

# **Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Glycine Cleavage System in Cyanobakterien und Pflanzen**



zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Maria Wittmiß, geb. am 17.03.1989 in Berlin

aus Berlin

Rostock, den 17. Juni 2019

**Gutachter:**

Prof. Dr. Hermann Bauwe, Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften

Prof. Dr. Hans-Peter Braun, Leibniz Universität Hannover, Institut für Pflanzengenetik

**Jahr der Einreichung:** 2019

**Jahr der Verteidigung:** 2019

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1. Das Glycine Cleavage System.....	3
2.1.1. Das Glycine Cleavage System in Pflanzen .....	8
2.1.2. Das Glycine Cleavage System in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 .....	8
2.1.3. Das Glycine Cleavage System im Menschen.....	9
2.2. Die Komplexbildung des Glycine Cleavage System.....	10
2.2.1. Physische Interaktion der GCS-Proteine aus Erbsen-Mitochondrien .....	10
2.2.2. Sub-Komplexe der einzelnen GCS-Untereinheiten .....	12
2.3. Zielstellung .....	13
3. Materialien und Methoden.....	14
3.1. Materialien.....	14
3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	14
3.1.2. DNA- und Proteinstandards .....	14
3.1.3. Antikörper .....	14
3.1.4. Oligonukleotide.....	15
3.1.5. Apparaturen, Geräte und Zubehör.....	15
3.1.6. Kulturmedien für <i>Escherichia coli</i> .....	16
3.1.7. Bakterienstämme .....	17
3.1.8. Cyanobakterien und Anzucht .....	17
3.1.9. Pflanzenmaterial und Anzucht .....	17
3.1.10. Programme und Software.....	17
3.2. Methoden.....	17
3.2.1. Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> , PCR) .....	17
3.2.2. Agarose-Gelelektrophorese .....	18
3.2.3. Agarose-Gelelution .....	18
3.2.4. Sequenzierung .....	18
3.2.5. Ligation .....	18
3.2.6. Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	18
3.2.7. Plasmid-Isolation.....	19
3.2.8. Restriktion .....	19
3.2.9. Proteinquantifizierung.....	19
3.2.10. Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	20
3.2.11. Western Blot.....	21

3.2.12.	Aufreinigung spezifischer Antikörper .....	21
3.2.13.	Reinigung der rekombinanten Proteine aus <i>E. coli</i> .....	22
3.2.14.	Größenausschlusschromatographie .....	23
3.2.15.	Filtration durch einen 300 kDa <i>cut-off</i> Filter .....	24
3.2.16.	Pulldown-Experimente .....	25
3.2.17.	Isolation von pflanzlichen Mitochondrien .....	25
3.2.18.	H-Protein Aktivität .....	26
3.2.19.	T-Protein Aktivität .....	26
3.2.20.	L-Protein Aktivität .....	27
3.2.21.	P-Protein Aktivität .....	27
3.2.22.	GCS-Gesamtaktivität .....	28
3.2.23.	Berechnung der Enzymaktivität .....	28
3.2.24.	Quantitative Proteomanalyse .....	29
3.2.25.	Analyse des <i>Synechocystis</i> Gesamtproteoms .....	31
3.2.26.	Analytische Ultrazentrifugation .....	31
3.2.27.	Elektronenmikroskopische Aufnahmen mittels Negativkontrastfärbung .....	32
4.	Ergebnisse .....	33
4.1.	Analyse der rekombinanten <i>Synechocystis</i> GCS-Proteine .....	33
4.1.1.	Das P-Protein .....	33
4.1.2.	Das L-Protein .....	35
4.1.3.	Das H-Protein .....	36
4.1.4.	Das T-Protein .....	39
4.1.5.	Simultane Expression aller GCS-Proteine in <i>E. coli</i> mittels DUET-Vektoren ..	43
4.1.6.	Analytische Ultrazentrifugation der <i>Synechocystis</i> GCS-Proteine .....	46
4.2.	Komplexbildung .....	48
4.2.1.	Filtration der GCS-Proteine durch einen 300 kDa <i>cut-off</i> Filter .....	48
4.2.2.	Stöchiometrie der <i>Synechocystis</i> GCS-Proteine <i>in vitro</i> .....	54
4.2.3.	Interaktionsstudien durch SEC .....	54
4.2.4.	Die Gesamtaktivität des GCS aus <i>Synechocystis</i> .....	57
4.2.5.	<i>In vitro</i> Interaktionen der GCS-Proteine .....	58
4.2.6.	Proteinstrukturvisualisierung mittels TEM und Negativkontrastfärbung .....	62
4.3.	Der Glycindecaboxylase-Komplex aus <i>Pisum sativum</i> .....	65
4.4.	Stöchiometrie der GCS-Proteine aus <i>P. sativum</i> und <i>A. thaliana</i> .....	69
4.4.1.	Klonierung und Expression des QconCAT-Proteins .....	69
4.4.2.	Proteomanalyse mittels markierungsfreier Hi3-Methode .....	70
4.4.3.	Eignung des QconCAT-Peptids und die Reinheit des Mitochondrienextraktes ..	72

4.4.4.	Stöchiometrie der GCS-Proteine in höheren Pflanzen .....	73
4.4.5.	Untersuchung der Gesamtmenge an GCS-Proteinen in <i>Synechocystis</i> .....	76
5.	Diskussion.....	78
5.1.	Das cyanobakterielle Glycine Cleavage System .....	78
5.2.	Die Stöchiometrie des pflanzlichen GCS .....	89
5.3.	Die Aktivität des GDC in Abhängigkeit der Proteinkonzentration .....	92
6.	Literatur.....	97
7.	Anhang.....	IV
7.1.	Klonierungsnachweise.....	IV
7.2.	Die Sauerstoffsensitivität des Tetrahydrofolates .....	VI
7.3.	Synthetisierte Nukleotidsequenz des QconCAT-Peptids .....	VII
7.4.	Eichgeraden der SEC-Analysen .....	VIII
7.5.	Liste der mittels Pulldown-Experiment und MS-Analysen detektierten Interaktionspartner.....	IX
7.6.	Vollständige Alignments .....	XII
7.7.	Liste der detektierten Proteine zur Kontrolle des Reinheitsgrades der analysierten Mitochondrienfraktionen .....	XIV
7.8.	Vergleich verschiedener Fraktionen des Mitochondrienextraktes .....	XVI
7.9.	Liste der detektierten QconCAT-Peptide .....	XVII
7.10.	Ermittlung des prozentualen Anteils an GCS-Proteinen in <i>Synechocystis</i> .....	XVIII
7.11.	Übersicht über alle ermittelten Proteine zur Analyse des prozentualen Anteils der GCS-Proteine in <i>Synechocystis</i> .....	XVIII
7.12.	Sequenzen .....	XVIII
7.13.	Abbildungsverzeichnis.....	XIX
7.14.	Tabellenverzeichnis .....	XXII
7.15.	Abkürzungsverzeichnis.....	XXIV
7.16.	Lebenslauf.....	XXVI

## 1. Zusammenfassung

Das Glycine Cleavage System (GCS) ist ein für alle Eukaryoten essentielles Multienzymsystem. In Mitochondrien pflanzlicher Mesophyllzellen stellt es bis zu 30 % der löslichen Matrixproteine dar, liegt jedoch in autotrophen Prokaryoten und in heterotrophem Pflanzengewebe in sehr viel geringerer Konzentration vor. Das GCS besteht aus insgesamt vier Proteinen, die kurz als P-, L-, T- und H-Protein bezeichnet werden. Mit Ausnahme des H-Proteins sind alle enzymatisch aktiv. Das GCS katalysiert in Kooperation mit der Serin-Hydroxymethyltransferase die reversible Umwandlung von zwei Molekülen Glycin zu einem Molekül Serin und ist somit Teil der Photorespiration in Pflanzen und Cyanobakterien sowie des C1-Metabolismus in allen Organismen. Die hohe Proteinkonzentration in pflanzlichen Blattmitochondrien ermöglicht eine Komplexbildung der einzelnen Proteine des GCS zum sogenannten Glycinecarboxylase-Komplex (GDC), die wiederum die Enzymaktivität beeinflusst. Der GDC ist *in vitro* instabil, so dass es bis heute nicht gelungen ist einen stabilen Komplex zu isolieren und zu analysieren. Bisherige Untersuchungen verweisen auf eine mögliche Stöchiometrie von  $2P_2:1L_2:9T:27H$  (L- und P-Protein liegen als Dimere vor, T- und H-Protein als Monomere). Die Komplexbildung scheint eine Besonderheit des GCS der Mitochondrien in photosynthetisierenden Pflanzenzellen zu sein und wurde in heterotrophem Pflanzengewebe und in anderen Organismen bisher nicht nachgewiesen. Deshalb stellt sich die Frage nach der funktionellen Bedeutung der strukturellen Assoziation der vier GCS-Proteine in Blattmitochondrien.

Die Klärung dieser Frage wurde auf zwei Ebenen versucht. Zum einen wurden die homologen, rekombinanten GCS-Proteine des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 und zum anderen der Stromaextrakt aus Blattmitochondrien untersucht. Mittels verschiedener Methoden wie Ultrafiltration und Größenausschlusschromatographie wurde nachgewiesen, dass aus rekombinanten GCS Proteinen des Cyanobakteriums *Synechocystis* ein enzymatisch aktiver Komplex rekonstruiert werden konnte. Dessen Stöchiometrie wurde anhand der aufgetrennten Proteinuntereinheiten abgeschätzt und beträgt ca.  $2L_2:6T:1P_2:52H$ . Quantitative Proteomanalysen ermöglichten eine präzise Untersuchung der Stöchiometrie des GCS in verschiedenen höheren Pflanzen. Unsere Untersuchungen ergaben für Pflanzen eine nahezu übereinstimmende Stöchiometrie von  $1L_2:8T:4P_2:20H$  (*Arabidopsis thaliana*) bzw.  $1L_2:8T:4P_2:28H$  (*Pisum sativum*). Damit ist der P-Protein-Anteil im GCS zweimal höher als in früheren Arbeiten angenommen und die Menge an H-Protein variiert ebenfalls. Daraus ergibt sich eine Größe des GDC aus Pflanzen von 1,5 bzw. 1,6 MDa. Diese entspricht nahezu

der Größe des *in vitro* bei hoher Proteinkonzentration rekonstruierten *Synechocystis*-GDC mit ca. 1,3 MDa, trotz der unterschiedlichen Stöchiometrie

Die mittels Ultrafiltration konzentrierten GCS-Proteine aus *Pisum sativum* zeigen eine geringere Glycin-abhängige Enzymaktivität als der ungefilterte Matrixextrakt aus Mitochondrien, was möglicherweise auf die Entfernung eines niedermolekularen Faktors zurückzuführen ist. Weiterhin ist die spezifische Enzymaktivität dieser Proteine bei Proteinkonzentrationen oberhalb  $0,05 \text{ mg ml}^{-1}$ , wo das Vorliegen eines GDC angenommen wird, nahezu konstant, steigt aber unterhalb  $0,05 \text{ mg ml}^{-1}$  deutlich an. Dieses Ergebnis deutet an, dass, im Gegensatz zur vorherrschenden Meinung, Komplexbildung bei hohen GCS-Konzentrationen nicht zu einer höheren Enzymaktivität des GCS führt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich trotz leicht unterschiedlicher Stöchiometrie die rekombinanten *Synechocystis* Proteine grundsätzlich als Modell für Struktur-Funktions-Analysen des GCS eignen. Bei hohen Konzentrationen bilden sie wie die pflanzlichen Matrixproteine einen wenn auch instabilen Komplex. Mit diesem methodischen Fortschritt können die rekombinanten cyanobakteriellen GCS-Proteine als Modell für zukünftige Struktur-Funktions-Analysen des pflanzlichen GCS-Multienzymsystems eingesetzt werden.

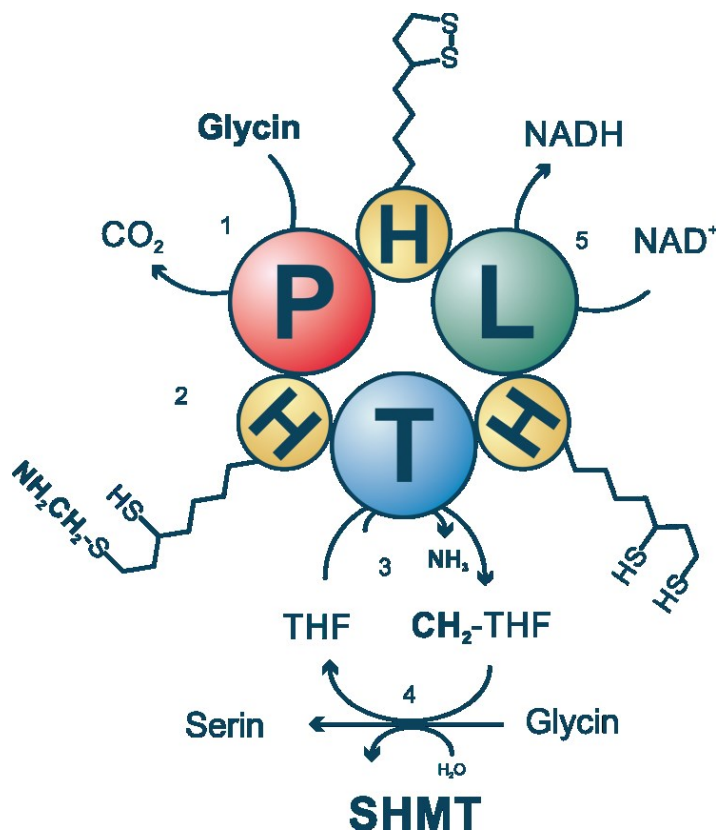
## 2. Einleitung

### 2.1. Das Glycine Cleavage System

Sagers und Gunsalus (1961) waren die Ersten, die einen Tetrahydrofolat- und Pyridoxal-5-Phosphat-abhängige Abbau von Glycin beschrieben. Ihre Untersuchungen am anaeroben Bakterium *Diplococcus glycinophilus* zeigten die Bildung von CO<sub>2</sub> und Ammonium, wenn dem Wachstumsmedium Glycin zugegeben wurde. Die dafür notwendigen Proteine wurden seither vielfach untersucht und gemeinsam als Glycine Cleavage System (GCS) beschrieben. Es handelt sich dabei um ein für Eukaryoten und viele Prokaryoten essentielles Multienzymsystem (Engel et al. 2007; Kikuchi et al. 2008). In der Literatur sind nur wenige Organismen beschrieben, in denen nicht alle Teilreaktionen des GCS erforderlich sind: das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Hagemann et al. 2005), das Proteobakterium *Sphingobium* sp. strain SYK-6 (Harada et al. 2017) sowie die einzelligen Parasiten *Plasmodium berghei* (Varadarajan et al. 2014) und *Trichomonas vaginalis* (Nývtlová et al. 2016).

Die vier Proteine des GCS sind in Eukaryoten kerncodiert (Day et al. 1985), werden im Zytosol synthetisiert (Walker und Oliver 1986b) und anschließend in das Mitochondrium importiert (Bourguignon et al. 1992; Bourguignon et al. 1993; Kim und Oliver 1990; Turner et al. 1992). Bei der oxidativen Decarboxylierung von Glycin werden unter Verwendung des Cofaktors Tetrahydrofolat (THF) die Produkte Methylentetrahydrofolat (CH<sub>2</sub>-THF), CO<sub>2</sub>, und NH<sub>3</sub> gebildet. Darüber hinaus wird unter Verbrauch von NAD<sup>+</sup> der für die Oxidation des Glycins benötigte Dithiolan-Ring proteingebundener Liponsäure regeneriert (siehe Abbildung 1). Die Gesamtreaktion ist prinzipiell reversibel und die beteiligten Proteine lose mit der mitochondrialen Matrix assoziiert (Motokawa und Kikuchi 1971). Zusammen mit der Reaktion der Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT) und eines weiteren Glycin-Moleküls entsteht in der oxidativen Richtung Serin.



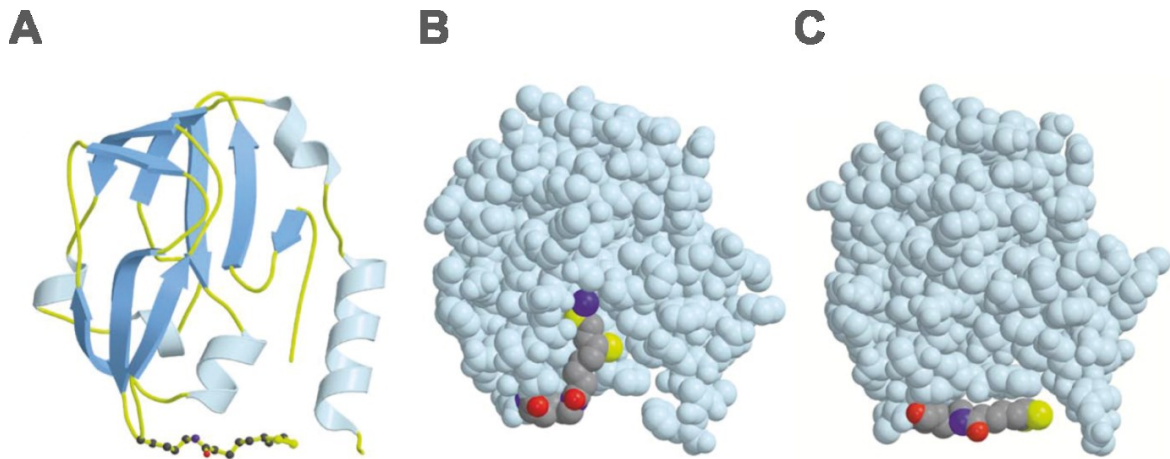


**Abbildung 1: Reaktionszyklus der Oxidation von Glycin durch das GCS und die Bildung von Serin in Zusammenhang mit der SHMT.**

Die Reaktionen des GCS und der SHMT wandeln zwei Moleküle Glycin in ein Molekül Serin um. Dabei werden CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub> freigesetzt sowie NAD<sup>+</sup> zu NADH reduziert. P: P-Protein; H: H-Protein; T: T-Protein; L: L-Protein; SHMT: Serin-Hydroxymethyltransferase, THF: Tetrahydrofolat, CH<sub>2</sub>-THF: Methylentetrahydrofolat. Die Erläuterung der einzelnen Schritte und Nummerierungen sind im Text erklärt (#).

Die größte Untereinheit des GCS und das Eingangsenzym der oxidativen Decarboxylierung von Glycin ist das P-Protein (Dimer, ca. 210 kDa; EC 1.4.4.2). Dieses Protein gehört zu der Gruppe der Oxidoreduktasen und verwendet neben Glycin auch lipoyliertes H-Protein als Substrat. Dabei bildet der Cofaktor Pyridoxal-5-Phosphat (PLP) mit Glycin eine Verbindung über eine Schiff'sche Base wobei die  $\alpha$ -Carboxylgruppe als CO<sub>2</sub> freigesetzt wird (Abbildung 1 (#1)) (Pares et al. 1994). Die verbleibende Aminomethylengruppe wird als Reaktionsintermediat auf oxidierte Liponsäure übertragen, die als prosthetische Gruppe des H-Proteins fungiert (#2). Das P-Protein selbst liegt bei Eukaryoten und einer Reihe von Prokaryoten als  $\alpha_2$  Homodimer (siehe Abbildung 3A) vor (*Flaveria pringlei* Bauwe et al. 1995; *Synechocystis* sp. PCC 6803 (hiernach *Synechocystis*) Hasse et al. 2010; *Escherichia coli* Okamura-Ikeda et al. 1993; *Pisum sativum* Turner et al. 1992). In *Synechocystis* konnte die Regulation des P-Proteins bereits detailliert beschrieben werden. Dort bildet der hochkonservierte Cysteinrest Cys<sup>972</sup> des C-Terminus eine Disulfidbrücke mit dem ebenfalls

konservierten Cys<sup>353</sup> und verschließt so das aktive Zentrum unter oxidierenden Bindungen. Unter reduzierenden Bedingungen wird diese Disulfidbrücke getrennt. Das aktive Zentrum liegt frei und nach der Bindung von PLP kann Glycin decarboxyliert werden (Hasse et al. 2013). Das ca. 14 bis 18 kDa große H-Protein (Abbildung 2 und 3B) kann als Mono- und Dimer vorliegen (Oliver 1994). An das Apoprotein wird im Mitochondrium (Fujiwara et al. 1990)  $\alpha$ -Liponsäure an den konservierten Lys<sup>63</sup>- (*P. sativum*, MacHerel et al. 1990) bzw. Lys<sup>59</sup>-Rest (Huhn, Fujiwara et al. 1986) als prosthetische Gruppe gebunden, sodass ein funktionsfähiges Holoprotein entsteht. Diese C<sub>8</sub>-Fettsäure wird mittels einer Amidbindung mit dem Protein verknüpft. Dafür wird zunächst mittels Lipoat-Protein Ligase oder Octanoyltransferase ein Lipoyl- bzw. Octanoylrest auf das H-Apoprotein übertragen. Im Fall der Octanoylübertragung werden dann zwei Schwefelatome mittels Lipoylsynthase eingefügt (Ewald et al. 2014). Diese Disulfidbindung ist anschließend in der Lage Reaktionsintermediate des GCS zu binden und zwischen den einzelnen Enzymen weiter zu geben (Oliver 1994). Im reduzierten und oxidierten Zustand (Abbildung 2A und C) ist der Liponsäurerest frei beweglich (Cohen-Addad et al. 1997). Nach der Decarboxylierung von Glycin durch das P-Protein wird die verbliebene Aminomethylengruppe an das distale Schwefelatom gebunden (Abbildung 1 (#2)). Das aminomethylierte H-Protein kann mittels Ionenaustauschchromatographie von den weiteren H-Protein-Varianten getrennt werden (Neuburger et al. 1991). Die Aminomethylierung des H-Proteins führt zu einer Konformationsänderung, in deren Folge der Liponsäurerest durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen in das Protein eingelagert wird (Ser<sup>12</sup>, Asp<sup>67</sup>, Glu<sup>14</sup>, Ile<sup>27</sup>, Ala<sup>31</sup>, Leu<sup>35</sup> und Ala/Thr<sup>64</sup>, siehe Abbildung 2B). Dadurch wird eine spontane Freisetzung von NH<sub>3</sub> verhindert (Cohen-Addad et al. 1995; Nakai et al. 2003; Pares et al. 1995). Diese Verbindung wird erst während des nächsten Reaktionsschrittes durch die Interaktion des H-Proteins mit dem T-Protein gelöst, wodurch der Liponsäurerest mit dem gebundenen Aminomethylenrest an die Oberfläche des H-Proteins verlagert und für das T-Protein zugänglich wird (Fujiwara et al. 1984; Guilhaudis et al. 2000).



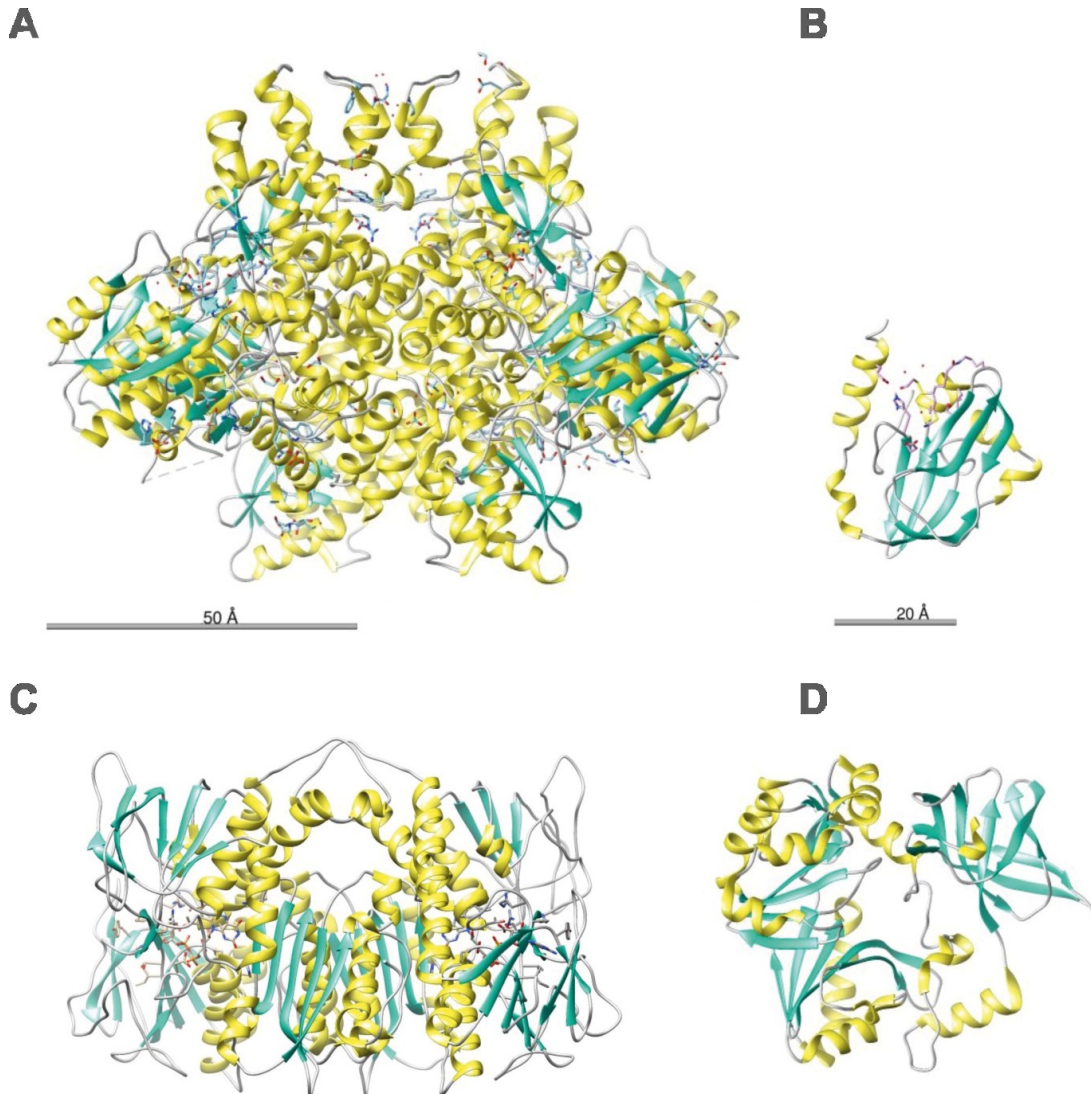
**Abbildung 2: Strukturen der verschiedenen Formen des H-Proteins.**

**A:** Oxidierte Form ( $H_{ox}$ ), **B:** Aminomethylierte Form ( $H_{met}$ ), **C:** Reduzierte Form ( $H_{red}$ ) (Cohen-Addad et al. 1995; Abbildung modifiziert nach Douce et al. 2001). Die Bindung der Aminomethylen-Gruppe an die Prosthetische Gruppe führt durch Strukturänderungen des H-Proteins zur Einlagerung des modifizierten Liponsäurerestes.

Das T-Protein (EC 2.1.2.10) ist eine ca. 40 kDa große Aminomethyltransferase mit nicht-kovalent gebundenem THF als Cofaktor (Bourguignon et al. 1993, Abbildung 3D). Durch THF ist das T-Protein mit der SHMT-Reaktion gekoppelt und die Metabolisierung von Glycin zu Serin ist möglich. Nach der Aminomethylierung des H-Proteins durch das P-Protein wird der Methylenrest ( $CH_2$ ) vom H-Protein mittels des T-Proteins auf THF übertragen und Ammonium freigesetzt (Abbildung 1 (#3)). Die Thiolgruppe des lipoylierten H-Proteins wird dadurch reduziert. Das entstandene  $CH_2$ -THF wird von der SHMT genutzt, um die aktive Methylengruppe auf ein weiteres Glycin-Molekül zu übertragen, wodurch Serin entsteht (Abbildung 1 (#4)). Die Bindung des Sauerstoff-sensitiven THF an das T-Protein oder die SHMT verhindert dessen Oxidation (Rebeille et al. 1994; Reed und Archer 1980). Das H-Protein ist während der Reaktion sowohl Substrat als auch Reaktionspartner des T-Proteins. Zusätzlich dazu stabilisiert die physische Interaktion das T-Protein, da es in Abwesenheit des H-Proteins *in vitro* zur Aggregation neigt (Guilhaudis et al. 2000).

Das L-Protein (EC 1.8.1.4) ist das dritte Enzym des GCS und gleichzeitig die E3-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH), der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase und der Branched-chain  $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase (Bourguignon et al. 1992; 1996). Daraus resultiert eine essentielle Funktion des L-Proteins für den gesamten Stoffwechsel. Das Protein liegt als ca. 100 kDa Homodimer (Abbildung 3C) vor, mit nicht-kovalent gebundenem Flavinadenindinukleotid (FAD) als Cofaktor. Innerhalb des GCS schließt es den katalytischen Zyklus der oxidativen Decarboxylierung von Glycin, indem es die Thiolgruppe des

lipoylierten H-Proteins unter Bildung von  $\text{FADH}_2$  reoxidiert (Abbildung 1 (#5)). Der an  $\text{FADH}_2$  gebundene Wasserstoff führt im Anschluss zur Reduktion von  $\text{NAD}^+$ .



**Abbildung 3: Übersicht der verfügbaren Kristallstrukturen der einzelnen GCS-Proteine.**

**A:** P-Protein aus *Synechocystis* - pdb 4LHC (Hasse et al. 2013); **B:** H-Protein aus *Pisum sativum* – pdb 1HTP (Cohen-Addad et al. 1995); **C:** L-Protein aus *Pisum sativum* - pdb 1DXL (Faure et al. 2000); **D:** T-Protein aus *Escherichia coli* - pdb 1VLO (Okamura-Ikeda et al. 2010). Die Skala dient jeweils für beide angrenzenden Strukturen (50 Å: P- und L-Protein, 20 Å H- und T-Protein). Die Darstellungen der Strukturen wurden mit dem Programm Chimera erstellt.

Für *Escherichia coli* (*E. coli*) (Okamura-Ikeda et al. 1993) und *Bacillus subtilis* (Mandal et al. 2004) konnte gezeigt werden, dass drei GCS-Komponenten (P-, T- und H-Protein) polycistronisch transkribiert werden. Im Unterschied dazu liegen im Gram-positiven Bodenbakterium *Streptomyces griseus* nur das H- und T-Protein in einem Operon vor. Die Regulation der Translation erfolgt hier über einen *glycine riboswitch* in der 5'UTR der mRNA des HT-Operons und des P-Protein Gens. Dieser Mechanismus erlaubt eine verstärkte

Bildung dieser Proteine bei erhöhten Glycinmengen, um toxische Konzentrationen von Glycin in der Zelle zu vermeiden (Tezuka und Ohnishi 2014).

### **2.1.1. Das Glycine Cleavage System in Pflanzen**

Wie in allen Eukaryoten ist auch das pflanzliche GCS in Mitochondrien lokalisiert (Neuburger et al. 1986). Die löslichen mitochondrialen Matrixproteine bestehen zu ca. 30 % aus GCS-Proteinen (Oliver et al. 1990b). Diese hohe Proteinkonzentration führt zu einem Glycin zu Serin Umsatz von bis zu  $1200 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  und einer  $\text{CO}_2$ -Abgabe, die bis zu fünffach höher ist als die des Tricarbonsäurezyklus (TCA) (Douce et al. 2001).

In Pflanzen repräsentieren das GCS und die SHMT die mitochondriale Komponenten des photorespiratorischen Zyklus (zusammengefasst in Bauwe et al. 2010). Dieser Stoffwechselweg baut das für die Zelle toxische 2-Phosphoglykolat ab (2-PG) (Anderson 1971; Hall et al. 1987; Kelly und Latzko 1976), das durch die Oxygenase-Reaktion der Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) entsteht. In mehreren Reaktionsschritten, die sich über drei Kompartimente der Zelle (Chloroplasten, Peroxisomen, Mitochondrien) und das Zytosol (Bauwe et al. 2010; Timm et al. 2008) verteilen, wird aus zwei Molekülen 2-PG ein Molekül 3-Phosphoglycerat generiert und so als C3-Einheit dem Stoffwechsel wieder zur Verfügung gestellt. Die Photorespiration wurde lange Zeit als verschwenderisch bezeichnet (Wingler et al. 2000), da sowohl vorher fixiertes  $\text{CO}_2$  wieder freigesetzt als auch Reduktionsäquivalente verbraucht werden.

Dennoch rückt die Optimierung der Photorespiration in den letzten Jahren zunehmend erfolgreich in den Fokus der Pflanzenzüchtung, da sich hier ein großes Potential zur Verbesserung des Pflanzenwachstums bietet (Weber und Bauwe 2013). Neben den Ansätzen zur synthetischen Veränderung des photorespiratorischen Stoffwechsels (South et al. 2019) konnte auch gezeigt werden, dass durch die Überexpression des nativen H- bzw. L-Proteins eine erhöhte photorespiratorische Kapazität entsteht und dies einen positiven Effekt auf die Photosyntheseleistung und das pflanzliche Wachstum ausübt (López-Calcano et al. 2018; Timm et al. 2012; Timm et al. 2015).

### **2.1.2. Das Glycine Cleavage System in *Synechocystis* sp. PCC 6803**

Über das GCS aus *Synechocystis* ist aus der Literatur nur sehr wenig bekannt. Eisenhut et al. (2008) konnten zeigen, dass der photorespiratorische Abbau von 2-PG auch für Cyanobakterien essentiell ist. Das Modellcyanobakterium *Synechocystis* besitzt insgesamt drei Stoffwechselwege (Eisenhut et al. 2008), um das durch die Oxygenase-Reaktion der

RubisCO entstandene toxische 2-PG abzubauen. Es wird entweder decarboxyliert oder mittels des C2-Zyklus bzw. des Glycerat-Weges in 3-Phosphoglycerat umgewandelt. Der C2-Zyklus gleicht dabei dem photorespiratorischen Stoffwechselweg aus Pflanzen und beinhaltet ein funktionelles GCS mit allen vier Proteinen. Dieses wurde im Gegensatz zum pflanzlichen GCS als nicht essentiell beschrieben, da z. B. die Deletion des T-Proteins (Slr0171, ca. 40 kDa) keine Veränderung im Wachstum oder der Photosyntheserate der Cyanobakterien zeigte. Nur das interne Verhältnis zwischen Glycin und Serin war zum Glycin verschoben (Hagemann et al. 2005).

Einzelstudien zu den vier Proteinen des GCS aus Cyanobakterien sind ebenfalls selten. Das L-Protein (Slr1096, ca. 100 kDa) wurde auf Grund seiner gleichzeitigen Funktion innerhalb der PDH als essentiell identifiziert und als membrangebundenes Homodimer beschrieben (Engels et al. 1997; Engels und Pistorius 1997). Das cyanobakterielle L-Protein enthält wie das pflanzliche Protein FAD als Cofaktor. Die Untersuchungen des P-Proteins (Slr0293, ca. 200 kDa) erfolgten in erster Linie mittels des rekombinanten Proteins. Es wurde für *Synechocystis* als redox-reguliertes Homodimer mit PLP als Cofaktor beschrieben. Lipoyliertes H-Protein (Slr0879, ca. 14 kDa) sowie Glycin dienen auch hier als Substrate (Hasse et al. 2007; 2013). Mit Hilfe des *Synechocystis* P-Proteins gelang es erstmalig die Kristallstruktur des homodimeren Enzyms zu generieren (Abbildung 3A) (Hasse et al. 2010). Auf Grund der Funktions- und Strukturähnlichkeiten zum pflanzlichen GCS scheint das System aus *Synechocystis* ortholog zu diesem zu sein (Kern et al. 2011).

Die Organisation der GCS-Gene im Genom von *Synechocystis* ist unabhängig, d.h. sie werden nicht in einem Operon transkribiert. Darin unterscheidet *Synechocystis* sich z. B. von dem Heterocysten-bildendem Cyanobakterium *Anabaena* (oder auch *Nostoc*) sp. PCC 7120. Dort sind die Gene für das P-, T- und H-Protein in einem gemeinsamen Operon angeordnet (*all4607*, *all4608*, *all4609*).

### **2.1.3. Das Glycine Cleavage System im Menschen**

Fehlfunktionen des GCS sind im Menschen an verschiedenen Krankheitsbildern beteiligt. Für den menschlichen Stoffwechsel ist Glycin keine essentielle Aminosäure, da sie u. a. aus Serin und Threonin gebildet werden kann. Für den Katabolismus von Glycin ist das GCS jedoch essentiell. Eine Fehlfunktion des GCS führt zur Akkumulation von Glycin in Körperflüssigkeiten und -gewebe wie z. B. dem Gehirn. Daraus resultiert das Krankheitsbild der nicht-ketotischen Hyperglycinämie (NKH). Dabei handelt es sich um eine autosomal-rezessive Erbkrankheit, die bereits in den ersten Lebensstunden zu Lethargie,

Muskelhypotonie und Atemstillstand führen kann (van Hove et al. 1993). Bei ca. 30 % der Patienten führt NKH bereits in den ersten drei Tagen nach der Geburt zum Tod (Kure et al. 2006). Der Grund für die Akkumulation von Glycin sind Punktmutationen in Proteinuntereinheiten des GCS und eine daraus resultierende verringerte enzymatische Aktivität beim Glycinabbau. In ca. 80 % der Fälle ist das Gen des P-Proteins mutiert und in ca. 20 % das des T-Proteins (Kure et al. 2006). Hiraga et al. (1981) beschrieben darüber hinaus einen Fall von NKH, der durch die Fehlfunktion des H-Proteins hervorgerufen wurde.

Weiterhin scheint der GCS bei der Krebsentstehung im menschlichen Körper beteiligt zu sein. Zhang et al. (2012) zeigten zum Beispiel, dass tumor-initiiierende Zellen nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome eine erhöhte Expression des P-Proteins aufweisen. Zusammen mit dem Stammzellfaktor LIN28B ist das P-Protein für das Wachstum und die Tumorgenese der initiiierenden Zellen verantwortlich. Durch den *knock down* des P-Proteins mittels shRNA (*smallhairpin* RNA) konnte das Wachstum der initiiierenden Zellen signifikant verringert werden. Die Autoren erhoffen sich daraus einen neuen Ansatz für die Krebstherapie.

Kürzlich wurde zudem eine Studie veröffentlicht, die eine Korrelation zwischen einer Fehlfunktion des GCS und dem Auftreten von Schizophrenie zeigt (Yoshikawa et al. 2018).

## **2.2. Die Komplexbildung des Glycine Cleavage System**

Die ersten Hinweise auf die Bildung eines instabilen Komplexes der GCS-Proteine wurden von Hiraga et al. (1972) veröffentlicht. Dabei handelte es sich um GCS-Proteine aus Lebermitochondrien des Huhns. Die Autoren beschrieben, dass nach der Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) in derselben Fraktion sowohl die Synthese als auch der Abbau von Glycin sowie der Glycin-<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Austausch gemessen werden konnte. Da diese Fraktion vor der Katalase als Markerprotein (ca. 240 kDa) eluierte, wurde geschlossen, dass die GCS-Proteine aus Hühnermitochondrien als Komplex (ca. 280 kDa) vorliegen müssten. Weitere Studien zur Komplexbildung wurden später in erster Linie mit GCS-Proteinen aus Blattmitochondrien durchgeführt.

### **2.2.1. Physische Interaktion der GCS-Proteine aus Erbsen-Mitochondrien**

Eine erste Teilcharakterisierung der Komplexbildung der pflanzlichen GCS-Proteine wurde 1983 publiziert (Sarojini und Oliver). Durch die Fällung des Matrixextraktes mit Aceton gelang es den Autoren eine Fraktion mit allen GCS-Proteinen zu isolieren, die in der Lage war markiertes Glycin aus NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> und nicht-markiertem Serin zu generieren.



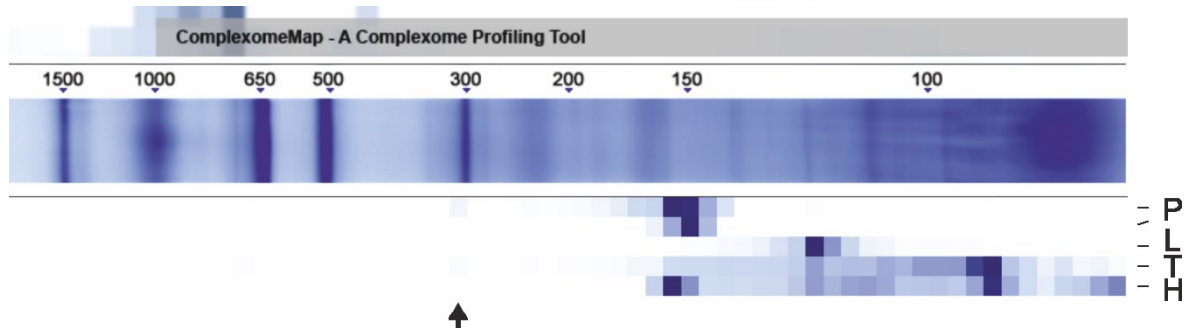
Obwohl nicht bewiesen wurde, dass die Proteine dafür in einem Komplex assoziiert waren, wurde zumindest auf eine starke Bindung des H- und P-Proteins geschlossen, da keine Stimulierung der Reaktion durch zusätzliche Liponsäure erfolgte.

Die Assoziation aller vier pflanzlichen GCS-Proteine wurde von Neuburger et al. (1986) nachgewiesen. Mit Hilfe einer XM-300 Diaflow Membran (Ausschlussgröße: 300 kDa) konnten alle vier Proteine akkumuliert werden und zeigten bei Anwesenheit von PLP und THF eine Oxidation von Glycin unter Bildung von NADH und Serin. Aus letzterem wurde, wie auch für die Reaktion in Vertebraten, eine weitere Assoziation des GCS mit der SHMT geschlussfolgert. Die Komplexbildung fand nur bei einer geringen Ionenkonzentration und einem neutralen pH-Wert statt, wodurch die Bindung des H-Proteins an die GCS-Enzyme gefördert wird (Neuburger et al. 1986). Des Weiteren mussten die Cofaktoren (PLP und THF) in gesättigten Mengen vorhanden sein. Als weitere essentielle Voraussetzung für die Komplexbildung stellte sich die Proteinkonzentration heraus. Dies wurde von Walker und Oliver (1986a) postuliert und mit Hilfe eines Verdünnungsexperimentes bestätigt (Neuburger et al. 1986). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Menge an H-Protein, die auf einer Membran mit 300 kDa als Ausschlussgröße verbleibt, mit sinkender absoluter Proteinkonzentration abnimmt. Über einer Proteinkonzentration von  $0,25 \text{ mg ml}^{-1}$  verblieben ca. 90 % des H-Proteins oberhalb der Membran und mit sinkender Proteinkonzentration nahm auch der im Retentat verbleibende Anteil an H-Protein kontinuierlich ab. Unklar blieb, ob die Konzentration an GCS-Proteinen oder die Gesamtkonzentration an mitochondrialen Matrixproteinen dabei entscheidend war. Mittels ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) wurde für diesen Komplex eine Stöchiometrie von  $2P_2:1L_2:9T_1:27H_1$  ( $_{1/2}$  = Monomer/Dimer) publiziert. Dies hat ein auf die Monomere bezogenes Verhältnis von  $4P:2L:9T:27H$  zur Folge und führt zu einer Größe des Komplexes von ca. 1,3 MDa (Oliver et al. 1990a; Oliver et al. 1990b). Für das pflanzliche System etablierte sich auf Grund der Komplexbildung auch der Name Glycinecarboxylase-Komplex (GDC).

Bisher ist es nicht gelungen einen intakten GDC aus pflanzlichem Gewebe zu isolieren. Diese Ergebnisse werden durch die *ComplexomeMap* der *Arabidopsis thaliana* GCS-Proteine aus Abbildung 4 unterstützt (Senkler et al. 2017). Keines der GCS-Proteine ist mit Hilfe der Blue-Native-Methode in einem höher-molekularen Bereich als 200 kDa zu finden, mit Ausnahme einer sehr geringen Menge T- und P-Protein bei 300 kDa ( $\rightarrow$ ). Die von oben nach unten nach der Proteingröße geordnete *heatmap* zeigt jedoch, dass das H-Protein sowohl in Höhe des P- als auch des T-Proteins verstärkt vorhanden ist (dunkelblaue Markierung). Auch in Höhe der



höchsten L-Protein Menge zeigt sich eine erhöhte Menge an H-Protein, wenn auch geringer als für P und T. Dies könnte auf eine Assoziation dieser Proteine als Sub-Komplexe bzw. Enzym-Substrat-Komplexe hindeuten (siehe 2.2.2).



**Abbildung 4: Heatmap der Verteilung der *Arabidopsis thaliana* GCS-Proteine in einer Blue Native-PAGE.**

Die *ComplexomeMap* (<https://complexomemap.de/>; Stand 14.06.2019) wird vom Institut für Pflanzengenetik von Prof. Dr. H. P. Braun der Leibniz Universität Hannover zur Verfügung gestellt. Dafür wurden die mitochondrialen Proteine mittels einer Blue Native-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels nicht-markierter quantitativer Proteomanalyse identifiziert (Senkler et al. 2017). P-Protein - AT4G33010; L-Protein - AT1G48030; T-Protein - AT1G11860; H-Protein - AT2G35370

### 2.2.2. Sub-Komplexe der einzelnen GCS-Untereinheiten

Eine direkte Assoziation zwischen einzelnen Proteinen des GCS wurde bisher in erster Linie zwischen den enzymatisch aktiven Proteinen und dem H-Protein beschrieben.

Die aus Mitochondrien vom Huhn isolierten P- und H-Proteine sind in der Lage eine relativ stabile 1:1 Interaktion einzugehen, die mittels Gelfiltration und Dichtegradientenzentrifugation gezeigt werden konnte (Hiraga und Kikuchi 1980). Die Interaktionsflächen beider Proteine konnte von Nakai et al. (2005) in dem Gram-negativen Eubakterium *Thermus thermophilus* HB8 nachgewiesen werden. Die Erkennungsregion am P-Protein ist positiv geladen und beinhaltet eine ca. 18 Å tiefe Spalte für die Aufnahme des Liponsäurerestes des H-Proteins. Am H-Protein handelt es sich um eine negativ geladene Region nahe der prosthetischen Gruppe (Region II), in der die Aminosäuren Asp<sup>33</sup> und Asp<sup>37</sup> hoch konserviert vorliegen (Nakai et al. 2003).

In derselben Arbeit wurde auch die Interaktionsregion am H-Protein für die Verbindung mit dem T-Protein beschrieben (Region I; Glu<sup>60</sup> und Asp<sup>67</sup>). Diese Interaktion ist auch für Proteine beschrieben, die aus Lebermitochondrien des Huhns isoliert wurden (Okamura-Ikeda et al. 1982). Dort sind das H- und T-Protein in der Lage einen stabilen 1:1-Komplex zu bilden. Dies wurde 1997 von Cohen-Addad et al. mittels *small angle X-ray scattering* bestätigt. Die Interaktion erfolgt zwischen dem Lys<sup>288</sup> des T-Proteins und Asp<sup>43</sup> des

H-Proteins (Okamura-Ikeda et al. 1999). Zusätzlich konnte das Arg<sup>292</sup> des T-Proteins als essentielle Aminosäure für die Verbindung identifiziert werden, da sie Wasserstoffbrückenbindungen mit drei Aminosäuren (Glu<sup>61</sup>, Ser<sup>62</sup> und Val<sup>63</sup>) des H-Proteins eingeht (Okamura-Ikeda et al. 2010).

Im Vergleich zum HP- und HT-Subkomplex scheint eine stabile Interaktion zwischen dem H- und L-Protein nicht denkbar. Im reduzierten Zustand ist der Liponsäurerest (abgesehen von der Bindung am Lys<sup>63</sup>) nicht definiert am H-Protein verankert. Eine Interaktion mit dem aktiven Zentrum des L-Proteins ist deshalb nur möglich, wenn die prosthetische Gruppe um 90° rotiert wird. Dies macht eine stabile Interaktion unwahrscheinlich (Faure et al. 2000) und wird durch die biochemische Charakterisierung dieser Interaktion zusätzlich unterstützt (Neuburger et al. 2000).

Zusätzlich zu diesen Interaktionen konnte mittels Größenausschlusschromatographie eine Verbindung des L- und P-Proteins und über Dichtegradientenzentrifugation eine Interaktion des P-, T- und H-Proteins aus Lebermitochondrien des Huhns gezeigt werden (Hiraga et al. 1972).

### 2.3. Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse des GCS aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 als Modell für *in vitro* Analysen zur Komplexbildung des pflanzlichen GDC. Das aus rekombinanten Proteinen rekonstruierte Modell sollte die Untersuchungen zu Struktur-Funktions-Beziehungen des GCS/GDC ermöglichen, da es bis heute weder gelungen ist einen aktiven GDC aus Pflanzen zu isolieren noch die pflanzlichen Proteine in enzymatisch aktiver Form rekombinant zu gewinnen.

Zusätzlich dazu sollten erste Hinweise auf die Stöchiometrie des möglichen cyanobakteriellen Komplexes gesammelt werden, um in Zusammenhang mit der Analyse der pflanzlichen Stöchiometrie das Vorliegen eines einheitlichen Komplexes in phototrophen Organismen zu überprüfen.

Die anteilige biochemische Charakterisierung des Multienzymkomplexes aus *P. sativum* sollte abschließend das Verständnis dessen instabiler Komplexbildung erweitern.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders vermerkt, entsprachen die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien dem analytischen Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen: Applichem (Darmstadt), BioRad Laboratories GmbH (München), Roche (Mannheim), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Invitrogen (Leck, NL), Fermentas (St. Leon Rot), PeqLab (Erlangen), Promega (Madison, USA), QIAGEN (Hilden), Sigma-Aldrich (Steinheim), Sigma (Taufkirchen).

Die Verbrauchsmaterialien wurden bezogen von: Biometra (Göttingen), BioRad Laboratories GmbH (München), Eppendorf (Hamburg), Serva (Heidelberg), Sorvall (Bad Homburg), Sartorius (Göttingen), GE Healthcare (Little Chalfont, UK), Invitrogen (Kalifornien, USA).

##### 3.1.2. DNA- und Proteinstandards

**Tabelle 1: Verwendete DNA- und Proteinstandards**

Größenstandard	Hersteller
1 kB Marker	Fermentas
Unstained Protein Molekular Weight Marker	Fermentas
SERVA Native Marker Liquid Mix für BN/CN	Serva Electrophoresis

##### 3.1.3. Antikörper

**Tabelle 2: Verwendeten Antikörper**

Antikörper	Organismus	Hersteller	Verdünnung
H-Protein	<i>Flaveria trinervia</i>	Kopriva et al. 1996	1:500 (gereinigt)
T-Protein	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Davids Biotechnologie GmbH	1:2000
T-Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Bioscience	1:2000
L-Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Bioscience	1:1000 (gereinigt)
P-Protein	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Seqlab	1:1000
P-Protein	<i>Pisum sativum</i>	-	1:3000
SHMT	<i>Solanum tuberosum</i>	Bioscience	1:500 (gereinigt)
Liponsäure	-	Calbiochem	1:1000
Anti-His-HRP	-	Miltenyi Biotec	1:10.000
Anti-Rabbit IgG-HRP	Kaninchen	BioRad	1:5000

### 3.1.4. Oligonukleotide

**Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide zur Plasmidherstellung**

Primer	Sequenz 5'→3'	Konstrukt
<i>sll0171Bam</i> HI fw <i>sll0171Eco</i> RI rev	<u>GGATCC</u> GTGGCCAAT CTTTTCCTG <u>GAATTC</u> TAAACGAGGTTTTGCTCGG	T-Protein in pET-Duet-1
<i>slr1096Xho</i> I fw <i>slr1096Eco</i> RI rev	<u>CTCGAGAT</u> GAGTCAGGATTTT <u>GAATTC</u> TAAACCGCCCGTTT	L-Protein in pBAD-HisA
<i>slr1096Mun</i> I fw <i>slr1096Xho</i> I rev	<u>CAATTGAT</u> GAGTCAGGATTTTGATTACGAT <u>CTCGAGA</u> ACCGCCCGTTTATACGCTTCGTC	L-Protein in pET-Duet-1
<i>slr0293Bam</i> HI fw <i>slr0293Pst</i> I rev	<u>GGATCCAAT</u> GCCCAACCTAGAGCCCGCCGT <u>CTGCAGCTATCCTTCCTTATAAGCCTCCAT</u>	P-Protein in pACYCDuet-1
<i>slr0879Nde</i> I fw <i>slr0879Xho</i> I rev	<u>CATATGATGGA</u> ACTGGAACATCCTGACGAT <u>CTCGAGATCTCCCGTCTCTAGGGTGGCGCG</u>	H-Protein in pACYCDuet-1
<i>slr0293Xho</i> I fw <i>slr0293Pvu</i> II rev	<u>CTCGAGATG</u> CCCAACCTAGAG <u>CAGCTGCTATCCTTCCTTATA</u>	P-Protein in pBAD-HisA
<i>slr0879Nde</i> I fw <i>slr0879Bam</i> HI rev	<u>CATATGGA</u> ACTGGAACATCCGGACGATCTGTAT <u>GGATCC</u> CCTAATCGCCCGTCTCCAGGGTGGC	H-Protein in pET28a

Die Expressionsstämme für *slr0293*-pBAD-HisA, *sll1096*-pBAD-HisA und *slr0879*-pET28a wurden bereits von Dr. Dirk Hasse generiert und sind hier nur der Vollständigkeit halber aufgeführt. Die Vektorkarten und einzelnen Klonierungsnachweise für die innerhalb dieser Arbeit erstellten Expressionsstämme (*slr0879*-*slr0293*-pACYCDuet-1 und *sll0171*-*slr1096*-pET-Duet-1) befinden sich im Anhang 7.1.

