

Photoreaktivierung und Genregulation durch CryB aus *Rhodobacter sphaeroides*

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

DIPL.-BIOL. ANDREA VON ZADOW

aus Mainz

angefertigt am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie

Fachbereich Biologie und Chemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Gießen, Mai 2017

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie des Fachbereiches 08 der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von Dezember 2012 bis April 2017 unter der Leitung von Prof. Dr. Gabriele Klug angefertigt.

Erstgutachterin: **Prof. Dr. Gabriele Klug**
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Fachbereich Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Alfred Batschauer**
Fachgebiet Pflanzenphysiologie
Fachbereich Biologie
Philipps-Universität Marburg

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, 24. Mai 2017

Andrea von Zadow

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	UV-induzierte DNA-Schäden und Reparaturmechanismen	1
1.1.1	Exzisionsreparatur und rekombinative Reparatur	2
1.1.2	Photoreaktivierung	3
1.2	Photolyasen	4
1.2.1	Der FAD-Cofaktor	4
1.2.2	Antennenchromophore in Photolyasen	6
1.2.3	Struktur und Reparaturmechanismen	7
1.3	Cryptochrome	9
1.4	Cry-DASH und bifunktionelle Mitglieder	11
1.5	CryB aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	12
1.6	Evolution und Klassifizierung der CPF	13
1.7	Bakterielle Blaulichtrezeptoren	15
1.8	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	17
1.9	Die anoxygene Photosynthese der Prokaryoten	17
1.10	Die Regulation von Photosynthesegenen in <i>Rhodobacter</i> durch Licht und Sauerstoff	18
1.10.1	Das PpsR/AppA-Repressor/Antirepressor-System	19
1.10.2	Das PrrBA-Zweikomponentensystem	21
1.10.3	Weitere Systeme	21
1.10.4	Zusammenspiel	22
1.11	Eisen-Schwefel-Cluster in Proteinen und Eisenmetabolismus	23
1.12	Oxidativer Stress	24
1.13	Zielsetzung der Arbeit	26
2	Material und Methoden	27
2.1	Allgemeines	27
2.2	Geräte und Reagenzien	27
2.3	Stämme und Plasmide	30
2.4	Oligonukleotide	33
2.5	Mikrobiologische Methoden	35
2.5.1	Messung der optischen Dichte (OD) von Bakterienkulturen	35
2.5.2	Antibiotika	35
2.5.3	Anzucht von <i>R. sphaeroides</i>	36
2.5.4	Konjugation von Plasmid-DNA nach <i>R. sphaeroides</i>	38

2.5.5	Zellernte von <i>R. sphaeroides</i>	39
2.5.6	<i>In vivo</i> Photoreaktivierung	39
2.5.7	Bakteriochlorophyllbestimmung	41
2.5.8	Anzucht von <i>E. coli</i>	41
2.5.9	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	42
2.5.10	Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	42
2.5.11	Anzucht von <i>E. coli</i> für Proteinüberexpression	42
2.5.12	Zellernte von <i>E. coli</i> nach Proteinüberexpression	43
2.5.13	Herstellung von Dauerkulturen	43
2.5.14	Fluoreszenzmikroskopie	44
2.6	Molekularbiologische Methoden	44
2.6.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
2.6.2	Aufreinigung von PCR-Produkten	49
2.6.3	Plasmidisolierung Alkalische Lyse	49
2.6.4	Restriktionsverdau von DNA	49
2.6.5	TAE-Agarose-Gelelektrophorese	51
2.6.6	Ethidiumbromidfärbung von Nukleinsäuren in Gelen	51
2.6.7	Gelextraktion	51
2.6.8	Ligation und Butanolfällung	52
2.6.9	Vorkehrungen für das Arbeiten mit RNA	52
2.6.10	RNA-Isolierung für Northern Blot	52
2.6.11	RNA-Isolierung und DNase-Verdau für <i>real-time</i> PCR	53
2.6.12	Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese für RNA	53
2.6.13	Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese für RNA	54
2.6.14	Northern-Vakuumblot	55
2.6.15	Northern-Elektroblot	55
2.6.16	<i>Labelling</i> von Sonden für Northern-Hybridisierung	56
2.6.17	Northern-Hybridisierung und Entwicklung	56
2.6.18	„Strippen“ von Membranen	58
2.7	Proteinbiochemische Methoden	58
2.7.1	Proteinaufreinigung	58
2.7.2	Aufkonzentrieren von Proteinlösungen	62
2.7.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	62
2.7.4	Dialyse von Proteinen	63
2.7.5	Reduktion von CryB	63
2.7.6	Messung von Protein-Absorptionsspektren	63
2.7.7	Freisetzen der Cofaktoren	64
2.7.8	Zellaufschluss von <i>R. sphaeroides</i> für Western Blot	64
2.7.9	SDS-PAGE	64
2.7.10	Silberfärbung	65
2.7.11	Coomassie-Färbung	66
2.7.12	Western Blot	66
2.7.13	Immunodetektion durch Chemolumineszenz	67

2.7.14	<i>In vivo</i> Protein-pulldown	68
2.7.15	<i>In vitro</i> Reparaturassay	69
3	Ergebnisse	71
3.1	Allgemeines zu CryB	71
3.1.1	Konstrukt zur heterologen Expression von CryB in <i>E. coli</i>	71
3.1.2	Aufreinigung des CryB-Wildtyp-Proteins	72
3.1.3	Expression von CryB in <i>R. sphaeroides</i>	73
3.2	Einführung zu den CryB-Varianten	74
3.2.1	<i>In vivo</i> Expression und Photoreaktivierung – alle Varianten	75
3.3	Untersuchungen zur (6-4)-Photolyaseaktivität	77
3.3.1	Aktives Zentrum – H362A und Q302A	77
3.3.2	Komplementation von $\Delta cryB$ mit der (6-4)-Photolyase aus <i>Drosophila melanogaster</i>	79
3.3.3	<i>In vitro</i> Reparatur von (6-4)-Schäden	80
3.4	Untersuchung der Cofaktoren	83
3.4.1	Der Elektronentransferweg zum FAD – die nicht reduzierbare CryB-Variante W338F	83
3.4.2	Die Bindung von FAD – L366-Varianten	84
3.4.3	Antennenbindung – CryB E37F	87
3.4.4	Doppelaustausche – E37F/W338F, E37F/L366H	89
3.4.5	Kinetik der <i>in vivo</i> Photoreaktivierung durch die CryB-Varianten	90
3.4.6	Das [4Fe4S]-Cluster	92
3.5	Untersuchungen zur Genregulation durch <i>real-time</i> PCR	99
3.6	Untersuchungen zur <i>puf</i> - und <i>puc</i> -Expression in $\Delta cryB$ unter Einfluss von Kanamycin	101
3.6.1	Expression von <i>puf</i> und <i>puc</i> im Wildtyp, $\Delta cryB$ pRK <i>cryB</i> und $\Delta cryB$ pRK415	102
3.6.2	Herstellung neuer $\Delta cryB$ -Stämme	103
3.6.3	Untersuchung der Kontrollstämme	104
3.6.4	Untersuchung des Kontrollstammes $\Delta cryB$ Sp pBBR1MCS-2	106
3.6.5	Expressionsanalyse des Kanamycin-Resistenzgens in $\Delta cryB$ durch <i>real-time</i> PCR	109
3.7	Genexpression unter Singulett-Sauerstoffstress	109
3.7.1	Expression der kleinen RNA CcsR1	109
3.7.2	Expression von <i>puf</i> und <i>puc</i>	111
3.8	Kristallisation von CryB	112
3.8.1	CryB-Reduktion mit Natriumdithionit für die Kristallisation	112
3.9	Interaktionsanalyse durch <i>in vivo</i> Protein-pulldown	113
3.10	Interaktionsanalysen mit CryB und AppA	115
3.10.1	AppA	116
3.10.2	Analytische Gelfiltration	117
3.10.3	<i>Small Angle X-ray Scattering</i> (SAXS)	120
3.10.4	Co-Kristallisation	121
3.11	Lokalisation von CryB	121

4 Diskussion	124
4.1 Die (6-4)-Photolyaseaktivität von CryB	124
4.1.1 Histidin H362 bei der <i>in vivo</i> Photoreaktivierung und <i>in vitro</i> Reparatur	124
4.1.2 Komplementation mit der (6-4)-Photolyase aus <i>Drosophila melanogaster</i>	125
4.1.3 <i>In vitro</i> Reparatur von (6-4)-Schäden	126
4.2 Die Cofaktoren von CryB und ihre Rolle bei der Photoreaktivierung	130
4.2.1 Der katalytische Cofaktor FAD	130
4.2.2 Der Antennenchromophor DLZ	133
4.2.3 Das [4Fe4S]-Eisen-Schwefel-Cluster	134
4.3 Untersuchungen zur <i>puf</i> - und <i>puc</i> -Expression in $\Delta cryB$ unter Einfluss von Kanamycin . . .	138
4.3.1 Kanamycin und Spectinomycin in Bezug auf oxidativen Stress	139
4.3.2 Ausschluss eines Kombinationseffektes	139
4.3.3 Eingeschränkte Ausprägung der Resistenz in $\Delta cryB$	140
4.3.4 Vergleich der Resistenzmechanismen	141
4.3.5 Einsatz von Antibiotika	142
4.3.6 Komplementationsstämme	142
4.4 Expressionsanalysen unter Singulett-Sauerstoffstress	143
4.5 Interaktionsanalysen	144
4.5.1 Assoziation von CryB mit dem Chaperon GroEL	144
4.5.2 CryB und AppA	145
4.6 Lokalisation	147
4.7 Fazit	149
5 Zusammenfassung	150
6 Summary	151
7 Literaturverzeichnis	152
8 Abkürzungsverzeichnis	170
9 Anhang	171
9.1 Chromatogramme	171
9.2 UV-Assays Kontrollen	172
9.3 Plasmiderhalt	172
9.4 Nachweis von Punktmutationen durch PCR	173
9.5 Sequenzen	174
Danksagung	177

1 Einleitung

Sonnenlicht ist eine essenzielle Energie- und Informationsquelle für alle Lebewesen. Die wichtigste Grundlage für das Leben auf der Erde ist durch die Nutzung von Lichtenergie für die Photosynthese durch Cyanobakterien und später Algen und Pflanzen entstanden. So entsteht nicht nur Sauerstoff, sondern auch Biomasse als Lebensgrundlage für heterotrophe Organismen. Neben der Eigenschaft als Energiequelle hat natürliches Licht einen bedeutenden Informationsgehalt. Es steuert den tageszeitlichen Rhythmus durch die Synchronisation der circadianen Uhr in Tieren, Pflanzen und einigen Prokaryoten, dient der visuellen Wahrnehmung von Objekten und Farben durch Tiere sowie der Orientierung. Sichtbares Licht ist elektromagnetische Strahlung und stellt einen kleinen Bereich des elektromagnetischen Spektrums in den Wellenlängen von 400–700 nm zwischen Ultraviolett (100–400 nm) und Infrarot (700–4000 nm) dar. Die Partikel, die die elektromagnetischen Wellen produzieren, werden Photonen oder Lichtquanten genannt. Je kürzer die Wellenlänge, desto höher ist der Energiegehalt der Photonen (Barsanti und Gualtieri, 2005). Neben seinen nützlichen Eigenschaften birgt der hohe Energiegehalt des kurzwelligen Lichts sowie eine zu hohe Lichtdosis auch Gefahren. Dies erfordert zelluläre Schutzmechanismen wie regulatorische Anpassungsprogramme zur Vermeidung von Licht, oder die Behebung von Schäden durch Reparatur.

Licht wird von Organismen durch Photorezeptoren wahrgenommen. Photosensorische Proteine sind in Bakterien außergewöhnlich verbreitet. Dabei spielt vor allem das kurzwellige blaue Licht eine wichtige Rolle als Informationsquelle, was durch eine hohe Diversität an Blaulichtrezeptoren deutlich wird. Licht ist nicht nur für photosynthetisch aktive Bakterien wie dem Purpurbakterium *Rhodobacter sphaeroides* relevant, sondern beeinflusst auch in chemotrophen Bakterien Phänomene wie Biofilmbildung, Pathogenese oder Phototaxis (Purcell und Crosson, 2008; Gomelsky und Hoff, 2011). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem **Blaulichtrezeptor- und DNA-Reparaturprotein CryB** aus *Rhodobacter sphaeroides*. Im Folgenden wird zunächst auf die DNA-schädigenden Effekte von UV-Strahlung eingegangen.

1.1 UV-induzierte DNA-Schäden und Reparaturmechanismen

UV-Strahlung induziert schädliche Effekte in allen lebenden Organismen, von Bakterien über einzellige Eukaryoten bis zu höheren Lebewesen wie Pflanzen und Tieren einschließlich des Menschen. Aufgrund ihrer Absorptionseigenschaften ist zelluläre DNA ein Hauptziel vor allem von UV-B-Strahlung (280–315 nm). Auch wenn der Anteil dieser Strahlung, der die Erdoberfläche erreicht, aufgrund der Absorption durch die Ozonschicht nur gering ist im Vergleich zur längerwelligen UV-A-Strahlung (315–400 nm), stellt UV-B eine besondere Gefahr dar. Direkte DNA-schädigende Effekte sind auf sie zurückzuführen, während UV-A-Strahlung, die nicht durch DNA absorbiert wird, vorwiegend indirekte schädigende Effekte hervorruft, beispielsweise durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wie Singu-

lettsauerstoff (Abschnitt 1.12). Die kurzwellige UV-C-Strahlung (<280 nm) hat auf der Erde keine biologische Relevanz, da sie in der Erdatmosphäre absorbiert wird (Sinha und Häder, 2002).

Die Einwirkung von UV-Strahlung induziert zwei Typen von direkten Schäden in der DNA: Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD) und Pyrimidin-Pyrimidon (6-4)-Photoproducte ((6-4)-PP) (Abbildung 1.1). Sie entstehen durch die kovalente Verknüpfung zweier benachbarter Pyrimidinbasen (Thymin oder Cytosin) desselben DNA-Stranges nach Absorption von UV-B-Licht (Faraji und Dreuw, 2014). CPD entstehen durch die Verknüpfung der C5- und C6-Atome beider beteiligter Pyrimidinbasen, dadurch bildet sich ein viergliedriger, zyklischer Ring (cyclobutan) zwischen den beiden Basen (T<>T oder T<>C). (6-4)-PP hingegen erhielten ihren Namen durch die nichtzyklische Verknüpfung des C6-Atoms der 5'-Pyrimidinbase mit dem C4-Atom der 3'-Pyrimidinbase. Die Entstehung dieses Schadens verläuft über eine kurzlebige Zwischenstufe, dem viergliedrigen Oxetan- oder Azetidin-Intermediat (bei T-T bzw. T-C Verknüpfungen), welches durch eine Paternò-Büchi-Reaktion generiert und sofort in das offene T(6-4)T bzw. T(6-4)C umgewandelt wird (Sancar, 2003). (6-4)-PP können durch Absorption von Licht einer Wellenlänge von etwa 300–360 nm weiterhin in ihre Dewar-Valenzisomere konvertiert werden (Yamamoto et al., 2017). Die beiden individuellen Typen von UV-induzierten DNA-Schäden entstehen zu ungleichen Häufigkeiten. CPD machen etwa 80 % der UV-Schäden aus, während (6-4)-PP nur zu etwa 20 % auftreten (Liu et al., 2015). Es gibt jedoch Hinweise, dass letztere ein höheres mutagenes Potenzial haben als die häufiger vorkommenden CPD-Schäden (LeClerc et al., 1991; Horsfall und Lawrence, 1994; Zdzienicka et al., 1992; Kamiya et al., 1998), wobei die relative Häufigkeit von Mutationen, die auf (6-4)-PP zurückzuführen sind, auch organismusabhängig ist (Lawrence et al., 1993; Gibbs et al., 1995). Das Verteilungsmuster der unterschiedlichen Pyrimidindimere, sowie deren Zusammensetzung aus Thyminen oder Cytosinen, hängt von der Lichtqualität (UV-A, -B oder Gesamtspektrum) sowie von der DNA-Sequenz ab (Douki et al., 2003; Cadet et al., 2005).

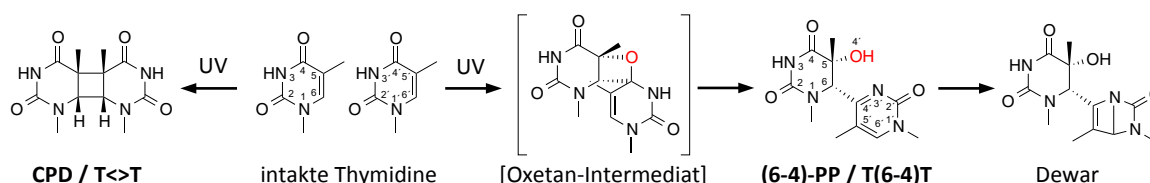


Abbildung 1.1: Entstehung von UV-induzierten Cyclobutan-Pyrimidindimeren (CPD) und (6-4)-Photoproducten ((6-4)-PP) aus Thyminbasen (T). Aus Yamamoto et al. (2017), modifiziert.

Unreparierte prämutagene DNA-Schäden können sich als Konsequenz verschiedener Basenaustausche in Form von Mutationen im Genom festigen oder die DNA-Synthese während der Replikation behindern, was zum Zelltod führen kann (Ikehata und Ono, 2011). Um dies zu vermeiden und um ein möglichst intaktes Genom an Folgegenerationen weiterzugeben, haben Organismen effiziente Mechanismen zur DNA-Reparatur entwickelt. Im Folgenden werden Reparaturmechanismen beschrieben, die bei der Beseitigung UV-induzierter Schäden zum Einsatz kommen.

1.1.1 Exzisionsreparatur und rekombinative Reparatur

Beschädigungen von DNA-Basen durch verschiedene endogene Einflüsse wie z. B. reaktive Sauerstoffspezies oder exogen verursachte Schäden durch beispielsweise ionisierende Strahlung und in manchen Organismen auch UV-Strahlung, können durch die **Basen-Exzisionsreparatur (BER)** behoben werden.

Die zentralen Enzyme bei diesem Vorgang sind DNA-Glykosylasen, die beschädigte Basen entfernen; im Anschluss wird die Stelle durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt. Ein anderer Mechanismus ist die **Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER)**, durch die eine Reihe DNA-verändernder Schäden entfernt werden, unter anderem die UV-induzierten CPD und (6-4)-PP. In Eukaryoten sind etwa 30 Polypeptide an dem komplexen Reparaturvorgang beteiligt, bei dem die Schadenstelle zunächst erkannt wird, anschließend die betroffenen Nukleotide entfernt werden und zuletzt die entstandene Einzelstranglücke durch die DNA-Polymerase aufgefüllt wird. Bei der prokaryotischen NER sind an dem Exzisionsprozess lediglich drei Proteine beteiligt, UvrA, B und C, darauf folgt die Neusynthese der entfernten Nukleotide (Sinha und Häder, 2002). Ob NER oder BER zum Einsatz kommt, hängt unter anderem davon ab, wo im Genom der Schaden auftritt, also in Bereichen mit aktiver Genexpression (transkriptionsgekoppelte Reparatur) oder in transkriptionell inaktiven Bereichen (globale Genomreparatur) (Friedberg, 2003). Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist die **rekombinative Reparatur**. Sie kommt während der DNA-Replikation zum Einsatz, aufgrund von Schäden, die nicht durch Exzisionsreparatur repariert wurden und die durch die Blockierung der Replikationsgabel einzelsträngige Lücken entstehen lassen. Diese Lücken werden durch Rekombination mit einem homologen DNA-Strang geschlossen und die noch vorhandenen Schäden daraufhin durch Exzisionsreparatur behoben (Shinohara und Ogawa, 1995).

Der im Fokus dieser Arbeit liegende Reparaturmechanismus ist die im Folgenden beschriebene lichtabhängige Photoreaktivierung, ein sehr effizienter Prozess, der ausschließlich und spezifisch der Reparatur der UV-induzierten CPD- und (6-4)-Schäden dient.

1.1.2 Photoreaktivierung

Als Photoreaktivierung bezeichnet man die Aufhebung schädlicher Effekte auf Organismen, wie Wachstumshemmung, Mutationen oder Zelltod, die durch UV-Strahlung (200–300 nm) hervorgerufen werden, durch den Einfluss von längerwelligem UV- bzw. blauem Licht (350–450 nm) (Sancar, 2003). Lange vor der Aufklärung des molekularen Mechanismus, der diesem Phänomen zugrunde liegt, wurde der Effekt des positiven Einflusses von Licht auf die Überlebensfähigkeit von Mikroorganismen nach UV-Bestrahlung festgestellt (Kelner, 1949a,b). Der Begriff „Photo-Reaktivierung“ wurde erstmals durch Dulbecco (1949) verwendet und entstand durch die Beobachtung, dass eine „Wiederbelebung“ von UV-geschädigten Phagen in Anwesenheit von Bakterienzellen durch den Einfluss von sichtbarem Licht begünstigt wird. Die ersten Hinweise auf ein „**Photoreaktivierendes Enzym**“, das UV-geschädigte DNA lichtabhängig repariert und so die negativen Folgeeffekte der UV-Strahlung verhindert, stammen aus *Escherichia coli* (Rupert et al., 1958) und Hefe (Rupert, 1960). Bei der Photoreaktivierung wird das Photoprodukt spezifisch durch ein einziges Enzym erkannt und der Schaden nicht wie bei den Exzisionsreparaturen durch Entfernung und Ersetzung, sondern durch Spaltung rückgängig gemacht. Die Reaktion bezieht ihre Energie im Gegensatz zu den „Dunkel“-Exzisionsreparaturen aus kurzwelligem Licht. Die Zuordnung des „Photoreaktivierenden Enzyms“ zu den Lyasen beruht auf dessen Aktivität der nichthydrolytischen Spaltung von C-C Bindungen, wodurch die Bezeichnung „Deoxyribodipyrimidin Photolyase“ oder kurz „**Photolyase**“ etabliert wurde (Minato und Werbin, 1972). Im Folgenden wird auf den strukturellen Aufbau, den Reparaturmechanismus sowie die Verbreitung von Photolyasen eingegangen.

1.2 Photolyasen

Photolyasen sind monomere cytoplasmatische Enzyme einer Größe von 50–65 kDa (Sancar, 1996). Sie erkennen und reparieren UV-induzierte Schäden in der DNA und werden anhand ihrer Substratspezifität für die beiden individuellen Schadentypen, Cyclobutan-Pyrimidindimere und (6-4)-Photoprodukte (Abschnitt 1.1), unterschieden. Die ersten beschriebenen Photolyasen waren **CPD-Photolyasen** und wurden intensiv am Beispiel des Vertreters aus *E. coli* untersucht (Sancar, 2008). Erst deutlich später wurden **(6-4)-Photolyasen**, erstmals in *Drosophila melanogaster*, entdeckt (Todo et al., 1993). Aufgrund dessen wurde der Begriff Photolyase früher nur für CPD-Photolyasen verwendet (Sancar, 1996, 2008). Die zunehmende Identifizierung von (6-4)-Photolyasen in diversen Organismen deutet auf ihre hohe Bedeutung für das Überleben von UV-Strahlung bei vielen Arten hin (Glas et al., 2009b).

Photolyasen katalysieren die Konvertierung der dimerisierten Pyrimidinbasen zurück in ihren monomeren Ausgangszustand in einer Reaktion, die sinnvollerweise ebenso wie die Entstehung des Schadens durch kurzwelliges Licht ausgelöst wird (Sancar, 2003). Die Reaktion wird durch Blaulichtabsorption des redoxaktiven FAD-Cofaktors vermittelt (Abschnitt 1.2.1) und läuft nicht in Dunkelheit ab. CPD- und (6-4)-Photolyasen funktionieren dabei jeweils über einen individuellen Mechanismus (Abschnitt 1.2.3).

Photolyasen sind weit verbreitet und in allen drei Domänen des Lebens – Prokaryoten, Eukaryoten, Archaeen – vertreten, nicht jedoch in plazentalen Säugetieren inklusive des Menschen (Wood et al., 2001; Li et al., 1993; Hsu et al., 1996) (Abschnitt 1.6). Hier wird die Reparatur von UV-Schäden stattdessen durch die oben beschriebene lichtunabhängige, unspezifische und weniger effiziente NER gewährleistet. Warum die nützlichen Photolyasen in manchen Linien verloren gingen, ist nicht geklärt (Lucas-Lledó und Lynch, 2009). Sie sind eng verwandt mit den Cryptochrom-Blaulichtrezeptoren, auf die in Abschnitt 1.3 eingegangen wird.

1.2.1 Der FAD-Cofaktor

Photolyasen sind Flavoproteine und binden nichtkovalent ein Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) im C-terminal gelegenen aktiven Zentrum, das ausnahmslos in allen bisher charakterisierten Photolyasen und Cryptochromen zu finden ist (Sancar, 2003; Chaves et al., 2011). FAD stellt einen der wichtigsten Cofaktoren bei enzymatischen Reaktionen dar und wird in Photolyasen als redoxaktiver Cofaktor für die Übertragung von Elektronen verwendet (Liu et al., 2015). Als Flavoproteine oder -enzyme werden Proteine bezeichnet, die typischerweise entweder ein Flavinmononukleotid (FMN) oder ein FAD, in der Regel nichtkovalent, gebunden haben; in manchen Fällen ist das Flavin jedoch kovalent an einen Histidin-, Cystein- oder Tyrosinrest des Proteins gebunden. Neben dem Vorkommen von Flavin-Cofaktoren in Photolyasen, Cryptochromen (Abschnitt 1.3) und weiteren photosensorischen Proteinen (Abschnitt 1.7) sind sie in Dehydrogenasen, Oxidasen oder Monooxygenasen an diversen Reaktionen beteiligt. Sie dienen häufig als Überträger von einem oder zwei Elektronen (Joosten und van Berkel, 2007). Das Kernstück von Flavinen ist ein dreigliedriger Isoalloxazinring, die Art des Flavins definiert sich durch die Reste. Bei FAD ist der Isoalloxazinring mit einem Ribitylphosphat verbunden, an welches durch eine Phosphodiesterbindung ein Adenosinmonophosphat gebunden ist. Bei dem isoliert betrachteten Teil des Isoalloxazinringes mit Ribitylrest handelt es sich um Riboflavin, einem als Vitamin B₂ bekannten Molekül, das durch Pflanzen und viele Bakterien synthetisiert wird (Bacher et al., 2000). Um eine Phosphatgruppe erweitert entsteht das Flavinmononukleotid (FMN). Der Isoalloxazinring ist der redoxaktive

Teil des Moleküls und kann durch die Aufnahme oder Abgabe von Elektronen verschiedene Redoxzustände annehmen (Abbildung 1.2). Der Name Flavin kommt von *flavus* (lat. gelb). In dieser Farbe erscheinen Flavine im oxidierten Zustand aufgrund der Absorptionseigenschaften des Isoalloxazinringes.

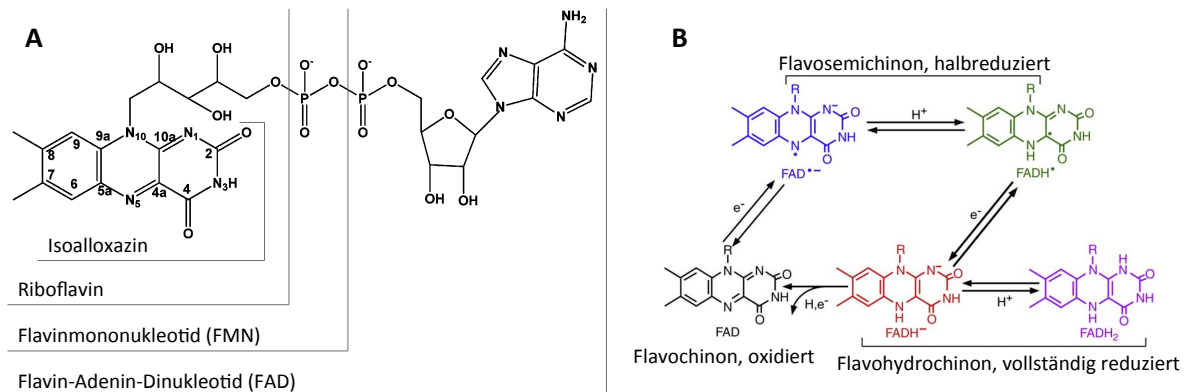


Abbildung 1.2: A) Der Aufbau von Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN) und Riboflavin. Aus Zhao et al. (2011), modifiziert. **B)** Redoxzustände von Flavinen (Bsp. FAD). Oxidiertes Flavochinon (FAD, schwarz), semichinoides (halbreduziertes) anionisches Radikal ($FAD^{\bullet-}$, blau), semichinoides (halbreduziertes) neutrales Radikal ($FADH^{\bullet}$, grün), anionisches Hydrochinon ($FADH^-$, rot) und protoniertes Hydrochinon ($FADH_2$, lila). R = verschiedene mögliche Seitenketten von Flavinen (siehe A). Aus Liu et al. (2010), modifiziert.

