, die keine DNA oder NaCl enthielt. Bei 0,05  $\mu\text{g}$  DNA lag die Aktivität bei 50% und bei 0,18  $\mu\text{g}$  bei 25%.

Ebenfalls wurde gezeigt, dass bereits 50 mM NaCl eine starke Dissoziation des Enzyms verursachen, was sich in einer Aktivität von 80% widerspiegelt. Dieses Ergebnis lieferte die Grundlage für die Bestimmung des Inhibitionsmechanismus durch DNA am GgpS-Protein. Es wurden die kinetischen Parameter  $K_M$  und  $V_{\text{max}}$  für die Substrate ADP-Glukose und Glycerol-3-P bestimmt. Zusätzlich wurden die im Vorigen Experiment bestimmten DNA-Mengen eingesetzt, um den Inhibitionsmechanismus zu analysieren.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 11:** Bestimmung der Enzymaktivitäten des GgpS-Proteins bei unterschiedlichen Substrat- und Inhibitorkonzentrationen. 0,1  $\mu\text{g}$  GgpS wurde in den Ansätzen verwendet. Die DNA-Mengen betrugten 0  $\mu\text{g}$  (Dreiecke), 0,02  $\mu\text{g}$  (Kreise), 0,05  $\mu\text{g}$  (Rauten) und 0,18  $\mu\text{g}$  (Quadrate). In Abb. A wurde die ADP-Glukose-, in Abb. B die Glycerol-3-P-Konzentration von 0 bis 2 mM gesteigert. Abb. C und D zeigen die Auftragung nach Lineweaver und Burk.

Die Messung der Enzymaktivitäten ergab typische Michaelis Menten-Kinetiken. Aus den Werten ließen sich die Parameter  $K_M$  und  $V_{\max}$  mittels einer Regressionskurve bestimmen. Diese sind in Tab. 3 aufgeführt. Aus den bestimmten Werten ging hervor, dass der  $K_M$ -Wert für die beiden Substrate auch bei steigenden Inhibitorkonzentrationen konstant blieb. Die Werte für  $v_{\max}$  sanken bei steigenden Inhibitorkonzentrationen. Dies deutet auf einen nicht-kompetitiven Inhibitionsmechanismus hin, bei dem die Substratbindung nicht eingeschränkt ist. Die Inhibition findet daher bei der Umsetzung der beiden Substrate zu Glukosylglycerol-P statt. Hierbei wird darauf hingewiesen, dass die kinetischen Parameter bei 0,18  $\mu\text{g}$  DNA/0,1  $\mu\text{g}$  GgpS bewusst ausgespart wurden. Bei diesen DNA-Mengen wurde eine Kurve nach Michaelis Menten beobachtet (Abb. 11 A und B). Die Ermittlung der kinetischen Parameter über eine Auftragung nach Lineweaver und Burk bestätigte im Falle von ADP-Glukose das Ergebnis (Abb. 11 C). Dies war jedoch bei Glycerol-3-P nicht der Fall (Abb. 11 D). Hier wurden Abweichungen bei einer Inhibitorkonzentration von 0,05  $\mu\text{g}$ /0,1  $\mu\text{g}$  GgpS festgestellt. Die Ermittlungen der Daten, über die Auftragung nach Lineweaver und Burk, ist jedoch

häufig sehr fehlerbehaftet, so dass die Daten der Regressionskurven als aussagekräftiger zu bewerten sind.

**Tab. 4:** Kinetische Parameter für die Substrate ADP-Glukose und Glycerol-3P (ermittelt über Regression)

ADP Glukose		
DNA [ $\mu\text{g/nM}$ ]	$K_M$ [mM]	$V_{\max}$ [nkatal*mg protein $^{-1}$ ]
0	0,48 +/- 0,07	354 +/- 18
0,02 $\mu\text{g}$ / 0,4 nM	0,51 +/- 0,06	319 +/- 14
0,05 $\mu\text{g}$ / 1 nM	0,41 +/- 0,04	217 +/- 7
Glycerol-3-P		
DNA [ $\mu\text{g/nM}$ ]	$K_M$ [mM]	$V_{\max}$ [nkatal* mg protein $^{-1}$ ]
0	0,71 +/- 0,07	411 +/- 16
0,02 $\mu\text{g}$ / 0,4 nM	0,72 +/- 0,13	357 +/- 27
0,05 $\mu\text{g}$ / 1 nM	0,75 +/- 0,09	275 +/- 14

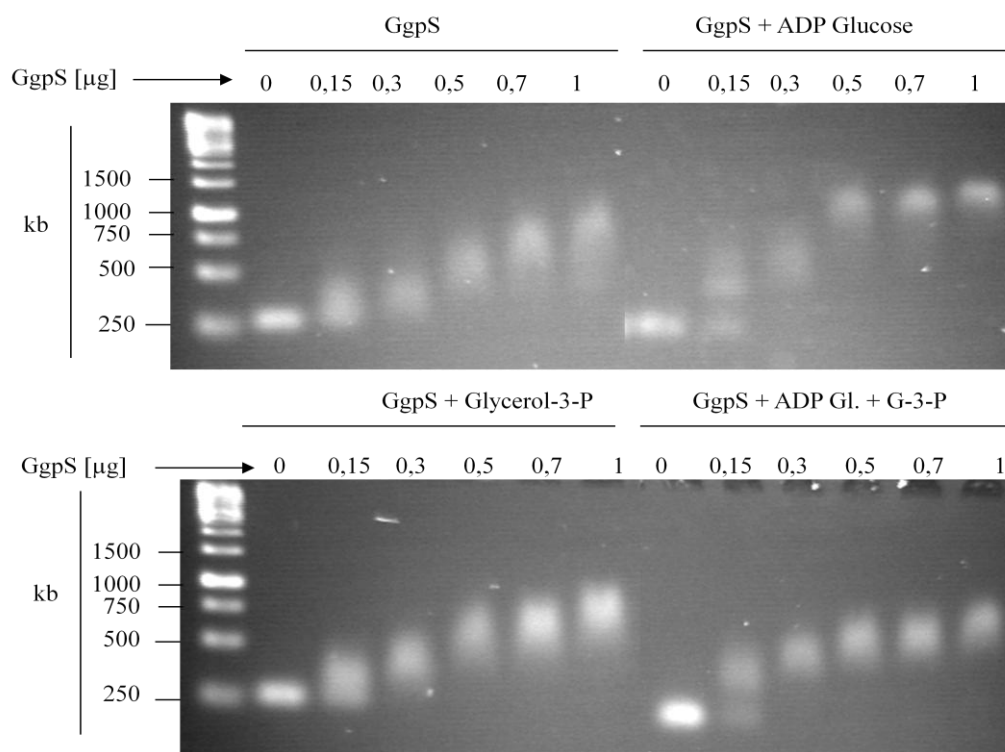
### 3.1.2 Einfluss der Substrate des GgpS-Proteins auf die Nukleinsäurebindung

Um den Mechanismus der Inhibition des GgpS Proteins durch Nukleinsäuren weiter zu untersuchen, wurden bereits in vorigen Arbeiten electrophoretic mobility shift assays (EMSA) durchgeführt (Novak 2010). Mittels dieser Methode konnte eine DNA Bindung des Proteins nachgewiesen werden. Es sollte nun untersucht werden, ob sich die Affinität des Proteins zur DNA in Anwesenheit der Substrate ADP-Glukose oder Glycerol-3-P verändert.

Um dies zu analysieren, wurde das GgpS-Protein mit Nukleinsäuren und den Substraten für 10 min. bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 2% Agarosegel aufgetragen und die Veränderung des Laufverhaltens der DNA im Gel dokumentiert. In Abb. 12 sind die Ergebnisse dargestellt. Bei einer Zugabe von 3 mM ADP-Glukose zeigte sich eine gesteigerte Affinität des Proteins zur DNA, da ein stärker verändertes Laufverhalten der DNA schon bei geringen Proteinmengen zu beobachten war. Es fand schon bei Zugabe von 0,5  $\mu\text{g}$  GgpS eine nahezu vollständige Veränderung des Laufverhaltens der DNA im Gel statt, während dies ohne Zugabe von Substraten erst bei 1  $\mu\text{g}$  der Fall war. Die Zugabe von 3 mM Glycerol-3-P führte zu keiner Veränderung des Bandenmusters. Auch die Zugabe beider Substrate führte nicht zu einer gesteigerten Affinität des Proteins zur DNA. Bei letzterem Ansatz sind die Substrate wahrscheinlich während der Inkubation umgesetzt worden.



### 3. Ergebnisse



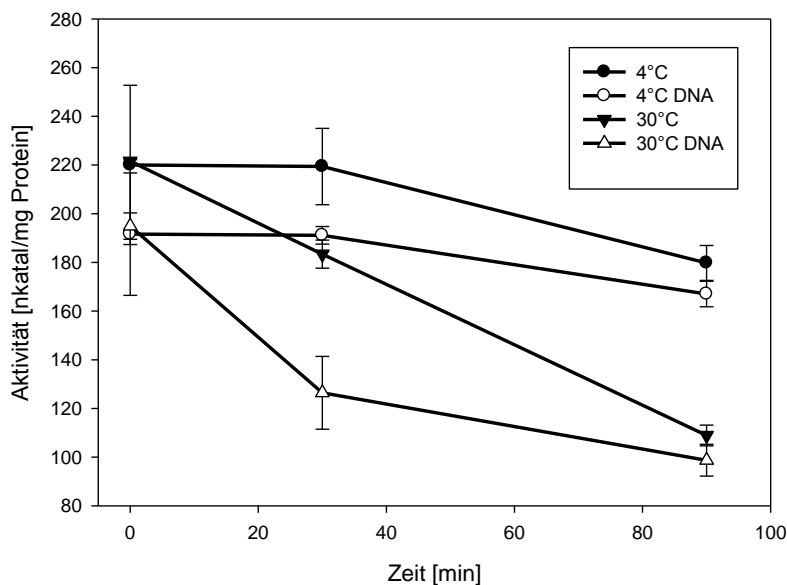
**Abb. 12:** EMSA mit dem GgpS-Protein und den Substraten Glycerol-3-P (3 mM) und ADP Glukose (3 mM). Über den einzelnen Gelspuren sind die eingesetzten GgpS-Mengen in µg angegeben. Es wurden 100 ng DNA in jeden Ansatz gegeben.

#### 3.1.3 Effekte von DNA auf die Stabilität des GgpS-Proteins

Für die Trehalosephosphatsynthase aus *Mycobacterium tuberculosis* wurde gezeigt, dass das Protein an DNA bindet. Ebenfalls wurde festgestellt, dass diese Interaktion nicht zu einer Hemmung des Proteins führt. Jedoch ist die Stabilität des Proteins in Anwesenheit von hohen NaCl-Mengen erhöht (Brühl 2010). Dies wurde bei GgpS bisher nicht untersucht. Sollte die Stabilität der GgpS gegenüber hohen Temperaturen durch die Interaktion mit Nukleinsäuren erhöht werden, könnte dies auch Auswirkungen auf die Stabilität bei höheren Temperaturen haben. Um dies zu untersuchen, wurde das GgpS-Protein unter zwei verschiedenen Temperaturen (4°C und 30°C) inkubiert. Dabei wurden Ansätze verglichen, denen nichts oder 2 µg DNA zugegeben wurden. Zu definierten Zeitpunkten wurden Aktivitätstests mit dem Enzym durchgeführt.

Das Ergebnis des Aktivitätstest ist in Abb. 13 dargestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass DNA unter den getesteten Bedingungen keinen stabilisierenden Effekt hat. Ein interessanter Nebenaspekt dieses Versuches ist die Tatsache, dass GgpS über 60 min eine relativ konstante Aktivität aufwies (außer 30°C + DNA).

Beim Ansatz mit 2  $\mu\text{g}$  DNA/0,1  $\mu\text{g}$  Ggps, (30°C) wurde ein früherer Abfall der Aktivität beobachtet. Dies würde eher auf eine destabilisierende Wirkung durch Nukleinsäuren hinweisen, was jedoch schwierig zu begründen ist.

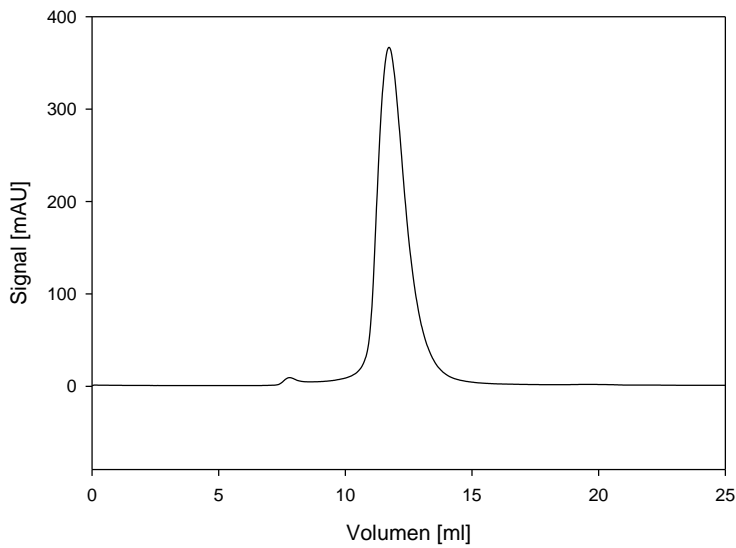


**Abb. 13:** Aktivitätstest mit GgpS (0,1  $\mu\text{g}$ ), welches über 90 min bei 4°C oder 30°C inkubiert wurde. Den Proben wurden, wo angegeben, 2  $\mu\text{g}$  DNA zugegeben.

#### 3.1.4 Oligomerisierung des GgpS-Proteins

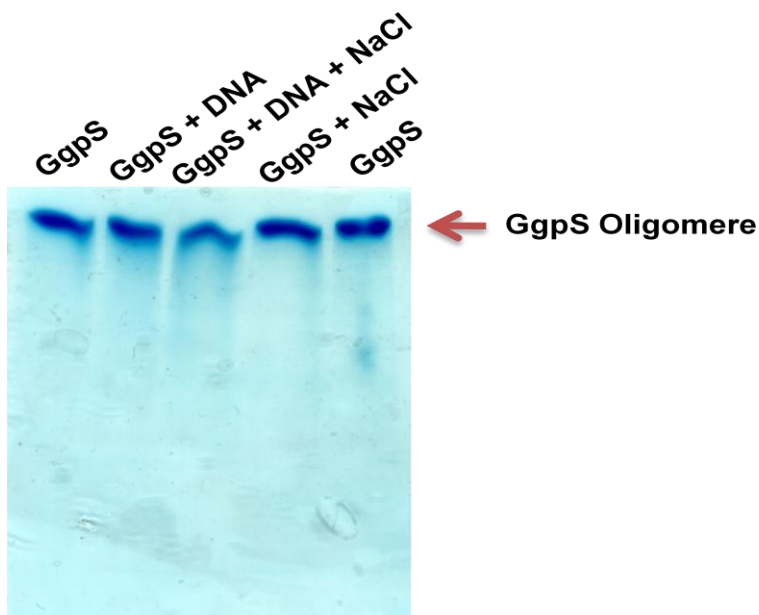
Es besteht die Hypothese, dass das GgpS-Protein oligomere Komplexe ausbildet. Hinweise liefert hierzu die Kristallstruktur der Trehalosephosphatsynthase aus *E. coli*. (Gibson *et al.* 2004). Diese weist große Ähnlichkeit zum GgpS-Protein auf. Daher ist es möglich, dass die GgpS ebenfalls solche Komplexe ausbildet.

Es wurde eine Gelfiltration durchgeführt, um eine Oligomerisierung des GgpS-Proteins zu untersuchen. In Abb. 14 ist das Ergebnis der Gelfiltration dargestellt. GgpS bildet Oligomere aus, die die Größe eines Pentamers aufweisen (271 kDa). Jedoch muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass eine Gelfiltration nur eine ungefähre Angabe der Größe eines Proteinkomplexes zulässt.



**Abb. 14:** Gelfiltration des GgpS-Proteins (3 mg). Es wurde eine Superdex200-Säule verwendet. Die Kalibrierung der Säule ergab, dass ein Elutionsvolumen von 11,6 ml einem pentameren Proteinkomplex entspricht (s. Anhang).

Es wurde weitergehend untersucht, ob sich die Größe der Oligomere verändert, wenn DNA oder NaCl zu den Proteinkomplexen gegeben werden. Es wurde eine native PAGE durchgeführt. Vor der Elektrophorese wurde GgpS mit DNA, NaCl oder beiden Substanzen inkubiert. Als Kontrolle diente eine Probe ohne Zusätze.



**Abb. 15:** Native PAGE des GgpS-Proteins mit 25  $\mu\text{g/ml}$  DNA, 200 mM NaCl und beiden Substanzen. Es wurde eine Vorinkubation von 10 min. bei 30°C durchgeführt.

In der nativen PAGE wurden keine Unterschiede der Oligomerisierung beobachtet (Abb. 15). Dies lässt darauf schließen, dass die Oligomerisierung des GgpS-Proteins nicht durch NaCl oder DNA beeinflusst wird. Verwunderlich war jedoch die Tatsache, dass in der nativen PAGE keine größeren Komplexe beobachtet wurden, da mehrere GgpS-Proteine an die DNA-Fragmente binden könnten. Möglicherweise sind diese Komplexe nicht in das Gel eingelaufen.

#### **3.1.5 Kinetik der GgpS-Nukleinsäure-Interaktion**

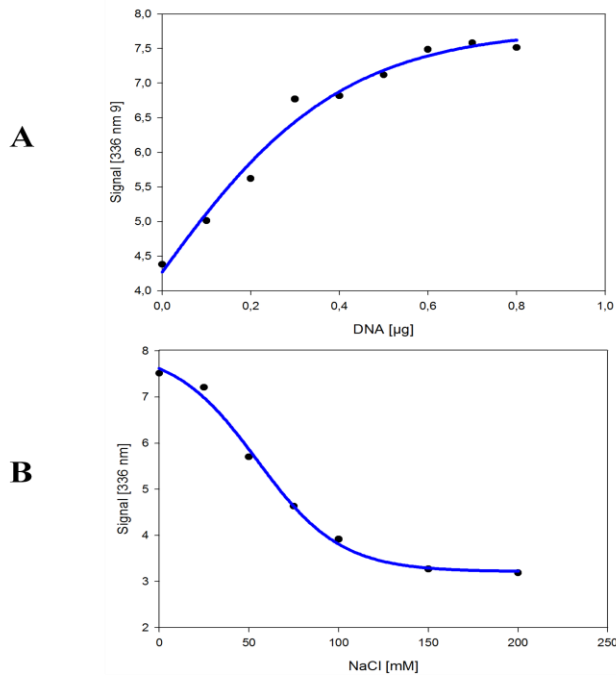
In der Arbeit von Jens Novak und in den vorigen Abschnitten dieser Arbeit wurde die Inhibition des GgpS-Proteins durch Nukleinsäuren untersucht. Hierbei konnten die Inhibition des Proteins und die Interaktion mit Nukleinsäuren gezeigt werden (Novak 2010). Die Art der Inhibition konnte während der vorliegenden Arbeit aufgeklärt werden. Bei der Hemmung handelt es sich um eine nicht-kompetitive Inhibition der GgpS durch Nukleinsäuren (s. Abschnitt 3.1.1). Die Kinetik der GgpS-Nukleinsäureinteraktion wurde untersucht. Dies sollte Hinweise über die Affinität des Proteins zu Nukleinsäuren liefern.

Für die Analyse der Bindungskinetik wurde eine Messung der Lichtstreuung des Proteins durchgeführt. Bei einer Interaktion des Proteins (z. B. mit DNA) könnte es zu einer Konformationsänderung des Proteins kommen, was zu einer Veränderung der Lichtstreuung führt. Wenn diese Änderung der Lichtstreuung abhängig von der Ligandenkonzentration ist, kann eine Bestimmung der Konstante  $K_D$  erfolgen. Aus ersten Vorversuchen ging hervor, dass sie die Lichtstreuung des GgpS-Proteins nach einer Zugabe von DNA dosisabhängig verändert (s. Anhang). Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass eine Störung der Messung durch DNA vorkommt.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden ansteigende DNA-Mengen zum GgpS-Protein gegeben. Nach Zugabe von DNA wurde das Protein für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lichtstreuung bei 336 nm gemessen.

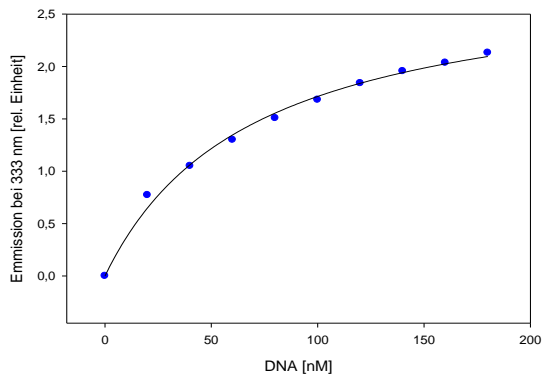
Nach der Messung der DNA-Bindung sollte die Dissoziation des Proteins nach einer Zugabe von NaCl untersucht werden. Hierzu wurden ansteigende Mengen NaCl zu den DNA-haltigen GgpS-Proben gegeben. Bei der Messung der Lichtstreuung konnte ein Anstieg des Signals nach einer Zugabe von DNA gemessen werden. Die Kurve hat einen typischen Verlauf für eine Ligandenbindung. Die Lichtstreuung stieg zunächst an und erreichte anschließend eine Sättigung. Dies ermöglicht die Berechnung des Parameters  $K_D$ . In diesem Experiment wurde jedoch zunächst Lachssperma-DNA verwendet, die auch in den Aktivitätstests Anwendung

fand. Diese ist für eine genaue Berechnung der DNA-Konzentration nur bedingt geeignet, da diese nur mittels Ultraschall auf eine Länge von ca. 2000 Bp. gebracht wurde. Daher wurde zunächst versucht die Messung der Lichtstreuung mit DNA durchzuführen, die eine definierte Länge aufweist und damit für eine exakte Konzentrationsbestimmung geeignet ist. Jedoch zeigte sich innerhalb dieser Experimente, dass die Lichtstreuungsmessungen mit Oligonukleotiden einer Länge von 50 Basen nicht funktionierte (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 16:** Lichtstreuung des GgpS-Proteins bei ansteigenden DNA-Mengen (A) und anschließender Zugabe von NaCl (B)

Als Alternative wurde daher versucht, die Tryptophanfluoreszenz des GgpS-Proteins zu messen. Diese verändert sich ebenfalls, wenn es zu einer Interaktion eines Proteins mit einem Substrat oder einem Inhibitor kommt bzw. eine Konformationsänderung stattfindet.



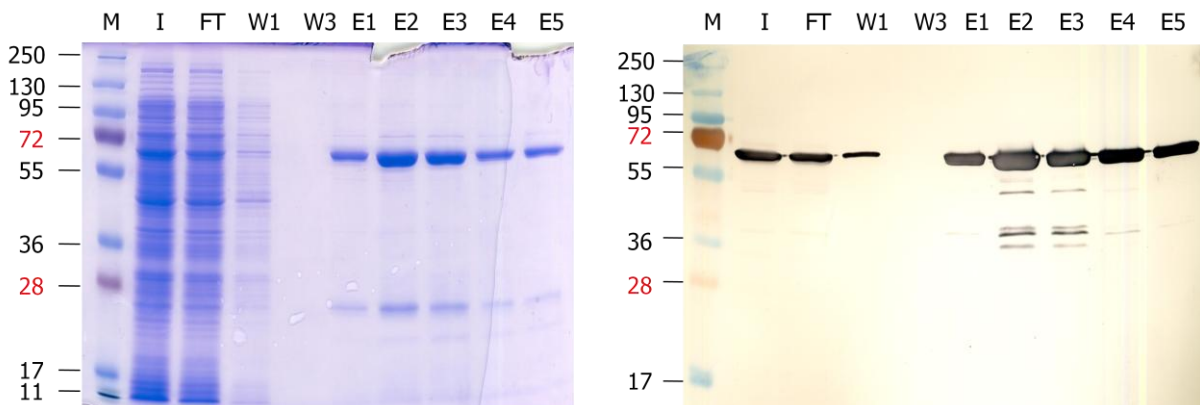
**Abb. 17:** Tryptophanfluoreszenz des GgpS-Proteins bei ansteigenden DNA-Konzentrationen. Als Anregungswellenlänge wurde 298 nm gewählt. Die Emission wurde bei 333 nm gemessen.

Anhand dieser Messung konnte der Wert für  $K_D$  ermittelt werden. Dieser betrug 69 nM, was einer sehr starken Affinität des Proteins zur DNA unter Niedrigsalzbedingungen entspricht. Dies stimmt mit den bisherigen Erwartungen überein, dass eine sehr genaue und schnelle Regulation des GgpS-Proteins stattfindet.