### 3.1.5. Apparaturen, Geräte und Zubehör

**Tabelle 4: Verwendete Geräte und Apparaturen**

Gerät/Apparatur	Hersteller	Herstellungsort
Agarosegel-Apparaturen	Bio-RAD	München
Äktaprime	GE Healthcare	UK
Beckman Optima™ XLA	Beckman Coulter	Indianapolis, USA
Biofuge pico	Heraeus Instruments	Osterode
Cary 50 UV-Vis Spektrophotometer	Agilent Technologies	Kalifornien, USA
Conviron PGR 15	CLF Plant climatic	Emersacker
Gefriertrocknungsanlage	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH	Osterode am Harz
Vaccumpumpe	Vacuubrand GmbH	Wertheim
Mastercycler®	Eppendorf AG	Hamburg
PAGE-Apparaturen	VWR/PEGLAB	Pennsylvania, USA

Gerät/Apparatur	Hersteller	Herstellungsort
pH 211 Microprocessor pH-Meter	Hanna Instruments	Rumänien
PowerPac 300/200 Power Supply	BioRad	München
Präzisionswaage 572-33	Kern & Sohn GmbH	Balingen
Recorder REC111	Amersham Bioscience	UK
Schüttelinkubator 3032	GFL	Burgwedel
Schüttler SM-30	Edmund Bühler GmbH	Bodelshausen
Schwingmühle MM400	Retsch	Haan
Shimadzu automated HPLC-System	Shimadzu	Japan
Sigma 3K30	Sigma Laborzentrifugen GmbH	Osterode am Harz
Sorvall RC 5 Plus	Thermo EC	Massachusetts, USA
Transmissions-elektronenmikroskop JEOL 2100	JEOL	Massachusetts, USA
Tri-carb 2810 TR	Perkin Elmer	Massachusetts, USA

### 3.1.6. Kulturmedien für *Escherichia coli*

Die für diese Arbeit verwendeten Kulturmedien entsprechen den Standardmedien für *E. coli* aus Green und Sambrook 2012. Für die Kultivierung von *E. coli* zur Plasmidgenerierung wurde Luria-Bertani (LB-)Medium nach Herstellerprotokoll (Roth) verwendet. Die Expression von Proteinen fand in 2YT-Vollmedium statt mit Ausnahme des  $^{15}\text{N}$ -markierten QconCAT-Proteins zur massenspektrometrischen Analyse. Dieses wurde in Minimalmedium überexprimiert. Für eine detaillierte Zusammensetzung in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5: Übersicht über die verschiedenen Kulturmedien für *E. coli***

<b>LB-Medium</b>	[500 ml]
5 g	Trypton/Pepton
2,5 g	Hefeextrakt
2,5 g	NaCl
<b>2YT-Medium</b>	[500 ml]
8 g	Trypton/Pepton
5 g	Hefeextrakt
2,5 g	NaCl
<b>5x Minimalmedium</b>	[200 ml]
8,54 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
3 g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
0,5 g	NaCl
1 g	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$
<b>1x Minimalmedium</b>	[250 ml]
50 ml	5x Minimalmedium
2,5 ml	40 % Glycerol
0,5 ml	1 M $\text{MgSO}_4$
25 $\mu\text{l}$	1 M CaCl
197 ml	$\text{H}_2\text{O}$

### 3.1.7. Bakterienstämme

BL21 Star™ (DE3) *F<sup>-</sup>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) galdcmrne131* (DE3)  
(Invitrogen)

LMG194 (Thermo) *F<sup>-</sup>ΔlacX74 galE thirpsL ΔphoA* (PvuII) *Δara714leu::Tn10*

DH5α (Invitrogen) *F<sup>-</sup>endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 deoR nupG lacZΔM15 hsdR17*

### 3.1.8. Cyanobakterien und Anzucht

Das verwendete cyanobakterielle Lysat wurde aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (russischer Wildtyp) gewonnen. Die Anzucht erfolgte in BG11-Medium (Rippka et al. 1979) in 50 ml Kulturröhrchen unter kontinuierlicher CO<sub>2</sub> Begasung (5 %) und konstanter Illumination mit ca. 120 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### 3.1.9. Pflanzenmaterial und Anzucht

Bei den genutzten Erbsenpflanzen (*Pisum sativum*) handelte es sich um die Sorte „Kleine Rheinländerin“, welche von der Firma Kiepenkerl bezogen wurde. Die Pflanzen wurden nach der Stratifikation (48 h bei 4 °C) auf einem Gemisch aus Erde und Vermiculite (Mini Tray; Einheitserdewerk Uetersen; 4:1) bei einer Photoperiode von 12h/12h Tag/Nacht und Normalluftbedingungen (380 bis 400 μl l<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>) angezogen. Die Ernte erfolgte nach drei Wochen. Der Ökotyp der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen war Columbia-0. Ebenfalls verwendet wurde die *gld1-1* Mutante (Timm et al. 2017). Die Anzucht war identisch zu den Erbsenpflanzen. Die Ernte der Rosetten erfolgte jedoch erst nach 8 Wochen.

### 3.1.10. Programme und Software

Für den Entwurf von Klonierungsstrategien und der Auswertung von Sequenzierdaten wurden die Programme Clone Manager Suite 7 und BioEdit verwendet. Die densitometrische Auswertung wurde mittels ImageJ durchgeführt. Die Graphen wurden mit SigmaPlot 13.0 erstellt und die Abbildungen mittels CorelDRAW 2017. Die Strukturdarstellung der einzelnen Proteine erfolgte mit Chimera 1.11.

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

Ein PCR-Reaktionsansatz wurde wie von Qiagen (Taq PCR Master Mix Kit) empfohlen angesetzt und die Fragmente mittels eines Thermocyclers amplifiziert. Je nach Fragmentgröße variierte die Elongationszeit. Ein allgemeiner Programmverlauf ist in Tabelle 6 dargestellt. Im Anschluss wurden die Ansätze mit 0,2 VT Stopplösung versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt.

**Tabelle 6: Teilschritte eines regulären PCR-Programms zur Fragmentamplifikation**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	94	2
2	94	1
3	58	1
4	72	variabel
5	72	4
6	4	∞

} 24-39 Zyklen

### 3.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung, Reinigung und Größenbestimmung amplifizierter DNA-Fragmente wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Dazu wurde 1 % Agarose in TAE-Puffer gelöst, aufgekocht und bei ca. 55 °C mit 0,1 µg µl<sup>-1</sup> Ethidiumbromid versetzt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 70 bis 100 V.

**Tabelle 7: Zusammensetzung des TAE-Puffers für die Agarose-Gelelektrophorese**

TAE-Puffer	40 mM 0,1 % (v/v) 0,5 mM	Tris 100 % Essigsäure EDTA (pH 8,0)
------------	--------------------------------	---

### 3.2.3. Agarose-Gelelution

Die Gelelution von DNA-Fragmenten erfolgte laut beigefügtem Protokoll mittels des peqGOLD Gel Extraktionskits (VWR).

### 3.2.4. Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde durch die Firma SeqLab durchgeführt.

### 3.2.5. Ligation

Die Ligation erfolgte nach dem Standardprotokoll aus Tabelle 8 durchgeführt und inkubierte je nach Bedarf entweder 2 h bei 37 °C oder 12 h bei 4 °C. Im Anschluss wurde der Ansatz direkt zur Transformation verwendet.

**Tabelle 8: Zusammensetzung eines Standardligationsansatzes**

2 µl	Vektor-DNA
4 µl	Fragment-DNA
1 µl	PEG4000
1 µl	T4-DNA-Ligase (Fermentas)
2 µl	10x Ligasepuffer (Fermentas)
10 µl	H <sub>2</sub> O

### 3.2.6. Transformation kompetenter *E. coli* -Zellen

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (z.B. DH5α, BL21(DE3)) tauten die Zellen auf Eis auf und wurden anschließend mit 20 µl Ligationsansatz (3.2.5) versetzt. Nach

15-minütiger Inkubation erfolgte ein Hitzeschock (90 sec, 42 °C) und eine weitere Inkubation auf Eis (15 min). Danach wurden die Zellen mit 500 µl LB-Medium gemischt und 1h bei 37 °C geschüttelt. Abschließend erfolgte die Inkubation auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion über Nacht bei 37 °C.

### 3.2.7. Plasmid-Isolation

Plasmidpräparationen erfolgten entweder nach einem Standardprotokoll der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly 1979) mit den in Tabelle 9 aufgeführten Puffern oder mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid EasyPure Kits (Macherey Nagel) aus einer 5 ml LB-Kultur, welche zuvor über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert wurde.

**Tabelle 9: Verwendete Lösungen für die alkalische Lyse zur Plasmid-Isolation**

	Konzentration	
Lösung 1	25 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	15 mM	EDTA
	20 % (v/v)	Glucose
Lösung 2	1 % (w/v)	SDS
	0,2 N	NaOH
Lösung 3	3 M	Kaliumacetat
	20 % (v/v)	Essigsäure
TE-Puffer	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	0,1 mM	EDTA

### 3.2.8. Restriktion

Eine Restriktion z. B. zur Plasmidkontrolle erfolgte durch ein Standardprotokoll (Tabelle 10). Nach einer Inkubation von 2 h bei 37 °C wurde der Ansatz mit 0,2 VT Stopplösung versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt.

**Tabelle 10: Zusammensetzung eines Standardansatzes zur Restriktion**

2 µl	Template-DNA
0,2 µl	Restriktionsenzym 1 (Fermentas)
0,2 µl	Restriktionsenzym 2 (Fermentas)
1 µl	10x Reaktionspuffer (Fermentas)
6,6 µl	H <sub>2</sub> O

### 3.2.9. Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung wurde mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt, welche für den jeweiligen Versuch benannt sind. Zum einen wurde die Bradford-Methode (Bradford 1976) mittels Roti®-Nanoquant (Roth) laut Protokoll durchgeführt. Zum anderen wurde die Methode mit Amidoschwarz genutzt (Schaffner und Weissmann 1973). Dazu wurden 5 µl der Proteinlösung mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt und mit 400 µl Färbelösung versetzt. Nach dem Mischen und einer Zentrifugation (20.000xg, 4°C, 15 min) wurde der Überstand abgenommen



und das Pellet mit 1 ml Waschlösung gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation bevor das Pellet bei 37 °C getrocknet wurde. Nach Aufnahme in 1 ml 0,2 M NaOH wurden die Ansätze bei 615 nm am Spektrophotometer vermessen. Als Standard diente eine mit BSA erstellte Eichreihe.

**Tabelle 11: Verwendete Lösungen zur Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Amidoschwarz**

	Konzentration	
Färbelösung	90 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	0,1 % (w/v)	Amidoschwarz 10B
Waschlösung	90 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure

### 3.2.10. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde nach Standardprotokollen (Laemmli 1970; Schägger 2006) durchgeführt.

#### SDS-PAGE

Die SDS-Page wurde verwendet, um die Filtrationsproben aufzutrennen, den Reinheitsgrad der Proteinelutionen nach IMAC zu überprüfen oder SEC-Fraktionen zu analysieren. Dazu wurden Polyacrylamid-Gele mit 8 cm x 9 cm verwendet.

**Tabelle 12: Zusammensetzung der SDS-PAGE zur Proteinauftrennung**

	Konzentration	
Sammelgel (5 %)	125 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	0,1 % (w/v)	SDS
	5 % (w/v)	Rotiphorese® Gel 30
	0,05 (w/v)	APS
	0,1 % (w/v)	TEMED
Trenngel (12 %)	375 mM	Tris-HCl, pH 8,8
	0,1 % (w/v)	SDS
	12 % (w/v)	Rotiphorese® Gel 30
	0,05 (w/v)	APS
	0,05 % (w/v)	TEMED
Laufpuffer	50 mM	Tris-HCl
	380 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS

Nach dem Auspolymerisieren wurden zwischen 0,1 bis 10 µg Protein bzw. Proteinextrakt aufgetragen. Nach einer 30-minütigen Elektrophorese bei 80 V wurde die Spannung auf 150 V erhöht bis die blaue Lauffront das Ende des Gels erreicht hat. Im Anschluss wurde das Gel entweder mit Coomassie®-Brilliantblau G-250 voll oder mit Coomassie®-Brilliantblau R-250 colloidal gefärbt oder die Proteine mittels Western Blot (3.2.11) zur immunologischen Detektion auf eine PVDF- oder Nitrocellulose-Membran transferiert.

## Native PAGE

Die native PAGE wurde nach dem gleichen Prinzip durchgeführt wie die SDS-PAGE (siehe Tabelle 12) mit dem Unterschied, dass kein SDS im Gel- oder Laufpuffer eingesetzt wurde.

### 3.2.11. Western Blot

Zur immunologischen Detektion wurden die per PAGE aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membran mittels *semi dry* Verfahren transferiert (90 min; 1 mA/cm<sup>2</sup>) (Towbin et al. 1979). Danach erfolgte die Blockierung der Membran mit 5 % Magermilch (in TBS-Puffer gelöst) für 1 h. Über Nacht wurde die Membran mit dem Primärantikörper bei 4 °C inkubiert (Ausnahme: Anti-HIS-HRP Antikörper, 1h bei Raumtemperatur (RT)). Nach 5x Waschen mit TBS folgte eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei RT (Ausnahme: Anti-HIS-HRP Antikörper, dieser ist bereits mit dem Sekundärantikörper gekoppelt). Durch die *enhanced chemiluminescence* (ECL, Oxidation von Luminol mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kann mit Hilfe der Peroxidase das Zielprotein auf einem lichtempfindlichen Film detektiert werden.

**Tabelle 13: Verwendete Puffer zur Durchführung eines Western Blots**

	Konzentration	
Transfer-Puffer	48 mM	Tris
	39 mM	Glycin
	3,7 % (w/v)	SDS
	20 % (v/v)	Methanol
TBS-Puffer	20 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	130 mM	Natriumchlorid

### 3.2.12. Aufreinigung spezifischer Antikörper

Zur Optimierung der Proteindetektion mit spezifischen Antikörpern wurden diese zum Teil (H- und L-Protein- sowie SHMT-Antikörper) für das entsprechende Protein nachgereinigt. Dazu wurde das jeweilige Protein durch SDS-PAGE (3.2.10) aufgetrennt und mittels Western Blot (3.2.11) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert, die Membran mittels Ponceau S-Lösung (Ponceau bindet reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine) angefärbt und die gewünschte Proteinbande ausgeschnitten. Nach einer Inkubation mit 100 mM Glycin-HCl (pH 2,5) für 5 min und der Waschung mit TBS (siehe Tabelle 13) wurde die Membran mit 3% BSA (biotinfrei, in TBS) 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Antikörperserum (über Nacht, 4 °C). Nach der Waschung mit TBS (2 x 5 min) und PBS (2 x 5 min) wurde der Antikörper mit 100 mM Glycin-HCl (pH 2,5) eluiert. Die Neutralisation erfolgte mit 1 M Tris-HCl (pH 8,0) und biotinfreiem BSA. Die 200 µl Aliquots lagerten bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

**Tabelle 14: Verwendete Puffer für die Affinitätsreinigung von Antikörpern**

	Konzentration	
PBS	4 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	30 mM	NaCl
Ponceau S-Lösung	0,25 g	Ponceau S
	12,5 ml	Essigsäure
	237,5 ml	H <sub>2</sub> O

**3.2.13. Reinigung der rekombinanten Proteine aus *E. coli***

Für die biochemischen Untersuchungen sowie die Analysen zur Komplexbildung wurden die vier GCS-Gene heterolog in *E. coli* überexprimiert und die Proteine mittels des angefügten Hisx6-tags über Affinitätschromatographie gereinigt (IMAC). Die Expressionskultur (2YT-Medium inklusive Antibiotikum) wurde aus einer Vorkultur (5 ml LB-Medium inklusive Antibiotikum über Nacht bei 37 °C geschüttelt) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bis 1 inkubiert. Anschließend erfolgten die Induktion durch z. B. Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-thiogalactopyranosid (IPTG) und eine weitere Inkubationsphase von 12 h. Danach wurden die Zellen pelletiert und im Homogenisationspuffer aufgenommen. Danach erfolgte die Lyse der Zellen mittels Ultraschall. Feste Zellbestandteile wurden wieder pelletiert und der klare Überstand als Lysat auf eine mit Homogenisationspuffer equilibrierte ProBond™ NI-NTA-Matrix (Invitrogen) gegeben. Diese wurde im Anschluss mit Waschpuffer von unspezifischen Proteinen befreit und das Zielprotein anschließend durch den Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die spezifischen Angaben zu jedem Proteinkonstrukt sind in Tabelle 15 aufgeführt, die genutzten Puffer in Tabelle 16. Liponsäure (LS) wurde der Zellkultur zur Expression des H-Proteins hinzugegeben, da es sich hierbei um die prosthetische Gruppe des Proteins handelt und *E. coli* nicht in der Lage ist die bei der Expression entstehenden sehr hohen Proteinmengen eigenständig vollständig zu lipoylieren.

**Tabelle 15: Übersicht über die Spezifikationen zur GCS-Proteinbiosynthese in *E. coli***

Protein	Stamm	Vektor	Antibiotikum	Induktor	Medium	°C
H	BL21(DE3)	pET28a	50 µg ml <sup>-1</sup> Kan	1 mM IPTG, 0,24 mM LS	2YT	30
T/H	BL21(DE3)	pET-DUET1, pET28a	100 µg ml <sup>-1</sup> Amp, 50 µg ml <sup>-1</sup> Kan	1 mM IPTG, 0,24 mM LS	2YT	25
L	LMG194	pBAD-HisA	100 µg ml <sup>-1</sup> Amp	0,02 % (v/v) Arabinose	2YT	30
P	LMG194	pBAD-HisA	100 µg ml <sup>-1</sup> Amp	0,02 % (v/v) Arabinose	2YT	30
HTLP	BL21(DE3)	pET-DUET1, pACYC-DUET1	30 µg ml <sup>-1</sup> Cm, 100 µg ml <sup>-1</sup> Amp	1 mM IPTG, 0,24 mM LS	2YT	30

**Tabelle 16: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für die Reinigung der GCS-Proteine**

<b>Puffer</b>	<b>Konzentration</b>	
P-Protein	20 mM	Na-Phosphat-Puffer pH 7,8
Homogenisationspuffer	500 mM	NaCl
	0,2 mM	PLP
	15 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
P-Protein	20 mM	Na-Phosphat-Puffer pH 7,8
Waschpuffer	500 mM	NaCl
	0,2 mM	PLP
	15 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
	40 mM	Imidazol
P-Protein	20 mM	Na-Phosphat pH 7,8
Elutionspuffer	500 mM	NaCl
	0,2 mM	PLP
	15 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
	500 mM	Imidazol
H/L-Protein	20 mM	Tris-HCl pH 7,8
Homogenisationspuffer	50 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
H/L-Protein	20 mM	Tris-HCl pH 7,8
Waschpuffer	1000 mM	NaCl
	40 mM	Imidazol
H/L-Protein	20 mM	Na-Phosphat pH 7,8
Elutionspuffer	500 mM	NaCl
	300 mM	Imidazol
H/T-Protein	50 mM	Tris-HCl pH 7,5
Homogenisationspuffer	200 mM	NaCl
	0,1% (w/v)	Tween 80
	1 mM	DTT
H/T-Protein	50 mM	Tris-HCl pH 7,5
Waschpuffer	500 mM	NaCl
	0,1% (w/v)	Tween 80
	1 mM	DTT
H/T-Protein	50 mM	Tris-HCl pH 7,5
Elutionspuffer	500 mM	NaCl
	0,1% (w/v)	Tween 80
	1 mM	DTT
	150 mM	Imidazol

### 3.2.14. Größenausschlusschromatographie

Für die Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) wurde eine High-Load 16/600 Superdex 200 Säule mit dem Äkta<sub>prime</sub> oder Äkta<sub>Explorer</sub> System (alles GE Healthcare) verbunden und äquilibriert (Puffer siehe Tabelle 17). Zur Eichung wurden im Herstellerprotokoll angegebene Mengen von Carboanhydrase (29 kDa), BSA (66 kDa) und Alkohol Dehydrogenase (150 kDa) verwendet (MWGF200-1KT Sigma Aldrich). Die zu untersuchenden Proben wurden gefiltert (45  $\mu$ m Filter) und in einem Volumen von 1 ml auf die Säule gegeben und bei entweder 0,1 ml min<sup>-1</sup> über Nacht oder 1 ml min<sup>-1</sup> für ca. 2 h eluiert (beide Verfahren zeigten keinen Unterschied in der Auftrennung der Proteine). Fraktionen mit einem Volumen von 1 ml wurden gesammelt und anschließend per 12% SDS-PAGE und ggf.

Western Blot analysiert. Die meisten SEC-Analysen wurden in Rostock durchgeführt, ein Teil der Ergebnisse wurde darüber hinaus in Kooperation mit Shanshan Wang und Dr. Markus Wirtz (COS Heidelberg) erhalten.

**Tabelle 17: Puffer für die Größenausschlusschromatographie.**

	Konzentration	
SEC-Puffer 1	20 mM	Tris-HCl, pH 8.0
	150 mM	NaCl
SEC-Puffer 2	5 mM	MOPS
	5 mM	Tris-HCl, pH 7.0
	1 mM	Serin
	20 $\mu$ M	PLP

### 3.2.15. Filtration durch einen 300 kDa *cut-off* Filter

Für die Filtrationsversuche wurden die GCS-Proteine entweder einzeln oder in verschiedenen Kombinationen gemischt und ca. 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 50  $\mu$ l des Ansatzes in ein Filtrationsröhrchen überführt, wobei der enthaltene Filter eine Ausschlussgröße von 300 kDa (Sartorius, Vivaspin 500, MWCO 300 kDa) hatte. Die Röhrchen wurden für 3 min bei 4 °C und 15.000xg zentrifugiert und anschließend das Filtrat (F) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Waschung (W) des Filters wurde noch drei Mal Puffer (siehe Tabelle 19) im gleichen Volumen auf den Filter gegeben, zentrifugiert und das Filtrat (W1 und W2) entnommen. Nach der dritten Waschung wurden sowohl das Filtrat (W3) als auch das Retentat (R) entnommen und alle Proben mittels einer 12% SDS-PAGE analysiert. Das Mischungsverhältnis ist in Tabelle 18 exemplarisch dargestellt.

**Tabelle 18: Übersicht über das Mischungsverhältnis der GCS-Proteine für die Filtration**

Protein	P	H	T	L
Molmasse	107	14	40	50
Verhältnis	1	8	2,5	2
Menge [ $\mu$ g]	1	8	2,5	2
Proteinkonzentration [ $\mu$ g $\mu$ l <sup>-1</sup> ]	2,71	1,56	2,57	0,84
Volumen (Menge/Proteinkonzentration) [ $\mu$ l]	0,37	5,12	0,97	2,38
Konzentration im Gemisch (Menge/Summe) [ $\mu$ g $\mu$ l <sup>-1</sup> ]	0,11	0,91	0,28	0,23
<b>Menge an Protein für 100 <math>\mu</math>l [<math>\mu</math>l]</b>	<b>4,18</b>	<b>57,90</b>	<b>11,00</b>	<b>26,92</b>

**Tabelle 19: Puffer für die Filtration durch einen 300 kDa *cut-off* Filter.**

	Konzentration	
Filtrations-Puffer	5 mM	MOPS
	5 mM	Tris-HCl, pH 7,0
	1 mM	Serin
	20 $\mu$ M	PLP
	1 mM	Triton X-100

### 3.2.16. Pulldown-Experimente

Der Pulldown wurde durchgeführt, um aus dem *Synechocystis* Zelllysat mögliche Interaktionspartner des immobilisierten Proteins zu finden. Dazu wurde das jeweilige Protein an die ProBond™ NI-NTA-Matrix gebunden und zusammen mit *Synechocystis* Lysat [Zellpellet einer 50 ml Kultur, OD<sub>750</sub>: 2-3, in Lysispuffer (siehe Tabelle 19) aufgenommen und mittels zwei *french press* Zyklen lysiert] 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschungen (siehe Tabelle 16 - H/L-Protein Waschpuffer) wurde das Protein von der Matrix eluiert (H/L-Protein Elutionspuffer) und mittels 12% SDS-PAGE und Western Blot sowie Massenspektrometrie (Methode: HDMS<sup>E</sup>, siehe 3.2.24) untersucht. Als Kontrollen diente sowohl leere als auch mit FDH gesättigte Matrix, inkubiert mit Lysat oder Puffer, als auch mit L- und P-Protein gesättigte Matrix, die mit Puffer statt Lysat inkubiert wurde.

### 3.2.17. Isolation von pflanzlichen Mitochondrien

Die Pflanzen wurden wie unter 3.1.9 aufgeführt angezogen und anschließend sowohl Spross als auch Blätter (insgesamt 150 bis 200 g) geerntet. Die Mitochondrienisolation erfolgte nachdem Protokoll von Keech et al. 2005 mit den in Tabelle 20 aufgeführten Puffern.

**Tabelle 20: Zusammensetzung der Puffer zur Mitochondrienisolation aus *Pisum sativum* und *Arabidopsis thaliana***

Puffer	Konzentration	
Extraktionspuffer	300 mM	Saccharose
	60 mM	TES
	10 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1 mM	Glycin
	2 mM	EDTA (Di-Natrium-Salz)
	1% (w/v)	Polyvinylpyrrolidone 25
	1% (w/v)	BSA
	25 mM	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
	50 mM	Natrium-Ascorbat
	20 mM	β-Mercaptoethanol
Waschpuffer	300 mM	Saccharose
	10 mM	TES
	10 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	2 mM	EDTA (Di-Natrium-Salz)
Percollgradientenpuffer	600 mM	Saccharose
	20 mM	TES
	20 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	2 mM	Glycin
	2 mM	EDTA (Di-Natrium-Salz)

Dazu wurden 30 bis 40 g Pflanzenmaterial der Erbse (15 bis 20 g von *Arabidopsis*) mit der Schere zerkleinert und mit 100 ml Extraktionspuffer im Mixer zwei Mal 10 Sekunden auf niedrigster Stufe zerkleinert. Die entstandene Suspension wurde durch ein Mulltuch (45 µm)

und anschließend durch ein Nylontuch (20 µm) filtriert. Nach einer Zentrifugation (10 min, 2420xg, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und erneut zentrifugiert (20 min, 14.560xg, 4 °C). Das entstandene Pellet wurde in 1 ml Waschpuffer resuspendiert und anschließend auf sechs vorher präparierte Percoll-Gradienten (50% Percoll/50% Percollgradientenpuffer, Zentrifugation 40 min, 18.500 rpm, 4 °C) gleichmäßig verteilt. Anschließend an die Zentrifugation (30 min, 11.000 rpm, 4 °C) wurden die Mitochondrien (ca. ein Zentimeter über dem unteren Rand als diffuse Wolke erkennbar) in ein weiteres Zentrifugengefäß überführt und mittels zwei Waschschritten mit je ca. 30 ml Waschpuffer und nachfolgender Zentrifugation (30 min, 11.000 rpm, 4 °C) vom Percoll befreit. Für die Enzymaktivitätsmessungen erfolgte eine direkte Lagerung der Mitochondrien in einer möglichst geringen Menge Waschpuffer bei -80 °C. Für die Analysen mittels Massenspektrometrie wurde ebenfalls möglichst viel Waschpuffer entfernt und das verbliebene Volumen nochmals zentrifugiert (40 min, 16.000xg, 4 °C), der Überstand entfernt und das Pellet in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 aufgenommen und ebenfalls bei -80 °C gelagert.

### **3.2.18. H-Protein Aktivität**

Das H-Protein des GCSs hat keine eigene katalytische Aktivität, sondern dient dem Transport von Zwischenprodukten, welche während der Reaktion am P-, T- und L-Protein generiert werden. Dennoch konnte überprüft werden, ob das H-Protein intakt und lipoyliert ist. Dazu wurde es dem L-Protein (siehe 3.2.20) und P-Protein (siehe 3.2.21) Aktivitätsansatz zugegeben.

### **3.2.19. T-Protein Aktivität**

Um die Aktivität des T-Proteins zu bestimmen wurde freigesetztes Ammonium/Ammoniak mittels der Berthelot-Reaktion und einer adaptierten Methode von Weatherburn 2002 gemessen. Dabei liegt das freigesetzte Ammoniak auf Grund des basischen pH-Wertes als NH<sub>3</sub> vor und kann mit Hypochlorid zu Monochloramin reagieren. Mittels des Phenols entsteht in einer weiteren Reaktion Indophenol, welches im alkalischen Milieu in blauer Form vorliegt. Für diese Reaktion wurden zuvor verschiedenen Mengen an P-, H- und T-Protein in einem Endvolumen von 392,5 µl GDC Aktivitätspuffer ohne THF (Tabelle 24) für 5 min inkubiert. Nach Entnahme einer 100 µl Probe wurden 7,5 µl THF für eine finale Konzentration des 6S-THF von 0,14 mM hinzugegeben und jeweils nach 1 min und 5 min 100 µl Probe entnommen. Die Proben wurden direkt nach Entnahme mit 400 µl H<sub>2</sub>O und 100 µl Phenol-Nitroprussid-Lösung gemischt und gevortext und nach der Zugabe von 200 µl Hypochlorid-Lösung nochmals gevortext. Nach einer 20 minütigen Inkubation im Wasserbad (50 °C)

erfolgte eine Lagerung für 40 min bei Raumtemperatur und im Anschluss wurden die Proben bei 636 nm am Spektrophotometer vermessen.

**Tabelle 21: Lösungen für die Messung der T-Protein Aktivität**

Lösung	Konzentration	
Phenol-Nitroprussid-Lösung	7 ml	Phenol
	34 mg	Nitroprussid
	93 ml	H <sub>2</sub> O
Hypochlorid-Lösung, pH 12	2,96 g	NaOH
	14,77 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O
	16,6 ml	12% NaOCl
	183,4 ml	H <sub>2</sub> O

### 3.2.20. L-Protein Aktivität

Das L-Protein reoxidiert das H-Protein unter Reduzierung von NAD<sup>+</sup> und stellt es somit der Decarboxylierungsreaktion am P-Protein wieder zur Verfügung. Zur Überprüfung der L-Protein Aktivität wurde die Reaktion mit reduziertem H-Protein (die Reduzierung erfolgte im Vorfeld der Aktivitätsmessung mit 70 mM TCEP) und NAD<sup>+</sup> gemessen. Dazu wurde 10 µg des gereinigten L-Proteins in einem finalen Volumen von 1 ml Puffer (siehe Tabelle 22) inkubiert. Durch die Absorptionsänderung bei 340 nm (Cary 50 UV-Vis Spektrophotometer, Agilent Technologies) wurde so die spezifische Aktivität des L-Proteins gemessen (Patel et al. 1995).

**Tabelle 22: Reaktionspuffer für die Messung der L-Protein Aktivität**

	Konzentration	
L-Protein Aktivitätspuffer	100 mM	Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,3
	1,5 mM	EDTA
	0,6 mg ml <sup>-1</sup>	BSA
	variierend	reduziertes H-Protein
	0,2 mM	NAD <sup>+</sup>

### 3.2.21. P-Protein Aktivität

Die Aktivität des P-Proteins wurde als Rückreaktion gemessen, indem der Kohlenstoff der Carboxylgruppe von Glycin mit Hilfe von NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> gegen ein <sup>14</sup>C-markiertes Kohlenstoffatom ausgetauscht wird (Hasse et al. 2007). Dafür wurden 7,5 µg P-Protein und 30 µg H-Protein in einem finalen Volumen von 900 µl Puffer (siehe Tabelle 23) 5 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> wurden über einen Zeitraum von 30 min zu drei verschiedenen Zeitpunkten (0, 15 und 30 min) 270 µl entnommen und durch Zugabe von 80 µl 50% Trichloressigsäure die Reaktion abgestoppt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in flüssigem Scintillationsmix (Perkin Elmer, Ultima Gold<sup>TM</sup>) mit Hilfe des Tri-carb 2810 TR (Perkin Elmer).



**Tabelle 23: Reaktionspuffer für die Messung der P-Protein Aktivität**

	Konzentration	
P-Protein Aktivitätspuffer	50 mM	Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0
	1 mM	DTT
	0,1 mM	PLP
	20 mM	Glycin
	30 mM	NaH <sup>14</sup> CO <sub>3</sub>

**3.2.22. GCS-Gesamtaktivität**

Die Gesamtaktivität aller GCS-Proteine wurde als Glycin-abhängige Reduktion von NADH gemessen (Neuburger et al. 1986; Timm et al. 2017). In einem finalen Puffervolumen (siehe Tabelle 24) von 400 µl wurde Mitochondrienextrakt mit verschiedenen Endkonzentrationen (0,01 bis 0,25 µg µl<sup>-1</sup>) sowie die einzelnen Fraktionen der SEC (0,01 bis 0,03 µg µl<sup>-1</sup>) hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht. Auf Grund der Sauerstoff-Sensitivität von THF (siehe Anhang 7.2) erfolgte dies unter anaeroben Bedingungen bei 25 °C. Nach der Zugabe von Glycin wurde am Spektrophotometer die Zunahme von NADH bei 340 nm gemessen. In Kontrollmessungen wurde anstatt Glycin, im gleichen Volumen Puffer zugegeben.

**Tabelle 24: Reaktionspuffer für die Messung der GDC-Gesamtaktivität**

	Konzentration	
Aktivitätspuffer	5 mM	MOPS
	5 mM	Tris-HCl, pH 7,2
	0,02 mM	PLP
	1 mM	β-Mercaptoethanol
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	EDTA
	2 mM	NAD <sup>+</sup>
	0,14 mM	6S-THF (in 100 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0)
	20 mM	Glycin

**3.2.23. Berechnung der Enzymaktivität**

Die Berechnung der Enzymaktivitäten wurde mit folgender Formel durchgeführt.

$$U [\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}] = \frac{\Delta E [\text{min}^{-1}] * \text{Volumen}_{\text{Gesamt}} [\text{ml}]}{\varepsilon [\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^2] * d_{\text{Küvette}} [\text{cm}] * \text{Volumen}_{\text{Probe}} [\text{ml}] * c_{\text{Protein}} [\text{mg ml}^{-1}]}$$

Die Ermittlung der K<sub>m</sub> und V<sub>max</sub>-Werte erfolgten nach der Ermittlung einer Substrat-Sättigungskurve nach Michaelis-Menten-Kinetik (Michaelis und Menten 1913) mit der von Lineweaver und Burk (1934) publizierten Methode.

### 3.2.24. Quantitative Proteomanalyse

Die quantitative Proteomanalyse wurde durchgeführt, um das molare Verhältnis der GCS-Proteine zueinander zu analysieren und somit eine mögliche Stöchiometrie des GDC-Komplexes in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) und *Pisum sativum* (*P. sativum*) zu ermitteln. Dafür wurden für jedes Protein spezifische Peptide (siehe Tabelle 25) von JPT Peptide Technologies GmbH synthetisiert. Diese waren C-terminal mit einem markierten Lysinrest versehen und konnten so im Massenspektrometer von den nativen Peptiden unterschieden werden. Die Auswahl der Peptide erfolgte auf der Grundlage von früheren MS-Analysen, so dass eine eindeutige Zuordnung zu den GCS-Proteinen und eine hohe Signalstärke erreicht werden konnten. Die generierten Peptide von JPT waren dabei nicht in der Lage zwischen den verschiedenen Isoformen der Proteine zu unterscheiden.

**Tabelle 25: Übersicht über die von JPT synthetisierten Peptide**

Protein	Sequenz	Organismus
H-Protein	YAPSEWVK*	<i>P. sativum</i>
H-Protein	YANSEWVK*	<i>A. thaliana</i>
T-Protein	GGAIIDSVTK*	<i>P. sativum/A. thaliana</i>
L-Protein	AIDNAEGLVK*	<i>P. sativum/A. thaliana</i>
L-Protein	AIDTAEGMVK*	<i>A. thaliana</i>
P-Protein	IAILNANYMAK*	<i>P. sativum/A. thaliana</i>

Die zweite Methode zur Quantifizierung war die Expression eines QconCAT-Proteins (Smith et al. 2016). Dabei handelte es sich um ein synthetisches Protein, das zwei oder mehr Peptide der zu quantifizierenden Proteine enthielt. Die Peptide wurden so gewählt, dass die Isoformen unterschieden werden konnten. Für *Arabidopsis* war je ein Peptid Isoform-spezifisch und eines in beiden Isoformen vorhanden. Die Expression erfolgte mit  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  als einzige Stickstoffquelle im Expressionsmedium. Dadurch werden die Peptide schwerer als die nativen und können im Massenspektrometer voneinander unterschieden werden.

Die Sequenz des Proteins wurde so gewählt, dass für jedes GCS-Protein aus *P. sativum* und *Arabidopsis* zwei Peptide enthalten waren. Zur Unterscheidung der Isoformen in *Arabidopsis* wurde hier je ein Peptid für die eine und ein Peptid für die andere Isoform ausgewählt. Diese tryptischen Peptide wurden mit einer unspezifischen Sequenz aus mindestens sechs Aminosäuren verbunden. Auf Grund der Lysin- bzw. Argininreste am C-Terminus können die spezifischen Peptide und linker-Sequenzen durch einen Verdau mit Trypsin voneinander getrennt werden. Zusätzlich zu den Peptiden wurden zur internen Kontrolle der Quantifizierung zwei Peptide der Glykogen Phosphorylase (PhosB) des Kaninchens, die auch als quantifizierte synthetische Standardpeptide verfügbar waren, N- und C terminal

angehängt. Um abschließend die Reinigung des Peptides mittels IMAC zu ermöglichen, wurde C terminal ein *his-tag* fusioniert. Im Vergleich zur N-terminalen Lokalisierung des *tags* kann so verhindert werden, dass unvollständig translatierte Peptide an die Matrix gebunden werden.

Zur Herstellung des QconCAT-Proteins wurde aus der gewünschten Aminosäuresequenz (320 Aminosäuren, 35,9 kDa) eine Nukleotidsequenz (969 bp, siehe Anhang 7.3) abgeleitet. Diese wurde mit *NcoI*- und *XhoI*-Schnittstellen versehen, von der Firma BaseClear synthetisiert und in den pUC57-Vektor ligiert. Das Fragment wurde von mir in den Expressionsvektor pET28a ligiert und dieser in *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

Die Expressionsinduktion erfolgte, nachdem die Kultur bei 37 °C auf OD<sub>600</sub> 0,9 angewachsen war, mit 1 mM IPTG, woraufhin eine Inkubation von 20 h bei 37 °C erfolgte. Anschließend wurde das Protein mittels IMAC gereinigt. Da das Protein nicht nativ vorliegen musste wurde es mit Harnstoff-haltigen Puffern gereinigt, um den Zellaufschluss und somit die verfügbare Proteinmenge zu optimieren.

Die Elutionsfraktionen wurden anschließend nochmals mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch colloidal Färbung sichtbar gemacht. Die QconCAT-Bande wurde ausgeschnitten, mit Hilfe eines Gel-Eluters (Biorad) eluiert und mit der Amidoschwarz-Methode (siehe 3.2.9) die Proteinkonzentration bestimmt.

**Tabelle 26: Puffer zur denaturierenden Reinigung des <sup>15</sup>N-QconCAT-Peptids aus *E. coli***

	Konzentration	
Homogenisationspuffer 1	50 mM	HEPES pH 7,6
	100 mM	NaCl
	10 mM	β-Mercaptoethanol
	1 M	Harnstoff
	1 %	Triton X-100
Homogenisationspuffer 2	50 mM	HEPES pH 7,6
	100 mM	NaCl
	10 mM	β-Mercaptoethanol
	8 M	Harnstoff
	1 %	Triton X-100
Waschpuffer	20 mM	Tris-HCl pH 7,8
	1 M	NaCl
	40 mM	Imidazol
	4 M	Harnstoff
Elutionspuffer	20 mM	Na-Phosphat pH 7,8
	500 mM	NaCl
	300 mM	Imidazol
	4 M	Harnstoff

Für die Proteomanalyse wurden Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana* und *Pisum sativum* durch drei Einfrier-Auftau-Zyklen aufgeschlossen und die löslichen Matrixproteine durch

anschließende Zentrifugation (4 °C, 40.000xg, 1 h) von der Membranfraktion getrennt. Die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte vollständig durch Dr. Stefan Mikkat (Core Facility Proteomanalytik, Universitätsmedizin Rostock) wie in Pade et al. (2017) beschrieben. Nachdem die löslichen Matrixproteine von der Membranfraktion getrennt wurden erfolgte der tryptische Verdau der Proteine mit einem Verhältnis von 1:100 Trypsin/Protein und der FASP-Technik (*filter-aided sample preparation*, Wiśniewski et al. 2009).

Die Analyse des Proteoms erfolgte entweder als markierungsfreie Hi3-Methode oder durch die Zugabe von markierten (schweren) Referenzpeptiden. Die Hi3-Methode (Silva et al. 2006) basiert auf der Analyse der Abundanz der drei Peptide mit dem stärksten Signal und einem Phos B (Glycogen Phosphorylase) Standard (Waters). Die Messungen erfolgten als LC-MS<sup>E</sup> bzw. -HDMS<sup>E</sup> Analysen, letzteres ist eine Methode, bei der Daten von wechselnd geringen und verstärkten Energiestadien der Peptide erhoben werden. Das genutzte System war das nanoAcquity UPLC System (Waters) verbunden mit dem Synapt G2-S Massenspektrometer (Waters). Die Trennung der Peptide wurde durch eine analytische Säule (ACQUITY UPLC HSS T3, Waters) bei einer Laufgeschwindigkeit von 300 nl min<sup>-1</sup> und einem Gradienten von 3 bis 35 % Puffer B (0,1% Ameisensäure in Acetonitril) über 90 min erreicht. Zur Auswertung wurde das Programm Progenesis QI verwendet.

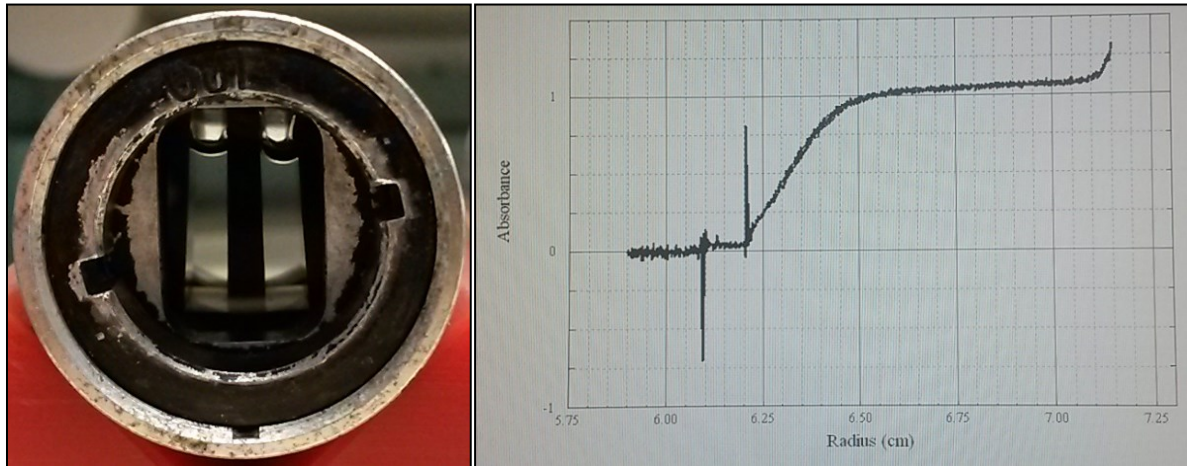
### **3.2.25. Analyse des *Synechocystis* Gesamtproteoms**

Die Anzuchtbedingungen und Methode (Hi3) der Gesamtproteomanalyse des *Synechocystis* Wildtyp Zelllysats sind in Pade et al. (2017) beschrieben, ein Teil der erhobenen Daten wurden dort bereits veröffentlicht.

### **3.2.26. Analytische Ultrazentrifugation**

Die analytische Ultrazentrifugation (AUZ) wurde in Kooperation mit Dr. Norbert Mücke (dkfz. Heidelberg) durchgeführt, um mittels einer unabhängigen Methode die Struktur der GCS-Proteine im Tris-NaCl-Puffer zu untersuchen. Die Untersuchung erfolgte in einer Beckman Optima™ XL-A Ultrazentrifuge mit einem An-60 Ti Rotor. Bei dem genutzten Puffer handelte es sich um 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl. Die Menge an analysiertem Protein entsprach bei OD<sub>280</sub> zwischen 0,2 und 0,7. Das Prinzip der AUZ beruht darauf, dass die Proteinverteilung in einer durchlässigen Zelle (Abbildung 5) während der Zentrifugation (42.000 rpm) gemessen und auf Grund einer Referenzzelle direkt mit dem verwendeten Puffer verglichen werden kann. Dafür wird der gesamte Zellenbereich über den Zeitraum der Zentrifugation (abhängig von der Proteingröße, kleine Proteine sedimentieren langsamer als große) gescannt und die Verteilung der Proteine bei 280 nm gemessen. Durch

die Sedimentation der Proteine verschiebt sich die Proteinkonzentration zum Zellenrand. Diese Sedimentationsgeschwindigkeit kann genutzt werden um die Molekülgröße zu bestimmen. Die Auswertung erfolgte durch Dr. Norbert Mücke unter Verwendung des Programms DCDT+.



**Abbildung 5: Darstellung einer Standardzelle für die AUZ und eines Verlaufes einer Sedimentation.**

Links: Frontal Ansicht einer Standardzelle für die AUZ – Linke Kammer: Pufferreferenz, Rechte Kammer: Proteinlösung. Rechts: Verteilung der Proteine in der Standardzelle während der Ultrazentrifugation.

### **3.2.27. Elektronenmikroskopische Aufnahmen mittels Negativkontrastfärbung**

Durch Negativkontrastfärbung (NKF) ist es möglich Proteinkomplexe abzubilden und hinsichtlich Größe und Form zu analysieren (Harris 2015; Haschemeyer und Harven 1974). Dazu wurden 10 µl der jeweiligen Probe auf ein Kupfernetz, welches vorher mit Graphen beschichtet wurde, überführt und ca. 1 min inkubiert. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit mit Hilfe eines Filterpapiers entfernt und direkt 10 µl 1% Uranylacetat (UA) zur Färbung aufgetragen. Nach 1 min wurde diese Flüssigkeit ebenfalls entfernt und mit der gleichen Prozedur und H<sub>2</sub>O das Kupfernetz von überschüssigem UA befreit. Durch das UA werden die Ränder des Moleküls sowie das Kupfernetz an Stellen gefärbt, die kein Protein beinhalten. Mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops (TEM) können die auf dem Kupfernetz abgebildeten Partikel im Anschluss visualisiert werden. Per NKF wurden in Kooperation mit Dr. Thomas Heimler (Universität Marburg) die einzelnen GCS-Proteine sowie das Retentat der 300 kDa *cut-off* Filtration hinsichtlich der dort vorhandenen Proteinkomplexe untersucht.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Analyse der rekombinanten *Synechocystis* GCS-Proteine

#### 4.1.1. Das P-Protein

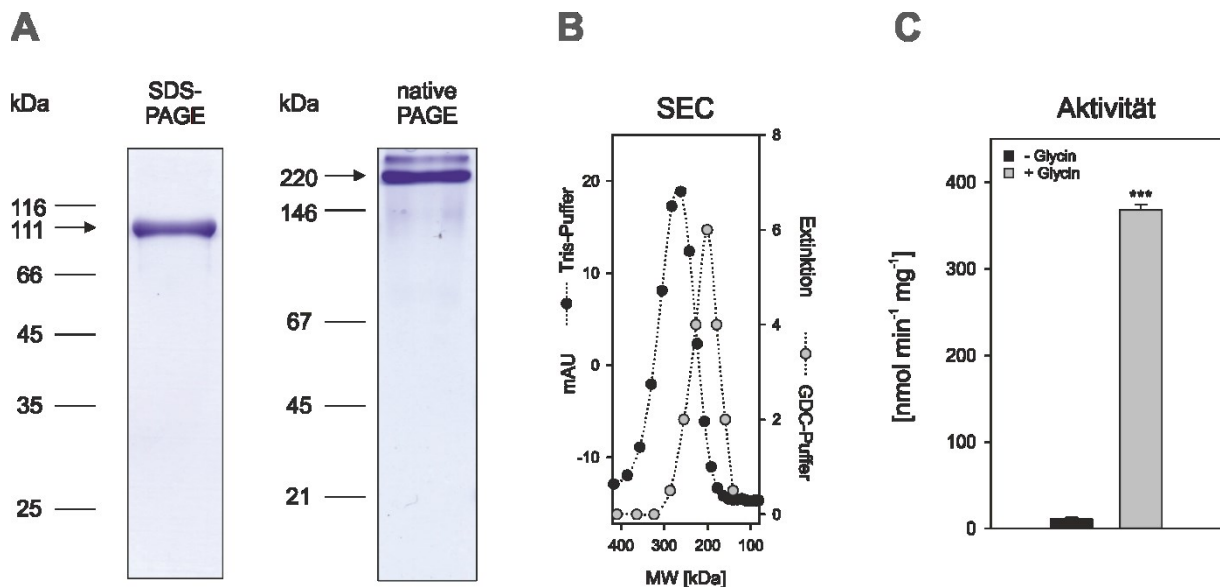
Eine eingehende Analyse des *Synechocystis* P-Proteins erfolgte bereits in früheren Arbeiten (Hasse et al. 2007; 2009; 2010; 2013). Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit das P-Protein nur mittels SDS- und nativer PAGE sowie SEC untersucht, um eine Eignung des heterolog exprimierten Proteins für Komplexversuche sicherzustellen. Die Messung der Aktivität des rekombinanten Proteins erfolgte ausschließlich unter den publizierten optimalen Bedingungen (Hasse et al. 2007).

Die PAGE-Analysen bestätigen sowohl die apparente Masse des P-Protein Monomers (ca. 110 kDa, Abbildung 6A), als auch die des Dimers (ca. 220 kDa, Abbildung 6A). In der nativen PAGE zeigt sich zusätzlich noch eine höhermolekulare Bande, die auf die Bildung eines Oligomers unter diesen Bedingungen hindeuten könnte. Die Untersuchungen mittels SEC (Abbildung 6B) konnten keinen Peak in dieser Größenordnung detektieren.

Die SEC-Analysen wurden vergleichend unter komplexfördernden Pufferbedingungen (GDC-Puffer; Neuburger et al. 1986) sowie Kontrollbedingungen durchgeführt. Erstere setzen sich aus geringen Salzkonzentrationen, einem niedrigen pH-Wert und PLP als Cofaktor des P-Proteins zusammen, während es sich beim Kontrollpuffer um einen 20 mM Tris/50 mM NaCl Puffer handelt. Im direkten Vergleich konnte dabei beobachtet werden, dass die aus den Elutionsprofilen berechneten Größen (Eichgeraden siehe Anhang 7.4) des P-Proteins voneinander abweichen. Während im GDC-Puffer das P-Protein bei der erwarteten Größe von ca. 220 kDa auftritt, eluiert es im Tris-Puffer früher und hat dort eine apparente Größe von ca. 270 kDa. Möglicherweise haben die genutzten Puffer einen Einfluss auf die Form des Proteins, da nicht allein die Größe des Proteins, sondern auch dessen hydrodynamischer Radius die Elution beeinflussten. Dadurch kann es zu einem abweichenden Migrationsverhalten des Proteins an der Säule und dadurch zu einer späteren Elution von der Säule kommen. Dennoch konnte die Größe des P-Protein Dimers weitestgehend bestätigt (200 bis 270 kDa) werden. Die Abweichungen lassen sich möglicherweise auch durch die unterschiedlichen Systeme der SEC-Analysen erklären (durchgeführt in Rostock: Äkta<sub>prime</sub> für komplexfördernde Bedingungen und durchgeführt in Heidelberg: Äkta<sub>explorer</sub> für Tris-Puffer), die auf Grund verschiedener Pumpmechanismen (Äkta<sub>prime</sub>: pulsierend; Äkta<sub>explorer</sub>:

kontinuierlich) einen Einfluss auf das Laufverhalten der Proteine haben können, obwohl zu Analyse die gleiche Säule genutzt wurde.