Für die katalytische Aktivität von Photolyasen ist die vollständige Reduktion des FAD durch zwei Elektronen zu $FADH^-$ erforderlich. Dieser Prozess der Reduktion wird als „Photoaktivierung“ bezeichnet und geschieht durch die Absorption von sichtbarem Licht (300–650 nm) und einem proteininternen Elektronentransfer zum oxidierten FAD oder semichinoiden $FADH^{\bullet}$ (Weber, 2005; Brettel und Byrdin, 2010).

Diese Aktivierung, also die Reduktion des FAD über das semichinoide $FADH^{\bullet}$ (halbreduziert) zum vollständig reduzierten, katalytisch aktiven Zustand, erfolgt durch die Weiterleitung von Elektronen von der Proteinoberfläche zum FAD, die von einem Elektronendonator in der Zelle stammen. Dieser Weg verläuft typischerweise über eine Kaskade von drei Tryptophanresten. Das Prinzip der „Trp-Triade“ ist in Photolyasen und Cryptochromen konserviert (Byrdin et al., 2004, 2010; Aubert et al., 2000). Am Beispiel der CPD-Photolyase aus *E. coli* verläuft der Elektronentransferweg von dem oberflächenexponierten W306 über das mittlere W359 zum dritten Tryptophan W382 im aktiven Zentrum, von welchem aus das Elektron auf das benachbarte $FAD(H^{\bullet})$ übertragen wird. Die Reaktion beginnt mit der Anregung des oxidierten FAD_{ox} zu FAD_{ox}^* bzw. des semichinoiden Flavinradikals $FADH^{\bullet}$ zu $FADH^{\bullet*}$ durch Lichtenergie. Dieses entzieht dem Tryptophan W382 ein Elektron. W382 wird wiederum sequenziell durch die beiden anderen Tryptophane reduziert. FAD liegt in Photolyasen *in vivo* größtenteils im vollständig reduzierten Zustand vor (Chaves et al., 2011). Alternativ zu der konservierten Triade mit drei Tryptophanen ist die Beteiligung von Tyrosin an der Elektronenübertragung bei der CPD-Photolyase aus *Anacystis nidulans* bekannt (Aubert et al., 1999). Der klassische Elektronentransferweg ist in Abbildung 1.3 dargestellt.

Die anschließende Reparatur wird durch die Anregung des vollständig reduzierten $FADH^-$ zu $FADH^{\bullet*}$ initiiert. Dies geschieht ebenso durch die Absorption von Licht (350–450 nm), gefolgt von einem Elektronentransfer von $FADH^{\bullet*}$ auf die beschädigte DNA und der Spaltung des Pyrimidindimers. Zuletzt wird das entstandene $FADH^{\bullet}$ durch Elektronenrücktransfer wieder in den aktiven Zustand transformiert. Bei diesem zweiten lichtabhängigen, von der Photoaktivierung zu unterscheidenden Prozess der Anregung und Reparatur, handelt es sich um die eingangs beschriebene Photoreaktivierung (Sancar, 2003).

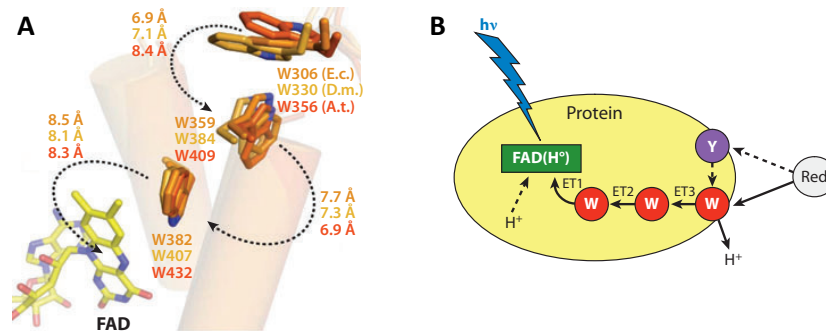


Abbildung 1.3: Elektronentransfer zur Reduktion von FAD_{ox} und FADH• über drei Tryptophane („Trp-Triade“). **A)** Konservierte Tryptophane der CPD-Photolyase aus *E. coli*, der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* und des DASH-Cryptochroms cry3 aus *Arabidopsis thaliana*. **B)** Schematische Darstellung der Reduktion. In manchen Vertretern ist ein Tyrosin anstelle des Tryptophans involviert. Red = externer Elektronendonator, W = Tryptophan, Y = Tyrosin, ET = Elektronentransfer, FAD = Flavin-Adenin-Dinukleotid. Aus Chaves et al. (2011).

Eine andere Möglichkeit der Anregung des FADH⁻ als die der direkten Lichtabsorption durch den Cofaktor selbst ist die im folgenden Abschnitt beschriebene Übertragung von Anregungsenergie durch den Antennenchromophor.

1.2.2 Antennenchromophore in Photolyasen

Die Anregung des vollständig reduzierten Flavin-Cofaktors geschieht entweder durch direkte Lichtabsorption oder durch Energietransfer (Exzitonentransfer) auf das FADH⁻ über einen zweiten, ebenso im Blaulichtbereich absorbierenden, sogenannten „Antennen“-Cofaktor (Brettel und Byrdin, 2010). Dieser N-terminal und wie FAD nichtkovalent gebundene Chromophor wird nicht für die Bindung des Schadens oder die katalytische Aktivität benötigt, sondern erweitert als „Lichtsammelantenne“ die Gesamtabsorption, insbesondere, wenn die Lichtverfügbarkeit eingeschränkt ist. Dadurch kann die Reparaturrate je nach Wellenlänge des vorhandenen Lichts um das 10–100-Fache verbessert werden (Zhong, 2015; Sancar, 2003). Die Energieübertragung erfolgt durch den Prozess des Förster-Resonanzenergietransfers durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen dem angeregten Antennenchromophor und FADH⁻. Die Effizienz bzw. Quantenausbeute dieses Energietransfers ist unter anderem von der Entfernung der beiden Moleküle abhängig (Weber, 2005; Sancar, 2008) und kann sehr unterschiedlich sein. So liegt sie beispielsweise bei der CPD-Photolyase aus *E. coli* bei 63 % (Payne und Sancar, 1990) und bei der aus *Anacystis nidulans* bei 98 % (Kim et al., 1992). Photolyasen sind aufgrund der direkten Absorption durch FADH⁻ auch ohne Antennenchromophor funktionsfähig, jedoch werden, am Beispiel der CPD-Photolyase aus *E. coli*, ca. 80 % der Photonen, die die Reparaturreaktion initiieren, aufgrund ihres höheren Extinktionskoeffizienten durch die Antenne absorbiert (Park et al., 1995). Im Gegensatz zum FAD ist dieser zweite Cofaktor in Photolyasen nicht konserviert – bislang wurden fünf verschiedene als Antennenchromophore verwendete Moleküle identifiziert: Zunächst wurden die Folat- und Deazaflavin-Vertreter 5,10-Methenyltetrahydrofolat (**MTHF**) bzw. 7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin (**8-HDF**) als Lichtsammelchromophore entdeckt. MTHF tritt unter anderem in den CPD-Photolyasen aus *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* auf und weist proteingebunden ein Absorptionsmaximum von 385 nm auf (Johnson et al., 1988); 8-HDF mit einem Absorptionsmaximum von 440 nm kommt beispielsweise in der CPD-Photolyase aus *Anacystis nidulans* (Eker et al., 1990) sowie in beiden Photolyasetypen aus *D. mela-*

nogaster vor (Glas et al., 2009a; Selby und Sancar, 2012). 8-HDF wird auch als F₀ bezeichnet und ist eine Vorstufe des Coenzyms F₄₂₀. In Archaeen wird es häufig verwendet, kommt aber vereinzelt auch in Bakterien und Eukaryoten vor (Glas et al., 2009a; Decamps et al., 2012; Kiontke et al., 2014). In einzelnen bisher bekannten Fällen wird das Flavinmononukleotid (FMN) als Antennenchromophor genutzt, wie bei der CPD-Photolyase aus *Thermus thermophilus* (Ueda et al., 2005), oder ein weiteres Molekül FAD, wie in *Sulfolobus tokodaii* (Fujihashi et al., 2007). Das zuletzt entdeckte 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (DLZ) mit einem Absorptionsmaximum bei 420 nm (proteingebunden) wird in *R. sphaeroides* und *Agrobacterium tumefaciens* als Antennenchromophor verwendet (Geisselbrecht et al., 2012; Zhang et al., 2013). DLZ entsteht durch das Enzym 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase (Lumazin-Synthase) und ist die direkte Vorstufe bei der Biosynthese von Riboflavin, welches dann durch die Einwirkung der Riboflavin-Synthase entsteht (Kis et al., 1995). Abbildung 1.4 zeigt die verschiedenen Antennenchromophore.

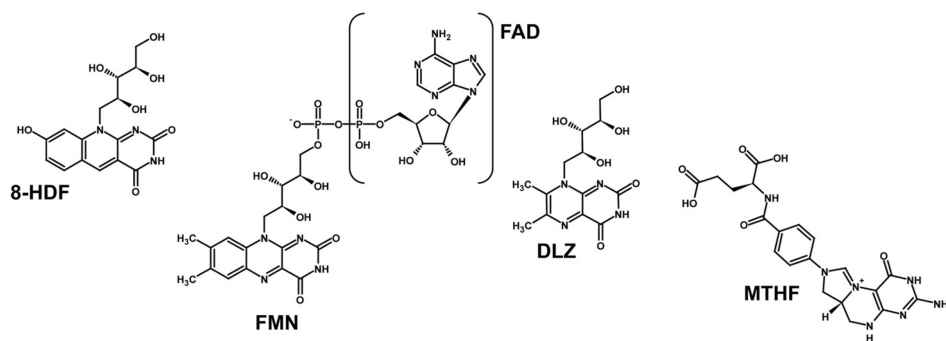


Abbildung 1.4: Die fünf bisher in Photolyasen als Antennenchromophore identifizierte Cofaktoren 7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin (8-HDF/F₀), Flavinmononukleotid (FMN), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (DLZ) und 5,10-Methenyltetrahydrofolat (MTHF). Aus Kiontke et al. (2014).

1.2.3 Struktur und Reparaturmechanismen

1.2.3.1 CPD-Photolyasen

Die erste Kristallstruktur einer Photolyase war die der CPD-Photolyase aus *E. coli* (Park et al., 1995). Photolyasen sind aus zwei Hauptdomänen aufgebaut – einer N-terminalen α/β -Domäne und einer C-terminalen helikalen Domäne – die durch einen *loop* verbunden sind. Der N-terminal gebundene Antennenchromophor ist an der Peripherie des Proteins lokalisiert, während FAD in der C-terminalen Domäne in einer Vertiefung, dem aktiven Zentrum, in einer U-förmigen Konformation gebunden ist. Diese Bindungsart des FAD ist typisch für Photolyasen (Sancar, 2003). Die Struktur der CPD-Photolyase mit gebundener DNA (Mees et al., 2004) bestätigte den zuvor postulierten (Park et al., 1995) „flip-out“-Mechanismus des Thymin dimers des betroffenen DNA-Stranges aus der Helix in das aktive Zentrum. Dabei bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem CPD und dem Adeninteil des FAD, über den vermutlich die Elektronenübertragung geschieht. Die Anregung des vollständig reduzierten FADH⁻ ist, wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, Voraussetzung für die Reparatur und der Auslöser für die Übertragung eines Elektrons auf den CPD-Schaden (30–250 ps). Die beiden Bindungen des Cyclobutan-Pyrimidindimers werden nacheinander in sehr kurzer Zeit gespalten (90 ps), gefolgt vom langsamer verlaufenden Rücktransfer des Elektrons zum semichinoid FADH[•]-Radikal. Die Reparatur eines Dimers geschieht innerhalb von 700 ps (Liu et al., 2011; Yamamoto et al., 2017).

1.2.3.2 (6-4)-Photolyasen

Der Reparaturmechanismus von (6-4)-Photolyasen ist bislang weniger gut verstanden als der von CPD-Photolyasen (Faraji und Dreuw, 2014). Die Strukturaufklärung der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* (Maul et al., 2008) zeigte, dass sie bezüglich der Domänenstruktur und eines im aktiven Zentrum ebenfalls in U-förmiger Konformation gebundenen FAD-Moleküls einen ähnlichen grundlegenden Aufbau wie CPD-Photolyasen aufweisen. Analog ist auch der „flip-out“-Mechanismus des (6-4)-Schadens in das aktive Zentrum der (6-4)-Photolyasen vorhanden. Aufgrund der strukturellen Unterschiede des DNA-Schadens unterscheidet sich jedoch die Ausbildung des Wasserstoffbrücken-Netzwerkes zwischen Schaden und FAD in der Bindetasche von dem der CPD-Photolyasen (Faraji und Dreuw, 2014). Eine besondere Relevanz haben zwei konservierte Histidine im aktiven Zentrum, die mit dem Schaden interagieren und ohne die keine Reparatur stattfindet (Maul et al., 2008; Hitomi et al., 2001). Die Spaltung des (6-4)-Photoproduktes ist wesentlich komplexer und dauert länger als die Reparatur eines CPD-Schadens, sie liegt im 10er-Nanosekundenbereich. Der entscheidende Schritt ist dabei der Protonentransfer vom ersten Histidin des aktiven Zentrums auf den (6-4)-Schaden. Dieser verhältnismäßig langsame Protonentransfer konkurriert mit dem wesentlich schneller ablaufenden Elektronenrücktransfer, weshalb (6-4)-Photolyasen weniger effizient als CPD-Photolyasen sind, bei denen das Verhältnis (Reparatur vs. Elektronenrücktransfer) umgekehrt ist. Die Protonenübertragung leitet die Spaltung des Dimers ein, die durch eine Umlagerung der Bindungen geschieht. Aufgrund des schnellen Elektronenrücktransfers relativ zur Protonentransferrate liegt die Quantenausbeute (Effizienz der Reparatur pro einfallendem Photon) von (6-4)-Photolyasen bei nur 10 % im Vergleich zu 90 % bei CPD-Photolyasen (Li et al., 2010). Der genaue Ablauf der Konvertierung des Dimers zurück in Monomere ist noch nicht vollständig geklärt. Während CPD-Photolyasen ihr Substrat durch Absorption eines einzigen Photons reparieren können, ist die Erfordernis von einem oder zwei Photonen für die Reparatur eines (6-4)-Schadens umstritten. Ebenso unklar ist, ob der Reparaturvorgang, analog zu der Entstehung des (6-4)-PP, über die Oxetan-Zwischenstufe abläuft (Faraji und Dreuw, 2014; Faraji et al., 2016; Yamamoto et al., 2017).

T(6-4)C- und T(6-4)T-Dimere werden mit gleicher Effizienz repariert, die Art der Bindung beider Varianten im aktiven Zentrum der (6-4)-Photolyasen ist ähnlich (Glas et al., 2009b). Die Reparatur von (6-4)-Dewar-Isomeren erfordert zunächst eine Umwandlung in das entsprechende (6-4)-PP. Diese Reaktion geschieht, wie die anschließende Reparatur, durch die (6-4)-Photolyasen selbst und erfordert eine Elektronenübertragung durch den FAD-Cofaktor (Glas et al., 2010). Die Umwandlung und Reparatur von T(6-4)T-Dewar-Isomeren verläuft dabei viel ineffizienter als die der T(6-4)C-Dewar-Isomere oder ist nicht möglich (Zhao et al., 1997; Glas et al., 2009b). Aufgrund der ineffizienten Reparatur von Dewar-Isomeren durch (6-4)-Photolyasen ist der bevorzugte Reparaturmechanismus dieser Schäden vermutlich die NER (Abschnitt 1.1.1) (Douki und Sage, 2016).

Abbildung 1.5 zeigt zusammenfassend den Ablauf der beiden Lichtreaktionen – Photoaktivierung und Photoreaktivierung (Photoreparatur) – durch Photolyasen.

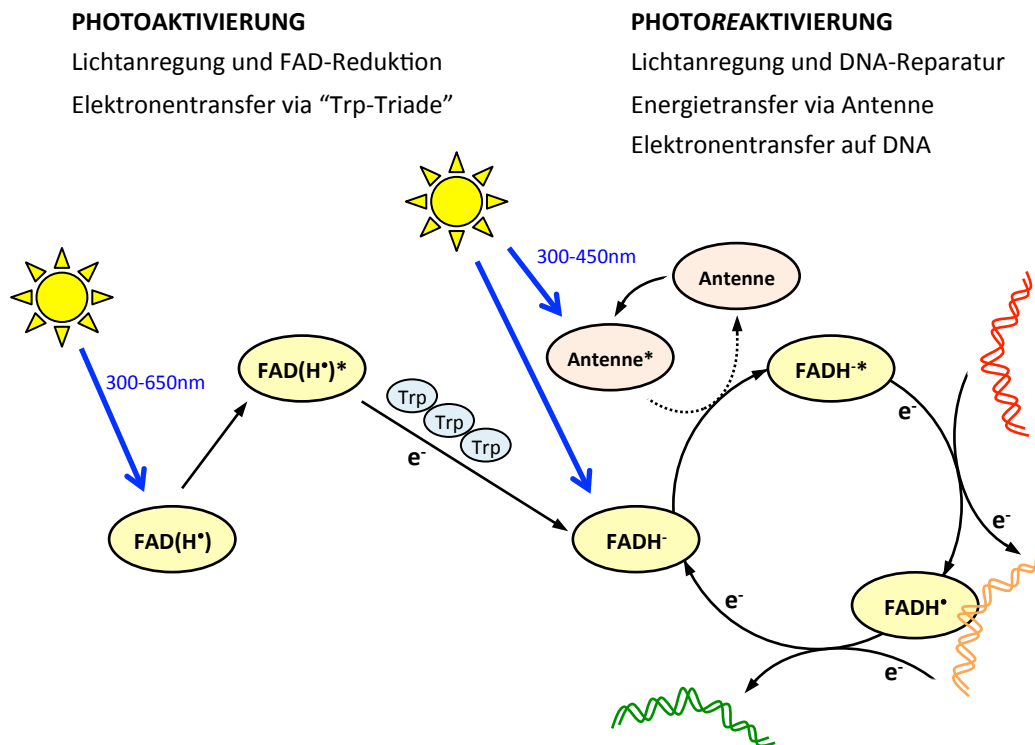


Abbildung 1.5: Lichtreaktionen der Photolyasen. Rot/Orange/Grün = geschädigte bis intakte DNA, gestrichelter Pfeil = Energietransfer, Trp = Tryptophan, FAD = Flavin-Adenin-Dinukleotid. Inspiriert durch Brettel und Byrdin (2010); Chaves et al. (2011); Weber (2005).

1.3 Cryptochrome

Photolyasen sind eng verwandt mit einer Gruppe von Blaulichtrezeptoren, den Cryptochromen, und bilden mit diesen die Proteinfamilie **CPF** (Cryptochrom/Photolyase-Familie) (Kavakli et al., 2017). Wie bei den Photolyasen waren Phänomene, die auf die Aktivität dieser Moleküle zurückzuführen sind, phänotypisch bereits lange vor deren Entdeckung bekannt. Die Reaktion von Pflanzen und anderen Organismen auf blaues Licht legte die Existenz eines Photorezeptors nahe. Sowohl aufgrund seiner Beschreibung in kryptogamen Pflanzen als auch aufgrund des „kryptischen“ (verborgenen) Charakters des zunächst unbekanntesten Photorezeptors setzte sich der Begriff Cryptochrom durch (Gressel, 1979). Der erste identifizierte Cryptochrom-Blaulicht-Photorezeptor war CRY1 aus *Arabidopsis thaliana*. In Pflanzen steuern Cryptochrome Vorgänge wie Hypokotylwachstum, Phototropismus und Stomataöffnung (Ahmad und Cashmore, 1993; Lin et al., 1995). Später wurden sie auch im Menschen (Hsu et al., 1996) und zahlreichen weiteren Organismen wie Insekten, Amphibien und anderen Säugetieren entdeckt, nicht jedoch in Archaeen. Cryptochrome in Tieren und Pflanzen vermitteln als Photorezeptoren die Regulation der Expression lichtabhängiger Gene und die Synchronisation der circadianen Uhr – somit kontrollieren sie täglich wiederkehrende, rhythmische Phänomene. In Tieren sind sie außerdem integraler Bestandteil der circadianen Uhr (Lin und Todo, 2005). Das erste bakterielle Cryptochrom wurde in *Synechocystis* entdeckt und eröffnete die Cry-DASH-Gruppe (Hitomi et al., 2000; Brudler et al., 2003), zu der auch nichtbakterielle Vertreter gehören. Später wurde für diese Gruppe jedoch auch eine für Photolyasen typische DNA-Reparatur beschrieben (Selby und Sancar, 2006) (Abschnitt 1.4). In Proteobakterien wurde des Weiteren eine neue Gruppe mit Cryptochrom- und Photolyase-Eigenschaften beschrieben (Hen-

drischk et al., 2009a; Zhang et al., 2013) (Abschnitte 1.5 und 1.6). Die Existenz klassischer Cryptochrome mit rein regulatorischer Funktion in Bakterien, wie sie in Pflanzen und Tieren beschrieben wurden, ist aufgrund der Nachweise einer DNA-Reparatur dieser bisher beschriebenen bakteriellen Cryptochrome noch nicht bekannt.

Cryptochrome besitzen eine N-terminale „*photolyase homology region*“ (PHR), die dem Aufbau und der Struktur der Photolyasen entspricht. Viele Vertreter haben darüber hinaus eine C-terminale Erweiterung, die in ihrer Größe stark variiert und der Signalweiterleitung durch Interaktion mit anderen Proteinen dient. Eine weitere zentrale Gemeinsamkeit der Photolyasen und Cryptochrome – neben der ähnlichen Primär- und Sekundärstruktur der PHR-Domäne – ist das U-förmig gebundene, konservierte FAD-Molekül als Cofaktor (Yang et al., 2000; Brautigam et al., 2004). Im Gegensatz zu Photolyasen sind die klassischen Cryptochrome der Pflanzen und Tiere jedoch nicht in der Lage, eine Photoreaktivierung zu bewirken. Die fehlende Fähigkeit zur DNA-Bindung und -Reparatur erklärt sich zum einen durch die Abwesenheit einer positiv geladenen Furche auf der Oberfläche der PHR-Domäne von Cryptochromen (Brautigam et al., 2004). Zum anderen liegt das FAD der Cryptochrome im aktiven „Signalzustand“ in der semichinoiden Form vor und nicht wie bei Photolyasen in der vollständig reduzierten Form (Bouly et al., 2007). Der Grund dafür ist das Vorhandensein eines Aspartats (bei pflanzlichen Cryptochromen) oder Cysteins (bei tierischen Cryptochromen) anstelle des bei Photolyasen und Cry-DASH konservierten Asparagins im aktiven Zentrum, das mit dem FAD in Wechselwirkung steht (Balland et al., 2009; Zoltowski et al., 2011; Klar et al., 2007). Die oben beschriebene lichtinduzierte Elektronenübertragung über drei konservierte Tryptophane („Trp-Triade“) zur Reduktion des FAD (Abschnitt 1.2.1) ist ebenfalls vorhanden, wie am Beispiel von Cryptochromen aus *Arabidopsis* und *Drosophila* gezeigt wurde (Giovani et al., 2003; Zoltowski et al., 2011). Cryptochrome durchlaufen somit eine von zwei Lichtreaktionen der Photolyasen, die Photoaktivierung durch Elektronenübertragung bis zum semichinoiden Zustand des FAD, nicht jedoch die Photoreaktivierung, also die Reparatur von DNA, für die der vollständig reduzierte Zustand nötig ist (Giovani et al., 2003). Das semichinoide FADH* kann durch Absorption von grünem Licht (500–600 nm) in den FADH⁻-Zustand überführt werden, der bei Cryptochromen neben dem oxidierten FAD jedoch ebenso einen inaktiven Zustand darstellt (Bouly et al., 2007). In der Pflanzenzelle liegt das FAD des Cryptochroms zu 90 % im oxidierten Zustand vor, zu 10 % halbreduziert und <1 % vollständig reduziert. Die Konzentration des halbreduzierten Zustandes ändert sich mit der Absorption von blauem Licht (Balland et al., 2009). Der Mechanismus der Signalvermittlung durch Cryptochrome ist weniger gut untersucht als der Reparaturmechanismus der Photolyasen, es ist jedoch bekannt, dass Prozesse wie Konformationsänderungen oder Phosphorylierung der C-terminalen Domäne eine Rolle spielen (Shalitin et al., 2002; Gao et al., 2013; Kondoh et al., 2011).

Anders als bei Photolyasen ist die Identität und Bindungsart von Antennenchromophoren weniger klar und teils widersprüchlich. Es wurde MTHF bei Cryptochromen aus *Arabidopsis* identifiziert, eine eindeutige Bindetasche fehlt jedoch (Malhotra et al., 1995; Yu et al., 2010). Im Cryptochrom aus *Drosophila* wurde neben FAD kein weiterer Chromophor gefunden (Zoltowski et al., 2011; Selby und Sancar, 2012). Bei dem Cryptochrom VcCry1 aus *Vibrio cholerae* wurde MTHF als Cofaktor identifiziert (Saxena et al., 2005), dieses Protein jedoch der im nächsten Abschnitt beschriebenen Cry-DASH-Gruppe zugeordnet, deren Mitglieder über eine Photolyaseaktivität verfügen (Selby und Sancar, 2006).

1.4 Cry-DASH und bifunktionelle Mitglieder

Die Gruppe der „DASH“-Cryptochrome (Cry-DASH) erhielt ihren Namen, um die Verwandtschaft des als erstes beschriebenen Mitglieds dieser Gruppe aus *Synechocystis* (sll1629) sowie einer in *Arabidopsis* gefundenen Sequenz dieses Clusters zu den bis dahin beschriebenen tierischen Cryptochromen aus *Drosophila* und *Homo* hervorzuheben, obwohl Cry-DASH selbst nicht in *Drosophila* oder dem Menschen vorkommt. Das Protein zeigte keine Photoreaktivierungsaktivität, jedoch DNA-Bindung und eine Beteiligung an der transkriptionellen Genregulation (Hitomi et al., 2000; Brudler et al., 2003). Cry-DASH-Vertreter wurden seitdem in weiteren Bakterienarten, Pilzen, Pflanzen und Tieren gefunden. Zunächst wurden keine Reparaturaktivitäten festgestellt und diese Proteine daher zu den Cryptochromen gezählt. Sie verfügen jedoch nicht, wie viele klassische Cryptochrome, über eine C-terminale Verlängerung (Lin und Todo, 2005), außerdem wurden bei manchen Vertretern auch Antennenchromophore wie bei den Photolyasen gefunden (Daiyasu et al., 2004; Worthington et al., 2003; Saxena et al., 2005; Pokorny et al., 2005; Castrillo et al., 2015). Nur kurze Zeit nach der Entdeckung wurde eine Reparatur von CPD-Schäden in einzelsträngiger DNA durch bakterielle, tierische und pflanzliche Mitglieder der Cry-DASH festgestellt und eine Umbenennung dieser Gruppe in ssDNA-Photolyasen vorgeschlagen (Selby und Sancar, 2006). Am Beispiel des DASH-Vertreters cry3 aus *Arabidopsis* wurde der Reparaturmechanismus von Cry-DASH-Proteinen aufgeklärt. Das Protein ist in der Lage, CPD-Schäden in doppelsträngiger DNA zu reparieren, wenn diese an der Stelle des Schadens als *loop*-Struktur und somit einzelsträngig vorliegt. Es fehlt vermutlich die Fähigkeit zum „*flipping-out*“ des Schadens aus doppelsträngiger DNA in das aktive Zentrum, wie es bei den klassischen CPD- und (6-4)-Photolyasen der Fall ist (Pokorny et al., 2008). Kürzlich wurde eine *in vitro* Reparaturaktivität von sowohl einzelsträngiger als auch doppelsträngiger DNA durch einen Cry-DASH-Vertreter aus dem Pilz *Phycomyces blakesleeanus* festgestellt, sowie dessen Fähigkeit zur *in vivo* Photoreaktivierung (Tagua et al., 2015). Ein Beitrag zur Photoreaktivierung wurde jedoch nicht für alle DASH-Vertreter nachgewiesen, wie das Beispiel des an regulatorischen Prozessen beteiligten DASH-Cryptochroms aus *Neurospora crassa* zeigt (Froehlich et al., 2010; Nsa et al., 2015). Für den DASH-Vertreter aus dem Pilz *Fusarium fujikuroi* wurde sowohl eine lichtabhängige Regulation von Sekundärstoffwechsel- und Entwicklungsprozessen als auch eine Reparaturaktivität gezeigt (Castrillo et al., 2013, 2015). Aufgrund der ursprünglichen Bezeichnung und der erst später hinzugekommenen Nachweise der Reparaturaktivität einiger Vertreter dieser Gruppe, werden sie oft weiterhin als Cry-DASH oder DASH-Cryptochrome bezeichnet, jedoch wird ebenso der Begriff ssDNA-Photolyase verwendet (Tagua et al., 2015; Öztürk et al., 2008).