### 3.2 Vergleich der Inhibition von GgpS aus *Synechocystis* mit Glukosyltransferasen anderer Organismen

#### 3.2.1 Regulation der Aktivität von GgpS aus *Synechococcus* sp. 7002, WH8102

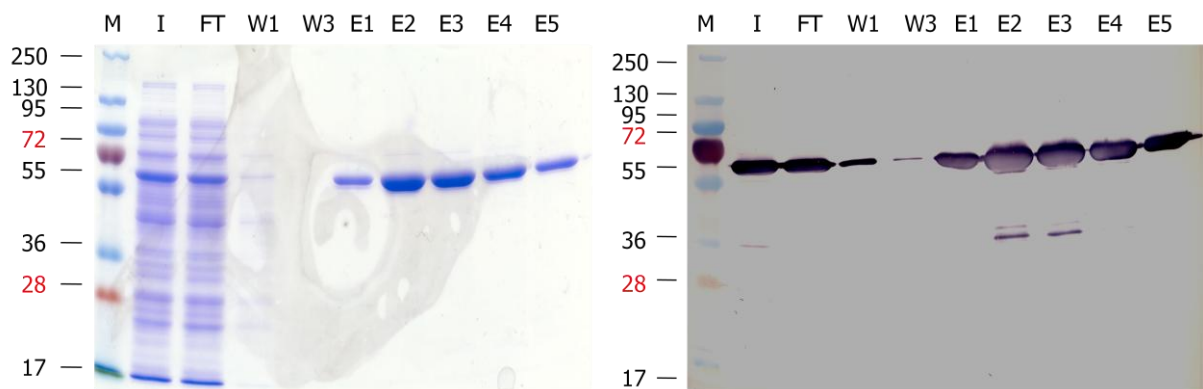
Das marine Cyanobacterium *Synechococcus* sp. 7002 besitzt ebenfalls eine GgpS. Diese weist sehr hohe Ähnlichkeiten zur GgpS aus *Synechocystis* auf. Die Aminosäuresequenzen stimmen zu 76% überein (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). *Synechococcus* sp. WH8102 besitzt eine GgpS, die eine zu 51% übereinstimmende Aminosäuresequenz aufweist. Aufgrund der relativ hohen Ähnlichkeiten der beiden Proteine mit der GgpS aus *Synechocystis* sollte die Aktivität dieser Proteine in Anwesenheit von DNA und deren Bindung an diese untersucht werden. Hierbei konnte auf bereits erstellte Expressionsvektoren (Novak 2010) zurückgegriffen werden. Es handelte sich wie bei GgpS aus *Synechocystis* um Expressionssysteme der Firma IBA (Göttingen). Es wurde ebenfalls der Vektor IBA-3 verwendet. Die beiden *ggpS*-Gene wurden in *E. coli* Bl 21 überexprimiert und anschließend die Proteine via Affinitätschromatografie gereinigt.



**Abb. 18:** Reinigung des GgpS-Proteins aus *Synechococcus* sp. 7002. Auf der linken Seite ist das Coomassie gefärbte SDS-Gel, auf der rechten Seite der Western Blot (anti Strep) gezeigt. M = Marker; I = Auftrag; FT = Durchfluss; W = Waschschrift; E = Elution

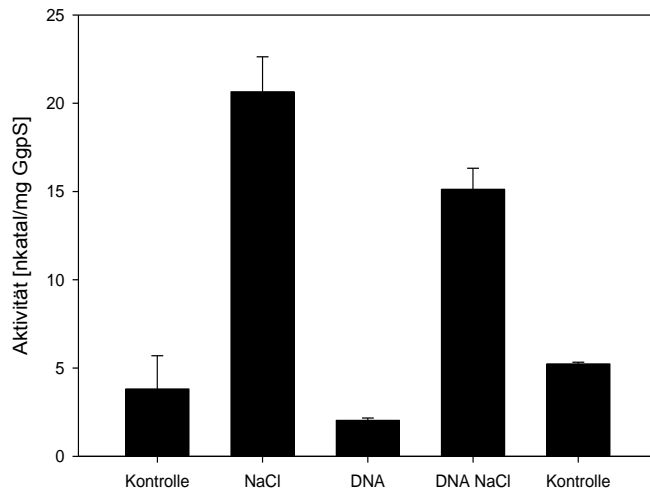
### 3. Ergebnisse

Wie in Abb.18 und Abb. 19 zu erkennen, konnten die beiden Proteine in den Elutionen erfolgreich nachgewiesen werden. Die Proteine wurden jeweils bei 58 kDa erwartet, was in beiden Reinigungsdokumentationen auch der Fall war. Die Western Blots mit einem Antikörper gegen den jeweils enthaltenen Strep Tag beweist die erfolgreiche Reinigung der beiden GgpS Proteine. In den mit Coomassie gefärbten Gelen fanden sich jedoch einige Verunreinigungen nach der Reinigung der GgpS aus *Synechococcus* sp. PCC 7002. Für die weiteren Analysen reichte der Reinheitsgrad beider Proteine jedoch aus.



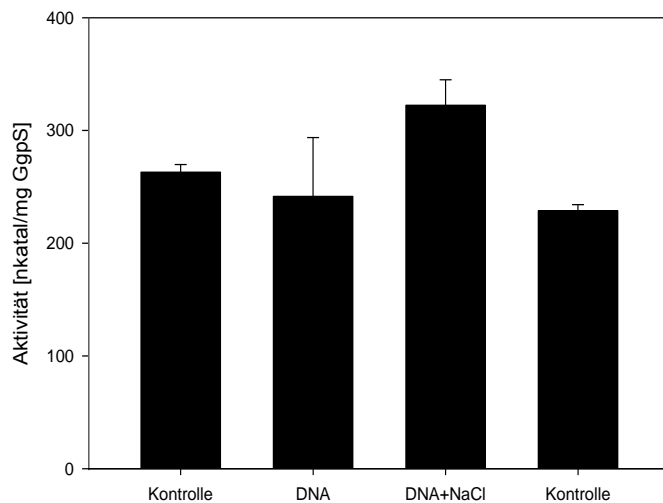
**Abb. 19:** Reinigung des GgpS-Proteins aus *Synechococcus* sp. WH8102. Auf der linken Seite ist das Coomassie gefärbte SDS-Gel, auf der rechten Seite der Western Blot (anti Strep) gezeigt. M = Marker; I = Auftrag; FT = Durchfluss; W = Waschschrift; E = Elution

Nach der erfolgreichen Reinigung der beiden GgpS-Proteine, sollte der Einfluss von Nukleinsäuren auf die Aktivität der Enzyme analysiert werden. Die GgpS aus *Synechococcus* sp. 7002 wies sehr niedrige Grundaktivitäten auf (Abb. 20). Diese ließ sich jedoch durch eine Zugabe von NaCl deutlich steigern. Der Zusatz von DNA zur GgpS verursachte einen leichten Rückgang der Aktivität, der jedoch deutlich geringer ausfiel als bei *Synechocystis* (Abb. 20).



**Abb. 20:** Aktivitätstest der GgpS aus *Synechococcus* sp. PCC 7002. Es wurden 1,4 µg GgpS verwendet. Die Testzeit betrug 12 min.

Die GgpS aus *Synechococcus* sp. WH8102 wies deutlich höhere Aktivitäten auf. Es wurde keine Steigerung der Aktivität durch NaCl beobachtet.

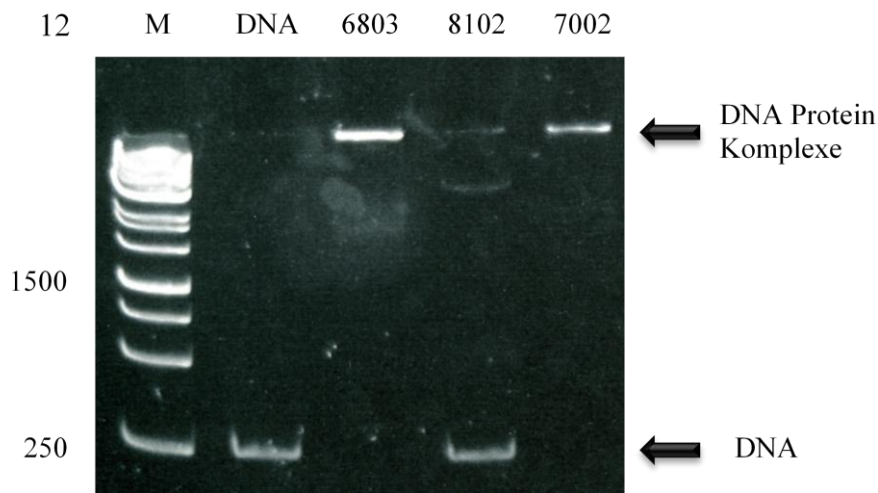


**Abb. 21:** Aktivitätstest der GgpS aus *Synechococcus* sp. WH8102. Es wurden 0,17 µg GgpS verwendet. Die Inkubationszeit betrug 10 min.

Wie in Abb. 21 zu erkennen, fand keine Inhibition des Proteins durch DNA statt. Die Aktivitäten blieben auch bei steigenden DNA-Mengen konstant. Dieses GgpS-Protein wird daher nicht durch Nukleinsäuren inhibiert.

Beide Proteine wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Interaktion mit DNA untersucht. Es wurde ein *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) durchgeführt. Es wurden die beiden GgpS-Proteine mit dem Enzym aus *Synechocystis* verglichen.





**Abb. 22:** EMSA der GgpS-Proteine aus *Synechocystis* sp. PCC6803, *Synechococcus* sp. 7002 und *Synechococcus* WH8102. Es wurden jeweils 1 µg Protein und 25 ng DNA verwendet als DNA diente ein PCR Produkt (233 Bp) welches mittels M13 Primern aus dem Vektor pDRIVE (Qiagen, Hilden) amplifiziert wurde.

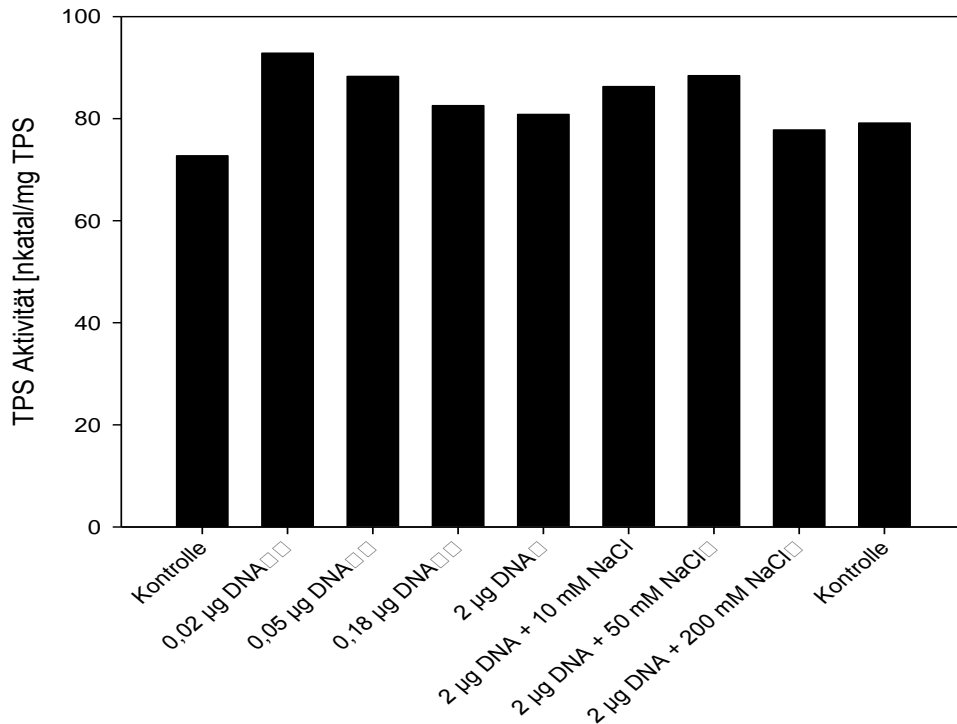
Das Ergebnis des EMSA betätigte die Vermutung aus dem Aktivitätsassay, dass die GgpS aus *Synechococcus* WH 8102 nicht mit Nukleinsäuren interagiert. Es wurde keine Verschiebung der DNA beobachtet, was für eine Interaktion des Proteins mit der DNA stehen würde. Der Einsatz der GgpS aus *Synechococcus* sp. 7002 führte zu einer Verschiebung der DNA, vergleichbar mit der GgpS aus *Synechocystis*. Die Ergebnisse aus dem Aktivitätstest und dem EMSA sprechen für einen vergleichbaren Effekt von Nukleinsäuren auf die GgpS wie in *Synechocystis*. Die starke Aktivierung von GgpS durch NaCl findet jedoch in *Synechocystis* nicht in diesem Ausmaß statt (s. Abb. 33).

### 3.2.2 Einfluss von Nukleinsäuren auf die TPS aus *Mycobacterium tuberculosis*

Die TPS aus *Mycobacterium tuberculosis* weist ebenfalls Ähnlichkeiten zur GgpS auf. Es wurde bereits gezeigt, dass die TPS an Heparin bindet und dadurch wahrscheinlich stabilisiert wird (Pan *et al.* 2002). Im Rahmen der Bachelorarbeit von Natalie Brühl wurden bereits erste Erkenntnisse über eine mögliche Nukleinsäureinteraktion gewonnen. Die TPS ging eine Bindung mit DNA in einem EMSA ein (Brühl 2010). In einem Aktivitätstest wurde ein stabilisierender Effekt durch DNA festgestellt. Da jedoch, wie im ersten Abschnitt dieses Kapitels beschrieben, die genaue Dosis einer Hemmung der GgpS ermittelt werden musste, sollte der Aktivitätstest erneut mit angepassten Bedingungen durchgeführt werden. Die

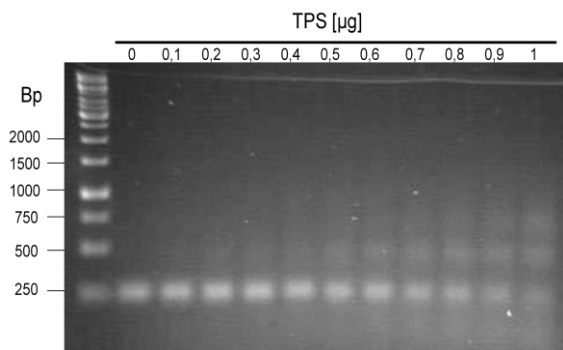
### 3. Ergebnisse

Zugabe von DNA hatte keine starken Auswirkungen auf die Aktivität der TPS. Die Zugabe von NaCl hatte keine negativen Auswirkungen auf das TPS Protein.



**Abb. 23:** Aktivitätstest der TPS aus *Mycobacterium tuberculosis*. Den Proben wurden unterschiedliche Mengen DNA zugesetzt. Ebenfalls wurde der Einfluss von NaCl in Anwesenheit von DNA untersucht. Es wurden 0,3 µg TPS verwendet als Substrate dienten ADP-Glukose und Gukose-6-P

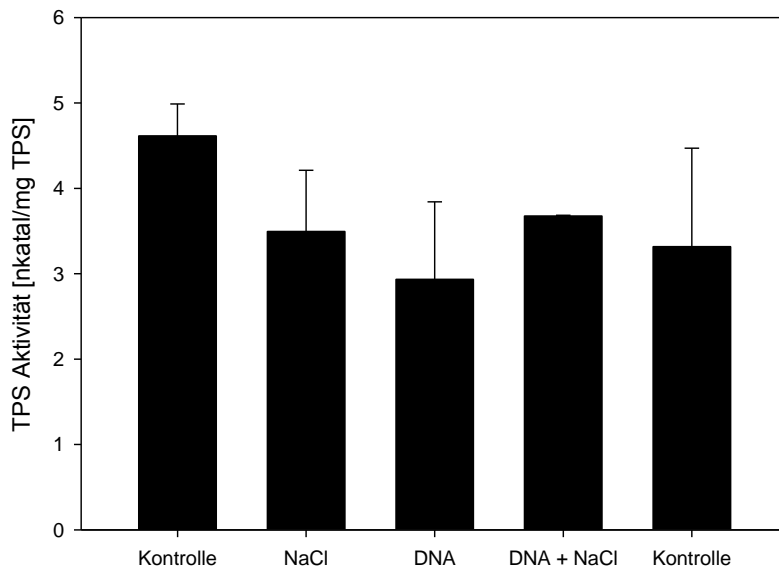
Als Kontrolle für die stattfindende Interaktion des Proteins mit DNA wurde ebenfalls ein EMSA durchgeführt (Abb. 24). Dieser bestätigte die bisherigen Beobachtungen (Brühl 2010). Die Zugabe von TPS führte zu einer Verschiebung der DNA, was für eine Interaktion des Proteins mit der DNA spricht. Diese Verschiebung ist abhängig von der zugegebenen TPS Menge.



**Abb. 24:** EMSA des TPS-Proteins mit 100 ng DNA, die mit M13 Primern aus dem pDRIVE Plasmid amplifiziert wurde.

### 3.2.3 Regulation der TPS aus *E. coli* und der GgpS aus *Thiobacillus denitrificans*

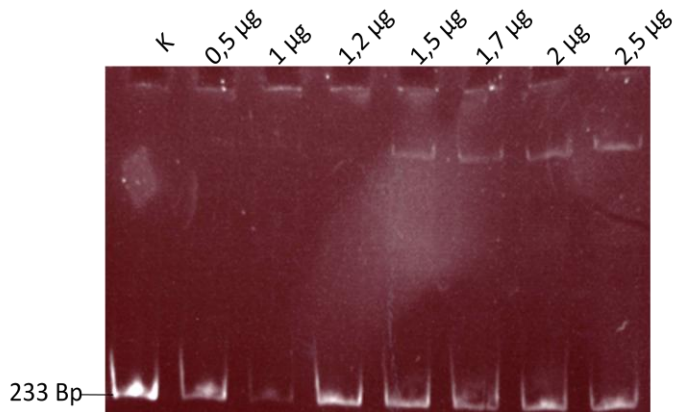
Die Trehalosephosphatsynthase aus *E. coli* weist Ähnlichkeiten zur GgpS aus *Synechocystis* auf (s. Abb. 29). Bisher ist nur wenig über die posttranslationale Regulation des Proteins bekannt. Es sollte in dieser Arbeit getestet werden, ob bei dieser Glukosyltransferase eine Interaktion mit Nukleinsäuren und eine Inhibition der Aktivität stattfindet. Die TPS konnte in früheren Arbeiten bereits angereichert und gereinigt werden (Brühl 2010). Die Reinigung des Proteins verlief erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die Auswirkungen von NaCl und DNA auf die Enzymaktivität untersucht. Als Substrate wurden ADP-Glukose und Glukose-6-Phosphat verwendet.



**Abb. 25:** Aktivitätstest der Trehalosephosphatsynthase aus *E. coli*. 5 µg TPS wurden verwendet. Die Testzeit betrug 12 min. Die Konzentration der Substrate ADP-Glukose und Glukose-6-Phosphat betrug 3 mM.

Die TPS wies in den Tests sehr geringe Aktivitäten auf ( $\approx 5$  nkatal/mg TPS). Wie in Abb. 25 zu erkennen, hatte ein Zusatz von DNA oder NaCl nur geringfügige Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms. Beide Substanzen senkten die Aktivität leicht. Jedoch sind diese Effekte nicht vergleichbar mit denen am GgpS Protein aus *Synechocystis*.

Eine mögliche Interaktion der TPS mit Nukleinsäuren wurde über einen EMSA untersucht.

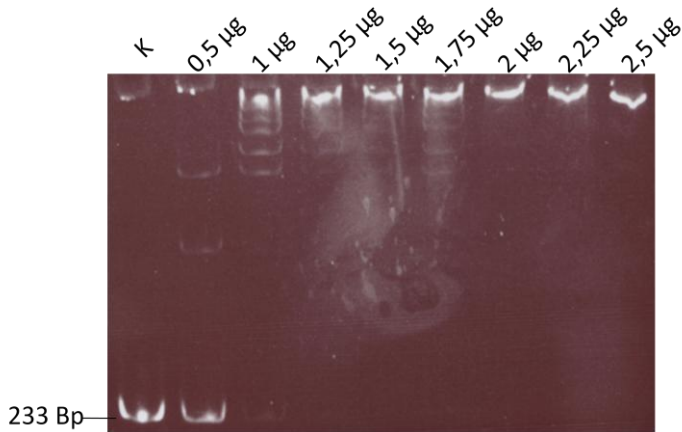


**Abb. 26:** EMSA der TPS aus *E. coli*. Als DNA diente ein 233 Bp Fragment aus dem Vektor pDRIVE. In der Spur K wurde lediglich das DNA-Fragment (25 ng) als Kontrolle in den Ansatz gegeben. Die weiteren Spuren zeigen die Ansätze, denen ansteigende Mengen TPS und 25 ng DNA zugegeben wurden.

Die Zugabe der TPS zu DNA hatte geringe Auswirkungen auf die DNA (Abb. 26). Lediglich eine sehr schwache Bande war bei ansteigenden Mengen der zugegebenen TPS zu erkennen, die für eine verschobene DNA steht. Der Großteil der DNA lag unverändert in der Probe vor. Daraus kann geschlossen werden, dass die TPS nicht oder nur in geringem Maße mit Nukleinsäuren interagiert.

*Thiobacillus denitrificans* besitzt ebenfalls eine GgpS. Über die posttranslationale Regulation ist ebenfalls nur wenig bekannt. Auch dieses Protein sollte hinsichtlich seiner Interaktion mit Nukleinsäuren charakterisiert werden. Die Anreicherung und Reinigung wurden bereits in vorigen Arbeiten etabliert (Brühl 2010). Im Fokus dieser Arbeit stand die Analyse der Auswirkungen von Nukleinsäuren auf das GgpS-Protein und die Interaktion mit Nukleinsäuren.

Nach mehreren Optimierungsversuchen ist es jedoch nicht gelungen, die Aktivität des Proteins zu messen (Daten nicht gezeigt). Selbst der Einsatz von 5 µg GgpS führte zu keiner GG-Synthese des Enzyms. Jedoch war es möglich, einen EMSA mit dem Protein durchzuführen, um die Interaktion des Proteins mit DNA zu untersuchen. Die Zugabe der GgpS zu der DNA führte zu einer Verschiebung der DNA ab einer Proteinmenge von 1 µg (Abb. 27).



**Abb. 27:** EMSA der GgpS aus *Thiobacillus denitrificans*. Als DNA diente ein 233 Bp Fragment aus dem Vektor pDRIVE. In der Spur K wurde das DNA-Fragment (25 ng) als Kontrolle in den Ansatz gegeben. Die weiteren Spuren zeigen die Ansätze, denen ansteigende Mengen GgpS und 25 ng DNA zugegeben wurden.

Es fanden sich jedoch mehrere Banden in den einzelnen Spuren, die bis zu 1,75 µg GgpS aufwiesen. Diese könnten für unterschiedliche Proteinmengen an einzelnen Fragmenten der DNA stehen.

### 3.3 Identifikation der Bindungsregion für Nukleinsäuren

#### 3.3.1 Biotinylierung des GgpS-Proteins

Das GgpS-Protein bindet an das negativ geladene Rückgrat der Nukleinsäuren (Novak 2010). Es handelt sich wahrscheinlich um eine elektrostatische Wechselwirkung des negativ geladenen Rückgrades und positiv geladenen Aminosäureresten am Protein. Für diese Wechselwirkung ist es notwendig, dass die an der Interaktion beteiligten Aminosäurereste exponiert vorliegen. Es sollte nun untersucht werden, welche Aminosäuren an der Interaktion des Proteins mit den Nukleinsäuren beteiligt sind. Hierzu wurde eine Biotinylierung des GgpS-Proteins in An- und Abwesenheit von DNA durchgeführt.

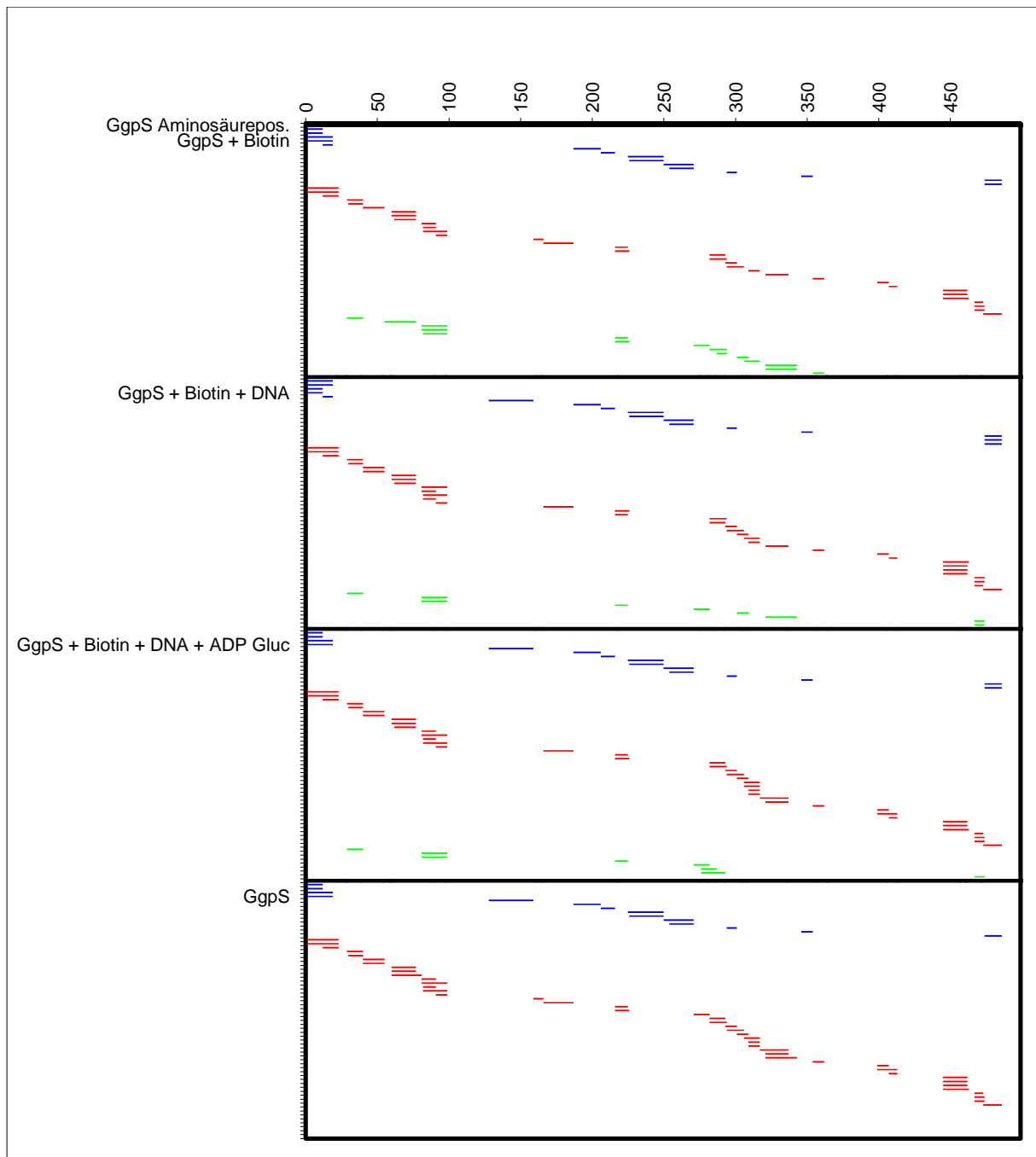
Die DNA könnte die positiven Reste, mit denen sie interagiert, vor einer Biotinylierung schützen. Zur Biotinylierung des Proteins wurde N-hydroxysuccinimidobiotin (NHS-Biotin) verwendet. NHS-Biotin reagiert mit primären Aminen, die an Lysinen zu finden sind und bildet eine Amidbindung aus. Die Reaktion wurde nach 5 min. durch Zugabe von Tris abgestoppt. Anschließend wurden die Proben auf ein Acrylamidgel aufgetragen und eine SDS PAGE durchgeführt. Danach wurden die Banden bei 55 kDa ausgeschnitten und für eine Analyse an das Zentrum für molekulare Medizin Köln (ZMMK) gesendet. Dort wurde ein Trypsinverdau des GgpS-Proteins durchgeführt und die Peptide hinsichtlich ihrer

Modifikationen bzw. Biotinylierung analysiert. Es wurden anschließend die Biotinylierungsmuster in An- und Abwesenheit von DNA verglichen. Zusätzlich wurde eine Probe analysiert, in der das GgpS-Protein mit DNA und ADP-Glukose inkubiert wurde. In Abb. 12 wurde bereits gezeigt, dass ADP-Glukose die Affinität des GgpS-Proteins zu DNA erhöht. Daher sollte nun untersucht werden, ob möglicherweise weitere positive Aminosäurereste an der DNA-Bindung in Anwesenheit von ADP-Glukose für eine DNA-Bindung genutzt werden können. Denkbar wäre eine Konformationsänderung des Proteins in alleiniger Anwesenheit von ADP-Glukose, die weitere positiv geladene Aminosäurereste exponiert. In Abb. 28 und Tab 4 ist das Ergebnis des Experimentes dargestellt.