Die Aktivitätsmessung zeigt, dass das heterolog in *E. coli* exprimierte P-Protein aus *Synechocystis* in der Lage ist, Glycin umzusetzen. Im Vergleich zur negativen Kontrolle, bei der kein Glycin zum Messansatz hinzugegeben wurde, ist die spezifische Aktivität mit Glycin um das fast 35-fache erhöht (ohne Glycin ca.  $11 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ; mit Glycin ca.  $367 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , die Hintergrundaktivität wurde abgezogen). Damit ist das P-Protein katalytisch aktiv und kann für weitere Versuche genutzt werden. Da für die Aktivitätsanalysen das ebenfalls in *E. coli* exprimierte H-Protein aus *Synechocystis* verwendet wurde, kann gleichzeitig bestätigt werden, dass auch dieses seine Funktion als Substrat erfüllt und sich somit für Komplexversuche eignet.



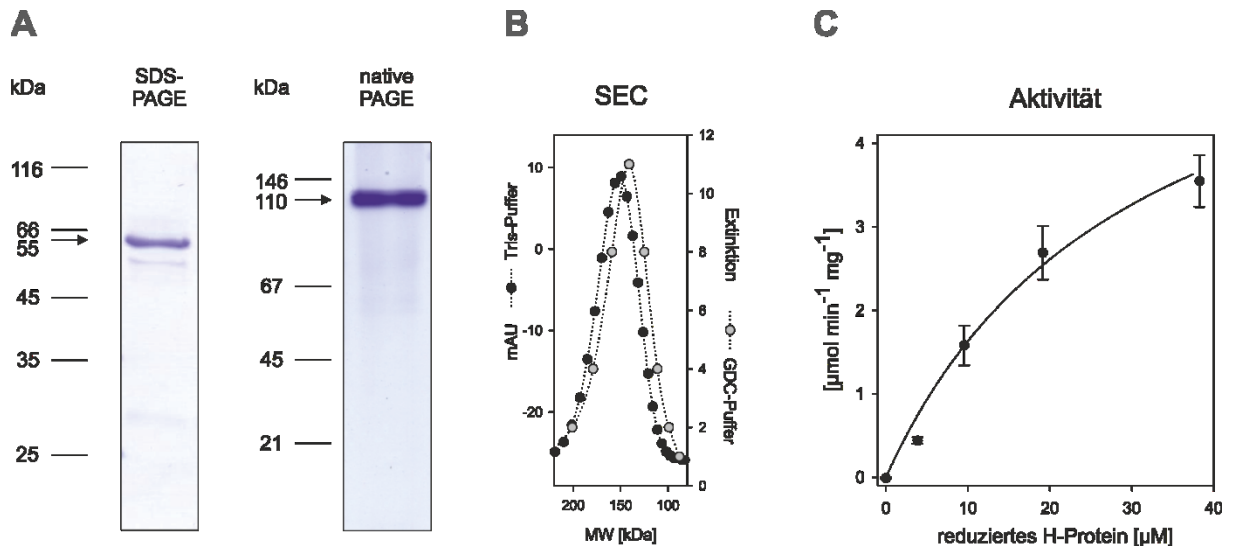
**Abbildung 6: Übersicht über die Untersuchungen zum rekombinanten *Synechocystis* P-Protein.**

**A:** PAGE-Analysen des rekombinanten P-Proteins. Links: Denaturierende SDS-PAGE mit der Proteinbande bei ca. 110 kDa. Rechts: Native PAGE mit der Proteinbande bei ca. 220 kDa. **B:** P-Protein Analysen mittels SEC. Vergleich zwischen GDC-Puffer und Tris-Puffer. Das P-Protein eluiert in beiden Puffern unterschiedlich, aber die berechneten Größen entsprechen weitestgehend der Erwartung von ca. 220 kDa: Tris-Puffer (schwarz) 270 kDa; GDC-Puffer (grau) 200 kDa. **C:** Vergleich der Aktivität des P-Proteins aus *Synechocystis* zwischen dem Reaktionsansatz mit Glycin (dunkelgrau) als Substrat und der Kontrolle ohne Glycin (schwarz).  $n=3$ ; \*\*\* $p<0,001$

#### 4.1.2. Das L-Protein

Eine detaillierte Untersuchung des L-Proteins aus *Synechocystis* wurde bisher nur am aus Zellen gereinigten Protein durchgeführt (Engels et al. 1997; Engels und Pistorius 1997). Da innerhalb dieser Arbeit erstmalig rekombinantes L-Protein genutzt wurde, erfolgte neben der Untersuchung der Oligomerisierung mittels PAGE- und SEC-Analysen auch eine biochemische Charakterisierung hinsichtlich der Aktivität des L-Proteins in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Als Substrat diente hierbei rekombinantes H-Protein aus *Synechocystis* (reduziert mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)). Abbildung 7A zeigt das Ergebnis der SDS- und nativen PAGE. Zu erkennen ist, dass die Masse des Monomers (ca. 55 kDa) und die des Homodimers (ca. 120 kDa) weitestgehend mit den erwarteten (ca. 50 bzw. 100 kDa) übereinstimmen. Im Unterschied zur SEC-Analyse (Abbildung 7B) des P-Proteins stimmen die berechneten Größen des L-Proteins unter beiden Pufferbedingungen (GDC-Puffer und Kontrolle) nahezu überein (140 bis 150 kDa). Dennoch unterscheiden sich beide von der erwarteten Größe. Dieser Unterschied lässt sich möglicherweise auf eine Abweichung der Form des L-Proteins von einem idealen globulären Protein zurückführen (siehe 2.1), was die Migration des Proteins im Säulenmaterial beeinflusst. Aus den Aktivitätsmessungen (Abbildung 7C) wird deutlich, dass das rekombinante *Synechocystis* L-Protein katalytisch aktiv ist und für weitere Analysen des GCS genutzt werden kann. Die Daten zeigen die erwartete Sättigungskurve mit ansteigender Substratkonzentration. Daraus konnten mittels Lineweaver-Burk-Auftragung der  $V_{\max}$ - ( $3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) und  $K_m$ -Wert (0,007 mM) berechnet werden. Letzteres liegt dabei unter dem publizierten  $K_m$ -Wert des L-Proteins aus *P. sativum* für das pflanzliche H-Protein (0,027 mM) (Neuburger et al. 2000).





**Abbildung 7:** Übersicht über die Untersuchungen zum rekombinanten *Synechocystis* L-Protein.

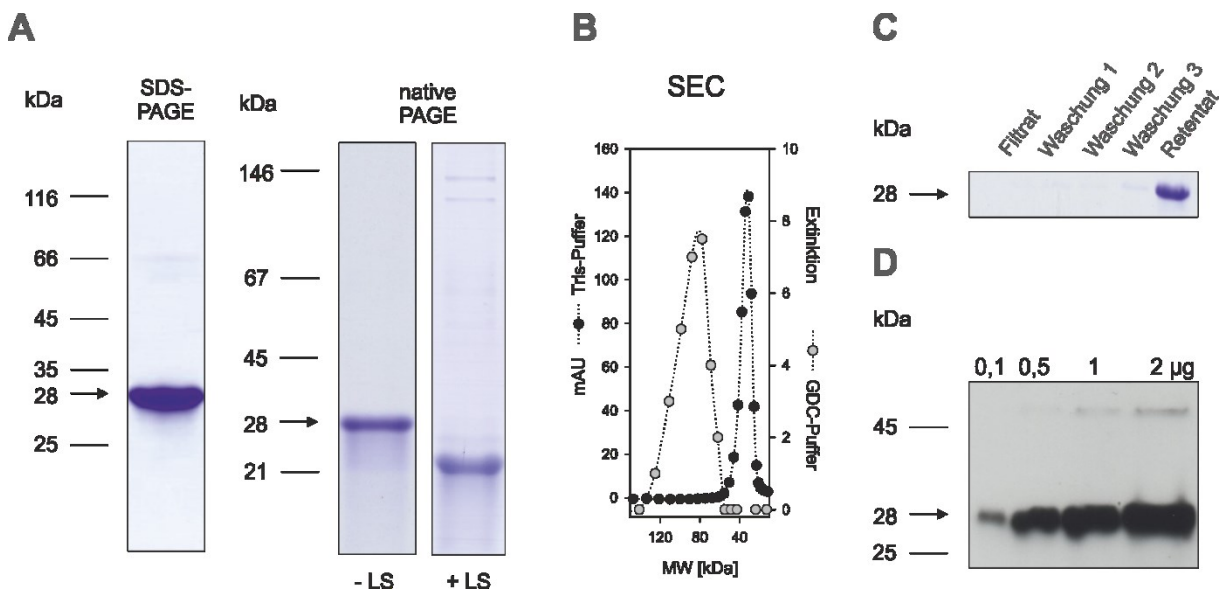
**A:** PAGE-Analysen des rekombinanten L-Proteins. Links: Denaturierende SDS-PAGE mit der L-Proteinbande bei ca. 55 kDa (Monomer). Rechts: Native PAGE mit der L-Proteinbande bei ca. 110 kDa (Dimer). **B:** L-Protein Analysen mittels SEC. Vergleich zwischen GDC-Puffer zur Komplexförderung und Tris-Puffer zur Kontrolle. Das L-Protein eluiert in beiden Puffern nahezu gleich mit einer Größe zwischen von ca. 150 kDa (GDC-Puffer, grau; Tris-Puffer, schwarz). **C:** Messung der L-Protein Aktivität in Abhängigkeit der Konzentration des reduzierten *Synechocystis* H-Proteins.

#### 4.1.3. Das H-Protein

Eine Analyse des rekombinanten H-Proteins aus *Synechocystis* erfolgte bereits in früheren Arbeiten (Hasse et al. 2007; 2009). Dennoch wurde auch dieses Protein hinsichtlich seiner Größe und seines Einflusses auf die Proteinaktivität untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt. Die Analysen mittels PAGE (Abbildung 8A) zeigen, dass das rekombinante H-Protein aus *Synechocystis* unter denaturierenden Bedingungen ein Dimer (ca. 28 kDa, Monomer 14 kDa) bildet. Dies wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt (Hasse et al. 2009), der Grund dafür bleibt weiterhin unbekannt. Auf Grund des veränderten Laufverhaltens des H-Proteins in der Tricin-SDS-PAGE (siehe Dissertation Hasse, 2010) könnte es sich um einen artifiziellen Effekt der Glycin-SDS-PAGE handeln. Die Literatur (Oliver 1994) und die Ergebnisse der SEC lassen jedoch auf eine Oligomerisierung des H-Proteins schließen.

In der nativen Page ist der Unterschied des lipoylierten und nicht-lipoylierten H-Proteins zu erkennen. Ohne den Zusatz externer Liponsäure zum Expressionsmedium ist *E. coli* nicht in der Lage die hohen Mengen an rekombinantem H-Protein vollständig zu lipoylieren. Auf Grund der geringeren positiven Ladung des Holoproteins, vermittelt von der prosthetischen Gruppe, läuft dieses innerhalb der nativen PAGE weiter als das Apoprotein (Abbildung 8A).

Die SEC-Analysen zeigen einen deutlichen Unterschied im Elutionsprofil des H-Proteins unter komplexfördernden und Kontrollbedingungen (Abbildung 8B). Während im GDC-Puffer das H-Protein bei 80 kDa eluiert, hat es im Tris-Puffer eine berechnete Größe von 32 kDa. Demnach scheint das H-Protein aus *Synechocystis* bei neutralem pH-Wert und geringer Salzkonzentration in der Lage zu sein, eine oligomere Struktur zu bilden. Der Peak der SEC-Analyse spricht für ein Tetramer. Die Interaktion mehrere H-Proteine zeigt sich zusätzlich auch in dem Filtrationsexperiment durch eine 50 kDa *cut-off* Membran (Abbildung 8C), bei dem der überwiegende Teil der H-Proteine im Überstand verbleibt, obwohl das monomere Protein nur ca. 14 kDa groß ist und somit die Membran passieren können sollte. Auch im Immunoblot konnte ein Teil des Proteins bei ca. 50 kDa detektiert werden (Abbildung 8D).

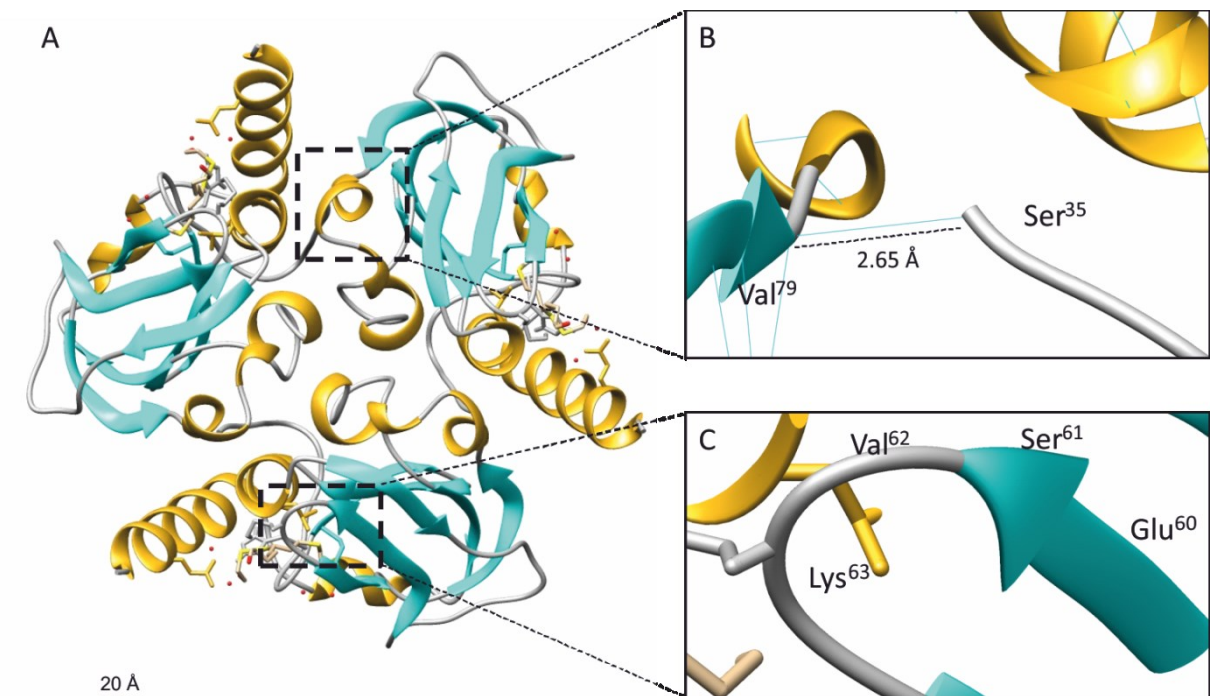


**Abbildung 8:** Übersicht über die Untersuchungen zum rekombinanten *Synechocystis* H-Protein.

**A:** PAGE-Analysen des rekombinanten H-Proteins. Links: Denaturierende SDS-PAGE. Rechts: Native PAGE mit H-Protein ohne vollständige Lipoylierung (links) bei ca. 30 kDa und mit Lipoylierung (rechts) bei ca. 22 kDa. **B:** H-Protein Analysen mittels SEC. Vergleich zwischen GDC-Puffer (grau) und Tris-Puffer (schwarz). Das H-Protein eluiert in beiden Puffern unterschiedlich, im GDC-Puffer: 80 kDa und im Tris Puffer: 32 kDa. **C:** Filtration des H-Proteins durch eine 50 kDa *cut-off* Membran. Die Filtration bestätigt die SEC-Ergebnisse, dass das H-Protein im GDC-Puffer eine höher molekulare Struktur (>50 kDa) bildet. **D:** Immunoblot des aufgereinigten H-Proteins. Der Nachweis erfolgte mit dem spezifischen aufgereinigten H-Protein Antikörper aus *F. trinervia*. Zu sehen ist die erwartete Bande bei 30 kDa (Dimer) und eine Bande bei ca. 50 kDa (Trimer).

Die SEC- und Filtrations-Analysen würden für ein Trimer oder Tetramer aus H-Proteinen sprechen. Um die mögliche Oligomerisierung des H-Proteins zu visualisieren wurden mit Hilfe von SymmDock (Schneidman-Duhovny et al. 2005a, 2005b) Modelle eines Tri- und eines Tetramers erstellt (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/SymmDock/>).

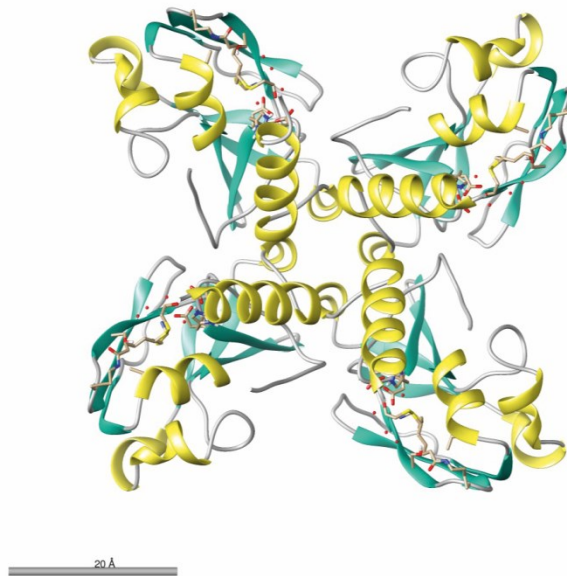
Abbildung 9A zeigt eine mögliche Organisation mehrerer H-Proteine zu einem Trimer, welches eine mögliche Kernstruktur des *Synechocystis* Komplexes bilden könnte. In dieser Anordnung liegt die prosthetische Gruppe am Lys<sup>63</sup> (Abbildung 9C) so, dass sie von den enzymatisch aktiven GCS-Proteinen erreicht werden kann und somit Reaktionsintermediate binden könnte. Zusätzlich dazu ist der Ser<sup>35</sup>-Rest jedes Monomers in der Lage eine intermolekulare Wasserstoffbrücke mit dem Val<sup>79</sup>-Rest der Hauptkette eines weiteren Monomers einzugehen (Abbildung 9B). Da es sich hier um theoretische Analysen handelt, bleibt der experimentelle Beweis aus, dass eine einzelne Wasserstoffbrückenbindung ausreicht, um ein stabiles Oligomer zu bilden. Desweiteren sind auch die angrenzenden Aminosäurereste (60-63, Abbildung 9C) frei zugänglich, um eine Interaktion mit dem T-Protein einzugehen. Letzteres wird durch die publizierte Struktur eines HT-Komplexes aus *E. coli* unterstützt (Okamura-Ikeda et al. 2010) (siehe auch Abbildung 13).



**Abbildung 9: Mögliche Struktur eines H-Protein Trimers aufbauend auf der pdb-Struktur 1HTP (*P. sativum*).**

SymmDock ermöglicht die Darstellung einer Proteinstruktur mit mehreren Untereinheiten basierend auf deren geometrischer Symmetrie. Das hier gezeigte Ergebnis dient ausschließlich der Visualisierung und hat keinen experimentellen Hintergrund. **A:** H-Protein Trimer. Der Trimer ist symmetrisch angeordnet und hat eine nach außen gelagerte prosthetischer Gruppe (Liponsäure), um einen Reaktionsablauf des GCS zu ermöglichen. **B:** Darstellung einer Wasserstoffbrückenbindung (WBB) zwischen den H-Proteinen. Die Rückansicht des Modells zeigt, dass eine intermolekulare Interaktion der einzelnen H-Proteine über eine WBB (2,65 Å) zwischen Ser<sup>35</sup> und Val<sup>79</sup> möglich ist. **C:** Detailansicht des Lys<sup>63</sup> mit kovalent gebundener Liponsäure. Die Anordnung der einzelnen H-Proteine erfolgte so, dass die drei Aminosäuren, die für die Interaktion des H-Proteins mit dem T-Protein notwendig sind, diesem zugänglich sein können (siehe 2.1, Abbildung 13).

Auch die Bildung eines H-Protein Tetramers ist auf Grund der SEC-Analysen prinzipiell denkbar. Eine mögliche Anordnung der Monomere ist in Abbildung 10 dargestellt. Für diese Anordnung konnten keine intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen vorhergesagt werden, so dass diese Abbildung rein auf Symmetrie und der nach außen gelagerten Liponsäure sowie den Aminosäureresten zur Bindung des T-Proteins (siehe Trimerstruktur) beruht.



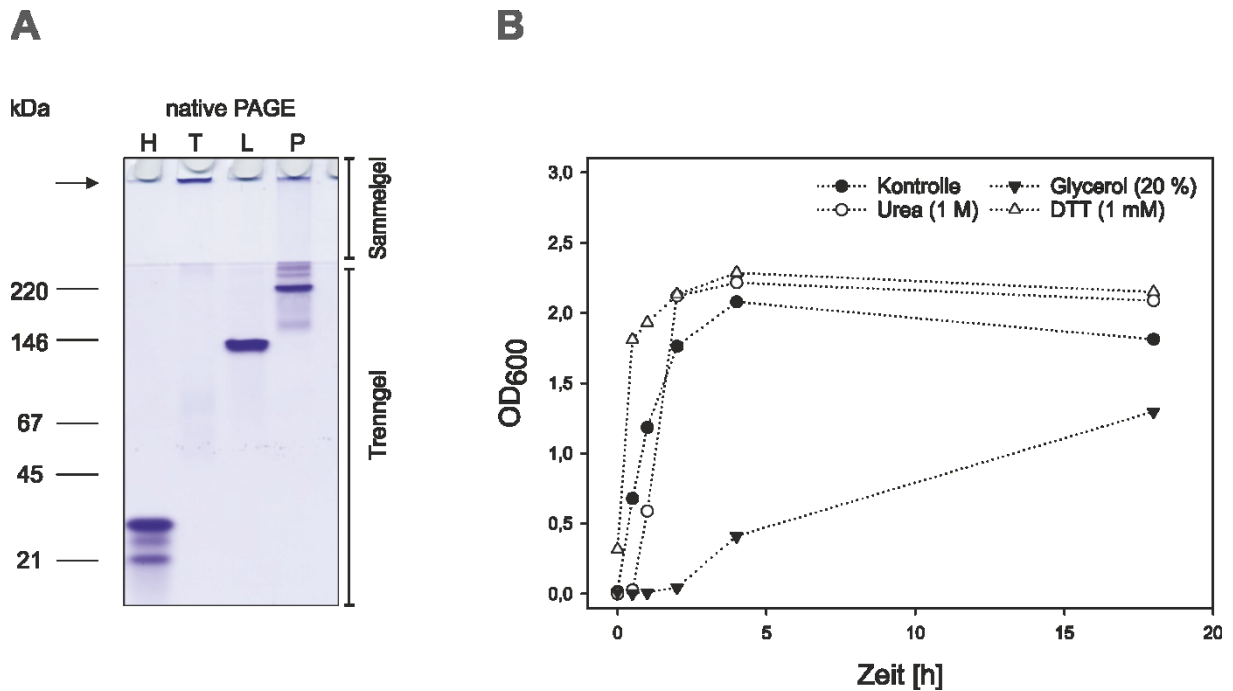
**Abbildung 10: Mögliche Struktur eines H- Protein Tetramers aufbauend auf der pdb-Struktur 1HTP (*P. sativum*).**

SymmDock ermöglicht die Darstellung einer Proteinstruktur mit mehreren Untereinheiten basierend auf deren geometrischer Symmetrie. Das hier gezeigte Ergebnis dient ausschließlich der Visualisierung und die Anordnung der Untereinheiten hat keinen experimentellen Hintergrund. Dargestellt ist ein symmetrischer H-Protein Tetramer mit nach außen gelagerter prosthetischer Gruppe (Liponsäure), um einen Reaktionsablauf des GCS prinzipiell zu ermöglichen. Skala: 20 Å

#### 4.1.4. Das T-Protein

Cohen-Addad et al. publizierten 1997, dass das T-Protein aus *P. sativum* durch Zugabe von H-Protein löslich blieb und ansonsten schwer lösliche Proteinaggregate bildete. Das konnte auch für das T-Protein aus *Synechocystis* beobachtet werden (siehe Abbildung 11). Initial konnte das T-Protein nicht mittels einer nativen PAGE aufgetrennt werden, sondern verblieb in der Tasche des Sammelgels (Abbildung 11A;  $\rightarrow$ ), während alle anderen GCS-Proteine entsprechend ihrer Größe nach getrennt wurden. Da das Protein über die IMAC gereinigt werden konnte und somit während dessen löslich war, erfolgte die Analyse der Aggregation nach der Reinigung und mit dem T-Protein in GDC-Puffer. Die Aggregation des gereinigten Proteins wurde in Abhängigkeit der Zeit bei OD<sub>600</sub> gemessen und die Lösung zeigte eine

schrittweise Trübung (Abbildung 11B – Kontrolle). Um dies möglicherweise zu verhindern, wurden Glycerol (20 %) und Harnstoff (1M) (Bondos und Bicknell 2003) sowie DTT (1 mM) zum Puffer hinzugegeben. Keine dieser Reagenzien hatte einen positiven Effekt auf die Löslichkeit des T-Proteins (Abbildung 11B). Aus diesem Grund wurde das T-Protein anschließend immer mit dem H-Protein coexprimiert (BL21 DE3, *sll0171*-pET-DUET1, *slr0879*-pET28a: TH-Protein) und mittels IMAC gereinigt. In diesem Zustand blieb das T-Protein löslich, was sich in den Filtrations- und SEC-Untersuchungen zeigt.



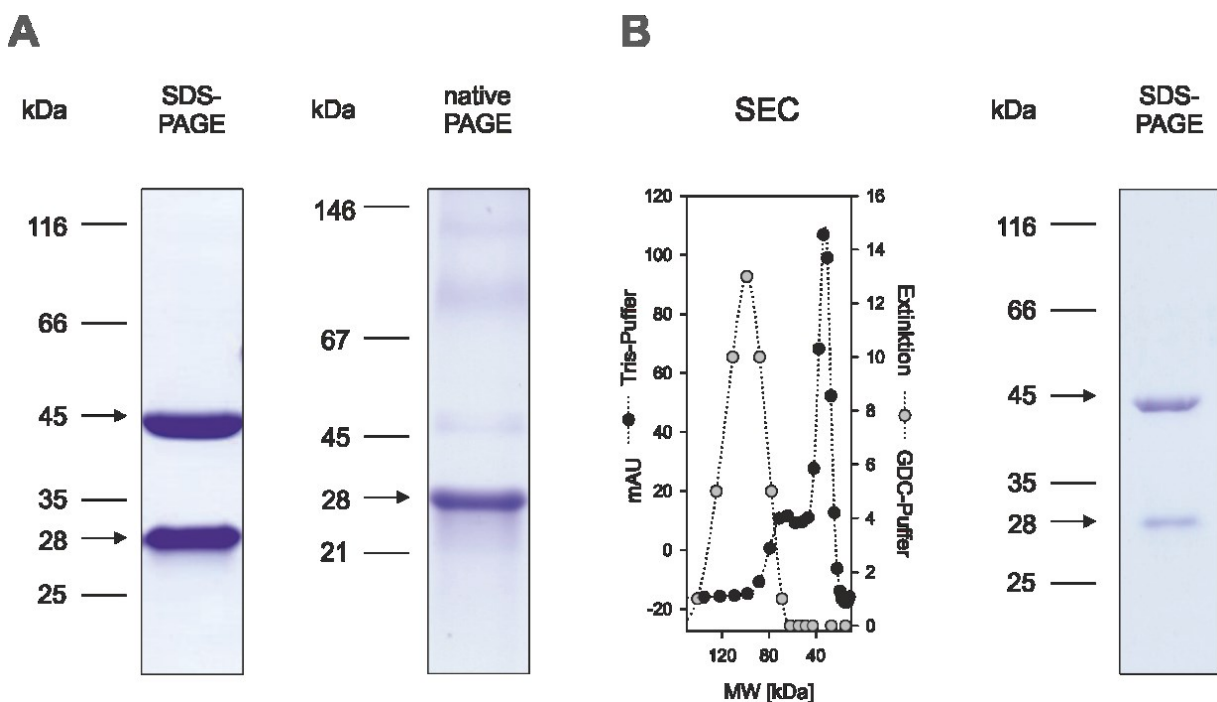
**Abbildung 11: Übersicht über die Analysen zur Aggregation des T-Proteins.**

**A:** Native PAGE aller GCS-Proteine aus *Synechocystis*. Das T-Protein blieb in der Tasche des Sammelgels und konnte nicht getrennt werden. **B:** Übersicht über das Aggregationspotential als Zunahme der OD<sub>600</sub> des T-Proteins mit unterschiedlichen Pufferzusätzen.

Nach der Coexpression mit dem H-Protein zeigten die Größenanalysen des T-Proteins mittels PAGE die erwartete Größe von ca. 45 kDa sowohl im denaturierenden als auch im nativen (mit zzgl. 75 und 100 kDa inklusive H-Protein) System. Die SEC-Analysen für das TH-Protein zeigen deutliche Unterschiede zwischen den Kontroll- und komplexfördernden Bedingungen. Im GDC-Puffer konnte trotz Vorliegen beider Proteine nur ein Elutionspeak detektiert werden. Die berechnete Größe dieses Peaks entsprach 100 kDa und die Peakfraktion enthielt sowohl T- als auch H-Protein (siehe Abbildung 11B). Daraus lässt sich vermuten, dass unter diesen Bedingungen das H- und T-Protein einen relativ stabilen Komplex eingehen, welcher nicht durch Verdünnung gelöst werden kann. Dies wird durch den Einzellauf des H-Proteins unterstützt (siehe Abbildung 8B). Dort scheint das H-Protein



um ca. 40 kDa später zu eluieren, was ungefähr der Größe des T-Protein Monomers entsprechen würde. Der Vergleich mit dem Lauf unter Kontrollbedingungen zeigt, dass im Tris-Puffer die beiden Proteine in verschiedenen Konformationen vorliegen. Die berechneten Größen sprechen dabei für einen 1:1 TH-Komplex (68 kDa) und das H-Protein (32 kDa) alleine (Abbildung 11B). Möglicherweise liegt ein Teil des T-Proteins ebenfalls allein vor. Die Aktivität des rekombinanten T-Proteins konnte mit dem im Material- und Methodenteil beschriebenen Test (3.2.19) bisher nicht nachgewiesen werden. Über die Messung der Gesamtaktivität der GCS-Proteine (siehe 4.2.4) konnte die T-Protein Aktivität jedoch indirekt nachgewiesen werden.



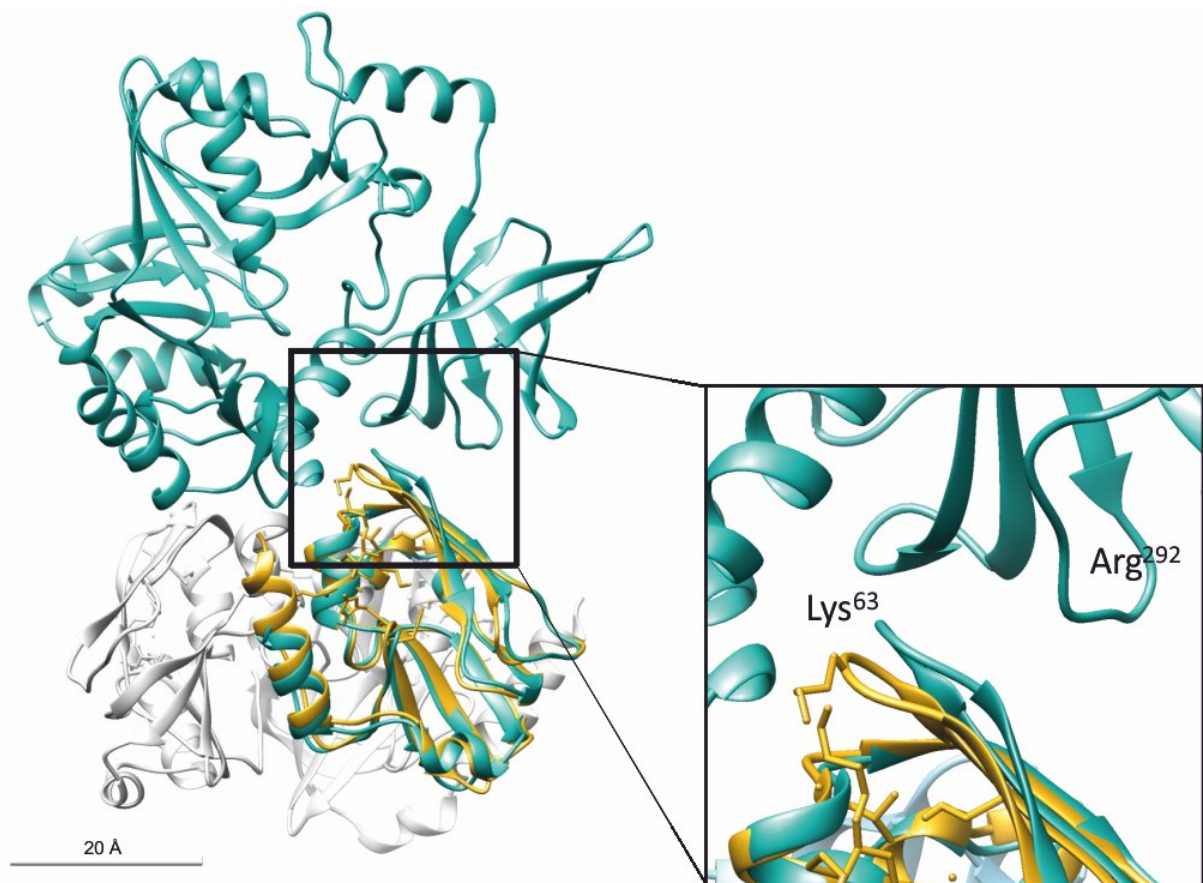
**Abbildung 12: Übersicht über die Untersuchungen zum rekombinanten *Synechocystis* TH-Protein.**

**A:** PAGE-Analysen des rekombinanten TH-Proteins. Links: Denaturierende SDS-PAGE mit der H-Proteinbande bei ca. 30 kDa (Dimer) und der T-Proteinbande bei ca. 45 kDa (Monomer). Rechts: Native PAGE mit der H-Proteinbande bei ca. 30 kDa (Dimer) und der T-Proteinbande bei ca. 47 kDa. Bei den zusätzlichen Banden (75 und 100 kDa) könnte es sich um TH-Komplexe mit unterschiedlichen Stöchiometrien handeln. **B:** TH-Protein Analysen mittels SEC. Vergleich zwischen GDC-Puffer zur Komplexförderung und Tris-Puffer zur Kontrolle. Während unter komplexfördernden Bedingungen die beiden Proteine innerhalb eines Peaks erscheinen und somit vermutlich einen Komplex bilden, erscheinen unter Kontrollbedingungen zwei Peaks. Der erste entspricht einem TH-Komplex und der zweit dem H-Protein bei ca. 30 kDa (GDC-Puffer, grau; Tris-Puffer, schwarz).

Die Assoziation des T-Proteins mit einem H-Protein in einem stabilen Komplex wurde für *E. coli* bereits experimentell bestätigt (Okamura-Ikeda et al. 2010). Die folgende Abbildung zeigt, dass diese Assoziation auch mit einem H-Protein Trimer theoretisch möglich wäre. Dafür wurde das nach Symmetrie geordnete H-Protein-Trimer (Abbildung 9) mittels des

Chimera Programms mit der Kristallstruktur des TH-Komplexes (pdb 3A8J) überlagert. Dabei wird deutlich, dass eine Interaktion zwischen H- und T-Protein auch möglich ist, wenn drei H-Proteine als Trimer assoziiert sind, was mit der beobachteten molekularen Masse der TH-Coeluate von ca. 100 kDa übereinstimmen würde.

Für eine Assoziation dieser beiden *Synechocystis* Proteine spricht die von Nakai et al. 2003 identifizierte Interaktionsfläche Region I am H-Protein von *T. thermophilus*. Die verantwortlichen Aminosäuren sind Glu<sup>60</sup> und Asp<sup>67</sup>, wie sie auch in *Synechocystis* vorkommen (siehe Abbildung 14). Darüber hinaus zeigt ein Alignment (Abbildung 15) der T-Protein Sequenzen aus *E. coli* und *Synechocystis*, dass die für die Interaktion notwendige Aminosäure Asp<sup>292</sup> aus *E. coli* (Okamura-Ikeda et al. 2010) auch in *Synechocystis* konserviert ist.



**Abbildung 13: Vergleich des H-Protein Trimers mit dem TH-Komplex (pdb 3A8J).**

Die Überlagerung des H-Protein Trimers (gold/weiß) mit dem publizierten *E. coli* TH-Komplex (blau, Okamura-Ikeda et al. 2010) zeigt, dass eine Interaktion eines H-Proteins mit dem T-Protein weiterhin möglich ist, auch wenn drei H-Proteine als Trimer vorliegen, denn keines der zusätzlichen H-Proteine blockiert die Bindestelle des T-Proteins (Arg<sup>292</sup>).

```

                    50          60          70          80
T. thermophilus      VYVELPEVGR VVEKGEAVAV VESVKTASDI YAPVAGEIVE
Synechocystis sp. PCC 6803 .F.....E.D K..FEQSMGA .....A...L .S..T.TVI.

```

**Abbildung 14: Sequenzvergleich der H-Proteinsequenzen von *Synechocystis* und *T. thermophilus*.**

Dargestellt sind nur 40 Aminosäuren mit der konservierten Region I am Glu<sup>60</sup> und Asp<sup>67</sup> (Nakai et al. 2003; rote Markierungen). Der vollständige Vergleich ist unter 7.6 dargestellt. Der Vergleich wurde mit Hilfe des Programms BioEdit und der Matrix Blosum62 erstellt.

```

                    290          300          310          320
E. coli              LEVQREHGTE K-LVGLVMTE KGVIRNELPV RFTDAQGNQH
Synechocystis sp. PCC 6803 .TE.KAN.V. .R....E.LA .QIA.HDY.I LHN----GEI

```

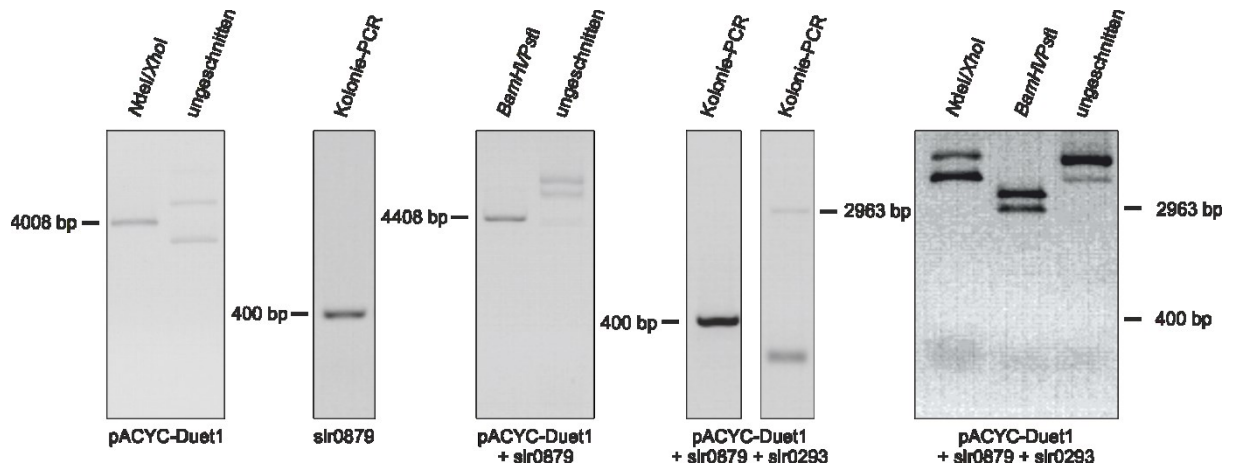
**Abbildung 15: Sequenzvergleich der T-Proteinsequenzen von *E. coli* und *Synechocystis*.**

Dargestellt sind nur 40 Aminosäuren mit der publizierten Bindestelle des T-Proteins Asp<sup>292</sup> (Okamura-Ikeda et al. 2010, rote Markierung) für die Interaktion mit dem H-Protein. Der vollständige Vergleich ist unter 7.6 dargestellt. Der Vergleich wurde mit Hilfe des Programms BioEdit und der Matrix Blosum62 erstellt.

#### 4.1.5. Simultane Expression aller GCS-Proteine in *E. coli* mittels DUET-Vektoren

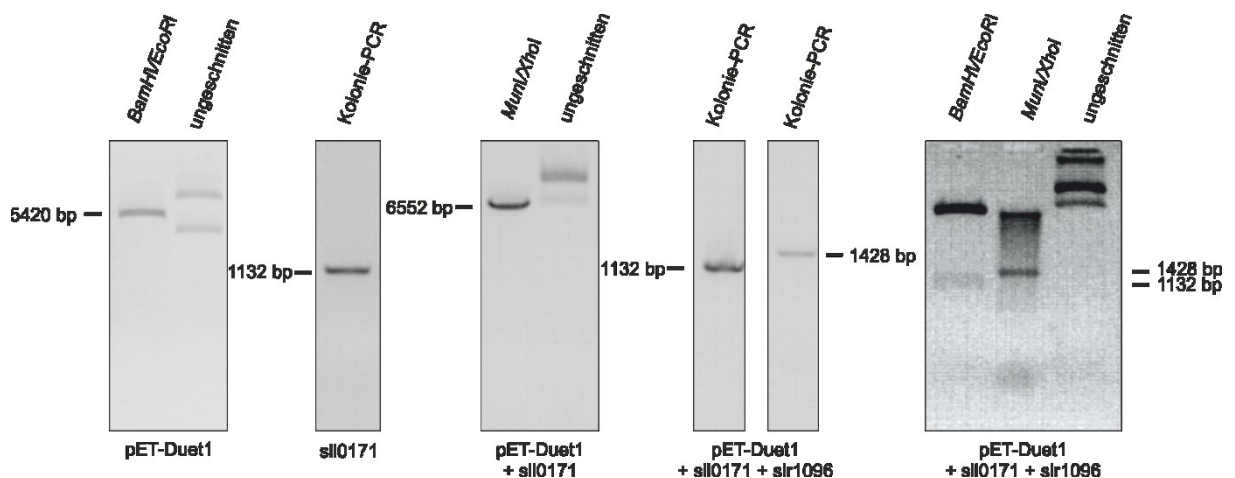
Bei der Untersuchung von Proteinkomplexen, kann die gleichzeitige Expression aller Komplexpartner hilfreich sein. Aus diesem Grund wurde das DUET-Vektor-System von Novagen® genutzt, um alle vier GCS-Proteine in derselben *E. coli*-Zelle zu exprimieren. Für diese Arbeit wurden die *Synechocystis*-Proteine wie folgt zusammen kloniert und exprimiert: das H-Protein mit dem P-Protein in den pACYC-Duet1-Vektor und das T-Protein mit dem L-Protein in pET-Duet1-Vektor. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter 3.1.4 dargestellt und die Methoden für die Klonierung unter 3.2. Die Expressionsbedingung sind unter 3.2.13 beschrieben. Das anschließend aus den Zellen gewonnene Lysat wurde in erster Linie für die Analysen mittels Größenausschlusschromatographie genutzt.





**Abbildung 16:** Übersicht über den Klonierungsnachweis der in den pACYC-Duet1 ligierten DNA-Fragmente von *slr0879* und *slr0293*.

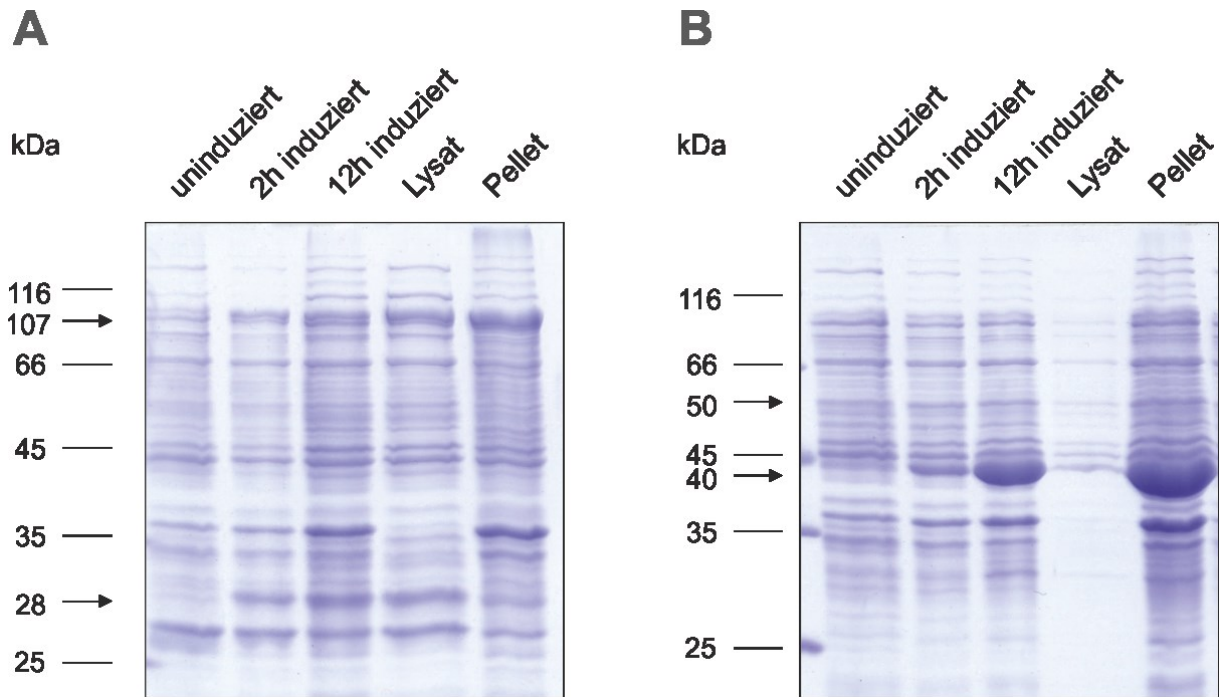
Die Übersicht zeigt, dass beide Fragmente vollständig in den Vektor ligiert wurden. Die verwendeten Restriktionsenzyme waren: *NdeI* und *XhoI* für das H-Protein (*slr0879*, 400 bp) und *BamHI* und *PstI* für das P-Protein (*slr0293*, 2963 bp). Obwohl das H-Protein Gen mittels Kolonie-PCR nachgewiesen werden konnte, war es nicht möglich es mittels Restriktion ebenfalls nachzuweisen.



**Abbildung 17:** Übersicht über den Klonierungsnachweis der in den pET-Duet1 ligierten DNA-Fragmente von *slI0171* und *slr1096*.

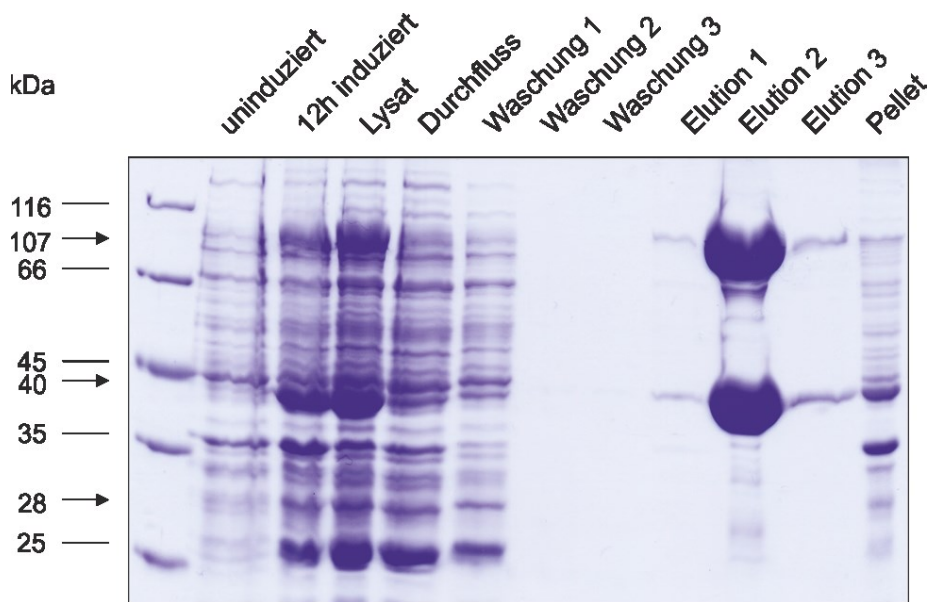
Die Übersicht zeigt, dass beide Fragmente korrekt in den Vektor ligiert wurden. Die verwendeten Restriktionsenzyme waren: *BamHI* und *EcoRI* für das T-Protein (*slI0171*, 1132 bp) und *MunI* und *XhoI* für das L-Protein (*slr1096*, 1428 bp).

Nach der erfolgreichen Klonierung erfolgte der Nachweis der simultanen Expression aller Proteine.



**Abbildung 18: Testexpression für beide Konstrukte. (A) pACYC-Duet1 mit H-Protein und P-Protein (B) pET-Duet1 mit T-Protein und L-Protein.**

Die Testexpression beider Konstrukte zeigt, dass das H- (28 kDa), T- (40 kDa) und P-Protein (107 kDa) sichtbar nach der Induktion exprimiert wurden. Die Expression des L-Proteins konnte nicht nachgewiesen werden. Nach der Kombination beider Plasmide, war die Expression des T- und P-Proteins deutlich verstärkt und beide Proteine konnten gereinigt werden. Das H-Protein wurde ebenfalls exprimiert, ist jedoch nicht an einen *his-tag* gekoppelt (*s-tag*) und konnte somit nicht an die NI-NTA binden. Trotz des nicht nachweisbaren L-Proteins wurde der gezeigte Expressionsstamm zur Analyse von Subkomplexen verwendet. Zur Analyse eines möglichen Gesamtkomplexes wurde das separat heterolog exprimierte L-Protein vor der Analyse zum Lysat hinzugegeben und der Ansatz für mindestens eine Stunde inkubiert.



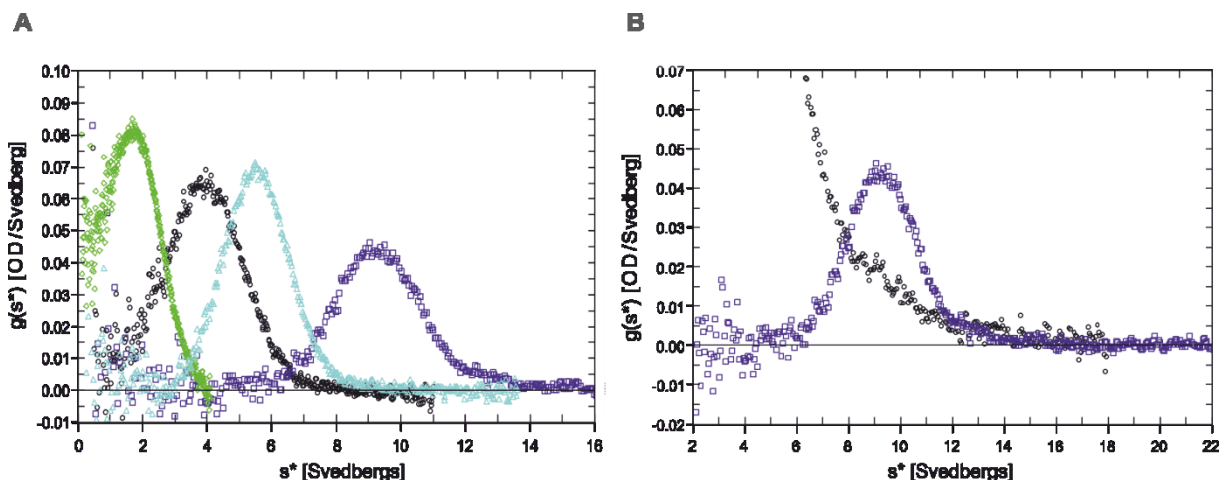
**Abbildung 19: Expression und Reinigung mittels NI-NTA des T- und P-Proteins aus dem Expressionsstamm mit *slr0879-slr0293*-pACYCDuet-1 und *slr0171-slr1096*-pET-Duet-1.**

#### 4.1.6. Analytische Ultrazentrifugation der *Synechocystis* GCS-Proteine

In Heidelberg erfolgte nach der Analyse der einzelnen GCS-Proteine per SEC in Tris-NaCl-Puffer die Untersuchung der Proteine mittels Analytischer Ultrazentrifugation (AUZ). Nach der SEC war die Proteinkonzentration in den jeweiligen Fraktionen sehr klein, so dass nur noch die Analyse in Tris-NaCl-Puffer durchgeführt werden konnte und nicht mehr in GDC-Puffer. Eine erneute Aufreinigung der Proteine in Heidelberg zur Wiederholung des Versuches in GDC-Puffer war nicht erfolgreich.