Die ursprüngliche klare funktionelle Unterteilung der Photolyasen und Cryptochrome in reparierend bzw. regulierend hat sich im Laufe der letzten Jahre sukzessive gewandelt, denn neben der zunächst den Cryptochromen zugeordneten Cry-DASH-Gruppe und der darauf folgenden Identifizierung ihrer Photolyasefunktion, gibt es mittlerweile immer mehr Beispiele von Vertretern der CPF, die beide Funktionen ausüben. Für zwei Vertreter aus Algen wurde eine Beteiligung sowohl an der Regulation der circadianen Uhr als auch an der Reparatur von (6-4)-Schäden gezeigt (Coesel et al., 2009; Heijde et al., 2010). Eine (6-4)-Photolyase aus dem Pilz *Cercospora zea-maydis* reguliert die Expression anderer Faktoren, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind (Bluhm und Dunkle, 2008). Auch die Kombination aus CPD-Reparatur und Regulation der Genexpression wurde für Vertreter aus den Pilzen *Aspergillus nidulans* und *Trichoderma atroviride* beschrieben (Bayram et al., 2008; Berrocal-Tito et al., 2007) sowie

die Reparatur von (6-4)-Photoprodukten durch Cryptochrome aus *Trichoderma*-Arten (Guzmán-Moreno et al., 2014; García-Esquivel et al., 2016). Aufgrund ihrer kombinierten Eigenschaften stellen sogenannte *dual-function*-Vertreter ein evolutionäres Bindeglied zwischen Photolyasen und Cryptochromen dar und mit zunehmender Erkenntnis über weitere Beispiele lassen sich möglicherweise evolutionäre Lücken in der CPF schließen (Chaves et al., 2011; Coesel et al., 2009). Die Aufnahme des Cryptochroms CryB aus *R. sphaeroides* in die wachsende Liste der *dual-function*-Mitglieder ist Thematik der vorliegenden Arbeit. Im Folgenden wird auf CryB und die neue Gruppe der CryPro bzw. FeS-BCP eingegangen.

1.5 CryB aus *Rhodobacter sphaeroides*

CryB wurde 2007 erstmals als ein Mitglied der Cryptochrom/Photolyase-Familie aus dem photosynthetischen Bakterium *Rhodobacter sphaeroides* (Abschnitt 1.8) beschrieben und charakterisiert (Hendrischk et al., 2007, 2009a). RSP_3077 (*cryB*) ist eine von drei Gensequenzen in *R. sphaeroides*, die Mitglieder der CPF kodieren. RSP_2143 (*phrA*) wurde aufgrund seines Beitrags zur *in vivo* Photoreaktivierung nach UV-Bestrahlung als Photolyase identifiziert (Hendrischk et al., 2007). Auch für CryB wurde in der Studie eine eindeutige Beteiligung an der Photoreaktivierung festgestellt. PhrA zeigt 56 % Sequenzidentität zu der CPD-Photolyase aus *Rhodobacter capsulatus*, dessen Genom darüber hinaus kein weiteres CPF-Mitglied aufweist (Braatsch und Klug, 2004b). Der dritte Kandidat, RSP_1981, wurde aufgrund eines *frameshifts* und eines dadurch bedingten Verlustes des FAD-Cofaktors als funktionslos erachtet und nicht weiterführend charakterisiert (Hendrischk et al., 2007). Der Mechanismus, durch den CryB zum Überleben von UV-Licht beiträgt, war lange Zeit nicht bekannt, da zunächst weder die Reparatur von CPD- noch von (6-4)-Schäden *in vitro* nachgewiesen werden konnte und kein regulatorischer Einfluss auf die Expression der Photolyase PhrA beobachtet wurde (Geisselbrecht et al., 2012; Hendrischk et al., 2009a; Frühwirth, 2012). Stattdessen wurde ein für Cryptochrome typischer, regulatorischer Einfluss auf die Expression von Genen festgestellt, die Komponenten des photosynthetischen Apparates kodieren (Hendrischk et al., 2009a). Später wurde der Einfluss von CryB unter drei verschiedenen Bedingungen – mikroaerobes Wachstum, photooxidativer Stress und Blaulichteinfluss – auf eine Vielzahl von Genen festgestellt (Frühwirth et al., 2012). Die Interaktion von CryB mit dem Blaulichtrezeptor AppA, einem der Hauptregulatoren der Photosynthesegene in *R. sphaeroides* (Abschnitt 1.8), lieferte eine Erklärung für die Einflussnahme von CryB auf die Expression der Photosynthesegene (Metz et al., 2012a). CryB unterliegt einer RpoH_{II}-abhängigen Expression und wird somit unter Singulett-Sauerstoffstress (Abschnitt 1.12) induziert (Nuss et al., 2010).

Struktur und Aminosäurekonservierung weisen deutliche Unterschiede zu kanonischen Photolyasen und Cryptochromen auf, dennoch gibt es Gemeinsamkeiten bezüglich des grundlegenden Aufbaus. So verfügt auch CryB über eine C-terminale katalytische Domäne mit einer DNA-bindenden Furche und einem im aktiven Zentrum gebundenen FAD-Molekül. Abweichend von der bei den meisten Photolyasen und Cryptochromen konservierten Tryptophan-Triade für den Elektronentransfer zum FAD (Abschnitt 1.2.1), wird dies in CryB durch zwei Tryptophane und zwei Tyrosine übernommen. Neben dem CPF-typischen, hochkonservierten FAD-Cofaktor bindet CryB den ungewöhnlichen Antennenchromophor 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (DLZ, Abschnitt 1.2.2) in der N-terminalen Domäne sowie ein [4Fe4S]-Eisen-Schwefel-Cluster (Abschnitt 1.11). Letzteres ist zwischen einer C-terminal gelegenen dachförmigen Subdomäne und der katalytischen Domäne eingebettet. C- und N-terminale Domänen sind durch einen

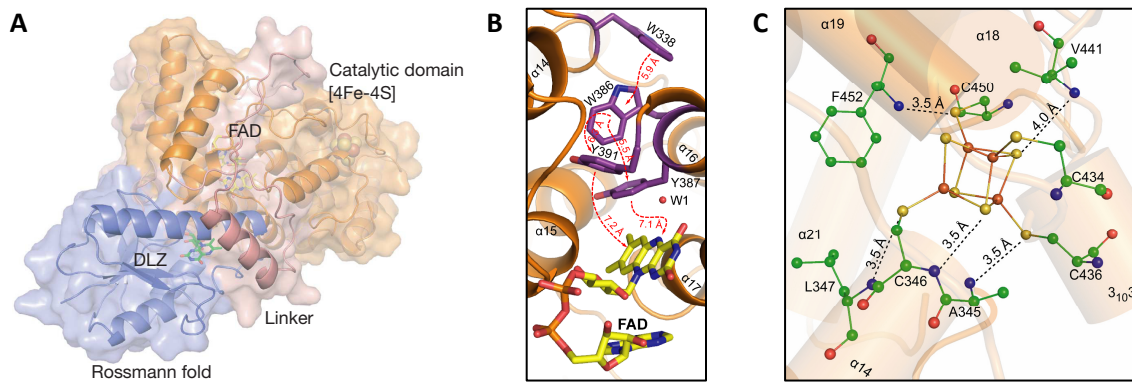


Abbildung 1.6: **A)** Struktur von CryB. **B)** „Trp-Diade“ zur FAD-Reduktion mit Beteiligung von zwei Tryptophanen und verzweigter Elektronentransferweg über zwei Tyrosine. **C)** Umgebung des [4Fe4S]-Clusters. Aus Geisselbrecht et al. (2012).

langen *linker* miteinander verbunden (Geisselbrecht et al., 2012) (Abbildung 1.6). Die Untersuchung der Cofaktoren und verschiedener Aminosäuren ist ein Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Aufgrund der regulatorischen Eigenschaften und des Fehlens der Reparaturaktivität wurde das Protein den Cryptochrom-Blaulichtrezeptoren zugeordnet. Im nächsten Abschnitt wird auf die Einordnung von CryB in der CPF eingegangen.

1.6 Evolution und Klassifizierung der CPF

Die Klassifizierung von Cryptochromen und Photolyasen in der CPF hat im Laufe der Zeit immer wieder Erweiterungen und neue Unterteilungen erfahren. Als die drei Hauptkategorien werden CPD-Photolyasen, (6-4)-Photolyasen und Cryptochrome unterschieden. Man geht davon aus, dass Photolyasen die Vorläufer der Cryptochrome sind und letztere im Laufe der Evolution ihre DNA-Reparaturaktivität verloren und stattdessen eine neue Funktion in der Signaltransduktion erworben haben (Chaves et al., 2011). Die klassischen Cryptochrome ohne Reparaturfunktion lassen sich in tierische und pflanzliche Cryptochrome unterteilen (Cashmore et al., 1999). Anhand ihrer Sequenz wurden CPD-Photolyasen zunächst in Klasse I und II unterteilt, wobei Klasse I in Mikroorganismen konserviert ist und Klasse II in höheren Eukaryoten. Beide Gruppen kommen jedoch in allen Domänen des Lebens vor (Yasui et al., 1994). Eine dritte Klasse wurde 2008 durch Öztürk et al. beschrieben. Sequenzen dieser Klasse III wurden in zahlreichen Bakterien gefunden und zunächst als die lang gesuchten bakteriellen Cryptochrome in Erwägung gezogen, da sie eine Schwestergruppe der pflanzlichen Cryptochrome bilden. Untersuchungen ergaben eine CPD-Photolyaseaktivität und somit die Definition einer dritten Untergruppe dieser Photolyasen. Demnach haben sich die pflanzlichen Cryptochrome aus CPD-III-Photolyasen entwickelt (Öztürk et al., 2008). PhrA aus *R. sphaeroides* findet sich in phylogenetischen Analysen in der Gruppe dieser CPD-III-Photolyasen wieder (Scheerer et al., 2015; darin als „RhospPIrA“ bezeichnet). Die bifunktionalen DASH-Cryptochrome stammen nach aktuellen phylogenetischen Untersuchungen ebenso von einem Vorläufer der CPD-Photolyasen ab, der zu den DASH- und pflanzlichen Cryptochromen sowie Klasse-I- bis III-CPD-Photolyasen führte (Chaves et al., 2011; Öztürk et al., 2008). Tierische Cryptochrome hingegen sind sehr viel näher verwandt mit den sich funktionell unterscheidenden (6-4)-Photolyasen als mit den

pflanzlichen Cryptochromen. Diese Beziehungen legen eine unabhängige Entstehung der pflanzlichen und tierischen Cryptochrome während der Evolution nahe (Cashmore et al., 1999).

Die Verteilung und Häufigkeit von Cryptochromen und Photolyasen in verschiedenen Organismen ist sehr unterschiedlich. So finden sich in *A. thaliana* zwei klassische Cryptochrome, ein Cry-DASH sowie eine (6-4)- und eine CPD-Photolyase. *D. melanogaster* enthält ebenso beide Photolyasetypen, jedoch nur ein Cryptochrom (Chaves et al., 2011). In plazentalen Säugetieren wie der Maus und dem Menschen gibt es jeweils zwei Cryptochrome, jedoch keine Photolyase (Kobayashi et al., 1998; Thompson und San-car, 2002). Der Modellorganismus *E. coli*, dessen CPD-Photolyase eine der am besten untersuchten ist, enthält keine (6-4)-Photolyase und kein Cryptochrom (Sancar und Sancar, 2006). *Synechocystis* sp. verfügt über eine CPD-Photolyase und ein DASH-Cryptochrom (Hitomi et al., 2000). Als ein Beispiel der Pilze besitzt *Ustilago maydis* zwei DASH-Cryptochrome, eine Klasse-I-CPD- und eine (6-4)-Photolyase (Brych et al., 2015). In Archaeen wurden bislang keine Cryptochrome gefunden, jedoch CPD-Photolyasen (Lin und Todo, 2005; Fujihashi et al., 2007; Kiontke et al., 2011).

Die neueste Untergruppe der CPF wurde durch das bakterielle Cryptochrom CryB aus *R. sphaeroides* eröffnet, für das ein regulatorischer Einfluss auf die Genexpression festgestellt werden konnte (Hendrischk et al., 2009a; Frühwirth et al., 2012) (Abschnitt 1.5). Ein weiteres Mitglied dieser Gruppe ist PhrB aus *Agrobacterium tumefaciens*, ein sehr nah verwandtes Homolog von CryB, für das eine (6-4)-Photolyaseaktivität festgestellt wurde. Dies ist das erste Beispiel einer Reparatur von (6-4)-Schäden durch ein bakterielles CPF-Mitglied (Oberpichler et al., 2011; Zhang et al., 2013). Mit der Kristallisation von CryB wurde die Gruppe der proteobakteriellen Cryptochrome (CryPro) definiert (Geisselbrecht et al., 2012) und mit der Beschreibung von PhrB die gleiche Gruppe als FeS-BCP (Eisen-Schwefel bakterielle Cryptochrome und Photolyasen) bezeichnet. Diese beiden Proteine sind die ersten charakterisierten Vertreter der neuen CryPro/FeS-BCP-Untergruppe, die sich von den bisherigen Gruppen der CPF phylogenetisch abgegrenzt. Sequenzen dieser Gruppe wurden in 345 Spezies gefunden, überwiegend in Proteobakterien, aber auch in Cyanobakterien und weiteren Bakterien sowie in wenigen Archaeen, nicht jedoch in Eukaryoten (Geisselbrecht et al., 2012). Die einzigartigen Kennzeichen der beiden bislang charakterisierten Vertreter sind der neuartige Antennenchromophor DLZ sowie das Eisen-Schwefel-Cluster als dritter Cofaktor. Letzteres stellt womöglich ein evolutionär frühes Merkmal der CPF dar (Abschnitt 1.11), das in den anderen Gruppen verloren ging (Zhang et al., 2013). Damit gibt es aktuell acht Untergruppen der CPF (Chaves et al., 2011; Tagua et al., 2015) (Abbildung 1.7). In dieser Arbeit wird die neueste Gruppe nach der Definition von Oberpichler et al. (2011) als FeS-BCP bezeichnet, da dieser Name sowohl „Cryptochrom“ als auch „Photolyase“ enthält. Nach der neuen Bezeichnung von *A. tumefaciens* als *A. fabrum* in Graf et al. (2015) wird PhrB als AfPhrB bezeichnet. Analog zu der CPD-III-Photolyase PhrA in *R. sphaeroides* gibt es auch in *A. fabrum* eine ebenso benannte CPD-III-Photolyase, AfPhrA (Oberpichler et al., 2011).

Die eindeutige Beteiligung von CryB an der Photoreaktivierung, die Entdeckung der (6-4)-Photolyaseaktivität seines Homologs AfPhrB sowie die zunehmenden Beispiele von *dual-function*-Mitgliedern aus der CPF, regten die erneute Erwägung einer möglichen Rolle von CryB als (6-4)-Photolyase an. Die Untersuchungen dazu sind ein zentraler Aspekt dieser Arbeit.

Beide Domänen kommen in Proteinen in *R. sphaeroides* vor. *RsLOV* besitzt keine *output*-Domäne, sondern ist lediglich um eine C-terminale α -Helix erweitert und gehört damit zu den „*short*“ LOV-Proteinen. Es bindet FMN als Cofaktor und unterliegt dem typischen Photozyklus von LOV-Proteinen (Hendrischk et al., 2009b). Ungeachtet der fehlenden *output*-Domäne ist *RsLOV* an der Regulation der Genexpression beteiligt, beispielsweise der Gene für Komponenten des Photosyntheseapparates, der photooxidativen Stressantwort, Chemotaxis und des Kohlenhydratstoffwechsels (Metz et al., 2012b).

R. sphaeroides besitzt drei BLUF-Domäne-Proteine (Metz et al., 2012a), von denen **AppA** das am besten untersuchte ist. Es wurde nach seiner Rolle bei der *activation of photopigment and puc expression* benannt (Gomelsky und Kaplan, 1995). Die Besonderheit von AppA ist die Wahrnehmung und Übermittlung von sowohl Redox- als auch Lichtsignalen in einem Protein (Braatsch et al., 2002). Diese Stimuli werden durch zwei verschiedene Domänen wahrgenommen: Die **FAD**-bindende BLUF-Domäne stellt den N-terminalen Bereich des Proteins dar, durch den die Blaulichtwahrnehmung stattfindet (Gomelsky und Kaplan, 1998; Gomelsky und Klug, 2002). Die C-terminale SCHIC-Domäne bindet einen Häm-Cofaktor und ist unabhängig vom FAD-Cofaktor für die Wahrnehmung von Redoxsignalen zuständig. Auf die Funktion von AppA als Antirepressor des transkriptionellen Repressors PpsR in der licht- und redoxabhängigen Regulation der Photosynthese wird in Abschnitt 1.10.1 eingegangen.

Einen nicht flavinbindenden Blaulichtrezeptor stellt das *photoactive yellow protein (PYP)* dar, das am besten im Schwefelpurpurbakterium *Ectothiorhodospira halophila* charakterisiert ist. Die Signaltransduktion erfolgt durch Blaulichtabsorption und eine *cis/trans*-Isomerisierung seines **p-Cumarsäure**-Cofaktors. Über die biologische Funktion ist wenig bekannt, möglicherweise spielt es eine Rolle bei der Phototaxis. PYP ist ausschließlich in Bakterien zu finden (Braatsch und Klug, 2004a), auch *R. sphaeroides* verfügt über einen Vertreter der PYP (Haker et al., 2000).

Rhodopsine mit **Retinal** als Chromophor sind vor allem für visuelle Prozesse bei Tieren und Menschen bekannt, sie zeigen jedoch keinerlei Sequenzhomologie zu den mikrobiellen Rhodopsinen (Ernst et al., 2014). Die verschiedenen bakteriellen und archaealen Rhodopsine (Bacteriorhodopsin, Halorhodopsin, sensorisches Rhodopsin und Proteorhodopsin), binden ebenfalls Retinal (Vitamin-A-Aldehyd) und fungieren oft als membrangebundene Protonenpumpen oder spielen eine Rolle bei der Chemotaxis, vor allem bei marinen Bakterien und Archaeen (Spudich und Bogomolni, 1984; Wickstrand et al., 2015). Die meisten Rhodopsine absorbieren Licht zwischen 400 und 700 nm und damit nicht nur im blauen Bereich, wobei die blau- und grünabsorbierenden Vertreter die wichtigste Rolle unter den mikrobiellen Rhodopsinen spielen (Ernst et al., 2014).

Neben den zahlreichen im blauen Bereich absorbierenden Photorezeptoren gibt es auch in Bakterien die ursprünglich aus Pflanzen bekannten **rotlichtabsorbierenden Phytochrome**. Pflanzliche Phytochrome binden kovalent das lineare Tetrapyrrol Phytochromobilin als Chromophor, das durch Absorption von rotem und dunkelrotem Licht zwischen der P_R (*red*) und P_{FR} (*far red*) Form durch *Z-E*-Isomerisierung reversibel konvertiert werden kann. Dadurch wird meist die Aktivität einer Histidinkinasedomäne gesteuert. Phytochrome regulieren die pflanzliche Photomorphogenese, das Wachstum und die Entwicklung (Rockwell et al., 2006). **Bacteriophytochrome** binden **Biliverdin** als Chromophor. *R. sphaeroides* verfügt über zwei Bacteriophytochrome, BphG1 und BphG2, die, anders als andere Phytochrome, zwei Output-Domänen mit verschiedenen Funktionen besitzen (Tarutina et al., 2006).

1.8 *Rhodobacter sphaeroides*

Rhodobacter sphaeroides kommt in der Natur in verschiedenen Lebensräumen vor, beispielsweise in stehenden Gewässern, Sedimenten oder feuchten Böden mit einem hohen Gehalt an organischen Substanzen. Es gehört zu den Nichtschwefelpurpurbakterien der gram-negativen α -3-Proteobakterien. Die meisten Arten kommen in Süßwasser vor, manche sind aber auch in marinen Sedimenten zu finden. *R. sphaeroides* ist fakultativ anaerob und kann durch anoxygene Photosynthese sowohl photoheterotroph als auch photoautotroph Energie gewinnen. Es betreibt außerdem aerobe Atmung mit Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor oder anaerobe Atmung unter Verwendung alternativer Elektronenakzeptoren wie Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Trimethylamin-N-Oxid (TMAO) sowie Fermentation, wenn keine Elektronenakzeptoren vorhanden sind. Sowohl bei phototrophem als auch chemotrophem Wachstum kann außerdem N_2 fixiert werden (Imhoff, 2006). Das Genom von *R. sphaeroides* besteht aus zwei zirkulären Chromosomen und fünf Plasmiden mit einer Gesamtgröße von 4,6 kb (Mackenzie et al., 2007). Die nicht obligatorische Phototrophie macht Bakterien wie *R. sphaeroides* zu beliebten Modellorganismen für die Untersuchung des Photosyntheseapparates, da dessen Modifikation aufgrund der Fähigkeit der Bakterien zu einer Reihe anderer Energiegewinnungsmöglichkeiten keine letalen Auswirkungen hat. Viele Erkenntnisse zur bakteriellen Photosynthese stammen ebenso aus dem engen Verwandten *Rhodobacter capsulatus* (Gregor und Klug, 1999). Die Ausbildung einer intracytoplasmatischen Membran (ICM) bei photosynthetischem Wachstum bietet aufgrund der stark vergrößerten Membranoberfläche das Potenzial, *R. sphaeroides* als Werkzeug für die heterologe Expression von Membranproteinen zu nutzen (Erbakan et al., 2015).

1.9 Die anoxygene Photosynthese der Prokaryoten

Die Photosynthese (PS) dient der Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie und einem damit verbundenen Aufbau von Biomasse durch die Fixierung von CO_2 . Die einzigen Prokaryoten, die wie Pflanzen und Algen eine oxygene (Sauerstoff produzierende) Photosynthese betreiben, sind die Cyanobakterien. Eine anoxygene Photosynthese findet sich bei den Grünen Schwefelbakterien (Phylum Chlorobi), Grünen Nichtschwefelbakterien (Phylum Chloroflexi), Heliobacteria (Phylum Firmicutes) sowie bei den Purpurbakterien (Phylum Proteobacteria), zu denen *Rhodobacter* gehört (Bryant und Frigaard, 2006).

Ein Unterschied zwischen oxygener und anoxygener Photosynthese ist die Quelle des Reduktionsmittels (Elektronendonator), das verwendet wird, um einen Elektronenfluss zu generieren. Erstere gewinnt Elektronen aus der Spaltung von Wasser, wobei Sauerstoff entsteht. Der finale Elektronenakzeptor nach einem linearen Elektronentransport ist $NAD(P)^+$. Bei der anoxygenen Photosynthese werden H_2S , H_2 oder andere reduzierte, anorganische oder organische Moleküle oxidiert. Der Elektronenakzeptor ist der Chinonpool, die Elektronen werden in einem zyklischen Transport über Bakteriophäophytin, Chinone, den Cytochrom bc_1 -Komplex und Cytochrom c_2 wieder an das Reaktionszentrum zurücktransportiert (Bryant und Frigaard, 2006; Zeilstra-Ryalls und Kaplan, 2004). Der photosynthetische zyklische Elektronentransport teilt sich die Komponenten Cyt bc_1 und Cyt c_2 mit dem Elektronentransport der Atmungskette (Verméglio und Joliet, 1999).

Der Photosyntheseapparat in *R. sphaeroides* wird an der intracytoplasmatischen Membran (ICM) aufgebaut. Er besteht aus einem Reaktionszentrum (RC), das von einem Lichtsammelkomplex des Typs LHI umgeben ist und mit diesem ein RC-LHI-Dimer bildet. Dieser Komplex ist wiederum von LHII-

Komplexen umgeben, die die Lichtsammelkapazität um ein Vielfaches erhöhen. RC und LH sind Pigment-Protein-Komplexe, die Bakteriochlorophyll a und Carotinoide auf verschiedene Weise gebunden haben. LHI wird auch als B875, und LHII als B800–850 bezeichnet, aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsmaxima ihrer Bakteriochlorophyllmoleküle. Die absorbierte Anregungsenergie wird von den LH-Komplexen zum RC weitergeleitet, wo eine Ladungstrennung im Chlorophyllpaar („*special pair*“) des RC stattfindet (Kiley und Kaplan, 1988; Hu et al., 1998; Zeilstra-Ryalls und Kaplan, 2004).

In *R. sphaeroides* sind die für die Photosynthese benötigten Komponenten in einem Photosynthese-Gencluster angeordnet. Dieses umfasst Gene und Operons für die Bakteriochlorophyll- und Carotinoid-Synthese, das Reaktionszentrum (**RC**) sowie den Lichtsammelkomplex **LHI**. Dabei ist das **puf-Operon** (*photosynthesis unit fixed*; Blankenship, 2014) mit den Genen *pufQKBALMX* von besonderer Bedeutung für die strukturellen Elemente des Photosyntheseapparates. Die Untereinheiten von LHI werden durch die Gene *pufA* und *pufB* kodiert, die des RC durch *pufL* und *pufM* sowie durch ein weiteres Gen, *puhA*. Durch unterschiedliche Halbwertszeiten einzelner Abschnitte des polycistronischen *puf*-Transkriptes wird die Produktion der individuell benötigten Mengen von LHI und RC reguliert (Zeilstra-Ryalls und Kaplan, 2004; Rauhut und Klug, 1999). Die Komponenten des **LHII** hingegen werden abseits des Clusters durch das **puc1-Operon** mit den Genen *pucBAC* kodiert. Das *puc2*-Operon kodiert eine weitere Kopie von *pucBA*, wobei *puc1* funktionell dominant ist (Choudhary und Kaplan, 2000; Zeng et al., 2003). Das Verhältnis des *puf*-kodierten LHI zu RC ist mit 15:1 unabhängig von der Lichtintensität konstant (*fixed*). Das Verhältnis von LHII:RC hingegen ist variabel und ändert sich in Abhängigkeit von der Lichtintensität (Aagaard und Sistro, 1972).

1.10 Die Regulation von Photosyntheseogenen in *Rhodobacter* durch Licht und Sauerstoff

Die Regulation der Bildung des photosynthetischen Apparates von *Rhodobacter* unterliegt zwei Umwelteinflüssen: Sauerstoffgehalt und Lichtintensität. Wenn Sauerstoff verfügbar ist, ziehen die Bakterien die aerobe Respiration zur Energiegewinnung vor. In Abwesenheit von Sauerstoff sind anoxygene Photosynthese, anaerobe Atmung oder Fermentation möglich. Da die Ausbildung des photosynthetischen Apparates zum einen energieaufwändig und daher nur dann sinnvoll ist, wenn kein oder wenig Sauerstoff verfügbar ist, und zum anderen die zeitgleiche Anwesenheit von photosynthetischen Pigmenten und Sauerstoff zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies führen kann (Abschnitt 1.12), unterliegt sie einer komplexen Regulation durch Licht und Sauerstoff (Gregor und Klug, 1999). Diese Regulation geschieht durch das Zusammenspiel verschiedener Redox- und Blaulichtsensoren. Im Falle von *R. sphaeroides* hängt die Reaktion auf Blaulicht mit der Verfügbarkeit von Sauerstoff in Bezug auf die Expression des Photosyntheseapparates folgendermaßen zusammen: Bei sehr geringem Sauerstoffgehalt hat Blaulicht keinen Einfluss auf die Expression der Photosynthese-Operons *puc* und *puf*, bewirkt unter anaeroben Bedingungen jedoch eine erhöhte Expression. Unter semiaeroben Bedingungen und gleichzeitigem Blaulichteinfluss wird die Expression von *puc* und *puf* gehemmt (Braatsch et al., 2002). Diesem Zusammenhang liegt das Repressor/Antirepressor-System PpsR/AppA zugrunde.