**Tab. 5:** Auflistung der analysierten Lysine nach der Biotinylierung. Mit „Biotin“ sind die Ansätze die GgpS und NHS-Biotin beinhalteten. „Biotin + DNA“ zeigt die Ansätze denen NHS-Biotin, GgpS und DNA zugegeben wurden. + steht für eine Biotinylierung; - für eine ausgebliebene Biotinylierung

Lysin Position	Biotin	Biotin + DNA
59	+	-
61	+	-
275	+	+
281	+	+
286	+	-
308	+	-
336	+	-
364	-	-
462	-	-
472	-	+
473	-	+

### 3. Ergebnisse



**Abb. 28:** Biotinylierungsmuster der Peptide des GgpS Proteins nach Inkubation bei verschiedenen Bedingungen. Die obere Achse ist mit den Aminosäureresten der GgpS dargestellt (499 Aminosäuren gesamt). In Blau sind Peptide angezeigt, die nicht biotinyliert wurden und auch kein Lysin aufweisen. In Rot sind die Peptide dargestellt, die nicht biotinyliert wurden aber ein Lysin aufweisen. In Grün sind die Peptide angezeigt, die biotinyliert sind und ein Lysin aufweisen. Für den Verdau des Proteins wurde Trypsin verwendet

Die Biotinylierung des GgpS Proteins lieferte Erkenntnisse über die an der Interaktion mit Nukleinsäuren beteiligten Lysine. Es fiel insbesondere ein Bereich auf, der auf der GgpS im Sequenzbereich vom 270 – 380 auf. Nach einer Zugabe von DNA wurden weniger Peptide in

diesem Bereich biotinyliert. Ebenfalls in der Region der Aminosäuren 60-100 wurden weniger Peptide biotinyliert.

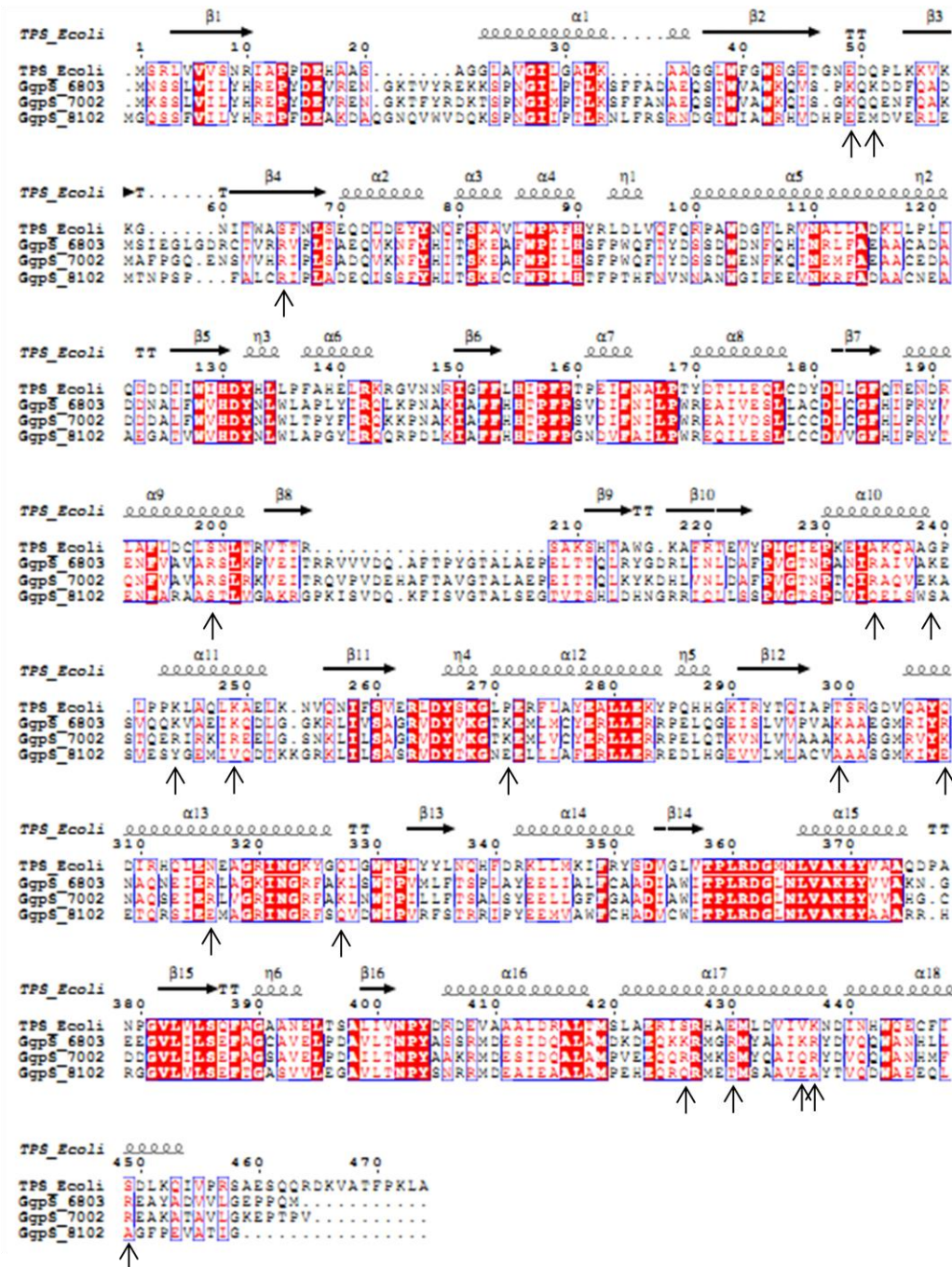
Die zugegebene ADP-Glukose führte, im Vergleich zu den Proben, denen lediglich DNA zugesetzt wurde, nur zu geringfügigen Unterschieden. Hier wurden Peptide im Bereich von AS 200-240 und 320 – 340 nicht mehr biotinyliert.

Die unterste Probe in Abb. 28 enthielt lediglich GgpS. Hier kann abgelesen werden, dass der Verdau mit Trypsin und die anschließende Analyse zu einer guten Abdeckung der gesamten Aminosäurereste des Proteins führte.

Ein sehr interessanter Sachverhalt zeigte sich beim Vergleich der Sequenzen der GgpS aus *Synechocystis* und *Synechococcus* sp. WH8102. Es zeigte sich, dass die Lysine, die nach der Inkubation mit NHS-Biotin nicht biotinyliert wurden, in der GgpS von *Synechococcus* nicht positiv geladen sind. Dies ist auch bei einigen Argininen der Fall, die nicht im Biotinylierungsexperiment erfasst wurden, da diese nicht mit NHS-Biotin reagieren. Anhand der Ergebnisse der Biotinylierung und dem Vergleich mit der GgpS aus *Synechococcus* konnten Aminosäuren ermittelt werden, die an der Interaktion mit Nukleinsäuren beteiligt sein könnten. Aminosäurereste, die auf der GgpS nicht exponiert sind, wurden ausgeschlossen. In Abb. 29 ist ein Sequenzvergleich der GgpS aus *Synechocystis* mit denen aus *Synechococcus* sp. 7002 und WH8102 dargestellt. Zusätzlich wurde die TPS aus *E. coli* herangezogen, was eine grobe Abschätzung der Sekundärstrukturen der Proteine ermöglicht, da dieses Protein bereits kristallisiert wurde (Gibson *et al.* 2004).



### 3. Ergebnisse



**Abb. 29:** Vergleich der Aminosäuresequenzen der TPS aus *E. coli* mit GgpS aus *Synechocystis* und den *Synechococcus* Stämmen 7002 und WH8102. In den blauen Kästen befinden sich exponierte Aminosäuren. In den roten Kästen sind konservierte Aminosäurereste dargestellt. Über den Sequenzen befinden sich die Sekundärstrukturen, in denen sich die Aminosäuren wahrscheinlich befinden. Die Nummern beziehen sich auf die Aminosäuresequenz der TPS aus *E. coli*. Mit den Pfeilen sind die in Tab. 5 aufgeführten Aminosäurereste aufgeführt. Die Grafik wurde mit Hilfe des Programmes Esript 2.2 erstellt.

Anhand des Vergleichs in Abb. 29 und den Ergebnissen der Biotinylierung wurden die Aminosäuren ermittelt, die an der Binding an Nukleinsäuren beteiligt sein könnten (Tab. 5).

### 3. Ergebnisse

**Tab. 6:** Vergleich von positiv geladenen Aminosäuren der *Synechocystis* GgpS mit der GgpS aus den beiden im Text beschriebenen *Synechococcus* Stämmen.

6803	Position	8102	Position	7002	Position
K	59	E	62	K	59
K	61	M	64	Q	61
R	80	C	80	H	79
R	215	S	215	R	214
R	270	Q	270	R	270
K	275	S	275	K	275
K	281	Y	281	R	281
K	286	V	286	R	286
K	308	E	309	K	308
K	336	A	337	K	336
R	345	E	346	K	345
R	353	E	354	R	353
K	364	Q	365	K	364
K	462	Q	463	R	462
R	466	T	467	S	466
K	472	E	473	Q	472
R	473	A	474	R	473
R	485	A	486	R	485

In Tabelle 5 sind alle positiven Aminosäuren von GgpS aufgelistet, die eine unterschiedliche Ladung zur *Synechococcus* WH8102 GgpS aufweisen.

Die Suche nach den putativen Nukleinsäurebindungsstellen wurde nach drei Kriterien durchgeführt:

1. Eine exponierte Position der positiv geladenen Aminosäuren
2. Eine unterschiedliche Ladung in der *Synechocystis* GgpS im Vergleich zu *Synechococcus* sp. WH8102
3. Eine ausbleibende Biotinylierung von Lysin in Anwesenheit von DNA (schloss keine Arginine mit ein)

Auf diese Weise wurden 13 Aminosäurereste ausgewählt, die nun hinsichtlich ihrer Nukleinsäureinteraktion und der Hemmung durch diese untersucht werden sollten.

### 3.3.2 Erstellung von GgpS-Varianten denen einzelne positiv geladene Aminosäurereste fehlen

Der Austausch von positiven Aminosäureresten, die an der Interaktion von GgpS mit Nucleinsäuren beteiligt sind, könnte zu einer beeinträchtigten Bindung des Proteins an Letztere führen. Ebenfalls könnte die Inhibition des Proteins durch Nucleinsäuren beeinträchtigt sein. Es wurden daher die im vorigen Abschnitt beschriebenen positiv geladenen Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht. Hierzu wurde die CCR Reaktion verwendet (s. Material und Methoden). In Tabelle 6 sind die erstellten *ggpS*-Varianten aufgelistet.

**Tab. 7:** Auflistung der GgpS Varianten, die mittels CCR erstellt werden sollten

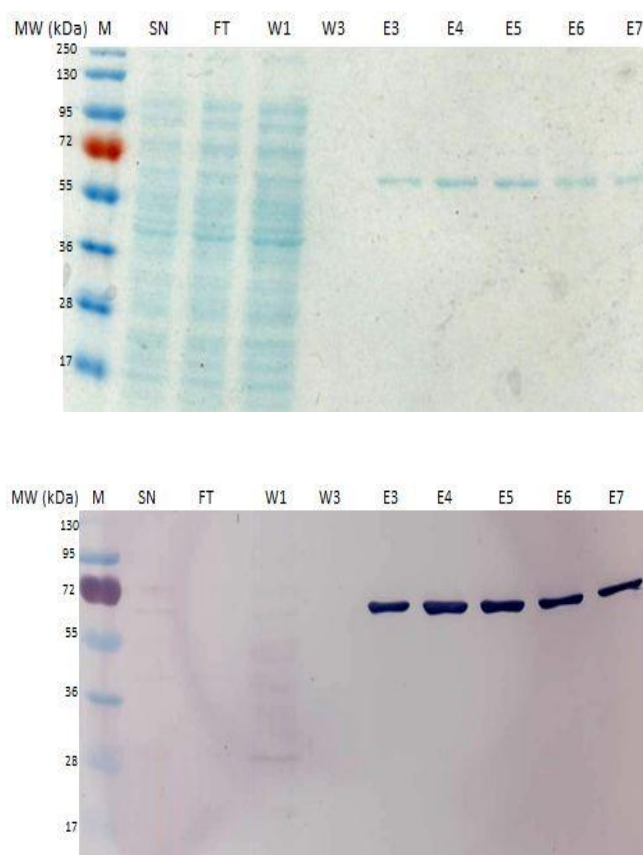
Nr.	Variante
1	K61A
2	R80A
3	R215A
4	R270A
5	K275A
6	K281A
7	K286A
8	K281A/K286A
9	K308A
10	K336A
11	R345A
12	R353A
13	R364A
14	R485A

Nachdem die CCR durchgeführt wurde, wurden die erzeugten Produkte in den Vektor pASK IBA-3 ligiert. Hierzu wurden die Schnittstellen *BamHI* und *PstI* verwendet. Der Großteil der erzeugten Konstrukte wies die einzuführende Punktmutation auf (Daten nicht gezeigt). Für zwei Aminosäurereste konnten jedoch keine Austausche erzielt werden. Dies war der Fall bei den Aminosäureresten K61 und R215. Selbst nach mehrfacher Wiederholung der CCR wiesen die Konstrukte lediglich das Wildtyp Gen für *ggpS* auf. Es wurde daher entschieden, diese beiden Reste nicht weiter zu untersuchen. Die erfolgreich erzeugten *ggpS* Varianten wurden

in *E. coli* BL21 angereichert und sollten anschließend gereinigt werden. Hierzu wurde eine Affinitätschromatographie mit einer StrepTactin-Matrix durchgeführt. Die Proteine wurden durch die Klonierung in den Vektor pASK IBA3 mit einem Strep Tag versehen.

#### 3.3.3 Reinigung der GgpS Varianten

Die verschiedenen Varianten wurden nach der Expression gereinigt. Es war möglich, alle erstellten Varianten zu reinigen. In Abb. 30 ist ein Beispiel für eine Reinigung dargestellt.

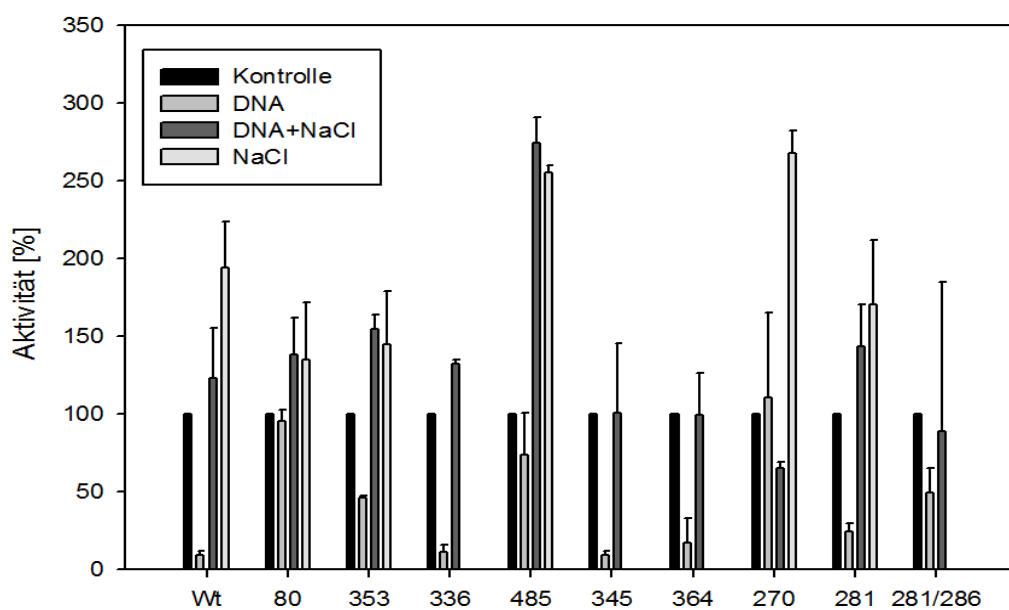


**Abb. 30:** Reinigung der GgpS Variante K281A/K284A. oben: Coomassiefärbung; unten: Western Blot. SN=Rohextrakt, FT= Durchfluss, W=Waschschritt, E=Elution

Die Ausbeute an gereinigtem Protein fiel sehr gering aus. Im Gegensatz zur natürlichen GgpS, bei der durchschnittlich 6 mg/ml gewonnen wurden, ergaben sich bei den Varianten durchschnittliche Konzentrationen von 0,1 mg/ml. Diese Mengen reichten jedoch aus, um weitere Analysen mit den Varianten durchzuführen.

### 3.3.4 Charakterisierung der GgpS-Varianten

Die verschiedenen GgpS-Varianten wurden nun mittels Enzymaktivitätstests charakterisiert. Hierbei sollte untersucht werden, ob die Hemmung der Proteine durch DNA in einer oder mehreren Mutanten eingeschränkt ist. Hierzu wurden die Enzyme mit DNA inkubiert und die Aktivität bestimmt. Ebenfalls wurden Proben untersucht, denen zusätzlich zur DNA NaCl zugesetzt wurde. Für den Test der Aktivität der GgpS-Varianten wurden diese lediglich mit den beiden Substraten ADP-Glukose und Glycerol-3-P inkubiert.



**Abb. 31:** Enzymaktivitätstests der GgpS-Varianten im Vergleich mit der Wildtyp-GgpS (Für Absolutwerte der Aktivitäten siehe Tab. 8). Es wurden jeweils 0,1 µg GgpS verwendet. Die Testzeit betrug 10 min.

Zunächst wurde festgestellt, dass alle getesteten Mutanten eine sehr niedrige Aktivität im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen (s. Tab. 8). Anhand einer Auswertung mit relativ dargestellten Werten ließen sich Erkenntnisse gewinnen. Fünf Varianten wurden ineffizienter durch DNA inhibiert als die natürliche GgpS. Hierbei handelte es sich um die Varianten R80A, R353A, R485A, R270A und K281A. Dies deutet auf eine Beteiligung dieser Reste an der Interaktion von GgpS mit Nukleinsäuren hin. Zusätzlich fand eine geringere Hemmung der GgpS in der Variante K281A/K286A statt. Es ist daher auch möglich, dass die Aminosäure K286 an der Interaktion des Proteins an Nukleinsäuren beteiligt ist. Dies konnte jedoch nicht über den Aktivitätstest überprüft werden, da diese Variante keine Aktivität

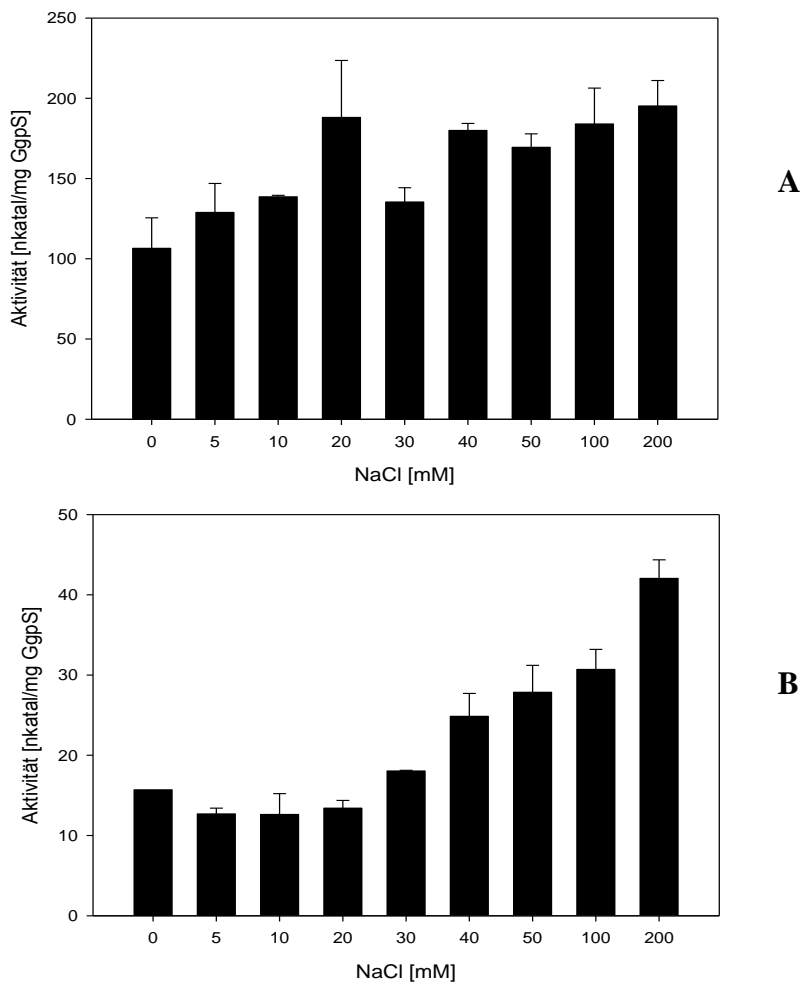
### 3. Ergebnisse

aufwies. Sehr auffällig war, dass einige Varianten eine vergleichsweise hohe Aktivität aufwiesen, wenn diesen neben DNA auch NaCl zugegeben wurden.

Die Varianten R485A, R270A und K281A wiesen eine sehr hohe Aktivität nach der Zugabe von NaCl auf. Möglicherweise wird durch das zugegebene NaCl die Konformation der Varianten verändert, was wiederum zu einer höheren Aktivität führt.

Diese Situation wurde an der GgpS Variante R270A überprüft. Hierzu wurde ein weiterer Aktivitätstest mit steigenden NaCl-Konzentrationen durchgeführt.

Bei der Wildtyp-GgpS wurde eine leichte Steigerung der Aktivität durch NaCl beobachtet (Abb.32) Dieser Effekt fiel bei der Variante R270A deutlich stärker aus. Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Hinweis auf eine Aktivierung der GgpS Varianten durch NaCl. Jedoch fiel die Steigerung der Aktivität niedriger aus als bei den Ansätzen, denen DNA und NaCl zugesetzt wurden.



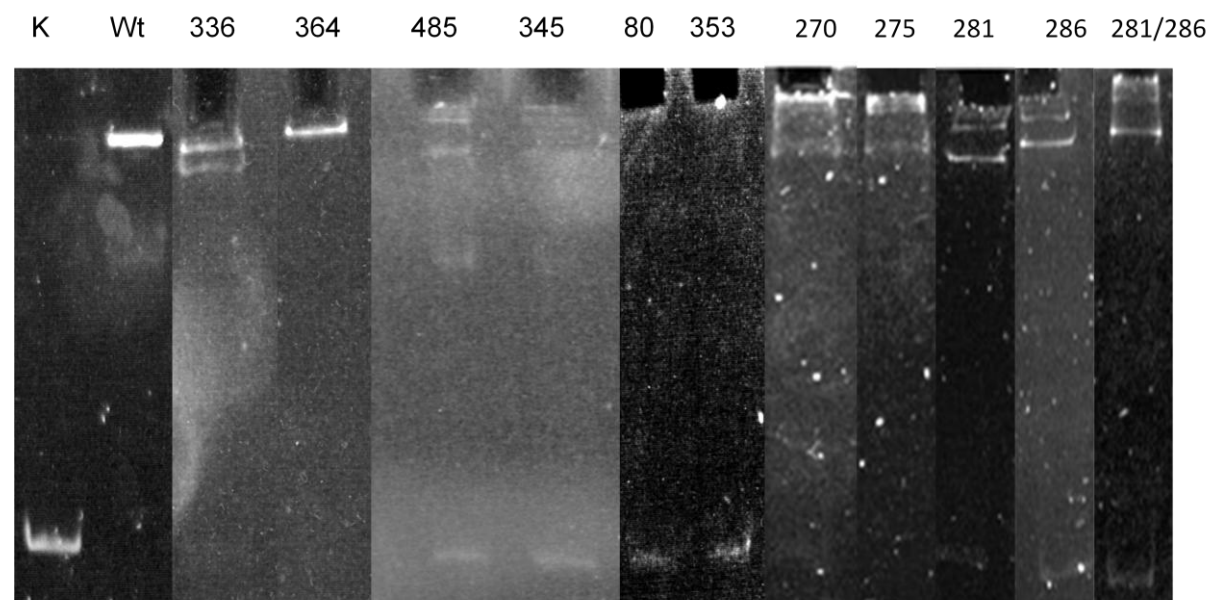
**Abb. 32:** Aktivitätstest der GgpS mit ansteigenden NaCl-Konzentrationen. Es wurde die Wildtyp-GgpS (A) mit der Variante R270A (B) verglichen.