Mit Hilfe der AUZ konnten die GCS-Proteine unabhängig von ihrer individuellen Form hinsichtlich ihrer Größe analysiert werden. Abbildung 20 zeigt die Zusammenfassung der Einzelläufe für jedes Protein. Zu sehen ist, dass die Proteine entsprechend der Erwartung migrieren, weshalb sich die Unterschiede zwischen der erwarteten Größe und der im Tris-NaCl-Puffer gemessenen Größe während der SEC-Analysen auf die Form der Proteine zurückführen lassen. Während das P-Protein (lila, die Abbildungen wurden von Dr. Norbert Mücke zur Verfügung gestellt) mit einem Sedimentationskoeffizienten von 9,3 S\* am schnellsten sedimentiert, braucht das H-Protein (grün, 1,8 S\*) entsprechend länger. Da für das T-Protein die Fraktion mit dem geringsten Anteil an H-Protein gewählt wurde, ist im AUZ-Lauf nur ein Peak erkennbar. Die berechneten Größen sind in Tabelle 27 dargestellt. Zusätzlich wurde im gleichen Puffer ein AUZ-Lauf durchgeführt, in dem alle GCS-Proteine im Verhältnis der Filtrationsversuche enthalten waren (siehe 3.2.15), um eine evtl. Komplexbildung nachzuweisen. Das Ergebnis dafür ist in Abbildung 20B dargestellt. Zu

sehen ist, dass kein Protein oder Proteinkomplex mit einem höheren Sedimentationskoeffizienten detektiert werden konnte als der des P-Proteins.



**Abbildung 20:** Darstellung des Sedimentationskoeffizienten der GCS-Proteine in Abhängigkeit der S-Verteilung ( $g/s^*$ ).

Der Sedimentationskoeffizient ergibt sich dabei aus der Verteilung der Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt in Abhängigkeit von der Winkelgeschwindigkeit. Dabei gilt, je größer das zu messende Protein, desto schneller sedimentiert es bei der gewählten Winkelgeschwindigkeit. **A:** Übersicht der Sedimentationskoeffizienten der einzelnen GCS-Proteine im Tris-Puffer. Die einzelnen GCS-Proteine migrieren innerhalb der AUZ wie anhand der Tertiärstruktur vorausgesagt. (grün – H-Protein, schwarz – T-Protein, blau – L-Protein; lila – P-Protein). **B:** Abbildung des Sedimentationskoeffizienten des P-Proteins (lila) im Vergleich zur Probe mit allen GCS-Proteinen (schwarz). Die Probe mit allen GCS-Proteinen im Tris-Puffer zeigte keinen Proteinkomplex mit höherem Sedimentationskoeffizienten als dem des P-Proteins.  $s^*$  bedeutet, dass die Berechnung mit den tatsächlichen Größen der Proteine (inklusive *tag*) durchgeführt wurden.

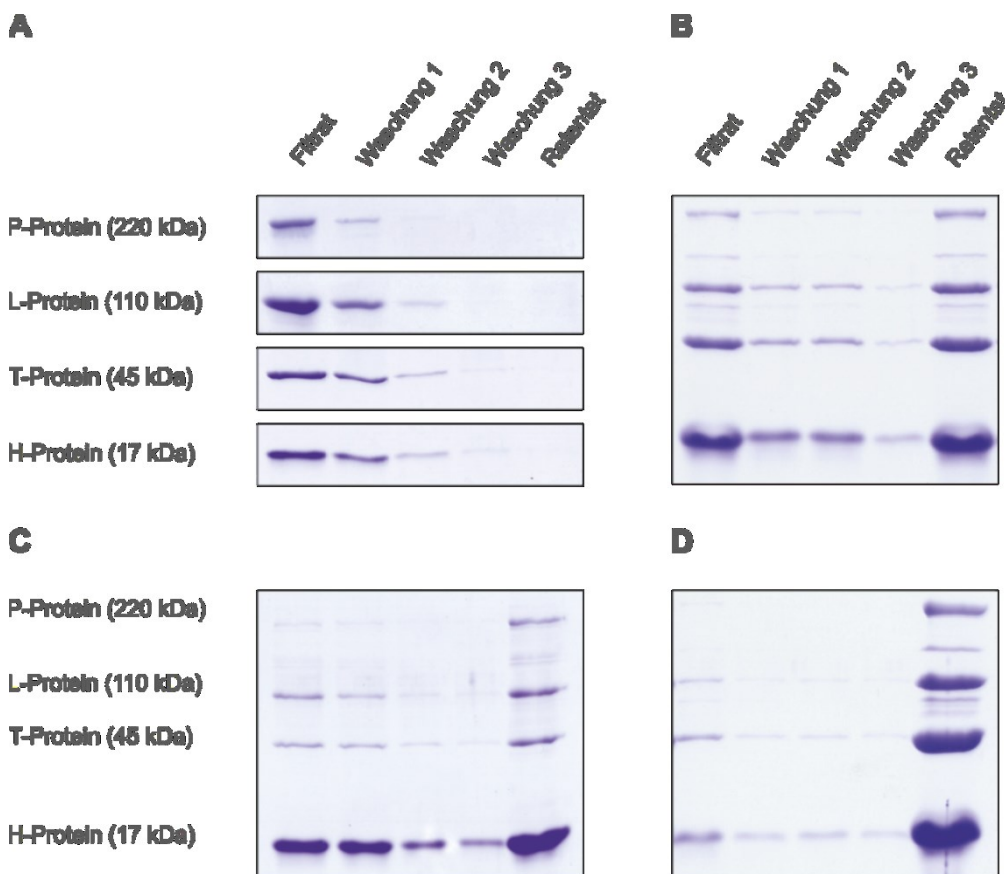
**Tabelle 27:** Übersicht über die berechneten molekularen Massen der GCS-Proteine mittels des Sedimentationskoeffizienten [ $S^*$ ].

Protein	MW <sub>[erwartet]</sub>	$S^*$ [Svedberg]	MW <sub>[berechnet]</sub>
P-Dimer	210 kDa	9,3	197 kDa
L-Dimer	100 kDa	5,6	107 kDa
T-Monomer	45 kDa	4,1	43 kDa
H-Monomer	14 kDa	1,8	16 kDa

## 4.2. Komplexbildung

### 4.2.1. Filtration der GCS-Proteine durch einen 300 kDa *cut-off* Filter

Die Filtration durch einen 300 kDa *cut-off* Filter wurde unter komplexfördernden Pufferbedingungen durchgeführt, um, wie zuvor bei Pflanzenmitochondrienextrakten gezeigt (Oliver et al. 1990b), die Interaktion der *Synechocystis* GCS-Proteine miteinander zu untersuchen. Dadurch sollte ein erster Hinweis auf eine mögliche Komplexbildung erhalten werden. 300 kDa wurden als *cut-off* Größe gewählt, da jedes Protein einzeln kleiner ist als 300 kDa. Das P-Protein Dimer mit 214 kDa ist dabei das größte Protein. Erst eine Verbindung der Einzelproteine miteinander führt zu einer Proteinstruktur größer als 300 kDa und somit zu einem Verbleib von Proteinen oberhalb der Membran (Retentat - R). Ungebundene Proteine können die Membran passieren und finden sich entweder in einer Waschfraktion (W) oder dem initialen Filtrat (F).



**Abbildung 21:** Ergebnisse der Filtrationsversuche durch einen 300 kDa *cut-off* Filter.

**A:** Negativkontrollen der einzelnen GCS-Proteine. **B:** Die direkte Filtration der kombinierten Proteine ohne zusätzliche Inkubation zeigt, dass ca. 33 % der Proteine im Retentat verbleiben. **C:** Die Kombination der Proteine inkl. 10 min Inkubation mit anschließender Filtration führt zu einer Komplexbildung aller GCS-Proteine, wodurch ca. 37 % der Proteine im Retentat verbleiben. **D:** Die Kombination der Proteine mit einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur führt zum Verbleib von ca. 55 % der initial geladenen Proteine im Retentat.

Abbildung 21A zeigt die Negativkontrolle für die Filtration der jeweiligen GCS-Einzelproteine. Um sicherzustellen, dass weder eine Aggregation der Proteine vorliegt noch, dass diese in der Lage sind mit dem Filtermaterial (Polyethersulfon) zu interagieren, wurden die Proteine zunächst einzeln durch die Membran mit einem Größenausschluss von 300 kDa filtriert. Die SDS-PAGE der jeweiligen Fraktionen zeigt, dass alle Proteine in der Lage sind vollständig die Membran zu passieren und kein Protein im Retentat verbleibt. Wurden die Proteine gemischt und anschließend direkt filtriert oder vor der Filtration 10 bzw. 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann filtriert, zeigt sich das Ergebnis aus den Abbildung 21B-D. Weiterhin sind ungebundene Proteine in der Lage die Membran zu passieren (demnach ist die Membran nicht blockiert und nicht alle Proteine interagieren miteinander), jedoch verbleibt ein deutlicher Anteil der Proteine selbst nach der dritten Waschung im Retentat. Der zeitliche Vergleich zeigt dabei, dass eine Inkubation von nur 10 min bereits zum Auftreten interagierender Proteine führt (ca. 33 - 37 %, siehe Tabelle 28). Wird das Proteingemisch vor der Filtration 60 min inkubiert, so steigert sich der prozentuale Anteil der miteinander interagierenden Proteine auf ca. 55 %.

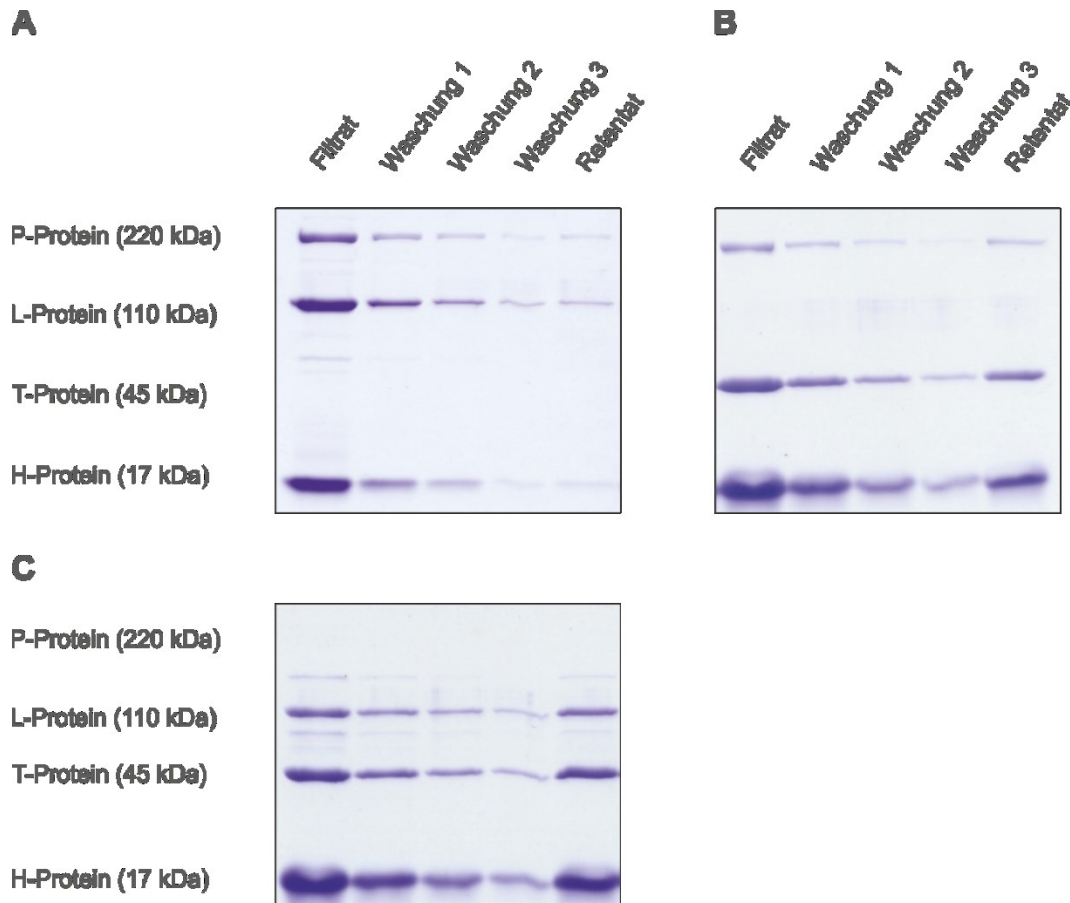
Das bedeutet, dass die GCS-Proteine zwar in der Lage sind schnell aneinander zu binden, diese Menge im Laufe der Zeit aber noch zunimmt. Aus der Tabelle 28 wird deutlich, dass der prozentuale Anteil der GCS-Proteine im Retentat nach 1 h um ca. 20 % erhöht ist und sich somit beinahe verdoppelt hat.

**Tabelle 28: Übersicht über die prozentualen Anteile der einzelnen GCS-Proteine im Retentat nach der Filtration durch eine 300 kDa *cut-off* Membran.** Berechnet wurde jeweils der molare prozentuale Anteil an der insgesamt gefilterten Proteinmenge.

Protein	Anteil des jeweiligen GCS-Proteins in %		
	0 min Inkubation Abbildung 21B	10 min Inkubation Abbildung 21C	60 min Inkubation Abbildung 21D
<b>P-Protein</b>	2,5	2,75	5,2
<b>L-Protein</b>	5,1	4,15	8,6
<b>T-Protein</b>	7,9	3,74	14,9
<b>H-Protein</b>	17,2	25,9	25,9
<b>Σ</b>	32,9	36,5	54,6

Neben dem zeitlichen Aspekt wurde auch geprüft, welche der einzelnen GCS-Proteine für die Interaktion essentiell sind. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 dargestellt. Ein Versuch ohne H-Protein war dabei nicht möglich, da das T-Protein auf Grund seines hohen Aggregationspotentials immer zusammen mit dem H-Protein exprimiert und gereinigt werden musste.





**Abbildung 22: Ergebnisse der Filtrationsversuche durch eine 300 kDa cut-off Membran mit jeweils drei der vier GCS-Proteine und 10 min Inkubation.**

**A:** Filtration der Proteine ohne das T-Protein. Ohne die Zugabe von T-Protein ist keine größere Menge an Protein im Retentat zu verzeichnen (10 %), woraus eine Notwendigkeit des T-Proteins für die Komplexbildung *in vitro* vermutet werden kann. **B:** Filtration der Proteine ohne das L-Protein. Die Kombination der GCS-Proteine ohne das L-Protein zeigt eine geringe Menge der Proteine im Retentat und deutet damit auf keine essentielle Funktion des L-Proteins bei der Komplexbildung hin (19 %). **C:** Filtration der Proteine ohne das P-Protein. Die Kombination der GCS-Proteine ohne das P-Protein zeigt das gleiche Ergebnis wie ohne das L-Protein (22,5 %).

Abbildung 22A zeigt, dass ohne das T-Protein, die anderen GCS-Proteine wieder in der Lage sind, vollständig die Membran zu passieren. Verglichen mit dem Filtrat und den Waschungen verbleiben nur 10 % der Proteine im Retentat. Diese Menge kann vermutlich mit einem weiteren Waschschrift ebenfalls entfernt werden. Somit scheint das T-Protein und /oder eine ausreichende Menge an H-Protein auf Grund der simultanen Expression für die Interaktion der GCS-Proteine *in vitro* entscheidend zu sein.

Anders verhält es sich, wenn entweder kein L- (Abbildung 22B, 19 %) oder P-Protein (Abbildung 22C, 22 %) im Ansatz enthalten sind. Wie für den Versuch mit allen vier Proteinen verbleibt ein deutlicher Anteil an Proteinen (siehe Tabelle 29) im Retentat und ist somit zur Interaktion fähig, wodurch diese die Membran nicht mehr passieren können. Das P-,

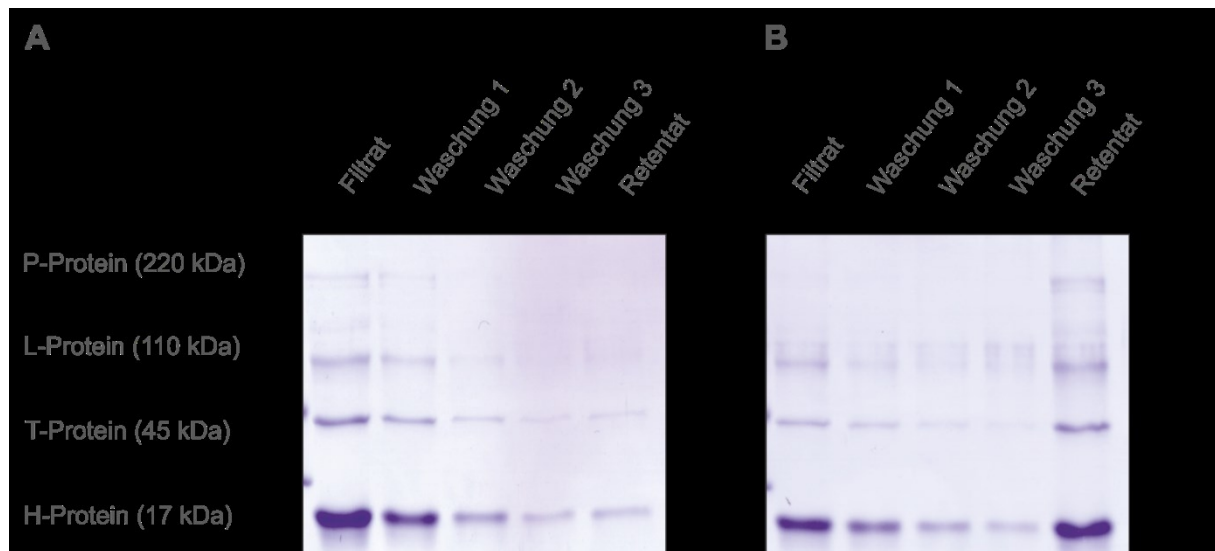
T- und H-Protein sind also in der Lage ohne das L-Protein eine Substruktur zu bilden. Auffällig ist jedoch, dass ein wesentlich geringerer Anteil an Proteinen im Überstand verbleibt als in der Probe mit allen vier Proteinen (33 %). Daraus kann die Hypothese aufgestellt werden, dass das T- und /oder eine ausreichende Menge an H-Protein unbedingt vorliegen muss, um Komplexbildung *in vitro* zu initiieren und gleichzeitig das Fehlen des L- oder P-Proteins die Komplexbildung zwar reduziert aber nicht komplett verhindert.

**Tabelle 29: Übersicht über die prozentualen Anteile der einzelnen GCS-Proteine in den Retentaten nach der Filtration durch eine 300 KDa cut-off Membran.** Berechnet wurde jeweils der molare prozentuale Anteil an der insgesamt gefilterten Proteinmenge.

Protein	Anteil des jeweiligen GCS-Proteins in %		
	ohne T-Protein Abbildung 22A	ohne L-Protein Abbildung 22B	ohne P-Protein Abbildung 22C
<b>P-Protein</b>	2,0	1,2	-
<b>L-Protein</b>	5,4	-	2,8
<b>T-Protein</b>	-	4,9	5,6
<b>H-Protein</b>	2,7	12,8	14,1
<b>Σ</b>	10	19	22,5

Um zu überprüfen ob das fehlende T- oder eine zu geringe Menge an H-Protein die Komplexbildung *in vitro* verhindert, wurde eine initiale Analyse mit steigender Menge an H-Protein durchgeführt. Abbildung 23 zeigt das unterschiedliche Filtrationsverhalten identischer Proben in denen ausschließlich die Menge an zugegebenem H-Protein variiert wurde. Während der Filtrationsansatz in Abbildung 23A 1,1  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  H-Protein enthielt und keine Komplexbildung initiiert werden konnte, waren es in Abbildung 23B 1,4  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  H-Protein und eine entsprechende Menge aller GCS-Proteine verblieb im Retentat. Daraus kann geschlossen werden, dass eine ausreichende Menge an H-Proteinen zumindest ein entscheidender Faktor bei der *in vitro* Komplexbildung darstellt. Um das T-Protein als essentiell nachweisen zu können, sollte zukünftig der Versuch aus Abbildung 22A mit steigender Menge an H-Protein wiederholt werden.

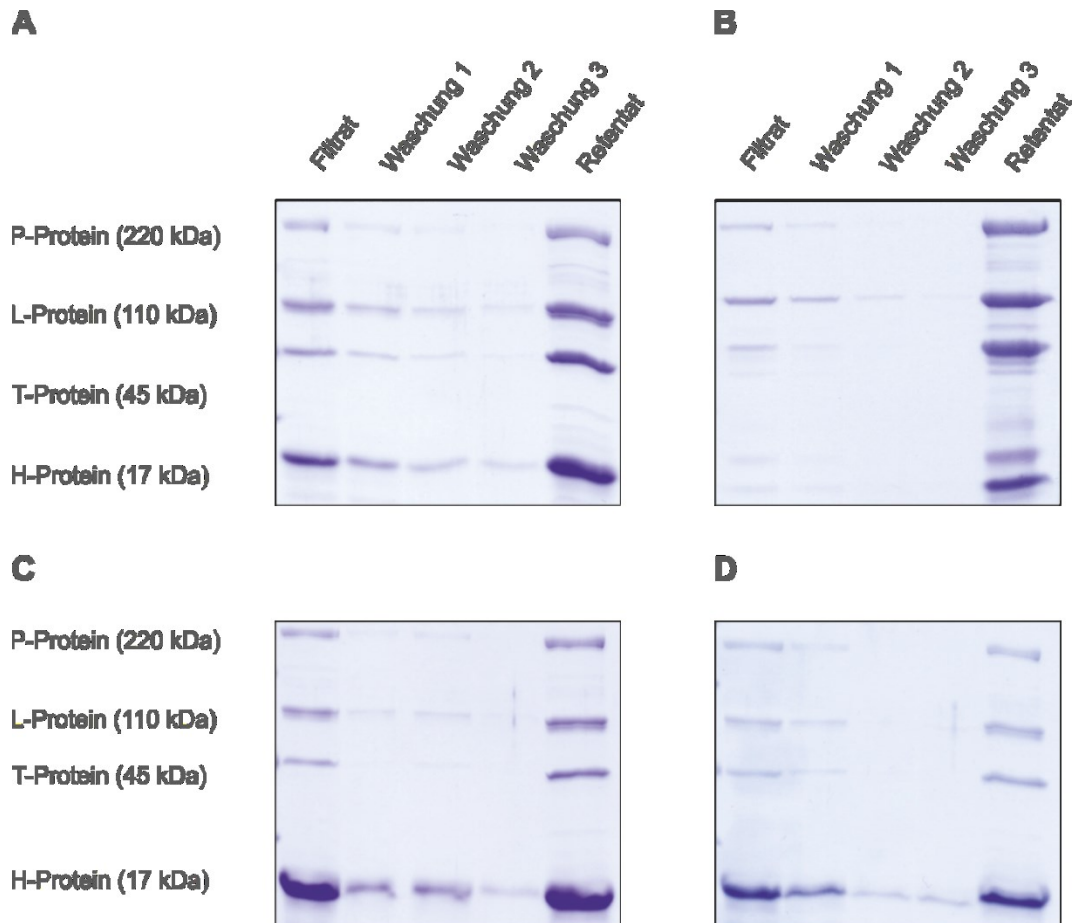




**Abbildung 23: Ergebnisse der Filtrationsversuche durch eine 300 kDa *cut-off* Membran in Abhängigkeit der initial zugegebenen Menge an H-Protein.**

**A:** Die Probe enthielt alle rekombinanten GCS-Proteine in folgenden Konzentrationen:  $0,1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  P-Protein,  $0,3 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  L-Protein,  $0,3 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  T-Protein und  $1,1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  H-Protein. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die Probe wie unter 3.2.15 beschrieben filtriert. **B:** Die Probe enthielt alle rekombinanten GCS-Proteine in folgenden Konzentrationen:  $0,1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  P-Protein,  $0,3 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  L-Protein,  $0,3 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  T-Protein und  $1,3 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  H-Protein. Nach 10 minütiger Inkubation wurde die Probe wie unter 3.2.15 beschrieben filtriert.

Zuletzt wurde getestet, inwiefern der Cofaktor des P-Proteins, Pyridoxal-5-Phosphat, die prosthetische Gruppe des H-Proteins oder die Zugabe eines Reduktionsmittels (Dithiothreitol, DTT) zur Komplexbildung beitragen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass weder PLP, noch die Zugabe von DTT einen Einfluss auf die Komplexbildung in den Ultrafiltrationsexperimenten hatten. Der Anteil an verbliebenen Proteinen im Retentat mit H-Protein ohne Liponsäure ist dagegen deutlich erhöht (siehe Tabelle 30: 56 % statt 36,5 %). Damit scheint die prosthetische Gruppe des H-Proteins nicht direkt an der Komplexinteraktion beteiligt zu sein.



**Abbildung 24:** Ergebnisse der Filtrationsversuche durch eine 300 kDa *cut-off* Membran in Abhängigkeit von PLP, DTT und Liponsäure.

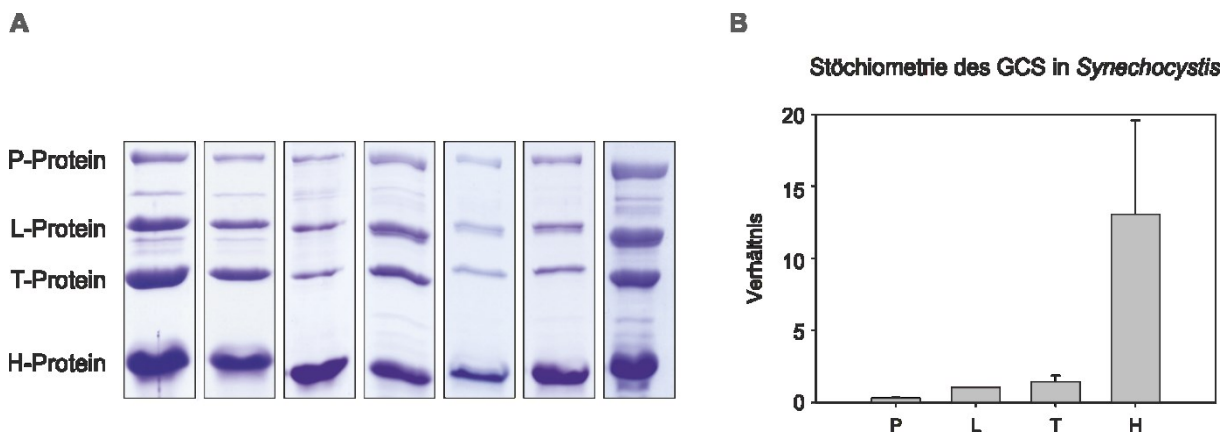
**A:** Filtration ohne zusätzliches PLP. Ohne die Zugabe von zusätzlichem PLP zeigt sich keine Veränderung in der Verteilung der Proteine zwischen den Proben. **B:** Kombination mit einem nur geringfügig lipoylierten H-Protein. Wie in der positiven Kontrolle mit nahezu vollständig lipoyliertem H-Protein verbleibt ein großer Teil der Proteine im Retentat. **C-D:** Vergleich zwischen Filtrationen mit (C) und ohne (D) DTT. Die Zugabe von 13 mM DTT hat keinen Einfluss auf den Verbleib der Proteine im Retentat. Die angegebenen Proteingrößen beziehen sich jeweils auf die native Struktur.

**Tabelle 30:** Übersicht über die prozentualen Anteile der einzelnen GCS-Proteine in den Retentaten nach der Filtration durch eine 300 kDa *cut-off* Membran. Berechnet wurde jeweils der molare prozentuale Anteil an der insgesamt gefilterten Proteinmenge.

Protein	Anteil des jeweiligen GCS-Proteins in %			
	ohne PLP Abbildung 24A	H-Protein ohne LS Abbildung 24B	ohne DTT Abbildung 24C	mit DTT Abbildung 24D
<b>P-Protein</b>	4,2	13,2	3,4	2,1
<b>L-Protein</b>	9,5	18,5	5,2	3,8
<b>T-Protein</b>	9,2	16,1	4,1	4,2
<b>H-Protein</b>	16	8,5	20,9	20,4
<b>Σ</b>	38,9	56,3	33,6	30,5

#### 4.2.2. Stöchiometrie der *Synechocystis* GCS-Proteine *in vitro*

Die Analyse der *in vitro* Stöchiometrie des GCS aus *Synechocystis* erfolgte, indem mittels ImageJ die Bandenstärke der einzelnen GCS Proteine in den finalen Retentaten quantifiziert wurde (Abbildung 25A). Die relativen Intensitäten wurden mit den jeweiligen Molekularmassen der Proteine verrechnet (P: 107 kDa, L: 50 kDa, T: 41 kDa und H: 14 kDa). Abschließend erfolgte die Berechnung des Verhältnisses zum L-Protein um vergleichbare Werte zu den publizierten Daten aus Pflanzen zu erhalten (Neuburger et al. 1986; Oliver et al. 1990b). Das Ergebnis ist in Abbildung 25B dargestellt und zeigt ein Verhältnis von 1L:1,5T:0,5P:13H. Aus diesem Verhältnis lässt sich eine Stöchiometrie von  $2L_2:6T:1P_2:52H$  ableiten und eine Komplexgröße von ca. 1,3 MDa. Auf Grund der hohen Standardabweichung in der H-Protein Berechnung und dem Ergebnis aus der SEC, dass das H-Protein zur Trimerbildung neigt, wäre auch ein Verhältnis von  $2L_2:6T:1P_2:54H$  möglich. Eine Analyse der Komplexgröße mittels nativer oder BN PAGE war nicht erfolgreich.



**Abbildung 25: Die Berechnung der *in vitro* Stöchiometrie der GCS-Proteine aus *Synechocystis* mittels ImageJ.**

**A:** Übersicht über die zur Berechnung verwendeten Überstände aus den Filtrationsversuchen. Zur Auswertung wurde das Programm ImageJ verwendet. **B:** Grafische Darstellung des berechneten Verhältnisses. Aus den ImageJ-Berechnungen lässt sich ein Verhältnis von 1L:1,5T:0,5P:13H und eine mögliche Stöchiometrie von  $2L_2:6T:1P_2:52-54H$  ableiten. n=7

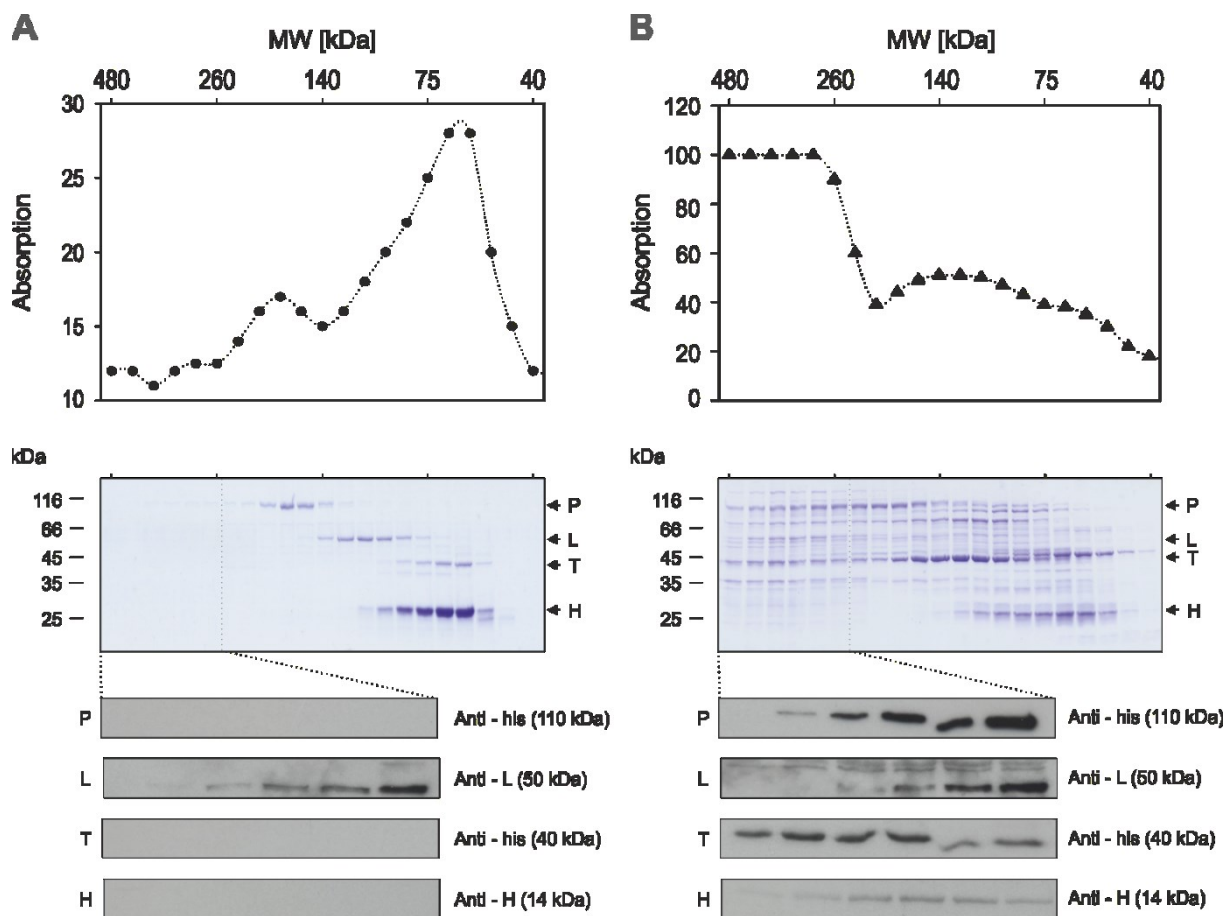
#### 4.2.3. Interaktionsstudien durch SEC

Als weitere Methode für die Untersuchung der Interaktion der GCS-Proteine wurde die Größenausschlusschromatographie (SEC) durchgeführt. Dazu wurde sowohl eine Kombination (siehe Filtration) der einzeln hergestellten rekombinanten Proteine, als auch ein *E. coli* Lysat in dem alle GCS-Proteine aus *Synechocystis* coexprimiert wurden, eingesetzt. Auch diese Analysen wurden unter den publizierten komplexfördernden Pufferbedingungen (Neuburger et al. 1986) durchgeführt. Wie zuvor bei den Filtrationsversuchen (3.2.15) wurden die rekombinanten Proteine nach der Reinigung im gleichen Verhältnis gemischt.

Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C und die SEC. Dabei sollte festgestellt werden, ob der GDC wie in den Filtrationsversuchen nachgewiesen auch bei stärkerer Verdünnung erhalten bleibt. Zusätzlich sollte die mögliche Größe des Komplexes eingegrenzt werden. Abbildung 26A zeigt das Elutionsprofil einschließlich SDS-PAGE mit den Fraktionen von 480 bis 40 kDa und den Immunoblots der Fraktionen von 480 bis 260 kDa. Das Elutionsprofil zeigt zwei markante Peaks, denen mit Hilfe der SDS-PAGE die einzelnen GCS-Proteine (Peak 1: ca. 200 kDa, P-Protein; Peak 2: ca. 65 kDa, H- und T-Protein) zugeordnet wurden. Im Bereich über 260 kDa wurde kein Peak aufgezeichnet und weder die SDS-PAGE noch die Immunoblots zeigen eine Akkumulation der GCS-Proteine in diesem Bereich. Somit gehen die Proteine vermutlich eine Interaktion ein, können diese aber auf Grund der Verdünnung nicht beibehalten. Den einzigen Unterschied zu den Einzelläufen zeigen das H- und T-Protein. Diese beiden Proteine eluieren später als erwartet, was auf eine kompaktere Struktur hindeuten könnte, die evtl. durch die anderen GCS-Proteine hervorgerufen wurde. Unklar ist, warum das L-Protein auch im hochmolekularen Bereich detektiert werden konnte, evtl. neigt das L-Protein unter den Bedingungen der SEC teilweise zur Aggregation oder Oligomerisierung.

Da *in vivo* die GCS-Proteine nicht unabhängig von anderen Proteinen vorkommen, wurde versucht die kompakte Situation innerhalb der Zelle während des SEC-Laufes zu simulieren. Dazu wurden mit Hilfe des DUET-Vektor-Systems alle GCS-Proteine gleichzeitig in *E. coli* exprimiert (siehe 4.1.5). Dadurch sollte im hochmolekularen Bereich während der SEC-Elution ein *makromolecular crowding* Effekt erzielt (zusammengefasst in Kuznetsova et al. 2014) und die instabile Interaktion der gereinigten Proteine stabilisiert werden. Da die Expression des H- und L-Proteins in den pDUET-Vektoren verhältnismäßig gering war, wurden diese beiden Proteine dem Lysat vor der Elution noch zusätzlich zugefügt. Das Ergebnis ist in Abbildung 26B dargestellt. Das Elutionsprofil verdeutlicht, dass im hochmolekularen Bereich (260 bis 480 kDa) eine hohe Konzentration an Molekülen (Proteine, DNA, RNA etc.) vorherrscht und somit ein *crowding* Effekt entsteht. Die unterhalb von 260 kDa abnehmende Proteinkonzentration ist im Vergleich mit der Konzentration aus Abbildung 26A auch bei kleineren Proteinmassen weiterhin erhöht. Dabei handelt es sich in erster Linie um endogene *E. coli* Proteine. Die SDS-PAGE der einzelnen Fraktionen zeigt jedoch bereits, dass eine erhöhte Menge an GCS-Proteinen vorhanden ist. Diese eluieren wie die gereinigten Proteine ebenfalls weitestgehend bei der erwarteten Größe. Da in der SDS-PAGE zwischen 260 und 480 kDa nicht zwischen rekombinanten GCS- und endogenen *E. coli*-Proteinen unterschieden werden kann, wurde für diesen Bereich ein Immunoblot mit

spezifischen Antikörpern gegen die einzelnen GCS-Proteine gemacht. Der *his-tag* Antikörper wurde zur gleichzeitigen Detektion des T- und P-Proteins verwendet und um zweifelsfrei das rekombinante *Synechocystis* Protein zu identifizieren. Das Vorhandensein aller GCS-Proteine im Bereich >260 kDa (das P-Protein einzeln eluiert bei 200 kDa) bestätigt eine Interaktion dieser Proteine. Diese Interaktion scheint durch den simulierten *macromolecular crowding* Effekt stabilisiert zu werden. Das bedeutet, dass die rekombinanten GCS-Proteine aus *Synechocystis* in der Lage sind, eine höhermolekulare Struktur zu bilden, die von der Gesamtkonzentration aller vorhandenen Proteine abhängig ist.



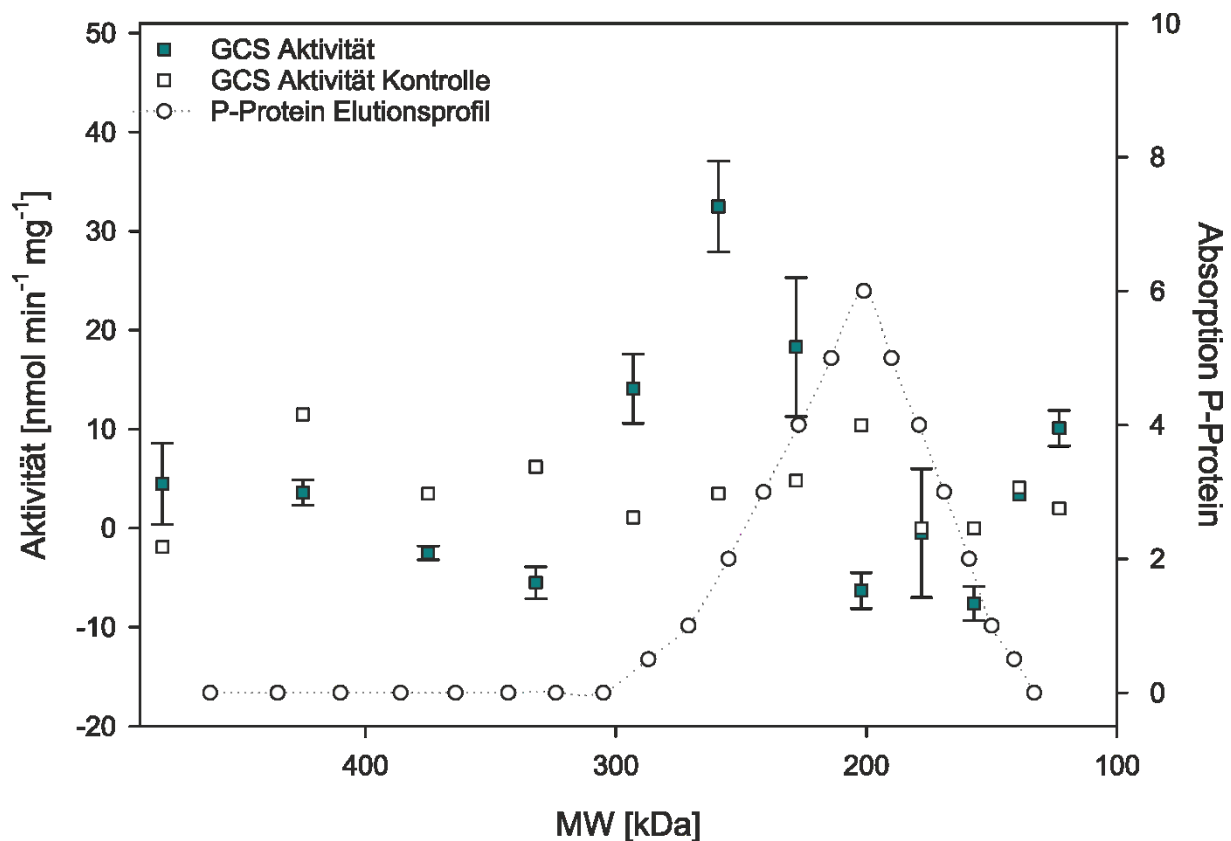
**Abbildung 26: Vergleich der Größenausschlusschromatographien von rekombinanten GCS-Proteinen und dem *E. coli* Lysat mit simultaner Expression aller Proteine.**

**A:** Die rekombinanten GCS-Proteine wurden nachträglich gemäß der Filtrationsversuche kombiniert, inkubiert und mittels SEC getrennt. Das Chromatogramm zeigt den höchsten Anteil an eluierten Proteinen nach 100 kDa und die SDS-PAGE zeigt die Verteilung der GCS-Proteine über alle eluierten Fraktionen. Der Immunoblot bestätigt, dass in den höher molekularen Fraktionen kein H-, T- oder P-Protein detektiert werden konnte. **B:** Das *E. coli* Lysat aus Zellen mit simultaner GCS-Expression, wurde mittels SEC aufgetrennt. Das Chromatogramm zeigt eine starke Absorption im hochmolekularen Bereich zwischen 260 und 480 kDa und später nochmal um 100 kDa. Die zugehörige SDS-PAGE zeigt eine breite Verteilung der eluierten Proteine. Der Immunoblot zeigt alle GCS-Proteine im Bereich über 220 kDa.

Auch das *Synechocystis* Wildtyp Zelllysate wurde per SEC analysiert. Allerdings war es mittels Immunoblot nicht möglich die GCS-Proteine zu detektieren. Dies ist vermutlich auf die geringe Abundanz der Proteine im Lysat zurückzuführen. Deshalb sind diese Ergebnisse nicht dargestellt.

#### **4.2.4. Die Gesamtaktivität des GCS aus *Synechocystis***

Nachdem die GCS-Proteine aus *Synechocystis* im hochmolekularen Bereich der SEC detektiert wurden, erfolgte die Überprüfung der enzymatischen Aktivität als Glycin-abhängige Bildung von NADH. Das Ergebnis ist in Abbildung 27 dargestellt und zeigt, dass in den Elutionsfraktionen GSC-Gesamtaktivität detektiert werden konnte (blaue Quadrate). Das Aktivitätsmaximum trat in den hochmolekularen Fraktionen vor dem P-Protein Peak (weiße Kreise) auf. Dabei handelt es sich um GCS-Aktivität der *Synechocystis* Proteine, da das Eluat des Kontrollstamms (transformiert mit den leeren pDUET-Vektoren, graue Quadrate) diese Aktivität nicht zeigt. Auf Grund der immunologischen Untersuchung dieser Fraktionen (siehe Abbildung 26B) und in Zusammenhang mit der hier detektierten Aktivität kann angenommen werden, dass es sich bei den GCS-Proteinen aus *Synechocystis* um eine aktive Komplexstruktur handelt. Des Weiteren zeigt dieses Ergebnis, dass das rekombinante *Synechocystis* T-Protein aktiv ist, auch wenn dessen Aktivität im Einzeltest nicht gezeigt werden konnte.



**Abbildung 27: Spezifische GCS-Gesamtaktivität in den Elutionsfraktionen der SEC-Analyse.**

Die Gesamtaktivität wurde als Glycin-abhängige Bildung von NADH in den hochmolekularen Elutionsfraktionen der SEC gemessen. Vergleichend mit der Aktivität des Expressionsstammes (blaue Quadrate) sind die Aktivität des leeren *E. coli* Kontrollstammes (graue Quadrate) und das Elutionsprofil des P-Proteins (weiße Kreise) dargestellt. Die GCS-Gesamtaktivität steigt in den Fraktionen vor dem einzelnen P-Protein an und deutet somit auf eine aktive Komplexbildung hin, bestehend aus allen vier Untereinheiten (siehe Abbildung 26). Proteinkonzentration im Assay: 0,01 – 0,02 mg ml<sup>-1</sup>, Expressionsstamm n≥2, Kontrollstamm n=1.

#### 4.2.5. *In vitro* Interaktionen der GCS-Proteine

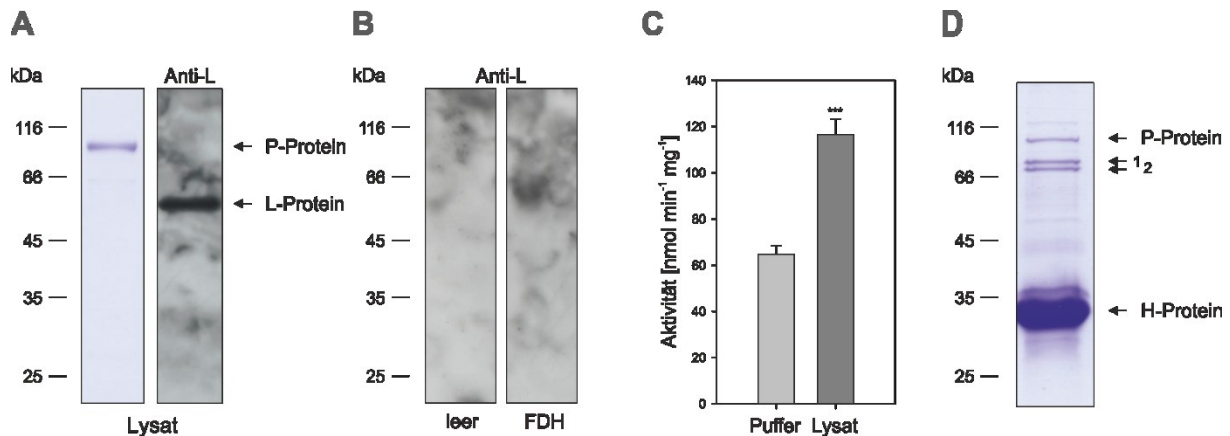
Eine gängige Methode für die Analyse möglicher Interaktionspartner eines bestimmten Proteins ist der Pulldown-Assay. Durch diese Methode kann untersucht werden, inwieweit ein spezifisches Protein mit weiteren Proteinen interagiert. Dazu wurde das P- bzw. das L-Protein mittels ihres *his-tags* an einer NI-NTA Matrix immobilisiert und diese anschließend mit Zelllysat des *Synechocystis* Wildtyps inkubiert. Nachdem durch Waschungen unspezifisch gebundene Proteine entfernt wurden, wurden das rekombinante Protein und die daran gebundenen Interaktionspartner mit Imidazol eluiert und die Elutionsfraktionen mittels Immunoblot und Massenspektrometrie analysiert. Im Anschluss wurde der Einfluss der gebundenen Proteine auf die jeweilige Aktivität des L- bzw. P-Proteins untersucht.

Abbildung 28A zeigt das Ergebnis des Pulldown-Versuches mit rekombinantem P-Protein als Köder. Während in der SDS-PAGE keine weiteren Proteine detektiert werden konnten, zeigt

die immunologische Untersuchung, dass das L-Protein aus dem cyanobakteriellen Lysat extrahiert werden konnte. Als Kontrollen wurden eine leere Matrix und eine mit rekombinanter Formate Dehydrogenase (FDH, *Pseudomonas* sp. 101, bereitgestellt von Shanshan Song) beladene Matrix mitgeführt, welche ebenfalls mit Lysat des *Synechocystis* Wildtyps inkubiert wurden. Die Kontrollen zeigen, dass das L-Protein weder an die leere Matrix noch an die mit FDH beladene Matrix unspezifisch bindet (Abbildung 28B). Daraus kann eine spezifische Interaktion zwischen P- und L-Protein postuliert werden. Die Untersuchung der P-Protein Aktivität (Methode siehe 3.2.21) ergab darüber hinaus, dass die mit Lysat inkubierte Probe eine 1,8-fach höhere P-Protein Aktivität aufweist als die mit Puffer inkubierte Probe (Abbildung 28C; Puffer:  $65 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ; Lysat:  $117 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Menge an P-Protein für die Messung der Aktivität mittels ImageJ und SDS-Gel ermittelt wurde. Bei sehr geringen Unterschieden in der Proteinkonzentration können hier Fehler auftreten. Die Ermittlung der Proteinmenge mittels Massenspektrometrie (siehe Tabelle 31) ergab eine doppelte Menge an P-Protein in der Lysat-inkubierten Probe. Es ist also möglich, dass der positive Effekt auf die P-Protein Aktivität ausschließlich auf die erhöhte Menge an P-Protein im Messansatz zurückzuführen ist.

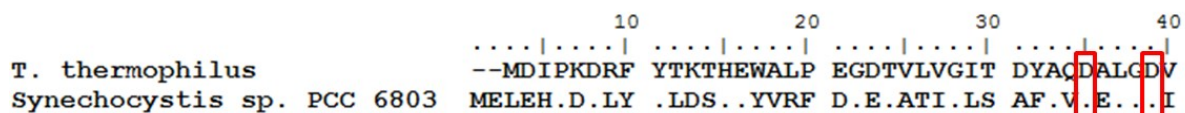
Ein weiterer Interaktionspartner des P-Proteins konnte mittels Coelution und anschließender SDS-PAGE detektiert werden. Bei der Reinigung des rekombinanten *Synechocystis* H-Proteins mittels IMAC konnte wiederholt beobachtet werden, dass neben dem H-Protein auch das P-Protein aus *E. coli* eluiert wurde (Abbildung 28D; die Identifikation mittels MS wurde von Dr. Stefan Mikkat durchgeführt). Da sowohl beim Pulldown als auch bei der Coelution während der Reinigung eine hohe Salzkonzentration vorherrscht (Waschung 40 mM Imidazol, Elution 300 mM Imidazol), müssen sowohl zwischen dem P- und H-Protein als auch zwischen dem P- und L-Protein starke hydrophobe Interaktionen bestehen, welche nicht durch Salz - wie für die pflanzliche GDC-Komplex-Interaktion publiziert (Neuburger et al. 1986) - getrennt werden können. Der Sequenzvergleich deutet darauf hin, dass die Interaktionsfläche des H-Proteins mit dem P-Protein vermutlich die gleiche ist, die für *Thermus thermophilus* von Nakai et al. 2003 publiziert wurde (siehe Abbildung 29).