1.10.1 Das PpsR/AppA-Repressor/Antirepressor-System

Der transkriptionelle **Repressor PpsR** (*photopigment suppression*; Penfold und Pemberton, 1994) verhindert unter aeroben Bedingungen die Expression einer Vielzahl von Genen, darunter eines Teils der photosynthetischen Gene. Sauerstoff bewirkt die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen. In diesem Zustand ist PpsR als Repressor aktiv und bindet als Tetramer an eine Konsensussequenz in den Promotorregionen bestimmter Gene und Operons. Unter anaeroben Bedingungen hingegen befindet sich das Protein im reduzierten Zustand und die Affinität zur DNA ist geringer. Die PpsR-DNA-Bindung wird außerdem durch den **Antirepressor AppA** (Abschnitt 1.7) auf zwei Arten durch Protein-Protein-Interaktion beeinflusst (Abbildung 1.8). Zum einen erfolgt eine Reduktion der Disulfidbrücke in PpsR durch die C-terminale cysteinreiche Region von AppA, wenn letztere reduziert vorliegt. Zum anderen bildet AppA in Abhängigkeit von Licht einen stabilen AppA-PpsR₂-Komplex und verhindert die DNA-Bindung von PpsR. Beides bewirkt somit eine Aufhebung der inhibierenden Wirkung von PpsR. Bei hohem Sauerstoffgehalt liegt AppA sowohl im Licht als auch im Dunkeln im inaktiven Zustand vor, somit ist der PpsR-Repressor aktiv, es kommt nicht zur Genexpression. Bei sinkendem Sauerstoffgehalt (semiaerob) nimmt AppA im Dunkeln eine aktive Konformation an und bewirkt die Reduktion von PpsR und dessen Bindung. Blaulicht macht diesen Vorgang jedoch unter aeroben und semiaeroben Bedingungen durch Anregung von AppA unwirksam, da die Absorption durch dessen FAD-Cofaktor und der darauf folgende Photozyklus die Bildung des AppA-PpsR₂-Komplexes verhindert. So findet eine lichtabhängige Repression bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sauerstoff statt. Bei sehr geringem Sauerstoffgehalt ist AppA sowohl im Dunkeln als auch unter Lichteinfluss aktiv und bindet PpsR, die Genexpression ist aktiv (Masuda und Bauer, 2002; Braatsch und Klug, 2004a). Neuere Studien zeigen, dass PpsR auch im Komplex mit AppA an DNA bindet und Licht nur einen geringen Einfluss auf die AppA-PpsR₂-Komplexbildung hat. Lichtabsorption durch gebundenes AppA beeinflusst jedoch die Struktur des Komplexes und die Aktivität von PpsR (Winkler et al., 2013).

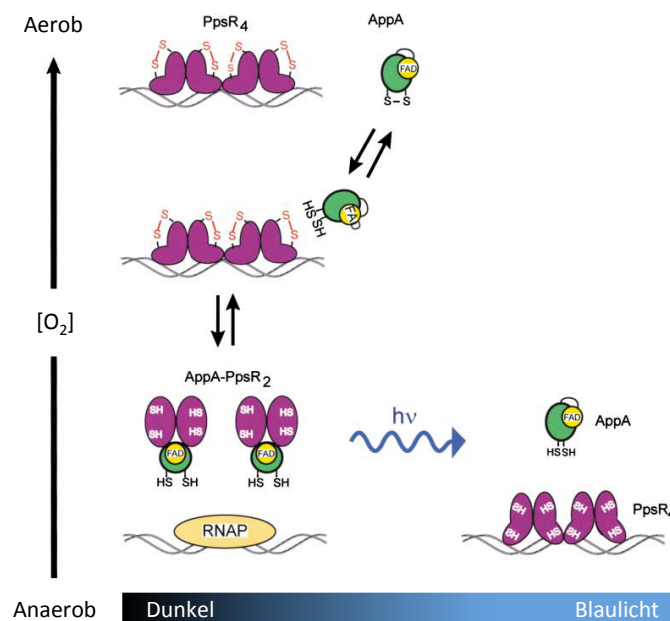


Abbildung 1.8: Das Zusammenspiel von AppA und PpsR bei der Expression photosynthetischer Gene in Abhängigkeit von Licht und Sauerstoff. Aus Masuda und Bauer (2002), modifiziert.

Zwischen der **BLUF**-Domäne (Abschnitt 1.7) und der C-terminalen cysteinreichen Region von AppA befindet sich die Sauerstoffsensordomäne, die für die Redoxregulation zuständig ist. Sie bindet einen Häm-Cofaktor, weshalb die Domäne *sensor containing heme instead of cobalamin* (**SCHIC**) heißt. Der Name kommt von der Ähnlichkeit dieser Domäne zu Cobalamin-(Vitamin-B₁₂-)Bindedomänen (Moskvin et al., 2007; Han et al., 2007). Die Präferenz zur Bindung von Häm anstelle von Cobalamin kommt aufgrund eines Histidins zustande, das in der Cobalamin-Bindedomäne an anderer Stelle ist (Yin et al., 2013; Vermeulen und Bauer, 2015). AppA bindet Häm sowohl unter anaeroben als auch aeroben Bedingungen (Yin et al., 2013). Die BLUF-Domäne von AppA beeinflusst die Interaktion mit PpsR in Abhängigkeit von Licht (Winkler et al., 2013) und außerdem die Häm-Bindung der SCHIC-Domäne in Abhängigkeit von Licht, im Dunkeln ist die Bindung stärker (Yin et al., 2013). PpsR bindet zudem ebenfalls einen Häm-Cofaktor durch Interaktion mit einem Cystein und einem Histidin in seiner DNA-Bindedomäne. Die Bindungsstärke entspricht der von Häm-Sensoren wie beispielsweise Irr und nicht der festen Bindung in Häm-Proteinen, die Funktionen wie Elektronentransfer ausüben. Somit besitzt PpsR neben der Funktion als Redoxsensor eine direkte Funktion als Häm-Sensor. Die Häm-Bindung beeinflusst die DNA-Bindung negativ und bewirkt eine erhöhte Transkription eines Teils der PpsR-regulierten Gene. Dies ermöglicht eine schnelle Reaktion zur Feinabstimmung von Häm, Bakteriochlorophyll und Photosystem-Apoproteinen, um einen Überschuss an freien toxischen Tetrapyrrolen zu vermeiden (Yin et al., 2012). Zum Regulon von PpsR gehören Gene für die Bakteriochlorophyll- und Carotinoidsynthese, die im Photosynthese-Gencluster liegen, sowie die Gene *hemC* und *hemE* (Tetrapyrrolbiosynthese) und die *puc1*- und *puc2*-Operons außerhalb dieses Clusters. Die Promotorregionen von *puf* und *puhA*, die innerhalb des Photosynthese-Genclusters liegen, enthalten keine PpsR-Bindestellen, werden aber indirekt ebenfalls durch PpsR reguliert (Moskvin et al., 2005). Das Homolog von PpsR in *R. capsulatus* ist CrtJ, ein Homolog von AppA gibt es in dieser Spezies nicht (Braatsch et al., 2002).

Neben AppA beeinflusst ein weiteres, erst kürzlich charakterisiertes Protein, **PpaA** (*photopigment and puc activation*) in *R. sphaeroides* bzw. **AerR** (*aerobic repressor*) in *R. capsulatus* (Dong et al., 2002; Gomelsky et al., 2003), ebenso wie AppA als **Antirepressor** die Aktivität von PpsR bzw. CrtJ. Beide ähneln der SCHIC-Domäne von AppA, binden jedoch Hydroxylcobalamin als Cofaktor. Der Cobalamin-Cofaktor ist dabei unerlässlich für die Antirepressorwirkung. Somit interagiert PpsR mit zwei strukturell verwandten Regulatoren, PpaA und AppA, die Cobalamin bzw. Häm als Cofaktoren binden (Cheng et al., 2014; Vermeulen und Bauer, 2015). Zudem wird die Expression von *ppaA* direkt durch PpsR unter aeroben Bedingungen negativ reguliert, bei sinkendem Sauerstoffgehalt steigt die *ppaA*-Expression. Es wurde kein DNA-Bindemotiv in PpaA gefunden. Der Effekt von PpaA ist moderat im Vergleich zu den Systemen PpsR/AppA, PrrBA und FnrL (s.u.) (Gomelsky et al., 2003). PpaA ist in der Lage, einen Knockout von AppA in Bezug auf die Pigmentierung vollständig zu kompensieren. Seine Aktivität ist jedoch im Normalfall vermutlich durch die von AppA überlagert (Vermeulen und Bauer, 2015). Der Effekt von PpaA auf die Genexpression geschieht unter aeroben Bedingungen und äußert sich scheinbar aktivierend auf die Photopigmentproduktion und *puc*-Expression. Das Homolog AerR hingegen agiert als aerober Repressor eines Teils der PS-Gene (Dong et al., 2002).

Durch die Interaktion von **CryB** (Abschnitt 1.5) mit **AppA** wird die Aktivität von PpsR auf einem weiteren, lichtabhängigen Weg reguliert. Durch diese Interaktion verringert CryB die Affinität von AppA zu PpsR und trägt zur Repression der Photosynthesegene bei (Metz et al., 2012a). Die Interaktion von AppA und CryB ist auch Thema der vorliegenden Arbeit.

1.10.2 Das PrrBA-Zweikomponentensystem

Unter **anaeroben Bedingungen** wird die Aktivierung der Photosynthese-Genexpression durch das **PrrA/PrrB-Zweikomponentensystem** in *R. sphaeroides* dominiert. Es entspricht dem RegA/RegB-System aus *R. capsulatus* (Braatsch und Klug, 2004a). Im Gegensatz zur negativen Regulation durch den Repressor PpsR bei hohem Sauerstoffgehalt, geschieht unter anaeroben Bedingungen eine positive Regulation durch den Aktivator PrrA (Eraso und Kaplan, 1994), der durch das zugehörige PrrB aktiviert wird. PrrB ist eine Sensor-Histidinkinase, die die Intensität des Elektronenflusses durch die Cytochrom *cbb₃*-Oxidase der Atmungskette als **Redoxsignal** wahrnimmt (Oh und Kaplan, 2000). Bei geringer Atmungsaktivität durch Sauerstoffmangel und somit geringem Elektronenfluss durch die *cbb₃*-Oxidase wird PrrB autophosphoryliert und aktiviert seinen Antwortregulator PrrA durch Übertragung einer Phosphatgruppe. Der phosphorylierte Transkriptionsfaktor PrrA aktiviert die Expression von Photosyntheseenen. Bei hohem Sauerstoffgehalt überwiegt die Phosphataseaktivität von PrrB und bewirkt die Dephosphorylierung von PrrA. Dadurch ist PrrA inaktiv und somit auch die Expressionsaktivierung durch dieses System (Oh et al., 2001; Happ et al., 2005). Zum Regulon von PrrA gehören ca. 34 Operons, die vorwiegend Photosynthese- und Elektronentransportkomponenten kodieren (Imam et al., 2014).

1.10.3 Weitere Systeme

Ein dritter globaler Regulator, der wie PrrA für die Aktivierung der PS-Gene während des anaeroben Metabolismus relevant ist, ist der **Transkriptionsfaktor FnrL** (Zeilstra-Ryalls und Kaplan, 1998). FnrL ist ein **Redoxsensor** der CRP/FNR-Regulatorfamilie (*cAMP receptor proteins / fumarate nitrate reductase regulator*) und bindet, wie sein Homolog FNR aus *E. coli*, ein sauerstoffsensitives [4Fe4S]-Cluster (Dufour et al., 2010; Körner et al., 2003). FnrL ist unerlässlich für das photosynthetische Wachstum und das Wachstum durch anaerobe Atmung (Zeilstra-Ryalls und Kaplan, 1995). Die Funktionsweise der direkten Sauerstoffwahrnehmung durch das FeS-Cluster ist am Beispiel von FNR aus *E. coli* bekannt. Sauerstoff konvertiert das [4Fe4S]- zu einem [2Fe2S]-Cluster. Bei weiter steigender Sauerstoffkonzentration zerfällt auch das [2Fe2S]-Cluster. Unter anaeroben Bedingungen liegt somit die [4Fe4S]-Form vor, welche eine Dimerisierung des Proteins begünstigt. In diesem dimeren Zustand ist FNR aktiv und in der Lage, spezifisch an eine DNA-Konsensussequenz zu binden (Khoroshilova et al., 1997; Kiley und Beinert, 1998). FNR aus *E. coli* und FnrL aus *R. sphaeroides* agieren sowohl als Transkriptionsaktivatoren als auch -repressoren (Spiro und Guest, 1990; Dufour et al., 2010). Zum Regulon von FnrL gehören neben Genen der Photosynthese unter anderem auch solche des Eisenstoffwechsels, Elektronentransportes, Stickstoffmetabolismus oder der anaeroben Atmung sowie kleine RNAs (sRNAs), wie beispielsweise PcrZ (s.u.), und es überschneidet sich zum Teil mit dem von PrrA (Dufour et al., 2010; Imam et al., 2014).

Neben FnrL sind auch **Thioredoxine** als eine weitere Gruppe von **Redoxsensoren** sowohl in *R. sphaeroides* als auch *R. capsulatus* unter anderem an der Regulation des photosynthetischen Apparates beteiligt. Neben diversen zellulären Funktionen bewirken sie durch Interaktion mit Zielmolekülen, beispielsweise mit der DNA-Gyrase, die Genregulation auf transkriptioneller Ebene (Zeller und Klug, 2006).

Die Expression der Photosynthesegene wird in *R. sphaeroides* nicht nur durch Protein-Transkriptionsfaktoren und deren Interaktionen mit Regulatorproteinen reguliert, sondern auch durch die kleine **nichtkodierenden RNA** (sRNA) **PcrZ** (*photosynthesis control RNA Z*) auf translationeller Ebene. PcrZ bindet in *trans* an bestimmte Ziel-mRNAs, die meisten davon aus dem photosynthetischen Gencluster, und

verhindert deren Translation, wahrscheinlich durch Einflussnahme auf die mRNA-Stabilität. Interessanterweise wird die Expression von PcrZ sowohl durch PrrA als auch durch FnrL aktiviert, welche beide Aktivatoren der PS-Gene unter anaeroben Bedingungen sind. Eine Induktion von PcrZ durch PrrA geschieht außerdem auch unter aeroben Bedingungen. PcrZ befindet sich unter direkter Kontrolle eines PrrA-abhängigen Promotors, die Regulation durch FnrL hingegen erfolgt auf bislang unbekanntem Weg. PcrZ wirkt der transkriptionellen Aktivierung der PS-Gene durch PrrA und FnrL durch direkte translationelle Repression der entsprechenden mRNAs entgegen. Ein weiteres Ziel von PcrZ ist die mRNA von *appA* und die Hemmung ihrer Translation, was eine Verstärkung der Repressorwirkung von PpsR bewirkt. Somit arbeiten die verschiedenen Systeme scheinbar gegeneinander, erreichen dabei jedoch eine ausgeklügelte Feinregulation durch PcrZ. Zu den von PcrZ negativ regulierten Genen gehören die *puc*- und *puf*-Operons, Gene für die Chlorophyll- und Carotinoidsynthese, für Cytochrome des zyklischen photosynthetischen Elektronentransportes sowie für verschiedene Transkriptionsfaktoren (Mank et al., 2012).

Aktuelle Studien entdeckten außerdem die bislang nicht charakterisierten Transkriptionsfaktoren **CrpK** (*cAMP receptor proteins*; RSP_2572) und **MppG** (*modulator of photopigment genes*; RSP_2888) in *R. sphaeroides*. Sie kontrollieren die Expression einiger Operons, die photosyntheserelevante Komponenten kodieren und erweitern somit das bislang bekannte Netzwerk an Regulatoren. CrpK bindet an ähnliche Promotorsequenzen wie FnrL und gehört wie dieser zur CRP/FNR-Familie. Sein Regulon überschneidet sich mit dem von FnrL, zu den Zielgenen gehören beispielsweise Gene der Chlorophyllsynthese oder des Eisenmetabolismus. Die Transkription von *mppG* wird bei photosynthetischem Wachstum direkt durch PrrA induziert. MppG agiert jedoch als transkriptioneller Repressor von unter anderem Photosynthese- und Photopigmentgenen, also als Gegenspieler zu seinem und dem Photosynthese-Aktivator PrrA, was darauf hindeutet, dass er eine ähnliche Rolle wie PcrZ in der Feinregulation der Photosynthesegene haben könnte (Imam et al., 2014).

1.10.4 Zusammenspiel

Die licht- und sauerstoffabhängige Ausprägung des PS-Apparates erfordert ein abgestimmtes Zusammenspiel der diversen beschriebenen Systeme in einem koordinierten regulatorischen Netzwerk. Die sauerstoffsensitiven Systeme basieren auf der Aktivierung der Photosynthesegene unter anaeroben Bedingungen (PrrA und FnrL) sowie der Hemmung unter aeroben Bedingungen (PpsR). Vor allem die beiden Systeme PrrBA und PpsR/AppA sind gut untersucht; sie stehen miteinander in Wechselwirkung, sind jedoch bei unterschiedlichen Bedingungen relevant (Jäger et al., 2007; Happ et al., 2005; Moskvina et al., 2005). PpsR ist zudem primär für die Regulation der PS-Gene zuständig, während PrrBA und FnrL globale Regulatorsysteme für weitere zelluläre Vorgänge darstellen. Oft findet eine gegenseitige Aktivierung oder Hemmung der Expression anderer Regulatoren des Netzwerkes auf Transkriptions- oder Translationsebene statt, beispielsweise die Hemmung der *ppaA*-Expression durch PcrZ oder PpsR (Mank et al., 2012; Gomelsky et al., 2003). Generell findet auch eine Überschneidung der Regulons verschiedener Systeme statt (Gomelsky et al., 2008; Imam et al., 2014).

1.11 Eisen-Schwefel-Cluster in Proteinen und Eisenmetabolismus

Eisen-Schwefel-Cluster (FeS-Cluster) als Cofaktoren von Proteinen sind ein evolutionär antikes Merkmal, das auf die Zeit zurück geht, bevor Sauerstoff auf der Erde vorhanden war. Die meisten FeS-Cluster bestehen aus zwei bis vier Eisenatomen, die durch jeweils vier Schwefelatome von Aminosäureseitenketten und anorganischen Sulfidmolekülen gebunden werden. Cystein ist die mit Abstand am häufigsten verwendete Aminosäure zur Bindung der Eisenatome, manchmal werden sie auch durch alternative Aminosäuren gebunden, wie Histidin, Aspartat oder Arginin (Imlay, 2006). Eine Hauptaufgabe von FeS-Clustern ist die Übertragung von Elektronen. Diese kommt vor allem in photosynthetischen und respiratorischen Elektronentransportketten sowie in weiteren Redoxenzymen vor. **Ferredoxine** sind eine der wichtigsten Gruppen von universellen Elektronenüberträgern, sie fungieren darüber hinaus auch als Eisenspeicher. Die meisten FeS-Cluster sind Ein-Elektron-Überträger, mit Ausnahme des [8Fe7S]-Clusters von Nitrogenasen, das in der Lage ist, zwei Elektronen zu übertragen (Johnson et al., 2005). In manchen Enzymen sind FeS-Cluster Teil des aktiven Zentrums und an der Substratbindung und Aktivierung des Enzyms beteiligt. Ein Beispiel ist die Aconitase, deren Cluster zwischen [3Fe4S] und der aktiven Form [4Fe4S] wechseln kann und als De-/Hydratase die Isomerisierung von Citrat katalysiert (Beinert et al., 1996). Auch das [4Fe4S]-Cluster des DNA-Reparaturenzyms MutY aus *E. coli* wird für die spezifische Erkennung des DNA-Substrates und für die Glykosylaseaktivität benötigt (Porello et al., 1998). Im Gegensatz dazu stellt das redoxinaktive FeS-Cluster der ähnlichen und ebenfalls an der DNA-Reparatur beteiligten Endonuklease III in dieser ein strukturelles Element dar. Diese Rolle von FeS-Clustern bei der Struktur und Stabilität kommt in FeS-Proteinen häufig vor (Johnson et al., 2005). Ein weiteres großes Aufgabenfeld von FeS-Proteinen ist die Regulation der Genexpression. Sie ist anhand der **Transkriptionsfaktoren FNR** (Abschnitt 1.10.3), **IscR** und **SoxR** in *E. coli* gut untersucht, diese Systeme sind in Bakterien weit verbreitet (Kiley und Beinert, 1998, 2003). Die FeS-Cluster dienen regulatorischen Proteinen als Sensoren des Sauerstoffgehaltes, wodurch ihre Aktivität gesteuert wird (Green et al., 2009). Dies geschieht über die Stabilität (IscR, FNR) oder den Redoxzustand (SoxR) des Clusters (Yeo et al., 2006; Khoroshilova et al., 1997; Ding et al., 1996).

FeS-Cluster wurden lange Zeit als eher seltene Cofaktoren in **DNA- oder RNA-bindenden Proteinen** erachtet. Neben der erwähnten Endonuklease III und MutY sowie den Transkriptionsfaktoren gibt es jedoch immer mehr Beispiele für nukleinsäurebindende und -bearbeitende Enzyme mit FeS-Clustern. In der Helikase XPD vom Typ Superfamilie 2 (SF2), die in vielen Organismen vorhanden und an der Nukleotid-Exzisionsreparatur beteiligt ist, hat das [4Fe4S]-Cluster eine stabilisierende Funktion und ist für die Helikaseaktivität essenziell (Rudolf et al., 2006). Der entsprechende bakterielle Vertreter DinG ist redoxaktiv und Reduktion inhibiert die Aktivität, was darauf hindeutet, dass das Enzym bei oxidativem Stress aktiviert wird (Ren et al., 2009). In den meisten aktuellen Beispielen ist jedoch keine offensichtliche Funktion in Elektronentransfer, Redoxregulation oder clusterabhängiger Katalyse bekannt (White und Dillingham, 2012). Mit der Entdeckung des [4Fe4S]-Clusters in *RsCryB* und *AfPhrB* (Geisselbrecht et al., 2012; Zhang et al., 2013), erstmals in Vertretern der Cryptochrome und Photolyasen, ist die Liste der bakteriellen DNA-prozessierenden Enzyme mit FeS-Cluster weiter gewachsen. Besonders auffällig ist die strukturelle Ähnlichkeit der C-terminalen Domäne der großen (Large) Untereinheit der eukaryotischen und archaealen Primase, PriL-CTD, mit dem Bereich des aktiven Zentrums von Photolyasen und Cryptochromen (Sauguet et al., 2010). Ein [4Fe4S]-Cluster wie in der PriL-CTD ist jedoch nur in der FeS-

BCP-Untergruppe der CPF zu finden. Die strukturelle Ähnlichkeit von *RsCryB* und *AfPhrB* mit der PriL-CTD aus *S. cerevisiae* legt die Entstehung aus einem gemeinsamen Vorläufer nahe.

Ursprüngliche FeS-Cluster bauten sich wahrscheinlich spontan an ihren Zielproteinen zusammen (Imlay, 2006). Mittlerweile wird dies durch komplexe enzymatische Maschinerien übernommen. Bislang sind drei unterschiedliche bakterielle Systeme, Nif, Isc und Suf, für die Clustersynthese bekannt. Allen ist die Beteiligung einer Cystein-Desulfurase und eines *scaffold*-Proteins gemein, an denen die FeS-Cluster aufgebaut werden. Von diesem werden die vorübergehend gebundenen Cluster dann in intakter Form auf ihre Apo-Zielproteine übertragen (Johnson et al., 2005). In vielen Bakterien ist mehr als eines dieser Systeme vorhanden. *R. sphaeroides* verfügt im Gegensatz zu *E. coli* über ein kombiniertes *isc/suf*-Operon, in dem die nötigen Gene für die Clustersynthese sowie weitere Gene für den Eisen- und Schwefelmetabolismus liegen (Remes et al., 2015). Auch Chaperone sind an der Reifung von FeS-Proteinen beteiligt. Die beiden *heat-shock-cognate*-Proteine HscB und HscA aus *E. coli* interagieren mit dem *scaffold*-Protein IscU und assistieren bei der Clustersynthese und Reifung der FeS-Zielproteine. Während IscU diese Chaperone benötigt, sind sie für das Suf-System nicht relevant (Johnson et al., 2005).

FeS-Cluster sind empfindlich gegenüber Sauerstoff (Imlay, 2006), vor allem reaktive Sauerstoffspezies bewirken deren Destabilisierung (Abschnitt 1.12). Daher haben sich in Bakterien komplexe Regulationssysteme entwickelt, die Eisenaufnahme und -Verfügbarkeit in Abhängigkeit von Sauerstoff regulieren. In *R. sphaeroides* geschieht dies maßgeblich durch die transkriptionellen Regulatoren IscR und OxyR (Zeller et al., 2007; Remes et al., 2014, 2015).

1.12 Oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) sind unvermeidbare Nebenprodukte des aeroben Stoffwechsels. Ihre Gefahr besteht in der hohen Reaktivität mit Biomolekülen (DNA, Proteine, Lipide) in der Zelle und deren Beschädigung. ROS entstehen innerhalb von Zellen durch unbeabsichtigte und unspezifische Energie- oder Elektronenübertragung auf molekularen Sauerstoff. **Superoxid (O_2^-)** und **Wasserstoffperoxid (H_2O_2)** entstehen durch die Übertragung von Elektronen von Redoxenzymen (vor allem Flavoenzymen), die eigentlich für andere Substrate bestimmt sind, auf O_2 . Durch die Übertragung eines ersten Elektrons entsteht O_2^- , dies wird meist gefolgt von einer zweiten Elektronenübertragung und der Generierung von H_2O_2 aus O_2^- . H_2O_2 kann außerdem aus zwei O_2^- -Molekülen durch Einwirkung der Superoxid-Dismutase entstehen. Ein zellulärer Angriffspunkt von O_2^- sind vor allem katalytische Eisenatome in exponierten Eisen-Schwefel-Clustern von Proteinen; H_2O_2 oxidiert u. a. die Schwefelatome von Cysteinen oder Methioninen in Proteinen und ebenfalls Eisen-Schwefel-Cluster. H_2O_2 ist außerdem das Ausgangsmolekül für die Entstehung des **Hydroxylradikals (OH^\bullet)**. Dies ist die reaktivste Sauerstoffspezies; sie ist in der Lage, die meisten Biomoleküle in der Zelle direkt anzugreifen. OH^\bullet entsteht durch die Übertragung eines Elektrons von freiem, zweiwertigem Eisen (Fe^{2+}) auf H_2O_2 in der Fenton-Reaktion. Dabei entsteht dreiwertiges Eisen (Fe^{3+}) sowie ein Hydroxidion (OH^-) und OH^\bullet . Da OH^\bullet unter anderem DNA angreift, geht von dieser Spezies eine besonders große zellschädigende Wirkung aus (Imlay, 2003). Bakterien besitzen diverse Schutzproteine, die entweder ROS entschärfen oder dem entstehenden Schaden entgegenwirken (Zhao und Drlica, 2014). Die spezifischen Enzyme, die das ROS-Level reduzieren, sind Superoxid-Dismutasen (SOD), Katalasen und Peroxidasen für den Abbau von O_2^- und H_2O_2 . Außer der Aktivität von Thioredoxinen ist bislang kein proteinbasierter Mechanismus bekannt, der Hydroxylradi-

kale unschädlich macht (Das und Das, 2000; Zhao und Drlica, 2014). Thioredoxine sind auf vielseitige Weise an der ROS-Antwort beteiligt. Sie reagieren auf ROS durch genregulatorische Aktivität, können jedoch auch H_2O_2 direkt reduzieren oder als H-Donor für Peroxidasen dienen. Aufgrund ihres geringen Redoxpotenzials schaffen sie eine reduzierende Atmosphäre in der Zelle (Zeller und Klug, 2006). Neben enzymatischen Systemen tragen auch Antioxidantien wie NADH, β -Carotin, Ascorbinsäure oder Glutathion zum Abbau von ROS bei (Cabiscol et al., 2000).