### 3.3.5 DNA Bindung der GgpS Varianten

Nachdem in Enzymaktivitätstests bereits Effekte, die durch die einzelnen Aminosäureaustausche hervorgerufen wurden, beobachtet wurden, sollte die Interaktion der GgpS-Varianten mit DNA untersucht werden. Hierzu wurden *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) durchgeführt. Es wurden die GgpS-Varianten mit einem 233 Bp DNA-Fragment inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 8% Acrylamidgel aufgetragen.

Die meisten Varianten verursachten eine Veränderung des Laufverhaltens der DNA im Acrylamidgel (Abb. 33). Jedoch fiel die Menge an verschobener DNA unterschiedlich aus. Bei der wildtypischen GgpS fand eine vollständige Verschiebung der DNA statt. Dies ist am Fehlen der DNA-Bande wie in der Kontrolle erkennbar. Bei sieben Varianten war diese Bande weiterhin vorhanden.

Die Varianten R485A, R345A, R80A, R353A K281A/K286A wiesen Signale auf Höhe der nicht verschobenen DNA auf. Bei den Varianten R270A, K281A und K286A sind noch relativ schwache Signale erkennbar. Dass diese jedoch mit einer schwächeren DNA Bindung in Verbindung stehen könnten, zeigt das Ergebnis der Variante K281A/K286A. Diese Doppelmutante wies ein stärkeres Signal auf Höhe der nicht verschobenen DNA auf als bei den beiden Einzelmutanten. Es ist davon auszugehen, dass die Doppelmutation die DNA-Bindung stärker beeinflusst.



**Abb. 33:** EMSA des GgpS-Proteins und der Varianten, bei denen einzelne Aminosäurereste ausgetauscht wurden. Es wurden jeweils 0,5 µg Protein aufgetragen. Die DNA-Menge betrug 25 ng. Als Kontrolle (K) wurde DNA ohne Protein aufgetragen. Die Anordnung der Varianten geht auf die Zusammenstellungen mehrerer Gele in dieser Abbildung zurück.

### 3. Ergebnisse

Da jedoch in allen Proben noch eine Verschiebung der DNA stattfindet, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass mehrere Reste an der Nukleinsäureinteraktion von GgpS beteiligt sind.

In Tabelle 8 sind die Enzymaktivitäten und die Ergebnisse aus den EMSA-Experimenten zusammengefasst dargestellt. Hierbei sind auch die Zusammenhänge zwischen den beeinträchtigten Hemmungen durch DNA in den Varianten und der schwächeren DNA-Bindung erkennbar.

**Tab. 8:** Zusammenfassung der Charakterisierung der GgpS-Varianten. Die Varianten, die eine Veränderung in der Inhibition und der DNA Bindung aufweisen, sind hervorgehoben.

Variante	Mutagenese	Reinigungs- ausbeute [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	EMSA Shift	GgpS Aktivität [nkat]	GgpS Aktivität [nkat] +DNA	GgpS Aktivität [nkat]+NaCl +DNA
Wt	Ja	4	Ja	75	5	60
K61A	Nein	-	-	-	-	-
R80A	<b>Ja</b>	<b>0,04</b>	<b>Nein</b>	<b>30</b>	<b>20,5</b>	<b>29,8</b>
R215A	Nein	-	-	-	-	-
R345A	Ja	0,101	Nein	6	0,76	12,4
K308A	Ja	0	-	-	-	-
K336A	Ja	0,144	Ja	16	1,97	22,6
R353A	<b>Ja</b>	<b>0,1</b>	<b>Nein</b>	<b>30</b>	<b>13,26</b>	<b>44,8</b>
R364A	Ja	0,13	Ja	22	3,4	24,1
R485A	<b>Ja</b>	<b>0,16</b>	<b>schwächer</b>	<b>3,5</b>	<b>3,64</b>	<b>35,9</b>
R270A	<b>Ja</b>	<b>0,1</b>	<b>schwächer</b>	<b>6</b>	<b>4,5</b>	<b>40</b>
K275A	Ja	0,1	Ja	0	0	0
K281A	Ja	0,1	schwächer	22	4	69,5
K286A	Ja	0,1	schwächer	0	0	0
K281A/K286A	<b>Ja</b>	<b>0,5</b>	<b>Nein</b>	<b>20</b>	<b>9</b>	<b>17</b>



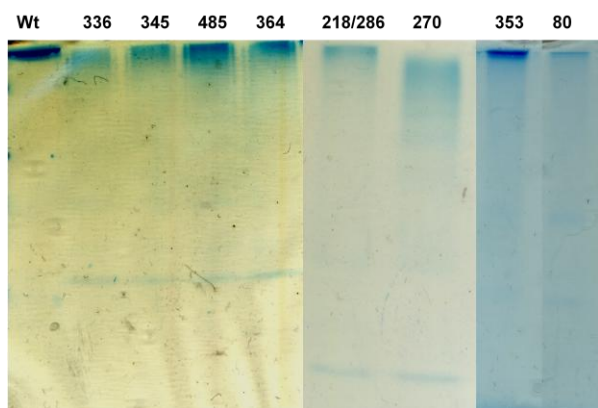
#### Zusammenfassung der Analyse der GgpS-Varianten:

In drei der vierzehn Varianten war es nicht möglich, ein modifiziertes Protein zu erstellen. Der Versuch des Aminosäureaustausches an den Positionen K61 und R215 war nicht erfolgreich. Die Sequenzierungen der CCR-Produkte ergaben lediglich die Wildtyp *ggpS* Gene. Die Variante K308A konnte zwar erstellt werden, jedoch konnte kein Protein gereinigt werden. Es war nach der Reinigung kein Protein nachweisbar. Bei den restlichen Varianten war es möglich, die modifizierten Proteine zu reinigen. Jedoch fielen die gewonnenen Proteinmengen sehr niedrig aus. Es wurden deutlich geringere Proteinmengen in den Elutionen gemessen (1/40). Jedoch reichten diese Mengen für eine Analyse in den Enzymaktivitätstests aus. Auch die EMSA-Experimente waren mit diesen Mengen möglich. Auch die Aktivitäten der Varianten blieben deutlich hinter denen des Wildtyp zurück. Bei einigen Varianten (K275A, K286A) konnte keine Aktivität gemessen werden. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass mindestens 4 Reste an der Interaktion von GgpS und Nukleinsäuren beteiligt sind. Bei diesen vier Resten zeigten sich eine geringere Inhibition durch DNA und eine abgeschwächte DNA-Bindung. Möglicherweise sind noch weitere Reste an der Interaktion beteiligt. Dies konnte anhand dieser Ergebnisse nicht geklärt werden, da hierzu der Zusammenhang aus EMSA und Enzymaktivitätstest, aufgrund fehlender Aktivitäten einiger Varianten, nicht hergestellt werden konnte.

#### **3.3.6: Stabilität der GgpS Varianten**

Aus den Ergebnissen im Abschnitt 3.3.5 wurde ersichtlich, dass die Varianten in ihrer Aktivität deutlich eingeschränkt sind. Dies sollte näher untersucht werden. Möglich wäre eine geringe Stabilität der Varianten. Dies kann durch den Austausch der Aminosäuren aufgetreten sein. Um einen Eindruck über die Stabilität der Varianten zu erhalten, wurden diese auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Banden bzw. Bandenmuster wurden mit dem Wildtyp verglichen.

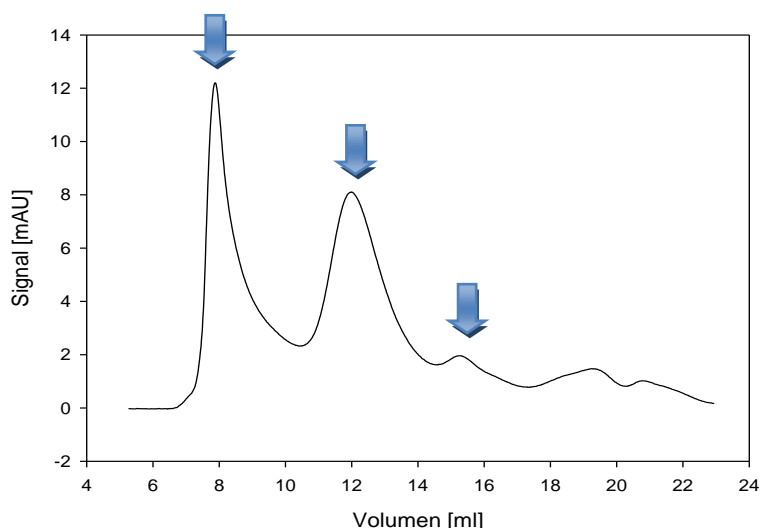
### 3. Ergebnisse



**Abb. 34:** Zusammenfassung der native PAGE des GgpS-Proteins und mehreren Varianten. Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie Brillant blau.

Im Vergleich zum Wildtyp wiesen nahezu alle Varianten eine diffuse Bande auf. Ebenfalls waren mehrere kleine Proteinkomplexe zu erkennen. Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Störung der Oligomerisierung des Proteins und eine niedrige Stabilität der Proteine. Dies könnte auch die Erklärung für die niedrigen Aktivitäten der Varianten im Enzymaktivitätstest sein.

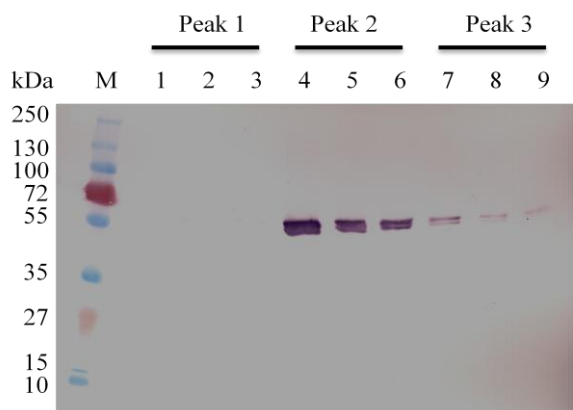
Um die Stabilität der Varianten zu überprüfen, wurde beispielhaft mit der Variante K281A/K286A eine Gelfiltration durchgeführt.



**Abb. 35:** Chromatogramm der Gelfiltration von GgpS K281A/K286A (50 µg) auf einer Superdex 200 Säule. Die Peaks, von denen Fraktionen für weitere Analysen aufgefangen wurden, sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Im Gegensatz zur Wildtyp-GgpS zeigten sich mehrere Peaks im Chromatogramm der Gelfiltration (Abb. 35). Es wurden die Fraktionen, die den einzelnen Peaks zugeordnet

wurden, auf ein Polyacrylamidgel-Gel aufgetragen und eine SDS PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt.



**Abb. 36:** Western Blot der Fraktionen aus der Gelfiltration (Abb. 35). Die Peaks sind vom niedrigsten Elutionsvolumen bis zum höchsten markiert. Je Peak wurden drei Fraktionen aufgefangen und via Western Blot untersucht.

Der Western Blot ergab, dass der Peak mit dem höchsten Signal, der sich im Ausschlussvolumen befand, keine GgpS enthielt (Abb. 36). In den Fraktionen der beiden weiteren Peaks konnte die GgpS jedoch nachgewiesen werden. Bei der Wildtyp GgpS wurde lediglich ein Peak bei 11,6 ml beobachtet. Dies ist ein Hinweis auf eine Destabilisierung des modifizierten Proteins durch den Austausch der Aminosäuren. Der Peak bei 15 ml könnte den kleineren Proteinkomplexen zuzuordnen sein, die bereits in der nativen PAGE beobachtet wurden (Abb.34).

#### 3.4 Untersuchungen der GgpS-Regulation in einem heterologen *in vivo* System

##### 3.4.1 Analyse von Bakterienstämmen, die sich für die GgpS-Untersuchung eignen

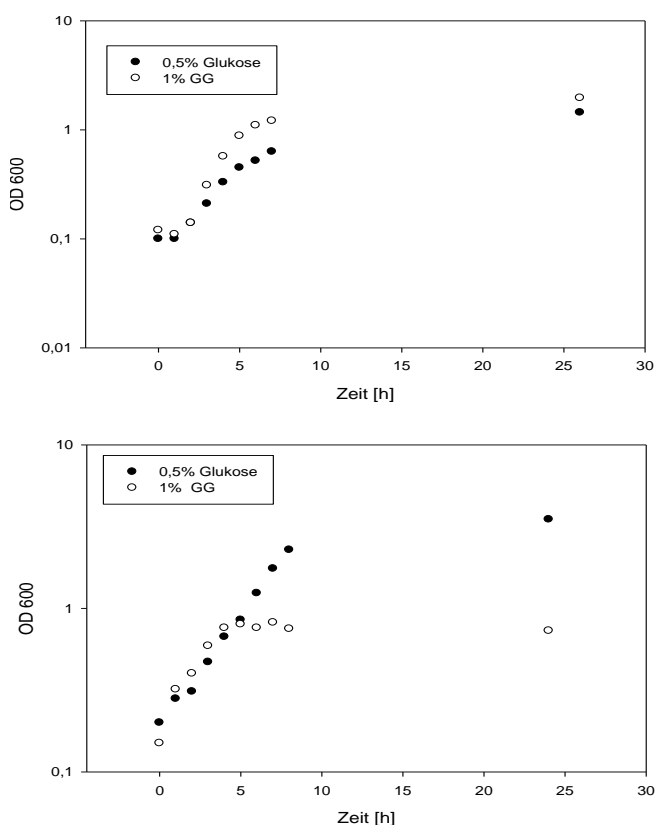
Die GgpS wurde in *Synechocystis* bereits unter *in vivo* Bedingungen untersucht (u. a. Hagemann 2011, Marin *et al.* 2006, Schoor *et al.* 1999). Diese Analysen dienten zur damaligen Zeit u. a. der Suche nach einem Regulator des GgpS-Proteins. In dieser Arbeit sollte die Regulation der GgpS unter *in vivo* Bedingungen fortgesetzt werden. Da die Inhibition des GgpS-Proteins durch eine sequenzunspezifische Interaktion mit Nukleinsäuren stattfindet, muss in diesem Falle eine Inhibition des Proteins bei niedrigen Salzkonzentrationen auch in heterologen Systemen stattfinden.

### 3. Ergebnisse

Zunächst wurde ein Bakterienstamm gesucht, der GgpS und GgpP heterolog synthetisieren kann und das durch die beiden Enzyme gebildete Glukosylglycerol nicht verstoffwechselt, da dies eine Analyse der Enzymaktivität in den Zellen unmöglich machen würde.

Zwei Bakterienstämme wurden zunächst getestet. Es handelte sich dabei um *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum*. Die beiden Stämme wurden in Minimalmedium angezogen und mit Glukosylglycerol als einziger Kohlenstoffquelle inkubiert.

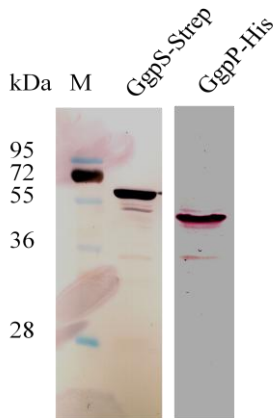
*E. coli* konnte Glukosylglycerol als Kohlenstoffquelle nutzen (Abb. 37 oben). *Corynebacterium glutamicum* vermochte dies jedoch nicht (Abb. 37 unten). Nach vierstündiger Inkubationszeit war kein Wachstum mehr zu beobachten. Das Wachstum bis 4 h kann mit eventuellen Rückständen an Glukose aus der Vorkultur erklärt werden. Dieses Ergebnis führte zur Auswahl von *C. glutamicum* als *in vivo* Testsystem für die GgpS-Regulation.



**Abb. 37:** Wachstum von *E. coli* (oben) und *C. glutamicum* (unten) auf den Kohlenstoffquellen Glukose (0,5%) und Glukosylglycerol (1%). Für *E. coli* wurde M9- für *C. glutamicum* CgXII Medium verwendet.

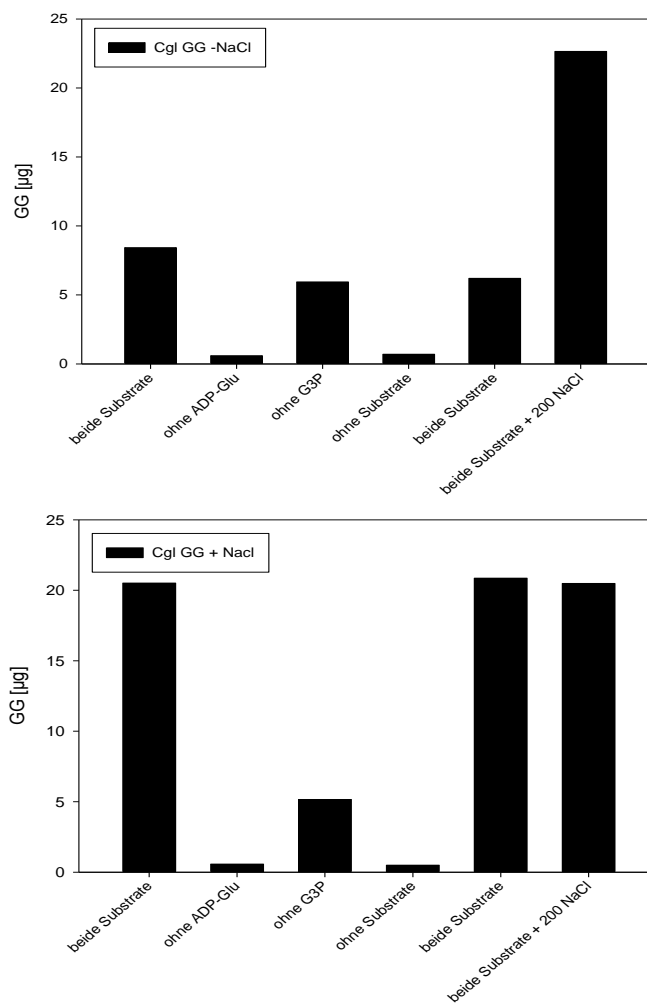
### 3.4.2 Anreicherung von GgpS und GgpP in *C. glutamicum* und Analyse der GG Synthese

Der Vektor pEKEx2 wird standardmäßig für Expressionen in *C. glutamicum* verwendet. Dieser Vektor wurde genutzt, um die Gene *ggsS*-Strep und *ggsP*-His<sub>6</sub> zu exprimieren. Die Konstrukte konnten in *C. glutamicum* eingebracht werden, und auch die Synthese der Proteine verlief erfolgreich (Abb. 38).



**Abb. 38:** Western Blots mit Extrakten von *C. glutamicum* Zellen in denen GgpS und GgpP angereichert wurden. M = Marker

Dieser Stamm wurde als *C. glutamicum* GG bezeichnet. Es wurde getestet, ob die beiden Proteine in *C. glutamicum* GG in aktiver Form vorliegen. Hierzu wurde ein Enzymaktivitätstest mit Zellextrakten von *C. glutamicum* GG durchgeführt (Abb. 39). Es konnte GG im Expressionsstamm nachgewiesen werden. Jedoch war es bei den Zellextrakten notwendig, ADP-Glukose zu den Zellextrakten zu geben, um GG in nachweisbaren Mengen zu synthetisieren. Ein Fehlen von Glycerol-3-P schien weniger Auswirkungen auf die GG-Synthese zu haben.



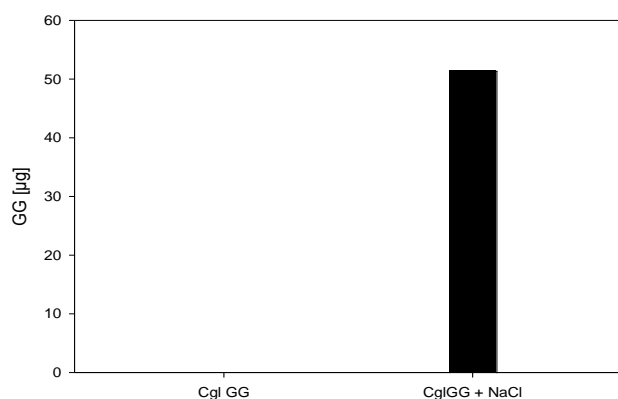
**Abb. 39:** Gebildetes GG in Zellextrakten von *Corynebacterium glutamicum*, in denen *ggpS* und *ggpP* exprimiert wurden. Die Zellen wurden in CgXII-Medium ohne bzw. mit 200 mM NaCl angezogen. Unter den Balken befinden sich Informationen zu den Zusätzen in den Proben.

Wurde dem Zellextrakt zusätzlich NaCl zugegeben, steigerte dies die GG-Synthese. In Zellen, die bereits in höheren NaCl-Konzentrationen angezogen wurden, konnten auch ohne externe NaCl-Zugabe höhere GG-Mengen gemessen werden, was auch den Erwartungen entsprach.

### 3.4.3 GG-Synthese in *Corynebacterium glutamicum*

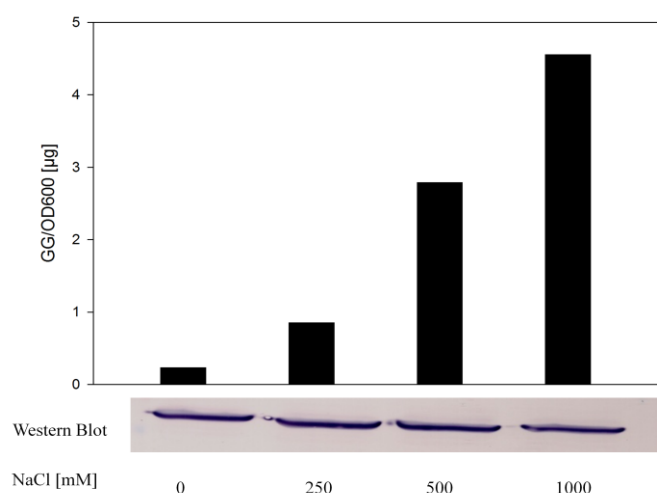
Es wurde nun versucht, das von den Zellen synthetisierte GG direkt in *C. glutamicum* nachzuweisen. Es konnte, nach einem Aufschluss der Zellen mit 60% Ethanol, kein GG nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), was auf ein technisches Problem zurückzuführen

ist. Der Überstand wurde nach der Zellernte ebenfalls untersucht, um von den Zellen eventuell exportiertes GG nachzuweisen.



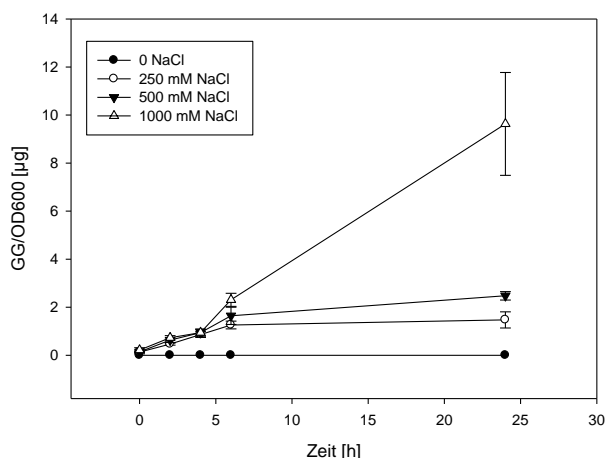
**Abb. 40:** Glukosylglycerol in Überständen (100 µl) von *C. glutamicum* GG

Das Ergebnis der Vermessung der Überstände nach der Zellernte von *C. glutamicum* GG zeigte, dass offenbar sämtliches von den Zellen gebildetes GG exportiert wurde (Abb. 40). Die Menge an synthetisiertem GG steht im Zusammenhang mit der NaCl-Konzentration im Außenmedium, wie in Abb. 41 zu erkennen ist. Ein Western Blot gegen den Strep-Tag am GgpS-Protein konnte zudem belegen, dass die Menge an GgpS konstant ist. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass die GG-Menge mit der Expression der Proteine allein zusammenhängt. Offensichtlich findet eine Regulation der GgpS in *C. glutamicum* statt, die mit der aus *Synechocystis* vergleichbar ist. Es wurde in *Synechocystis* gezeigt, dass GG von präformierten Enzymen gebildet wird (Hagemann *et al.* 1990).



**Abb. 41:** GG-Synthese von *C. glutamicum* GG bei steigenden NaCl-Konzentrationen. Der Western Blot wurde mit einem Antikörper gegen den Strep-Tag am GgpS-Protein entwickelt. 100 µl der Überstände wurden vermessen.

Diese Hypothese wurde weiter überprüft. Es wurde die GG-Synthese nach einem NaCl-Schock untersucht. Hierbei sollte sich die GG-Menge an die zugegebene NaCl-Konzentration anpassen.

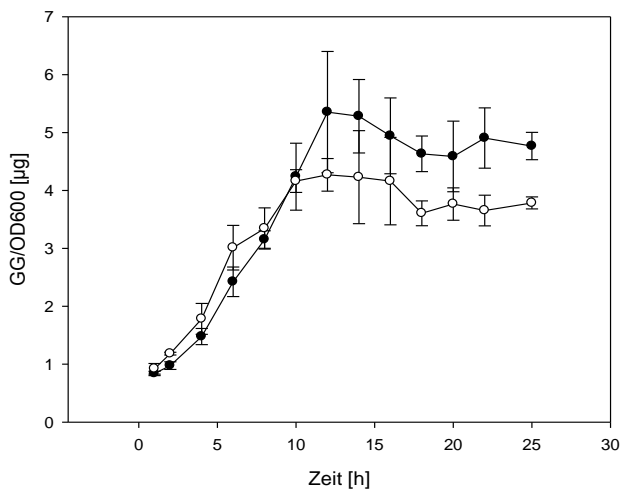


**Abb. 42:** GG-Synthese von *C. glutamicum* nach einem NaCl-Schock bei einer  $OD_{600}$  von 5. 100 µl Überstand wurden vermessen.