**Abbildung 28: Übersicht über die Interaktionen des P-Proteins mit weiteren GCS-Proteinen.**

**A:** Pulldown mit dem rekombinanten P-Protein als Köder. Mittels Immunoblot konnte das L-Protein in der mit *Synechocystis* Lysat inkubierten Probe detektiert werden. **B:** Immunoblot der Kontrollen. Die Kontrollen mit leerer Matrix und Matrix mit FDH gesättigt zeigen, dass keine unspezifische Interaktion des L-Proteins mit der Matrix auftritt. **C:** Vergleichende P-Protein Aktivitätsmessungen zwischen der mit Puffer und der mit *Synechocystis* Lysat inkubierten Probe. Die Aktivität des P-Proteins war in der mit *Synechocystis* Lysat inkubierten Probe um das 1,8-fache erhöht.  $n=3$ ,  $***p<0,0001$ . **D:** Coelution des P- und H-Proteins während der Reinigung des H-Proteins. Bei der Reinigung des H-Proteins durch IMAC konnte in den Elutionsfraktionen das P-Protein (*E. coli*) mittels MS-Analyse (Dr. Stefan Mikkat) identifiziert werden. Die weiteren dominanten Proteinbanden entsprechen von oben nach unten der *E. coli* Glutamine-Fructose-6-Phosphat-Aminotransferase (1) und dem *E. coli* Polymyxin-Resistenz Protein (2).



**Abbildung 29: Sequenzvergleich der H-Proteinsequenzen von *Synechocystis* und *T. thermophilus*.**

Dargestellt sind die ersten 40 Aminosäuren der Proteine mit der konservierten Region II am Asp<sup>33</sup> und Asp<sup>37</sup> (Nakai et al. 2003; rote Markierungen). Der vollständige Vergleich ist unter 7.6 dargestellt. Der Vergleich wurde mit Hilfe des Programms BioEdit und der Matrix Blosom62 erstellt.

Zur Bestätigung der Proteinidentifikation mittels Immunoblots wurden die Elutionsfraktionen der Pulldown-Experimente zusätzlich mittels Proteomanalyse (HDMS<sup>E</sup> = *high-definition elevated energy*) analysiert (Dr. Stefan Mikkat). Das Ergebnis ist in Tabelle 31 dargestellt. Dabei zeigt sich deutlich eine spezifische Anreicherung des L-Proteins durch an die Säule gebundenes P-Protein. Im Vergleich zur Kontrolle ist die Menge an L-Protein mehr als 200-fach erhöht. Zusätzlich dazu ist auch die Menge an P-Protein leicht erhöht (2-fach). Neben dem L-Protein konnte mittels MS-Analyse auch das H-Protein als spezifischer Interaktionspartner des P-Proteins aus dem *Synechocystis* Lysat detektiert werden. Die Menge an H-Protein ist dabei um das 150-fache gegenüber der Pufferkontrolle erhöht. Dieses Ergebnis unterstützt die auf Grund der Coelution des rekombinanten *Synechocystis* H-Proteins

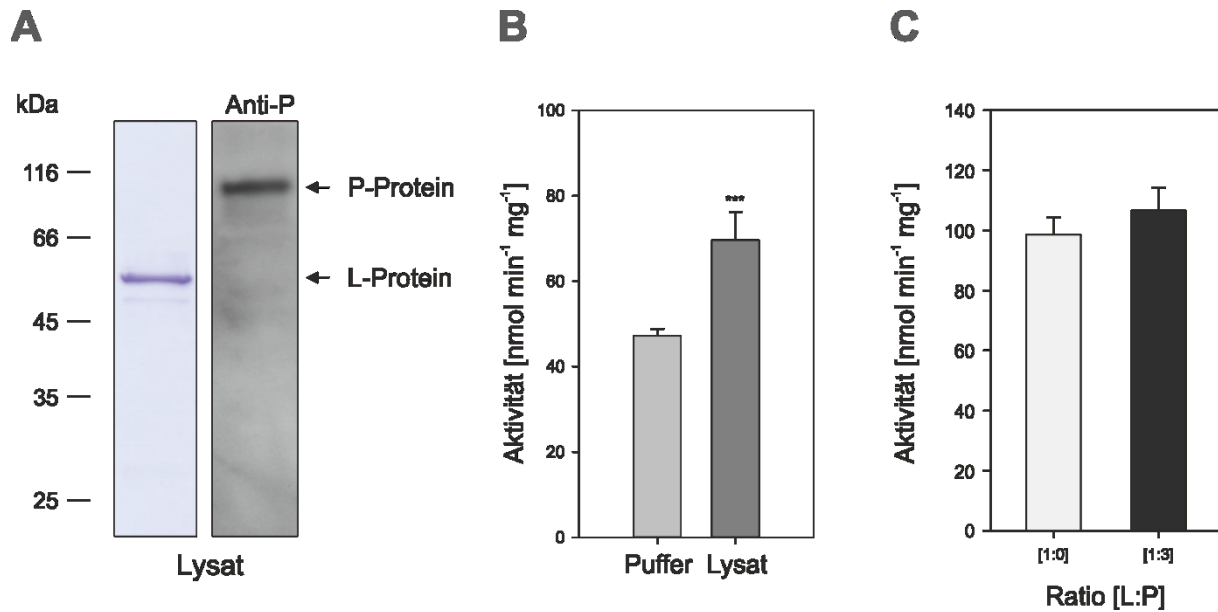
und des *E. coli* P-Proteins vermutete Wechselwirkung und könnte so auf eine stabile Substruktur aus P-, L- und H-Protein hindeuten. Zusätzlich dazu besteht die Möglichkeit, dass die Interaktion zwischen L- und P-Protein nicht direkt, sondern indirekt über das H-Protein stattfindet. Das T-Protein konnte nicht detektiert werden.

**Tabelle 31: Übersicht über die *Synechocystis* GCS-Proteine, die in der Elutionsfraktion des Pulldown-Versuches mittels MS detektiert werden konnten.**

Dargestellt sind jeweils die P- und L-Protein-Probe, welche mit Puffer inkubiert wurde im Vergleich zur Probe, welche mit Lysat des *Synechocystis* Wildtyps inkubiert wurde. Die Werte sind als relative Mengen angegeben inklusive des dazugehörigen *fold change*. n.d. = nicht detektiert. Vollständige Liste siehe Anhang 7.5.

Beschreibung	P-Protein			L-Protein		
	Puffer	Lysat	<i>fold change</i>	Puffer	Lysat	<i>fold change</i>
<b>L-Protein</b>	13,7	3.039	221	15.1375	183.065	1,2
<b>P-Protein</b>	5.066	10.526	2,1	122	302	2,5
<b>H-Protein</b>	0,0	150	150	811	4.533	5,6
<b>T-Protein</b>	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-

Im Vergleich zu den Versuchen mit *Synechocystis* P-Protein als Köder konnte in Pulldown-Experimenten mit gebundenem L-Protein nur eine geringe Anreicherung weiterer GCS-Proteine nachgewiesen werden (siehe Tabelle 31 sowie Abbildung 30): P-Protein 2,5-fach erhöht, H-Protein 5,6-fach erhöht. Das T-Protein konnte auch durch das L-Protein nicht gebunden werden. Trotz der mangelnden Interaktionen konnte die L-Protein Aktivität nach der Inkubation mit *Synechocystis* Lysat erhöht werden. Zieht man jedoch die MS-Analysen mit in Betracht, so hat sich die Menge an L-Protein verdoppelt, was die erhöhte spezifische Aktivität erklären könnte. Eine weitere Erklärung wäre, dass erst durch die Interaktion mit dem H-Protein ein positiver Aktivitätseffekt erzielt werden kann. Die Abwesenheit von T-Protein in den Pulldown-Fractionen könnte auch damit zusammenhängen, dass das *Synechocystis* T-Protein nicht in der löslichen Proteinfraction vorliegt (Dr. Stefan Mikkat, persönliche Mitteilung).



**Abbildung 30: Übersicht über die Interaktionen des L-Proteins mit weiteren GCS-Komponenten.**

**A:** Pulldown mit dem rekombinanten L-Protein als Köder. Mittels Immunoblot konnte das P-Protein in der mit *Synechocystis* Lysat inkubierten Probe detektiert werden. **B:** Vergleichende L-Protein-Aktivitätsmessungen zwischen der mit Puffer und der mit *Synechocystis* Lysat inkubierten Probe. Die Aktivität des L-Proteins war in der mit *Synechocystis* Lysat inkubierten Probe um das 1,5-fache erhöht.  $n=3$ , \*\*\* $p<0,005$ . **C:** L-Protein-Aktivitätsmessung inklusive des rekombinanten P-Proteins. Die L-Protein-Aktivität konnte nicht erhöht werden, wenn das Protein vor der Messung mit rekombinantem P-Protein im Verhältnis 1:3 für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

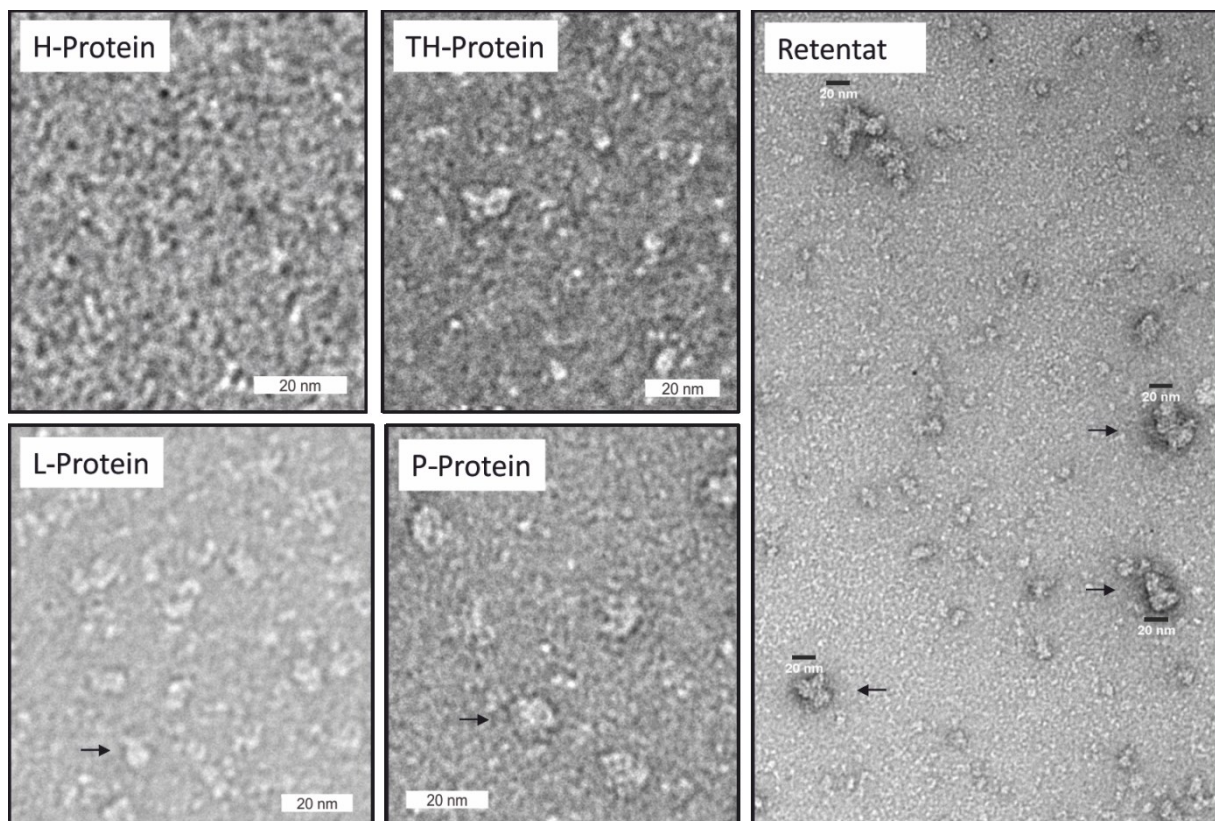
#### 4.2.6. Proteinstrukturvisualisierung mittels TEM und Negativkontrastfärbung

Die Negativkontrastfärbung (NKF) mit anschließender Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde durchgeführt, um die quartäre Struktur eines GCS-Komplexes zu visualisieren. Dazu wurde der Filtrationsversuch wie unter 3.2.15 beschrieben an der Universität Marburg durchgeführt und das so generierten Retentat ohne Verzug wie in 3.2.27 beschrieben und unter Anleitung von Dr. Thomas Heimerl auf ein Kupfernetz übertragen. Zur Kontrolle des Filtrationsüberstandes wurden auch die einzelnen GCS-Proteine aufgetragen und analysiert. Die entstandenen Bilder sind in Abbildung 31 dargestellt.

Detaillierte Strukturanalysen mittels NKF und TEM sind erst ab einer Größe von ca. 100 kDa möglich. Deshalb zeigten die Proben des H- und TH-Proteins keine unterscheidbaren Strukturen. Erst ab der Größe des L-Proteins (ca. 100 kDa) werden Strukturen erkennbar, die sich in Form (rund oder oval) und Größe unterscheiden lassen. Das ist auf die verschiedenen Ausrichtungen des Proteins auf dem Kupfernetz zurückzuführen. Die detaillierteste Auflösung konnte für das P-Protein erzielt werden. Die Abbildung zeigt deutlich das P-Protein in verschiedenen Ausrichtungen, die in Größe (Durchmesser von ca. 10 nm  $\triangleq$  ca.

100 Å) und Form mit der Kristallstruktur des P-Proteins aus *Synechocystis* übereinstimmen (Hasse et al. 2013).

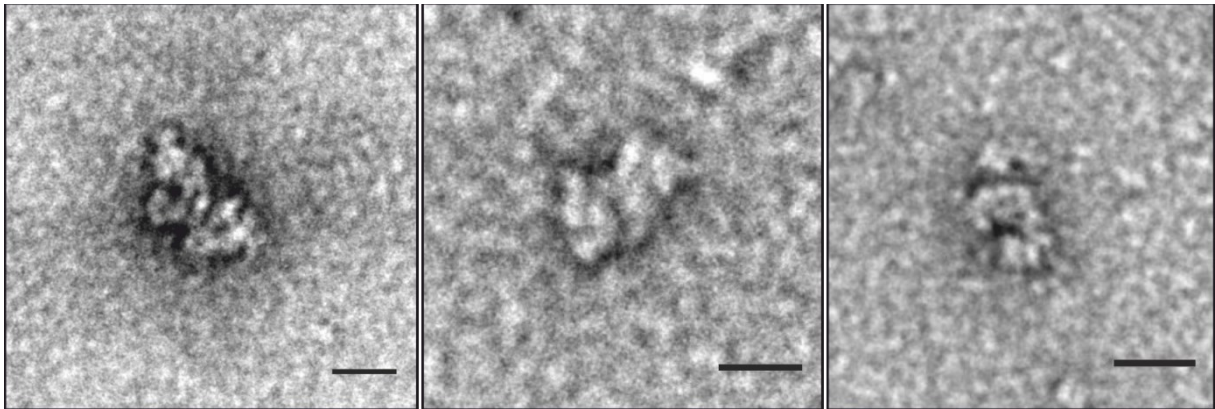
Der Vergleich zwischen den Einzelproteinen und den kombinierten Proteinen zeigt für letzteres eine sehr heterogene Probe. Zum einen sind eine Reihe kleinerer, vermutlich ungebundener Proteine zu erkennen. Diese lagen entweder nach der Filtration im Retentat noch ungebunden vor (siehe hierzu auch Abbildung 21) oder ein Teil der gebildeten Proteinkomplexe dissoziierte während der Verdünnung der Probe und der Überführung auf das Kupfernetz bereits wieder. Zusätzlich dazu sind in der Abbildung jedoch verschiedene größere Partikel erkennbar. Diese stellen Proteinkomplexe dar und zeigen mögliche Strukturen bzw. Substrukturen eines GDC der *Synechocystis* Proteine. Im Vergleich zum 20 nm Größenstandard (Abbildung 31 weißer Balken) ist zu erkennen, dass diese Strukturen größer sind als das P-Protein. Die unterschiedlichen Formen zeigen dabei verschiedene Ausrichtungen oder unterschiedliche Assemblierungen mit verschieden vielen gebundenen Proteinen.



**Abbildung 31: TEM-Aufnahmen der einzelnen GCS-Proteine und des Filtrationsretentats. Skala: 20 nm**

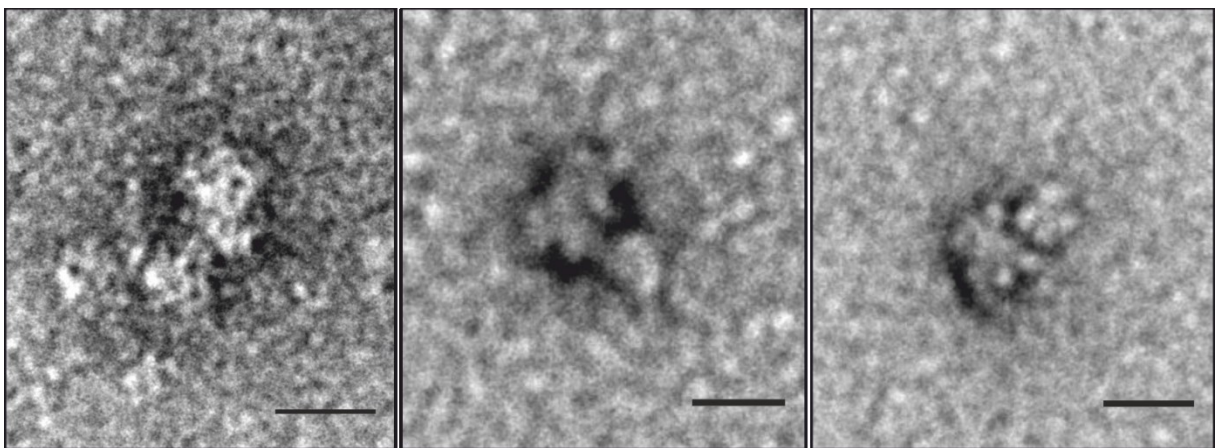


Die Untersuchungen mehrerer Kupfernetze (1:100 und 1:1000 Verdünnungen) zeigten wiederkehrende Formen von Partikeln. Eine genauere Analyse der größeren Strukturen zeigte, dass zwei Formen häufiger auftraten. Die erste ist in Abbildung 32 abgebildet. Sie zeigt eine längliche Struktur mit einer Verdickung in der Mitte und einem schmaler werdenden Verlauf zu jeder Seite. Auf Grund der Ähnlichkeit kann diese Struktur als „Schmetterlingsform“ bezeichnet werden.



**Abbildung 32: Detaillierte TEM-Aufnahmen einer möglichen Formation des GDC aus *Synechocystis*.** Die Abbildungen erinnern an die Form eines Schmetterlings. Skala 20 nm

Die zweite Struktur erinnert hingegen eher an einen Abbildung 33. Zu erkennen ist hierbei eine Art Schirm, der sich aus mehreren Proteinen zusammensetzen könnte und ein Stiel, der mittig aus diesem Schirm herausragt.



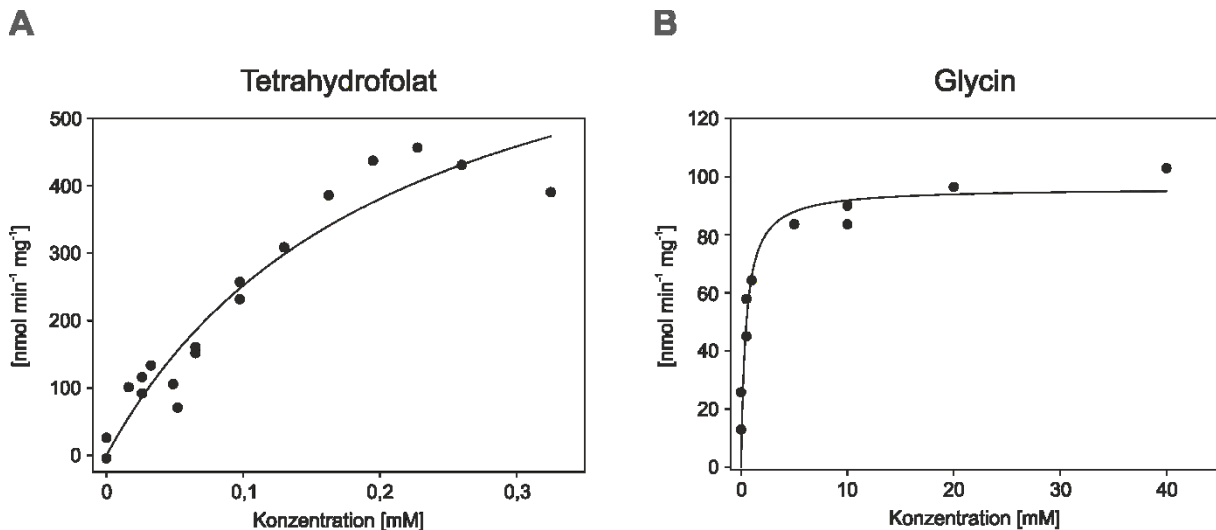
**Abbildung 33: Detaillierte TEM-Aufnahmen einer weiteren möglichen Formation des GDC aus *Synechocystis*.** Die Abbildungen erinnern an die Form eines Pilzes. Skala 20 nm

Da es sich bei den Proben um gereinigte rekombinante GCS-Proteine handelt, kann vermutet werden, dass es sich hierbei um eine Interaktion der *Synechocystis* GCS-Proteine in einer bzw. zwei (Sub-)Komplexstrukturen handeln könnte.

### 4.3. Der Glycinecarboxylase-Komplex aus *Pisum sativum*

Um einen Einfluss der Komplexbildung auf die Gesamtaktivität der GCS-Proteine zu analysieren, wurden Versuche mit isolierten Erbsenmitochondrien durchgeführt, da es bisher nicht gelungen ist die GCS-Aktivität der Fraktionen aus den Filtrationsversuchen zu ermitteln. Dazu wurde der Matrixextrakt von der Membranfraktion getrennt und anschließend durch eine 300 kDa *cut-off* Membran gefiltert, um so die ungebundenen von den assoziierten Proteinen zu trennen. Im Anschluss wurden die beiden Fraktionen hinsichtlich möglicher Unterschiede in der Gesamtaktivität der GCS-Proteine analysiert.

Zur Optimierung des Versuchsaufbaus, besonders für die Messung der Aktivität unter anaeroben Bedingungen, wurde die Gesamtaktivität in Abhängigkeit von der Glycin- und THF-Konzentration im Mitochondrienextrakt bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 34 zu sehen und die berechneten  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte sind in Tabelle 32 gelistet. Für die Messung der Gesamtaktivität konnte nicht die sättigende Konzentration von THF eingesetzt werden, weil THF schon ab einer Konzentration von 0,2 mM bei 340 nm für eine belastbare Auswertung zu stark absorbiert. Bei den folgenden Analysen wurde deshalb eine Konzentration von 0,14 mM THF eingesetzt. Für Glycin hingegen konnten sättigende Substratmengen von 20 mM eingesetzt werden. Entscheidend für die Untersuchungen der spezifischen GCS-Aktivität war die Arbeit unter anaeroben Bedingungen. Diese wurden erreicht indem der Messansatz in der Küvette 5 min mit Stickstoff begast wurde bevor das Sauerstoff-sensitive THF hinzugegeben wurde. Während der Messung wurde die Küvette, aber nicht der Messansatz, weiterhin kontinuierlich begast, um das Eindringen von Sauerstoff zu minimieren.



**Abbildung 34: GCS-Gesamtaktivität des ungefilterten Mitochondrienextraktes.**

**A:** Bestimmung der Enzymaktivität mit steigender Menge an Tetrahydrofolat. **B:** Bestimmung der Enzymaktivität mit steigender Menge an Glycin. Proteinkonzentration: 2,5 µg ml<sup>-1</sup>, n=2

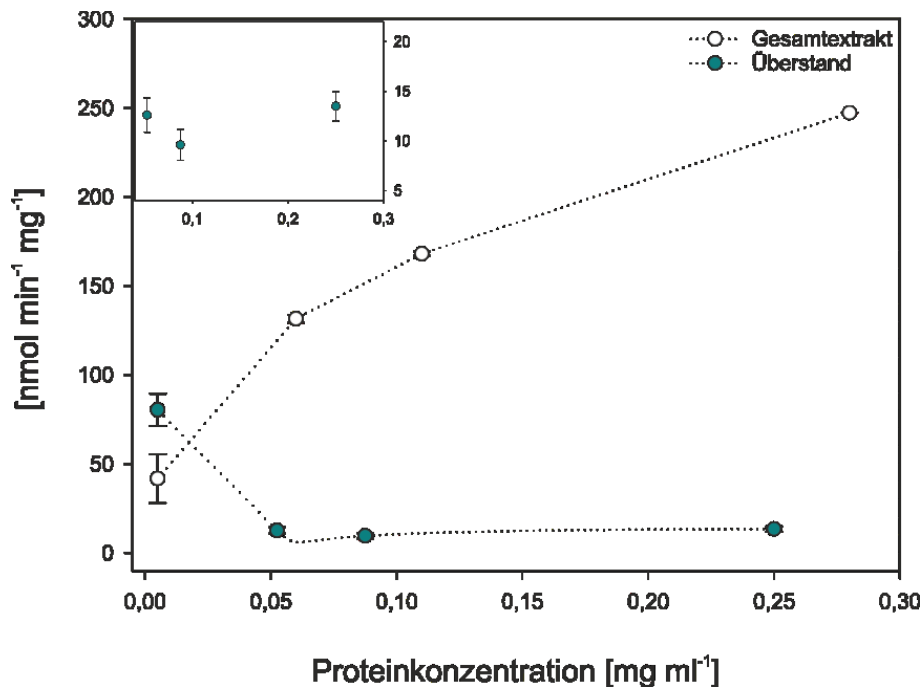
**Tabelle 32: Übersicht über die mittels Lineweaver-Burk berechneten K<sub>m</sub> und V<sub>max</sub>-Werte.**

	K <sub>m</sub> [mM]	V <sub>max</sub> [nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ]
Tetrahydrofolat	0,2	777
Glycin	0,5	96

Nach Etablierung der Testbedingungen wurde die Gesamtaktivität in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration bestimmt. Neuburger et al. postulierten 1986 eine steigende Enzymaktivität des GDC aus Erbsen mit steigender Proteinkonzentration. Da die Komplexbildung ab 0,25 mg ml<sup>-1</sup> Protein nahezu vollständig sein sollte (Oliver et al. 1990b), wurden Proteinkonzentrationen zwischen 0,005 und maximal 0,27 mg ml<sup>-1</sup> gewählt (siehe Abbildung 35). Das Ergebnis zeigt, dass im ungefilterten Gesamtextrakt die spezifische Enzymaktivität mit steigender Proteinkonzentration stark ansteigt (45 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> bei 0,005 mg ml<sup>-1</sup> verglichen mit 245 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> bei 0,27 mg ml<sup>-1</sup>).

Zusätzlich dazu wurde auch die Gesamtaktivität im Retentat nach der Filtration des Matrixextraktes durch einen 300 kDa *cut-off* Filter gemessen. Auf Grund der hohen Proteinkonzentration (ca. 2 mg ml<sup>-1</sup>) und des Verbleibs der Proteine im Retentat sollten diese hier als Komplex vorliegen und eine entsprechend hohe spezifische Enzymaktivität aufweisen. Die Messungen zeigen jedoch, dass die spezifische Aktivität bei niedriger Proteinkonzentration von nur 0,005 mg ml<sup>-1</sup> am höchsten ist (80 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>). Weiterhin nimmt die spezifische Aktivität des Retentats mit steigender Proteinkonzentration ab. Erst zwischen 0,08 bis 0,25 mg ml<sup>-1</sup> Proteinkonzentration ist wieder ein leichter Aktivitätsanstieg

zu verzeichnen (siehe Vergrößerung Abbildung 35:  $0,08 \text{ mg ml}^{-1} = 9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  vs.  $0,25 \text{ mg ml}^{-1} = 13 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ).



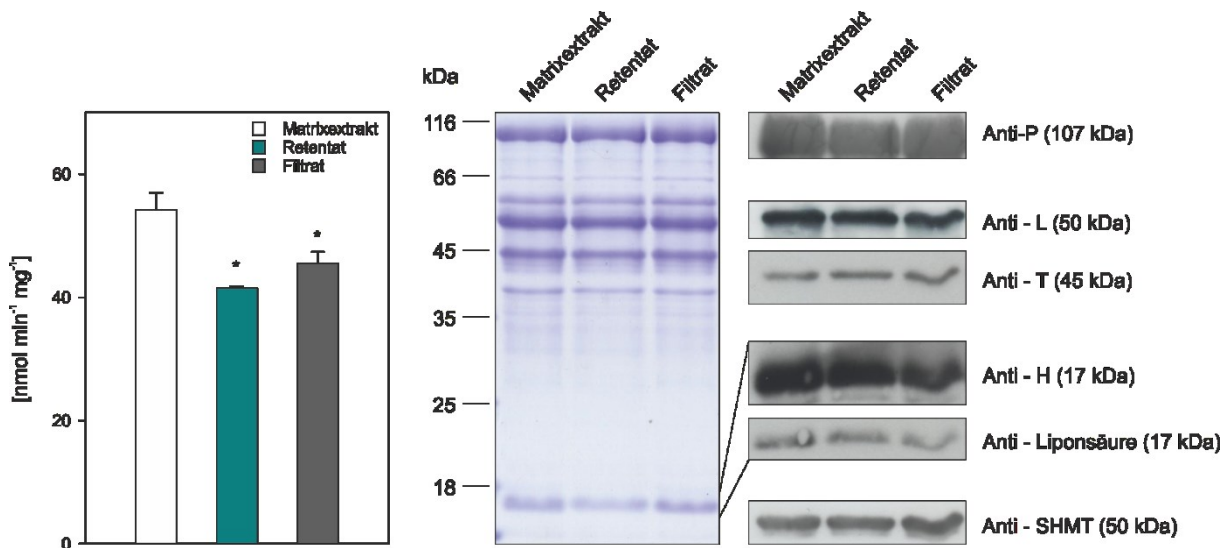
**Abbildung 35: Vergleich der GCS-Gesamtaktivität des mitochondrialen Gesamtextraktes und des Retentats nach der Filtration durch eine 300 kDa cut-off Membran.**

Die spezifische Aktivität wurde als Glycin-abhängige Bildung von NADH bei verschiedenen Proteinkonzentrationen gemessen. Die Filtration wurde durchgeführt um den Anteil an ungebundenen GCS-Proteinen zu reduzieren und damit möglichst ausschließlich Komplexaktivität zu messen. Der Gesamtextrakt diente dabei als Kontrolle.  $n \geq 2$

Der Vergleich der GCS Enzymaktivität zeigte einen deutlichen Unterschied in den spezifischen Aktivitäten zwischen dem mitochondrialen Gesamtextrakt und dem Retentat. Nach den Ergebnissen von Neuburger et al. 1986 wurde dagegen eine höhere GCS Aktivität im Retentat bzw. bei den höchsten Proteinkonzentrationen erwartet, wo ein GDC vorliegen sollte. Aus diesem Grund wurde bei einer einheitlichen Proteinkonzentration von  $0,05 \text{ mg ml}^{-1}$  die spezifische Aktivität des Gesamtextraktes, des Retentats und des Filtrats nach der 300 kDa-Filtration erneut analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 36 dargestellt und zeigt, dass sowohl das Retentat als auch das Filtrat eine geringere GCS Aktivität als der Gesamtextrakt aufweisen. Darüber hinaus übersteigt die Aktivität des Filtrats die des Retentats. Die korrespondierende SDS-PAGE und dazugehörigen Immunoblots zeigen, dass es keinen deutlichen Unterschied in der Menge der einzelnen GCS-Proteine in den Fraktionen gibt. Auch die SHMT als ein an der Glycin-Serin-Interkonversion beteiligtes Enzym und der Lipoylierungsstatus des H-Proteins sind vergleichbar. Das deutet darauf hin, dass vermutlich einzig die unterschiedliche Proteinkonzentration zwischen Filtrat, Retentat und Gesamtextrakt



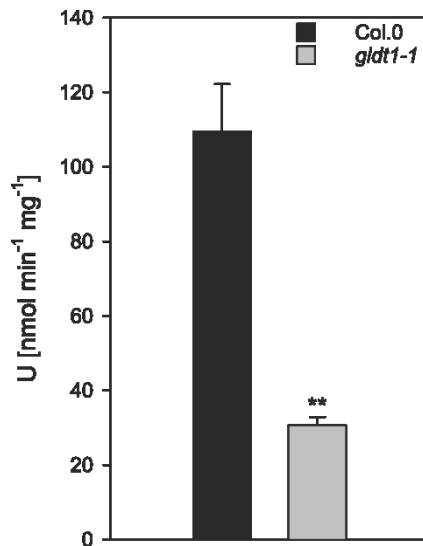
und die damit einhergehende Assoziation/Dissoziation der Proteine für den Unterschied in der Gesamtaktivität verantwortlich ist. Im Unterschied zu den Ergebnissen in Abbildung 35 ist hier die spezifische Aktivität des ungefilterten Extraktes um ca. die Hälfte reduziert. Grund dafür könnte eine Verunreinigung der Probe mit nicht-mitochondrialen Proteinen sein, so dass der Anteil an GCS-Proteinen im Test geringer war als für die Berechnung angenommen.



**Abbildung 36: Gesamtaktivität des ungefilterten mitochondrialen Matrixextraktes verglichen mit dem Retentat und Filtrat, inklusive der korrespondierenden SDS-PAGE und der Immunoblots.**

Verglichen mit dem Gesamtextrakt der Matrixfraktion weisen sowohl das Retentat als auch das Filtrat eine geringere spezifische Aktivität der GCS-Proteine auf. Proteinkonzentration:  $0,05 \text{ mg ml}^{-1}$ ,  $n=4$ ,  $*p<0,05$ . Aufgetragene Proteinmenge für SDS-PAGE und Immunoblot:  $10 \mu\text{g}$ . Verwendete Antikörper siehe Tabelle 2, alle Blots wurde für 30 Sekunden belichtet mit Ausnahme des SHMT-Blots (1 min).

Inwiefern die Aktivität des pflanzlichen GCS von den vorhandenen Einzelproteinen abhängt, wurde anteilig anhand des T-Proteins getestet. Die Messung der spezifischen Aktivität der GCS-Proteine im *Arabidopsis* Wildtyp (Col.0) verglichen mit der *gldt1-1 knockdown* Mutante mit nur noch 5 % T-Proteingehalt wurden bereits in Timm et al. 2017 veröffentlicht. Dort konnte gezeigt werden, dass die Mutante trotz stark reduzierter Menge an T-Protein weiterhin in der Lage ist, auch unter Normalluftbedingungen ähnlich dem Col.0 zu wachsen. Die GCS-Aktivität ist dabei auf 30 % der wildtypischen Aktivität reduziert. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass das T-Protein in *Arabidopsis* in weitaus höheren Mengen vorliegt als für die Aktivität notwendig wäre. Diese nicht für die Aktivität relevante Menge an T-Protein könnte möglicherweise zum Schutz des Sauerstoff-sensitiven THF dienen. Der Vergleich der Gesamtaktivität zwischen Wildtyp und *gldt1-1* Mutante ist in Abbildung 37 dargestellt.



**Abbildung 37:** Vergleich der spezifischen Gesamtaktivität der GCS-Proteine zwischen dem Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* (Col.0) und der *gldt1-1* knockdown Mutante.

Verglichen mit dem Col.0 besitzt die Mutanten nur noch 5 % der ursprünglichen T-Protein Konzentration und ist damit dennoch in der Lage noch 30 % der Wildtyp-Gesamtaktivität zu generieren. n=3, \*\*p<0,01

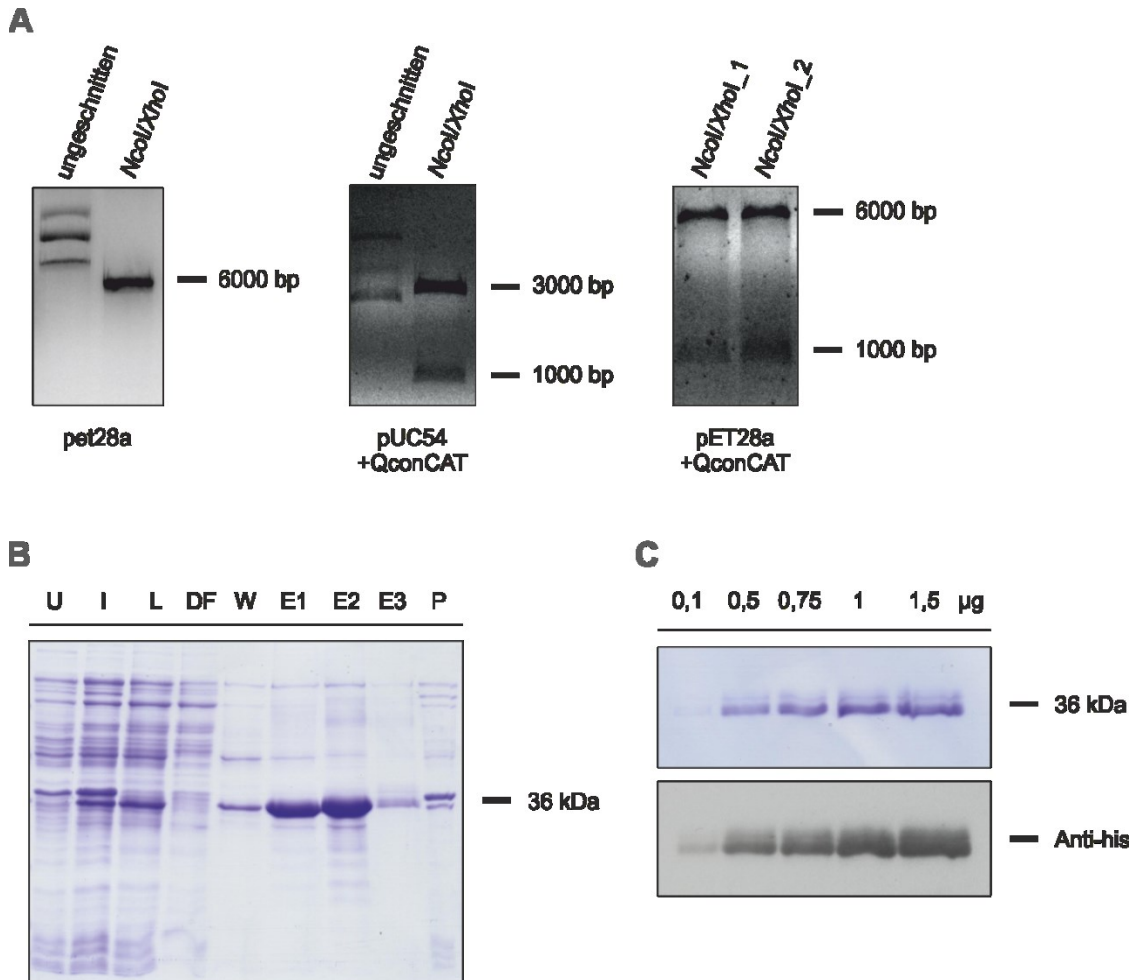
#### 4.4. Stöchiometrie der GCS-Proteine aus *P. sativum* und *A. thaliana*

Für die Bestimmung der Stöchiometrie der pflanzlichen GCS-Proteine wurde die quantitative Proteomanalyse angewandt (Silva et al. 2006). Wie im Methodenteil beschrieben, wurden zur Quantifizierung zwei verschiedene Arten von <sup>15</sup>N-markierten Peptiden eingesetzt. Diese wurden sowohl als rekombinantes Polypeptid (QconCAT) und auch als synthetische Peptide (jpt) erzeugt.

##### 4.4.1. Klonierung und Expression des QconCAT-Proteins

Die Klonierung des QconCAT-Proteins erfolgte wie unter 3.2.24 beschrieben. Der Nachweis der Klonierung des QconCAT-Proteins ist in Abbildung 38 dargestellt. Die Peptide für die einzelnen Isoformen der GCS-Proteine wurden auf der Grundlage früherer MS-Untersuchungen ausgewählt. Entscheidend für die Auswahl war, dass jedes gewählte Peptid ausschließlich in einem der entsprechenden Proteine bzw. Isoformen vorkommt und somit eine eindeutige Zuordnung erfolgen kann. Zusätzlich dazu wurde sichergestellt, dass diese GCS-typischen Peptide reproduzierbar mit hoher Signalintensität während der MS-Analyse von Pflanzenextrakten auftraten. Die abgeleitete Proteinsequenz ist im Anhang 7.3 dargestellt. Die Kontrollrestriktion des pET28a+QconCAT Plasmids zeigt, dass die Ligation des synthetisierten Gens in den Vektor pET28a erfolgreich war (Abbildung 38A). Die SDS-PAGE (Abbildung 38B) zeigt die Expression des Proteins nach Zugabe von IPTG (Abbildung 38C – I) sowie die Elution des Proteins mit Imidazol-haltigem Puffer (Abbildung 38B – E1

bis E3). Nach einer weiteren Aufreinigung erfolgten zur Kontrolle eine SDS-PAGE und ein Immunoblot mit *his-tag* Antikörper (Abbildung 38C). Jeder Schritt zeigt die erfolgreiche Expression des QconCAT-Proteins mit der erwarteten molekularen Masse von ca. 36 kDa durch den *E. coli*-Expressionsstamm BL21 (DE3).



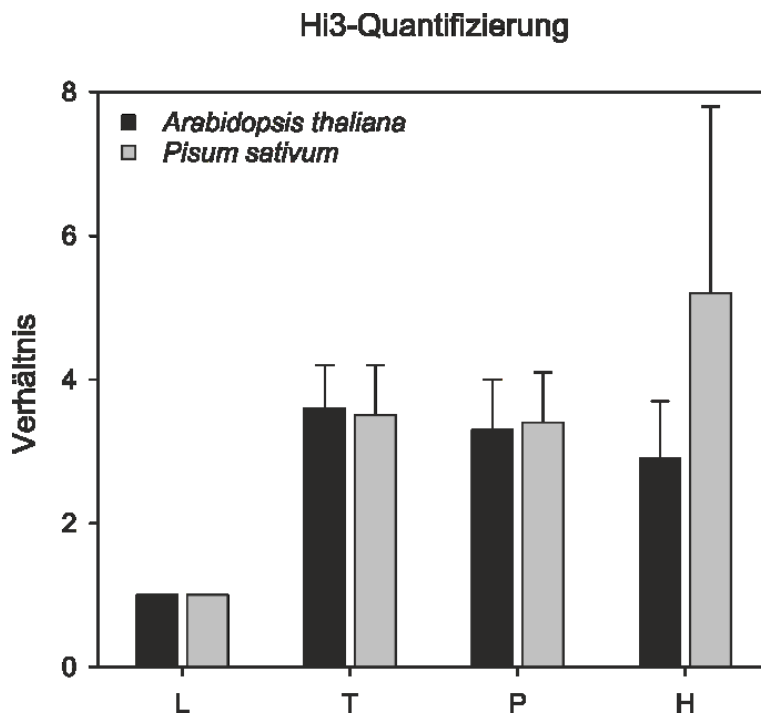
**Abbildung 38:** Übersicht über die Klonierung und Expression des QconCAT-Peptids mit  $^{15}\text{N}$ -markierten Aminosäuren.

**A:** Klonierung der Nukleotidsequenz in den Vektor pET28a. **B:** SDS-PAGE der Expression des QconCAT-Peptids in Minimalmedium mit  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ . Das Peptid wurde wie erwartet exprimiert und nach der dritten Waschung mit 300 mM Imidazol eluiert. U: uninduzierte Probe; I: induzierte Probe; L: Lysat; DF: Durchfluss; W: 3. Waschung; E1-E3: Elutionen 1-3; P: Pellet. **C:** SDS-PAGE und Immunoblot zur Kontrolle. Die SDS-PAGE zeigte saubere Elutionsfraktionen, und mittels *his-tag* Antikörper konnte das vollständige QconCAT-Peptid nachgewiesen werden.

#### 4.4.2. Proteomanalyse mittels markierungsfreier Hi3-Methode

Die Proteomanalyse und Auswertung wurde von Dr. Stefan Mikkat durchgeführt. Dabei erfolgte die erste Quantifizierung mittels der markierungsfreien Hi3-Methode (Silva et al. 2006). Diese ist besonders für kleine Polypeptide (z. B. das H-Protein) auf Grund der geringen Anzahl an tryptischen Peptiden unzuverlässig. Dennoch kann anhand der

Hi3-Methode ein erstes Verhältnis der Proteine untereinander abgeschätzt werden. Es konnte beobachtet werden, dass mit dieser Methode kaum ein Unterschied in den Verhältnissen der GCS-Proteine aus *P. sativum* und *A. thaliana* besteht. Einzig das H-Protein scheint in *P. sativum* (Verhältnis L- zu H-Protein: ca. 5) häufiger vorzukommen als in *A. thaliana* (Verhältnis L- zu H-Protein: ca. 3). Des Weiteren unterscheiden sich auch die Ergebnisse der löslichen Fraktionen nur gering von denen des jeweiligen Gesamtextraktes (siehe Anhang 7.8), was dafür spricht, dass die Proteine weitgehend löslich oder höchstens lose mit der mitochondrialen Matrix assoziiert sind. Die Abbildung 39 zeigt die Verhältnisse der Monomere der GCS-Proteine bezogen auf ein L-Protein Monomer, welche in Tabelle 33 nochmals zusammengefasst sind. Diese Daten geben einen ersten Hinweis auf eine ähnliche Stöchiometrie der GCS-Proteine aus *A. thaliana* und *P. sativum*.



**Abbildung 39: Markierungsfreie Hi3-Quantifizierung der GCS-Proteine aus *P. sativum* und *A. thaliana*.**

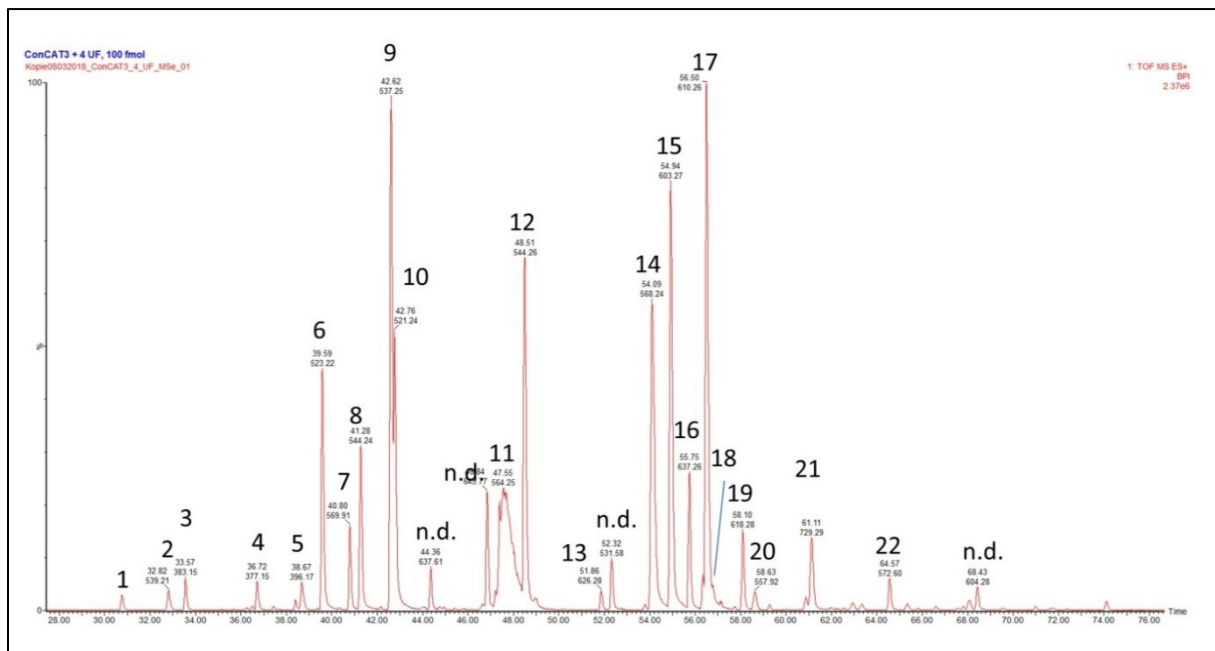
Dargestellt ist der Vergleich zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Pisum sativum*. Die Menge an Protein wurde jeweils als Verhältnis zum L-Protein berechnet und die Stöchiometrie gilt für die Monomere. n=2

**Tabelle 33: Ermittelte Verhältnisse der GCS-Proteine durch die Hi3-Methode.**

	<i>P. sativum</i>	<i>A. thaliana</i>
L-Protein	1	1
T-Protein	3,6	3,5
P-Protein	3,3	3,4
H-Protein	2,9	5,2

#### 4.4.3. Eignung des QconCAT-Peptids und die Reinheit des Mitochondrienextraktes

Als Vorversuch zur quantitativen Proteomanalyse wurde zuerst getestet, ob die einzelnen Peptide des tryptisch verdauten QconCAT-Proteins mittels MS-Analyse identifiziert werden können. Das Chromatogramm mit 100 fmol des QconCAT-Proteins ist in Abbildung 40 dargestellt. Sie zeigt, dass alle Peptide identifiziert werden konnten. Darüber hinaus zeigt das Chromatogramm jedoch auch nicht identifizierbare Peaks. Dabei handelt es sich vermutlich um Peptide, die unvollständig proteolytisch geschnitten wurden und z. B. die *linker*-Sequenz (siehe Anhang 7.3) nicht wie vorgesehen entfernt wurde. Zusätzlich dazu unterlagen einige Peptide auch Modifikationen infolge der Oxidation von Methionin-Resten, die bei der Ermittlung der Stöchiometrie beachtet wurden. Eine vollständige Auflistung der den Nummern zugehörigen Peptide ist im Anhang 7.9 enthalten.

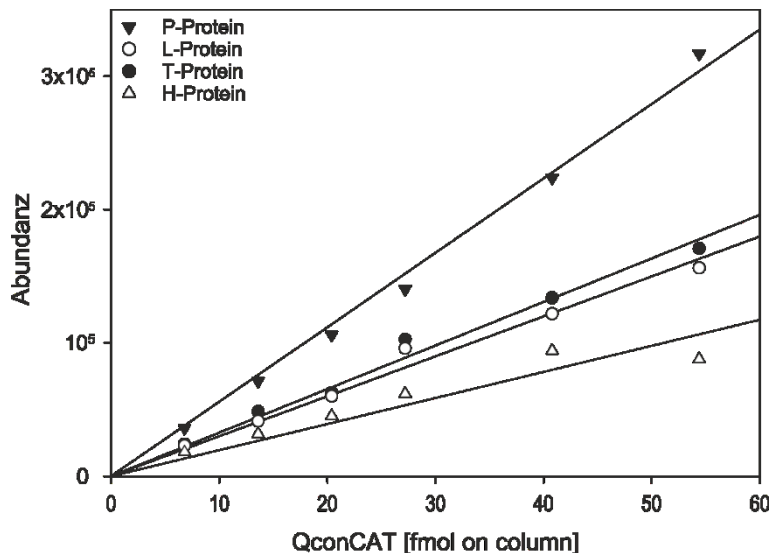


**Abbildung 40: Chromatogramm (Abundanz in % in Abhängigkeit der Retentionszeit) des tryptisch verdauten und mittels MS getrennten QconCAT-Proteins.**

Die MS-Analyse des tryptisch verdauten QconCAT-Proteins konnte alle Peptide zweifelsfrei identifizieren. Zusätzlich dazu wurden jedoch einige nicht identifizierbare Peaks ermittelt (n.d.) und einige Peptide scheinen Modifikationen zu unterliegen. Die Abbildung wurde von Stefan Mikkat zur Verfügung gestellt.

Im Anschluss wurde der lineare Bereich der Quantifizierung mit Hilfe des QconCAT-Proteins ermittelt, sprich der Bereich in dem ein lineares Verhältnis der Peptidmenge mit der gemessenen Signalintensität vorliegt. Dazu wurden ansteigende Konzentrationen des Eichproteins zu 20 µg Stromaproteinextrakt hinzugegeben und anschließend mit Trypsin verdaut. Für alle GCS-Proteine wurde in Abbildung 41 je beispielhaft ein Peptid (unabhängig

von Organismus und Isoform) ausgewählt und die gemessene Abundanz in Abhängigkeit der Menge in *fmol on column* angegeben. Aus der Linearität ergibt sich eine gute Eignung der Peptide für die Nutzung als Standard zur quantitativen Proteomanalyse. Die synthetischen jpt-Peptide wurden mit dem gleichen Verfahren analysiert und deren Eignung konnte ebenfalls bestätigt werden (nicht gezeigt).