Im Gegensatz zu O_2^- und H_2O_2 ist **Singulett-Sauerstoff** ($^1\text{O}_2$) eine energetisch angeregte Form von O_2 . Es wird als ein toxisches Nebenprodukt der Photosynthese durch Energietransfer auf O_2 durch angeregte Chromophore gebildet (Anthony et al., 2005) und ist somit vor allem in photosynthetischen Bakterien wie *R. sphaeroides* von Bedeutung. Neben der $^1\text{O}_2$ -Generierung durch Lichtenergie und *photosensitizer* wie Chlorophylle kann es auch durch enzymatische Prozesse entstehen. Ein primäres Angriffsziel von $^1\text{O}_2$ sind bestimmte Aminosäuren in Proteinen (Davies, 2004). Carotinoide können der Entstehung von $^1\text{O}_2$ vorbeugen, indem sie die Energie von angeregtem Bakteriochlorophyll durch Löschung (*quenching*) in harmlose Wärmeenergie umwandeln (Cogdell et al., 2000), sodass sie nicht auf Sauerstoff übertragen wird. Außerdem kann das energetisch angeregte $^1\text{O}_2$ direkt durch Carotinoide *gequencht* werden (Glaeser und Klug, 2005). Auch Thioredoxine sind wie bei den anderen ROS beteiligt, hier durch direktes *quenching* von $^1\text{O}_2$ (Das und Das, 2000). Dennoch wird bei der Entstehung von $^1\text{O}_2$ ein zelluläres Anpassungsprogramm gestartet, um die durch oxidativen Stress entstehenden Schäden zu minimieren und zu beheben. Dies geschieht durch die Aktivität verschiedener alternativer Sigmafaktoren, die als Untereinheit der RNA-Polymerase, anstelle ihres primären oder „*housekeeping*“ Sigmafaktors, im Zuge der Stressantwort bestimmte Gene aktivieren, deren Genprodukte an der Bekämpfung von ROS und deren Folgen beteiligt sind. In *R. sphaeroides* ist RpoE (σ^E) ein zentraler Sigmafaktor der Stressantwort. Er wird primär durch $^1\text{O}_2$ aktiviert und weniger durch die anderen oben beschriebenen ROS. Die Expression eines weiteren alternativen Sigmafaktors, RpoH_{II} in *R. sphaeroides*, steht unter direkter transkriptioneller Kontrolle von RpoE und kontrolliert wiederum ein Regulon aus Genen für die oxidative Stressabwehr. Die Zahl der Gene, die der direkten Kontrolle durch RpoE aufgrund von RpoE-Zielpromotoren unterliegen, ist relativ gering; durch die Aktivierung von RpoH_{II} wird das Regulon jedoch stark erweitert (Nuss et al., 2009). Einige $^1\text{O}_2$ -induzierte Gene werden außerdem unabhängig von dieser Sigmafaktor-Kaskade aus RpoE und RpoH_{II} kontrolliert. Dies geschieht durch den alternativen Sigmafaktor RpoH_I, dessen Expression nicht unter der Kontrolle von RpoE steht. Beide RpoH-Sigmafaktoren weisen jedoch überlappende Regulons auf. Zu den Zielgenen gehören neben proteinkodierenden Genen auch diverse kleine regulatorische sRNAs (Berghoff et al., 2009). RpoH_I spielt außerdem eine Rolle in der Hitzestressantwort, seine Rolle in der Antwort auf Singulett-Sauerstoff ist im Vergleich zu RpoH_{II} untergeordnet (Nuss et al., 2010). Zu den durch Singulett-Sauerstoff induzierten Genen der Stressantwort gehören auch beide CPF-Mitglieder aus *R. sphaeroides*. CryB wird durch RpoH_{II}, und PhrA direkt durch RpoE induziert (Nuss et al., 2009, 2010; Anthony et al., 2005).

Als oxidativen Stress bezeichnet man eine Situation, in der die Konzentration von ROS ein Level erreicht, das die zelluläre Abwehrkapazität gegen diese übersteigt (Cabiscol et al., 2000), im Falle von Singulett-Sauerstoff spricht man von photooxidativem Stress.

1.13 Zielsetzung der Arbeit

Das ungewöhnliche CPF-Mitglied CryB wurde zunächst als Cryptochrom mit regulatorischen Funktionen beschrieben. Verschiedene Beobachtungen deuten darauf hin, dass CryB zusätzlich über eine für (6-4)-Photolyasen typische **DNA-Reparaturaktivität** verfügt, die bislang nicht nachgewiesen werden konnte. In der vorliegenden Arbeit sollen konservierte Aminosäuren des aktiven Zentrums ausgetauscht und die Varianten durch *in vivo* Photoreaktivierungsexperimente überprüft werden, um Hinweise auf eine mögliche (6-4)-Photolyaseaktivität zu erhalten. Des Weiteren sollen die Untersuchungen zur *in vitro* Reparatur erneut aufgegriffen werden.

CryB verfügt über drei anstelle der üblichen zwei **Cofaktoren** in Photolyasen und Cryptochromen. In dieser Arbeit soll die Rolle der Cofaktoren durch den Austausch von Aminosäuren an deren Bindungsstellen untersucht werden. Von besonderer Bedeutung sind dabei das Eisen-Schwefel-Cluster, das nur in Vertretern der FeS-BCP-Untergruppe vorkommt, sowie der putative Antennenchromophor DLZ. Zudem soll die Rolle der im Vorfeld dieser Arbeit identifizierten Aminosäuren zur Reduktion des katalytischen Cofaktors FAD nun *in vivo* untersucht werden. Die verschiedenen Cofaktor-Varianten werden auf Proteinebene sowie bei der *in vivo* Photoreaktivierung betrachtet.

Die Zuordnung von CryB als regulatorisches Cryptochrom basierte unter anderem auf dem Phänotyp einer verringerten **Pigmentierung** des *R. sphaeroides*-Knockout-Stammes $\Delta cryB$ im Vergleich zum Wildtyp unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen. Aufgrund eines Verlustes dieses zuvor beobachteten Phänotyps sollen neue Knockout-Stämme generiert und auf Färbung, Chlorophyllgehalt sowie Expression der *puf*- und *puc*-mRNAs untersucht werden.

CryB interagiert mit dem **Blaulichtrezeptor AppA** und trägt auf diesem Weg zur Regulation der Photosynthesegene über das PpsR/AppA-Repressor/Antirepressor-System bei. In dieser Arbeit soll eine **Co-Kristallisation** der beiden Proteine vorgenommen werden. Des Weiteren soll eine erneute Kristallisation von CryB als Vorbereitung auf die Generierung einer Struktur im lichtaktivierten Zustand durchgeführt werden, für einen Vergleich mit der bisher vorhandenen Dunkelstruktur. Durch eine *in vivo pull-down*-Analyse sollen außerdem weitere mögliche **Interaktionspartner** von CryB identifiziert werden.

Eine spezifische zelluläre **Lokalisation** von CryB ist bislang nicht bekannt. Durch Fusion mit dem *cyan fluorescent protein* (CFP) soll untersucht werden, ob es einen definierten Aufenthaltsbereich des Proteins innerhalb der Zelle gibt.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeines

Alle Arbeiten mit Bakterien erfolgten unter sterilen Bedingungen am Bunsenbrenner. Erlenmeyerkolben, Glasröhrchen, Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Glaskugeln wurden durch Autoklavieren, Nährmedien und Reagenzien entweder durch Autoklavieren oder Filtrieren sterilisiert. Impfösen oder Drigalskispatel wurden durch Ausglühen bzw. Abflammen sterilisiert, Flächen und Pipetten mit 70%igem Ethanol behandelt. Zum Ansetzen von Puffern wurde entweder zweifach destilliertes (bidest, ddH₂O) oder vollentsalztes (VE-H₂O) Wasser verwendet. Für alle molekularbiologischen Arbeiten sowie für das Ansetzen bestimmter Chemikalien wurde steriles, nukleasefreies Wasser der Firma Roth (Roth-H₂O) verwendet. Zentrifugationen von 1,5- und 2-ml-Eppendorfgefäßen wurden in der Biofuge Fresco (4 °C) oder in der Biofuge Pico (RT) (Heraeus) durchgeführt.

2.2 Geräte und Reagenzien

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte und Reagenzien

Geräte	Hersteller
ÄKTApurifier	GE Healthcare, München
Savant SpeedVac Concentrator SC110	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Sorvall™ RC6+ Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Sorvall™ RC 5C+ Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rotina 420R Schwingrotorzentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Optima™ TLX Ultrazentrifuge	Beckmann, Krefeld
Spektralphotometer Specord 50	Analytik Jena
Spektrofluorometer RF-5301PC (AG Batschauer)	Shimadzu, Neufahrn
Spektrophotometer GeneQuant 1300 (AG Batschauer)	GE Healthcare, München
ZweistrahlSpektrophotometer V-660 (AG Essen)	JASCO, Groß-Umstadt
UV Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla, CA, USA
MicroPulser™	Bio-Rad, München
Mikroskop DMI6000 B (AG Thormann)	Leica, Wetzlar

S1000™ Thermal Cycler	Bio-Rad, München
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad, München
C1000™ Thermal Cycler CFX96™ Real-Time System	Bio-Rad, München
Vacuum Blotter	Appligene, Heidelberg
Molecular Imager FX™	Bio-Rad, München
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin, Berlin
Sonotrode Sonopuls GM70	Bandelin, Berlin
Elektroblotter PerfectBlue™ Semi-Dry	Peqlab, Erlangen
Odyssey Infrared Imaging System (AG Batschauer)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

Enzyme und Kits	Hersteller
Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QRT-PCR Master Mix	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs (NEB)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (NEB)
DNase I Invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Polynukleotidkinase (PNK)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNase A	Qiagen, Hilden
innuPREP Gel Extraction Kit	Analytik Jena
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
peqGOLD TriFast™ Kit	Peqlab, Erlangen
Prime-a-Gene® Labeling System	Promega, Mannheim
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche, Mannheim

Reagenzien	Hersteller
DEPC	Roth, Karlsruhe
Bacto Agar	Difco, Heidelberg
2,2'-Dipyridyl	Merck, Darmstadt
Standard-Nährmedium I	Roth, Karlsruhe
Standard-Nähragar I	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phenol wassergesättigt, nicht stabilisiert	AppliChem Panreac, Darmstadt
Phenol stabilisiert:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	AppliChem Panreac, Darmstadt
LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf

Acrylamid 4K Lösung (40 %) Mix 37,5:1	AppliChem Panreac, Darmstadt
Roti®-Quant (5× Konzentrat)	Roth, Karlsruhe
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fixier- und Entwicklerlösung für Röntgenfilme	Adefo, Neu-Isenburg
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roth, Karlsruhe
TEMED	AppliChem Panreac, Darmstadt
Salmon sperm DNA - Natriumsalz (sonifiziert) (Lachssperm-DNA)	AppliChem Panreac, Darmstadt
Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody, HRP conjugate (#31460)	Thermo Fisher Scientific / Pierce, Rockford, IL, USA
Monoclonal Anti-polyHistidine-Peroxidase Antibody produced in mouse (A7058)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Größenstandards und radioaktive Nukleotide	Hersteller
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (AG Batschauer)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Low Range (Unstained SDS-PAGE Standards)	Bio-Rad, München
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 bis 180 kDa)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
[$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig
[$\gamma^{32}\text{P}$]dATP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig

Sonstiges	Hersteller
Dialyserschlauch (VISKING Typ 20/32), MW cutoff 14 kDa	Roth, Karlsruhe
0,22 μM Filter (Rotilabo®-Spritzenfilter, PVDF, steril)	Roth, Karlsruhe
Konjugationsfilter Whatman™ Membrane Filters Cellulose Nitrate	GE Healthcare, München
Quarzküvette (Suprasil®), Schichtdicke 10 mm	Hellma, Müllheim
Quarzküvette (Suprasil®), Fluoreszenzküvette (AG Batschauer, AG Essen)	Hellma, Müllheim
Blotting Paper BP002 Albet® LabScience	Hahnemühle FineArt GmbH, Dassel
Roti®-Nylon plus, Porengröße 0,45 μM , Ladung positiv	Roth, Karlsruhe
Nitrocellulosemembran (Protran BA83)	GE Healthcare, München
illustra™ MicroSpin™ G-50 column	GE Healthcare, München
illustra™ MicroSpin™ G-25 column	GE Healthcare, München
0,22 μM Filter Whatman™ Membrane Filters, regenerated cellulose	GE Healthcare, München
Ni-NTA-Matrix	Qiagen, Hilden
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare, München
Polypropylensäulen, 1 ml und 5 ml	Qiagen, Hilden

HiTrap™ Heparin HP Säule, 5 ml	GE Healthcare, München
HiLoad™ 16/60 Superdex 200 prep grade, cv 120 ml	GE Healthcare, München
Superdex 200 HR 10/30, cv 25 ml	GE Healthcare, München
Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit, 30 kDa MW cutoff	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Polystyrol-Küvetten (10 × 4 × 45 mm)	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Stämme und Plasmide

Tabelle 2.2 zeigt alle verwendeten Grund-Stämme von *E. coli* und *R. sphaeroides* ohne stammfremde Plasmide. Alle Plasmide, die in *E. coli*- oder *R. sphaeroides*-Stämmen exprimiert wurden, sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Das Plasmid pETcryB (= pET-RsCryB; Geisselbrecht et al., 2012) diente als Ausgangsplasmid für alle davon abgeleiteten „pETcryB“-Plasmide mit Punktmutationen im *cryB*-Gen für die im Namen enthaltenen Aminosäureaustausche.

Das Plasmid pRKcryB (= pRK3077; Hendrischk et al., 2007) sowie alle davon abgeleiteten „pRKcryB“-Plasmide mit Punktmutationen im *cryB*-Gen für die im Namen enthaltenen Aminosäureaustausche enthält die *cryB*-Sequenz inklusive 127 bp *upstream* und 67 bp *downstream* der *coding sequence* (CDS). Die gleiche Sequenz ist im Zwischenvektor pDcryB enthalten. Dieser diente als Ausgangsplasmid zur Insertion von Punktmutationen für die anschließende Klonierung der veränderten Sequenz in pRK415.

Tabelle 2.2: Stämme von *E. coli* und *R. sphaeroides*

Stamm	Beschreibung	Quelle
<i>E. coli</i>		
DH5α	Verwendet zur Klonierung. F ⁻ <i>endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>supE44 thi-1 λ⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169 φ80ΔlacZΔM15</i>	Meselson und Yuan (1968)
DH5α λpir	Verwendet zur Klonierung mit pNPTS138-R6KT. φ80ΔlacZΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1 λpir</i>	Miller und Mekalanos (1988)
S17-1	Verwendet zur Konjugation in <i>R. sphaeroides</i> . <i>thi pro hsdR⁻ hsdM⁺ recA RP4 2-Tc::Mu-Km::Tn7 res⁻ mod⁺ Tp^R Sm^R</i>	Simon et al. (1983)
BL21(DE3)pLysS	Verwendet zur Überexpression von CryB. F ⁻ <i>dcm ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3) pLysS (Cam^R)</i>	Stratagene
Rosetta(DE3)	Verwendet zur Überexpression von CryB. F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pRARE (Cam^R)</i>	Novagen
JM109	Verwendet zur Überexpression von AppA. F ⁺ <i>traD36 proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV44 e14⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17</i>	Yanisch-Perron et al. (1985); New England Biolabs (NEB)
<i>R. sphaeroides</i>		
2.4.1	Wildtyp	van Niel (1944)
ΔcryB	Chromosomale Deletion von <i>cryB</i> (RSP_3077) in <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 durch die Km ^R -Kassette aus pUC4K (Vieira und Messing, 1982)	Hendrischk et al. (2007)

$\Delta cryBKmNeu$	Chromosomale Deletion von <i>cryB</i> (RSP_3077) in <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 durch die Km^R -Kassette aus pUC4K (identisch mit $\Delta cryB$ aus Hendrischk et al., 2007)	Diese Arbeit
$\Delta cryBSp$	Chromosomale Deletion von <i>cryB</i> (RSP_3077) in <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 durch die Ω - Sm^R/Sp^R -Kassette aus pHP45 Ω (Prentki und Krisch, 1984)	Diese Arbeit
$\Delta phrA$	Chromosomale Deletion von <i>phrA</i> (RSP_2143) in <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 durch die Km^R -Kassette aus pUC4K (Vieira und Messing, 1982)	Hendrischk et al. (2007)

Tabelle 2.3: Plasmide für *E. coli* und *R. sphaeroides*

Plasmid	Beschreibung	Quelle
In <i>E. coli</i> verwendet		
pET28a	Expressionsvektor, verwendet zur Überexpression von CryB-Varianten. 5369 bp. Km^R	Novagen
pET <i>cryB</i>	Entspricht pET- <i>RsCryB</i> aus Geisselbrecht et al. (2012). 6838 bp. Km^R	Geisselbrecht et al. (2012)
pET <i>cryB</i> H362A	AS-Austausch Histidin -> Alanin	Diese Arbeit
pET <i>cryB</i> Q302A	AS-Austausch Glutamin -> Alanin	Diese Arbeit
pET <i>cryB</i> W338F	AS-Austausch Tryptophan -> Phenylalanin	Geisselbrecht et al. (2012)
pET <i>cryB</i> L366H	AS-Austausch Leucin -> Histidin	Kawen (2014)
pET <i>cryB</i> L366F	AS-Austausch Leucin -> Phenylalanin	Diese Arbeit
pET <i>cryB</i> L366A	AS-Austausch Leucin -> Alanin	Diese Arbeit
pET <i>cryB</i> E37F	AS-Austausch Glutamat -> Phenylalanin	Geisselbrecht (2013)
pET <i>cryB</i> E37F/W338F	AS-Austausch Glutamat -> Phenylalanin AS-Austausch Tryptophan -> Phenylalanin	Diese Arbeit
pET <i>cryB</i> E37F/L366H	AS-Austausch Glutamat -> Phenylalanin AS-Austausch Leucin -> Histidin	Diese Arbeit
pET <i>cryB</i> C346A	AS-Austausch Cystein -> Alanin	Diese Arbeit
pET <i>cryB</i> C434A	AS-Austausch Cystein -> Alanin	Diese Arbeit
pET <i>cryB</i> C437A	AS-Austausch Cystein -> Alanin	Geisselbrecht (2013)
pET <i>cryB</i> C450A	AS-Austausch Cystein -> Alanin	Diese Arbeit
pET <i>cryB</i> C434A/C437A	2x AS-Austausch Cystein -> Alanin	Diese Arbeit
pET <i>cryB</i> C437S	AS-Austausch Cystein -> Serin	Diese Arbeit / S.R. Nayakanti (2013)
pET <i>cryB</i> $\Delta_{D432-V508}$	C-terminale <i>cryB</i> -Deletion um 77 AS. 6607 bp.	Diese Arbeit / S.R. Nayakanti (2013)
pET <i>cryB</i> $\Delta_{S431-P507}$	C-terminale <i>cryB</i> -Deletion um 77 AS. Ersatz der terminalen AS Serin S431 durch Valin. 6607 bp.	Diese Arbeit
pGEXAppA Δ N	Expressionsvektor pGEX-4T-1:: <i>appA</i> Δ 5-190, zur Überexpression von AppA Δ N als GST-Fusion. Ap^R	Han (2006)

pDcryB	Zwischenvektor pDRIVE (Qiagen) mit <i>cryB</i> -Sequenz inkl. 127 bp <i>up</i> - und 67 bp <i>downstream</i> zur Insertion von Punktmutationen, für die anschließende Klonierung in pRK415. 5555 bp. Ap ^R Km ^R	Hendrischk (2009)
pET21sfGFP	pET21 mit der Sequenz für das <i>superfolder Green Fluorescent Protein</i> (741 bp). 6108 bp. Ap ^R	Pédelacq et al. (2006)
In <i>R. sphaeroides</i> verwendet		
pRK415	<i>Broad-host-range</i> -Vektor. 10.690 bp. Tc ^R	Keen et al. (1988)
pBBR1MSC-2	<i>Broad-host-range</i> -Vektor. 5144 bp. Km ^R	Kovach et al. (1995)
pPHUΔ3077	<i>suicide</i> -Vektor pPHU281 (Hübner et al., 1993) zur Deletion von <i>cryB</i> in <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette aus pUC4K (Vieira und Messing, 1982). Tc ^R Km ^R	Hendrischk et al. (2007)
pPHU281- <i>cryB</i> -Ω-Sp	<i>suicide</i> -Vektor pPHU281 (Hübner et al., 1993) zur Deletion von <i>cryB</i> in <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 durch Insertion einer Streptomycin/Spectinomycin-Resistenzkassette aus pHP45Ω (Prentki und Krisch, 1984). Tc ^R Sm ^R /Sp ^R	A. Jäger (2012)
pRKpufcryB	pRKpuf3077 in Hendrischk et al. (2009a). Zur Überexpression von <i>cryB</i> mit Hexahistidin- <i>tag</i> unter Kontrolle des <i>puf</i> -Promotors. 12.621 bp. Tc ^R	Konzer (2008)
pRKcryB	pRK3077 in Hendrischk et al. (2007). pRK415 mit <i>cryB</i> -Sequenz inkl. 127 bp <i>up</i> - und 67 bp <i>downstream</i> zur Komplementation von Δ <i>cryB</i> . 12.393 bp. Tc ^R	Hendrischk et al. (2007)
pRKcryB H362A	AS-Austausch Histidin -> Alanin	Diese Arbeit
pRKcryB Q302A	AS-Austausch Glutamin -> Alanin	Diese Arbeit
pRKcryB W338F	AS-Austausch Tryptophan -> Phenylalanin	Diese Arbeit
pRKcryB Y387F	AS-Austausch Tyrosin -> Phenylalanin	Diese Arbeit
pRKcryB Y391F	AS-Austausch Tyrosin -> Phenylalanin	Diese Arbeit
pRKcryB L366H	AS-Austausch Leucin -> Histidin	Hantl (2015)
pRKcryB L366F	AS-Austausch Leucin -> Phenylalanin	Diese Arbeit
pRKcryB L366A	AS-Austausch Leucin -> Alanin	Diese Arbeit
pRKcryB E37F	AS-Austausch Glutamat -> Phenylalanin	Diese Arbeit
pRKcryB E37F/W338F	AS-Austausch Glutamat -> Phenylalanin AS-Austausch Tryptophan -> Phenylalanin	Stein (2013)
pRKcryB E37F/L366H	AS-Austausch Glutamat -> Phenylalanin AS Austausch Leucin -> Histidin	Diese Arbeit
pRKcryB C434A/C437A	2× AS Austausch Cystein -> Alanin	K. Teich (2012)
pRKDmPhot	pRK415 mit der aus cDNA abgeleiteten Sequenz der (6-4)-Photolyase aus <i>Drosophila melanogaster</i> (aus Maul et al., 2008)	Kawen (2014)
pBE16ScryBeCFP	Fluoreszenzvektor zur Lokalisation von CryB. Km ^R	B. Eisenhardt (2014)
pBE16ScryBeCFP C437A	Fluoreszenzvektor zur Lokalisation von CryB C437A (Kontrolle). Km ^R	Diese Arbeit

pNPTS138-R6KT	<i>suicide</i> -Vektor für <i>in-frame</i> -Deletionen und Insertionen. <i>mobRP4⁺ ori-R6K sacB</i> . 4430 bp. Km ^R	Lassak et al. (2010)
pNPTS138-R6KTCryBsfGFP	pNPTS138-R6KT <i>suicide</i> -Vektor zur Insertion von sfGFP als C-terminale Fusion mit <i>cryB</i> in <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1. 6732 bp. Km ^R	Diese Arbeit

2.4 Oligonukleotide

In Tabelle 2.4 sind alle in dieser Arbeit als Primer verwendeten Oligonukleotide für verschiedene PCR-Anwendungen (Abschnitt 2.6.1) zusammengefasst sowie Oligonukleotide, die als Sonden für Northern-Hybridisierung genutzt wurden. Oligonukleotid-Stocklösungen (100 µM) wurden in Roth-H₂O gelöst und anschließend 1:10 verdünnt (10 µM).

Tabelle 2.4: Oligonukleotide/Primer für PCR-Anwendungen und Hybridisierungssonden

Oligonukleotid	Sequenz 5' -> 3'	nt	Beschreibung / Quelle
Klonierungsprimer für Mutagenese-PCR			
cryB_H362A_nck_f	TGCCACG <u>CC</u> ATCCAGCGGCTGATGGTG	28	Codon CAC -> GCC
cryB_H362A_nck_r	CTGGAT <u>GG</u> CTGGGCATAGGCGAGATCG	28	
cryB_Q302A_nck_f	CATCCGGG <u>CG</u> ATCCTCGGCTGGCGGGAG	28	Codon CAG -> GCG
cryB_Q302A_nck_r	GAGGAT <u>CG</u> CCGGATGAAGCCCTCGACC	28	
cryB_W338F_nck_f	CTCTACT <u>TTC</u> GGCAAGCCACGCGGATGG	28	Codon TGG -> TTC
cryB_W338F_nck_r	GCTTGCC <u>GA</u> AGTAGAGCGGCGGAGGGC	28	
cryB_Y387F_nck_f	GAATGG <u>TTC</u> TCTCTCGGTCTATATCGATG	28	Codon TAT -> TTC
cryB_Y387F_nck_r	CCGAGAG <u>GA</u> ACCATTTCGTGCACCTCGGC	28	
cryB_Y391F_nck_f	TCGGTCT <u>TTC</u> ATCGATGCGCTGGAATGGG	28	Codon TAT -> TTC
cryB_Y391F_nck_r	CATCGAT <u>GA</u> AGACCGAGAGATACCATT	28	
cryB_L366H_nck_f	CAGCGG <u>CAC</u> ATGGTGACGGGCAATTTTCG	28	Codon CTG -> CAC
cryB_L366H_nck_r	TCACCAT <u>GT</u> GCCGCTGGATGTGGTGGGC	28	
cryB_L366F_nck_f	CAGCGG <u>TTC</u> ATGGTGACGGGCAATTTTCG	28	Codon CTG -> TTC
cryB_L366F_nck_r	TCACCAT <u>GA</u> ACCGCTGGATGTGGTGGGC	28	
cryB_L366A_nck_f	CCAGCGG <u>CG</u> ATGGTGACGGGCAATTTTC	28	Codon CTG -> GCG
cryB_L366A_nck_r	CACCAT <u>CG</u> CCGCTGGATGTGGTGGGCA	28	
cryB_E37F_nck_f	GATGGAG <u>TTC</u> GGCACCTATGTCCCGCAC	28	Codon GAG -> TTC
cryB_E37F_nck_r	GGTGCC <u>GA</u> ACTCCATCACCTCGGCCATG	28	
cryB_C346A_nck_f	GATGGCGG <u>CC</u> CTCTCCGCCGCGGTCGCC	28	Codon TGC -> GCC
cryB_C346A_nck_r	GGAGAGG <u>GC</u> CGCCATCCGCGTGGGCTTG	28	
cryB_C434A_nck_f	GGATTAC <u>CG</u> CCCGGCTGCGCCTATGCG	28	Codon TGC -> GCC
cryB_C434A_nck_r	GCCGCGG <u>GC</u> GTAATCCGACATCCGGTCG	28	
cryB_C437A_nck_f	CCGCGG <u>CG</u> CCCTATGCGGTGAAGGAC	28	Codon TGC -> GCC
cryB_C437A_nck_r	ATAGGC <u>GG</u> CGCCGCGGACAGTAATCCGAC	28	
cryB_C450A_nck_f	CCGCGC <u>CG</u> CCCTTCAACCTGCTCTAC	28	Codon TGC -> GCC
cryB_C450A_nck_r	GAAGGG <u>GG</u> CGGCGGGGTCCCGTCCGG	28	
cryB_C437S_nck_f	CCGCGG <u>CAG</u> CGCCTATGCGGTGAAGGAC	28	Codon TGC -> AGC
cryB_C437S_nck_r	ATAGGC <u>GCT</u> GCCGCGGACAGTAATCCGAC	28	