Die Synthese von GG ließ sich durch eine Zugabe von NaCl steigern. Zusätzlich war zu beobachten, dass die Menge an GG auch bei einem NaCl-Schock direkt mit der NaCl-Konzentration im Zusammenhang steht (Abb. 42).

Es wurden weitere Messungen durchgeführt, um die GG-Synthese in *C. glutamicum* weiter zu analysieren. Hierbei sollte die zeitliche Auflösung verbessert werden. Ebenfalls sollte der Einfluss von kompatiblen Soluten getestet werden, die *C. glutamicum* normalerweise verwendet. Hierzu wurde Betain ausgewählt, welches von *C. glutamicum* bei hyperosmotischem Stress über den Transporter BetP aufgenommen wird (Rübenhagen *et al.* 2000).





**Abb. 43:** GG-Synthese nach einem NaCl-Schock über 24 h. Es wurden Zellen untersucht, denen 600 mM NaCl oder 600 mM NaCl und 2 mM Betain zugegeben wurden.

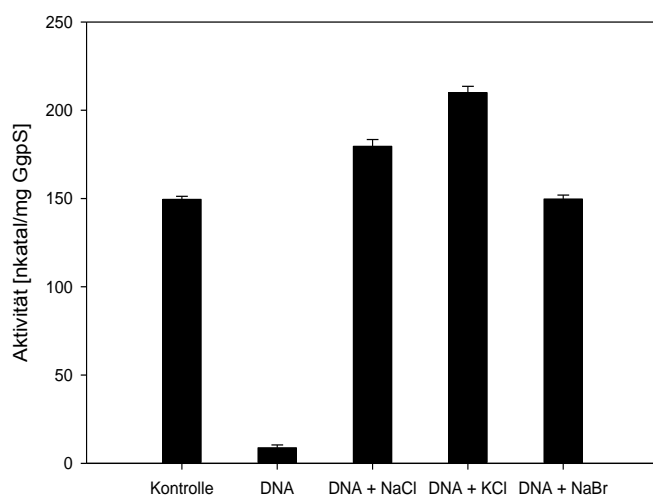
Nach 2 h Inkubation konnte GG in den Überständen nachgewiesen werden. Die GG-Menge stieg über 12 (NaCl) bzw. 10 h (NaCl + Betain) an. Anschließend wurde eine Sättigung erreicht (Abb. 43).

Die GG-Synthese war in beiden Kulturen über zehn Stunden vergleichbar. Die Kulturen, denen Betain zugegeben wurde, stellten die Synthese jedoch früher ein. Die Anwesenheit des Betains hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Syntheserate des GG.

#### 3.4.4 Auswirkungen weiterer osmotisch aktiver Substanzen auf die GG Synthese

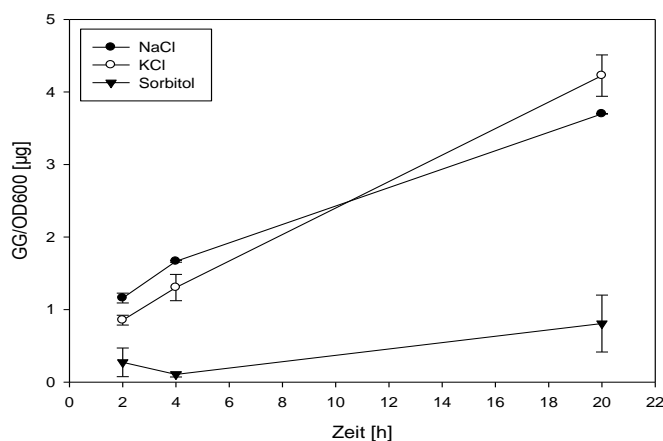
In *in vitro* Analysen wurde gezeigt, dass GgpS auch durch KCl aktiviert werden kann (Schoor *et al.* 1999, Abb. 44), was vermutlich durch die Dissoziation des Proteins von Nukleinsäuren geschieht. Alle getesteten Salze hoben die Inhibition des Proteins durch DNA auf.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 44:** Enzymaktivitätstest des GgpS-Proteins (0,1  $\mu\text{g}$ ) über 10 min. In der Kontrolle wurden lediglich die Substrate ADP-Glukose und Glycerol-3-P verwendet. Die Proben enthielten die angegebenen Zusätze. Es wurden 2  $\mu\text{g}$  DNA und jeweils 200 mM der Salze verwendet.

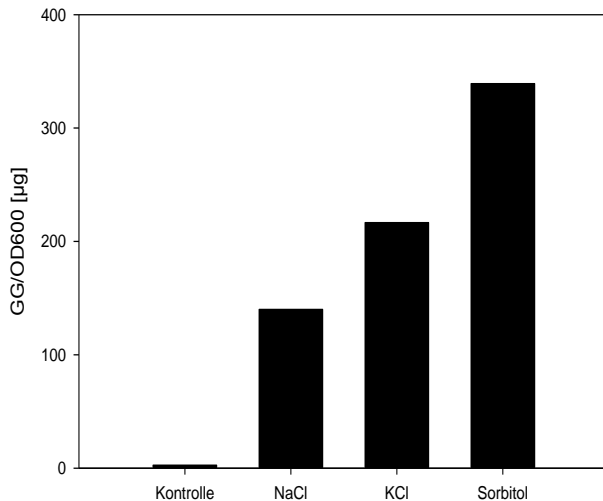
Der in Abb. 44 gezeigte Effekt sollte auch *in vivo* zu beobachten sein. Um dies zu analysieren, wurde *C. glutamicum* GG einem hyperosmotischen Stress ausgesetzt, der zu einer GG-Synthese führen sollte, wenn die zugeführten Substanzen eine Dissoziation der GgpS von den Nukleinsäuren verursachen.



**Abb. 45:** GG-Synthese von *C. glutamicum* GG nach Behandlung mit den osmotisch aktiven Substanzen NaCl (600 mM), KCl (600 mM) und Sorbitol (1 M). Es wurden jeweils die Überstände nach der Zellernte vermessen.

Es wurden die Auswirkungen der Salze NaCl und KCl auf die GG Synthese verglichen. Zusätzlich wurde das ebenfalls osmotisch aktive Sorbitol eingesetzt. Sorbitol löst in *Synechocystis* keine GG-Synthese aus (Marin *et al.* 2006).

KCl induzierte die GG-Synthese in vergleichbarer Weise wie NaCl. Dieses Ergebnis bestätigt die *in vitro* Beobachtungen (Abb. 44). Die Zugabe von Sorbitol hingegen verursachte keine bzw. eine sehr geringe GG-Produktion. Es waren nur Spuren im Überstand der Zellen nachweisbar. Dies ist jedoch auf ein technisches Problem zurückzuführen.

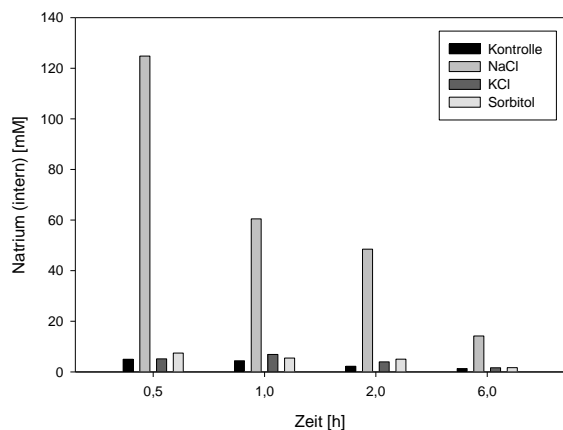


**Abb. 46:** GG-Synthese des Stammes *C. glutamicum* GG nach einem hyperosmotischen Schock. Es wurden die Zellextrakte der Kulturen nach 6 h Inkubation vermessen.

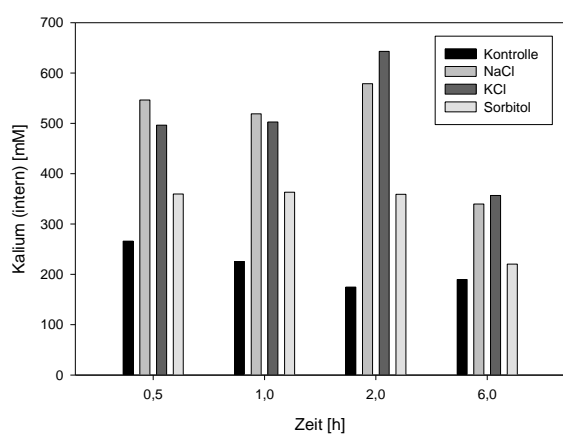
Das in hohen Konzentrationen (1 M) verwendete Sorbitol, störte die Derivatisierung der weiteren Substanzen (Ribitol und GG)(s. auch Anhang 5). Die Frage, ob GG in mit Sorbitol behandelten Zellen synthetisiert wird, konnte nur über die Messung des intern gebildeten GG beantwortet werden. Da ein einfacher Zellaufschluss in Ethanol nicht ausreichte, um das intern synthetisierte GG nachzuweisen (s. Abschnitt 3.4.3), wurde eine Behandlung der Zellen mit Methanol und anschließender Chloroformfällung der Proteine durchgeführt. Diese Behandlung ließ eine Messung des internen GG mittels GC zu.

Mit einem Aufschluss der Zellen in Methanol und anschließender Chloroformfällung der Proteine konnten die internen GG-Mengen bestimmt werden (Abb. 46). Die Zellen, die mit NaCl und KCl inkubiert wurden, synthetisierten erwartungsgemäß GG, was ohne Zusatz von Osmolyten kaum zu erkennen war. Jedoch konnte auch in den mit Sorbitol inkubierten Zellen GG nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die GgpS in den mit Sorbitol inkubierten Zellen aktiv ist. Die Aktivierung geht wahrscheinlich auf die erhöhte Kaliumkonzentration in den Zellen zurück. Dies sollte über die Messung der internen Ionen Natrium und Kalium überprüft werden.

### 3. Ergebnisse



**A**



**B**

**Abb. 47:** Bestimmung der internen Ionen Natrium (A) und Kalium (B) mittels Atomemmissionsspektrometrie. Die Veränderung der Ionenkonzentration wurde über 6 Stunden verfolgt.

Die Messung der internen Ionenkonzentrationen bestätigte die Annahme, dass die interne Kaliumkonzentration in den mit Sorbitol behandelten Zellen ansteigt. Jedoch wiesen die mit Sorbitol behandelten Zellen niedrigere Kaliumkonzentrationen auf als die Ansätze, denen NaCl oder KCl zugegeben wurden. In allen mit Osmolyten behandelten Zellen stiegen die Kaliumkonzentrationen an, was nicht für die Natriumkonzentrationen zutraf. Die mit NaCl inkubierten Zellen wiesen sehr hohe Natriumkonzentrationen auf, die sich im Bereich von 120 mM nach 30 min. Inkubation befanden. Die Natriumkonzentration nahm jedoch über die Zeit wieder ab. Dies war auch bei den Kaliumionen der Fall, jedoch trat dies erst nach 6 h ein.

### 3.5 Optimierung der GG-Produktion in *C. glutamicum*

#### 3.5.1 Mögliche Verbesserungen der Verfügbarkeit des Substrates ADP-Glukose

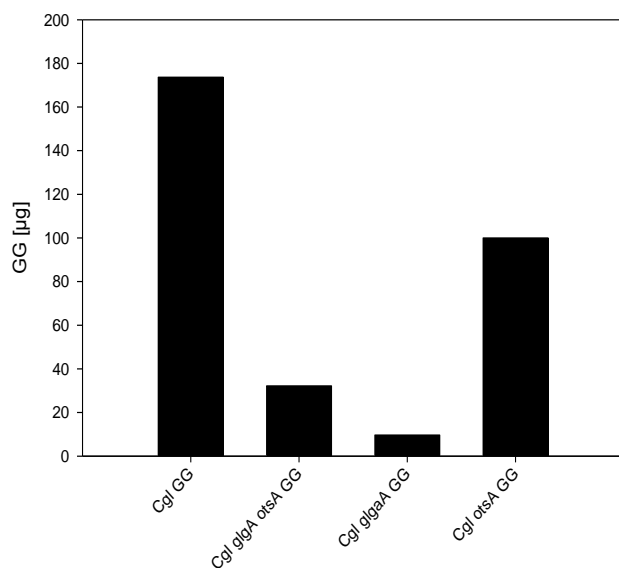
Glukosylglycerol wird bisher in der Industrie enzymatisch mit gereinigten Proteinen hergestellt (www.bitop.de). Hierbei treten häufiger Probleme mit Kontaminationen in den Produktionslösungen auf (persönl. Mitteilung Prof. R. Krämer, Dr. G. Seibold). Daher ist eine Erstellung eines bakteriellen GG-Produktionsstammes von großem Wert.

Aus den Analysen der Überstände der *C. glutamicum* GG Kulturen ging hervor, dass die getesteten Stämme relativ hohe GG-Mengen in das Außenmedium exportieren (1 g/l). Es sollte versucht werden, die produzierte GG-Menge zu steigern. Hierzu wurde die Überlegung aufgestellt, dass eine erhöhte Verfügbarkeit an Substraten für die GG Synthese eine Steigerung der GG-Synthese zur Folge haben könnte. ADP-Glukose wird unter anderem während der Trehalosesynthese verbraucht. Dies geschieht über den OtsAB Syntheseweg. Zwar handelt es sich bei ADP-Glukose lediglich um ein sekundär eingesetztes Substrat, jedoch wurde gezeigt, dass die Trehalosephosphatsynthase (OtsA) neben dem Hauptsubstrat UDP-Glukose auch ADP-Glukose für die Trehalosesynthese nutzen kann (Brühl 2010, diese Arbeit). Eine weitere Möglichkeit, die Verfügbarkeit der ADP-Glukose zu steigern, ist die Unterbrechung der Glykogensynthese.

Aufgrund dieser Informationen wurden verschiedene *C. glutamicum*-Stämme mit dem Plasmid pEKEx3 *ggpS ggpP* transformiert, denen die Gene *otsAB* und *glgA* fehlen. Die Nutzung des Vektors pEKEx3 statt wie zuvor der Variante pEKEx2 war notwendig, da letztgenannter Vektor eine Kanamycinresistenz aufweist, was ebenfalls bei den genutzten Insertionsmutanten der Fall ist. Da der Vektor pEKEx3 eine Spectinomycinresistenz trägt, konnten hierdurch Komplikationen vermieden werden. Nach erfolgreicher Klonierung des Vektors und Transformation der Mutanten  $\Delta glgA$ , *otsAB:kan* bzw. einer Doppelmutante (Daten nicht gezeigt), konnte die GG-Produktion der Stämme analysiert werden. Hierzu wurden die Stämme jeweils auf eine optische Dichte von 1 angeimpft und die Zellen bis zu einer OD von 5 bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde ein hyperosmotischer Stress, in Form von 600 mM NaCl, durchgeführt. Die Stämme wurden anschließend für 18 h weiter inkubiert. Abschließend wurden die Überstände der Kulturen im GC vermessen.

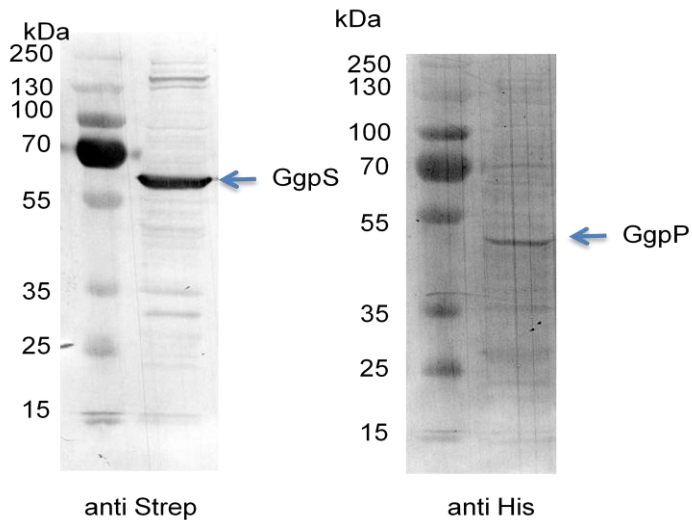
Das Fehlen von ADP-Glukose verbrauchenden Enzymen erzeugte jedoch nicht den erwarteten Effekt. Die GG-Mengen lagen sogar unter denen des Wildtypstammes, der *GgpS* und *GgpP* exprimiert. Einzig der Stamm, dem *otsA* fehlte, synthetisierte ansatzweise

zufriedenstellende an GG. Jedoch lag auch hier die Ausbeute unter dem Stamm mit Wildtyp-hintergrund.



**Abb. 48:** GG-Produktion verschiedener *C. glutamicum* Stämme. Die Inkubationszeit betrug 18 h mit jeweils 600 mM NaCl. 100 µl des Überstandes wurde vermessen.

Weitergehend sollte der Versuch unternommen werden, eine wachstumsunabhängige GG-Produktion zu erreichen. Für eine wachstumsunabhängige GG-Produktion eignen sich Stämme, die für bestimmte Aminosäuren auxotroph sind. Für die wachstumsunabhängige GG-Produktion wurde ein *C. glutamicum*  $\Delta ilvA$  Stamm verwendet. Dieser Stamm kann kein Isoleucin synthetisieren und ist für ein Wachstum von externem Isoleucin abhängig. Mit diesem Stamm wurde eine Transformation des Plasmids pEKEx2 *ggsS ggpP* durchgeführt. Diese verlief erfolgreich und das Plasmid konnte in den Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde versucht, die Proteine GgsS und GgpP im Stamm anzureichern. Anschließend sollten die Proteine via Western Blot und anschließender immunologischer Detektion nachgewiesen werden (Abb. 49).



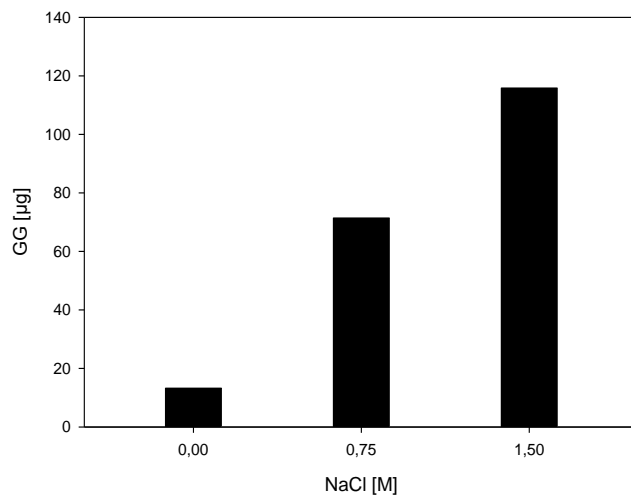
**Abb. 49:** Western Blot zum Nachweis der Proteine GgpS-Strep und GgpP-His<sub>6</sub>. GgpS wurde bei ca. 55 kDa erwartet, GgpP bei 46 kDa. Die Zellen wurden für die Anreicherung der Proteine jeweils sechs Stunden mit IPTG behandelt.

Nach der erfolgreichen Synthese der Proteine wurde der Versuch unternommen, GG in diesem Stamm zu produzieren. Hierzu wurden die Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 40 inkubiert. Anschließend wurde den Zellen das Isoleucin entzogen und nach einer Inkubation von 60 min ein Salzschock durchgeführt. Hierzu wurden den Zellen unterschiedliche Mengen NaCl-zugegeben und diese anschließend für 24 h inkubiert.

Es konnte deutlich gezeigt werden, dass GG in Abhängigkeit von der eingesetzten NaCl-Konzentration synthetisiert wird (Abb. 50). Die bisherigen Experimente zur GG-Produktion fanden mit wachsenden Stämmen statt (Vgl. Abb. 41). Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass relativ hohe Mengen (umgerechnet 1,2 g/l) GG unabhängig vom Wachstum produziert werden konnten. Es müssen jedoch, um diese Produktion zu optimieren, in Zukunft weitere Tests durchgeführt werden (s. Diskussion).

### 3. Ergebnisse

---



**Abb. 50:** GG Produktion des Stammes Cgl  $\Delta ilvA$  GG bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen über 24 h. Es wurden 30 g/l Glukose als Kohlenstoffquelle verwendet. Die  $OD_{600}$  betrug 40. 100  $\mu$ l des Überstandes wurden vermessen.



## 4. Diskussion

### 4.1 Das GgpS-Protein wird durch eine nicht kompetitive Inhibition reguliert

Die Inhibition des GgpS-Proteins durch Nukleinsäuren wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit gezeigt (Novak 2010). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Art der Inhibition das Protein durch Nukleinsäuren erfährt. Hierzu wurden die kinetischen Parameter  $K_M$  und  $V_{max}$  bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen bestimmt (Abb. 11). Da der  $K_M$ -Wert bei ansteigenden Inhibitorkonzentrationen konstant blieb und der Wert für  $V_{max}$  gesunken ist, kann von einer nicht-kompetitiven Inhibition ausgegangen werden (Bisswanger 2008). Bei dieser Form der Inhibition bindet der Inhibitor nicht an das aktive Zentrum des Enzyms und die Substratbindung wird nicht beeinträchtigt. Die Inhibition betrifft die Umsetzung der Substrate ADP-Glukose und Glycerol-3-Phosphat zum Produkt Glukosylglycerolphosphat. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der electrophoretic mobility shift assays (EMSA) gestützt (Abb. 12). Die Affinität von GgpS zu Nukleinsäuren steigt in alleiniger Anwesenheit von ADP-Glukose, was jedoch eine Substratbindung in Anwesenheit von DNA voraussetzt. Die erhöhte Affinität der GgpS zu Nukleinsäuren in Anwesenheit von ADP-Glukose könnte ein weiterer Aspekt der Regulation des Proteins sein. Es wäre möglich, dass bei einem Mangel an Glycerol-3-P eine verstärkte Hemmung des Enzyms stattfindet, die diesem Mangel an Substrat entgegenwirkt. Ob ein Mangel an Glycerol-3-P in *Synechocystis* regelmäßig vorkommt, ist bisher unbekannt. Ebenfalls kann anhand dieser Daten noch keine Aussage über eine Funktion dieses Effekts *in vivo* getroffen werden. Glycerol-3-P erhöhte die Affinität des GgpS-Proteins hingegen nicht. Der Zusatz von ATP hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Affinität des Proteins zu Nukleinsäuren (Daten nicht gezeigt).

Bei den Vorversuchen zu den Kinetikmessungen konnte eine weitere wichtige Erkenntnis gewonnen werden. Es reichen sehr geringe Mengen an Nukleinsäuren aus, um das GgpS-Protein zu inhibieren (Abb. 9 und 10). Bisher wurden höhere Mengen für die Inhibition des Proteins eingesetzt (Novak 2010, Brühl 2010). Es genügen bereits  $0,18 \mu\text{g DNA}/0,1 \mu\text{g GgpS}$ , um die Aktivität der GgpS um 75% zu senken. Jedoch beeinflussen diese Erkenntnisse nicht die Aussagen, die in vorherigen Arbeiten über die Inhibition getroffen wurden. Hierbei wurde zumeist eine Maximalinhibition angestrebt, was beim Einsatz von  $200 \mu\text{g DNA}/0,1 \mu\text{g GgpS}$  erreicht wurde. Die hohe Affinität der GgpS zu Nukleinsäuren unterstreicht die

Effizienz dieses Regulationsmechanismus. Durch diese hohe Affinität ist die Möglichkeit gegeben, sehr gezielt auf leichte Veränderungen der Ionenkonzentrationen zu reagieren.

### **4.2 GgpS weist eine sehr hohe Affinität zu Nukleinsäuren unter Niedrigsalzbedingungen auf**

Um die Interaktion des GgpS-Proteins mit Nukleinsäuren weiter zu charakterisieren, wurde die Kinetik der Interaktion untersucht. Über die Messung der Lichtstreuung und der Tryptophanfluoreszenz konnten weitere Erkenntnisse über die Affinität der GgpS zu DNA gewonnen werden. Es konnte über die Messung der Lichtstreuung eine Bindungskurve erstellt werden, die einen typischen Verlauf aufwies (Abb. 16 (A)). Da sich die Lichtstreuung des Proteins in Anwesenheit von DNA veränderte, kann von einer Konformationsänderung des Proteins ausgegangen werden. Bei der verwendeten Wellenlänge für die Lichtstreuung (333 nm) zeigte DNA allein keinen Effekt bzw. es wurde kein Signal gemessen, das die Messung stören sollte (s. Anhang). Das Signal der Lichtstreuung der GgpS erreichte durch Zusatz von NaCl wieder die Ausgangswerte (Abb.16 (B)). Wie bereits im Abschnitt 3.1.5 beschrieben, war es schwierig, anhand dieser Daten die Bindungskonstante  $K_D$  zu bestimmen. Die in diesem Experiment verwendete Lachssperma-DNA lässt nur eine ungenaue Bestimmung der DNA Konzentration zu. Außerdem war es mit Oligonukleotiden nicht möglich, die Lichtstreuungsmessungen durchzuführen. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde alternativ die Tryptophanfluoreszenz der GgpS gemessen (Abb. 17). Diese veränderte sich durch Zugabe von Oligonukleotiden, was durch die Bindung dieser an das Protein verursacht wurde. Die Oligonukleotide verursachten in Abwesenheit des Proteins keine Absorption bei 298 nm und auch keine Emission bei 335 nm (Daten nicht gezeigt). Anhand dieser Daten konnte der  $K_D$  Wert bestimmt werden. Dieser lag bei 69 nM, was einer relativ hohen Affinität des Proteins zu Nukleinsäuren unter Niedrigsalzbedingungen entspricht. Beispielsweise weisen histonartige Proteine aus *E. coli*, welche ebenfalls sequenzspezifisch an DNA binden, Werte von 29 nM auf (Vitoc *et al.* 2011). Die Bestimmung der kinetischen Daten der Nukleinsäureinteraktion der GgpS verlief, wie oben beschrieben, problematisch. Mit der zunächst verwendeten Lachssperma DNA bei der Lichtstreuungsmessung konnte keine genaue Angabe über die Bindungskonstante  $K_D$  gemacht werden. Bei der Messung der Tryptophanfluoreszenz konnte die Dissoziation der GgpS nicht gemessen werden. Um die Bindungseigenschaften des GgpS Proteins zu überprüfen und die bisherigen Ergebnisse zu unterstützen, wäre die Anwendung von weiteren Methoden empfehlenswert. Beispielsweise könnte die Interaktion über FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) untersucht

werden, indem die DNA und die GgpS mit kompatiblen Fluorophoren ausgestattet werden. Anschließend könnte über die Messung der FRET-Effizienz eine Bindungskurve erstellt und damit die bisher bestimmten kinetischen Daten verifizieren werden. Ebenfalls wäre eine Analyse der Interaktion via Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie denkbar. Hierbei wird einer der beiden zu untersuchenden Interaktionspartner auf einer Matrix (z. B. Gold) immobilisiert. Hierbei ergibt sich eine Veränderung des Brechungsindex. Dieser verändert sich ebenfalls bei einer Interaktion mit einem Interaktionspartner, wenn dieser zugegeben wird. Mittels dieser Methode lassen sich ebenfalls Bindungskinetiken messen und die einzelnen Parameter bestimmen.