**Abbildung 41: Untersuchung zur Linearität der Peptide mit steigender Konzentration.**

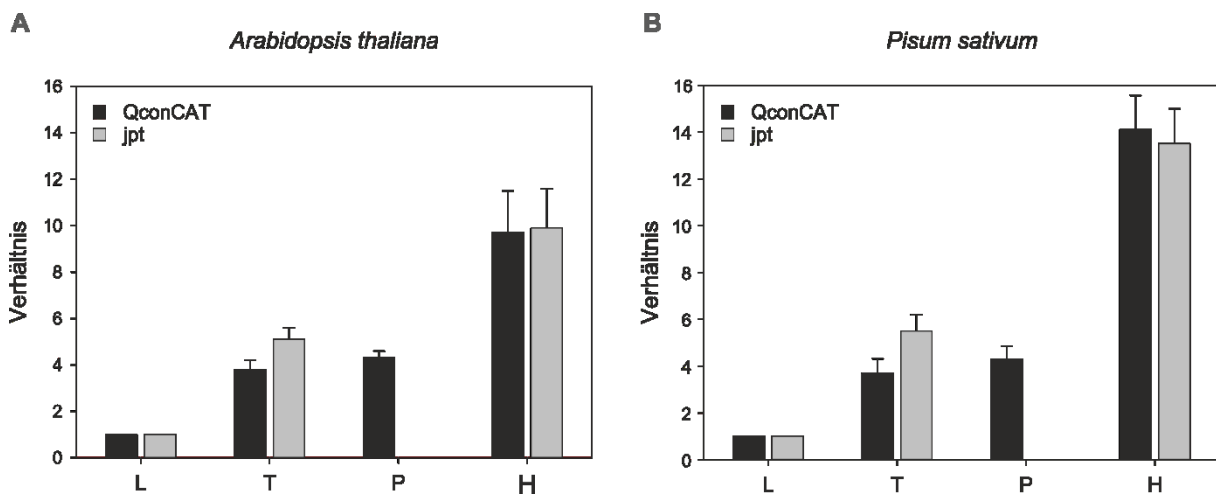
Zu 20 µg mitochondrialem Matrixextrakt wurden unterschiedliche Mengen QconCAT-Protein zugegeben, tryptisch verdaut und mittels MS<sup>E</sup> analysiert. Für jedes GCS-Protein wurde exemplarisch ein Peptid ausgewählt: P-Protein (Isoform 1): IIGISVDSSGK; L-Protein (Isoform 1): AIDNAEGLVK; T-Protein: GGAIDDSVITK; H-Protein (Isoform 1): VKPSSPAELESMLGPK.

Ebenfalls als Vorversuch wurden die isolierten Mitochondrien hinsichtlich ihres Reinheitsgrades analysiert. Unter allen identifizierten Proteine aus *A. thaliana* konnten nur sieben der insgesamt 40 identifizierten Proteine nicht eindeutig dem mitochondrialen Proteom zugeordnet werden. Darüber hinaus wurde ermittelt, dass die GCS Proteine ca. 34 % des molaren Verhältnisses am Gesamtproteom darstellen, was nahezu dem publizierten Anteil von ca. 30 % entspricht (Douce et al. 2001). Die detaillierte Liste der identifizierten Proteine ist unter 7.7 aufgeführt.

#### 4.4.4. Stöchiometrie der GCS-Proteine in höheren Pflanzen

Durch die Zugabe einer definierten Menge des QconCAT-Peptids bzw. der jpt-Peptide als Standard kann das auf die Monomere bezogene molare Verhältnis der GCS-Proteine aus *A. thaliana* und *P. sativum* präzise bestimmt werden. Dazu wurde die Menge des markierten (schweren) Peptids mit der Menge des nativen (leichten) Peptids verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 42 und Tabelle 34 zusammengefasst und stimmen für beide Methoden und

Organismen dabei weitestgehend überein. Für die QconCAT-Methode stimmen die Werte der enzymatisch aktiven Proteine zwischen beiden untersuchten Pflanzen überein. Nur das Verhältnis des L-Proteins zum H-Protein ist in *P. sativum* (ca. 14) im Vergleich zu *A. thaliana* (ca. 10) um ca. 40 % erhöht. Ebenso verhält es sich mit der jpt-Methode. Das L- und T-Protein stimmen zwischen beiden Pflanzen weitestgehend überein und auch das H-Protein ist in *P. sativum* vergleich mit *A. thaliana* erhöht. Einzig der Anteil des P-Proteins konnte nicht zweifelsfrei ermittelt werden. Der gemessene Wert lag im Vergleich zur QconCAT-Methode und Hi3-Methode um ein Vielfaches höher. Vermutlich wurde das jpt-Peptid für das P-Protein nicht vollständig gelöst, so dass sich in den Proben eine geringere Menge als vorgesehen befand. Aus diesem Grund wurden die P-Protein Werte für die jpt-Methode nicht weiter berücksichtigt. Somit scheint die jpt-Methode anfälliger für methodische Schwachpunkte zu sein, als die QconCAT-Methode. Aus diesem Grund und weil mittels jpt-Methode kein verlässlicher Wert für das P-Protein ermittelt werden konnte, wurden die mittels QconCAT-Methode bestimmten Werte für die Berechnung der Stöchiometrie verwendet.



**Abbildung 42: Stöchiometrie der GCS-Proteine von *A. thaliana* (A) und *P. sativum* (B).**

Verglichen wurden jeweils die QconCAT- und die jpt-Methode. Die Berechnung erfolgt immer im Verhältnis zur Abundanz des L-Proteins. Die Ermittlung des P-Protein-Verhältnisses durch die jpt-Methode ist fehlerhaft und deshalb nicht dargestellt. n=6

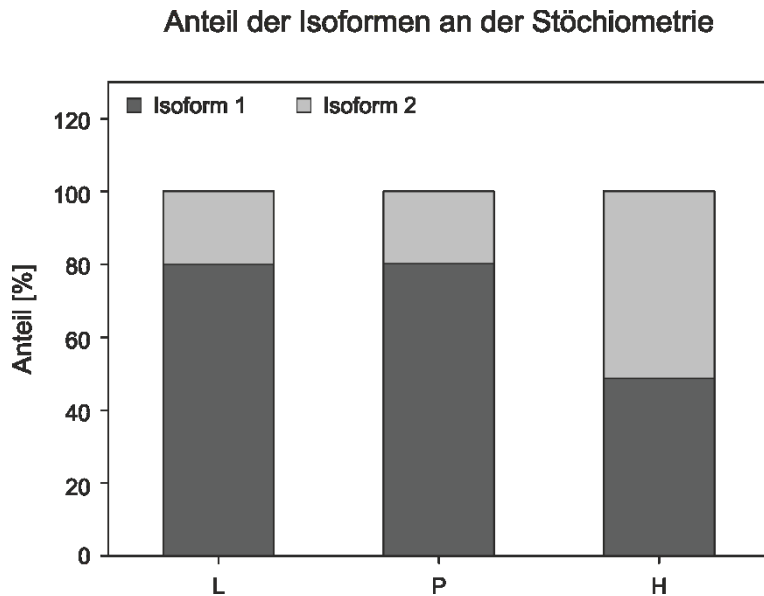
**Tabelle 34: Durch quantitative Proteomanalyse ermittelte Stöchiometrien der GCS-Proteine aus *P. sativum* und *A. thaliana*.**

	<i>P. sativum</i>		<i>A. thaliana</i>	
	QconCAT	jpt	QconCAT	jpt
L-Protein	1	1	1	1
T-Protein	3,7	5,5	3,8	5,1
P-Protein	4,3	-	4,3	-
H-Protein	14,1	13,5	9,7	9,9

Aus den Verhältnissen ergibt sich eine mögliche Stöchiometrie von  $1L_2:8T:4P_2:28H$  für *P. sativum* und  $1L_2:8T:4P_2:20H$  *A. thaliana*. Die Komplexgrößen wären somit 1,5 bzw. 1,6 MDa. Der Vergleich zwischen den ermittelten Verhältnissen dieser Arbeit und der publizierten Stöchiometrie des GDC aus *P. sativum* ( $1L_2:9T:2P_2:27H$ , Oliver et al. 1990b) zeigt kaum Abweichungen (siehe Tabelle 34). Das legt die Vermutung nahe, dass das Verhältnis der GCS-Proteine und damit eine mögliche Stöchiometrie des GDC in höheren Pflanzen weitestgehend übereinstimmen, vorausgesetzt alle Proteine liegen Komplexgebunden vor. Für den Vergleich wurde die publizierte Stöchiometrie der Monomere bezogen auf ein L-Protein Monomer dargestellt. Während die Anteile von L- und T-Protein mit der Arbeit von (Oliver et al. 1990b) weitestgehend übereinstimmen, liegt der hier bestimmte P-Protein Anteil doppelt so hoch wie zuvor publiziert. Dies würde bei einer vollständigen Integration aller GCS-Proteine in einen Komplex für ein zusätzliches P-Protein Dimer innerhalb des GDC sprechen. Die mit der QconCAT-Methode bestimmte H-Protein Stöchiometrie relativ zu den anderen GCS-Proteinen aus *P. sativum* ist im Vergleich mit der publizierten Menge nahezu identisch. Im Vergleich dazu, weicht der Wert des H-Proteins aus *A. thaliana* ab, so dass sich hier ein Unterschied im Aufbau des Komplexes zwischen *A. thaliana* und *P. sativum* zeigt.

Mit Hilfe der QconCAT-Methode konnten auch Analysen bezüglich des Anteils der Isoformen der einzelnen Proteine an der Stöchiometrie getroffen werden. Diese sind in Abbildung 43 dargestellt. Das H1- (AT2G35370) und H3-Protein (AT1G32470) sind mit nahezu gleichen Anteilen vorhanden (das H2-Protein wurde nicht gefunden). Im Gegensatz dazu wird der Anteil an P-Protein zu ca. 80% von der ersten Isoform (AT4G33010) bestimmt. Ebenso verhält es sich mit dem L-Protein. Auch hier liegt der Anteil der ersten Isoform bei ca. 80% (AT1G48030).





**Abbildung 43: Übersicht über den Anteil der einzelnen Isoformen an der Stöchiometrie.**

Mit der QconCAT-Methode konnte der Anteil der jeweiligen Isoform des Proteins an der Stöchiometrie ermittelt werden. Isoform 1: L-mtLPD1 (AT1G48030); P-GLDP1 (AT4G33010); H-GDCH1 (AT2G35370); Isoform 2: L-mtLPD2 (AT3G17240); P-GLDP2 (AT2G26080) H-GDCH3 (AT1G32470).

#### **4.4.5. Untersuchung der Gesamtmenge an GCS-Proteinen in *Synechocystis***

In Pflanzenmitochondrien ist die Ausbildung des GDC abhängig von hohen Proteinkonzentrationen. Dies deckt sich mit dem hohen prozentualen Anteil an GCS-Proteinen (ca. 30 %; Oliver et al. 1990b, diese Arbeit) in den Mitochondrien phototrophen Gewebes. Die Menge an GCS-Proteinen in der cyanobakteriellen Zelle war bisher nicht bekannt. Mittels Hi3-Quantifizierung wurde innerhalb dieser Arbeit erstmals der prozentuale Anteil der GCS-Proteine am Gesamtproteom von *Synechocystis* geschätzt. Dieser beträgt ca. 0,3 % (siehe Tabelle 35) und ist damit 100-fach geringer als in Blattmitochondrien. Das P-Protein wurde in diesem Experiment leider nicht detektiert und deshalb nicht in die Berechnung einbezogen. Eine Aussage über die Stöchiometrie der *Synechocystis* GCS-Proteine konnte auf Grund der fehlenden Vergleichspeptide (QconCAT oder jpt, siehe auch 3.2.24) für die Proteomanalyse nicht getroffen werden. Die vollständige Liste der analysierten Proteine ist unter 7.11 dargestellt.

**Tabelle 35: Übersicht über die Verteilung der GCS-Proteine im Zelllysate des *Synechocystis* Wildtyps.**

Je vier unabhängige *Synechocystis* Kulturen wurden in BG11-Medium angezogen und anschließend eine *shotgun* Proteomanalyse durchgeführt um alle identifizierbaren Proteine zu ermitteln (Einzelwerte siehe Anhang 7.10). Aus der Abundanz wurden die durchschnittliche Menge ( $\bar{O}$ ) und das molare prozentuale Verhältnis (%) der GCS-Proteine zum Gesamtproteom berechnet.  $\pm$  S.D., n=4

	$\bar{O}$	%
<b>L-Protein</b>	49.464 $\pm$ 8.653	0,2 $\pm$ 0,04
<b>H-Protein</b>	8.205 $\pm$ 1.260	0,03 $\pm$ 0,006
<b>T-Protein</b>	6.623 $\pm$ 699	0,03 $\pm$ 0,002
<b>Summe aller Proteine</b>	24.767.589 $\pm$ 840.017	100
	<b>% GCS</b>	<b>0,26 <math>\pm</math> 0,03</b>

## 5. Diskussion

Der Fokus dieser Arbeit lag in der funktionellen und strukturellen Untersuchung des ubiquitär vorkommenden GCS am Beispiel des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 sowie der Pflanzen Erbse bzw. Arabidopsis. Es sollte geprüft werden, ob die rekombinant hergestellten GCS-Proteine aus *Synechocystis* in der Lage sind, *in vitro* einen enzymatisch aktiven Komplex zu bilden. Dies wäre die erste Rekonstruktion eines rekombinanten GDC und würde eine methodische Grundlage für detaillierte Struktur-Funktions-Analysen schaffen. Darüber hinaus erfolgte der Vergleich der GCS-Stöchiometrie, um die Literaturdaten zum pflanzlichen GDC zu verifizieren und ihre allgemeine Gültigkeit für phototrophe Organismen zu prüfen. Weiterhin erfolgte eine Teilcharakterisierung der Biochemie des GCS insbesondere der Beziehung zwischen Proteinkonzentration und Enzymaktivität.

### 5.1. Das cyanobakterielle Glycine Cleavage System

Innerhalb dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass *Synechocystis* GCS-Proteine in der Lage sind *in vitro* einen Proteinkomplex zu bilden. Dies ist der erste beschriebene rekombinante GCS-Komplex. Bisherige Untersuchungen an GCS-Proteinen beschränkten sich auf die Analyse der Struktur und Funktion der einzelnen Proteine bzw. auf die Rolle der GCS-Proteine im photorespiratorischen Metabolismus von *Synechocystis* (Eisenhut et al. 2008). Die hier dargestellten Ergebnisse bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Komplexassemblierung sowie der Rolle dieses Komplexes in Cyanobakterien und, auf Grund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten, möglicherweise darüber hinaus in phototrophen Organismen.

Begonnen wurde mit der Einzelcharakterisierung der rekombinanten GCS-Proteine (siehe 4.1). In den SEC-Untersuchungen zeigte sich dabei ein deutlicher Unterschied zwischen den Kontroll- (Tris-Puffer) und den komplexfördernden Bedingungen (GDC-Puffer; Neuburger et al. 1986) bei der Elution des H-Proteins. Unter Kontrollbedingungen (niedrige Ionen- und Salzkonzentration, siehe auch Tabelle 17) eluierte das H-Protein wie erwartet mit einer Größe von ca. 14 kDa, während bei komplexfördernden Bedingungen eine Oligomerisierung auftrat (siehe 4.1.3). Dies lässt sich vermutlich durch die erhöhte Salzkonzentration in Form von Natriumchlorid im Kontrollpuffer erklären. Der direkte Einfluss von Salz auf Proteine ist sehr komplex und muss in jedem Einzelfall genauer analysiert werden. Jedoch geht aus der Literatur zum GDC hervor, dass die Dissoziation der Proteine (besonders H- und P-Protein) bei hohen Salzkonzentrationen stärker ist als bei niedrigen (Neuburger et al. 1986), so dass

eine Oligomerisierung des H-Proteins bei niedrigen Salzkonzentrationen gefördert und bei hohen getrennt wird. Durch den Einfluss von Ionen auf die Oberflächenladung der Proteine könnten elektrostatische Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beteiligten Proteinen gelöst werden. Dadurch würde das H-Protein eher in Monomeren vorliegen und so die unterschiedlichen Elutionsvolumina des H-Proteins im Kontrollpuffer mit 150 mM Natriumchlorid im Vergleich zum GDC-Puffer ohne Natriumchlorid erklären (Abbildung 8B). Getestet werden könnte diese Vermutung indem das H-Protein mit verschiedenen Natriumchlorid (10 bis 50 mM) Konzentrationen über die SEC eluiert wird. Darüber hinaus kann Natriumchlorid auf Grund seiner Interaktion mit Wasser eine Fällung des Proteins bewirken. Ob Chlorid- oder Natrium-Ionen diesen Effekt bestimmen, könnte z. B. durch die Verwendung anderer Salze untersucht werden. Caesiumchlorid hat z. B. auf Grund seines chaotropen Kations eine stärker destabilisierende Wirkung als Magnesiumchlorid (Curtis und Lue 2006). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass der Einfluss einer erhöhten Salzkonzentration auch für die Assoziation des H- und T-Proteins der Fall ist (siehe 4.1.4).

Der zweite Unterschied zwischen dem Kontroll- und GDC-Puffer ist die Zugabe von Serin. Diese Aminosäure wurde für Lysozym bereits als stabilisierend bestätigt (Arakawa und Timasheff 1985) und könnte somit auch einen Effekt auf das GCS haben. Gegen diese Vermutung spricht jedoch die von Oliver und Sarojini 1987 publizierte Hemmung der GCS-Aktivität durch Serin. Der Effekt von Serin auf die Komplexbildung wurde innerhalb dieser Arbeit nicht genauer untersucht, könnte zukünftig aber mit einer ansteigenden Konzentration dieser Aminosäure in den Puffern der SEC- oder Filtrationsuntersuchungen getestet werden.

Den ersten Hinweis auf eine mögliche Komplexbildung der *Synechocystis* GCS-Proteine boten Filtrationsexperimente. Diese waren angelehnt an die Rekonstruktionsexperimente mit pflanzlichen GCS-Proteinen (Neuburger et al. 1986; Oliver et al. 1990b). Die Filtration der cyanobakteriellen Proteine erfolgte durch eine 300 kDa *cut-off* Membran, da jedes GCS-Protein einzeln kleiner ist als 300 kDa und somit die Membran ungehindert passieren kann. Eine Mischung der Proteine bewirkte, dass ca. 30 % der initialen Proteinmenge im Retentat verblieb. Das zeigt eine Interaktion der einzelnen GCS-Proteine aus *Synechocystis in vitro*. Die daraus resultierende Struktur ist größer als 300 kDa und umfasst alle GCS-Untereinheiten (P, L, T, H, Abbildung 21). Die Analyse mittels ImageJ ergab dabei eine mögliche Stöchiometrie der im Retentat verbliebenen Proteine von 2L<sub>2</sub>:6T:1P<sub>2</sub>:52H und damit eine Masse des Komplexes von ca. 1,3 MDa. Diese Größe entspricht trotz eines abweichenden

Verhältnisses der Proteine untereinander nahezu der innerhalb dieser Arbeit analysierten Komplexgröße des pflanzlichen GDC (1L<sub>2</sub>:8T:4P<sub>2</sub>:20H; 1,5 MDa) und könnte durch die Filtration durch eine 1.000 kDa cut-off Membran überprüft werden. Diese Analyse gibt einen sehr guten Hinweis auf die Stöchiometrie des *Synechocystis* GDC, sollte aber mit einer weiteren Methode verifiziert werden. Coomassie ist nur eine bedingt geeignete Färbemethode zur Analyse der Stöchiometrie, da die Proteine auf Grund ihrer ungleichen Menge an basischen Aminosäuren an die Coomassie bindet unterschiedlich stark angefärbt werden. Insbesondere eine übersättigte Färbung kann das Ergebnis verfälschen, sodass die Berechnung dieses Proteinanteils höher ausfällt als tatsächlich vorhanden. Aus diesem Grund sollte diese Methode nie als einzige Methode zur Ermittlung der Stöchiometrie von Proteinen verwendet werden. Als zusätzliche Methode könnte die innerhalb dieser Arbeit angewendete MS-Analyse mittels QconCAT und/oder synthetischen Peptiden in der Zukunft angewendet werden.

Das Filtrationsexperiment lässt keine Schlüsse darüber zu, wie die Proteine miteinander interagieren. Unwahrscheinlich ist, dass jedes Protein mit jedem weiteren interagiert und somit ein Komplex gebildet wird. Wahrscheinlicher ist eine Kernstruktur aus H-Proteinen, da dieses mit allen katalytisch aktiven Proteinen interagieren muss. Dies wurde auch für den pflanzlichen GDC postuliert (Oliver 1994).

Trotz der fehlenden Informationen zur Gesamtstruktur zeigen die Filtrationsexperimente eine definierte Komplexbildung und geben erste Hinweise über den Aufbau eines Komplexes aus *Synechocystis*. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch die Ausbildung von Subkomplexen aus H-, T- und L-Protein sowie H-, T- und P-Protein möglich ist (Pulldown). Dies unterstreicht die Assoziation des H-Proteins mit den katalytisch aktiven Proteinen und somit die Möglichkeit der Kernstruktur aus H-Proteinen. Diese Kernstruktur aus H-Proteinen wird durch die notwendige Menge an H-Proteinen im Filtrationsversuch unterstützt (Abbildung 23). Die Überprüfung der Notwendigkeit des T-Proteins steht noch aus. Da jedoch z. B. das T- und das H-Protein aus *E. coli* in der Lage sind einen stabilen 1:1 Komplex zu bilden (Guilhaudis et al. 2000; Okamura-Ikeda et al. 2010), ergibt sich daraus die Möglichkeit, dass das H-Protein in Verbindung mit dem T-Protein eine Kernstruktur bildet. Dies scheint auch mit mehreren aneinander gebundenen H-Proteinen möglich, da auch ein H-Protein Trimer weiterhin mit dem T-Protein interagieren könnte (Abbildung 13).

Eine Überprüfung dieser Kernstruktur aus T- und H-Proteinen wäre durch die Mutation der Interaktionsflächen dieser beiden Proteine möglich. Durch den Austausch des Arg<sup>292</sup>-Restes

(z.B. durch einen ungeladenen Alanin- oder apolaren Glycin-Rest ohne Seitenkette) des T-Proteins würde die stabile Komplexbildung der beiden Proteine nicht mehr möglich sein (Okamura-Ikeda et al. 2010). Die Wiederholung der Filtrationsexperimente mit dem mutierten T-Protein sollten dann keine oder schwächere Komplexbildungen zeigen, wenn die Kernstruktur des GCS aus H- und T-Protein gebildet wird. Das Gleiche könnte mit einem mutierten Ser<sup>35</sup>-Rest des H-Proteins durchgeführt werden, um die vorhergesagte Wasserstoffbrückenbindung im H-Protein-Trimer experimentell zu bestätigen. Beide Varianten sollte zusätzlich auf mögliche Auswirkungen hinsichtlich der GCS-Aktivität getestet werden. Im Gegensatz zum T- und H-Protein scheinen das L- und P-Protein keine essentielle Funktion für die *in vitro* Komplexbildung zu haben. Das Retentat nach der Filtration ohne L-Protein beinhaltet zwar nur ca. 20 % der anfänglichen Proteinmenge, verglichen mit der Filtration ohne T-Protein ist jedoch weiterhin eine Interaktion durch den Verbleib der restlichen Proteine im Retentat erkennbar. Dies könnte daraufhin deuten, dass das L-Protein eher peripher an den Komplex bindet. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass das L-Protein mit weiteren enzymatischen Komplexen interagiert bzw. kooperiert. Auch die Filtration ohne P-Protein zeigt im Gegensatz zur Filtration ohne T-Protein weiterhin eine Komplexbildung der verbliebenen L-, T- und H-Proteine. Wie schon für das L-Protein beschrieben, ist diese ebenfalls schwächer (ca. 22 %) als mit allen vier GCS-Proteinen. Somit scheinen das L-, T- und H-Protein sowie das P-, T- und H-Protein *in vitro* in der Lage zu sein einen Subkomplex zu bilden, während ohne das T-Protein kein Komplex gebildet werden kann. Ein HTP-Subkomplex wird dadurch unterstützt, dass z. B. in *Nostoc* sp. PCC 7120 die GCS-Proteine in einem gemeinsamen Operon kodiert sind (Cyanobase: *all4607* bis 4609). Weitere Operons zeigt die DOOR-Datenbank (Mao et al. 2009): für das P-, T- und H-Protein u.a. in *E. coli* und in *Thermus thermophilus* während in *Desulfovibrio vulgaris* das P- und H-Protein mit dem L-Protein ein gemeinsames Operon bilden.

Zusätzlich zur Analyse von für die Komplexbildung essentiellen Untereinheiten wurden weitere Faktoren untersucht, z. B. inwieweit die Interaktionszeit bzw. Proteinkonzentration eine entscheidende Rolle spielen. Die Zeitversuche zeigten, dass nach 1 h Inkubationszeit ein höherer Anteil an Proteinen im Komplex assoziiert vorlagen als ohne Inkubation. Zukünftige Versuche sollten daher zur Nachbildung des *in vivo* Systems mit einer geringeren Proteinkonzentration und dafür einer längeren Inkubationszeit durchgeführt werden.

Bisher war es nicht möglich, die enzymatische Gesamtaktivität des GCS aus *Synechocystis* in den Filtrationsproben (Retentat oder Filtrat) nachzuweisen. Während der Nachweis der

Aktivität von P- und L-Protein erfolgte und auch die Rolle des H-Proteins als Cofaktor bestätigt werden konnte, fehlt der direkte Nachweis der Aktivität des rekombinanten T-Proteins (der indirekte Nachweis erfolgte über die GCS-Aktivität innerhalb der SEC-Analysen). Der angewendete Test zur Bestimmung der T-Protein-Einzelaktivität basierte auf dem Nachweis von Ammonium nach der Reaktion am T-Protein (3.2.19). Diese Methode hat sich als unzuverlässig herausgestellt, da die Ergebnisse sehr hohe Schwankungen aufwiesen. Diese sind vermutlich auf einen Rest Glycin im Reaktionsansatz zurückzuführen, der nicht mittels eines Pufferaustausches entfernt werden konnte. Für zukünftige Analysen und der damit zusammenhängenden Entwicklung eines Modells für das GCS ist der Aktivitätsnachweis des T-Proteins essentiell. Eine Möglichkeit wäre ein gekoppelter Aktivitätstest mit einer Methylentetrahydrofolat-abhängigen Dehydrogenase (Wohlfarth et al. 1991). Trotz des fehlenden Aktivitätsnachweises kann auf Grund der PAGE-, Filtrations- und SEC-Untersuchungen (Abbildung 12, Abbildung 21) davon ausgegangen werden, dass die Struktur des rekombinanten T-Proteins mit der *in vivo* Struktur übereinstimmt. Sollte das rekombinante T-Protein nicht aktiv sein, so könnte dies ein Grund für die bisher nicht messbare Gesamtaktivität der GCS-Proteine aus *Synechocystis* in den Filtrationsexperimenten sein. Weitere Gründe könnten eine fehlende Komponente für die Aktivität des Multienzymsystems oder eine abweichende Tertiär- bzw. Quartärstruktur nach der *in vitro* Rekonstruktion des GCS sein. Dafür spricht die gemessene Aktivität des GCS nach der SEC-Elution des *E. coli* Lysates.

Der Befund einer *in vitro* Komplexbildung durch die Filtrationsexperimente wird durch die Ergebnisse der SEC unterstützt. Die Einzelproteinanalyse zeigte, dass die GCS-Untereinheiten unter komplexfördernden Bedingungen bei ungefähr der erwarteten Größe eluieren (P-Protein Dimer: 200 kDa, L-Protein Dimer: 140 kDa, TH: 100 kDa, H: 80 kDa). Die Abweichungen lassen sich zum einen dadurch erklären, dass das Laufverhalten von Proteinen weniger durch deren Größe sondern eher durch ihren Radius (Siegel und Monty 1966) bestimmt werden. Zum anderen neigen die eigentlich als Monomere erwarteten T- und H-Proteine bei gleichzeitiger Elution zur Bildung von Subkomplexen.

Nach Kombination der einzelnen GCS-Proteine und anschließender Elution über eine präparative SEC-Säule konnte kein Komplex nachgewiesen werden. Das widerspricht den Filtrationsexperimenten und deutet somit auf eine Dissoziation der Proteine hin. Gründe dafür könnten die sich verringernde Proteinkonzentration oder ungünstige Pufferbedingungen während der Elution von der SEC-Säule sein. Erst die Simulation eines *molecular crowding*

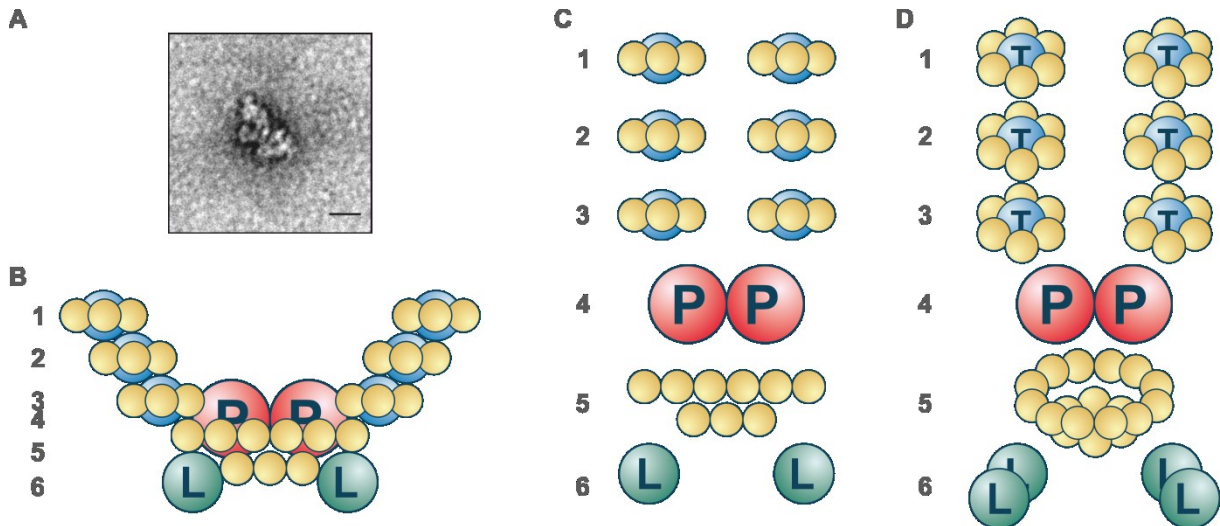
Effekts (zusammengefasst in Zimmerman und Minton 1993) scheint die Dissoziation der einzelnen Proteine während des Laufes zu verhindern. *Molecular crowding* kann die Faltung von Proteinen, deren Aggregation oder auch die Bildung von oligomeren Proteinkomplexen beeinflussen (Chebotareva et al. 2004). Ein Beispiel für letzteres ist der PDH Komplex aus *Azotobacter vinelandii*, der unter Einfluss von Polyethylenglycol (PEG) in der Lage ist höher-molekulare Komplexe zu bilden, die in Abwesenheit des Reagenz nicht auftraten (Bosma et al. 1980). Der *crowding* Effekt in dieser Arbeit wurde nicht durch zusätzliche Reagenzien erreicht, sondern durch konzentriertes Lysat aus einem *E. coli* Expressionsstamm genutzt, der alle vier Untereinheiten simultan exprimiert. Das so von der Säule eluierte Proteingemisch beinhaltete deshalb zusätzlich zu den *Synechocystis* GCS-Proteinen auch alle weiteren für die Zellvitalität, Proteinfaltung und -stabilisierung notwendigen *E. coli* Proteine, Proteinkomplexe sowie DNA, RNA und Metabolite. Dadurch ergibt sich besonders in den hochmolekularen Elutionsfraktionen (>250 kDa) eine höhere Proteinkonzentration als während der Elution des Filtrationsexperimentes. Das scheint einen stabilisierenden Effekt auf einige Interaktionen der GCS-Proteine aus *Synechocystis* zu haben, so dass laut Eichgerade (siehe Anhang 7.4) ein Komplex von ca. 300 kDa eluiert werden konnte. Dass der *in vitro* Komplex aus allen vier Untereinheiten besteht, konnte mittels Immunoblot bewiesen werden und zeigt sich auch in dem Nachweis der GCS-Aktivitäten der Elutionsfraktionen nach der SEC. Die Glycin-abhängige Bildung von NADH in Fraktionen, die vor dem P- bzw. L-Protein eluierten, spricht für die Interaktionen aller GCS-Proteine. Die Berechnung der Komplexgröße aus dem Elutionsprofil (ca. 300 kDa) stimmt dabei nicht mit der erwarteten Größe (min. 350 kDa, wenn jede Untereinheit nur einmal vorkommt, ca. 1,3 MDa bei Annahme der oben ermittelten Stöchiometrie) überein, dies kann jedoch durch die genutzte Säule erklärt werden, bei der es sich um eine präparative und nicht um eine analytische Säule handelte, die auch bei den Einzelproteinen Größenunterschiede aufwies (siehe 4.1). Zusätzlich können über die genutzte Säule (High-Load 16/600 Superdex 200) nur Proteine in einem Größenbereich unter 600 kDa aufgetrennt werden. In der Praxis deutet das Elutionsprofil (Abbildung 26B) darauf hin, dass die maximale Größe der getrennten Proteine zwischen 400 und 450 kDa lag und alle größeren Komplexe innerhalb des Ausschlussvolumens der Säule laufen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass es einen größeren *Synechocystis* GCS-Komplex gibt, wie mittels der ImageJ Analyse postuliert von ca. 1,3 MDa der nicht mit Hilfe der SEC analysiert werden konnte. Unklar ist, warum nur in drei Fraktionen eine erhöhte GCS-Aktivität gemessen werden konnte, obwohl auch in weiteren Fraktionen alle GCS Untereinheiten nachgewiesen werden konnten. Eine mögliche Erklärung



dafür könnte sein, dass erst in diesen Fraktionen das optimale Verhältnis der einzelnen Untereinheiten herrschte das zur Bildung eines aktiven Multienzymkomplexes notwendig ist. Des Weiteren könnte das gleichzeitige Vorkommen der Proteine an dieser Stelle ebenfalls einen zusätzlichen Faktor rekrutiert haben, der nicht nur die Komplexbildung, sondern auch dessen Aktivität unterstützt. Das Ergebnis der SEC lässt dabei eher auf ein kleines Protein oder einen Cofaktor schließen. Das Vorkommen so eines hypothetischen Faktors wird auch durch die Befunde mit den Pflanzenextrakten unterstützt, wo ebenfalls der Gesamtextrakt erheblich höhere GCS Aktivitäten als das Retentat aufwies. Um ein derartiges hypothetisches Protein zu identifizieren, wäre es sinnvoll die gesammelten Fraktionen der SEC mittels MS zu analysieren. Eine alternative Erklärung für die Beschränkung der GCS Aktivität auf drei Fraktionen wäre eine unzureichende Menge an H-Protein in den Fraktionen mit allen GCS-Proteinen, aber ohne nachgewiesene Enzymaktivität. Dies könnte zukünftig durch zusätzliche Zugabe von H-Protein zum Aktivitätstest untersucht werden. Für weiterführende SEC-Analysen wäre der Zusatz von PEG oder Ficoll zur SEC denkbar, um zu untersuchen, ob die Interaktion rein durch den *molecular crowding* Effekt zustande kommt oder ob ein oder mehrere unbekannte Proteine (siehe auch die folgende Diskussion zum Pulldown) aus dem *E. coli* Lysat zur Komplexbildung (wie z. B. die Protein-binde Domäne der PDH in Eukaryoten, u. a. Harris et al. 1997 ) und Aktivität der GCS-Proteine beitragen.

Die Größe des *in vitro* Komplexes konnte durch die hier gezeigten Versuche nicht eindeutig bestimmt werden, liegt für *Synechocystis* aber zwischen min. 350 kDa (Größe und Struktur der Einzelproteine, SEC-Experimente) und 1,3 MDa (Filtrationsexperimente, ImageJ). Die TEM-Aufnahmen zeigen vermutlich verschiedene Formen von transienten (Sub-)Komplexen und geben erste Hinweise darauf, wie die einzelnen GCS-Proteine miteinander interagieren und welche Komplexstruktur sich daraus ergeben könnte. Für die TEM-Aufnahmen wurde das Retentat der *in vitro* Filtrationsexperimenten genutzt. Die visualisierten Formen wurden anschließend hinsichtlich größerer (>10 nm Durchmesser) und gleichmäßig geformten Strukturen untersucht, denn definierte Proteinkomplexe neigen zu Symmetrie (zusammengefasst in Goodsell und Olson 2000; Plaxco und Gross 2009). Mit diesen Kriterien wurden zwei Konformationen gefunden. Sollte es sich dabei um einen vollständigen *Synechocystis* GDC mit einer Stöchiometrie von  $2L_2:6T:1P_2:54H$  (4.2.2) handeln, wären folgende Anordnungen der Proteine denkbar. Die erste Struktur erinnert an die Form eines Schmetterlings und die zweite an die eines Pilzes (siehe 4.2.6).

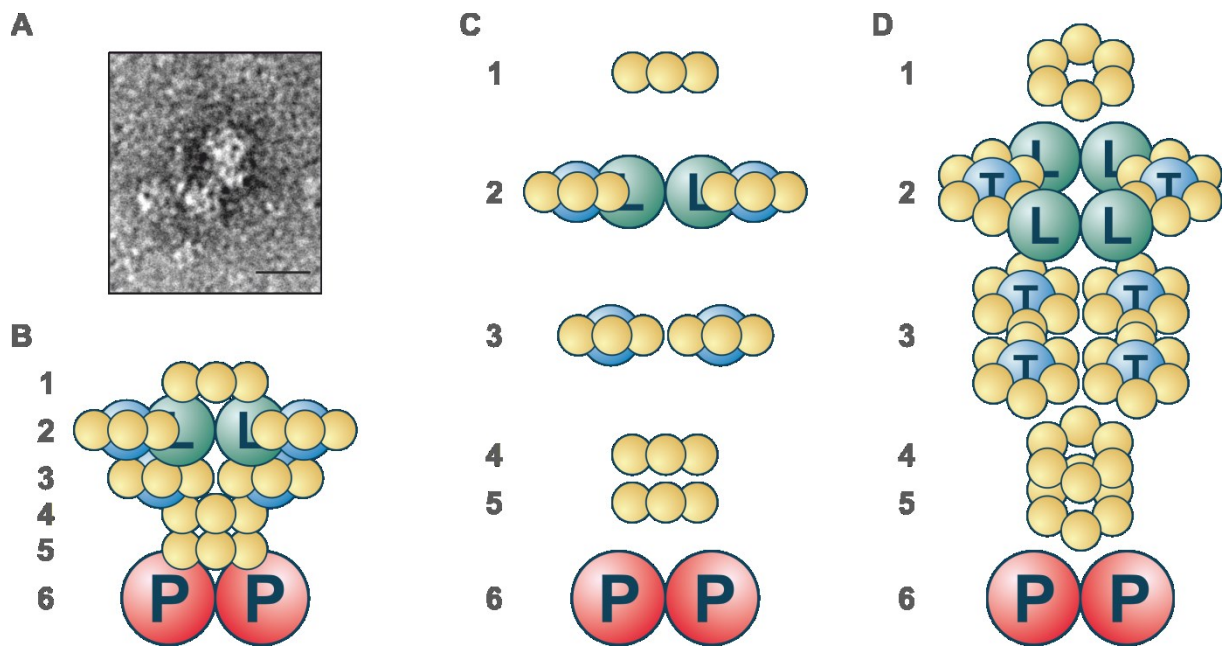
In der Schmetterlings-Form könnte das P-Protein mittig angeordnet sein, die beiden L-Proteine könnten die unteren Abschnitte der Flügel bilden. Die T-Proteine würden die oberen Flügelabschnitte bilden und die H-Proteine würden sich in mehreren Trimeren um die enzymatisch aktiven Proteine anordnen. Zur Veranschaulichung wurde ein Modell (Abbildung 44) das alle Proteine in der Schmetterlingsform umfasst beispielhaft angeordnet.



**Abbildung 44: Veranschaulichung der möglichen Lage der Proteine des *Synechocystis* GDC in der Schmetterlingsform.**

**A:** TEM-Aufnahme der Schmetterlingsform. **B:** Anordnung der GCS-Proteine als Modell in der frontalen Ansicht. **C:** Übersicht über die verschiedenen Ebenen des Modells. **D:** Eine dreidimensionale Ansicht der Modellebenen der Schmetterlingsform. 1-3 – 1 T-Protein umschlossen von 2 H-Protein Trimeren; 4 – P-Protein Dimer; 5 – 1 Ring aus 4 H-Protein Trimeren zusammen mit 1 Ring aus 2 H-Protein Trimeren; 6 – 2 L-Protein Dimere.

Die Pilz-Struktur aus den TEM-Aufnahmen könnte ebenfalls ein Komplex sein. Der Vergleich mit der Skala (20 nm) zeigt, dass der untere Teil des „Stiels“ einen Durchmesser von ca. 10 nm besitzt. Dabei könnte es sich um das P-Protein handeln. Der restliche „Stiel“ könnte aus einer Aneinanderreihung von H-Protein-Trimeren bestehen und der Schirm könnte sich im unteren Bereich aus einer Kombination aus H- und T-Proteinen und im oberen Bereich aus L- und H-Proteinen zusammensetzen. In Abbildung 45 wurde diese Variante ebenfalls mit dem Modell veranschaulicht.



**Abbildung 45: Veranschaulichung der möglichen Lage der Proteine des *Synechocystis* GDC in der Pilzform.**

**A:** TEM-Aufnahme der Pilzform. **B:** Anordnung der GCS-Proteine als Modell in der frontalen Ansicht. **C:** Übersicht über die verschiedenen Ebenen des Modells. **D:** Eine dreidimensionale Ansicht der Modellebenen der Pilzform. 1 – 1 Ring aus 2 H-Protein Trimeren; 2 – 2 L-Protein Dimere mit 2 T-Proteinen umrandet von je 2 H-Protein Trimeren; 3 – 1 T-Protein umschlossen von 2 H-Protein Trimeren; 4-5 – Ring aus 2 H-Protein Trimeren; 6 – P-Protein Dimer.

In beiden Varianten sind folgende Punkte berücksichtigt: Beide Varianten sind symmetrisch und beinhalten die aus den Filtrationsexperimenten ermittelte Stöchiometrie von  $2L_2.6T:1P_2:54H$  (4.2.2) des *Synechocystis* GDC. Die H-Proteine sind in Trimeren angeordnet, wie es die Ergebnisse der SEC-Analysen suggerieren. Bei beiden Varianten bildet ein Teil der H-Proteine das Zentrum des Komplexes, so wie es auch für den pflanzlichen GDC postuliert wurde (Oliver und Raman 1995). Die T-Proteine sind so angeordnet, dass das generierte  $CH_2$ -THF der SHMT zugänglich gemacht werden kann.

Somit könnte es sich bei beiden Strukturen um einen *Synechocystis* GDC handeln. Allerdings neigen stabile Proteinkomplexe in der Regel nicht zu verschiedenen Konformationen. Das bedeutet entweder, dass es sich bei einer (oder beiden) Abbildung(en) nicht um einen Komplex handelt oder dass der Komplex kein regulärer Proteinkomplex ist. Darüber hinaus wäre ebenfalls denkbar, dass es sich bei den verschiedenen Strukturen um unterschiedliche transiente Stadien des instabilen Komplexes handelt. Das Vorliegen eines irregulären Proteinkomplexes wird durch den Fakt unterstützt, dass der pflanzliche Komplex auch von anderen Arbeitsgruppen bisher nicht in seiner vollständigen Form isoliert werden konnte. Das könnte auch erklären, warum weniger komplexe Strukturen in der TEM abgebildet wurden als

erwartet. Ein weiterer Grund dafür könnte die Instabilität des Komplexes sein, denn sowohl die Filtrationsexperimente als auch die SEC haben gezeigt, dass der Komplex sich bei Verdünnung auflöst. Für die TEM-Aufnahmen mussten die Proben ebenfalls verdünnt werden, um unterschiedliche Strukturen voneinander unterscheiden zu können. Dabei kann es zu einem Zerfall des Komplexes gekommen sein.

Für eine endgültige Aussage über die Form des Komplexes aus *Synechocystis* waren insgesamt zu wenige und zu heterogene Aufnahmen vorhanden. Für weitere Experimente mittels NKF und TEM sollten deshalb im Vorfeld *crosslink*-Analysen durchgeführt werden, die den Komplex auch bei Verdünnung stabilisieren. Daraus könnte eine höhere Anzahl an definierten Abbildungen resultieren. Eine weitere Möglichkeit ist die Nutzung der Kryo-Elektronmikroskopie zur Analysierung der dreidimensionalen Struktur, denn hier ist die Probenbehandlung milder als bei der NKF und TEM.

Weitere Analysen zur Aufklärung einer möglichen Komplexbildung der Untereinheiten *in vivo* wurden mittels Pulldown-Experimenten durchgeführt (Abbildung 28, Abbildung 30). Auch wenn es sich dabei prinzipiell ebenfalls um eine *in vitro* Methode handelt, liegen durch die Nutzung des *Synechocystis* Zelllysates die interagierenden Proteine eher in ihrem nativen Zustand vor. Aus den Ergebnissen dieser Experimente kann geschlossen werden, dass die endogenen P-, L- und H-Proteine auch in ihrem nativen Zustand eine Interaktion eingehen. Dadurch konnte das von Sato et al. (2007) mittels *yeast two-hybrid* erhaltene *Synechocystis* Interaktom erweitert werden. Dieses zeigte nur Interaktionen des P-Proteins mit Slr0810 (hypothetisches Protein) und Slr0214 (Methyltransferase, Motiv: 5'-CGATCG-3') und des L-Proteins mit Sll1841 (PDH E2) und Sll1671(hypothetisches Protein). Wie aus der Literatur bekannt ist, können das P- und H-Protein eine relativ stabile Verbindung eingehen (Kikuchi und Hiraga 1982), eine Verbindung zwischen L- und H-Protein wurde hingegen als unwahrscheinlich beschrieben (Faure et al. 2000; Neuburger et al. 2000). Demnach scheint eine direkte Interaktion zwischen P- und L-Protein fraglich. Möglich erscheint jedoch eine indirekte Interaktion der beiden größten GCS-Proteine über das H-Protein. Dies würde wiederum die Vermutung unterstützen, dass das H-Protein als Kernstruktur für die P-, L- und T-Protein Interaktion fungiert. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass eines der zusätzlich gefundenen Proteine die Komplexbildung stabilisiert, wie es für das *E. coli* Lysat innerhalb der SEC-Analysen postuliert wurde. Insgesamt wurden zwei hypothetische Proteine in den Pulldown-Experimenten gefunden, die mit dem L- und P-Protein coeluiert wurden: Slr0769 und Sll0359. Ersteres gehört laut BLAST-Analyse zur ErfK/YbiS/YcfS/YnhG Proteinfamilie

und hat damit vermutlich eine Transferaseaktivität. Das zweite ist vermutlich ein Transkriptionsregulator. Diese funktionelle Einordnung macht es unwahrscheinlich, dass diese Proteine zur Interaktion der GCS-Proteine *in vivo* beitragen. Auf Grund der hohen Salzkonzentrationen in den für diese Versuche genutzten Puffern kann vermutet werden, dass eine starke Interaktion zwischen dem H-, L- und P-Protein besteht. Verglichen mit dem pflanzlichen GDC, der nur bei geringen Salzkonzentrationen rekonstruiert werden konnte (Neuburger et al. 1986), scheint im Pulldown-Versuch die Interaktion der GCS-Proteine weniger anfällig für Dissoziationen unter hohen Salzkonzentrationen. Dies könnte eine besondere Eigenschaft des cyanobakteriellen GCS sein, die diesen prinzipiell weniger anfällig für plötzlich erhöhte Konzentrationen an z. B. Natriumchlorid macht, die für euryhaline Cyanobakterien im natürlichen Lebensraum vorliegen können (zusammengefasst in Hagemann 2011). Unklar ist, warum diese relativ stabile Interaktion der GCS-Proteine nicht auch in den SEC-Analysen detektiert werden konnte. Möglicherweise sind die dissoziierten Proteine unter hohen Salzbedingungen nicht in der Lage eine Interaktion einzugehen, bereits Komplex-assoziierte Proteine dagegen sind weniger anfällig für eine Dissoziation bei steigenden Salzkonzentrationen. Diese Erklärung wird sowohl durch die immunologische Untersuchung als auch die MS-Analyse unterstützt in denen zweifelsfrei eine Interaktion zwischen P-, L- und H-Protein nachgewiesen werden konnte.

Dass das T-Protein nicht in den Elutionsfraktionen der Pulldown-Experimente vorhanden war, liegt vermutlich daran, dass es nicht in der löslichen Fraktion nach dem Zellaufschluss vorhanden war, sondern sich in der Membranfraktion befand. Dies wird durch verschiedene MS-Analysen unterstützt, in denen das T-Protein von *Synechocystis* immer weit stärker in der Membranfraktion als in der löslichen Fraktion vertreten ist (persönliche Mitteilung von Dr. Stefan Mikkat). Allerdings steht die Subkomplexbildung im Pulldown aus P-, L- und H-Protein im Widerspruch zu den *in vitro* Komplexversuchen mittels Filtration. Dort war das T-Protein z. T. essentiell für den Verbleib der Proteine im Retentat und somit für deren Assoziation. Da für die Filtrationsversuche aufgereinigte Proteine und für den Pulldown das gesamte *Synechocystis* Lysat verwendet wurde, besteht die Möglichkeit, dass eine weitere Komponente aus dem *Synechocystis* Lysat die Subkomplexbildung initiiert ohne dass das T-Protein beteiligt sein muss oder die Menge an H-Protein ist auch in diesem Fall entscheidend für eine Komplexbildung (Filtrationsexperimente, Abbildung 23).

Zusätzlich ist es ebenfalls möglich, dass das T-Protein über die verwendeten Methoden nicht detektiert werden konnte. Der Zellaufschluss mittels Ultraschall kann unzureichend sein um

das T-Protein aus der Membranfraktion freizusetzen, was durch den Aufschluss mittels *french press* behoben werden könnte. Für die MS-Analyse ist ein zuverlässiger Verdau der Proteine mittels Trypsin essentiell. Okamura-Ikeda et al. konnten feststellen, dass das T-Protein aus *E. coli* wenig anfällig für den Verdau mit Trypsin ist (Okamura-Ikeda et al. 2003). Dies könnte auch für das T-Protein aus *Synechocystis* zutreffen und somit die Analyse mittels MS negativ beeinträchtigen.

Zusammenfassend sprechen die Strukturuntersuchungen zum GCS aus *Synechocystis* für eine Komplexbildung. Die verschiedenen Methoden zeigen deutlich die Interaktion einzelner und aller Proteine. Die Ausbildung eines derartigen Komplexes würde in Anbetracht der geringen GCS Gesamtmenge in der nicht-kompartimentierten Cyanobakterienzelle eine hinreichend schnelle Enzymreaktion vermitteln, ohne dass Zwischenprodukte oder das H-Protein frei diffundieren müssten. Diese Erkenntnisse bilden weiterhin eine stabile Grundlage für zukünftige Struktur- und Funktionsanalysen des GDC in Prokaryoten und darüber hinaus auch in Eukaryoten.

## 5.2. Die Stöchiometrie des pflanzlichen GCS

Die von Oliver et al. (1990b) publizierte Stöchiometrie und die von Neuburger et al. (1986) bestimmten Bedingungen für eine Komplexbildung wurden bisher für photosynthetisch aktives Gewebe von Pflanzen als weitestgehend allgemein gültig angenommen. Durch die Untersuchung des GCS aus *Synechocystis* innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die GCS-Komplexbildung phototropher Organismen vielschichtiger ist als bisher angenommen wurde. Aus diesem Grund wurden MS-Analysen zur Stöchiometrie der GCS-Proteine von *A. thaliana* und *P. sativum* durchgeführt. Die publizierte Stöchiometrie des Erbsen-GDC (Oliver et al. 1990b) von  $1L_2:9T:2P_2:27H$  konnte innerhalb dieser Arbeit korrigiert werden. Die MS-Analysen ergaben eine Stöchiometrie der GCS-Proteine von  $1L_2:8T:4P_2:20H$  für *A. thaliana* bzw.  $1L_2:8T:4P_2:28H$  für *P. sativum* und damit eine Größe von 1,5 bis 1,6 MDa. Mit Hilfe der jpt- und QconCAT-Methode und der Analyse mittels MS können die nativen Proteine durch spezifische Peptide für die einzelnen Isoformen identifiziert und analysiert werden. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die innerhalb dieser Arbeit ermittelte Stöchiometrie des pflanzlichen GDC genauer ist, als die bisher gültige.