Sonstige Klonierungsprimer			
cryB_CDS_Ndelup	GTTGTTTCATATGCTGACACGGCTCATCCTC	30	Geisselbrecht et al. (2012), darin „sense, Ndel“
cryB_CDS_Hind_dw	CATTACAAGCTTTCAGACCGGCTCGCC	27	Geisselbrecht et al. (2012), darin „reverse, XhoI“
cryB-C_HindIIIdw	GCCGATAAGCTTTCACGACATCCGGTCGATATAGG	35	verwendet mit cryB_CDS_Ndelup für CryB $\Delta_{D432-V508}$
cryB-C_Valin_dw	GCCGATAAGCTTTCAGACCATCCGGTCGATATAGG	35	verwendet mit cryB_CDS_Ndelup für CryB $\Delta_{S431-P507}$
Primer zum Nachweis von Mutationen durch analytische (Kolonie-)PCR (Anwendung siehe Anhang 9.4)			
H362A_mitMut_r (A)	CATCAGCCGCTGGATGGC	18	Produkt 218 bp
H362A_ohneMut_r (B)	CATCAGCCGCTGGATGTG	18	
H362A_f (C)	CGGTCGAGGGCTTCATCC	18	
Q302A_mitMut_r (A)	CCGCCAGCCGAGGATCGC	18	Produkt 260 bp
Q302A_ohneMut_r (B)	CCGCCAGCCGAGGATCTG	18	
Q302A_f (C)	TCCACTGGGCCACCGACC	18	
W338F_mitMut_f (A)	CTGCCGCCGCTCTACTTC	18	Produkt 234 bp
W338F_ohneMut_f (B)	CTGCCGCCGCTCTACTGG	18	
W338F_r (C)	CGGCGAACTGGCTCATCC	18	
L366H_mitMut_f (A)	CACCACATCCAGCGGCAC	18	C437A_ohneMut_r als (C) verwendet. Produkt 246 bp
L366H_ohneMut_f (B)	CACCACATCCAGCGGCTG	18	
E37F_mitMut_f (A)	GCCGAGGTGATGGAGTTC	18	Produkt 297 bp
E37F_ohneMut_f (B)	GCCGAGGTGATGGAGGAG	18	
E37F_r2 (C)	GCAGAGGAACCGGTCGTC	18	
C437A_mitMut_r (A)	CTTCACCGCATAGGCGGC	18	Produkt 251 bp
C437A_ohneMut_r (B)	CTTCACCGCATAGGCGCA	18	
C437A_f (C)	ATGCCACCACATCCAGC	18	
Primer für analytische (Kolonie-)PCR zur Überprüfung von Stämmen			
KanR2_fwd	CATGAACAATAAACTGTCTGC	22	
KanR2_rev	GAAGATGCGTGATCTGATCC	20	
omega_Sp_fwd	CAATAGTTGGCGAAGTAATCG	21	
omega_Sp_rev	CACGGCACGATCATCGTGC	19	
cryB400up	GGAAGGCATAGGCGCTTGC	21	
cryB400down	CTGCTGCACCGGATGAACC	19	
Primer für quantitative <i>real-time</i> PCR (qrtPCR) und Überprüfung von DNA-Kontamination			
<i>(Weitere verwendete real-time-PCR-Primer sind in Frühwirth (2012) zu finden.)</i>			
Kan-real-fwd	TACTCACCCTGCGATCC	18	
Kan-real-rev	GCCATTACGCTCGTCATC	18	
rpoZ_fwd	ATCGCGGAAGAGACCCAGAG	20	
rpoZ_rev	GAGCAGCGCCATCTGATCCT	20	
0906_real_A	TCAAGACCGACGTGGTAA	18	S. Frühwirth
0906_real_B	AGCAGCGTGAAGAACAGA	18	S. Frühwirth
2878_real-A	CAAGAGCGTGACGACGAT	18	S. Frühwirth
2878_real-B	GTTCGGCTTCTCGTTCAG	18	S. Frühwirth

RSP_0799 (<i>gloB</i>) fwd	GAACCATTACGCCTTCTC	18	Überprüfung v. DNA-Kontamination vor qrtPCR. 214 bp
RSP_0799 (<i>gloB</i>) rev	GAACCATTACGCCTTCTC	18	
Sequenzierungsprimer			
M7	GCGGATAACAATTTAC	17	Für pRK415
MP6	GTTGGGTAACGCCAGGG	17	Für pRK415
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	20	Für pET28a u. pDRIVE
T7term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	19	Für pET28a
SP6	CATTTAGGTGACACTATAG	19	Für pDRIVE
3077seq1	GAGGCGGTCGCGACCCGG	18	Frühwirth (2012)
3077seq2	GGTGC GCGGGTACTCGAC	19	Frühwirth (2012)
3077seq3	CTCGGCTGGCGGGAGTATG	19	Frühwirth (2012)
Oligonukleotide zur Herstellung radioaktiv markierter Sonden			
pucB_for	GCCGAAGAAGTTCATAAGCAA	21	Produkt 268 bp
pucA_rev	CAGCCGAGCCTTGGTAGTAG	20	
2.4.1.PufAB-F	ACATCTGGCGTCCGTGGTTC	20	Produkt 125 bp
2.4.1.PufAB-R	ATCACCGCGAGGAGGAACAG	20	
14S	CTTAGATGTTTCAGTTCCC	19	
p-0680a	CGTCGCCGCTGCTGCTACAGGTC	23	Berghoff et al. (2009)
p-0682	CGCGCCGATCTGTCATTGGATG	23	Berghoff et al. (2009)

Kursiv = Überlappende Region bei Primern für Mutagenese-PCR

Fett = Nicht komplementäre Basen bei Primern für Mutagenese-PCR und Primern zum Nachweis von Mutationen

Unterstrichen = Codon

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Messung der optischen Dichte (OD) von Bakterienkulturen

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurden zwischen 0,75 und 1 ml einer Kultur entnommen und in eine Polystyrol-Küvette (10 × 4 × 45 mm, Sarstedt) überführt. Die Streuung von *E. coli*-Kulturen wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt, die von *R. sphaeroides* bei 660 nm (OD₆₆₀), aufgrund der geringen Absorption photosynthetischer Pigmente in diesem Bereich, wodurch die Zelldichte unabhängig von der Pigmentierung wiedergegeben wird. Die Messung der OD erfolgte im Spektralphotometer Specord 50 (Analytik Jena).

2.5.2 Antibiotika

Zur Selektion antibiotikaresistenter *R. sphaeroides*- und *E. coli*-Stämme und zur Aufrechterhaltung von Plasmiden wurden den Kulturmedien und Agarplatten Antibiotika in den in Tabelle 2.5 aufgeführten Konzentrationen hinzugefügt. Der individuelle Einsatz ist in den jeweiligen Abschnitten zur Kultivierung beschrieben. Die einzige Abweichung bezüglich der Konzentration betrifft Kanamycin im Stamm $\Delta cryB$ bei Anwesenheit eines pRK415-basierten Plasmids. Aufgrund der hohen Sensitivität des Stammes $\Delta cryB$

gegenüber Kanamycin, wurde dieses in halber Konzentration eingesetzt (Tetracyclin zum Erhalt des Plasmids immer in normaler Konzentration). Dies betrifft lediglich die Anzucht in Flüssigkultur in Kombination mit Tetracyclin nach der Konjugation mit pRK415-basierten Plasmiden zur Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen (Abschnitt 2.5.3.2). Die in Wasser (Roth-H₂O) angesetzten Antibiotika-Stammlösungen wurden durch einen 0,22-µM-Filter (Rotilabo®-Spritzenfilter, PVDF, steril, Roth) sterilfiltriert.

Tabelle 2.5: Konzentrationen verwendeter Antibiotika

Antibiotikum	Abk.	Stock-Konz.	Gelöst in	Arbeitskonzentration	
				<i>E. coli</i>	<i>R. sphaeroides</i>
Kanamycin (Roth)	Km	10 mg/ml	Roth-H ₂ O	25 µg/ml	25 µg/ml
Tetracyclin (Serva)	Tc	10 mg/ml	75 % EtOH	20 µg/ml	1,5 µg/ml
Spectinomycin (Sigma-Aldrich)	Sp	10 mg/ml	Roth-H ₂ O	10 µg/ml	10 µg/ml
Chloramphenicol (Sigma-Aldrich)	Cam	17 mg/ml	75 % EtOH	34 µg/ml	–
Ampicillin (Roth)	Ap	100 mg/ml	Roth-H ₂ O	200 µg/ml	–

2.5.3 Anzucht von *R. sphaeroides*

Die Kultivierung von *R. sphaeroides* wurde in Malat-Minimalmedium (RÄ-Medium; *Rhodobacter*-Äpfelsäure-Medium, Tabelle 2.6) durchgeführt (Drews, 1983). Dieses wurde durch Autoklavieren sterilisiert und anschließend mit Phosphat- und Vitaminlösung komplettiert, welche zuvor durch Filtration sterilisiert wurden. Antibiotika (Tabelle 2.5) wurden falls benötigt nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

Tabelle 2.6: Zusammensetzung RÄ-Medium für *R. sphaeroides*

RÄ-Medium	1 Liter	Spurenelementlsg.	1 Liter	Vitaminlösung (125×)	1 Liter
Malat	30 g	MnCl ₂ × 4 H ₂ O	20 mg	Nicotinsäure	200 mg
MgSO ₄ × 2 H ₂ O	0,2 g	ZnCl ₂	5 mg	Nicotinamid	200 mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,2 g	LiCl	5 mg	Thiamin/HCl	400 mg
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,07 g	KBr	2,5 mg	Biotin	8 mg
Spurenelementlösung	1,5 ml	KI	2,5 mg		
<i>pH 6,9, autoklavieren</i>		CuSO ₄	0,15 mg	Phosphatlösung (50×)	1 Liter
Vitaminlösung	8 ml	Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	1 mg	K ₂ HPO ₄	45 g
Phosphatlösung	20 ml	CoCl ₂ × 6 H ₂ O	5 mg	KH ₂ PO ₄	30 g
		SnCl ₂ × 2 H ₂ O	0,5 mg		
		BaCl ₂	0,5 mg		
		AlCl ₃	1 mg		
		H ₃ BO ₄	10 mg		
		EDTA	20 mg		
		Fe(III)citrat	500 mg		

2.5.3.1 Plattenkultivierung

Die Anzucht von *R. sphaeroides*-Zellen beginnt mit dem Ausstreichen weniger Zellen aus einer Glycerin-Dauerkultur auf sterilen RÄ-Nährböden. Zur Herstellung der Platten wurde autoklaviertes RÄ-Medium (Tabelle 2.6) mit 1,6 % Bacto Agar (Difco) auf 60 °C abgekühlt, anschließend mit Vitamin- und Phosphatlösung komplettiert sowie gegebenenfalls mit Antibiotika versetzt. Die Lagerung der Platten erfolgt bei 4 °C im Dunkeln. Die Zellen wurden zur Vereinzelnung durch einen Verdünnungsausstrich auf die Platten ausgestrichen und für 3 Tage bei 32 °C inkubiert. Bei der Anzucht von Zellen aus einer Dauerkultur wurden stets Platten mit allen Antibiotika verwendet, gegen die der Stamm resistent ist, aufgrund eines chromosomal- oder plasmidlokalisierten Resistenzgens. Die Kultivierung auf Platten zur Gewinnung von Einzelkolonien wurde außerdem nach der Konjugation (Abschnitt 2.5.4) sowie zur Bestimmung der Anzahl an CFU (*colony-forming units*) nach Experimenten verwendet. Dazu wurden Bakterien aus Flüssigkulturen in geeigneten Verdünnungen mit einem Drigalskispatel oder Glaskugeln auf den Platten verteilt und bei 32 °C inkubiert.

2.5.3.2 Flüssigkultivierung unter mikroaeroben Bedingungen

Für die Anzucht von Flüssigkulturen von *R. sphaeroides* wurde eine Einzelkolonie einer Plattenkultur in 40 ml RÄ-Medium (Tabelle 2.6) in einen 50-ml-Kolben überführt. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte direkt vor der Verwendung des Mediums. Antibiotika, gegen die ein chromosomal lokalisiertes Resistenzgen im verwendeten Stamm vorliegt, wurden in Flüssigkulturen nicht hinzugefügt. Ausnahmen stellen die Anzucht von Stämmen vor und nach einer Konjugation dar (Abschnitt 2.5.4), für die Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen (Abschnitt 2.5.13) sowie für Experimente zur Auswirkung von Antibiotika in Flüssigkulturen. Antibiotika, gegen die ein plasmidlokalisiertes Resistenzgen im verwendeten Stamm vorliegt, wurden dem Medium zum Erhalt des Plasmids hinzugefügt.

Bei der Anzucht von *R. sphaeroides* spielen Sauerstoffgehalt und Lichtverfügbarkeit eine wesentliche Rolle, da diese Bedingungen ausschlaggebend für die Art der Energiegewinnung der Zellen sind. Die Form und Füllhöhe der verwendeten Kolben beeinflussen dabei den Sauerstoffgehalt. In dieser Arbeit wurden die Stämme für Experimente überwiegend unter mikroaeroben Bedingungen angezogen. Vorkulturen wurden stets unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert. Dazu wurden 50- oder 100-ml-Kolben mit einem Volumen von 40 bzw. 75 ml befüllt. Kulturen wurden bei Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{660} 0,4–0,8) überimpft oder zum späteren Animpfen frischer Vorkulturen bei 4 °C für wenige Tage gelagert. Für das Animpfen frischer Kulturen aus Vorkulturen wurden 0,5 bis 2 ml in 40 bzw. 75 ml Medium gegeben. Kolben wurden stets unter konstantem Schütteln (140 rpm) bei 32 °C im Dunkeln inkubiert. Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff einer mikroaeroben Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase beträgt ca. 25–30 μ M (Remes et al., 2015).

2.5.3.3 Eisenmangelbedingungen

Für die Generierung von Eisenmangelbedingungen wurde RÄ-Medium ohne Zusatz von Fe(III)citrat in der Spurenelementlösung verwendet. Die Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen bei 32 °C kultiviert. 100 μ l einer normalen Vorkultur wurden in 40 ml RÄ-Eisenmangelmedium (RÄ -Fe) überimpft, diese Kultur wurde ü. N. angezogen. Das Überimpfen in frisches Eisenmangelmedium wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Aus der dritten Kultur wurden 0,5 bis 2 ml in 75 ml Eisenmangelmedium mit Zusatz

von 30 μM des Eisenchelators 2,2'-Dipyridyl (Merck) überimpft, die Kultur wurde ü. N angezogen (nach Peuser et al., 2011).

2.5.3.4 Photooxidativer Stress

Zur Generierung von photooxidativem Stress wurden *R. sphaeroides*-Zellen unter aeroben Bedingungen im Licht unter Anwesenheit eines *photosensitizers* (Methylenblau, Sigma-Aldrich) kultiviert. Dazu wurden mikroaerob angezogene Vorkulturen in der frühen exponentiellen Phase (OD_{660} 0,4–0,6) auf eine OD_{660} von 0,2 in einem Gesamtvolumen von 80 ml in RÄ-Medium verdünnt. Die verdünnten Kulturen wurden in Meplatflaschen angesetzt. Dunkelkontrollen wurden lichtdicht in Alufolie eingepackt. Anschließend wurden die Kulturen mit 0,2 μM Methylenblau versetzt (16 μl aus 1 mM Stock) und in einem Wasserbad (32 °C) unter konstanter Begasung mit Sauerstoff kultiviert. Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff beträgt dabei ca. 180 μM (Frühwirth et al., 2012). Die Kulturen wurden zunächst für eine Verdopplungszeit (ca. 3–4 Stunden) an diese Bedingungen gewöhnt. Zur Erzeugung von Singulett-sauerstoff ($^1\text{O}_2$) wurden die aeroben Kulturen für eine Zeitdauer von 20 Minuten mit Weißlicht einer Halogenlampe bestrahlt, sodass die mittlere Lichtintensität in den Kulturen ca. 800 W/m^2 betrug. Vor Anschalten des Lichts wurden 20 ml aus den Kulturen entnommen (t_0) sowie nach 7 oder 20 Minuten Singulett-sauerstoffstress (t_7 , t_{20}). Die Zellen wurden wie unter 2.5.5 beschrieben geerntet und im Anschluss für RNA-Extraktion (Abschnitte 2.6.11 und 2.6.10) verwendet.

2.5.4 Konjugation von Plasmid-DNA nach *R. sphaeroides*

Zur Einführung eines Plasmids in *R. sphaeroides* wurde die *E. coli*-vermittelte Konjugation angewendet. Der *E. coli*-Donorstamm S17-1 verfügt über die chromosomal integrierten *tra*-Gene des RP4-Plasmids und besitzt dadurch die Fähigkeit, Plasmide durch Konjugation in einen gram-negativen Empfängerstamm zu transferieren. Zunächst wurden Zellen von S17-1 durch das zu konjugierende Plasmid transformiert (Abschnitt 2.5.10). 100 μl einer Übernachtskultur von S17-1 wurden mit 1 ml einer exponentiellen *R. sphaeroides*-Kultur gemischt. Die Bakterien wurden zentrifugiert (1500 g / 4000 rpm, 4 min, RT), das Zellsediment in 1 ml RÄ ohne Antibiotikazusatz gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in einem geringen Volumen (80–100 μl) RÄ-Medium aufgenommen und auf ein Filterpapier (Whatman™ Membrane Filters Cellulose Nitrate, GE Healthcare Life Sciences) auf einer PY-Agarplatte (Tabelle 2.7) getropft, auf welcher der Vorgang der Konjugation erfolgt. PY (*Peptone Yeast*) ermöglicht sowohl das Wachstum von *R. sphaeroides* als auch von *E. coli*. Alternativ zur Vereinigung von Zellmaterial aus zwei Flüssigkulturen wurde 1 ml einer *R. sphaeroides*-Kultur abzentrifugiert, das Zellsediment in 80 μl RÄ-Medium resuspendiert, anschließend mit S17-1-Zellmaterial von einer dicht gewachsenen Platte durch eine Impföse versetzt und gemischt und diese Suspension auf den Filter übertragen. Die PY-Platte wurde für mindestens 4 Stunden und maximal ü. N. bei 32 °C inkubiert. Anschließend wurde der Filter in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen wurden mit 1 ml RÄ-Medium vorsichtig durch Pipettieren ab gespült. Je 50–100 μl verschiedener Verdünnungsstufen der Zellsuspension wurden auf RÄ-Agarplatten mit allen zur Selektion benötigten Antibiotika ausplattiert und bei 32 °C für 3–4 Tage inkubiert. Nach Konjugationen von *suicide*-Plasmiden zur Generierung von Knockout-Stämmen durch chromosomale Insertion einer Resistenzkassette wurde zunächst nur auf das Vorhandensein der Kassette selektioniert. Klone wurden anschließend sowohl auf Platten mit den Antibiotika der Resistenzkassette und des *suicide*-Plasmids als auch auf Platten mit lediglich dem Antibiotikum der Resistenzkas-

sette überstrichen, um auf den Verlust des Plasmids und die Integration der Kasette zu selektionieren. Bei Konjugationen replikationsfähiger Plasmide wurde das entsprechende Antibiotikum zum Erhalt des Plasmids verwendet sowie gegebenenfalls ein weiteres Antibiotikum, gegen das der Stamm bereits eine Resistenz aufweist. Potenziell positive Klone wurden zur Gewinnung von mehr Zellmaterial auf frische Platten überstrichen. Mikroaerobe 40-ml-Flüssigkulturen mit Zusatz aller Antibiotika, gegen die der Stamm nach der Konjugation eine Resistenz aufwies, wurden mit dem überstrichenen Zellmaterial angeimpft, ü. N. bis zu einer OD_{660} von 0,6–0,8 kultiviert und für die Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen verwendet (Abschnitt 2.5.13). Die Integration der Resistenzkasette bzw. das Vorhandensein der konjugierten Plasmide wurden durch Kolonie-PCR (Abschnitt 2.6.1.2) überprüft.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung PY-Medium für Agarplatten, pH 7,0

	Mengen für 500 ml	Endkonz.
Bacto Trypton	5 g	1 %
Hefeextrakt	0,25 g	0,05 %
CaCl ₂ (1 M)	1 ml	2 mM
MgCl ₂ (1 M)	1 ml	2 mM
FeSO ₄ (0,5 %)	1,2 ml	0,0012 %
Bacto Agar	8 g	1,6 %

2.5.5 Zellernte von *R. sphaeroides*

Für die Gewinnung von Zellen zur Proteinanalyse oder RNA-Isolierung wurden *R. sphaeroides*-Kulturen nach Abschluss eines Experiments in gekühlte und mit 5 g Eis versehene 40-ml-Zentrifugenröhrchen überführt, um ein direktes Anhalten zellulärer Reaktionen zu bewirken. Bei einem größeren Erntevolumen wurde die Kultur auf zwei Röhrchen verteilt. Die Zentrifugation erfolgte bei 20.000–24.000 g (Rotor SA600 oder SS-34) und 4 °C für 10 min. Zellsedimente wurden anschließend in 800 µl kaltem RÄ-Medium (für RNA-Extraktion) oder TBS_R für Proteinanalyse (Tabelle 2.19) resuspendiert, in 1,5-ml-Gefäße überführt und bei 16.000 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden bis zur Verwendung bei -20 °C oder nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

2.5.6 *In vivo* Photoreaktivierung

Beim *in vivo* Photoreaktivierungsexperiment wurden *R. sphaeroides*-Stämme auf die Überlebensfähigkeit von UV-Strahlung untersucht. Zur Regenerierung durch lichtvermittelte Reparatur wurden die Zellen nach der UV-Behandlung einer photoreaktivierenden Lichtquelle ausgesetzt. Die Untersuchungen sind unterteilt in Endpunkt-Überlebensraten nach mindestens 3 Stunden Photoreaktivierungszeit sowie Kinetik mit unterschiedlichen Zeitdauern im photoreaktivierenden Licht. Außerdem wurde das Experiment bei unterschiedlichen Lichtintensitäten durchgeführt sowie unter Eisenmangelbedingungen. Plasmidhaltige Stämme (pRK415-basiert) wurden stets in Anwesenheit von Tetracyclin angezogen und für das Experiment in tetracyclinfreiem Medium verdünnt sowie auf tetracyclinfreien RÄ-Nährböden ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 32 °C. Das Experiment erfolgte in einem abgedunkelten Raum mit Rotlicht, sodass die Dunkelkontrollplatten zwischen UV-Behandlung und dem Einpacken in Alufolie nicht mit Licht in Kontakt kamen.

2.5.6.1 Endpunkt-Überlebensraten

Mikroaerobe Übernachtkulturen von *R. sphaeroides* wurden in einem Volumen von 75 ml bis zu einer OD_{660} von 0,7–0,8 kultiviert. 50 μl einer $0,5 \times 10^{-6}$ -Verdünnung in RÄ-Medium wurden mit 5 Glasperlen auf RÄ-Agar ausplattiert. Je Stamm wurden vier Platten vorbereitet. Zwei Platten wurden ohne Deckel einer Dosis von 100 J/m^2 UV-Licht (254 nm) ausgesetzt (UV Stratalinker 1800, Stratagene). Eine davon wurde direkt im Anschluss unter einer Weißlichtlampe (TL-D 58W/25) bei einer Lichtintensität von $50 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ für mindestens 3 Stunden inkubiert und im Anschluss in Alufolie verpackt. Die andere wurde in Alufolie verpackt und im Dunkeln inkubiert. Kontrollplatten ohne UV-Behandlung wurden auf gleiche Weise in Licht und Dunkelheit inkubiert. Nach 3–4 Tagen wurden die Kolonien (*colony-forming units*, CFU) gezählt und die Überlebensraten der Licht- und Dunkelansätze als Verhältnis zwischen CFU auf UV-behandelten Platten zu nicht behandelten Kontrollplatten berechnet.

2.5.6.2 Photoreaktivierungskinetik

Für die Bestimmung der Überlebensraten nach unterschiedlichen Zeitdauern in photoreaktivierendem Licht wurden die Zellen wie unter 2.5.6.1 beschrieben kultiviert und verdünnt. Je Stamm wurde für jeden Zeitpunkt eine Platte vorbereitet. Nach der Behandlung mit UV-Licht wurden die Platten unter Weißlicht ($50 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten (1, 5, 10, 20, 30 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden, 4 Tage) aus dem Licht entfernt und zur weiteren Inkubation in Alufolie verpackt. Eine Dunkelkontrolle (0 Minuten Licht) wurde direkt nach der UV-Behandlung in Alufolie verpackt. Für die Zeitpunkte 0 Minuten (Dunkelheit), 30 Minuten und 3 Stunden wurde jeweils eine Kontrollplatte ohne UV-Behandlung mitgeführt. Nach 3–4 Tagen wurden die Kolonien gezählt und Überlebensraten zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Lichtinkubation als Verhältnis der CFU von UV-behandelten Platten zum Mittelwert der drei nicht UV-behandelten Platten berechnet.

2.5.6.3 Lichtintensitäten

Die Intensität des für die Photoreaktivierung benötigten Lichts wurde durch die Belichtung UV-behandelter Zellen mit unterschiedlichen Lichtintensitäten von 1, 3, 6, 15, 50 und $80 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ untersucht. Für jede Stufe wurde eine Kontrollplatte mitgeführt. Anzucht, Verdünnung und Ausplattieren wurden wie in 2.5.6.1 beschrieben durchgeführt. Nach 3–4 Tagen wurden die Kolonien gezählt und die Überlebensraten als Verhältnis der CFU von UV-behandelten Platten zum Mittelwert der nicht UV-behandelten Platten berechnet.

2.5.6.4 Eisenmangelbedingungen

Kulturen wurden unter Eisenmangelbedingungen (Abschnitt 2.5.3.3) in einem Volumen von 75 ml unter Anwesenheit von $30 \mu\text{M}$ 2,2'-Dipyridyl bis zu einer OD_{660} von 0,6–0,7 kultiviert. Die UV-Behandlung sowie anschließende Licht- bzw. Dunkelinkubation wurden aufgrund von Eisenspuren in Agar in Flüssigmedium durchgeführt, um die Anwesenheit von Eisen während des Experiments zu minimieren. Für die spätere Bestimmung der CFU wurden die Zellen erst nach einer Photoreaktivierungszeit von 5 Stunden auf RÄ-Platten ausplattiert. Für das Experiment wurden die Zellen in einem Volumen von 20 ml RÄ-Fe mit $30 \mu\text{M}$ 2,2'-Dipyridyl in einer Petrischale verdünnt (10^{-6}) und mit UV-Licht (100 J/m^2) behandelt. 50 μl wurden direkt nach der UV-Behandlung im Dunkeln ausplattiert und in Alufolie verpackt, die Petrischale wurde anschließend in Weißlicht ($50 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) inkubiert. Ein Kontrollansatz ohne UV-Behandlung

wurde auf gleiche Weise mitgeführt. Nach 5 Stunden Weißlichtinkubation wurden erneut 50 µl im Dunkeln ausplattiert. Zur Vergleichbarkeit mit Normalbedingungen (eisenhaltig) wurde das Experiment auf gleiche Weise in normalem RÄ-Flüssigmedium durchgeführt. Überlebensraten wurden aus dem Verhältnis der CFU von UV-behandelten zu nicht behandelten Platten berechnet.

Die Bestimmung der Photoreaktivierungskinetik unter Eisenmangelbedingungen wurde ebenfalls in Flüssigmedium durchgeführt. Zu den unter 2.5.6.2 beschriebenen Zeitpunkten wurden den Kulturen jeweils 50 µl entnommen und im Dunkeln ausplattiert. Für die Zeitpunkte 0 Minuten, 30 Minuten, 3 Stunden und 5 Stunden wurden nicht UV-behandelte Kontrollen mitgeführt. Zur Berechnung der Überlebensraten wurden die CFU-Werte aus UV-behandelten Ansätzen der ersten Stunde auf den Kontrollwert (nicht UV-behandelt) zum Zeitpunkt 30 Minuten bezogen; die beiden letzten Werte (3 und 5 Stunden) wurden auf ihren jeweiligen Kontrollwert zu gleichen Zeitpunkten bezogen, aufgrund des Weiterwachsens der Zellen in Flüssigmedium während der Photoreaktivierungsphase.

2.5.7 Bakteriochlorophyllbestimmung

Für die Bestimmung des Bakteriochlorophyllgehaltes wurde 1 ml einer *R. sphaeroides*-Kultur geerntet (16.000 g, 5 min, RT) und das Zellsediment in 50 µl ddH₂O rückgelöst. Zu den gelösten Zellen wurden 500 µl eines 7:2-Gemisches aus Aceton:Methanol hinzugegeben. Die Proben wurden für 10 Sekunden gevortext und anschließend zentrifugiert (16.000 g, 5 min, RT), um Zelltrümmer zu entfernen. Die Absorption des Überstandes wurde in einer Quarzküvette (Suprasil®, Schichtdicke 10 mm, Hellma) im Spektralphotometer bei 770 nm gegen Aceton:Methanol (7:2) gemessen. Die Absorptionswerte geben den relativen Gehalt an gelöstem Bakteriochlorophyll wieder, das in Aceton:Methanol ein Absorptionsmaximum von 770 nm aufweist. Die Werte wurden auf die Zelldichte (OD₆₆₀) der Kultur zum Zeitpunkt der Ernte normalisiert.