Mit den gemessenen Daten wurden die Erwartungen bestätigt, dass GgpS eine sehr hohe Affinität zu Nukleinsäuren besitzt. Dies ermöglicht eine sehr schnelle Anpassung der Aktivität des Enzyms bei veränderten osmotischen Bedingungen

### **4.3 GgpS bildet oligomere Komplexe aus**

Es ist bei mehreren Glukosyltransferasen bekannt, dass diese oligomere Komplexe ausbilden. Die Trehalosephosphatsynthase aus *E. coli* bildet beispielsweise Dimere und Tetramere aus (Gibson *et al.* 2004). Auch über die TPS aus *Mycobacterium tuberculosis* ist bekannt, dass dieses Protein Tetramere ausbildet (Pan *et al.* 2002). Die Analyse der GgpS hinsichtlich dieser Fragestellung ergab, dass das Enzym ebenfalls Oligomere bildet (Abb. 14). Aus der durchgeführten Gelfiltration ging hervor, dass diese Komplexe einem Tetramer oder einem Pentamer entsprechen, wobei die Bildung von Pentameren sehr selten vorkommt. Bereits vor Beginn dieser Arbeit wurde vermutet, dass die GgpS oligomere Komplexe ausbildet. Hinweise dazu lieferte das Ergebnis eines *yeast 2 hybrid* Experimentes, in welchem die GgpS eine Interaktion mit weiteren GgpS-Proteinen zeigte (Stirnberg *et al.* 2006). Ebenfalls konnten über Formaldehyd Vernetzung (engl. *crosslinking*) oligomere GgpS Komplexe gezeigt werden (Novak 2010). Im letztgenannten Experiment zeigten sich jedoch auch dimere und trimere Komplexe, welche nach der Gelfiltration nicht nachzuweisen waren. Lediglich in der Analyse der Punktmutanten, welche in Abschnitt 4.7 diskutiert werden, fielen Komplexe mit einem niedrigeren Molekulargewicht als bei den Tetrameren auf, die jedoch einer instabileren GgpS-Variante zuzuordnen sind.

Die Oligomerisierung veränderte sich nicht durch die Zugabe ausgewählter Substanzen wie DNA oder NaCl, was über eine native-PAGE gezeigt werden konnte (Abb. 15). Eine Gelfiltration des GgpS-Proteins, die in Anwesenheit von DNA durchgeführt wurde, bestätigte

das Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Somit kann geschlossen werden, dass die GgpS dauerhaft in einer oligomeren Form vorliegt. Über die Funktion dieser Oligomere kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. Möglich wäre z.B. eine Stabilisierung des Proteins. Ebenfalls wurde gezeigt, dass die Aktivierungskurven von GgpS und die Dissoziationskurven des Proteins einen sigmoidalen Verlauf aufweisen (Abb. 16, Novak 2010). Dies könnte mit einer Kooperativität der GgpS-Nukleinsäureinteraktion in Zusammenhang stehen. Die Bindung von einer GgpS-Untereinheit an Nukleinsäuren könnte die weiteren Untereinheiten des Komplexes beeinflussen und dadurch die Affinität dieser Untereinheiten zu Nukleinsäuren steigern.

In Kooperation mit der AG Baumann (Köln) wurde der Versuch unternommen, die Struktur des GgpS-Proteins über die Analyse von GgpS-Kristallen zu untersuchen. Die Struktur konnte jedoch bis zu der Anfertigung dieser Dissertation noch nicht aufgeklärt werden. Die ersten Ergebnisse nach der Kristallisation und der Strukturanalyse lieferten einige interessante Hinweise über die Oligomerisierung des GgpS-Proteins. In der Analyse der Kristalle konnte beobachtet werden, dass eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass die GgpS hohe konformelle Ähnlichkeiten zur TPS aus *E. coli* aufweist. Die bisherigen Ergebnisse sprechen für eine Ausbildung von tetrameren Proteinkomplexen (persönl. Mitteilung Dr. Jan Gebauer). Dies stimmt mit den bisherigen Ergebnissen aus der Gelfiltration überein (Abb. 14). Bei der Gelfiltration konnte noch nicht zweifelsfrei gesagt werden, ob es sich bei der GgpS um einen tetrameren oder pentameren Proteinkomplex handelt (s.o.). Das Ergebnis unterstützt jedoch die Annahme, dass die GgpS ein Homotetramer ausbildet.

### **4.4 Die GgpS aus *Synechococcus* sp. PCC 7002 wird durch NaCl aktiviert und durch Nukleinsäuren inaktiviert**

Die GgpS aus *Synechococcus* sp. PCC 7002 weist hohe Ähnlichkeiten zur GgpS aus *Synechocystis* auf. Eine Blast Analyse ergab Übereinstimmungen der Aminosäuresequenzen von 70% (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob sich die Regulation dieser Proteine ähneln oder sogar gleichen. Für diese Untersuchungen wurde das GgpS-Protein aus *Synechococcus* sp. PCC 7002 gereinigt (Abb.18). Unter Kontrollbedingungen (lediglich Zugabe von Glycerol-3-P und ADP-Glukose) wurden sehr niedrige Aktivitäten gemessen (Abb. 20). Jedoch zeigte sich, dass eine Zugabe von NaCl zu höheren Aktivitäten führte. Bisher ist über die Regulation der GgpS aus *Synechococcus* sp. PCC 7002 nur wenig bekannt. Es wurde gezeigt, dass die Expression des *ggsS* Gens unter

hyperosmotischen Bedingungen sehr stark erhöht wird (Engelbrecht *et al.* 1999). Im Gegensatz zur GgpS aus *Synechocystis* liegt die GgpS nicht präformiert in der Zelle vor. Eine Behandlung der Zellen mit Chloramphenicol störte die GG-Synthese. Erst wenn die Zellen mit NaCl vorbehandelt wurden, konnte eine Aktivität gemessen werden (Engelbrecht *et al.* 1999).

Die Zugabe von DNA hatte eine Inhibition des Proteins zur Folge. Eine Interaktion der GgpS und DNA konnte über ein EMSA-Experiment nachgewiesen werden (Abb. 22). Jedoch scheint die Inhibition der GgpS aus *Synechococcus* nicht der wichtigste Regulationsmechanismus zu sein. Erst wenn NaCl in die Ansätze der Aktivitätstests gegeben wurde, stieg die Aktivität des Enzyms deutlich an. Dies ist ein entscheidender Unterschied zur GgpS aus *Synechocystis*, die zwar auch einen Anstieg ihrer Aktivität durch die Zugabe von NaCl zeigte, welcher jedoch deutlich niedriger ausfiel als bei der GgpS aus *Synechococcus*. *Synechococcus* sp. PCC 7002 kommt in natürlicher Umgebung in marinen Gewässern vor (Klähn *et al.* 2010 (2)). Unter diesen Bedingungen ist eine ständige Synthese von kompatiblen Soluten erforderlich. Somit fällt eine Inhibition des Proteins GgpS unter diesen Bedingungen weniger ins Gewicht als eine schnelle Aktivierung. Möglich wäre es, dass die GgpS aus *Synechococcus* eine vergleichbare posttranslationale Regulation erfährt wie in *Synechocystis*, diese jedoch unter *in vivo* Bedingungen weniger relevant ist.

### **4.5 Die TPS aus *Mycobacterium tuberculosis* und die GgpS aus *Thiobacillus denitrificans* interagieren mit Nukleinsäuren.**

Im Rahmen der Untersuchungen der Regulation weiterer Glukosyltransferasen wurden die TPS aus *Mycobacterium tuberculosis*, *E. coli* und die GgpS aus *Thiobacillus denitrificans* analysiert. Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass keines dieser drei Enzyme durch Nukleinsäuren inaktiviert wird. Jedoch konnte eine Interaktion der Enzyme mit DNA nachgewiesen werden (Abb. 24, 26, 27). Bei der TPS aus *E. coli* handelt es sich jedoch lediglich um eine sehr schwache Interaktion. Es konnte zwar eine Verschiebung der DNA im EMSA beobachtet werden, jedoch lag der Großteil der DNA in den Proben unverändert vor (Abb. 26). Im Enzymaktivitätstest hatte die Zugabe von DNA zu den Proben einen leicht inhibierenden Effekt auf das Enzym. Die Aktivität sank auf 60-80% der Ausgangsaktivität (Abb. 25). Diese Inhibition fällt deutlich geringer aus als bei der GgpS aus *Synechocystis*, deren Aktivität bei einer Zugabe von DNA nahezu vollständig inhibiert wird (Abb. 31). Es

kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Inhibition der TPS durch Nucleinsäuren einen zentralen Regulationsmechanismus für dieses Protein darstellt.

Die TPS aus *Mycobacterium tuberculosis* zeigte ebenfalls eine schwache Interaktion mit DNA im EMSA (Abb. 24). Es ist zusätzlich bekannt, dass die TPS mit Heparin interagiert (Pan *et al.* 2002). Eine Interaktion von Heparin mit der GgpS aus *Synechocystis* findet ebenfalls statt (Novak 2010). Diese legte die Grundlage für die Hypothese, dass die GgpS an das negativ geladene Rückgrat von Nucleinsäuren bindet und dadurch inaktiviert wird. Eine Inhibition der TPS durch Nucleinsäuren wurde jedoch nicht beobachtet (Abb. 23). Es wurde in vorherigen Arbeiten gezeigt, dass insbesondere hohe Salzkonzentrationen einen negativen Effekt auf die Enzymaktivität der TPS haben. Dieser kann durch die Zugabe von DNA in gewissem Maße aufgehoben werden (Brühl 2010). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits sehr geringe DNA Mengen (0,6 ng/μl) ausreichen, um diesen stabilisierenden Effekt zu erzeugen, was bisher nur bei sehr hohen DNA Konzentrationen (2,5 μg/μl) getestet wurde. Ein Anstieg der Aktivität nach einer Zugabe von DNA konnte anhand der in dieser Arbeit gemessenen Aktivitäten nicht beobachtet werden.

Die GgpS aus *Thiobacillus denitrificans* konnte lediglich hinsichtlich ihrer Interaktion mit DNA untersucht werden. Nach mehreren Optimierungsversuchen konnte keine Aktivität des Enzyms beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die naheliegende Begründung ist eine geringe Stabilität des Proteins. Beispielsweise könnte die Funktionalität des Enzyms bereits durch die Reinigung beeinträchtigt worden sein. Hierzu müssten die eingesetzten Puffer genauer angepasst werden. Auch ein vollständiger Wechsel des Puffersystems könnte in Betracht gezogen werden.

Die Analyse der Interaktion des Proteins mit DNA über einen EMSA zeigte, dass eine stärkere Interaktion der GgpS mit der eingesetzten DNA stattfindet als bei der TPS aus *E. coli* (Abb. 27). Schon eine Zugabe von 1 μg GgpS führte zu einer vollständigen Veränderung des Laufverhaltens der DNA im Polyacrylamidgel. Jedoch fanden sich in den Spuren mit geringeren Proteinmengen von 1-1,75 μg mehrere verschobene Banden. Dabei könnte es sich um DNA-Moleküle handeln, die unterschiedlich viele GgpS Proteine gebunden haben und daher unterschiedlich große Komplexe bilden. Dieser Effekt wurde bei der GgpS aus *Synechocystis* nicht beobachtet (Abb. 22). Die Zugabe der GgpS aus *Synechocystis* zu DNA führte zu einer einheitlichen Verschiebung der DNA. Die beobachtete Interaktion des GgpS Enzyms aus *Thiobacillus denitrificans* mit der DNA findet offensichtlich, wie in

*Synechocystis*, sequenzspezifisch statt, da DNA aus dem Vektor pDRIVE verwendet wurde. Bei der Interaktion des Proteins mit Nucleinsäuren könnte es sich, wie bei der GgpS aus *Synechocystis*, um eine elektrostatische Wechselwirkung von positiv geladenen Aminosäuren mit dem negativ geladenen Rückgrat der Nucleinsäuren handeln. Über eine Interaktion des Proteins mit Heparin ist jedoch bisher nichts bekannt. Ein Sequenzvergleich zeigte, dass die GgpS aus *Thiobacillus denitrificans* drei Aminosäuren aufweist, die als mögliche Interaktionspartner der GgpS aus *Synechocystis* beschrieben wurden (s. Abschnitt 4.7). Es handelt sich dabei um die Aminosäuren K270, K286 und K345, die in *Synechocystis* an dieser Position ebenfalls positiv geladen sind (R270, K286, R345). In *Synechocystis* kommen jedoch mehr Aminosäuren als potentielle Bindungsstellen für Nucleinsäuren vor. Dies könnte die zuvor beschriebene schwächere Interaktion der GgpS aus *Thiobacillus denitrificans* erklären. Um diese Hypothese zu stützen, sind jedoch weitere Analysen erforderlich. Insbesondere die Suche nach einer Möglichkeit, die Aktivität des Proteins zu messen, hätte eine hohe Priorität. Dies würde es erlauben, Aussagen über eine Inhibition des Enzyms durch Nucleinsäuren zu treffen. Es wurden bisher jedoch keine Arbeiten an der GgpS aus *Thiobacillus denitrificans* veröffentlicht (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>; Stand: 07.11.2013), was die Identifikation von geeigneten Versuchsbedingungen erschwert.

### **4.6 Die GgpS aus *Synechococcus* sp. WH8102 wird nicht durch Nucleinsäuren inhibiert und es findet keine Interaktion statt.**

Die GgpS aus *Synechococcus* sp. WH8102 weist ebenfalls große Ähnlichkeiten zur GgpS aus *Synechocystis* auf. Daher wurde auch dieses Enzym hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften zu Nucleinsäuren untersucht. Ebenfalls wurden eventuelle Einflüsse einer Bindung auf die Aktivität geprüft.

Eine Bindung des Proteins an DNA wurde nicht beobachtet (Abb. 22). Auch die Aktivität des Enzyms wird durch DNA nicht beeinträchtigt (Abb. 21). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der GgpS aus *Synechococcus* sp. WH8102 und der GgpS aus *Synechocystis* erbrachte eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Regulation der Proteine (Abb. 29, Tab. 5). Bereits in vorherigen Arbeiten, die die Interaktion der GgpS aus *Synechocystis* mit Nucleinsäuren behandelten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Interaktion von positiv geladenen Aminosäuren mit dem negativ geladenen Rückgrat der Nucleinsäuren stattfindet (Novak 2010). Im Vergleich der Aminosäuresequenzen der GgpS-Proteinen aus *Synechocystis* und *Synechococcus* sp. WH8102 fiel auf, dass mehrere

exponierte positive Aminosäuren, die in der *Synechocystis* GgpS zu finden sind, nicht in *Synechococcus* sp. WH8102 vorkommen (Abb. 29, Tab. 5). Es ist daher möglich, dass das Fehlen dieser Aminosäuren mit der fehlenden Interaktion der GgpS mit DNA im Zusammenhang steht. Dieser Sachverhalt lieferte ein Kriterium für die Auswahl von positiven Aminosäuren der GgpS aus *Synechocystis*, die durch neutral geladene Aminosäuren ausgetauscht werden sollten. Diese Ergebnisse sollten Erkenntnisse über die Nukleinsäure-Interaktionsstellen der *Synechocystis* GgpS liefern.

Die Analyse mehrerer Glukosyltransferasen hinsichtlich ihrer Interaktion mit Nukleinsäuren und den eventuellen Auswirkungen auf die Aktivität kann wie folgt zusammengefasst werden. Bei der GgpS aus *Synechococcus* sp. 7002 konnte ein inhibierender Effekt durch Nukleinsäuren beobachtet werden. Mehrere der getesteten Glukosyltransferasen interagierten mit Nukleinsäuren. Offensichtlich ist die Inhibition der Aktivität durch Nukleinsäuren auf die Glucosyltransferasen weniger Organismen beschränkt. Die Unterschiede, die bei den GgpS-Proteinen aus *Synechocystis* und *Synechococcus* sp. WH8102 beobachtet wurden, waren jedoch von großem Wert für die Suche nach den Nukleinsäureinteraktionsstellen der GgpS aus *Synechocystis* (s. Abschnitt 4.7).

### **4.7 Die GgpS aus *Synechocystis* bindet mit mehreren positiv geladenen Aminosäuren an Nukleinsäuren**

Wie in Abschnitt 4.6 bereits erwähnt, besteht die Hypothese, dass die GgpS aus *Synechocystis* über eine elektrostatische Wechselwirkung mit dem negativ geladenen Rückgrat von Nukleinsäuren interagiert. Die Beteiligung des Rückgrats der Nukleinsäuren konnte über die beobachtete Inhibition des GgpS Proteins durch Heparin gezeigt werden (Novak *et al.* 2010, Abb. 7). Bei Heparin handelt es sich um ein Struktur analogon für das negativ geladene Rückgrat der Nukleinsäuren. Es galt die Frage zu beantworten, ob und welche positiven Aminosäuren des GgpS-Proteins an der Interaktion mit Nukleinsäuren beteiligt sind. Erste Hinweise auf beteiligte Lysinreste lieferte die Biotinylierung des GgpS-Proteins in An- und Abwesenheit von DNA (Abb. 28, Tab. 4). Jedoch schloss diese Analyse keine Arginine mit ein. Hinweise über eine mögliche Beteiligung dieser Aminosäuren lieferte der Sequenzvergleich der GgpS-Proteine aus *Synechocystis* und *Synechococcus* sp. WH8102. Hierbei zeigte sich, dass mehrere positiv geladene Aminosäuren, die in *Synechocystis* exponiert vorliegen, nicht in *Synechococcus* vorkommen. Dabei handelte es sich unter



anderem um Lysine, die im oben genannten Experiment durch DNA vor einer Biotinylierung geschützt wurden. Anhand dieser Daten konnte eine Auswahl über die Aminosäuren getroffen werden, die durch Alanine ersetzt werden sollten. Insgesamt sollten 13 positive Aminosäuren ausgetauscht werden (Tab. 6). Dies gelang jedoch nicht bei allen Aminosäuren. Es war nicht möglich, die Aminosäuren K61 und R215 gegen Alanine auszutauschen. Nach mehreren getesteten Bedingungen der CCR wurde keine Mutation beobachtet. Möglich wäre, dass die konstruierten Primer für die CCR nicht gebunden haben oder die Verknüpfung der gebundenen Primer durch die Ampligase nicht funktionierte. Ein weiteres Problem zeigte sich bei der Variante K308A. Es war nicht möglich, das Protein zu reinigen. Es fand eine sehr geringe Expression statt und nach der Reinigung fand sich kein Protein in den Elutionen. Eine naheliegende Erklärung ist eine hohe Instabilität dieser GgpS-Variante.

Die Reinigung sämtlicher GgpS-Varianten verlief problematisch. Von den weiteren Varianten der GgpS war es zwar möglich, eine geringe Menge Protein zu erhalten, jedoch fielen die Ausbeuten im Vergleich zur Wildtyp-GgpS sehr gering aus (s. Tab. 8). Es ist auch hier davon auszugehen, dass die GgpS-Varianten sehr instabil bezüglich ihrer Quartärstruktur bzw. Oligomerisierung sind, da diese bis auf die Varianten R80A und R353A in der durchgeführten nativen PAGE diffuse Banden bildeten, was bei der Wildtyp-GgpS nicht zu beobachten war (Abb. 34). Mehrere Varianten wiesen in der nativen PAGE zusätzliche Banden auf, die wahrscheinlich Proteinkomplexen mit einem geringeren Molekulargewicht entsprechen. Dies deutet auf eine gestörte Oligomerisierung der Varianten hin. Es ist möglich, dass der Austausch der Aminosäuren die Konformation des Proteins beeinflusst und dadurch die Oligomerisierung gestört wird. Die Interaktionsstellen der einzelnen GgpS-Proteine zueinander sind derzeit unbekannt. Hinweise hierzu würde die Kristallisation des Proteins liefern, durch die eine genaue Struktur des Proteins aufgeklärt würde. Es wurde in Zusammenarbeit mit der AG Baumann der Universität Köln bereits versucht, die GgpS zu kristallisieren. Diese Arbeiten waren jedoch zum Zeitpunkt der Verfassung dieser Dissertation noch nicht abgeschlossen.

Die Analyse der Enzymaktivitäten lieferte Hinweise über eine eventuelle Beteiligung der ausgetauschten Aminosäuren an der Nukleinsäurebindung der GgpS. Die Varianten, in denen die Aminosäuren R353, R485, K281 und insbesondere die Aminosäuren R80 und R270 ausgetauscht wurden, wurden deutlich schwächer durch DNA inhibiert als die Wildtyp GgpS. Jedoch wurde nicht bei allen ausgetauschten Aminosäuren eine vollständige Aufhebung der Inhibition beobachtet (Tab 7). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass mehrere Aminosäuren an der Interaktion der GgpS mit Nukleinsäuren beteiligt sind. Diese

Hypothese wird durch die Ergebnisse der EMSA Experimente gestützt (Abb. 33). Hier zeigte sich bei mehreren Varianten eine schwächere DNA-Bindung. Jedoch wurde diese in keiner Variante vollständig aufgehoben (Tab. 8). Für zukünftige Analysen empfiehlt es sich, mehrere Aminosäuren auszutauschen. Der Versuch wurde unternommen, eine CCR mit mehreren phosphorylierten Oligonukleotiden, die auch für die einzelnen Austausch verwendet wurden, eine mehrfach modifizierte GgpS-Variante zu erstellen. Jedoch war es nicht möglich, eine solche Variante zu erstellen (Daten nicht gezeigt). Es ist jedoch gelungen, eine zweifach modifizierte Variante zu erstellen, bei der die Reste K281 und K286 ausgetauscht wurden. Da diese Reste in unmittelbarer Nähe zu einander liegen, konnte ein einzelnes phosphoryliertes Oligonukleotid verwendet werden, auf welchem beide Basentriplets, die für die beiden Lysine kodieren, ausgetauscht wurden. Bei dieser Variante konnten, im Gegensatz zur Variante K286A, Aktivitäten gemessen werden (Tab. 8). Zusätzlich wurde das Protein im Vergleich zur Einzelvariante K281A schwächer durch DNA inhibiert (Abb. 31). Dieses Ergebnis weist auf eine Beteiligung der Aminosäure K286 an der Nukleinsäureinteraktion hin. Die Analyse der Variante R345A führte zu einem unerwarteten Ergebnis. Im EMSA zeigte dieses Protein eine deutlich schwächere DNA Bindung als die Wildtyp-GgpS. Jedoch wurde die Variante R345A im Aktivitätstest nahezu normal inhibiert. Eine denkbare Erklärung wäre, dass einige Reste, die an der Nukleinsäureinteraktion beteiligt sind, nicht mit der Inhibition im Zusammenhang stehen. In dieser Dissertation wurde bereits gezeigt, dass mehrere Glukosyltransferasen an Nukleinsäuren binden, diese jedoch keinen inhibierenden Effekt hatten. Ein Beispiel ist die TPS aus *Mycobacterium tuberculosis*, welche an DNA bindet und trotzdem keine Hemmung erfährt (Abb. 23 und Abb. 24). Es konnte in weiteren Arbeiten gezeigt werden, dass die TPS aus *Mycobacterium tuberculosis* an Heparin bindet, was bisher mit einem stabilisierenden Effekt erklärt wurde (Pan *et al.* 2002).

In Abb. 51 ist eine modellierte Struktur des GgpS-Proteins dargestellt. Diese wurde über einen Sequenzvergleich der GgpS mit der TPS aus *E. coli* erstellt, bei der bereits die Struktur bekannt ist (Gibson *et al.* 2004). In dieser modellierten Struktur der GgpS sind alle ausgetauschten Aminosäuren blau markiert. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurden nur die Aminosäuren beschriftet, die in den EMSA Experimenten eine schwächere Bindung an DNA aufwiesen. Drei der positiven Aminosäuren (R270, K281 und K286) befinden sich in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums der GgpS, welches im Bereich der Aminosäure 300 vermutet wird. In diesem Bereich befindet sich das aktive Zentrum bzw. die Bindestelle für UDP-Glukose der TPS aus *E. coli* (Gibson *et al.* 2004).