Darüber hinaus kann durch den Vergleich der Stöchiometrien von *A. thaliana* und *P. sativum* eine fast allgemeine Gültigkeit dieser Stöchiometrie für höhere Pflanzen postuliert werden. *A. thaliana* dient u. a. auf Grund seines kleinen Genoms und dessen vollständiger

Sequenzierung (Arabidopsis Genome Initiative 2000) sowie dem Vorhandensein umfangreicher Mutantenbibliotheken als Modellorganismus für alle höheren Pflanzen. Die innerhalb dieser Arbeit zum ersten Mal analysierte Stöchiometrie der Arabidopsis-GCS-Proteine zeigt ein Verhältnis von  $1L_2:8T:4P_2:20H$ . Somit scheinen auch höhere Pflanzen, die im Unterschied zu *P. sativum* mehrere Isoformen der GCS-Proteine besitzen, eine vergleichbare Stöchiometrie der enzymatisch aktiven Proteine aufzuweisen. Im Vergleich dazu scheint die Menge an H-Protein variabel zu sein, woraus sich eine notwendige höhere Verfügbarkeit des Proteins ableiten lassen könnte.

**Tabelle 36: Übersicht über die in dieser Arbeit ermittelten Stöchiometrien der GCS-Proteine aus Pflanzen und *Synechocystis*.** Zum Vergleich ist die von Oliver et al. publizierte Stöchiometrie mit aufgeführt.

Protein	<i>P. sativum</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>Synechocystis</i>	<i>P. sativum</i> (Oliver et al. 1990b)
L <sub>2</sub> -Protein	1	1	2	1
T-Protein	8	8	6	9
P <sub>2</sub> -Protein	4	4	1	2
H-Protein	28	20	52	27

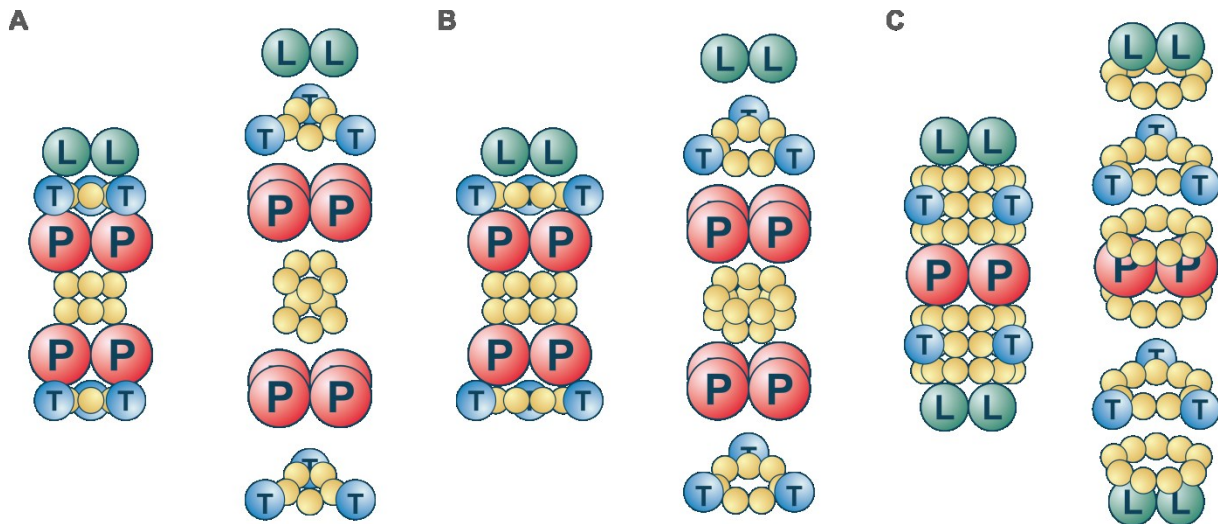
Obwohl das L-Protein auch Teil der PDH, KGDH und BCKDH ist, wird auf Grund der hohen Abundanz des GDC in Mitochondrien davon ausgegangen, dass es sich hierbei auch um die *in vivo* Stöchiometrie handelt. In früher publizierten Arbeiten (Oliver et al. 1990b) zur Analyse der GDC-Stöchiometrie von *P. sativum* hatte der Komplex zwei P-Protein Dimere und 27 H-Protein Monomere. Im Vergleich dazu enthält die innerhalb dieser Arbeit ermittelte Stöchiometrie vier P-Protein Dimer und 20 bzw. 28 H-Protein Monomere. Daraus ergibt sich für *A. thaliana* ein geringeres Verhältnis der H-Proteine pro enzymatisch aktivem Protein. Während bei Oliver et al. pro enzymatisch aktivem Protein je ca. 2 H-Proteine verfügbar waren, so sind es nun 1,5 H-Proteine. Da das H-Protein in drei unterschiedlichen Konformationen ( $H_{ox}$ ,  $H_{met}$  und  $H_{red}$ ) vorliegt, könnten sich je zwei enzymatisch aktive Proteine ein H-Protein Trimer teilen.

Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeiten der pflanzlichen mit den cyanobakteriellen GCS-Proteinen erscheint eine vergleichbare Stöchiometrie wahrscheinlich. Eine eindeutige *in vivo* Stöchiometrie des *Synechocystis* GCS konnte innerhalb dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Die ImageJ-Auswertungen lassen jedoch eine Stöchiometrie von  $2L_2:6T:1P_2:52H$  vermuten. Für eine vollständige enzymatische Reaktion sind mindesten drei H-Protein-

Konformationen als Reaktionsintermediat ( $H_{ox}$ ,  $H_{met}$  und  $H_{red}$ ) für die enzymatisch aktiven Proteine notwendig. Um einen möglichst effizienten Ablauf der Aktivität zu gewährleisten könnten also min. drei und bis zu sechs H-Proteine je enzymatisch aktivem Protein im *in vivo* Komplex möglich sein und eine Stöchiometrie von  $2L_2:6T:1P_2:54H$  wäre denkbar. Auf Grund der hohen Standardabweichung bei der Ermittlung des H-Proteins scheint eine abweichende Anzahl dieses Proteins wahrscheinlich. Die Einzelproteinanalysen unterstützen auch die Vermutung, dass das H-Protein als Trimer vorliegt und durchaus eine Reihe von H-Protein Trimeren den Kern der GCS-Struktur bilden könnte.

Folgende Abbildungen zeigen einen möglichen Aufbau des GDC in Pflanzen und *Synechocystis*. Dabei weicht die Anordnung der *Synechocystis* Proteine von der in Abbildung 44 und Abbildung 45 dargestellten Anordnung der TEM-Aufnahmen ab. Die in Abbildung 46 dargestellte Anordnung beruht auf den in dieser Arbeit ermittelten Stöchiometrien (Tabelle 36) und einem ähnlichen Aufbau des Komplexes zwischen den Pflanzen und *Synechocystis*. Auf Grund der orthologen Proteine ist ein stark abweichender Aufbau des Komplexes zwischen den Organismen unwahrscheinlich. Deshalb wurde die Anordnung so dargestellt, wie sich der Komplex im Laufe der Evolution entwickelt haben könnte. Darüber hinaus wurden folgende Punkte bei der Anordnung der Proteine berücksichtigt: Proteinkomplexe sind in der Regel symmetrisch angeordnet (Goodsell und Olson 2000; Plaxco und Gross 2009). Das H-Protein bildet als Oligomer wahrscheinlich die Kernstruktur des Komplexes (Oliver und Raman 1995, diese Arbeit) und muss auf Grund seiner Funktion als Vermittlerprotein für alle enzymatisch aktivem Proteine direkt verfügbar sein. Das T-Protein ist in der Lage einen relativ stabilen Komplex mit dem H-Protein einzugehen (Okamura-Ikeda et al. 2010) und könnte in Zusammenhang mit dem H-Protein eine Kernstruktur bilden (diese Arbeit). Das H-Protein ist auch als Trimer in der Lage eine Verbindung mit dem T-Protein einzugehen (diese Arbeit, Abbildung 9). Das P-Protein ist auch über Organismengrenzen hinweg in der Lage eine Verbindung mit dem H-Protein einzugehen (diese Arbeit, Abbildung 28). Die Verbindung zwischen P- und L-Protein wird vermutlich über das H-Protein vermittelt (diese Arbeit, 4.2.5). Das L-Protein hat auf Grund seiner Interaktion mit anderen Proteinkomplexen vermutlich eine periphere Lage. Die Proteine L, T und H sowie P, T und H sind in der Lage Subkomplexe zu bilden (diese Arbeit). Das *Synechocystis* P-Protein zeigt in der BN (ComplexomeMap Abbildung 4) und nativen PAGE eine Oligomerisierung (diese Arbeit, Abbildung 6). Das am T-Protein generierte  $CH_2$ -THF muss der SHMT zur Verfügung stehen. Deshalb ist das Protein vermutlich eher an den Grenzen des Komplexes und nicht im Inneren lokalisiert.





**Abbildung 46:** Übersicht über die mögliche Anordnung der GCS-Proteine in einem Komplex. Je Komplex ist links die frontale Ansicht und rechts eine dreidimensionale Anordnung dargestellt.

**A:** Anordnung der Proteine in einem Komplex in *A. thaliana* ( $1L_2:8T:4P_2:20H$ ). **B:** Anordnung der Proteine in einem Komplex in *P. sativum* ( $1L_2:8T:4P_2:28H$ ). **C:** Anordnung der Proteine in einem Komplex in *Synechocystis* ( $2L_2:6T:1P_2:54H$ ).

Neben dem stöchiometrischen Verhältnis der Untereinheiten wurde auch der GCS-Anteil am Gesamtproteom von *Synechocystis* geschätzt. Die weitaus geringere Menge der GCS-Proteine in *Synechocystis* (100-fach) im Vergleich zum GCS in Blättern steht vermutlich in Zusammenhang mit der unterschiedlichen Aktivität des C2-Zyklus. Während Pflanzen nur mittels 2-Phosphoglykolat-Phosphatase die Detoxifizierung des 2-PG erreichen und eine sehr hohe Oxygenaseaktivität der RubisCO unter ambienten Bedingungen aufweisen, verfügt *Synechocystis* über zwei weitere Wege zum Abbau von 2-PG und zusätzlich über einen aktiven *carbon concentrating mechanism* (Badger et al. 2006; Eisenhut et al. 2006) zur weitgehenden Unterdrückung der Oxygenase Reaktion von RubisCO.

### 5.3. Die Aktivität des GDC in Abhängigkeit der Proteinkonzentration

Die Untersuchungen am pflanzlichen GDC dienten zu Beginn der Methodenetablierung der GCS Aktivitätsmessung, wobei die Reduktion von  $NAD^+$  in Abhängigkeit des Substrats Glycin gemessen wurde. Allerdings zeigten die von mir durchgeführten Experimente abweichende Ergebnisse zu den publizierten Abhängigkeiten der GDC-Aktivität von der Proteinkonzentration (Neuburger et al. 1986). Während der Gesamtproteinextrakt wie erwartet mit steigender Konzentration eine steigende spezifische Aktivität aufwies, da bisher angenommen wird das mit steigendem Gesamtprotein der Anteil an GDC zunimmt, so sank die spezifische Aktivität der Proteine des Retentats mit steigender Konzentration. Daraus resultiert die Vermutung, dass die Abhängigkeit der Aktivität von der Komplexbildung noch

nicht vollständig aufgeklärt ist. Durch die Filtration von Matrixextrakten durch eine 300 kDa *cut-off* Membran wurden die Komplex-assoziierten von den dissoziierten Proteinen getrennt. Somit sollte die Aktivität beider Zustände getrennt analysierbar sein. Aus der Literatur (Bourguignon et al. 1988; Walker und Oliver 1986a) ist bekannt, dass mit dem Aufschluss der Mitochondrien der *in vivo* Komplex zerfällt und erst durch die Filtration und damit verbundene Konzentration der Proteine rekonstruiert werden kann. Das spricht dafür, dass die Proteine im Gesamtextrakt dissoziiert und im Retentat Komplex-assoziiert sind. Ist dies der Fall, würde das bedeuten, dass die Komplex-assoziierten Proteine eine geringere Enzymaktivität aufweisen, als die dissoziierten Proteine. Wenn das H-Protein fest im Komplex assoziiert ist, könnte seine Mobilität eingeschränkt sein und die geringere Aktivität zustande kommen. Die höhere spezifische Aktivität des Retentats bei sehr niedriger Konzentration könnte ebenfalls ein Hinweis auf die fehlende Stabilität des Komplexes sein. Eine detaillierte Analyse der Gesamtaktivität des Filtrats könnte Aufschluss über den Zustand der GCS-Proteine geben. Durch die Filtration sollten dort alle Proteine dissoziiert vorliegen. Erste Untersuchungen wurden hier bereits durchgeführt. Bei einer Proteinkonzentration von  $0,05 \text{ mg ml}^{-1}$  weist der Durchfluss eine höhere Enzymaktivität als der Überstand auf. Das unterstützt die Vermutung, dass die Komplexbildung eher einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität hat und damit eventuell einen Schutzmechanismus vor übermäßigem Glycin-Abbau, Serin-Akkumulation oder einem ungleichen Verhältnis von Reduktionsintermediaten darstellen könnte. Unklar bleibt bei dieser Vermutung, warum im Gesamtextrakt bei der gleichen Konzentration eine höhere Aktivität als im Durchfluss gemessen werden konnte.

Abschließend soll diskutiert werden, ob die Aktivität *in vivo* von der Komplexbildung abhängen könnte. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei  $130 \text{ mg ml}^{-1}$  ein Komplex vorliegt (Oliver et al. 1990b) und ein Glycinumsatz von bis zu  $1200 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (Douce et al. 2001) möglich ist. Bei den innerhalb dieser Arbeit gezeigten Daten wäre der Komplex bei gleichbleibender Erhöhung der spezifischer Aktivität (Abbildung 35,  $4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  zwischen 0,09 und 0,25 mg) ab einer Konzentration von  $50 \text{ mg ml}^{-1}$  in der Lage diesen Glycinumsatz zu erreichen. Im Vergleich dazu ist der Gesamtextrakt, in dem die Proteine dissoziiert vorliegen (Bourguignon et al. 1988), bei gleichbleibendem Trend (Abbildung 35,  $80 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  zwischen 0,1 und 0,28 mg) schon ab einer Konzentration von  $1,7 \text{ mg ml}^{-1}$  in der Lage den gleichen Glycinumsatz zu erreichen. Das würde bedeuten, dass die Komplexbildung den tatsächlich möglichen Umsatz von Glycin zu Serin hemmt. Ein Grund dafür könnte sein, die Zelle vor toxischen Konzentrationen an Serin zu schützen (Timm et al. 2013). Gleichzeitig muss jedoch auch das Level an Glycin reguliert werden, denn der toxische

Effekt des Glycins auf phototrophe Organismen konnte bereits mehrfach belegt werden (Eisenhut et al. 2007; Kure et al. 2006). Für einen effektiven Glycin-Abbau wäre eine Dissoziation der GCS-Proteine und damit ansteigende Enzymaktivität von Vorteil. Sollte dieser Zusammenhang zwischen Komplex-assoziierten und dissoziierten Proteinen und einer daraus resultierenden veränderten Aktivität der Proteine tatsächlich bestehen, stellt sich die Frage der Regulation für die Assoziation und Dissoziation. Eine Möglichkeit wäre die Regulation über das Verhältnis der Reduktionsequivalente. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Phosphoribulokinase/CP12/Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Komplex in höheren Pflanzen bei der Inkubation mit NAD(H) assoziiert und bei NADP(H) dissoziiert (Wedel et al. 1997) und auch die Aktivität der Phosphoribulokinase ist abhängig von der Dissoziation des Komplexes. Somit wäre es kein unbekanntes Konzept, dass Proteinkomplexe je nach Verfügbarkeit von Cofaktoren assoziieren bzw. dissoziieren und damit ihre Gesamtaktivität oder eine Teilaktivität beeinflussen. Im Hinblick auf die Aktivität des GDC könnte diese Vermutung, wie von Wedel et al. durchgeführt, durch die Inkubation des Gesamtextraktes und des Retentats bzw. Filtrats mit  $\text{NAD(P)}^+$  oder  $\text{NAD(P)H}$  und der anschließenden Messung der Gesamtaktivität bestätigt werden. Zusätzlich dazu sollten auch die Einzelproteinaktivitäten im Gesamtextrakt und in Abhängigkeit der Anwesenheit der anderen GCS-Proteine ermittelt werden. Dies gilt generell auch für den in dieser Arbeit durchgeführten Filtrationsversuch der pflanzlichen Proteine, um festzustellen, ob die Gesamtaktivität durch die Proteinkonzentration oder eine Teilaktivität des P-, L- oder T-Proteins beeinflusst ist.

Die in dieser Arbeit postulierte mögliche Zusammenarbeit von Komplex-assoziierten und -dissoziierten GCS-Proteinen wird durch bereits publizierte Überexpressionsstudien der einzelnen GCS-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* unterstützt. Wenn für den optimalen photorespiratorischen Fluss ein definierter GDC verantwortlich wäre, dann sollte die Überexpression einzelner GCS Proteine keinen Einfluss auf den Glycinumsatz haben. Im Gegensatz dazu zeigte die gesteigerte H-Protein Expression eine erhöhte spezifische GCS Aktivität durch ein niedrigeres Level an Glycin (Timm et al. 2012). Da die Expression der anderen GCS-Komponenten unverändert blieb, ist das vermutlich auf die gesteigerte Menge an H-Protein als Substrat bzw. Reaktionsintermediat zurückzuführen. Wenn es sich bei der spezifischen Gesamtaktivität um einen dynamischen Prozess handelt, der von Komplex-assoziierten und -dissoziierten Proteinen gesteuert wird, so stünde im Falle der H-Protein Überexpression den dissoziierten P-, T- und L-Proteinen eine gesteigerte Menge an Reaktionsintermediat zur Verfügung und die Reaktion von Glycin zu  $\text{CH}_2\text{-THF}$  könnte

effektiver ablaufen. Die Überexpression des L-Proteins hat ebenfalls eine Reduktion von Glycin zur Folge, woraus eine erhöhte Aktivität des GDC geschlossen wurde (Timm et al. 2015). Da auch hier nur das L-Protein erhöht exprimiert wurde und die anderen Untereinheiten unverändert blieben, ist dieses möglicherweise in der Lage, reduziertes H-Protein schneller wieder zu reoxidieren und somit wieder dem P-Protein zur Verfügung zu stellen. Dass der gleiche Effekt nicht bei der Überexpression des T-Proteins gezeigt werden konnte, wurde auf eine von Anfang an gesteigerte hohe Menge an T-Protein in der mitochondrialen Matrix zurückgeführt, so dass keine zusätzliche Stimulierung möglich war (Timm et al. 2017). Der *knock-down* des T-Proteins hatte in dieser Arbeit einen signifikant verringernden Einfluss auf die Gesamtaktivität des GDC, aber nicht auf das Wachstum der Arabidopsis-Mutanten. Möglicherweise sind die verbliebenen T-Proteine von den weiteren Untereinheiten dissoziiert.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zum GCS in phototrophen Organismen zeigen, dass sich der cyanobakterielle Komplex nur gering vom pflanzlichen unterscheidet und somit als Modell für zukünftige Struktur- und Funktionsanalysen genutzt werden kann. Dafür ist es essentiell die Stöchiometrie des Komplexes anhand von MS-Analysen zu verifizieren. Dafür bietet sich die QconCAT-Methode an. Im Vergleich mit der jpt-Methode zeigen die QconCAT Ergebnisse eine vergleichbare Genauigkeit und bietet darüber hinaus die Möglichkeit durch die Synthese eines artifiziellen Proteins eine sehr viel höhere Anzahl verschiedener Peptiden zu analysieren. Neben der Stöchiometrie des Komplexes ist auch dessen Aktivität für dessen Nutzung als Modell entscheidend. Die Aktivitätsmessungen innerhalb der SEC-Analysen haben gezeigt, dass das *Synechocystis* T-Protein prinzipiell aktiv ist. Dies sollte dennoch z. B. anhand des bereits erwähnten Testes (Methylentetrahydrofolat-abhängigen Dehydrogenase) verifiziert werden. Im Anschluss müssen Tests zur *Synechocystis* GCS-Aktivität folgen. Da alle *Synechocystis* Proteine in großer Menge rekombinant hergestellt werden können, bietet sich hier eine Vielzahl von Möglichkeiten. Der in dieser Arbeit durchgeführte GCS-Gesamtaktivitätstest mit unterschiedlichen Mengenkombinationen der Einzelproteine ist ebenso denkbar wie die Messung in Kooperation mit der SHMT. Des Weiteren sollte zur Analyse, ob ein zusätzlicher Faktor für die Aktivität notwendig ist, *Synechocystis* oder *E. coli* Lysat zur Messung hinzugegeben werden. Um den Bereich an möglichen Faktoren dabei einzugrenzen, könnten die Fraktionen, in denen nach der SEC-Analyse Aktivität detektiert wurde, verwendet und diese auch mittels MS analysiert werden. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit und mit Hilfe der erwähnten, zukünftigen

Arbeiten sollte es möglich sein ein Modell des GCS zu etablieren, das es möglich macht die genaue Struktur des Komplexes in phototrophen Organismen zu verifizieren.

Die Stöchiometrie des pflanzlichen GDC konnte innerhalb dieser Arbeit überprüft und verfeinert werden. In zukünftigen Arbeiten sollte der Fokus deshalb auf der Analyse der Gesamtaktivität des Komplexes im Vergleich zur Gesamtaktivität der nicht-assoziierten Proteine liegen und der Grund ermittelt werden, warum die Proteine in einem Komplex vorliegen, wenn die Einzelproteine in der Lage sind bei niedrigerer Konzentration die gleiche Aktivität zu erzielen. Dazu müsste der Komplex *in vitro* unterschiedlichen physiologischen Bedingungen (höhere Temperaturen, saurer und basischer pH-Wert, höheren Glycin und Serin-Konzentrationen, höherer Konzentration an THF, etc.) ausgesetzt werden und dessen Aktivität ermittelt werden, um einen möglichen Unterschied festzustellen. Darüber hinaus kann durch die Zugabe der orthologen *Synechocystis* Proteine zum Aktivitätstest ermittelt werden, ob die Erhöhung der verfügbaren Menge an Einzelproteinen auch *in vitro* einen Effekt auf die Aktivität des Komplexes hat. Damit könnte untersucht werden ob bei unterschiedlichen physiologischen Bedingungen ein stabiler Komplex besteht oder die Verfügbarkeit eines transienten Komplexes einen Schutzmechanismus vor negativen Einflüssen darstellt.

## 6. Literatur

- Anderson, L.E.** (1971) Chloroplast and cytoplasmic enzymes II. Pea leaf triose phosphate isomerases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 235, 237–244.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, 796–815.
- Arakawa, T. and Timasheff, S.N.** (1985) The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophysical Journal*, 47, 411–414.
- Badger, M.R., Price, G.D., Long, B.M. and Woodger, F.J.** (2006) The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO<sub>2</sub> concentrating mechanism. *Journal of Experimental Botany*, 57, 249–265.
- Bauwe, H., Chu, C.C., Kopriva, S. and Nan, Q.** (1995) Structure and expression analysis of the *gdcSP*A and *gdcSP*B genes encoding two P-isoproteins of the glycine-cleavage system from *Flaveria pringlei*. *European Journal of Biochemistry*, 234, 116–124.
- Bauwe, H., Hagemann, M. and Fernie, A.R.** (2010) Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in Plant Science*, 15, 330–336.
- Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7, 1513–1523.
- Bondos, S.E. and Bicknell, A.** (2003) Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Analytical Biochemistry*, 316, 223–231.
- Bosma, H.J., Voordouw, G., Kok, A. de and Veeger, C.** (1980) Self-association of the pyruvate dehydrogenase complex from *Azotobacter vinelandii* in the presence of polyethylene glycol. *FEBS Letters*, 120, 179–182.
- Bourguignon, J., MacHerel, D., Neuburger, M. and Douce, R.** (1992) Isolation, characterization, and sequence analysis of a cDNA clone encoding L-protein, the dihydrolipoamide dehydrogenase component of the glycine cleavage system from pea-leaf mitochondria. *European Journal of Biochemistry*, 204, 865–873.
- Bourguignon, J., Merand, V., Rawsthorne, S., Forest, E. and Douce, R.** (1996) Glycine decarboxylase and pyruvate dehydrogenase complexes share the same dihydrolipoamide dehydrogenase in pea leaf mitochondria: evidence from mass spectrometry and primary-structure analysis. *The Biochemical Journal*, 313 (Pt 1), 229–234.

- Bourguignon, J., Neuburger, M. and Douce, R.** (1988) Resolution and characterization of the glycine-cleavage reaction in pea leaf mitochondria. Properties of the forward reaction catalysed by glycine decarboxylase and serine hydroxymethyltransferase. *The Biochemical Journal*, 255, 169–178.
- Bourguignon, J., Vauclare, P., Merand, V., Forest, E., Neuburger, M. and Douce, R.** (1993) Glycine decarboxylase complex from higher plants. Molecular cloning, tissue distribution and mass spectrometry analyses of the T protein. *European Journal of Biochemistry*, 217, 377–386.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Chebotareva, N.A., Kurganov, B.I. and Livanova, N.B.** (2004) Biochemical effects of molecular crowding. *Biochemistry (Moscow)*, 69, 1239–1251.
- Cohen-Addad, C., Faure, M., Neuburger, M., Ober, R., Sieker, L., Bourguignon, J., MacHerel, D. and Douce, R.** (1997) Structural studies of the glycine decarboxylase complex from pea leaf mitochondria. *Biochimie*, 79, 637–643.
- Cohen-Addad, C., Pares, S., Sieker, L., Neuburger, M. and Douce, R.** (1995) The lipoamide arm in the glycine decarboxylase complex is not freely swinging. *Nature Structural Biology*, 2, 63–68.
- Curtis, R.A. and Lue, L.** (2006) A molecular approach to bioseparations. Protein–protein and protein–salt interactions. *Chemical Engineering Science*, 61, 907–923.
- Day, D.A., Neuburger, M. and Douce, R.** (1985) Biochemical Characterization of Chlorophyll-Free Mitochondria From Pea Leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, 12, 219.
- Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M. and Rébeillé, F.** (2001) The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in Plant Science*, 6, 167–176.
- Eisenhut, M., Bauwe, H. and Hagemann, M.** (2007) Glycine accumulation is toxic for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, but can be compensated by supplementation with magnesium ions. *FEMS Microbiology Letters*, 277, 232–237.
- Eisenhut, M., Kahlon, S., Hasse, D., Ewald, R., Lieman-Hurwitz, J., Ogawa, T., Ruth, W., Bauwe, H., Kaplan, A. and Hagemann, M.** (2006) The plant-like C2 glycolate cycle and the bacterial-like glycerate pathway cooperate in phosphoglycolate metabolism in cyanobacteria. *Plant Physiology*, 142, 333–342.

- Eisenhut, M., Ruth, W., Haimovich, M., Bauwe, H., Kaplan, A. and Hagemann, M.** (2008) The photorespiratory glycolate metabolism is essential for cyanobacteria and might have been conveyed endosymbiontically to plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 17199–17204.
- Engel, N., van den Daele, K., Kolukisaoglu, U., Morgenthal, K., Weckwerth, W., Pärnik, T., Keerberg, O. and Bauwe, H.** (2007) Deletion of glycine decarboxylase in Arabidopsis is lethal under nonphotorespiratory conditions. *Plant Physiology*, 144, 1328–1335.
- Engels, A., Kahmann, U., Ruppel, H.G. and Pistorius, E.K.** (1997) Isolation, partial characterization and localization of a dihydrolipoamide dehydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1340, 33–44.
- Engels, A. and Pistorius, E.K.** (1997) Characterization of a gene encoding dihydrolipoamide dehydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Microbiology*, 143 (Pt 11), 3543–3553.
- Ewald, R., Hoffmann, C., Florian, A., Neuhaus, E., Fernie, A.R. and Bauwe, H.** (2014) Lipoate-Protein Ligase and Octanoyltransferase Are Essential for Protein Lipoylation in Mitochondria of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 165, 978–990.
- Faure, M., Bourguignon, J., Neuburger, M., MacHerel, D., Sieker, L., Ober, R., Kahn, R., Cohen-Addad, C. and Douce, R.** (2000) Interaction between the lipoamide-containing H-protein and the lipoamide dehydrogenase (L-protein) of the glycine decarboxylase multienzyme system 2. Crystal structures of H- and L-proteins. *European Journal of Biochemistry*, 267, 2890–2898.
- Fujiwara, K., Okamura-Ikeda, K. and Motokawa, Y.** (1984) Mechanism of the glycine cleavage reaction. Further characterization of the intermediate attached to H-protein and of the reaction catalyzed by T-protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 259, 10664–10668.
- Fujiwara, K., Okamura-Ikeda, K. and Motokawa, Y.** (1986) Chicken liver H-protein, a component of the glycine cleavage system. Amino acid sequence and identification of the N epsilon-lipoyllysine residue. *The Journal of Biological Chemistry*, 261, 8836–8841.
- Fujiwara, K., Okamura-Ikeda, K. and Motokawa, Y.** (1990) cDNA sequence, in vitro synthesis, and intramitochondrial lipoylation of H-protein of the glycine cleavage system. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 17463–17467.
- Goodsell, D.S. and Olson, A.J.** (2000) Structural symmetry and protein function. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29, 105–153.



- Green, M.R. and Sambrook, J.** (2012) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 4th edn. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Guilhaudis, L., Simorre, J.P., Blackledge, M., Marion, D., Gans, P., Neuburger, M. and Douce, R.** (2000) Combined structural and biochemical analysis of the H-T complex in the glycine decarboxylase cycle: evidence for a destabilization mechanism of the H-protein. *Biochemistry*, 39, 4259–4266.
- Hagemann, M.** (2011) Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *FEMS Microbiology Reviews*, 35, 87–123.
- Hagemann, M., Vinnemeier, J., Oberpichler, I., Boldt, R. and Bauwe, H.** (2005) The glycine decarboxylase complex is not essential for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Biology*, 7, 15–22.
- Hall, N.P., Kendall, A.C., Lea, P.J., Turner, J.C. and Wallsgrove, R.M.** (1987) Characteristics of a photorespiratory mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) deficient in phosphoglycollate phosphatase. *Photosynthesis Research*, 11, 89–96.
- Harada, A., Kamimura, N., Takeuchi, K., Yu, H.Y., Masai, E. and Senda, T.** (2017) The crystal structure of a new O-demethylase from *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *The FEBS Journal*, 284, 1855–1867.
- Harris, J.R.** (2015) Transmission electron microscopy in molecular structural biology. A historical survey. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 581, 3–18.
- Harris, R.A., Bowker-Kinley, M.M., Wu, P., Jeng, J. and Popov, K.M.** (1997) Dihydrolipoamide Dehydrogenase-binding Protein of the Human Pyruvate Dehydrogenase Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 19746–19751.
- Haschemeyer, R.H. and Harven, E. de** (1974) Electron microscopy of enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 43, 279–301.
- Hasse, D., Andersson, E., Carlsson, G., Masloboy, A., Hagemann, M., Bauwe, H. and Andersson, I.** (2013) Structure of the homodimeric glycine decarboxylase P-protein from *Synechocystis* sp. PCC 6803 suggests a mechanism for redox regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 35333–35345.
- Hasse, D., Hagemann, M., Andersson, I. and Bauwe, H.** (2010) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analyses of the homodimeric glycine decarboxylase (P-protein) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 66, 187–191.

- Hasse, D., Mikkat, S., Hagemann, M. and Bauwe, H.** (2009) Alternative splicing produces an H-protein with better substrate properties for the P-protein of glycine decarboxylase. *The FEBS Journal*, 276, 6985–6991.
- Hasse, D., Mikkat, S., Thrun, H.-A., Hagemann, M. and Bauwe, H.** (2007) Properties of recombinant glycine decarboxylase P- and H-protein subunits from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *FEBS Letters*, 581, 1297–1301.
- Hiraga, K. and Kikuchi, G.** (1980) The mitochondrial glycine cleavage system. Functional association of glycine decarboxylase and aminomethyl carrier protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 255, 11671–11676.
- Hiraga, K., Kochi, H., Hayasaka, K., Kikuchi, G. and Nyhan, W.L.** (1981) Defective glycine cleavage system in nonketotic hyperglycinemia. Occurrence of a less active glycine decarboxylase and an abnormal aminomethyl carrier protein. *The Journal of Clinical Investigation*, 68, 525–534.
- Hiraga, K., Kochi, H., Motokawa, Y. and Kikuchi, G.** (1972) Enzyme complex nature of the reversible glycine cleavage system of cock liver mitochondria. *Journal of Biochemistry*, 72, 1285–1289.
- Keech, O., Dizengremel, P. and Gardeström, P.** (2005) Preparation of leaf mitochondria from *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 124, 403–409.
- Kelly, G.J. and Latzko, E.** (1976) Inhibition of spinach-leaf phosphofructokinase by 2-phosphoglycollate. *FEBS Letters*, 68, 55–58.
- Kern, R., Bauwe, H. and Hagemann, M.** (2011) Evolution of enzymes involved in the photorespiratory 2-phosphoglycolate cycle from cyanobacteria via algae toward plants. *Photosynthesis Research*, 109, 103–114.
- Kikuchi, G. and Hiraga, K.** (1982) The mitochondrial glycine cleavage system. Unique features of the glycine decarboxylation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 45, 137–149.
- Kikuchi, G., Motokawa, Y., Yoshida, T. and Hiraga, K.** (2008) Glycine cleavage system. Reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 84, 246–263.
- Kim, Y. and Oliver, D.J.** (1990) Molecular cloning, transcriptional characterization, and sequencing of cDNA encoding the H-protein of the mitochondrial glycine decarboxylase complex in peas. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 848–853.

- Kopriva, S., Chu, C.C. and Bauwe, H.** (1996) H-protein of the glycine cleavage system in *Flaveria*: alternative splicing of the pre-mRNA occurs exclusively in advanced C4 species of the genus. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 10, 369–373.
- Kure, S., Kato, K., Dinopoulos, A., Gail, C., DeGrauw, T.J., Christodoulou, J., Bzduch, V., Kalmanchey, R., Fekete, G., Trojovsky, A., Plecko, B., Brenningstall, G., Tohyama, J., Aoki, Y. and Matsubara, Y.** (2006) Comprehensive mutation analysis of GLDC, AMT, and GCSH in nonketotic hyperglycinemia. *Human Mutation*, 27, 343–352.
- Kuznetsova, I.M., Turoverov, K.K. and Uversky, V.N.** (2014) What macromolecular crowding can do to a protein. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 23090–23140.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lineweaver, H. and Burk, D.** (1934) The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658–666.
- López-Calcano, P.E., Fisk, S., Brown, K.L., Bull, S.E., South, P.F. and Raines, C.A.** (2018) Overexpressing the H-protein of the glycine cleavage system increases biomass yield in glasshouse and field-grown transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnology Journal*.
- MacHerel, D., Lebrun, M., Gagnon, J., Neuburger, M. and Douce, R.** (1990) cDNA cloning, primary structure and gene expression for H-protein, a component of the glycine-cleavage system (glycine decarboxylase) of pea (*Pisum sativum*) leaf mitochondria. *The Biochemical Journal*, 268, 783–789.
- Mandal, M., Lee, M., Barrick, J.E., Weinberg, Z., Emilsson, G.M., Ruzzo, W.L. and Breaker, R.R.** (2004) A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science*, 306, 275–279.
- Mao, F., Dam, P., Chou, J., Oltman, V. and Xu, Y.** (2009) DOOR. A database for prokaryotic operons. *Nucleic Acids Research*, 37, D459–63.
- Michaelis, L. and Menten, M.L.** (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 333–369.
- Motokawa, Y. and Kikuchi, G.** (1971) Glycine metabolism in rat liver mitochondria. V. Intramitochondrial localization of the reversible glycine cleavage system and serine hydroxymethyltransferase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 146, 461–464.
- Nakai, T., Ishijima, J., Masui, R., Kuramitsu, S. and Kamiya, N.** (2003) Structure of *Thermus thermophilus* HB8 H-protein of the glycine-cleavage system, resolved by a six-

- dimensional molecular-replacement method. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 59, 1610–1618.
- Nakai, T., Nakagawa, N., Maoka, N., Masui, R., Kuramitsu, S. and Kamiya, N.** (2005) Structure of P-protein of the glycine cleavage system. Implications for nonketotic hyperglycinemia. *The EMBO Journal*, 24, 1523–1536.
- Neuburger, M., Bourguignon, J. and Douce, R.** (1986) Isolation of a large complex from the matrix of pea leaf mitochondria involved in the rapid transformation of glycine into serine. *FEBS Letters*, 207, 18–22.
- Neuburger, M., Jourdain, A. and Douce, R.** (1991) Isolation of H-protein loaded with methylamine as a transient species in glycine decarboxylase reactions. *The Biochemical Journal*, 278 (Pt 3), 765–769.
- Neuburger, M., Polidori, A.M., Piètre, E., Faure, M., Jourdain, A., Bourguignon, J., Pucci, B. and Douce, R.** (2000) Interaction between the lipoamide-containing H-protein and the lipoamide dehydrogenase (L-protein) of the glycine decarboxylase multienzyme system. 1. Biochemical studies. *European Journal of Biochemistry*, 267, 2882–2889.
- Nývltová, E., Smutná, T., Tachezy, J. and Hrdý, I.** (2016) OsmC and incomplete glycine decarboxylase complex mediate reductive detoxification of peroxides in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 206, 29–38.
- Okamura-Ikeda, K., Fujiwara, K. and Motokawa, Y.** (1982) Purification and characterization of chicken liver T-protein, a component of the glycine cleavage system. *The Journal of Biological Chemistry*, 257, 135–139.
- Okamura-Ikeda, K., Fujiwara, K. and Motokawa, Y.** (1999) The amino-terminal region of the *Escherichia coli* T-protein of the glycine cleavage system is essential for proper association with H-protein. *European Journal of Biochemistry*, 264, 446–453.
- Okamura-Ikeda, K., Hosaka, H., Maita, N., Fujiwara, K., Yoshizawa, A.C., Nakagawa, A. and Taniguchi, H.** (2010) Crystal structure of aminomethyltransferase in complex with dihydrolipoyl-H-protein of the glycine cleavage system. Implications for recognition of lipoyl protein substrate, disease-related mutations, and reaction mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 18684–18692.
- Okamura-Ikeda, K., Kameoka, N., Fujiwara, K. and Motokawa, Y.** (2003) Probing the H-protein-induced conformational change and the function of the N-terminal region of *Escherichia coli* T-protein of the glycine cleavage system by limited proteolysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 10067–10072.

- Okamura-Ikeda, K., Ohmura, Y., Fujiwara, K. and Motokawa, Y.** (1993) Cloning and nucleotide sequence of the *gcv* operon encoding the *Escherichia coli* glycine-cleavage system. *European Journal of Biochemistry*, 216, 539–548.
- Oliver, D.J.** (1994) The Glycine Decarboxylase Complex from Plant Mitochondria. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45, 323–337.
- Oliver, D.J., Neuburger, M., Bourguignon, J. and Douce, R.** (1990a) Glycine metabolism by plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 80, 487–491.
- Oliver, D.J., Neuburger, M., Bourguignon, J. and Douce, R.** (1990b) Interaction between the Component Enzymes of the Glycine Decarboxylase Multienzyme Complex. *Plant Physiology*, 94, 833–839.
- Oliver, D.J. and Raman, R.** (1995) Glycine decarboxylase. Protein chemistry and molecular biology of the major protein in leaf mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 27, 407–414.
- Oliver, D.J. and Sarojini, G.** (1987) Regulation of Glycine Decarboxylase by Serine. In *Progress in Photosynthesis Research. Volume 3 Proceedings of the VIIth International Congress on Photosynthesis Providence, Rhode Island, USA, August 10-15, 1986* (Biggins, J., ed). Dordrecht, s.l.: Springer Netherlands, pp. 573–576.
- Pade, N., Mikkat, S. and Hagemann, M.** (2017) Ethanol, glycogen and glucosylglycerol represent competing carbon pools in ethanol-producing cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under high-salt conditions. *Microbiology (Reading, England)*, 163, 300–307.
- Pares, S., Cohen-Addad, C., Sieker, L., Neuburger, M. and Douce, R.** (1994) X-ray structure determination at 2.6-Å resolution of a lipoate-containing protein: the H-protein of the glycine decarboxylase complex from pea leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 4850–4853.
- Pares, S., Cohen-Addad, C., Sieker, L.C., Neuburger, M. and Douce, R.** (1995) Refined structures at 2 and 2.2 Å resolution of two forms of the H-protein, a lipoamide-containing protein of the glycine decarboxylase complex. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 51, 1041–1051.
- Patel, M.S., Vettakkorumakankav, N.N. and Liu, T.C.** (1995) Dihydrolipoamide dehydrogenase. Activity assays. *Methods in Enzymology*, 252, 186–195.
- Plaxco, K.W. and Gross, M.** (2009) Protein complexes. The evolution of symmetry. *Current Biology*, 19, R25–6.

- Rebeille, F., Neuburger, M. and Douce, R.** (1994) Interaction between glycine decarboxylase, serine hydroxymethyltransferase and tetrahydrofolate polyglutamates in pea leaf mitochondria. *The Biochemical Journal*, 302 (Pt 1), 223–228.
- Reed, L.S. and Archer, M.C.** (1980) Oxidation of tetrahydrofolic acid by air. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 801–805.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. and Stanier, R.Y.** (1979) Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology*, 111, 1–61.
- Sagers, R.D. and Gunsalus, I.C.** (1961) Intermediary metabolism of *Diplococcus glycinophilus*. I. Glycine cleavage and one-carbon interconversions. *Journal of Bacteriology*, 81, 541–549.
- Sarojini, G. and Oliver, D.J.** (1983) Extraction and partial characterization of the glycine decarboxylase multienzyme complex from pea leaf mitochondria. *Plant Physiology*, 72, 194–199.
- Sato, S., Shimoda, Y., Muraki, A., Kohara, M., Nakamura, Y. and Tabata, S.** (2007) A large-scale protein protein interaction analysis in *Synechocystis* sp. PCC6803. *DNA Research : An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 14, 207–216.
- Schaffner, W. and Weissmann, C.** (1973) A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Analytical Biochemistry*, 56, 502–514.
- Schägger, H.** (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1, 16–22.
- Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R. and Wolfson, H.J.** (2005a) Geometry-based flexible and symmetric protein docking. *Proteins*, 60, 224–231.
- Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R. and Wolfson, H.J.** (2005b) PatchDock and SymmDock. Servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Research*, 33, W363–7.
- Senkler, J., Senkler, M., Eubel, H., Hildebrandt, T., Lengwenaus, C., Schertl, P., Schwarzländer, M., Wagner, S., Wittig, I. and Braun, H.-P.** (2017) The mitochondrial complexome of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 89, 1079–1092.
- Siegel, L.M. and Monty, K.J.** (1966) Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biophysics including Photosynthesis*, 112, 346–362.
- Silva, J.C., Gorenstein, M.V., Li, G.-Z., Vissers, J.P.C. and Geromanos, S.J.** (2006) Absolute quantification of proteins by LCMSE. A virtue of parallel MS acquisition. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5, 144–156.
- Smith, D.G.S., Gingras, G., Aubin, Y. and Cyr, T.D.** (2016) Design and expression of a QconCAT protein to validate Hi3 protein quantification of influenza vaccine antigens. *Journal of Proteomics*, 146, 133–140.
- South, P.F., Cavanagh, A.P., Liu, H.W. and Ort, D.R.** (2019) Synthetic glycolate metabolism pathways stimulate crop growth and productivity in the field. *Science (New York, N.Y.)*, 363.
- Tezuka, T. and Ohnishi, Y.** (2014) Two glycine riboswitches activate the glycine cleavage system essential for glycine detoxification in *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*, 196, 1369–1376.
- Timm, S., Florian, A., Arrivault, S., Stitt, M., Fernie, A.R. and Bauwe, H.** (2012) Glycine decarboxylase controls photosynthesis and plant growth. *FEBS Letters*, 586, 3692–3697.
- Timm, S., Florian, A., Wittmiß, M., Jahnke, K., Hagemann, M., Fernie, A.R. and Bauwe, H.** (2013) Serine acts as a metabolic signal for the transcriptional control of photorespiration-related genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 162, 379–389.
- Timm, S., Giese, J., Engel, N., Wittmiß, M., Florian, A., Fernie, A.R. and Bauwe, H.** (2017) T-protein is present in large excess over the other proteins of the glycine cleavage system in leaves of *Arabidopsis*. *Planta*.
- Timm, S., Nunes-Nesi, A., Pärnik, T., Morgenthal, K., Wienkoop, S., Keerberg, O., Weckwerth, W., Kleczkowski, L.A., Fernie, A.R. and Bauwe, H.** (2008) A cytosolic pathway for the conversion of hydroxypyruvate to glycerate during photorespiration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20, 2848–2859.
- Timm, S., Wittmiß, M., Gamlien, S., Ewald, R., Florian, A., Frank, M., Wirtz, M., Hell, R., Fernie, A.R. and Bauwe, H.** (2015) Mitochondrial Dihydrolipoyl Dehydrogenase Activity Shapes Photosynthesis and Photorespiration of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 27, 1968–1984.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4350–4354.

- Turner, S.R., Ireland, R. and Rawsthorne, S.** (1992) Cloning and characterization of the P subunit of glycine decarboxylase from pea (*Pisum sativum*). *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 5355–5360.
- van Hove, J., Coughlin, C. and Scharer, G.** (1993) *GeneReviews®. Glycine Encephalopathy*. Seattle (WA).
- Varadarajan, N.M., Sundaram, B., Subramani, P.A., Kalappa, D.M., Ghosh, S.K. and Nagaraj, V.A.** (2014) Plasmodium berghei glycine cleavage system T-protein is non-essential for parasite survival in vertebrate and invertebrate hosts. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 197, 50–55.
- Walker, J.L. and Oliver, D.J.** (1986a) Glycine decarboxylase multienzyme complex. Purification and partial characterization from pea leaf mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 261, 2214–2221.
- Walker, J.L. and Oliver, D.J.** (1986b) Light-induced increases in the glycine decarboxylase multienzyme complex from pea leaf mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 248, 626–638.
- Weatherburn, M.W.** (2002) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39, 971–974.
- Weber, A.P.M. and Bauwe, H.** (2013) Photorespiration--a driver for evolutionary innovations and key to better crops. *Plant Biology*, 15, 621–623.
- Wedel, N., Soll, J. and Paap, B.K.** (1997) CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 10479–10484.
- Wingler, A., Lea, P.J., Quick, W.P. and Leegood, R.C.** (2000) Photorespiration. Metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 355, 1517–1529.
- Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N. and Mann, M.** (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*, 6, 359–362.
- Wohlfarth, G., Geerligs, G. and Diekert, G.** (1991) Purification and characterization of NADP(+)-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase from *Peptostreptococcus productus marburg*. *Journal of Bacteriology*, 173, 1414–1419.
- Yoshikawa, A., Nishimura, F., Inai, A., Eriguchi, Y., Nishioka, M., Takaya, A., Tochigi, M., Kawamura, Y., Umekage, T., Kato, K., Sasaki, T., Ohashi, Y., Iwamoto, K., Kasai, K. and Kakiuchi, C.** (2018) Mutations of the glycine cleavage system genes



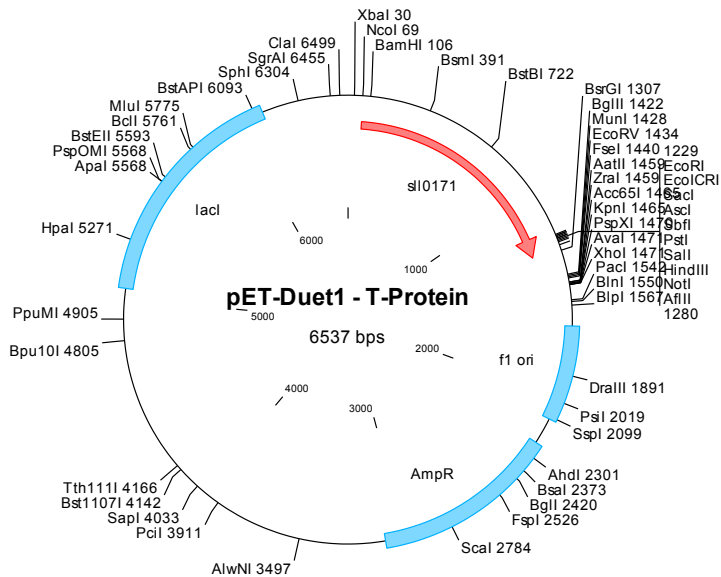
possibly affect the negative symptoms of schizophrenia through metabolomic profile changes. *Psychiatry and clinical neurosciences*, 72, 168–179.

**Zhang, W.C., Shyh-Chang, N., Yang, H., Rai, A., Umashankar, S., Ma, S., Soh, B.S., Sun, L.L., Tai, B.C., Nga, M.E., Bhakoo, K.K., Jayapal, S.R., Nichane, M., Yu, Q., Ahmed, D.A., Tan, C., Sing, W.P., Tam, J., Thirugananam, A., Noghabi, M.S., Pang, Y.H., Ang, H.S., Mitchell, W., Robson, P., Kaldis, P., Soo, R.A., Swarup, S., Lim, E.H. and Lim, B.** (2012) Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell*, 148, 259–272.

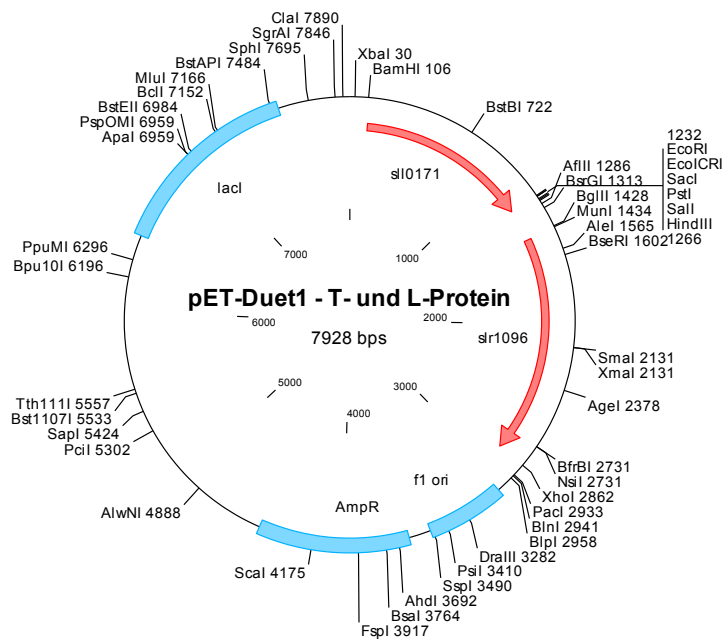
**Zimmerman, S.B. and Minton, A.P.** (1993) Macromolecular crowding. Biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 22, 27–65.