2.5.8 Anzucht von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli*-Flüssigkulturen erfolgte in Standard-Nährmedium I (St-I, Roth). Für die Plattenkultivierung auf festen Nährböden wurde Standard-Nähragar I (St-I Agar, Roth) verwendet. Beide Medientypen wurden zur Sterilisation autoklaviert. Die Zugabe von Antibiotika zu Nähragar erfolgte nach Autoklavieren und anschließendem Abkühlen des Mediums auf ca. 60 °C. Platten wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Zugabe von Antibiotika zu Flüssigkulturen erfolgte direkt vor Verwendung. Zur Anzucht auf Nährböden wurden Zellen aus einer Bakteriendauerkultur entnommen und durch einen Verdünnungsausstrich vereinzelt. Die Anzucht auf Platten zur Gewinnung von Einzelkolonien erfolgte außerdem nach der Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA (Abschnitt 2.5.10). Hier erfolgte die Vereinzelnung durch Ausplattieren einer Bakteriensuspension mit einem Drigalskispatel. Platten wurden ü. N. bei 37 °C inkubiert. Zur Anzucht von Flüssigkulturen wurden Einzelkolonien von Platten mit einer Impföse in Medium überführt (25 ml in 100-ml-Kolben oder 10 ml in 50-ml-Kolben) und unter konstantem Schütteln bei 180 rpm und einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Für Plasmidisolierung (Abschnitt 2.6.3) bestimmte Kulturen wurden in Glasröhrchen in einem Volumen von 3 ml Medium, Vorkulturen zur Proteinüberexpression (Abschnitt 2.5.11) in einem Volumen von 25 ml Medium in 100-ml-Erlenmeyerkolben ü. N. angezogen. Für die Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen (Abschnitt 2.5.13) wurden Zellen in 10 ml Medium in 50-ml-Erlenmeyerkolben entweder für einige Stunden oder ü. N. angezogen.

2.5.9 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Einführung von Plasmid-DNA in *E. coli* wurde die Elektrotransformation (Abschnitt 2.5.10) angewendet. Dabei ist es wichtig, dass die Elektroporation unter salzfreien Bedingungen abläuft, da Salze beim Anlegen der Spannung während der Transformation einen Kurzschluss verursachen können. Die Herstellung elektrokompetenter Zellen beinhaltet daher lediglich die Anzucht sowie das gründliche Waschen der Zellen, um das ionenhaltige Medium so rückstandsfrei wie möglich zu entfernen. Dazu wurde eine Übernachtskultur von einer Einzelkolonie von Platte in 25 ml St-I Medium (ggf. mit Antibiotikazusatz für den Erhalt eines bereits vorhandenen Plasmids oder bei Vorhandensein eines chromosomal lokalisierten Resistenzgens) angeimpft und am nächsten Morgen 5%ig in 500 ml frisches Medium in einem 2-Liter-Kolben angeimpft. Die Kultur wurde bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{600} von 0,5–0,7 bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt und anschließend für 15–30 Minuten auf Eis abgekühlt. Die Kultur wurde in 250-ml-Zentrifugenbecher aufgeteilt, bei 4000 g (5000 rpm Rotor GSA, Sorvall) und 4 °C geerntet und der Überstand verworfen. Die Zellsedimente wurden vorsichtig in insgesamt 500 ml kaltem Roth-H₂O resuspendiert. Die Suspensionen wurden erneut zentrifugiert (4000 g, 4 °C, 10 Minuten) und die Sedimente in 250 ml kaltem Roth-H₂O rückgelöst. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellsedimente in insgesamt 10 ml kaltem 10%igem Glycerin rückgelöst und in 40-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 2000 g (4000 rpm Rotor SS-34, Sorvall) und 4 °C für 10 Minuten wurden die Zellen in insgesamt 2–3 ml kaltem 10%igem Glycerin resuspendiert und zügig in Portionen à 50 oder 100 µl aliquotiert, in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.5.10 Elektrotransformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli*-Zellen zur Vervielfältigung von Plasmiden bei der Klonierung oder zur Herstellung von Expressionsstämmen erfolgte durch Elektroporation. 50 µl kompetente Zellen (Abschnitt 2.5.9) je Transformation wurden auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA gemischt. Das Volumen der Plasmid-DNA betrug maximal 1/10 des Zellvolumens. Für die Transformation von Ligationsansätzen (Abschnitt 2.6.8) oder PCR-Produkten nach der Mutagenese-PCR (Abschnitt 2.6.1.5) wurden bis zu 5 µl für 50 µl Zellen eingesetzt. Für die Transformation fertiger Plasmid-DNA in Klonierungs- oder Konjugationsstämmen wurden 1–30 ng eingesetzt. Für die Transformation von Plasmiden in Expressionsstämmen, die bereits ein stammeigenes Plasmid enthalten, wurden 50–300 ng eingesetzt. Die Zellen wurden in eine Elektroporationsküvette (Bio-Rad) überführt und im MicroPulser™ (Bio-Rad) für 5–7 ms einer Spannung von 2,5 kV ausgesetzt. Die Zellen wurden direkt im Anschluss mit 500 µl St-I Medium gemischt und für eine Stunde bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurden die Zellen auf Nährböden mit Antibiotikazusatz ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

2.5.11 Anzucht von *E. coli* für Proteinüberexpression

Für die Überexpression von Proteinen zur chromatographischen Aufreinigung wurden spezifische Expressionsstämmen und -bedingungen angewendet, die für das jeweilige Protein geeignet sind. Die Expression von CryB und dessen Varianten erfolgte vom pET28a-Vektor, dessen *multiple cloning site* (MCS) unter Kontrolle eines T7-Promotors steht. Aus diesem Grund erfolgt die Expression nur in Stämmen, die eine T7-Polymerase kodieren. So wird eine vorzeitige Expression des Proteins in anderen Stämmen (z. B. in DH5α während der Klonierung) vermieden. Stämme mit diesem Expressionssystem enthalten das λDE3-Lysogen, das die T7-Polymerase kodiert und sind durch den Zusatz „(DE3)“ gekennzeichnet. Auch

die Expression der T7-Polymerase ist kontrollierbar, da ihr Gen unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors steht, der durch Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbar ist. IPTG ist ein Analog der Allostactose, wird im Gegensatz zu dieser jedoch nicht verstoffwechselt. Es hebt die inhibierende Wirkung des *lac*-Repressors auf und erlaubt so das Ablesen des *lac*-Promotors (Donovan et al., 1996). Dies verhindert ein vorzeitiges Ablesen des Promotors im Expressionsstamm. Für die Expression von CryB und dessen Varianten wurde der Stamm BL21(DE3)pLysS (Stratagene) verwendet. Dieser verfügt über das Plasmid pLysS, auf dem das T7-Lysozym kodiert ist, ein T7-Polymerase-Inhibitor, durch den zusätzlich zu den anderen Kontrollmechanismen eine Hintergrundexpression des Zielproteins reduziert wird. Abweichend davon wurde in manchen Fällen der Stamm Rosetta(DE3) (Novagen) verwendet. Dieser ist ein Derivat von BL21 und verfügt über das Plasmid pRARE, auf dem bestimmte tRNAs kodiert sind, die in *E. coli* selten vorkommen.

Zellen einer Übernacht-Vorkultur wurden in einem Volumen von 0,5 oder 1 Liter in einem 2-Liter-Kolben auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Ab diesem Punkt wurde im Fall von BL21(DE3)pLysS kein Chloramphenicol zum Erhalt des stammeigenen pLysS-Plasmids mehr hinzugefügt. Die Zellen wurden bis zum Erreichen des exponentiellen Wachstums (OD₆₀₀ 0,4–0,6) bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. In dieser Phase wurde die Expression durch Zugabe von 0,1 mM IPTG (Stock 0,5 M) induziert und die Kultur anschließend bei 17 °C und 180 rpm für 24 Stunden weiter inkubiert. Die geringe IPTG-Konzentration sowie geringe Temperatur bewirken eine langsame Induktion sowie ein langsames Zellwachstum, was eine schonende Expression des Proteins ermöglicht.

Die Expression von AppA erfolgte vom pGEX-4T-1-Vektor (Amersham Pharmacia) in *E. coli* JM109. Die Expression des GST-Fusionsproteins steht unter direkter Kontrolle des ebenfalls IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors. Das Animpfen von Vorkulturen erfolgte entsprechend der Expression von CryB, die Induktion in der exponentiellen Phase erfolgte mit 0,5 mM IPTG. Im Anschluss an die Expression wurden die Zellen bei 21 °C und 180 rpm für 6 Stunden inkubiert.

2.5.12 Zellernte von *E. coli* nach Proteinüberexpression

Nach individueller Wachstumsdauer wurden die Zellen durch 20-minütige Zentrifugation bei 8600 g (7000 rpm im Rotor F10S, Sorvall) und 4 °C geerntet. Die Zellsedimente aus einem Liter Expressionskultur wurden in 25 ml Puffer rückgelöst. Die für die CryB-Überexpression verwendeten BL21(DE3)pLysS-Zellen wurden in Ni-NTA-Lysepuffer (pH 8,3) gelöst, JM109 für AppA-Überexpression in PBS (Tabelle 2.19). Die Zellsuspensionen wurden in 50-ml-Gefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur Aufreinigung erfolgte bei -80 °C für maximal 3 Monate.

2.5.13 Herstellung von Dauerkulturen

Um Bakterien eines Klons langfristig zu konservieren, wurden Glycerin-Dauerkulturen hergestellt. Dazu wurden 2 bzw. 4 ml einer dicht gewachsenen *E. coli*-Kultur bzw. einer spät-exponentiellen *R. sphaeroides*-Kultur (OD₆₆₀ ca. 0,7–0,9), die jeweils von einer Einzelkolonie ausgingen und mit allen Antibiotika angezogen wurden, gegen die der entsprechende Stamm resistent ist, bei niedriger Drehzahl geerntet (5.000 rpm, 5 min, RT). Die Zellsedimente wurden in 1 ml St-I- bzw. RÄ-Medium ohne Antibiotika gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellsedimente in 1 ml Medium ohne Antibiotika aufgenommen und mit 0,5 ml 80%igem Glycerin (v/v) gemischt. Die

Glycerinkultur wurde in ein 2-ml-Schraubdeckelgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.5.14 Fluoreszenzmikroskopie

R. sphaeroides-Zellen wurden bis zu einer OD₆₆₀ von 0,6–0,7 kultiviert und 10 µl auf ein 1 × 1 cm großes 1%-Agaroseplättchen auf einem Objektträger gegeben. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen für Lokalisationsstudien wurden mit dem inversen Mikroskop Leica DMI6000 B (Leica, Wetzlar) und einem HCX PL APO 100×/1,4 Objektiv, in Verbindung mit einer sCMOS Kamera und der VisiView Software (Visitron Systems, Puchheim) der AG Thormann (Justus-Liebig-Universität Gießen) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden anschließend in ImageJ bearbeitet.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten (Amplifikation) durch das mehrfache Durchlaufen eines Syntheszyklus mittels einer DNA-Polymerase. Ein Zyklus besteht aus der Denaturierung einer doppelsträngiger DNA-Vorlage (*template*), der Anlagerung (*annealing*) zweier kurzer einzelsträngige DNA-Fragmente (Primer, Oligonukleotidprimer), die komplementär zu den Enden des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes sind, an die einzelsträngige *template*-DNA sowie der Synthese des komplementären Stranges entlang der *template*-DNA (Elongation) durch die Polymerase. Der Übergang zwischen einzel- und doppelsträngigen Bereichen durch die Anlagerung der Primer stellt das Substrat für die DNA-Polymerase dar. Die drei Schritte finden bei unterschiedlichen Temperaturen statt, die Denaturierung erfolgt bei 94–98 °C, das *primer-annealing* in einem sehr variablen Bereich von ca. 45–72 °C und die Elongation bei 72 °C, dem Optimum der DNA-Polymerase. Während eines Zyklus findet eine theoretische Verdopplung des durch die Bindestellen des Primerpaares eingegrenzten genetischen Materials statt. Die PCR-Reaktion enthält eine ausreichende Menge an Desoxyribonukleotiden (dNTPs) für die Synthese des Komplementärstranges sowie an Primermolekülen, da diese in jedem Zyklus in die neu entstandenen Fragmente inkorporiert werden. Diese Fragmente stehen wiederum als *templates* für weitere Verdopplungen in den nächsten Zyklen zur Verfügung. Die mehrfache Wiederholung dieser Verdopplung (je nach Anwendung ca. 25–40 Zyklen) führt somit zu einer exponentiellen Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes. Aufgrund der hohen Temperaturen (94–98 °C) zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA im ersten Schritt eines jeden Zyklus hat sich die Verwendung der hitzestabilen *Taq*-DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* etabliert (Saiki et al., 1988). Für bestimmte Anwendungen ist die Verwendung einer *proofreading*-Polymerase vorteilhaft, deren Fehlerrate geringer als bei der *Taq*-Polymerase ist. Vorhandensein, Reinheit und Größe von PCR-Produkten wurden im Anschluss an eine PCR durch TAE-Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Abschnitt 2.6.5). Für alle PCRs (außer qrtPCR) wurde der S1000™ oder der T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) verwendet. Im Folgenden werden verschiedene in dieser Arbeit verwendete Varianten der PCR für unterschiedliche Anwendungen beschrieben.

2.6.1.1 *Taq*-PCR

Zur Überprüfung des Vorhandenseins eines bestimmten DNA-Abschnittes in einer Probe eignet sich die Verwendung der *Taq*-Polymerase ohne *proofreading*-Funktion, da das PCR-Produkt lediglich zur Analyse auf einem Gel betrachtet und nicht weiterverwendet wird (analytische PCR) und Mutationen keine Auswirkung haben. Diese Art der PCR wurde zum einen zur Detektion von DNA-Abschnitten in *R. sphaeroides* nach Konjugation mit Plasmid-DNA (Kolonie-PCR, Abschnitt 2.6.1.2) und zum anderen zur Überprüfung von Kontaminationen mit chromosomaler DNA in RNA-Proben nach DNase-Verdau eingesetzt (Abschnitt 2.6.11). Eine weitere Anwendung war die Gewinnung von DNA-Fragmenten zur radioaktiven Markierung als Sonden für die Northern-Hybridisierung. Hierbei handelt es sich nicht um eine analytische PCR, dennoch war die Verwendung der *Taq*-Polymerase ausreichend, da bei dieser Anwendung Sequenzfehler tolerierbar sind. Die Zusammensetzungen der verschiedenen PCR-Reaktionen sind in Tabelle 2.8 zusammengefasst. Die initiale Denaturierung erfolgte bei der *Taq*-PCR für 3 Minuten, die Denaturierungsschritte bei 94 °C, Denaturierung und *primerannealing* während der Zyklen jeweils für 30 Sekunden, die Elongationszeit variierte mit der Größe des erwarteten Produktes. Es folgte eine finale Elongation nach dem Durchlaufen der Zyklen für 7 Minuten.

Tabelle 2.8: Reaktionen für *Taq*-PCR

	<i>Taq</i> -PCR mit Plasmid-DNA / Kolonien	<i>Taq</i> -PCR mit chrom. DNA / RNA-Proben
	Menge (Endkonz.)	Menge (Endkonz.)
10× <i>Taq</i> -Puffer	1 µl	1 µl
dNTPs (10 mM <i>each</i>)	0,2 µl (200 µM <i>each</i>)	0,1 µl (100 µM <i>each</i>)
Primer <i>fwd</i> (10 µM)	0,5 µl (0,5 µM)	0,6 µl (0,6 µM)
Primer <i>rev</i> (10 µM)	0,5 µl (0,5 µM)	0,6 µl (0,6 µM)
5× Q-Solution	2 µl (nur bei Kolonie-PCR)	–
<i>Template</i> -DNA	20–30 ng oder Kolonie	40 ng (DNA / RNA)
<i>Taq</i> -Polymerase (1 u/µl)	0,2 µl	0,2 µl
Roth-H ₂ O	ad 10 µl	ad 10 µl

2.6.1.2 Kolonie-PCR (*Taq*)

Die Kolonie-PCR stellt eine Form der analytischen PCR dar und wurde angewandt, um die Aufnahme eines Plasmids oder Integration einer Resistenzkassette ins Chromosom nach der Konjugation in *R. sphaeroides* zu überprüfen. Dazu wurden mehrere identische Reaktionen mit einem Volumen von 10 µl angesetzt (Zusammensetzung Tabelle 2.8). Mit einer Pipettenspitze wurde wenig Zellmaterial von Konjugationsklonen von Platten in die Reaktionsgefäße überführt. Als Negativkontrolle dienten Stämme, die das Plasmid nicht enthielten, als Positivkontrolle, sofern vorhanden, Stämme, die das Plasmid bereits enthielten. Eine weitere Reaktion enthielt ca. 20–30 ng des entsprechenden aufgereinigten Plasmids anstelle von Zellmaterial. Die initiale Denaturierungszeit wurde aufgrund der schwierigeren Zugänglichkeit der DNA im Zellmaterial auf 7 Minuten verlängert. Die Zyklenzahl betrug 35.

2.6.1.3 PCR mit chromosomaler DNA bzw. RNA-Proben (*Taq*)

Für die Überprüfung von DNA-Kontaminationen in RNA-Proben wurden Primer für ein willkürlich ausgewähltes, chromosomal lokalisiertes Gen aus *R. sphaeroides*, *gloB* (RSP_0799), verwendet. Es wurden 40 ng RNA und als Positivkontrolle 40 ng chromosomale DNA in 10- μ l-Reaktionen eingesetzt (Tabelle 2.8). Es wurden 30 Zyklen durchlaufen. Das Ausbleiben von PCR-Produkten zeigte eine Abwesenheit von DNA in den RNA-Proben an.

2.6.1.4 PCR zur Gewinnung von Fragmenten für die Klonierung

Für die Amplifikation von Fragmenten zur Klonierung von proteinkodierenden Abschnitten ist die Korrektheit der Sequenz essenziell. Hier wird die Phusion DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific) mit Korrekturlesefunktion (*proofreading*) eingesetzt. Im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase hat die Phusion eine 50-fach geringere Fehlerrate. Um das PCR-Produkt für die folgenden Klonierungsschritte Restriktionsverdau und Ligation zu verwenden, wurden durch die Primer Sequenzen von Schnittstellen für Restriktionsenzyme an beide Enden des Produktes angehängt. Denaturierungsschritte erfolgten bei der Phusion-PCR bei 98 °C, die initiale Denaturierung für 30 Sekunden. Denaturierungsschritte während der Zyklen dauerten 10 Sekunden und das *primerannealing* ebenfalls 10 Sekunden. Die Elongationszeiten variierten mit den erwarteten Produktgrößen zwischen 30 Sekunden und 2 Minuten. Es wurden 30 Zyklen durchlaufen, gefolgt von einer finalen Elongation für 10 Minuten. Die Reaktionszusammensetzung ist in Tabelle 2.9 zusammengefasst. Es wurden mehrere identische 10- μ l-Reaktionen angesetzt.

2.6.1.5 Inverse PCR zur Einführung von Punktmutationen

Für das Einfügen von Basenaustauschen in eine DNA-Sequenz wurde in dieser Arbeit eine Form der *site-directed mutagenesis* PCR angewandt. Dabei werden im Gegensatz zu einer normalen PCR zwei Primer verwendet, die am 5'-Ende partiell komplementär sind, an der gleichen Stelle der *template*-Sequenz binden und entgegengesetzt zueinander ausgerichtet (*inverse* PCR) sind, die 3'-Enden weisen voneinander weg (Zheng et al., 2004; Liu und Naismith, 2008). Als *template* dient ein Plasmid, welches während der PCR komplett repliziert wird. Das PCR-Produkt ist das gesamte Plasmid in linearer Form und mit überhängenden Enden nach der Aneinanderlagerung zum Doppelstrang, da die Primer an der Bindestelle versetzt voneinander mit überlappendem Bereich binden. An den überhängenden Einzelstrangstellen kann sich das Plasmid wieder in seinen ringförmigen Zustand zusammenlagern, ist jedoch zunächst noch an den beiden Übergangsstellen einzelsträngig offen. Diese Form wird auch als „*nicked*“ Plasmid bezeichnet (Liu und Naismith, 2008) und wird erst nach der Transformation in *E. coli in vivo* ligiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden so gewählt, dass genau 16 Basen des 5'-Endes des Primerpaares komplementär zueinander sind und an den 3'-Enden jeweils 12 Basen nicht komplementär, somit beträgt die Gesamtlänge jedes Primers 28 Basen (Abbildung 2.1). Genau in der Mitte des komplementären Teils befindet sich ein bis drei Basen, die nicht der *template*-Sequenz entsprechen. So befindet sich im linearen PCR-Produkt an dieser Stelle eine bis drei andere Basen als in der *template*-Sequenz. Bei dieser *inverse* PCR findet im Gegensatz zur normalen PCR keine exponentielle, sondern eine lineare Vermehrung des *templates* statt. Daher ist eine höhere Menge an Ausgangsmaterial nötig. In dieser Arbeit wurde diese Methode zur Veränderung von Codons in proteinkodierenden Sequenzen von *cryB* genutzt. Als *templates* wurden Plasmide geringer Größe verwendet, die in einer PCR problemlos repliziert werden können. Für Sequenzveränderungen in *cryB* in Konstrukten zur Proteinüberexpression in

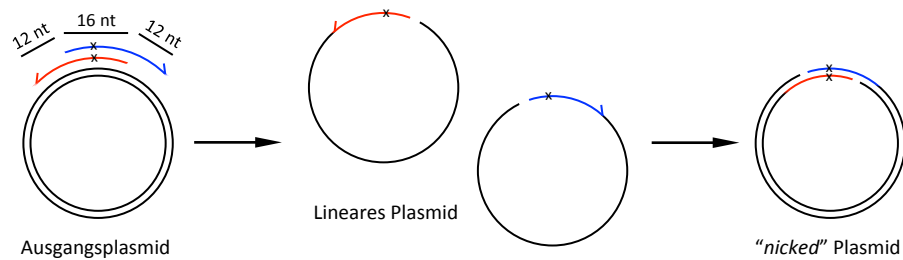


Abbildung 2.1: Prinzip der Mutagenese durch *inverse* PCR. x = Basenaustausch. Erklärungen siehe Text

E. coli diente pETcryB (6838 bp) als Ausgangs-*template*; für Konstrukte zur Transformation in *R. sphaeroides* wurde zunächst pDRIVEcryB (5555 bp) für die Mutagenese-PCR verwendet und das *insert* im Anschluss in den größeren Vektor pRK415 kloniert. Plasmid-DNA wurde in einer Menge von 200–500 ng je 10- μ l-Reaktion eingesetzt. Da auch hier die Fehlerfreiheit der Sequenz essenziell ist, wurde die Phusion DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Es wurden jeweils mehrere identische 10- μ l-Reaktionen angesetzt (Tabelle 2.9), da sich dies als effizienter erwies als ein größeres Volumen. Die Reaktionszeiten und -temperaturen entsprechen den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen. Bei der Mutagenese-PCR ist eine hohe *annealing*-Temperatur wichtig (wenn möglich 72 °C). 3- μ l-Proben der Reaktionen wurden auf einem Agarosegel analysiert, der Rest der Ansätze wurde vereinigt und einem DpnI-Verdau unterzogen (Abschnitt 2.6.4.3). Nach Aufreinigung über präparative Gelelektrophorese und Gelextraktion (Abschnitte 2.6.5 und 2.6.7) wurden bis zu 5 μ l des linearen Plasmids in 50 μ l *E. coli* DH5 α transformiert (Abschnitt 2.5.10). Eine vorherige Ligation ist nicht nötig, da eine *in vivo* Ligation des Plasmids in *E. coli* stattfindet und es dort als ringförmiges Plasmid repliziert werden kann.

Tabelle 2.9: Reaktionen für Phusion-PCR

	Phusion-PCR	Phusion-PCR für Mutagenese
	Menge (Endkonz.)	Menge (Endkonz.)
5 \times HF oder GC Puffer	2 μ l	2 μ l
dNTPs (10 mM <i>each</i>)	0,2 μ l (200 μ M <i>each</i>)	0,2 μ l (200 μ M <i>each</i>)
Primer <i>fwd</i> (10 μ M)	0,5 μ l (0,5 μ M)	0,2 μ l (0,2 μ M)
Primer <i>rev</i> (10 μ M)	0,5 μ l (0,5 μ M)	0,2 μ l (0,2 μ M)
DMSO (nur bei GC-Puffer)	0,2 μ l	0,2 μ l
Phusion Polymerase (2 u/ μ l)	0,1 μ l	0,1 μ l
Plasmid-DNA	10–100 ng	200–500 ng
Roth-H ₂ O	ad 10 μ l	ad 10 μ l

2.6.1.6 Quantitative *real-time* PCR

Die quantitative *real-time* PCR (qrtPCR) ermöglicht die Quantifizierung von DNA während der PCR. In den meisten Anwendungen handelt es sich um eine RT-PCR (Reverse Transkriptase PCR), da das *template* der Reaktion cDNA (*complementary* DNA) ist, die zuvor von einem RNA-Transkript in cDNA umgeschrieben wurde. In dieser Arbeit wurde die Reaktion mit dem Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QRT-PCR Master Mix (Agilent) durchgeführt, bei dem die cDNA-Synthese und anschließende qrtPCR-Reaktion durch eine Reverse Transkriptase bzw. eine *Taq*-Polymerase in einer Reaktion direkt nacheinander ablaufen. Durch

den Einsatz spezifischer Primer wird bei der cDNA-Synthese lediglich das Zieltranskript umgeschrieben. Der erste Zyklus der folgenden PCR stellt die Zweitstrangsynthese der nach reverser Transkription zunächst einzelsträngigen DNA dar. Von der nun doppelsträngigen DNA ausgehend findet eine Amplifikation statt. Die Quantifizierung geschieht durch die Anwesenheit eines Fluoreszenzfarbstoffes, hier SYBR Green, der an doppelsträngige DNA bindet und in gebundenem Zustand nach Anregung eine 11-fach höhere Fluoreszenz aufweist als ungebunden (Zipper et al., 2004). Die Intensität der Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus durch den C1000™ Thermal Cycler CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad) gemessen. Je mehr Ausgangsmaterial eines bestimmten RNA-Transkriptes bzw. dessen cDNA zu Beginn der PCR vorhanden war, desto früher entsteht eine Erhöhung der Fluoreszenz gegenüber dem Hintergrundsignal. Der Zyklus, ab dem sich die Fluoreszenz deutlich vom Hintergrundsignal abhebt (zu Beginn der exponentiellen Phase), wird als Schwellenwert-Zyklus (*threshold cycle*, *Ct*) bezeichnet und ist ein relatives Maß für die Menge an Ausgangs-*template*. Da die absoluten Ausgangsmengen nicht bekannt sind, handelt es sich um eine relative Quantifizierung. Die Berechnung erfolgte nach Pfaffl (2001) mit der Formel

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

Die *Ct*-Werte des Zielgens (*target*) werden auf die eines internen Referenzgens oder *housekeeping*-Gens (*ref*) normalisiert. Bei diesem handelt es sich um ein Gen, dessen Expression bei unterschiedlichen Bedingungen oder in unterschiedlichen Stämmen unbeeinflusst ist. So werden Varianzen durch Schwankungen der Gesamttranskriptmengen zwischen den zu vergleichenden Proben ausgeglichen. In dieser Arbeit wurde das Transkript der RNA-Polymerase Untereinheit Z (*rpoZ*) als Referenz verwendet. *Ct*-Werte unbekannter Proben (*sample*) werden in Relation zu einer Referenzprobe (*control*) betrachtet (beispielsweise „Mutante“ zu „Wildtyp“ oder „behandelt“ zu „unbehandelt“). *E* ist die zuvor ermittelte Effizienz der Amplifikation durch das verwendete Primerpaar. Der *ratio*-Wert beschreibt den n-fachen Unterschied des Transkriptlevels der unbekannt Probe in Relation zur Referenzprobe. Da es bei der PCR lediglich darum geht, die Anwesenheit und Menge eines Transkriptes zu detektieren, ist es ausreichend, nur einen Abschnitt des Transkriptes zu amplifizieren, dieser ist in der Regel zwischen 150 und 250 bp lang und durch die Position der Primer definiert. Reaktionsansätze und das PCR-Programm sind in Tabelle 2.10 aufgeführt. Bei der *real-time* PCR werden 40 Zyklen durchlaufen. Neben den angegebenen

Tabelle 2.10: Reaktion und Programm für *real-time* PCR

Reaktion		Programm		
Reagenz	Menge (Endkonz.)	Prozess	Temp. (°C)	Zeit
2× Master Mix (Agilent)	5 µl	Reverse Transkription	50	10'
Primer <i>fwd</i> (10 µM)	0,5 µl (0,5 µM)	Initiale Denaturierung	95	3'
Primer <i>rev</i> (10 µM)	0,5 µl (0,5 µM)	Denaturierung	94	5"
DTT	0,1 µl	<i>Primerannealing</i>	56	5"
RT/RNase Bloc	0,4 µl	Elongation	60	5"
RNA (20 ng/µl)	2 µl	[40 Zyklen]		
Roth-H ₂ O	1,5 µl	Denaturierung	95	10"
		Schmelzkurve	65–95	5"/0,5 °C

biologischen Replikaten wurden stets technische Duplikate durchgeführt (zwei identische Ansätze mit derselben RNA). Die Auswertung erfolgte mit der CFX Manager™ Software Version 1.0 (Bio-Rad).