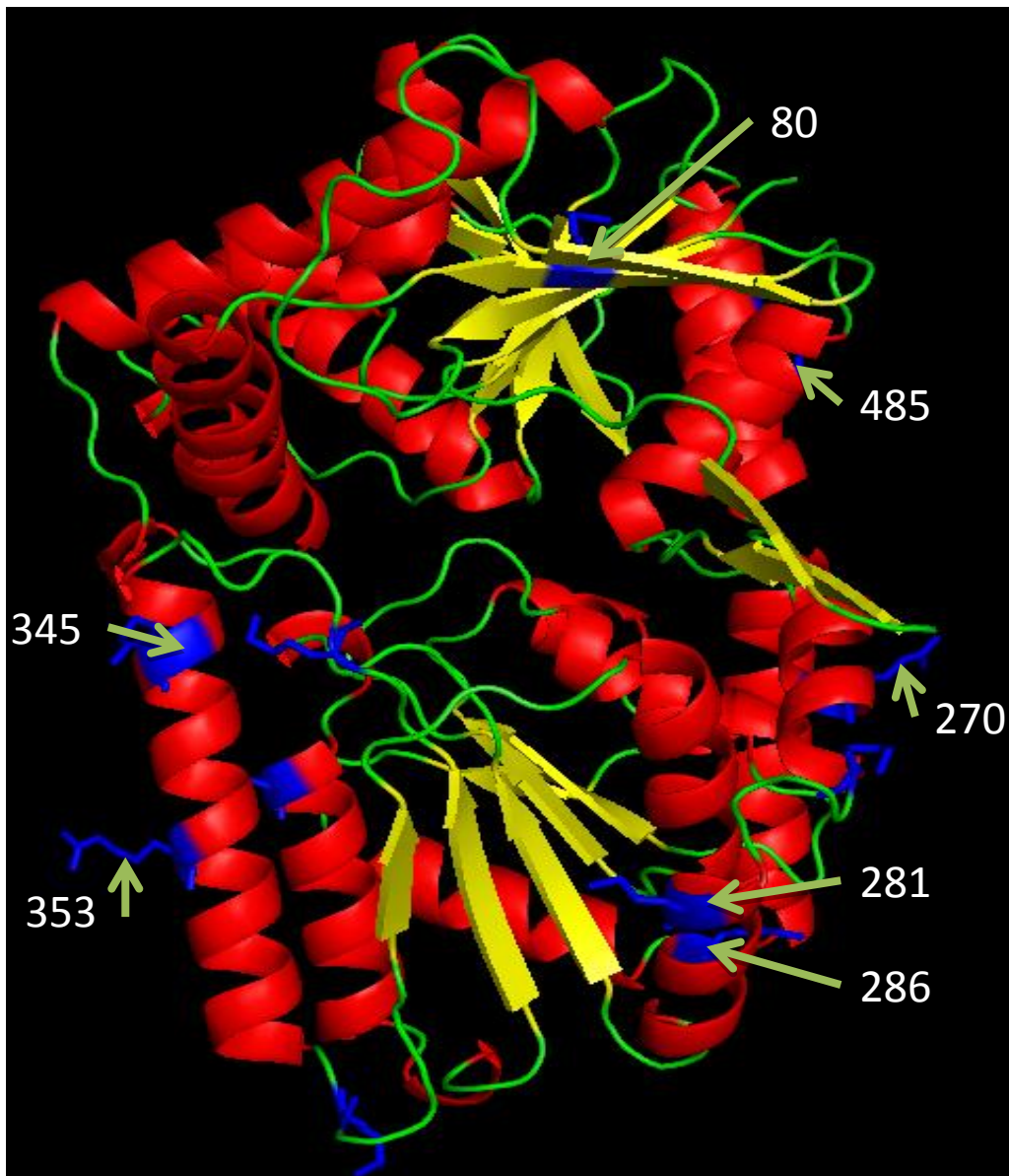


Abb. 51: Modellierte Struktur des GgpS-Proteins auf Basis der TPS aus *E. coli* (Gibson *et al.* 2004). In Blau sind die Aminosäurereste der putativen Bindestellen hervorgehoben. Die Reste, die in den oben aufgeführten Experimenten als mögliche Bindestellen identifiziert wurden, sind mit ihrer entsprechenden Sequenzposition markiert.

Durch die Ähnlichkeit der beiden Proteine ist es vorstellbar, dass sich im Bereich der Aminosäure 300 der GgpS die ADP-Glukose Bindestelle befindet. Die unmittelbare Nähe der drei genannten Aminosäuren zum aktiven Zentrum könnte mit der Regulation der GgpS im direkten Zusammenhang stehen. Möglich wäre eine Konformationsänderung der GgpS, die sich direkt auf das aktive Zentrum auswirkt. Jedoch würde dies nur die Umsetzung der Substrate ADP-Glukose und Glycerol-3-P betreffen, da die Substratbindung durch die Interaktion mit Nukleinsäuren nicht beeinträchtigt ist (s. Abschnitt 4.1 und Abb. 11). Die

Aminosäuren R353 und R345 liegen ebenfalls nahe des aktiven Zentrums. Beide Aminosäuren befinden sich in einer Helixdomäne. Diese Helix findet sich ebenfalls bei der TPS aus *E. coli*. Dieser Helix wird dort eine Beteiligung an der Oligomerisierung der TPS zugesprochen (Gibson *et al.* 2004). Dies könnte auch bei der GgpS der Fall sein. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass die GgpS Variante R353A als eine der wenigen Varianten relativ konsistente Banden in der nativen PAGE zeigte (Abb. 34). Die Variante R345A schien im Gegensatz dazu instabil zu sein. Jedoch kann anhand der Tatsache, dass fast alle GgpS-Varianten instabil waren, nicht auf eine direkte Beteiligung dieser Aminosäure an der Oligomerisierung geschlossen werden. Um dies zu klären, werden die Daten aus der Kristallisation von großem Nutzen sein, da einzelne Aminosäuren analysiert werden können, die mit weiteren GgpS-Proteinen interagieren, was eine ausreichend gute Auflösung der Struktur voraussetzt. Ebenfalls ist es zu empfehlen, einige einzelne Aminosäuren, die bereits getestet wurden, gegen andere Aminosäuren als Alanin auszutauschen. Es ist nicht auszuschließen, dass der Austausch gegen andere Aminosäuren zu stabileren Proteinvarianten führen kann. Denkbar wäre ein Austausch der positiv geladenen Aminosäuren gegen Glutamat, welches negativ geladen ist. Diese Aminosäure weist auch strukturell mehr Ähnlichkeit zu Arginin oder Lysin auf als das bisher genutzte Alanin. Die negative Ladung von Glutamat würde definitiv die elektrostatische Wechselwirkung der GgpS mit dem Rückgrat der Nucleinsäuren stören, was sich ebenfalls positiv auf die Analysen der Beteiligung der ausgetauschten Aminosäuren an der Inhibition auswirken könnte.

Die Austausche positiv geladener Aminosäurereste trugen zur Suche nach den Nucleinsäureinteraktionsstellen bei. Ziel der Austausche war die Suche von GgpS-Varianten, die schwächer durch Nucleinsäuren inhibiert werden und eine geringere Affinität zu Nucleinsäuren aufweisen. Dies wurde bei mehreren Varianten beobachtet. Auch wenn die einzelnen GgpS-Varianten sehr eingeschränkt in ihrer Aktivität waren, konnten wichtige Erkenntnisse über die Interaktion der GgpS mit Nucleinsäuren gewonnen werden.

### **4.8 GgpS ist in einem heterologen *in vivo* System aktiv und wird wie in *Synechocystis* reguliert**

Neben der Regulation des GgpS-Proteins *in vitro* wurde in dieser Arbeit die Regulation der GgpS in einem *in vivo* System untersucht. Sollte die Inhibition der GgpS sequenzunabhängig durch Nucleinsäuren inhibiert werden, müsste dies auch in einem heterologen Bakterienstamm stattfinden. Das Bakterium *Corynebacterium glutamicum* eignete sich als ein solches Testsystem, da dieses Bakterium Glukosylglycerol nicht verstoffwechseln kann (Abb.

37). *C. glutamicum* besitzt offenbar kein Aufnahmesystem für Glukosylglycerol. *E. coli* dagegen konnte GG als Kohlenstoffquelle nutzen und schied dadurch als Kandidat aus.

Die Gene *ggsS* und *ggsP* konnten erfolgreich in den Vektor pEKEx2 kloniert und anschließend in *C. glutamicum* exprimiert werden (Abb. 38). Die Aktivität der Enzyme konnte über einen Aktivitätstest der Zellextrakte nachgewiesen werden (Abb. 39). Jedoch mussten in diesem Falle die Substrate ADP-Glukose und Glycerol-3-P zugegeben werden. Ein Fehlen von Glycerol-3-P hatte dabei weniger Auswirkungen auf die Aktivität. Unter diesen Bedingungen wurde eine geringe Menge GG synthetisiert. Das Fehlen von ADP-Glukose verursachte eine fast vollständig ausbleibende GG-Synthese, was auf die Unterbrechung des Stoffwechsels nach der Zellyse zurückzuführen ist. Es konnte eine deutliche Steigerung der Aktivität beobachtet werden, wenn NaCl zu den Ansätzen gegeben wurde. Dies ist auf die Dissoziation der GgsS von den Nukleinsäuren zurückzuführen. In Zellextrakten aus mit NaCl vorinkubierten Zellen konnten vergleichbare GG-Mengen gemessen werden.

Ziel dieses Projektes war es jedoch, die GgsS-Regulation *in vivo* zu untersuchen. Es war möglich, eine GG-Synthese durch den Stamm *C. glutamicum* GG zu beobachten. Zunächst konnte das GG jedoch nur im Außenmedium gemessen werden (Abb. 40). Hierbei zeigte sich, dass die GG Menge direkt mit der außen zugegebenen Salzmenge im Zusammenhang steht. Da die Proteinmenge in allen Ansätzen vergleichbar war, konnte ein Zusammenhang der Proteinmenge mit der GG-Synthese ausgeschlossen werden (Abb. 41).

Nach mehreren Versuchen, GG in den Zellen nachzuweisen, führte ein Aufschluss in Methanol mit anschließender Chloroformbehandlung der Extrakte zu verlässlichen Werten der zellinternen GG-Mengen. Hierbei konnte beobachtet werden, dass GG auch in den Zellen vorhanden ist. Offensichtlich akkumuliert *C. glutamicum* Glukosylglycerol und exportiert es ab einer gewissen internen Konzentration. Es ist bisher unbekannt, wie *C. glutamicum* das GG exportiert. Da *C. glutamicum* normalerweise kein GG transportiert, wird kein spezifischer Transporter für GG vorhanden sein. Möglich wäre ein Export von GG über mechanosensitive Kanäle wie MscCG, welcher sehr ähnlich zu MscS in *E. coli* ist (Becker *et al.* 2013). *Synechocystis* besitzt MscS als mechanosensitiven Kanal (Hagemann 2011). Es wird vermutet, dass GG über diesen Kanal exportiert wird, wenn ein hypoosmotischer Schock eintritt.

Sorbitol löst in *Synechocystis* keine GG-Synthese aus (Marin *et al.* 2006). Es wird vermutet, dass Sorbitol, welches durch *Synechocystis* aufgenommen werden kann, in der Zelle selbst als kompatibles Solut agieren kann, was wiederum eine Ionenaufnahme verhindert. In

*Corynebacterium glutamicum* hingegen findet keine Sorbitolaufnahme statt (Ochrombel *et al.* 2011, Peter *et al.* 1998). Ein starker Anstieg der Sorbitolkonzentrationen im Außenmedium führt zu einem hyperosmotischen Stress (Marin *et al.* 2006). Dies führt wiederum zu einer Aufnahme von Ionen, insbesondere Kalium (Abb. 47). Bei *C. glutamicum* GG-Zellen, die mit 1 M Sorbitol behandelt wurden, konnte jedoch kein GG im Außenmedium gemessen werden, was auf ein technisches Problem zurückzuführen ist (s. unten u. Anhang 5). In den Chromatogrammen der gaschromatografischen Analyse der Überstände der untersuchten Kulturen wurde stets Sorbitol in hohen Mengen detektiert. Die Flächen der Peaks, die Sorbitol anhand eines Vergleichs mit einem Standard zugeordnet werden konnten, waren so hoch, dass das eingesetzte Derivatisierungsmittel (MSTFA/Pyridin) möglicherweise nicht in ausreichenden Mengen für die Derivatisierung von GG und dem internen Standard Ribitol ausreichte. Über die Messung der internen GG-Mengen konnte gezeigt werden, dass GG auch in sorbitolbehandelten Zellen synthetisiert wird (Abb. 46). Es ist davon auszugehen, dass GG auch von sorbitolbehandelten Zellen exportiert wird. Um dies zu beweisen, müssten in Zukunft alternative Nachweismethoden getestet werden. Es ist möglich, GG über eine HPLC nachzuweisen. Jedoch entstehen dort Überschneidungen des GG-Signals mit dem Signal von Glukose, welche bei den Kultivierungen als Kohlenstoffquelle eingesetzt wird (pers. Mitteilung Dr. G. Seibold). Möglich wäre es, die Zellen mit alternativen Kohlenstoffquellen zu kultivieren, um diesem Problem begegnen zu können.

Eine weitere Frage warf die Messung der internen Kaliumkonzentrationen in *Corynebacterium glutamicum* auf (Abb. 47). Diese lagen auch bei niedrigen Salzkonzentrationen im Medium bei 250 mM. In *Synechocystis* liegen diese bei 59 mM (Hagemann 1994). Bei solchen Ionenkonzentrationen, wie sie in *C. glutamicum* gemessen wurden, wurde bei *in vitro* Messungen mit dem GgpS Protein bereits eine vollständige Dissoziation der GgpS von den Nukleinsäuren beobachtet. Es müsste daher in *C. glutamicum* die Situation vorliegen, dass nicht das vollständige interne Kalium für eine Wechselwirkung mit der GgpS oder den Nukleinsäuren zur Verfügung steht. Ebenfalls muss beachtet werden, dass die GgpS in *C. glutamicum* überexprimiert wurde und sich dadurch das Verhältnis der GgpS zu den Nukleinsäuren ändert. Dass die Aktivierung allein durch die in die Zelle gelangten Natriumionen, bei Zugabe von NaCl, ausgelöst wird, kann ausgeschlossen werden, da auch die Zugabe von KCl oder Sorbitol zu einer Aktivierung der GG-Synthese führte (Abb. 46).

Da die GG-Synthese in *Corynebacterium glutamicum* GG bei niedrigen internen Ionenkonzentrationen reduziert ist und diese durch eine Zugabe von Salzen bzw. Sorbitol

gesteigert wird, kann geschlossen werden, dass die Inhibition der GgpS durch Nucleinsäuren auch in *C. glutamicum* stattfindet (Abb. 46, 47). Der Effekt durch Sorbitol kommt dabei durch den damit verbundenen Kaliumstrom zustande. Die niedrigeren Kaliumkonzentrationen in den mit Sorbitol behandelten Zellen sind schwierig zu erklären, da in die intern gemessenen GG-Mengen sogar höher ausfallen als bei den salzbehandelten Zellen (Abb. 46, 47). Die Messung des internen GG könnte jedoch einer gewissen Ungenauigkeit unterliegen, da viele Behandlungsschritte notwendig waren, um das GG aus den Zellen zu extrahieren.

Die gemessenen Daten lassen trotz der zuvor beschriebenen Probleme auf eine sequenzspezifische Interaktion der GgpS mit Nucleinsäuren schließen. Ebenfalls können Proteine aus *Synechocystis* als spezifische Regulatoren der GgpS endgültig ausgeschlossen werden, da diese in *C. glutamicum* nicht vorkommen sollten. Als einziger möglicher Regulator aus *Synechocystis*, der auch in *C. glutamicum* GG vorkommen kann, würde eine kleine interferierende RNA in Frage kommen, die möglicherweise innerhalb des *ggsS* Gens gebildet wird. Solche kleinen interferierenden RNA-Moleküle kommen in *Synechocystis* vor. Ein Beispiel ist dabei das Gen *isrR* welches innerhalb des Genes *isiA* liegt und als negativer Regulator für die IsiA Synthese fungiert (Dühning *et al.* 2006). Das Protein IsiA wird in *Synechocystis* bei Eisenmangel gebildet. Seine Funktion wird derzeit noch diskutiert (Geiß *et al.* 2001). Bisher gibt es jedoch keine Hinweise über eine solche RNA im *ggsS*-Gen. Das Gen *ggsR* kodiert für einen Transkriptionsregulator von *ggsS* (Klähn *et al.* 2010 (1)). Die Sequenz für dieses Gen liegt im Promotorbereich von *ggsS* und ist auf dem pEKEx2 Vektor, der für die Expression von *ggsS* und *ggsP* in *C. glutamicum* verwendet wurde, nicht vorhanden. Daher kann auch dieser Faktor in *C. glutamicum* ausgeschlossen werden.

Somit kann geschlossen werden, dass in *C. glutamicum* eine vollständige posttranslationale Regulation der GgpS wie in *Synechocystis* stattfindet.

### **4.9 Glukosylglycerol kann in *C. glutamicum* in großen Mengen produziert werden**

Im vorigen Abschnitt wurde beschrieben, dass die GgpS in *C. glutamicum* wie in *Synechocystis* reguliert wird. Ein großer Anteil des synthetisierten GG wird dabei in das Außenmedium abgegeben. Hierbei wurden GG-Mengen von 1 g/l gemessen. Da dies eine hohe Menge an GG darstellt, sollte der Versuch unternommen werden, die Produktion an GG zu optimieren.

Der erste Ansatz sah eine Verbesserung der Verfügbarkeit von ADP-Glukose vor. Hierzu wurden *C. glutamicum* Stämme verwendet, denen die Enzyme für ADP-Glukose

verbrauchende Reaktionen fehlen. Hierbei handelte es sich um die Gene *glgA* und *otsA*. Das Protein GlgA ist in der Glykogensynthese von Bedeutung. Das Gen *otsA* kodiert für die Trehalosephosphatsynthase. Diese kann neben UDP-Glukose auch ADP-Glukose als Substrat für die Trehalosephosphat Synthese nutzen.

Mit diesen Stämmen konnte keine höhere GG-Ausbeute erreicht werden (Abb. 48). Dies könnte jedoch auf Probleme bei der Behandlung der Zellen zurückzuführen sein. Alle Stämme, denen *glgA* fehlte, wiesen eine Kanamycin Resistenz auf. Dadurch mussten diese Stämme mit einem alternativen Plasmid transformiert werden. Hierbei handelte es sich um den Vektor pEKEx3 *ggsS ggpP*, welcher eine Spectinomycinresistenzkassette trägt. Spectinomycin beeinträchtigt jedoch das Wachstum von *C. glutamicum* sehr stark (persönl. Mitteilung Dr. Gerd Seibold). Aus diesem Grunde kann Spectinomycin nicht in den Hauptkulturen verwendet werden. Daher kann es in diesen Kulturen zu einem Verlust des Vektors kommen. Dies würde folglich zu verminderten GG-Ausbeuten in den Kulturen führen, da nicht mehr alle Zellen GG produzieren. Bei der *otsA* Mutante handelt es sich um einen Deletionsstamm, welcher mit dem Vektor pEKEx2 *ggsS ggpP* transformiert werden konnte. Dies erklärt wahrscheinlich die höheren Ausbeuten im Vergleich zu den anderen Stämmen. Im Vergleich zum Wildtypstamm mit den Proteinen GgpS und GgpP fielen auch hier die Ausbeuten deutlich geringer aus.

Neben dem Versuch, die GG-Ausbeute über die bessere Substratzufuhr zu erhöhen, sollte versucht werden, die GG-Produktion unabhängig vom Wachstum der Zellen zu induzieren. Dies könnte eine GG-Produktion über einen längeren Zeitraum ermöglichen, der in den bisherigen Kulturen auf die exponentielle Wachstumsphase limitiert war (Abb. 43). Für diesen Zweck wurde ein Isoleucin auxotropher Stamm verwendet (Sahm und Eggeling 1999). Diesem fehlt das *ilvA* Gen, welches für die Threonin Dehydrogenase kodiert, welche für die Isoleucinsynthese notwendig ist (Radmacher *et al.* 2002, Morbach *et al.* 1996).

Mit diesem Stamm wurde eine Transformation des Vektors pEKEx2 GG durchgeführt und die Proteine GgpS und GgpP konnten nachgewiesen werden (Abb. 49). Nach Erreichen einer optischen Dichte von 40 wurde das Wachstum des Stammes unterbrochen (Entzug von Isoleucin) und ein NaCl-Schock durchgeführt, welcher zu einer GG-Produktion führte. Die Menge des produzierten GG stand im Zusammenhang mit der zugegebenen NaCl Menge. Mit diesem Experiment konnte erneut gezeigt werden, dass die GG-Produktion nicht vom Wachstum der Zellen abhängig ist. In weiteren Experimenten könnte nun versucht werden, GG über einen längeren Zeitraum zu produzieren. Hierzu müsste in definierten Abständen



Glukose zugeführt werden, um eine längere GG-Produktion zu ermöglichen. Jedoch muss beachtet werden, dass die Zellen sich mit der Zeit an die hohen Salzkonzentrationen akklimatisieren, was nach bereits 24 h der Fall ist. Es müssten daher in Zukunft längere Messungen der GG-Produktion erfolgen.

Es kann zusammengefasst werden, dass es bisher nicht möglich war, die GG-Produktion von *C. glutamicum* über eine verbesserte Substratzufuhr zu steigern. Die GG-Produktion findet unabhängig vom Wachstum der Zellen statt, was eine längere GG-Produktion ermöglichen könnte, wenn der Eintritt in die stationäre Wachstumsphase verhindert wird und zusätzlich eine ausreichende Menge an Glukose längerfristig zur Verfügung gestellt wird.

## 5. Literaturverzeichnis

**Akai, M., Onai, K., Morishita, M., Mino, H., Shijuku, T., Maruyama, H., Arai, F., Itoh, S., Hazama, A., Checchetto, V., Szabò, I., Yukutake, Y., Suematsu, M., Yasui, M., Ishiura, M., Uozumi, N. (2012)** Aquaporin AqpZ is involved in cell volume regulation and sensitivity to osmotic stress in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 194:6828-6836

**Becker, M., Börngen, K., Nomura, T., Battle, A.R., Marin, K., Martinac, B., Krämer, R. (2013)** Glutamate efflux mediated by *Corynebacterium glutamicum* MscCG, *Escherichia coli* MscS, and their derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* 1828:1230-1240

**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

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

**Bi, W., Stambrook, P. J. (1998)** Site-directed mutagenesis by combined chain reaction. *Anal. Biochem.* 256:137-140.

**Bisswanger, H. (2008)** Enzyme Kinetics Principles and Methods. 2nd Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

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

**Booth, I. R. und Paul Blount (2012):** The MscS and MscL Families of Mechanosensitive Channels Act as Microbial Emergency Release Valves. *J Bacteriol.* 194:4802-4809

**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

**Bremer, E., Krämer, R. (2000)** Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes. In: Storz G., Henнге-Aronis R. (eds) *Bacterial stress responses*. ASM Press, Washington pp 79-97.

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

**Brühl, N. (2010):** Aktivitätsregulation von GgpS-, GgaS- und TPS-Proteinen aus Cyanobakterien und heterotrophen Bakterien. Bachelorarbeit

**Cavalier-Smith, T. (1995)** Zooflagellate phylogeny and classification. *Tsitologia* 11: 1010–1029.

**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

**Desplats, P., Folco, E., Salerno, G.L. (2005)** Sucrose may play an additional role to that of an osmolyte in *Synechocystis* sp. PCC 6803 salt-shocked cells. *Plant Physiol. Bioch.* 43: 133–138.

**Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R., 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.* 15:348-357

**Dühring, U., Axmann, I., Hess, W., Wilde, A. (2006)** An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene *isiA*. *PNAS* 18: 7054-7058

**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 *ggpS* 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

**Eikmanns, B.J., Kleinertz, E., Liebl, W., Sahn, H. (1991)** A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* 102:93-98

**Giaever, H. M., Styrvold, O.B., Kaasen, I., Strøm A.R. (1988)** Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170:2841-2849

**Gibson, R.P., Lloyd, R., Charnock S. and Davies G. (2002)** Characterization of *Escherichia coli* OtsA, a trehalose-6-phosphate synthase from glycosyltransferase family 20. *Acta Cryst. D* 58:349-351

**Gibson, R.P., Tarling, C.A., Roberts, S., Withers, S.G., Davies, G.J. 2004** The donor subsite of trehalose-6-phosphate synthase: binary complexes with UDP-glucose and UDP-2-deoxy-2-fluoro-glucose at 2 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 279:1950-1955

**Geiß, U., Vinnemeier, J., Kunert, A., Lindner, I., Gemmer, B., Lorenz, M., Hagemann, M., Schoor, A. (2001)** Detection of the *isiA* Gene across Cyanobacterial Strains: Potential for Probing Iron Deficiency. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5247-5253

**Gouesbet G, Jebbar M, Talibart R, Bernard T, Blanco C (1994)** Pipcolic acid is an osmoprotectant for *Escherichia coli* taken up by the general osmoporters ProU and ProP. *Microbiology* 140:2415–2422

**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. 87: 4645-4649.

**Haardt M, Kempf B, Faatz E, Bremer E (1995)** The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-independent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. Mol Gen Genet 246:783–786

**Hagemann, M. (2011)** Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. FEMS Microbiol Rev 35:87-123

**Hagemann, M., Fulda, S., 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. 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., Schoor, A., Jeanjean, R., Zuther, E., Joset, F. (1997)** The *stpA* Gene from *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 Encodes the Glucosylglycerol-Phosphate Phosphatase Involved in Cyanobacterial Osmotic Response to Salt Shock. J. Bacteriol. 179:1727-1733

**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

**Hames, C., Halbedel, S., Schilling, O., Stulke, J. (2005)** Multiple-mutation reaction: a method for simultaneous introduction of multiple mutations into the *glpK* gene of *Mycoplasma pneumoniae*. Appl. Environ. Microbiol 71:4097-4100.