## 7. Anhang

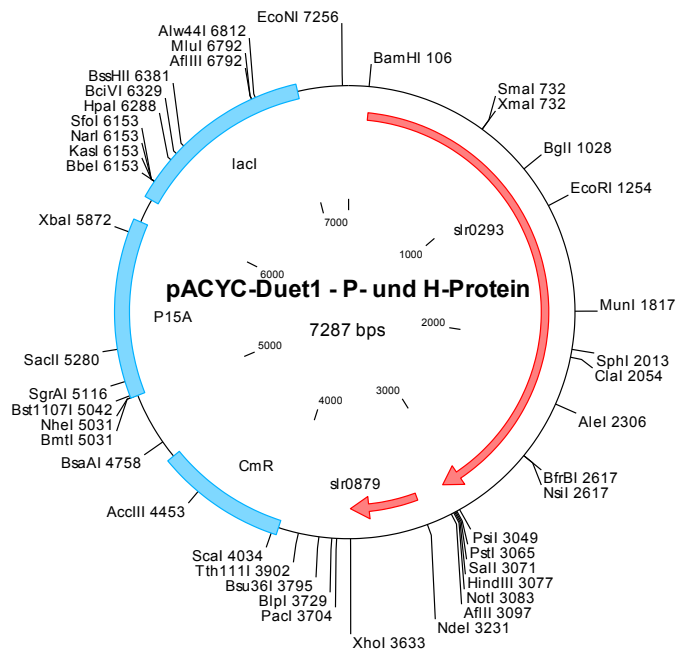
### 7.1. Klonierungsnachweise



Anhang 1: Vektorkarte des T-Proteins (*slf0171*) im pET-Duet1-Vektor. Schnittstellen: *BamHI* und *EcoRI*

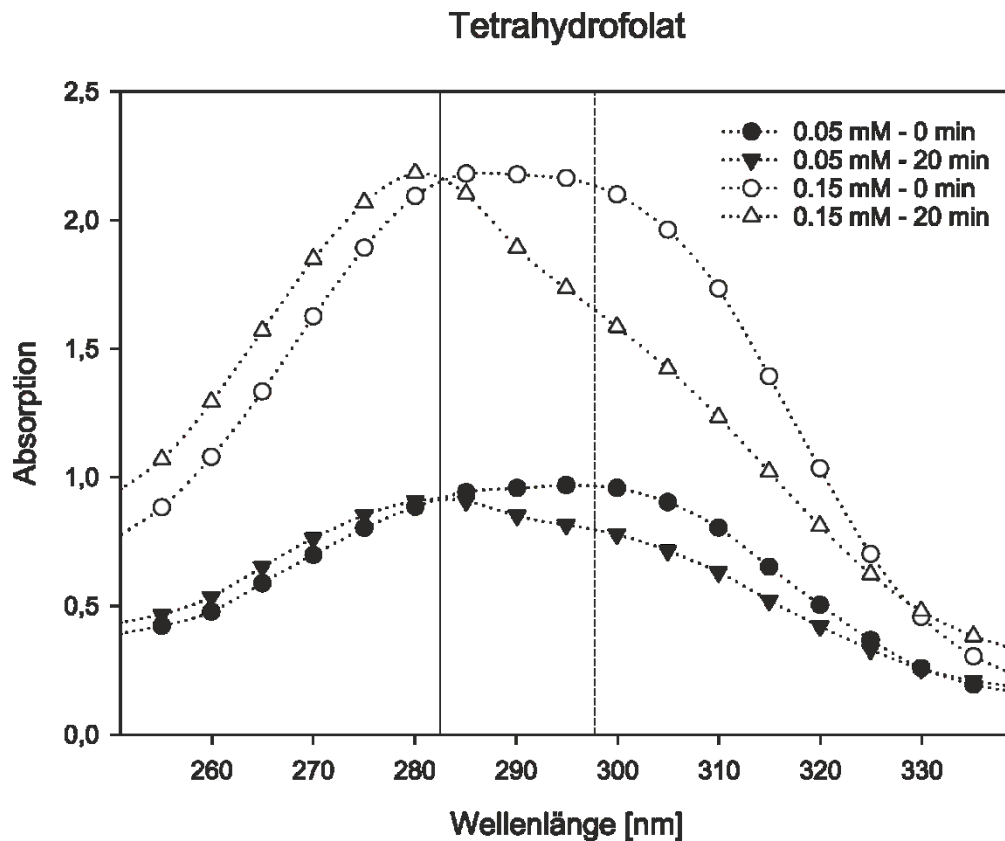


Anhang 2: Vektorkarte des T-Proteins (*slf0171*) und L-Proteins (*slr1096*) im pET-Duet1-Vektor. Schnittstellen: *BamHI* und *EcoRI* (T-Protein) bzw. *MunI* und *XhoI* (L-Protein)



**Anhang 3: Vektorkarte des H-Protein (*slr0879*) und P-Proteins (*slr0293*) im pACYC-Duet1-Vektor. Schnittstellen: *NdeI* und *XhoI* (H-Protein) bzw. *BamHI* und *PstI* (P-Protein)**

## 7.2. Die Sauerstoffsensitivität des Tetrahydrofolates



### Anhang 4: Übersicht über die Absorptionsänderung von Tetrahydrofolat.

Verglichen wurden zwei verschiedene Konzentrationen an THF (0,05 und 0,15 mM) im Wellenlängenbereich von 250 bis 340 nm. Zusehen ist, dass sich das Absorptionsmaximum des THF nach 20 min unter Sauerstoffhaltiger Luft von 298 nm (gestrichelte Linie, Tetrahydrofolat) nach 283 nm (durchgängige Linie, Dihydrofolat) verschiebt. Aus diesem Grund wurde die Gesamtaktivität des GCS unter Sauerstoff-freier Atmosphäre gemessen.

### 7.3. Synthetisierte Nukleotidsequenz des QconCAT-Peptids

Original Sequence										Optimized Sequence									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	ATG	GGG	GCG	AGC	GGC	AAA	GTG	CTG	TAT	1	ATG	GGT	GCT	TCT	GGT	AAA	GTT	CTG	TAC
11	AAC	GAT	AAC	TTT	TTT	GAA	GGC	AAA	GCG	11	AAC	GAT	AAC	TTC	TTC	GAA	GGT	AAA	GCG
21	GGC	AAA	GCG	GGC	CGT	ACC	CCG	TTT	ACC	21	GGT	AAA	GCA	GGT	CGT	ACC	CCG	TTC	ACC
31	GGC	CTG	AAC	CTG	GAT	AAA	ATT	GGC	GTG	31	GGT	CTG	AAC	CTG	GAC	AAA	ATC	GGT	GTT
41	GGC	CGT	ACC	CCG	TTT	ACC	AGC	GGC	CTG	41	GGT	CGT	ACC	CCG	TTC	ACC	TCC	GGT	CTG
51	CTG	GAA	AAA	ATT	GGC	GTG	AAC	AGC	CGT	51	CTG	GAA	AAA	ATC	GGT	GTT	AAC	TCT	CGT
61	AAA	GCG	ATT	GAT	AAC	GCG	GAA	GGC	CTG	61	AAA	GCG	ATC	GAC	AAC	GCT	GAA	GGT	CTG
71	AAA	ATT	ATT	GCG	AAC	AGC	CGT	GCG	AAA	71	AAA	ATC	ATT	GCT	AAC	TCT	CGT	GCT	AAA
81	ATT	GAT	ACC	GCG	GAA	GGC	ATG	GTG	AAA	81	ATC	GAT	ACC	GCT	GAA	GGT	ATG	GTT	AAA
91	CTG	GCG	CGG	GCG	CGT	ATT	ATT	GGC	GTG	91	CTG	GCT	CCG	GGT	CGT	ATC	ATC	GGT	GTT
101	GTG	GAT	AGC	AGC	GGC	AAA	CAG	GCG	CTG	101	GTT	GAT	TCT	TCT	GGT	AAA	CAG	GCG	CTG
111	ATG	GCG	ATG	CCG	GGC	CGT	ATT	ATT	GGC	111	ATG	GCG	ATG	CCG	GGT	CGT	ATC	ATC	GGT
121	AGC	GTG	GAT	AGC	AGC	GGC	AAA	CAG	GCG	121	TCT	GTT	GAT	TCT	TCT	GGT	AAA	CAG	GCA
131	CGT	ATG	GCG	ATG	GCG	AGC	AAA	ATT	GCG	131	CGT	ATG	GCG	ATG	GCA	TCC	AAA	ATC	GCT
141	CTG	AAC	GCG	AAC	TAT	ATG	GCG	AAA	CGT	141	CTG	AAC	GCG	AAC	TAC	ATG	GCG	AAA	CGT
151	GAA	AAC	GAA	AAA	GGC	GGC	GCG	ATT	GAT	151	GAA	AAC	GAA	AAA	GGC	GGT	GCG	ATC	GAC
161	AGC	GTG	ATT	ACC	AAA	GTG	ACC	GAT	ATT	161	TCT	GTT	ATC	ACC	AAA	GTT	ACC	GAC	CGT
171	CGT	GTG	GGC	TTT	ATT	AGC	AGC	GGC	CCG	171	CGT	GTT	GGT	TTC	ATC	TCT	TCT	GGT	CCG
181	CCG	CGT	AGC	CAT	AGC	ATT	CGT	CGT	GTG	181	CCG	CGT	TCC	CAC	TCT	ATC	CGT	GCG	GTT
191	TTT	TTT	AGC	AGC	GGC	CCG	CCG	GCG	CGT	191	TTC	TTC	AGC	TCT	GGT	CCG	CCG	GCA	CGT
201	CAT	AGC	GGC	CTG	AAA	TAT	GCG	CCG	AGC	201	CAC	TCT	GGT	CTG	AAA	TAC	GCT	CGT	CAC
211	GAA	TGG	GTG	AAA	CAT	GAA	GGC	GGC	CTG	211	GAA	TGG	GTT	AAA	CAC	GAA	GGT	CCG	CTG
221	TAT	GCG	AAC	AGC	CAT	GAA	TGG	GTG	AAA	221	TAC	GCG	AAC	TCC	CAC	GAA	TGG	GTT	AAA
231	GAA	GGC	ATG	ATT	AAA	ATT	AAA	CCG	ACC	231	GAA	GGC	ATG	ATC	AAA	ATC	AAA	CCG	ACC
241	CCG	GAT	GAA	CTG	GAA	AGC	CTG	CTG	GGC	241	CCG	GAC	GAA	CTG	GAA	TCT	CTG	CTG	GGT
251	AAA	GAA	TAT	ACC	ATG	ATT	AAA	GTG	AAA	251	AAA	GAA	TAC	ACT	ATG	ATC	AAA	GTT	AAA
261	AGC	AGC	CCG	GCG	GAA	CTG	GAA	AGC	CTG	261	TCT	TCT	CCG	GCG	GAA	CTG	GAA	TCT	CTG
271	GGC	CCG	AAA	GAA	TAT	ACC	ATG	ATT	AAA	271	GGT	CCG	AAA	GAA	TAC	ACC	ATG	ATC	AAA
281	AAA	CCG	AGC	ATC	CCG	GCG	GAA	CTG	GAA	281	AAA	CCG	AGC	TCC	CCG	GCT	GAA	CTG	GAA
291	CTG	ATG	GCG	CCG	GAA	GAA	TAT	ACC	GCG	291	CTG	ATG	GGT	CCG	AAA	GAA	TAC	ACC	GCT
301	GGC	AAA	GTG	TTT	GCG	GAT	TAT	GAA	GAA	301	GGT	AAA	GTT	TTC	GCT	GAC	TAC	GAA	TAC
311	GTG	AAA	GCG	AGC	GGC	AAA	CAT	CAT	CAT	311	GTT	AAA	GCG	TCT	GGT	AAA	CAT	CAC	CAC
321	CAT	CAC	TGA							321	CAC	CAC	TAA						

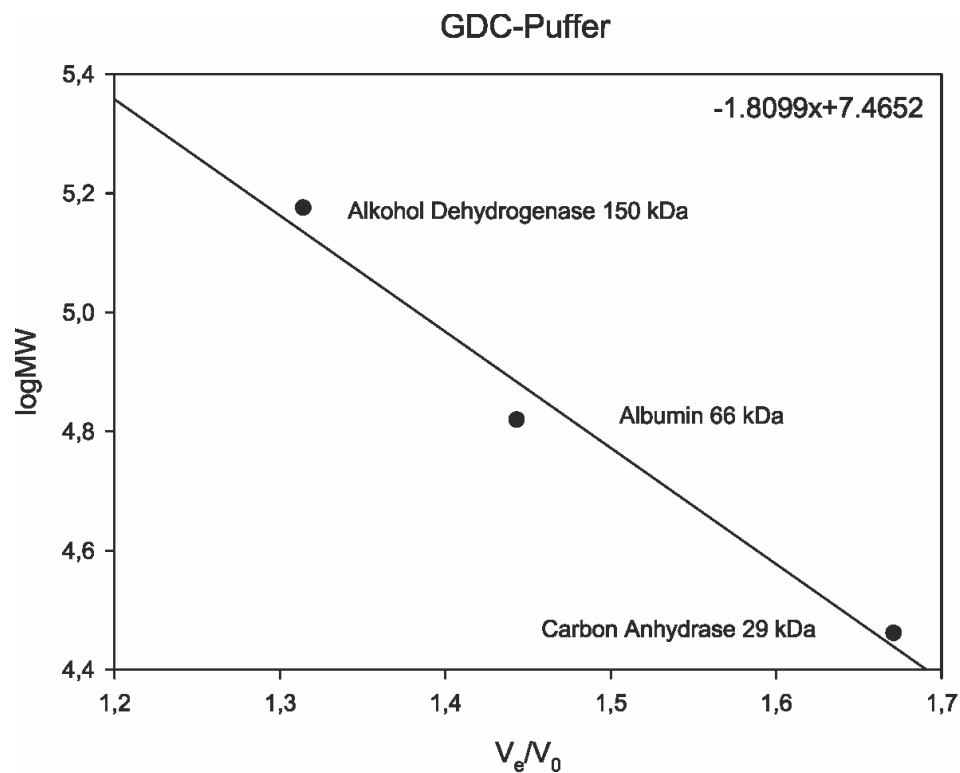
Anhang 5: Übersicht über die von BaseClear synthetisierte Nukleotidsequenz für die Expression des QconCAT-Peptids in *E. coli*.

Links: Originale Sequenz. Rechts: Von BaseClear optimierte Sequenz für *E. coli*. Basenpaare: 969

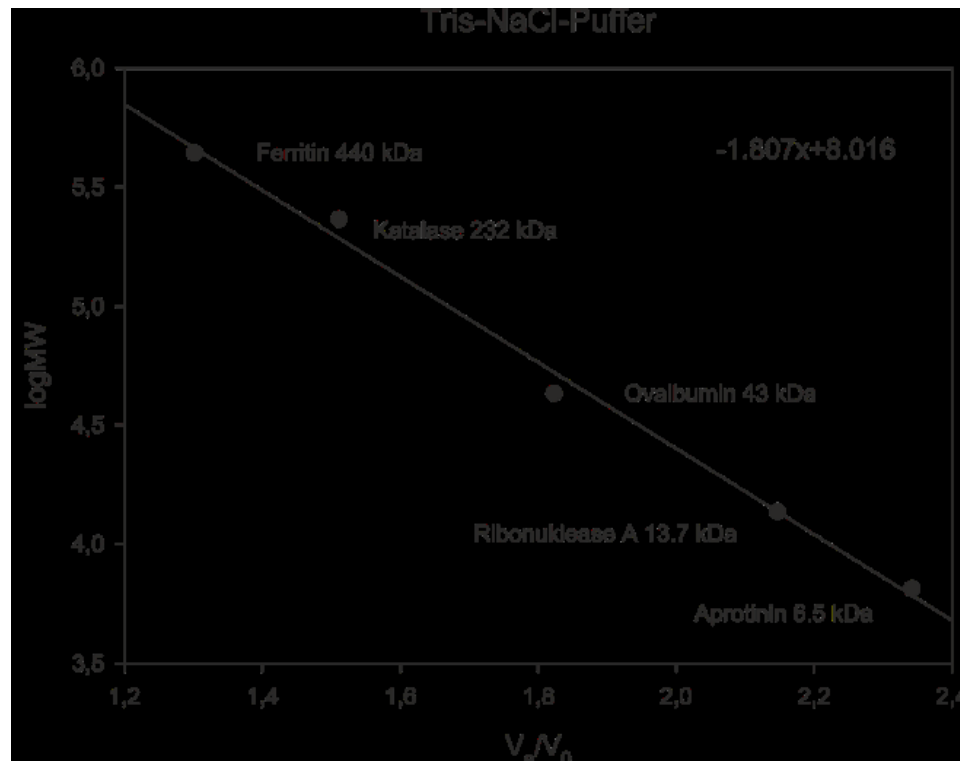
<b>MGASGKVLYPNDNFFEGK</b>			<b>ASGKAGRTPFTSGLNLDKIGVAGRT</b>			<b>PFTSGLDLEKIG</b>		
PhosB-Peptid (interne Kontrolle)			DLDH <i>P. sativum</i>			DLDH 1/2 <i>A. thaliana</i>		
<b>VNSRAKAIDNAEGLVKIIANSRAKAIDTAEGMVKILAPGRIIGVSV</b>			<b>DSSGKQALRM</b>					
DLDH (1) <i>P. sativum/A. thaliana</i>			DLDH 2 <i>A. thaliana</i>			GLD-P (2) <i>P. sativum/A. thaliana</i>		
<b>AMPGRIIGISVDSSGKQALRMAMASKIAILNANYMAKRL</b>			<b>ENEKGG</b>			<b>GAIDDSVITKV</b>		
GLD-P 1 <i>A. thaliana</i>			GLD-P 1/2 <i>P. sativum/A. thaliana</i>			GLD-T <i>P. sativum/A. thaliana</i>		
<b>TDIRRVGFISSGPPPRSHSIRRVGFFSSGPPARSHSGLKYAPSHEWVK</b>			<b>HEGGLK</b>					
GLD-T <i>P. sativum</i>			GLD-T <i>P. sativum/A. thaliana</i>			GLD-H <i>P. sativum</i>		
<b>YANSHEWVKHEGMIKIKPTSPDELESLLGAKEYTMIKVKPSSPAELES</b>			<b>LMGPK</b>			<b>KEYT</b>		
GLD-H1/3 <i>A. thaliana</i>			GLD-H <i>P. sativum</i>			GLD-H1 <i>A. thaliana</i>		
<b>MIKVKPSSPAELEALMGPK</b>			<b>KEYTASGKVFADYEEYVKASGKHHHHHH</b>					
GLD-H3 <i>A. thaliana</i>			PhosB-Peptid (interne Kontrolle)					

Anhang 6: Übersicht über die Sequenz des QconCAT-Peptids mit den *linker*-Sequenzen (hellgrau), den Peptiden für die jeweiligen Isoformen (schwarz und unterstrichen) und dem *his-tag* (schwarz).

#### 7.4. Eichgeraden der SEC-Analysen



Anhang 7: Eichgerade der SEC-Analysen mit komplexförderndem GDC-Puffer (Rostock).



Anhang 8: Eichgerade der SEC-Analysen mit Kontrollpuffer (Tris-NaCl-Puffer) (Heidelberg).

## 7.5. Liste der mittels Pulldown-Experiment und MS-Analysen detektierten Interaktionspartner

### Anhang 9: Übersicht über die detektierten Proteine.

Grün: *Synechocystis* GCS-Proteine; weiß: *E. coli* Proteine, blau: weitere *Synechocystis* Proteine. Vergleich der Abundanz inklusive *fold changes*

	Normalisierte Abundanz Hi3					
	31	32		29	30	
	P- Protein mit Puffer inkubiert	P-Protein mit <i>Synechocystis</i> Zelllysate inkubiert	mit fold change	L-Protein mit Puffer inkubiert	L-Protein mit <i>Synechocystis</i> Zelllysate inkubiert	mit fold change
Beschreibung	32/31			30/29		
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12) GN=slyD PE=1 SV=1	19646,5	35142,3	1,8	37352,7	509639,2	13,6
Ferric uptake regulation protein OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12) GN=fur PE=1 SV=1	25903,7	62538,4	2,4	62810,6	186919,7	3,0
Dihydrolipoyl dehydrogenase OS= <i>Synechocystis</i> sp. (strain PCC 6803 / Kazusa) GN=lpdA PE=1 SV=3	13,7	3039,5	221,2	151375,7	183065,2	1,2
Transcriptional regulator YqjI OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12) GN=yqjI PE=1 SV=1	8157,3	16955,3	2,1	37354,0	72271,8	1,9
Trypsin OS= <i>Sus scrofa</i> PE=1 SV=1	14476,8	18376,2	1,3	16522,8	25959,5	1,6
Phycobilisome 7.8 kDa linker polypeptide, allophycocyanin-associated, core OS= <i>Synechocystis</i> sp. (strain PCC 6803 / Kazusa) GN=apcC PE=3 SV=1	0,0	10246,9	10246,9	1,0	41268,3	41944,0
Nickel-responsive regulator OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12) GN=nikR PE=1 SV=1	115,1	916,8	8,0	11550,9	35377,5	3,1
Phycobilisome 8.9 kDa linker polypeptide, phycocyanin-associated, rod OS= <i>Synechocystis</i> sp. (strain PCC 6803 / Kazusa) GN=cpcD PE=1 SV=1	0,0	1272,1	1272,1	0,0	23276,8	23276,8
NADH-quinone oxidoreductase subunit E OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12) GN=nuoE PE=1 SV=1	162,9	761,8	4,7	2855,3	12809,8	4,5

Glycine dehydrogenase (decarboxylating) OS=Synechocystis sp. (strain PCC 6803 / Kazusa) GN=gcvP PE=1 SV=1	5066,7	10526,3	2,1	122,1	302,4	2,5
30S ribosomal protein S12 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsL PE=1 SV=2	1821,6	3086,7	1,7	1277,2	3674,7	2,9
Metal-binding protein ZinT OS=Escherichia coli (strain K12) GN=zinT PE=1 SV=1	277,6	1910,5	6,9	740,2	4979,6	6,7
Alcohol dehydrogenase, propanol-preferring OS=Escherichia coli (strain K12) GN=adhP PE=1 SV=1	1000,3	3650,0	3,6	831,6	1772,6	2,1
Glycine cleavage system H protein OS=Synechocystis sp. (strain PCC 6803 / Kazusa) GN=gcvH PE=3 SV=1	0,0	150,4	150	811,6	4533,3	5,6
Transcription termination/antitermination protein NusG OS=Synechocystis sp. (strain PCC 6803 / Kazusa) GN=nusG PE=3 SV=1	0,0	675,5	675,5	0,0	3772,8	3772,8
30S ribosomal protein S11 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsK PE=1 SV=2	280,7	1025,6	3,7	572,5	1515,4	2,6
Autonomous glycyl radical cofactor OS=Escherichia coli (strain K12) GN=grcA PE=1 SV=1	56,0	374,0	6,7	703,3	1884,2	2,7
Elongation factor Tu OS=Synechocystis sp. (strain PCC 6803 / Kazusa) GN=tuf PE=1 SV=1	0,0	847,9	847,9	21,1	2077,5	98,4
50S ribosomal protein L14 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplN PE=1 SV=1	100,6	495,0	4,9	425,8	1343,1	3,2
30S ribosomal protein S4 OS=Synechocystis sp. (strain PCC 6803 / Kazusa) GN=rpsD PE=3 SV=1	0,0	610,0	610	1,4	1683,5	1203,9
Arabinofuranosidase OS=Synechocystis sp. (strain PCC 6803 / Kazusa) GN=abfB PE=4 SV=1	0,0	0	-	0,0	1842,6	1842,6
Photosystem I reaction center subunit II OS=Synechocystis sp. (strain PCC 6803 / Kazusa) GN=psaD PE=1 SV=2	0,0	263,0	263	0,0	1544,7	1544,7



Slr0769 protein OS=Synechocystis sp. (strain PCC 6803 / Kazusa) GN=slr0769 PE=4 SV=1	0,0	121,4	121,4	0,0	1620,3	1620,3
50S ribosomal protein L15 OS=Synechocystis sp. (strain PCC 6803 / Kazusa) GN=rplO PE=3 SV=1	0,0	127,2	127,2	0,0	1547,2	1547,2
Sll0359 protein OS=Synechocystis sp. (strain PCC 6803 / Kazusa) GN=sll0359 PE=1 SV=1	0,0	358,3	358,3	0,0	1230,0	1230,0
30S ribosomal protein S10 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsJ PE=1 SV=1	0,0	10,3	10,3	369,6	1018,4	2,8
Urease accessory protein UreE OS=Synechocystis sp. (strain PCC 6803 / Kazusa) GN=ureE PE=3 SV=1	0,0	220,4	220,4	1,2	785,6	631,4
Uncharacterized protein slr0903 OS=Synechocystis sp. (strain PCC 6803 / Kazusa) GN=slr0903 PE=4 SV=1	0,0	408,2	408,2	0,0	565,2	565,2
Major outer membrane lipoprotein Lpp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpp PE=1 SV=1	0,0	0	121,4	30,3	647,9	21,4

## 7.6. Vollständige Alignments

### Anhang 10: H-Protein Alignment *Synechocystis* und *T. thermophilus*

```

                                10      20      30      40
T. thermophilus      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
--MDIPKDRF YTKTHEWALP EGDTVLVGIT DYACDALGDI
Synechocystis sp. PCC 6803 MELEH.D.LY .LDS..YVRF D.E.ATI.LS AF.V.E..I

                                50      60      70      80
T. thermophilus      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
VYVELPEVGR VVEKGEAVAV VESVKTASDI YAPVAGEIVE
Synechocystis sp. PCC 6803 .F.....E.D K..FEQSMGA ....A...L .S..T.TVI.

                                90      100     110     120
T. thermophilus      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
VNLALEKTPE LVNQDPYG-E GWIFRLKPRD MGDLDLDE-LLD
Synechocystis sp. PCC 6803 K.S...DQ.. .L.....E. ..LIKVRLD. VE.AK.G.MA

                                130
T. thermophilus      ....|....| ..
AGGYQEVLES EA
Synechocystis sp. PCC 6803 ..D.RAT..T GD

```

Anhang 11: H-Protein Alignment *Synechocystis* und *T. thermophilus*

		10	20	30	40
E. coli		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Synechocystis sp. PCC 6803		-----MAQQT	PLYEQHTLCG	ARMVDFHGWM	MPLHYGSQID
		MANLFP.LR.	...NLI.EQT	TKLTT.G..E	..VQFAGLKQ
		50	60	70	80
E. coli		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Synechocystis sp. PCC 6803		EHHAVRTDAG	MFDVSHMTIV	DLRGSRTREF	LRILLANDVA
		..Q...EKV.	...I...GKF	V.T.QKVLAA	.QS.VPS.LD
		90	100	110	120
E. coli		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Synechocystis sp. PCC 6803		KLTKSGKALY	SGMLNASGGV	IDDLIVYYFT	-----EDFFR
		R..P-...Q.	TVL...Q..I	...I...DQG	KNPEGQERV
		130	140	150	160
E. coli		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Synechocystis sp. PCC 6803		LVVNSATREK	DLSWITQHA-	EPFGIEITVR	DDLMIQVQG
		.I..A..TV.	.KQ.LLE.LP	.EIDFQDLS.	EKV-L..L..
		170	180	190	200
E. coli		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Synechocystis sp. PCC 6803		PNAQAKAATL	FNDAQRQAVE	GMKPFFGVQA	GDLFIATTGY
		.E.LTILQP.	VDQNLGELPA	FGHLEAEFLR	EKA...R...
		210	220	230	240
E. coli		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Synechocystis sp. PCC 6803		TGEAGYEIAL	PNEKAADFWR	ALVEAGVKPC	GLGARDTLRL
		...D.F..MV	SP.VGKQL.Q	TFGSK..T..	.....
		250	260	270	280
E. coli		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Synechocystis sp. PCC 6803		EAGMNLVGQE	MDETISPLAA	NMGWTIAWEP	ADRDFIGREA
		....G....D	.NDETT..E.	GL..LVHLD-	SKG....AV
		290	300	310	320
E. coli		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Synechocystis sp. PCC 6803		LEVQREHGTE	K-LVGLVMTE	KGVIENELPV	RFTDAQGNQH
		.TE.KAN.V.	.R....E.LA	.QIA.HDY.I	LHN---GEI
		330	340	350	360
E. coli		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Synechocystis sp. PCC 6803		EGIITSGTFS	PTLGYSIALA	RVP---EGIG	ETAIVQIRNR
		M..V....L.	...QKA...G	Y..TELAKV.	QELE.EV.GK
		370			
E. coli		.... ....	.... ....		
Synechocystis sp. PCC 6803		EMPVKVTKPV	FVRNGKAVA		
		TYGI..V.KL	.Y.SEQKPR		

## 7.7. Liste der detektierten Proteine zur Kontrolle des Reinheitsgrades der analysierten Mitochondrienfraktionen

### Anhang 12: Übersicht über alle mittels Hi3 detektierten Proteine in der Mitochondrienfraktion von *Arabidopsis thaliana*.

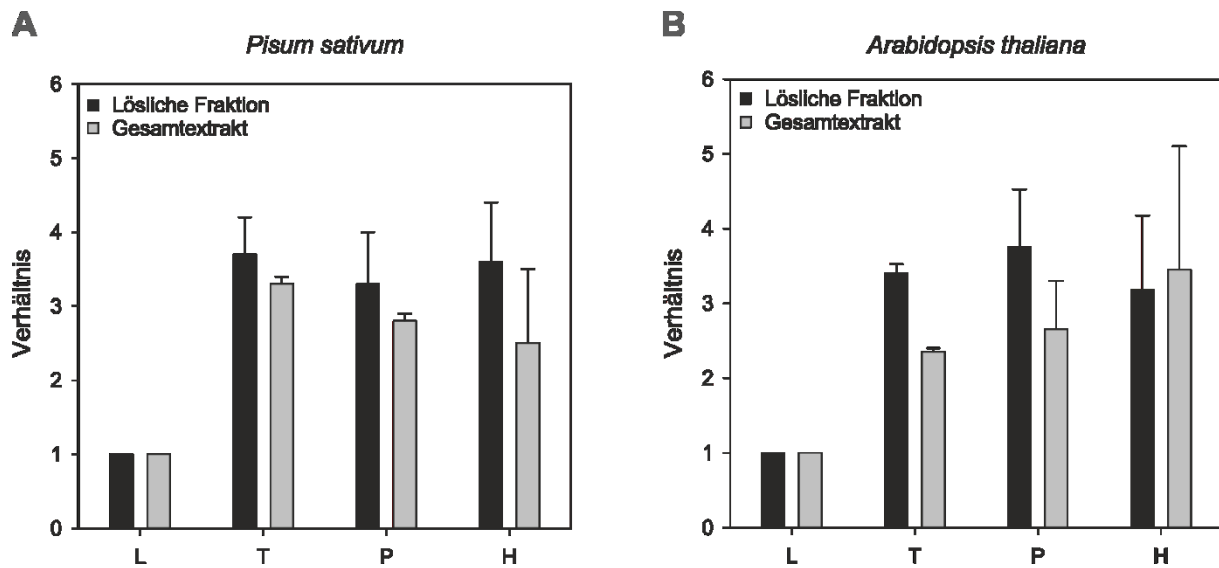
Grün: GCS-Proteine von *A. thaliana*, rot: Interne Kontrolle, schwarz: alle weiteren Proteine.

Beschreibung und Lokalisation	fmol on column
Glycine dehydrogenase (decarboxylating) 1_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=GLDP1 PE=1 SV=2	24,7418
Glycine dehydrogenase (decarboxylating) 2_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=GLDP2 PE=2 SV=1	24,7418
Serine hydroxymethyltransferase 1_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=SHM1 PE=1 SV=1	20,9468
Glycogen phosphorylase_ muscle form OS=Oryctolagus cuniculus GN=PYGM PE=1 SV=3	20
ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=ATPA PE=1 SV=2	15,6141
Dihydrolipoyl dehydrogenase 1_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=LPD1 PE=1 SV=2	14,8831
Aminomethyltransferase_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=GDCST PE=2 SV=1	14,3151
ATP synthase subunit beta-3_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g08680 PE=2 SV=1	13,4911
Glycine cleavage system H protein 1_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=GDH1 PE=1 SV=1	13,1067
Malate dehydrogenase 1_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g53240 PE=1 SV=1	12,4704
Formate dehydrogenase_ chloroplastic/mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=FDH1 PE=1 SV=1	9,9307
Putative F-box/kelch-repeat protein At4g39756 OS=Arabidopsis thaliana GN=At4g39756 PE=3 SV=1	7,6892
Aldehyde dehydrogenase family 2 member B4_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=ALDH2B4 PE=2 SV=1	7,5081
Mitochondrial outer membrane protein porin 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=VDAC3 PE=1 SV=3	7,1357
Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g20420 PE=1 SV=1	6,2831
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta-1_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=PDH2 PE=1 SV=2	6,223
Mitochondrial dicarboxylate/tricarboxylate transporter DTC OS=Arabidopsis thaliana GN=DTC PE=1 SV=1	5,8433
Chaperonin CPN60_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=CPN60 PE=1 SV=2	5,056
Chaperonin CPN60-like 1_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g33210 PE=2 SV=1	4,7313
Nucleoside diphosphate kinase III_ chloroplastic/mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=NDPK3 PE=1 SV=1	4,6581
Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier-like protein OS=Arabidopsis thaliana GN=BOU PE=2 SV=1	4,6254
Bifunctional L-3-cyanoalanine synthase/cysteine synthase C1_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=CYSC1 PE=1 SV=1	4,4152
Probable mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-1_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g51980 PE=2 SV=1	4,0794

Probable mitochondrial-processing peptidase subunit beta_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=At3g02090 PE=2 SV=2	3,7126
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 12A1_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=ALDH12A1 PE=2 SV=1	2,9754
Dihydrolipoyl dehydrogenase 2_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=LPD2 PE=1 SV=1	2,575
Peroxiredoxin-2F_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=PRXIIF PE=1 SV=2	2,4773
NADH-cytochrome b5 reductase-like protein OS=Arabidopsis thaliana GN=CBR2 PE=1 SV=2	2,0802
At1g55160/T7N22.11 OS=Arabidopsis thaliana GN=F7A10.9 PE=2 SV=1	1,94
Probable NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g52840 PE=1 SV=1	1,7241
ATP synthase subunit d_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=At3g52300 PE=1 SV=3	1,5057
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha-1_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=E1 ALPHA PE=2 SV=2	1,3955
Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating]_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=ALDH6B2 PE=2 SV=2	1,3025
AT4g29480/F17A13_300 OS=Arabidopsis thaliana GN=At4g29480 PE=2 SV=1	1,1629
Gamma carbonic anhydrase-like 2_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=GAMMACAL2 PE=1 SV=1	1,155
Gamma carbonic anhydrase 1_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=GAMMACA1 PE=1 SV=1	1,0667
CBS domain-containing protein CBSX3_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=CBSX3 PE=1 SV=1	0,809
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha-2_ mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=IAR4 PE=1 SV=2	0,7186
Putative uncharacterized protein At5g08060 OS=Arabidopsis thaliana GN=F13G24.260 PE=2 SV=1	0,407
NAC transcription factor-like 9 OS=Arabidopsis thaliana GN=NTL9 PE=4 SV=1	0,1321

## 7.8. Vergleich verschiedener Fraktionen des Mitochondrienextraktes

Anhang 13: Mit Hilfe der Hi3-Methode wurden die lösliche Fraktion und der mitochondriale Gesamtextrakt analysiert.



### 7.9. Liste der detektierten QconCAT-Peptide

**Anhang 14: Identifikation der Chromatogramm-Peaks des QconCAT-Peptids inklusive der Sequenz und den Modifikationen.**

Peak No	Sequenz	Modifikation	m/z	Masse H <sup>+</sup>
1	AIDTAEGMVK	Oxidation (M)	531.244	1061.481
2	MAMPGR		336.147	671.285
3	YANSHEWVK		383.171	1147.496
4	YAPSHEWVK		565.259	1129.509
5	EYTMIK		396.189	791.370
6	AIDTAEGMVK		523.249	1045.486
7	LENEKGAIDDSVITK	MissCleavage	569.939	1707.813
8	GGAIDDSVITK		544.269	1087.527
9	IIGVSDSSGK		537.279	1073.548
10	AIDNAEGLVK		521.266	1041.522
11	VGFISSGPPPR		564.287	1127.563
12	IIGISVDSSGK		544.289	1087.564
13	IAILNANYMAK	Oxidation (M)	626.315	1251.619
14	VGFFSSGPPAR		568.273	1135.532
15	TPFTSGLNLDK		603.298	1205.582
16	VFADYEEYVK		637.285	1273.561
17	TPFTSGLDLEK		610.298	1219.585
18	VKPSSPAELESIMGPK		563.287	1687.830
19	IAILNANYMAK		618.316	1235.624
20	VKPSSPAELEALMGPK		557.950	1671.835
21	VLYPNDNFFEGK		729.329	1457.650
22	IKPTSPDELESLLGAK		572.570	1715.879

### 7.10. Ermittlung des prozentualen Anteils an GCS-Proteinen in *Synechocystis*

Anhang 15: Werte der Anteile der einzelnen GCS-Proteine im molaren Verhältnis zur Gesamtmenge an Proteinen.

Probe	Abundanz				Ø	%
	1	2	3	4		
L-Protein	49.678	39.122	60.287	48.767	49.464 ± 8.653	0,2 ± 0,04
H-Protein	7.802	9.249	6.600	9.171	8.205 ± 1.260	0,033 ± 0,006
T-Protein	7.669	6.297	6.208	6.318	6.623 ± 699	0,03 ± 0,002
SHMT	37.345	32.812	32.626	36.457	34.810 ± 2443	0,14 ± 0,006
PDH (Σ E1-3)	130.635	117.224	138.953	124.451	127.816 ± 9.228	0,52 ± 0,04
Σ aller Proteine	25.917.817	23.948.169	24.418.206	24.786.163	24.767.589 ± 840.017	100
					<b>% GCS</b>	<b>0,26 ± 0,03</b>
					<b>% GCS + SHMT</b>	<b>0,4 ± 0,03</b>

### 7.11. Übersicht über alle ermittelten Proteine zur Analyse des prozentualen Anteils der GCS-Proteine in *Synechocystis*

Die vollständige Tabelle befindet sich auf der beiliegenden CD.

### 7.12. Sequenzen

Alle genutzten Nukleotid- und Proteinsequenzen befinden sich auf der beiliegenden CD.



### 7.13. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reaktionszyklus der Oxidation von Glycin durch das GCS und die Bildung von Serin in Zusammenhang mit der SHMT. ....	4
Abbildung 2: Strukturen der verschiedenen Formen des H-Proteins.....	6
Abbildung 3: Übersicht der verfügbaren Kristallstrukturen der einzelnen GCS-Proteine.....	7
Abbildung 4: <i>Heatmap</i> der Verteilung der <i>Arabidopsis thaliana</i> GCS-Proteine in einer Blue Native-PAGE. ....	12
Abbildung 5: Darstellung einer Standardzelle für die AUZ und eines Verlaufes einer Sedimentation.....	32
Abbildung 6: Übersicht über die Untersuchungen zum rekombinanten <i>Synechocystis</i> P-Protein. ....	34
Abbildung 7: Übersicht über die Untersuchungen zum rekombinanten <i>Synechocystis</i> L-Protein. ....	36
Abbildung 8: Übersicht über die Untersuchungen zum rekombinanten <i>Synechocystis</i> H-Protein. ....	37
Abbildung 9: Mögliche Struktur eines H-Protein Trimers aufbauend auf der pdb-Struktur 1HTP ( <i>P. sativum</i> ).....	38
Abbildung 10: Mögliche Struktur eines H- Protein Tetramers aufbauend auf der pdb-Struktur 1HTP ( <i>P. sativum</i> ).....	39
Abbildung 11: Übersicht über die Analysen zur Aggregation des T-Proteins.....	40
Abbildung 12: Übersicht über die Untersuchungen zum rekombinanten <i>Synechocystis</i> TH-Protein.....	41
Abbildung 13: Vergleich des H-Protein Trimers mit dem TH-Komplex (pdb 3A8J). ....	42
Abbildung 14: Sequenzvergleich der H-Proteinsequenzen von <i>Synechocystis</i> und <i>T. thermophilus</i> .....	43
Abbildung 15: Sequenzvergleich der T-Proteinsequenzen von <i>E. coli</i> und <i>Synechocystis</i> .....	43
Abbildung 16: Übersicht über den Klonierungsnachweis der in den pACYC-Duet1 ligierten DNA-Fragmente von <i>slr0879</i> und <i>slr0293</i> . ....	44
Abbildung 17: Übersicht über den Klonierungsnachweis der in den pET-Duet1 ligierten DNA-Fragmente von <i>sll0171</i> und <i>slr1096</i> .....	44
Abbildung 18: Testexpression für beide Konstrukte. (A) pACYC-Duet1 mit H-Protein und P-Protein (B) pET-Duet1 mit T-Protein und L-Protein. ....	45
Abbildung 19: Expression und Reinigung mittels NI-NTA des T- und P-Proteins aus dem Expressionsstamm mit <i>slr0879-slr0293</i> -pACYCDuet-1 und <i>sll0171-slr1096</i> -pET-Duet-1. ...	46

Abbildung 20: Darstellung des Sedimentationskoeffizienten der GCS-Proteine in Abhängigkeit der S-Verteilung ( $g/s^*$ ). .....	47
Abbildung 21: Ergebnisse der Filtrationsversuche durch einen 300 kDa <i>cut-off</i> Filter. ....	48
Abbildung 22: Ergebnisse der Filtrationsversuche durch eine 300 kDa <i>cut-off</i> Membran mit jeweils drei der vier GCS-Proteine und 10 min Inkubation. ....	50
Abbildung 23: Ergebnisse der Filtrationsversuche durch eine 300 kDa <i>cut-off</i> Membran in Abhängigkeit der initial zugegebenen Menge an H-Protein. ....	52
Abbildung 24: Ergebnisse der Filtrationsversuche durch eine 300 kDa <i>cut-off</i> Membran in Abhängigkeit von PLP, DTT und Liponsäure. ....	53
Abbildung 25: Die Berechnung der <i>in vitro</i> Stöchiometrie der GCS-Proteine aus <i>Synechocystis</i> mittels ImageJ. ....	54
Abbildung 26: Vergleich der Größenausschlusschromatographien von rekombinanten GCS-Proteinen und dem <i>E. coli</i> Lysat mit simultaner Expression aller Proteine. ....	56
Abbildung 27: Spezifische GCS-Gesamtaktivität in den Elutionsfraktionen der SEC-Analyse. ....	58
Abbildung 28: Übersicht über die Interaktionen des P-Proteins mit weiteren GCS-Proteinen. ....	60
Abbildung 29: Sequenzvergleich der H-Proteinsequenzen von <i>Synechocystis</i> und <i>T. thermophilus</i> . ....	60
Abbildung 30: Übersicht über die Interaktionen des L-Proteins mit weiteren GCS-Komponenten. ....	62
Abbildung 31: TEM-Aufnahmen der einzelnen GCS-Proteine und des Filtrationsretentats. Skala: 20 nm. ....	63
Abbildung 32: Detaillierte TEM-Aufnahmen einer möglichen Formation des GDC aus <i>Synechocystis</i> . Die Abbildungen erinnern an die Form eines Schmetterlings. Skala 20 nm ...	64
Abbildung 33: Detaillierte TEM-Aufnahmen einer weiteren möglichen Formation des GDC aus <i>Synechocystis</i> . Die Abbildungen erinnern an die Form eines Pilzes. Skala 20 nm .....	64
Abbildung 34: GCS-Gesamtaktivität des ungefilterten Mitochondrienextraktes. ....	66
Abbildung 35: Vergleich der GCS-Gesamtaktivität des mitochondrialen Gesamtextraktes und des Retentats nach der Filtration durch eine 300 kDa <i>cut-off</i> Membran. ....	67
Abbildung 36: Gesamtaktivität des ungefilterten mitochondrialen Matrixextraktes verglichen mit dem Retentat und Filtrat, inklusive der korrespondierenden SDS-PAGE und der Immunoblots. ....	68

Abbildung 37: Vergleich der spezifischen Gesamtaktivität der GCS-Proteine zwischen dem Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> (Col.0) und der <i>gldt1-1 knockdown</i> Mutante.....	69
Abbildung 38: Übersicht über die Klonierung und Expression des QconCAT-Peptids mit <sup>15</sup> N-markierten Aminosäuren. ....	70
Abbildung 39: Markierungsfreie Hi3-Quantifizierung der GCS-Proteine aus <i>P. sativum</i> und <i>A. thaliana</i> . ....	71
Abbildung 40: Chromatogramm (Abundanz in % in Abhängigkeit der Retentionszeit) des tryptisch verdauten und mittels MS getrennten QconCAT-Proteins. ....	72
Abbildung 41: Untersuchung zur Linearität der Peptide mit steigender Konzentration. ....	73
Abbildung 42: Stöchiometrie der GCS-Proteine von <i>A. thaliana</i> (A) und <i>P. sativum</i> (B). ....	74
Abbildung 43: Übersicht über den Anteil der einzelnen Isoformen an der Stöchiometrie. ....	76
Abbildung 44: Veranschaulichung der möglichen Lage der Proteine des <i>Synechocystis</i> GDC in der Schmetterlingsform. ....	85
Abbildung 45: Veranschaulichung der möglichen Lage der Proteine des <i>Synechocystis</i> GDC in der Pilzform. ....	86
Abbildung 46: Übersicht über die mögliche Anordnung der GCS-Proteine in einem Komplex. Je Komplex ist links die frontale Ansicht und rechts eine dreidimensionale Anordnung dargestellt. ....	92

## 7.14. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete DNA- und Proteinstandards .....	14
Tabelle 2: Verwendeten Antikörper .....	14
Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide zur Plasmidherstellung .....	15
Tabelle 4: Verwendete Geräte und Apparaturen .....	15
Tabelle 5: Übersicht über die verschiedenen Kulturmedien für <i>E. coli</i> .....	16
Tabelle 6: Teilschritte eines regulären PCR-Programms zur Fragmentamplifikation .....	18
Tabelle 7: Zusammensetzung des TAE-Puffers für die Agarose-Gelelektrophorese .....	18
Tabelle 8: Zusammensetzung eines Standardligationsansatzes .....	18
Tabelle 9: Verwendete Lösungen für die alkalische Lyse zur Plasmid-Isolation .....	19
Tabelle 10: Zusammensetzung eines Standardansatzes zur Restriktion .....	19
Tabelle 11: Verwendete Lösungen zur Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Amidoschwarz .....	20
Tabelle 12: Zusammensetzung der SDS-PAGE zur Proteinauftrennung .....	20
Tabelle 13: Verwendete Puffer zur Durchführung eines Western Blots .....	21
Tabelle 14: Verwendete Puffer für die Affinitätsreinigung von Antikörpern .....	22
Tabelle 15: Übersicht über die Spezifikationen zur GCS-Proteinbiosynthese in <i>E. coli</i> .....	22
Tabelle 16: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für die Reinigung der GCS-Proteine .....	23
Tabelle 17: Puffer für die Größenausschlusschromatographie. ....	24
Tabelle 18: Übersicht über das Mischungsverhältnis der GCS-Proteine für die Filtration .....	24
Tabelle 19: Puffer für die Filtration durch einen 300 kDa <i>cut-off</i> Filter .....	24
Tabelle 20: Zusammensetzung der Puffer zur Mitochondrienisolation aus <i>Pisum sativum</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25
Tabelle 21: Lösungen für die Messung der T-Protein Aktivität .....	27
Tabelle 22: Reaktionspuffer für die Messung der L-Protein Aktivität .....	27
Tabelle 23: Reaktionspuffer für die Messung der P-Protein Aktivität .....	28
Tabelle 24: Reaktionspuffer für die Messung der GDC-Gesamtaktivität .....	28
Tabelle 25: Übersicht über die von JPT synthetisierten Peptide .....	29
Tabelle 26: Puffer zur denaturierenden Reinigung des <sup>15</sup> N-QconCAT-Peptids aus <i>E. coli</i> .....	30
Tabelle 27: Übersicht über die berechneten molekularen Massen der GCS-Proteine mittels des Sedimentationskoeffizienten [S*]. ....	47
Tabelle 28: Übersicht über die prozentualen Anteile der einzelnen GCS-Proteine im Retentat nach der Filtration durch eine 300 kDa <i>cut-off</i> Membran. Berechnet wurde jeweils der molare prozentuale Anteil an der insgesamt gefilterten Proteinmenge .....	49

Tabelle 29: Übersicht über die prozentualen Anteile der einzelnen GCS-Proteine in den Retentaten nach der Filtration durch eine 300 KDa <i>cut-off</i> Membran. Berechnet wurde jeweils der molare prozentuale Anteil an der insgesamt gefilterten Proteinmenge.....	51
Tabelle 30: Übersicht über die prozentualen Anteile der einzelnen GCS-Proteine in den Retentaten nach der Filtration durch eine 300 kDa <i>cut-off</i> Membran. Berechnet wurde jeweils der molare prozentuale Anteil an der insgesamt gefilterten Proteinmenge.....	53
Tabelle 31: Übersicht über die <i>Synechocystis</i> GCS-Proteine, die in der Elutionsfraktion des Pulldown-Versuches mittels MS detektiert werden konnten. ....	61
Tabelle 32: Übersicht über die mittels Lineweaver-Burk berechneten $K_m$ und $V_{max}$ -Werte. ..	66
Tabelle 33: Ermittelte Verhältnisse der GCS-Proteine durch die Hi3-Methode.....	71
Tabelle 34: Durch quantitative Proteomanalyse ermittelte Stöchiometrien der GCS-Proteine aus <i>P. sativum</i> und <i>A. thaliana</i> . ....	75
Tabelle 35: Übersicht über die Verteilung der GCS-Proteine im Zelllysats des <i>Synechocystis</i> Wildtyps. ....	77
Tabelle 36: Übersicht über die in dieser Arbeit ermittelten Stöchiometrien der GCS-Proteine aus Pflanzen und <i>Synechocystis</i> . Zum Vergleich ist die von Oliver et al. publizierte Stöchiometrie mit aufgeführt. ....	90

**7.15. Abkürzungsverzeichnis**

2-PG	2-Phosphoglykolat
Å	Ångström
AHT	Anhydrotetracyclin
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AUZ	Analytische Ultrazentrifugation
BCKDH	Verzweigtkettige- $\alpha$ -Ketosäuren-Dehydrogenase-Komplex
BSA	Bovin Serum Albumin
C2	oxidativer photosynthetischer Kohlenstoffzyklus
CH <sub>2</sub> -THF	Methylen-Tetrahydrofolat
Cm	Chloramphenicol
DF	Durchfluss nach der Filtration durch eine <i>cut-off</i> Membran
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>S</u> orbent <u>A</u> ssay
FDH	Format Dehydrogenase
FPLC	<u>F</u> ast <u>P</u> rotein <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
GA	Gesamtaktivität (Glycin-abhängige Bildung von NADH)
GCS	Glycine Cleavage System
GDC	Glycinecarboxylase-Komplex
GME	Gesamtmitochondrienextrakt
HDMS <sup>E</sup>	<i><u>H</u>igh-<u>D</u>efinition <u>M</u>ass <u>S</u>pectrometry (<u>E</u>levated energy)</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IMAC	<u>I</u> mmobilized <u>M</u> etal ion <u>A</u> ffinity <u>C</u> hromatography
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
KGDH	$\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase
K <sub>m</sub>	Halbsättigungskonzentration in der Michaelis-Menten-Kinetik
LB	Luria-Bertani (Medium)
LS	Liponsäure
mAU	<i>milli absorbance units</i>
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MS <sup>E</sup>	<i><u>M</u>ass <u>S</u>pectrometry (<u>E</u>levated energy)</i>

MW	Molecular Weight
NKH	nicht-ketotischen Hyperglycinämie
OD	Extinktion
ox	oxidiert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDH	Pyruvate Dehydrogenase
PEG	Polyethylenglykol
PLP	Pyridoxal-5-Phosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
QconCAT	Protein <u>Q</u> uantification with <u>conCAT</u> enated peptides
red	reduziert
<i>s</i>	Sedimentationskoeffizient
S	Svedberg
SHMT	Serin-Hydroxymethyltransferase
SV	Säulenvolumen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TCA	Tricarbonsäurezyklus
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
THF	Tetrahydrofolat
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UA	Uranylacetat
5'UTR	<i>untranslated region (upstream)</i>
Ü	Überstand nach der Filtration durch eine <i>cut-off</i> Membran
v/v	<i>volume/volume</i>
V <sub>0</sub>	Ausschlussvolumen
V <sub>e</sub>	Elutionsvolumen
V <sub>max</sub>	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit in der Michaelis-Menten-Kinetik
VT	Volumenteile
w/v	<i>weight/volume</i>
WT	Wildtyp

## 7.16. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Maria Wittmiß  
Geburtstag: 17.03.1989  
Geburtsort: Berlin  
Familienstand: ledig

### Schulausbildung

2001 – 2008 Merian-Schule, Berlin Köpenick  
1997-2001 Kiekemal-Grundschule, Berlin Hellersdorf  
1995-1997 Sheldrick-Grundschule, Berlin Hellersdorf

### Beruflicher Werdegang

2014-2018 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Abteilung Pflanzenphysiologie,  
Universität Rostock  
  
Thema der Dissertation: „Untersuchungen zur Struktur und  
Funktion des Glycine Cleavage System in Cyanobakterien und  
Pflanzen“  
  
2012-2014 Master der Funktionellen Pflanzenwissenschaften,  
Universität Rostock  
  
Thema der Master-Arbeit: „Charakterisierung von *Arabidopsis*  
*thaliana* Mutanten mit gesteigertem Gehalt an mitochondrialer  
Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (mtLPD1)“  
  
2009-2012 Bachelor der Biowissenschaften,  
Universität Rostock  
  
Thema der Bachelor-Arbeit: „Einfluss photorespiratorischer  
Intermediate auf das Wachstum von *Arabidopsis thaliana*“

### Forschungsaufenthalte

01/2018 Philipps Universität Marburg, Prof. Dr. Uwe Maier, Abteilung  
Zellbiologie I  
  
- Proteinkomplexanalyse mittels *negative staining* und TEM  
  
09/2016 COS Heidelberg, Prof. Rüdiger Hell, Molekulare Biologie der  
Pflanzen (Finanziert durch das Professorinnenprogramm II der  
Universität Rostock)  
  
- FPLC (COS, Dr. Markus Wirtz)  
- Analytische Ultrazentrifugation (dkfz., Dr. Norbert Mücke)  
  
10/2015 Leibniz Universität Hannover, Prof. Hans-Peter Braun, Institut  
für Pflanzengenetik  
  
- Analyse von Proteinkomplexen mittels Blue Native PAGE