**Hincha, D.K. und Hagemann, M. (2004)** Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochem. J.* 383: 277–283.

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

**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

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

**Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, 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

**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

**Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M. (1957)** Studies on the amino acid fermentation. Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 3: 193-205

**Klähn, S., Höhne, A., Simon, E., Hagemann, M. (2010)** The gene *ssl3076* encodes a protein mediating the salt-induced expression of *ggpS* for the biosynthesis of the compatible solute glucosylglycerol in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 192:4403-4412

**Klähn, S., Steglich, C., Hess, W.R., Hagemann, M. (2010)** Glucosylglycerate: a secondary compatible solute common to marine cyanobacteria from nitrogen-poor environments. *Environ. Microbiol* 12:83-84

**Krämer, R. (2009)** Osmosensing and osmosignaling in *Corynebacterium glutamicum*. *Amino Acids* 37:487-497

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

**Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, MW., Falkenberg, P., McDougall, J., Strøm, AR (1991)** DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 5:1049-1064

**Lamark T., Røkenes T.P., McDougall J., Strøm A.R. (1996)** The complex *bet* promoters of *Escherichia coli*: regulation by oxygen (*ArcA*), choline (*BetI*), and osmotic stress. *J Bacteriol* 178: 1655–1662

**Lindner, S.N., Seibold, G.M., Henrich, A., Krämer, R., Wendisch, V.F. (2011)** Phosphotransferase system-independent glucose utilization in *corynebacterium glutamicum* by inositol permeases and glucokinases. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:3571-3581

**Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951)** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275

**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., 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 (2006), 152, 2023–2030

**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

**Möker, N. Brocker, M. Schaffer, S. Krämer, R. Morbach, S. Bott, M. (2004)** Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoregulation. Mol. Microbiol 54:420-438

**Morbach, S., Sahm, H., Eggeling, L. (1996)** L-Isoleucine Production with *Corynebacterium glutamicum*: Further Flux Increase and Limitation of Export. Appl. Environ. Microbiol. 62(12):4345-4351

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



**Novak, J., Stirnberg, M., Roenneke, B., Marin, K. (2010)** A Novel Mechanism of Osmosensing, a Salt-dependent Protein-Nucleic Acid Interaction in the Cyanobacterium *Synechocystis* Species PCC 6803. JBC 286:3235–3241

**Novak, J. (2010)** Regulation der Glukosylglycerol-Phosphat-Synthase aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Dissertation

**Ochrombel, I., Becker, M., Krämer, R., Marin, K. (2011)** Osmotic stress response in *C. glutamicum*: impact of channel- and transporter-mediated potassium accumulation. Arch. Microbiol. 193:787-796

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

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

**Partensky, F., Hess, W. R., and Vaultot, D. (1999)** *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. Microbiol Mol Biol Rev 63: 106–127.

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

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

**Potts, M. (2004)** Desiccation tolerance of prokaryotes. Microbiol. Rev. 58:755-805

**Radmacher, E., Vaitsikova, A., Burger, U., Krumbach, K., Sahm, H., Eggeling, L. (2002)** Linking central metabolism with increased pathway flux: L-valine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2246-2250

**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. 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

**Reed, R. H., Richardson, D. L., Warr, S. R. C., Stewart W. D. P. (1984)** Carbohydrate accumulation and osmotic stress in cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol* 130:1-4

**Reed, R. H., War, S. R. C., Richardson, D. L., Moore, D., J., Stewart, W. D. P. (1985)** Multiphasic osmotic adjustment in a euryhaline cyanobacterium. *FEMS Microbiol. Letters* 28:225-229

**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

**Rübenhagen, R., Rönsch, H., Jung, H., Krämer, R., Morbach, S. (2000)** Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* 275:735-741

**Sahm, H., Eggeling, L. (1999)** D-Pantothenate Synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and use of panBC and Genes Encoding L-Valine Synthesis for D-Pantothenate Overproduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1973-1979

**Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989)** *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbour Laboratory Press

**Scanlan, D. J., Ostrowski, M., Mazard, S., Dufresne, A., Garczarek, L., Hess, W. R., (2009)** Ecological genomics of marine picocyanobacteria. *Micobiol Mol Biol Rev* 73: 449–499.

**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., Hagemann, M., Erdmann, N. (1999)** Glucosylglycerolphosphate synthase: target for ion-mediated regulation of osmolyte synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Arch Microbiol (1999) 171 : 101–106

**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., Blount, P., Martinac, B. and Kung, C. (1997)** Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities. Annu Rev Physiol. 59:633-57.

**Vitoc, C.I., Mukerji, I. (2011)** HU binding to a DNA four-way junction probed by Förster resonance energy transfer. Biochemistry 50: 1432-1441

**Wolf, A., Krämer, R., Morbach, S. (2003)** Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and their significance in response to osmotic stress. Molecular Biology 49: 1119-1134

#### **Intenetseiten und Datenbanken:**

**Cyanobase:** <http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>

**Pubmed:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

**ExPASy** Proteomics Server: <http://www.expasy.ch/>

**SMART:** <http://smart.embl-heidelberg.de/>

**ClustalW2:** <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

**Ncbi Blast:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/blink.cgi?mode=query>

## Anhang

### A.1: In dieser Dissertation verwendete DNA und Proteinstandards

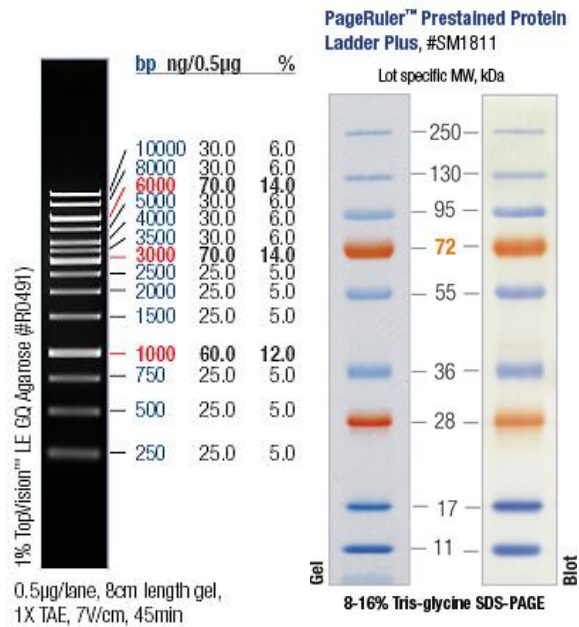
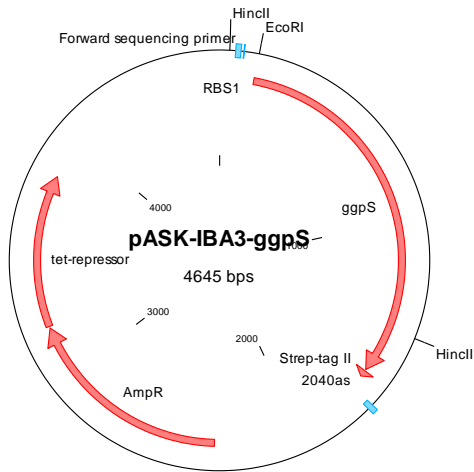
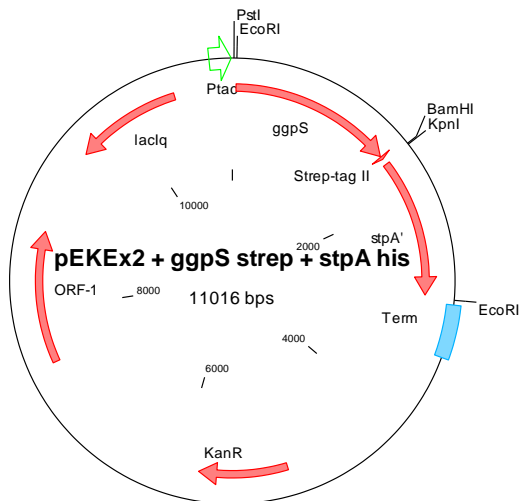


Abb. 52: Standards die in der Agarosegelelektrophorese und SDS PAGE verwendet wurden. Links: Fermentas 1 kb DNA Ladder. Rechts: Fermentas PageRuler Prestained Protein Ladder Plus

**A.2: Ausgewählte Vektorkarten von häufig verwendeten Vektoren**



**Abb. 53: Expressionsvektor pASK IBA-3 *ggpS-strep***



**Abb. 54: Expressionsvektor pEKEx2 + *ggpS-strep* und *stpA(ggpP)-his***

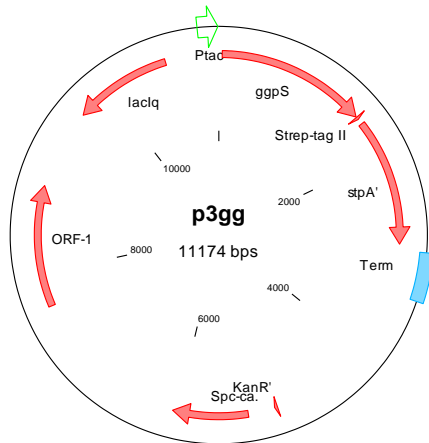


Abb. 55: Expressionsvektor pEKEx3 *ggpS-strep* und *stpA(ggpP)-his*

**A.3: Lichtstreuungsmessung zur Erfassung der optimalen Wellenlänge für die Aufnahme der Bindungskinetik**

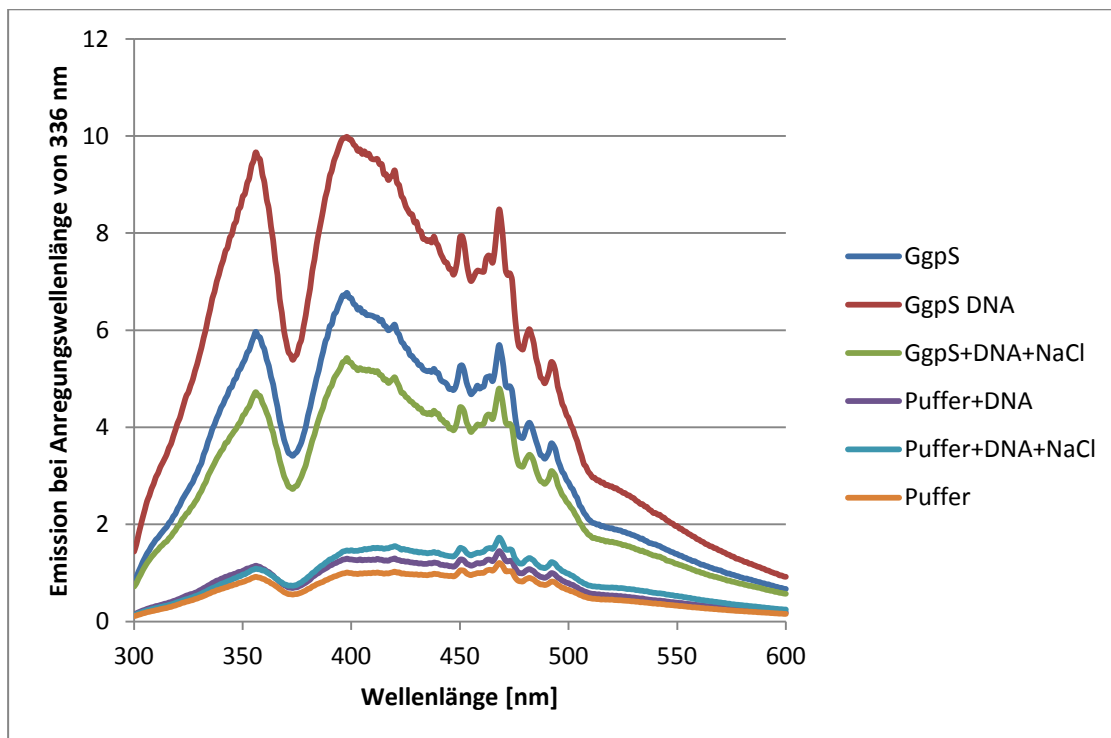
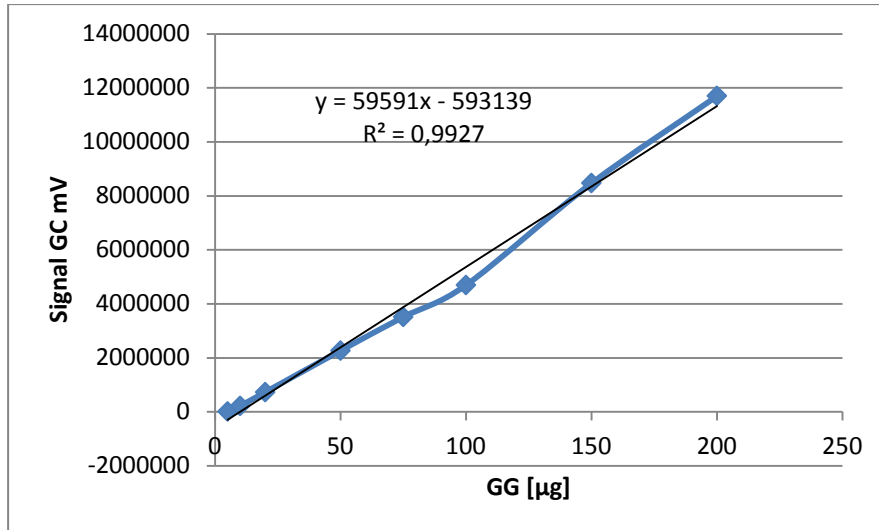


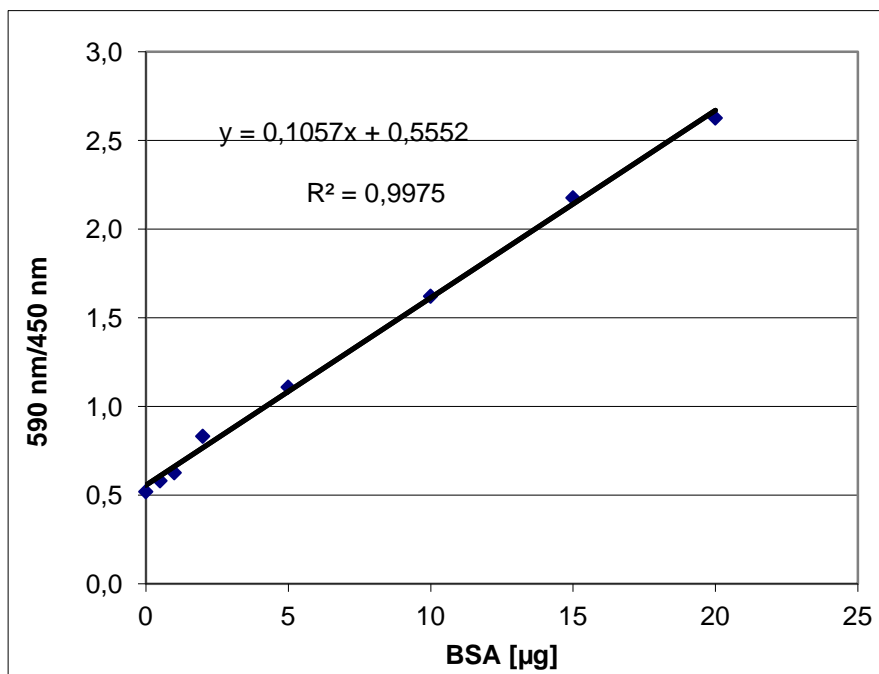
Abb. 56: Messung der Emmissionsspektren bei einer Anregung bei 336 nm.

## A.4: Kalibrierungen einzelner Messmethoden

### A.4.1: Kalibrierung des gaschromatographischen GG Nachweises



### A.4.2: Kalibrierung der Proteinbestimmung nach Bradford



### A.4.3: Kalibrierung der Volumina zur Molekulargewichtsbestimmung während der Gelfiltration auf der Säule Superdex200

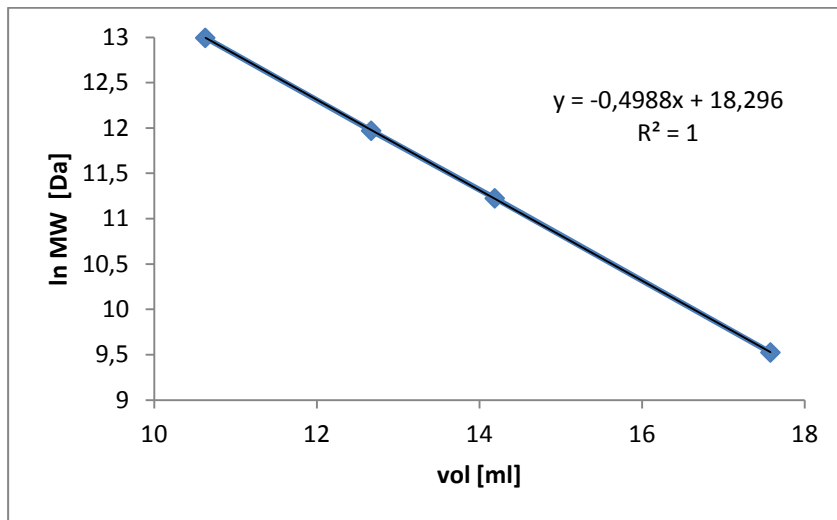


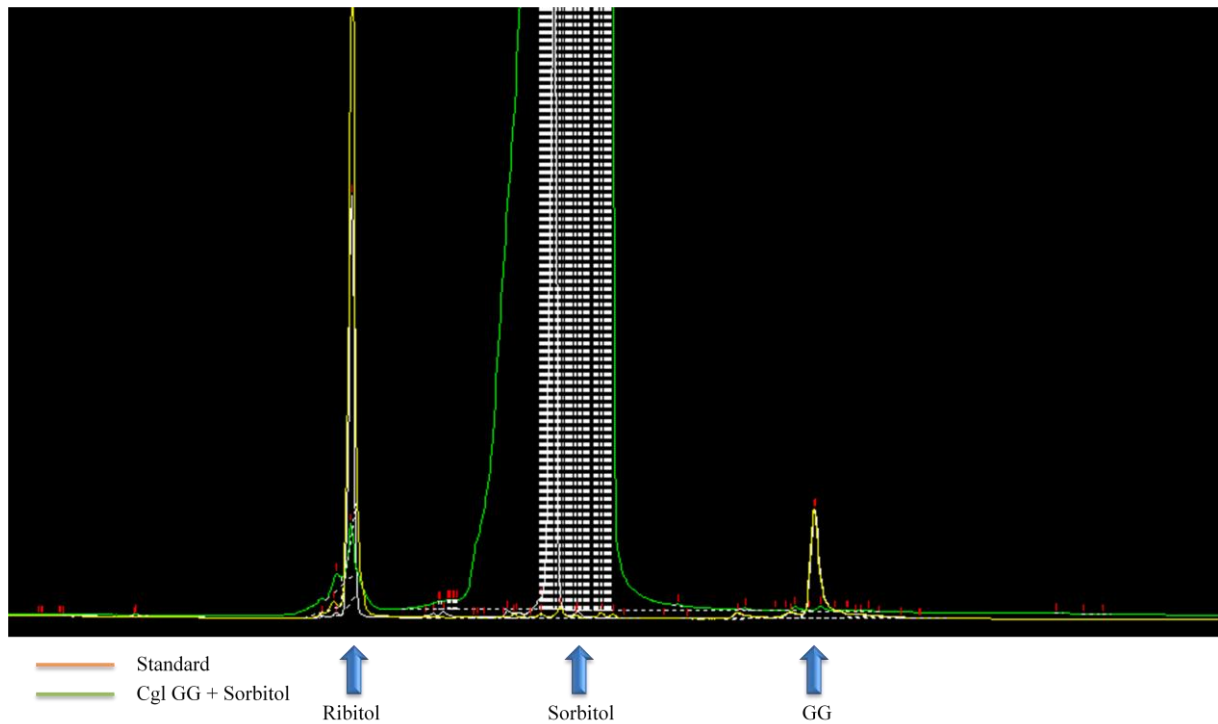
Abb. 57: Kalibriergerade für die Bestimmung der Molekulargewichte der Gelfiltrationen

Tab. 9: Zuordnung der einzelnen Elutionsvolumina zu den Molekulargewichten der einzelnen getesteten Proteinen

	MW Da	ln MW	Volume ml
Ferritin	440000	12,99453	10,63
Aldolase	158000	11,9703503	12,67
Conalbumin	75000	11,2252434	14,19
RNAseA	13700	9,52515111	17,58



**A.5: Darstellung der technischen Problematik bei der Analyse von Cgl GG Zellen, die mit Sorbitol inkubiert wurden.**



**Abb. 58: Chromatogramm der GC Messung von Cgl GG mit zugesetztem Sorbitol. Das Signal von Sorbitol konnte nicht mehr vollständig angezeigt werden. Durch die hohe Sorbitolmenge könnten Probleme bei der Derivatisierung der Substanzen GG und des internen Standards Ribitol aufgetreten sein.**

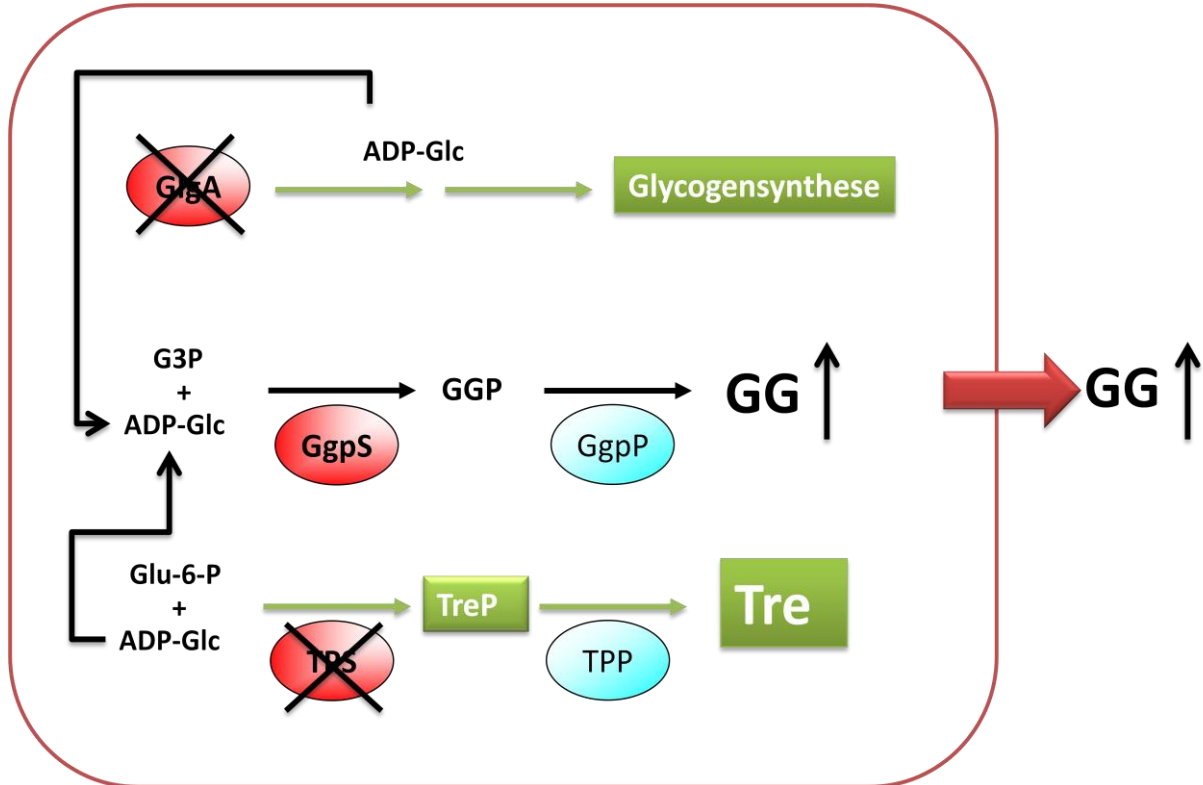
A.6: Optimierung der ADP-Glukose Verfügbarkeit in *C. glutamicum* GG

Abb. 59: Darstellung der Optimierung der ADP-Glukose Verfügbarkeit in *Corynebacterium glutamicum* GG. GG=Glukosylglycerol, Tre=Trehalose Glu-6-P=Glukose-6-Phosphat, ADP-Glc=ADP-Glukose, G3P=Glycerol-3-Phosphat

### Danksagungen

Ich bedanke mich herzlichst bei Herrn Prof. Reinhard Krämer für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Ebenfalls möchte ich mich für die vielen hilfreichen und interessanten Diskussionen bedanken.

Herrn Prof. Flügge danke ich für die Übernahme des 2. Gutachters. Bei Frau Prof. Schnetz möchte ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Ich danke Kay Marin für die Betreuung in der ersten Hälfte meiner Arbeit und über die gute Einführung in das Thema.

Jens Novak möchte ich für die Einarbeitung in die praktischen Arbeiten des Themas und auch für die vielen Diskussionen und Ratschläge danken.

Ich danke Jan Gebauer und Prof. U. Baumann für die gute Zusammenarbeit im Bereich der Kristallisation der GgpS.

Ich danke meinen Kollegen Natalie Brühl, Stephanie Huhn, Anna Bartsch und Andreas Uhde aus dem Labor 394 für eine schöne Arbeitsatmosphäre.

Ich danke meinen Kollegen Markus Becker, Michael Becker und Stanislaw Maksimov aus der „Osmogruppe“ für viele interessante Gespräche und Labormeetings.

Meinen Praktikanten Julia Eckhoff, Anna Thonet, Christopher Stoffels und Dimitar Petrov danke ich für die tolle Mitarbeit am Thema.

Ich danke unseren technischen Assistentinnen Anja Wittmann, Ute Meyer und Eva Glees für das gute Zuarbeiten im Labor.

Gabriele Sitek möchte ich ebenfalls danken, die immer für einen ausreichenden Vorrat an Agarplatten und Nährmedien sorgte.

Ich möchte allen Mitarbeitern der AG Krämer für die gute Zusammenarbeit danken.

Ich danke meinen Eltern Sigrid und Michael Roenneke für die Unterstützung während meiner Arbeit und auch für ihre Unterstützung über mein gesamtes Studium hinweg.

## 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 der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Reinhard Krämer betreut worden.

Köln den 02.12.2013

Benjamin Roenneke