2.6.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden vor dem präparativen Restriktionsverdau (Abschnitt 2.6.4.1) zwecks Ligation oder vor der radioaktiven Markierung zur Verwendung als Sonden (Abschnitt 2.6.16) mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) isoliert, um die Bestandteile des PCR-Reaktionsgemisches zu entfernen. Dazu wurden mehrere identische 10- μ l-PCR-Ansätze vereinigt. Die Elution erfolgte mit 30 μ l Roth-H₂O.

2.6.3 Plasmidisolierung Alkalische Lyse

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) angewandt. 1,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden bei 16.000 g für 2 Minuten bei RT geerntet. Das Zellsediment wurde in 100 μ l gekühlter Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8)), die direkt vor Verwendung mit 100 μ g/ml RNase A (Qiagen, Stock 100 mg/ml) ergänzt wurde, durch Vortexen resuspendiert und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Das darin enthaltene EDTA komplexiert zweiwertige Ionen, die für Enzyme wie DNasen essenziell sind, wodurch diese inaktiviert werden. Anschließend wurden 200 μ l Lösung II (200 mM NaOH, 1 % SDS) hinzugegeben. Die Suspension wurde durch 4–6-maliges Invertieren gemischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. In diesem Schritt erfolgt die Zelllyse durch SDS und NaOH, außerdem bewirkt der stark alkalische pH-Wert die Denaturierung von linearer chromosomaler DNA, jedoch nicht von zirkulärer Plasmid-DNA, und SDS die Denaturierung von Proteinen. Als letztes wurden 150 μ l gekühlte Lösung III (2 M Essigsäure, 3 M Kaliumacetat) hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde erneut 4–6-mal vorsichtig invertiert und für 10–15 Minuten auf Eis inkubiert. Durch den sauren pH der Lösung wird die Gesamtreaktion neutralisiert. Unter diesen Bedingungen kann die chromosomale DNA nicht in ihre ursprüngliche Form renaturieren und fällt aus, ebenso verhält es sich mit denaturierten Proteinen. Durch eine anschließende Zentrifugation für 10 Minuten bei 16.000 g wurde das Präzipitat sedimentiert. Der Überstand mit den in Lösung befindlichen Plasmidmolekülen wurde zwei weitere Male zentrifugiert, um Reste des Präzipitats gründlich zu entfernen. Die gelösten Plasmide im Überstand wurden durch Zugabe von 1 ml 96%igem Ethanol gefällt und durch 10-minütige Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C sedimentiert. Das Präzipitat wurde anschließend 1–2-mal mit je 500 μ l 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in der Vakuumzentrifuge (Savant SpeedVac Concentrator SC110) für 5 Minuten getrocknet und in 50 μ l Roth-H₂O aufgenommen. Die Lagerung gelöster Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

2.6.4 Restriktionsverdau von DNA

Die Verwendung von Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) zum spezifischen Schneiden von DNA wurde erstmals durch Danna und Nathans (1971) beschrieben. Zu Klonierungszwecken werden Restriktionsenzyme vom Typ II verwendet, die doppelsträngige DNA innerhalb einer meist palindromischen Erkennungssequenz schneiden. Dabei entstehen entweder „blunt ends“ ohne Überhänge oder „sticky ends“ mit Überhängen. Letztere eignen sich für eine anschließende orientierungskontrollierte Ligation zweier Fragmente, z. B. der Insertion eines PCR-Produktes in einen Vektor. Es wurden Restriktionsenzyme und Puffer der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet.

2.6.4.1 Präparativer Verdau und Dephosphorylierung von Vektoren

Für die Vorbereitung von Vektoren und *inserts* zu Klonierzwecken wurden diese mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten, um komplementäre Enden zu erzeugen. Die Gewinnung eines *inserts* erfolgte entweder durch das Herausschneiden aus einem vorhandenen Vektor oder durch das Schneiden eines aufgereinigten PCR-Produktes (Abschnitt 2.6.2), an dessen Enden durch die PCR-Primer zuvor geeignete Schnittstellen angefügt wurden. Um eine Erkennung der Schnittstellen durch Restriktionsenzyme bei PCR-Produkten zu gewährleisten, wurden an den Erkennungssequenzen angrenzend drei weitere willkürliche Basen durch die Primer angefügt. Vektoren enthalten eine Aneinanderreihung von Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme in der *multiple cloning site* (MCS) – durch Verdau mit ein oder zwei Restriktionsenzymen in diesem Bereich erfolgt die Linearisierung des Plasmids. Für den präparativen Verdau zur Gewinnung von ausreichenden Mengen an geschnittenem Vektor und *insert* wurden ca. 5–20 µg Vektor oder 1–5 µg PCR-Produkt mit geeignetem Puffer in einem Volumen von 20–60 µl angesetzt. Dazu wurde 1/10 des Gesamtreaktionsvolumens an Restriktionsenzym (10 u/µl, Endkonzentration 1 u/µl) hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Doppelverdau mit zwei Enzymen wurden sequenziell durchgeführt: zunächst wurde eine doppelte Menge des im verwendeten Puffer weniger optimal funktionierenden Enzyms hinzugegeben und nach einer Stunde das zweite Enzym, so dass beide Enzyme zusammen 1/10 des Reaktionsvolumens ausmachten. Die Reaktion wurde für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert.

Um eine Religation von nur einfach geschnittenen Vektoren zu vermeiden, wurden diese nach dem Verdau einer Dephosphorylierung unterzogen. Dazu wurden zu der Verdaureaktion 8 µl 10× AP-Puffer (NEB), 9 µl Roth-H₂O und 3 µl Antarctic Phosphatase (5 u/µl; NEB) hinzugefügt. Die Reaktion wurde für eine Stunde bei 37 °C weiter inkubiert. Dies wurde auch durchgeführt, wenn der Vektor mit zwei Enzymen geschnitten wurde, da auch hier im Falle eines unvollständigen Verdau eine Religation stattfinden kann. Nach Verdau und Dephosphorylierung wurden die Fragmente über präparative Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt (Abschnitt 2.6.5) und für die Ligation (Abschnitt 2.6.8) verwendet.

2.6.4.2 Analytischer Verdau

Zur Überprüfung der Insertion eines Fragments in einen Vektor wurden Restriktionsverdau in kleinerem Maßstab durchgeführt. Dazu wurden ca. 0,5–1 µg eines Plasmids in einem 10-µl-Reaktionsansatz mit 1 µl 10× Puffer und 1 µl Enzym (10 u/µl) gemischt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Wie auch beim präparativen Verdau erfolgte der Verdau mit zwei Enzymen sequenziell. Die Gesamtreaktion wurde anschließend zur Analyse auf ein TAE-Agarosegel (Abschnitt 2.6.5) aufgetragen.

2.6.4.3 DpnI-Verdau

Der spezielle Fall des Restriktionsverdau mit dem Enzym DpnI wurde ausschließlich nach der *inverse* PCR (Abschnitt 2.6.1.5) zur Mutagenese angewandt, um *template*-Moleküle aus der Reaktion zu entfernen. DpnI verdaut spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA an der Erkennungssequenz 5'-Gm⁶ATC (Weiner et al., 1994). Das als *template* verwendete Ausgangsplasmid unterscheiden sich von der in der PCR neu entstandenen linearen Plasmid-DNA durch die Anwesenheit von Methylierungen, da es zuvor in *E. coli* synthetisiert wurde und gängige *E. coli*-Stämme wie der verwendete DH5α über eine Dam-Methylase verfügen. Bei der Synthese von DNA während der PCR erhält diese keine Methylierungen und ist somit nicht angreifbar für einen Abbau durch DpnI. Insgesamt wurden 35–40 µl aus identischen

10- μ l-PCR-Reaktionen der *inversen* PCR vereinigt und 5 μ l 10 \times Tango-Puffer, 1 μ l DpnI (10 u/ μ l; Thermo Fisher Scientific) hinzugefügt. Die Reaktion wurde mit Roth-H₂O auf ein Volumen von 50 μ l aufgefüllt und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Aufreinigung über ein präparatives Gel und Gel-extraktion (Abschnitte 2.6.5 und 2.6.7), gefolgt von einer Transformation (Abschnitt 2.5.10) des linearen Plasmids in *E. coli*.

2.6.5 TAE-Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten zwecks Analyse oder präparativer Aufreinigung nach der PCR (Abschnitt 2.6.1) oder nach Restriktionsverdau (Abschnitt 2.6.4) erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Hierbei werden lineare DNA-Fragmente nach ihrer Länge aufgetrennt. Durch das Anlegen einer Spannung migrierten die negativ geladenen DNA-Moleküle in Richtung Anode. Kürzere Fragmente laufen dabei schneller durch die Poren des Gels und legen somit eine weitere Distanz zurück als größere Moleküle in der gleichen Zeit. Das Gel liegt dabei vollständig bedeckt durch TAE-Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure 1 mM EDTA) in einer Elektrophoresekammer. Je nach erwarteter Fragmentgröße oder benötigter Auflösung werden Gele unterschiedlicher Agarose-Prozentigkeit hergestellt. Für Fragmente unter 300 bp wurden in der Regel 1,5%ige Gele (w/v), für Fragmente größer als 300 bp 1%ige Gele verwendet. Dazu wurde die jeweilige Menge Agarose (Biozym LE Agarose) in TAE-Puffer aufgeköcht und das Gel nach einer kurzen Abkühlung in Gelschlitten mit geeigneten Kämmen gegossen. Für die analytische Gelelektrophorese wurden Taschen mit einem Füllvolumen von etwa 10 μ l gegossen, präparative Gele erhielten längere Taschen, um größere Volumen von bis zu 90 μ l aufzunehmen. Proben von bis zu 10 μ l Volumen wurden mit 1 μ l 6 \times Ladepuffer (Thermo Fisher Scientific) gemischt, größere Volumen für präparative Gele wurden mit ca. 1/6 des Probenvolumens an Ladepuffer gemischt und in die Taschen pipettiert. Als Längenstandard für 1%ige Gele wurde der GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) verwendet, für 1,5%ige Gele der 100 bp Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 40 bis 80 mA. Gele wurden anschließend in einem Ethidiumbromidbad gefärbt.

2.6.6 Ethidiumbromidfärbung von Nukleinsäuren in Gelen

Sowohl Agarosegele als auch Polyacrylamid-Harnstoffgele wurden zur Sichtbarmachung von DNA bzw. RNA nach erfolgter Elektrophorese (Abschnitte 2.6.5 bzw. 2.6.13) in Ethidiumbromid gefärbt. Ethidiumbromid bindet an Nukleinsäuren, wodurch die Intensität seiner Fluoreszenz nach Anregung durch Licht erhöht wird (Le Pecq und Paoletti, 1966). Agarosegele wurden für 20 Minuten, Polyacrylamid-Harnstoffgele für 2 Minuten in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und anschließend auf einem UV-Tisch (UVT-20 M/W, Herolab) bestrahlt, um Nukleinsäurebereiche als Banden sichtbar zu machen.

2.6.7 Gelextraktion

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen TAE-Agarosegelen (Abschnitt 2.6.5) wurde das QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) oder das innuPREP Gel Extraction Kit (Analytik Jena) nach Herstellerangaben verwendet. Um den Kontakt der DNA mit Ethidiumbromid und UV-Licht zu vermeiden, wurden Gele vor dem Färben in Ethidiumbromid so zurechtgeschnitten, dass nur ein Randbereich des Gels gefärbt und der Hauptbereich nicht mitgefärbt wurde. Anhand der Bandenposition im gefärbten Gelstück wurde die Bande aus dem ungefärbten Gelstück ausgeschnitten und in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. DNA wurde nach der Gelextraktion mit 30 μ l Roth-H₂O eluiert und ein Aliquot von 3 μ l durch

analytische Gelelektrophorese (Abschnitt 2.6.5) überprüft sowie die Menge durch Vergleich mit den Banden des Längenstandards ermittelt. Erhaltene Fragmente wurden für die Ligation oder direkte Transformation (Abschnitte 2.6.8 und 2.5.10) weiterverwendet oder zur Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.6.8 Ligation und Butanolfällung

Bei der Ligation zweier linearer DNA-Fragmente wird das 3'-Hydroxylende des einen Moleküls mit dem 5'-Phosphat des anderen verbunden. Diese Reaktion geschieht an beiden Strängen doppelsträngiger DNA und wird durch die DNA-Ligase katalysiert (Cohen et al., 1973). Die Reaktion wurde in einem Volumen von $20\text{ }\mu\text{l}$ angesetzt. Geschnittener und dephosphorylierter Vektor sowie geschnittenes *insert* (molares Verhältnis 1:3) wurden nach der Gelextraktion oder PCR-Aufreinigung (Abschnitte 2.6.7 und 2.6.2) mit $2\text{ }\mu\text{l}$ $10\times$ T4 DNA Ligasepuffer mit 10 mM ATP (NEB), $1\text{ }\mu\text{l}$ T4 DNA Ligase ($5\text{ U}/\mu\text{l}$; NEB) und $11\text{ }\mu\text{l}$ Roth- H_2O gemischt. Um den Verdau und die Dephosphorylierung zu überprüfen, wurde eine Religationskontrolle mit geschnittenem Vektor, aber ohne *insert* angesetzt sowie als Positivkontrolle ein Ansatz mit 20 ng ungeschnittenem Ausgangsplasmid ohne Ligase. Die Reaktionen wurden über Nacht bei $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und anschließend einer Butanolfällung unterzogen, um Salze zu entfernen, die bei der folgenden Elektrotransformation stören würden. Dazu wurden die Reaktionen mit ddH_2O auf $100\text{ }\mu\text{l}$ aufgefüllt, mit $1100\text{ }\mu\text{l}$ 1-Butanol versetzt und für 10 Sekunden gevortext. Die Fällungsreaktionen wurden bei 16.000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 20 Minuten zentrifugiert und die Präzipitate zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen (16.000 g , 5 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Die DNA wurde für 5 Minuten in der Vakuumentrifuge (Savant Speed-Vac Concentrator SC110) getrocknet und in $12\text{ }\mu\text{l}$ ddH_2O aufgenommen. Jeweils bis zu $5\text{ }\mu\text{l}$ der gefällten Ligationsansätze und Kontrollen wurden für die Elektrotransformation von $50\text{ }\mu\text{l}$ elektrokompetenter *E. coli*-Zellen eingesetzt (Abschnitt 2.5.10).

2.6.9 Vorkehrungen für das Arbeiten mit RNA

Alle Experimente mit RNA wurden unter möglichst RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Für das Lösen von RNA wurde steriles, nukleasefreies Wasser von Roth (Roth- H_2O) verwendet. Für größere Volumen wie Wasch- und Strippingpuffer für Northern Blot oder Lösungen für die RNA-Isolierung wurde ddH_2O zur Inaktivierung von RNasen vor der Verwendung mit $0,1\%$ (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC, Roth) versetzt und autoklaviert.

2.6.10 RNA-Isolierung für Northern Blot

Zur Gewinnung ausreichender Mengen RNA aus *R. sphaeroides*-Zellen für den Northern Blot wurde die „Hot-Phenol“-Extraktion angewandt. Dabei wurden Zellen aus einem Volumen von $15\text{--}20\text{ ml}$ einer exponentiellen Kultur (OD_{660} $0,4\text{--}0,6$) mit $200\text{ }\mu\text{l}$ kaltem Resuspensionspuffer (300 mM Saccharose, 10 mM Natriumacetat (NaOAc, pH 4,5)) durch Pipettieren und Vortexen resuspendiert. Es wurden $250\text{ }\mu\text{l}$ Lysepuffer (2% SDS, 10 mM NaOAc (pH 4,5)) hinzugefügt, die Suspension wurde durch Vortexen gemischt und für 90 Sekunden bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Wasserbad erhitzt, um die Zellen zu lysieren. Nach der Inkubation wurden die Proben erneut gevortext. Es folgte die Zugabe von $500\text{ }\mu\text{l}$ $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmem Phenol (wassergesättigt, nicht stabilisiert, AppliChem Panreac), erneutes Vortexen und Inkubation bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 3 Minuten. Direkt im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße für mindestens 30 Sekunden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach einem kurzen Antauen bei RT zentrifugiert (16.000 g , 15 Minuten , RT). Die obere, RNA-enthaltende wässrige Phase wurde durch Pipettieren in ein neues Reaktionsgefäß

überführt. Die Phenolisierung mit anschließender Schockfrierung, Zentrifugation und Übertragung der wässrigen Phase wurde insgesamt dreimal nacheinander durchgeführt. Im Anschluss wurden der wässrigen Phase 500 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugefügt, die Lösung wurde durch Vortexen gemischt und zentrifugiert (16.000 g, 5 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der RNA mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 4,5) und dem 2,5-fachen Volumen kaltem 96%igem Ethanol versetzt und gevortext. Die Fällung erfolgte bei -20 °C über Nacht. Zur Rückgewinnung wurde die gefällte RNA für mindestens 30 Minuten bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert und das sedimentierte RNA-Präzipitat zweimal mit je 500 µl kaltem 70%igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation je 5 Minuten 16.000 g, 4 °C). Der Rest-Ethanol nach dem letzten Waschschrift wurde vorsichtig durch Pipettieren entfernt und die RNA in der Vakuumzentrifuge (Savant SpeedVac Concentrator SC110) getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 50 µl Roth-H₂O aufgenommen und fortan auf Eis oder zur längeren Lagerung bei 20 °C aufbewahrt.

2.6.11 RNA-Isolierung und DNase-Verdau für *real-time* PCR

Die Isolierung von RNA für die quantitative *real-time* PCR (Abschnitt 2.6.1.6) wurde mit dem peqGOLD TriFast™ Kit (peqlab) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde Zellmaterial aus 15 ml einer *R. sphaeroides*-Kultur bei einer OD₆₆₀ von 0,6 eingesetzt. Die RNA wurde nach der Fällung in 50 µl Roth-H₂O rückgelöst. Um verbliebene Spuren von DNA zu entfernen, wurden die Proben einer Behandlung mit DNase unterzogen. Dazu wurden mindestens 4 u DNase I (Invitrogen) je 10 µg RNA in einem Volumen von 120 µl mit 12 µl 10× DNase-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 20 mM MgCl₂; 500 mM KCl) eingesetzt. Die Reaktion wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, anschließend mit Roth-H₂O auf ein Volumen von 300 µl aufgefüllt und die RNA aufgereinigt. Dazu wurde ein gleiches Volumen Phenol stabilisiert:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1; AppliChem Panreac) zu der Probe gegeben, gevortext und für 10 Minuten bei 16.000 g und RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) gemischt, um Phenolrückstände zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation (3 min, 13.000 rpm, RT) wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 4,5) und einem Volumen Isopropanol gemischt und die RNA ü. N. bei -20 °C gefällt. Die Rückgewinnung der gefällten RNA geschah wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Die RNA wurde auf eine Konzentration von 20 ng/µl verdünnt und für die *real-time* PCR eingesetzt.

2.6.12 Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese für RNA

Die Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von RNA-Proben für die spätere Detektion großer RNA-Transkripte (>500 Basen) mittels Northern Blot verwendet. Für die Detektion kleiner RNAs wurde die im nächsten Abschnitt beschriebene Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese für den sich anschließenden Northern Blot verwendet. Die Verwendung von Formaldehyd bewirkt eine Denaturierung der RNA und ermöglicht eine Separierung nach der Größe (Basen). Für das Gel wurden zunächst 1,1 g Agarose (Biozym LE Agarose) in 80 ml DEPC-H₂O aufgeköcht. Nach kurzem Abkühlen wurden 11 ml 10× MOPS (Tabelle 2.11) sowie 20 ml Formaldehyd unter dem Abzug hinzugegeben. Das Gel wurde in einen 20 × 13 cm große Gelschlitten gegossen. Gelschlitten, Kamm, Laufkammer sowie alle verwendeten Behälter wurden zur Entfernung von RNAsen vor Verwendung mit 1 M NaOH und DEPC-H₂O behandelt. Definierte RNA-Mengen (10 µg) wurden in 1,5-ml-Gefäßen in der Vakuumzentrifu-

ge (Savant SpeedVac Concentrator SC110) vollständig eingedampft, die getrocknete RNA wurde in je 9 µl RNA-Auftragspuffer (Tabelle 2.11) sorgfältig rückgelöst und anschließend zur Denaturierung bei 65 °C für 10 Minuten erhitzt. Die Proben wurden mit je 1 µl Ladepuffer (Tabelle 2.11) versehen und in die zuvor gespülten Taschen des Gels geladen. Der Gellauf erfolgte in 1× MOPS bei 100–120 V für 2–3 Stunden, bis die Bromphenolblau-Lauffront ca. 6,5–8 cm erreicht hat. Während des Laufs wurde der Puffer durch eine Umwälzpumpe gleichmäßig im oberen und unteren Teil der Gelkammer verteilt, um die Ansammlung von Elektrolyten zu vermeiden. Nach dem Lauf wurde das Gel für jeweils 30–60 Minuten zunächst in 250 ml Lösung A (50 mM NaOH, 150 mM NaCl) und anschließend in 250 ml Lösung B (100 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl) unter leichtem Schwenken inkubiert und im Anschluss für den Northern Blot durch die Vakuum-Methode (Abschnitt 2.6.14) verwendet.

Tabelle 2.11: Zusammensetzung eines Formaldehyd-Agarosegels, RNA-Auftrags- und Ladepuffer

Gel	für 110 ml	Auftragspuffer	für 500 µl	Ladepuffer	für 100 ml
Agarose	1,1 g	MOPS (10×) ¹⁾	50 µl	Glycerin (80 %)	60 ml
DEPC-H ₂ O	80 ml	Formamid	250 µl	EDTA (250 mM)	2,5 ml
MOPS (10×) ¹⁾	11 ml	Formaldehyd	89 µl	Bromphenolblau (1 %)	37,5 ml
Formaldehyd	20 ml	DEPC-H ₂ O	111 µl		

¹⁾ MOPS (10×): 200 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure, 10 mM EDTA pH 7, 50 mM NaOAc, 108 mM NaOH

2.6.13 Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese für RNA

Die denaturierende Polyacrylamid-(PAA-)Gelelektrophorese mit Harnstoff basiert auf der von Maniatis et al. (1975) für die Größenseparierung einzelsträngiger Nukleinsäuren entwickelten Methode und wurde für die Auftrennung von RNA verwendet, um diese im Anschluss zur späteren Detektion spezifischer Transkripte auf eine Membran zu übertragen (Northern Blot, Abschnitt 2.6.15) oder die RNA-Qualität durch Ethidiumbromidfärbung des Gels (Abschnitt 2.6.6) zu überprüfen. Harnstoff und Formaldehyd sowie Erhitzen der Probe bewirken eine Denaturierung der RNA, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden. Die PAA-Gelelektrophorese ist vor allem geeignet für die Auflösung kleiner Nukleinsäurefragmente und wurde daher für die Auftrennung von RNA-Proben verwendet, die zur späteren Detektion kleiner RNAs durch Northern Blot bestimmt waren. Die Gelzusammensetzung ist in Tabelle 2.12 aufgeführt. Gele wurden zwischen Glasplatten von 20 × 20 cm gegossen und für mindestens eine Stunde polymerisiert. RNA-Proben (je 1 µg für Qualitätsgele, je 10 µg für anschließenden Northern Blot) wurden mit dem 0,5–0,7-fachen Volumen FU-Mix (Tabelle 2.12) als Auftragspuffer versetzt und vor dem Auftragen für 10 Minuten bei 65 °C erhitzt. Als Laufpuffer wurde 1× TBE-Puffer verwendet. Die Gele liefen bei mindestens 300 V für ca. 2 Stunden.

Tabelle 2.12: Harnstoff-PAA-Gel und RNA-Auftragspuffer (FU-Mix)

Gel	Menge	Endkonz.	FU-Mix	Konz.
Harnstoff	16,8 g	7 M	Harnstoff	6 M
TBE (10×) ¹⁾	4 ml	1×	Formamid	80 %
Acrylamid 40 % ²⁾	10 ml	10 %	TBE (10×) ¹⁾	10 %
VE-H ₂ O	ad 40 ml		Bromphenolblau	0,1 %
TEMED ³⁾	20 µl		Xylencyanol	0,1 %

¹⁾ 890 mM Tris, 25 mM EDTA, 890 mM Borat, pH 8,3

²⁾ Acrylamid 4K Lösung (40 %) Mix 37,5:1 (AppliChem Panreac)

³⁾ AppliChem Panreac

2.6.14 Northern-Vakuumblot

Der Northern Blot dient der Übertragung von RNA aus einem Gel auf eine Membran, nach vorangegangener gelelektrophoretischer Auftrennung und wurde von Alwine et al. (1977) entwickelt. Die Membran wird für die spätere spezifische Detektion bestimmter RNA-Transkripte durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden verwendet (Abschnitt 2.6.17). Zur Übertragung von in Formaldehyd-Agarosegelen (Abschnitt 2.6.12) aufgetrennter RNA wurde der Vakuumblot verwendet. Dazu wurde zunächst ein in ddH₂O getränktes Filterpapier (Blotting Paper BP002, Albet LabScience) auf die luftdurchlässige untere Platte des Vacuum Blotters (Appligene) gelegt und darauf eine dünne Plastikschiablone, deren mittlere Aussparung an jeder Seite ca. 0,5 cm kleiner ist als das Gel. In die Aussparung wurde eine Nylonmembran (Roti[®]-Nylon plus, Porengröße 0,45 µM, Ladung positiv, Roth) gelegt, sodass sie vollständig mit dem darunterliegenden Filter-Papier in Berührung ist. Die Membran wurde mit 10× SSC-Puffer (1,5 M NaCl, 150 mM Natriumcitrat) getränkt. Zuletzt wurde das Gel vorsichtig auf der Membran platziert, sodass es an jeder Seite der Plastikschiablone überlappte, und mit 10× SSC-Puffer überschichtet. Anschließend wurde ein Vakuum angelegt, durch das die RNA aus dem Gel auf die darunterliegende Membran transferiert wurde. Das Vakuum sollte einen Druck von mindestens 50 mbar aufweisen und für ca. 45 min bis 1 h angelegt sein. Während der Übertragung wurde darauf geachtet, dass das Gel stets mit Puffer bedeckt war und gegebenenfalls 10× SSC-Puffer nachgefüllt. Das Gel wurde zum Abdampfen im Abzug gelagert und die Membran zur Fixierung der RNA mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm im UV Stratalinker 1800 (Stratagene) durch die Funktion Autocrosslink (1200 J/m²) zweimal behandelt.

2.6.15 Northern-Elektroblot

Der Elektroblot wurde für die Übertragung von RNA aus Polyacrylamidgelen auf Membranen verwendet. Dazu wurden drei Filterpapiere (Blotting Paper BP002, Albet LabScience), die leicht größer sind als das Gel, in 1× TBE-Puffer getränkt und luftblasenfrei auf die Anodenplatte des Elektroblotters (peqlab) gelegt. Auf diese wurde eine Nylonmembran (Roti[®]-Nylon plus, Porengröße 0,45 µM, Ladung positiv, Roth) der gleichen Größe gelegt, die ebenfalls zuvor in TBE getränkt wurde. Das Gel mit der zu übertragenden RNA (Abschnitt 2.6.13) wurde auf die Membran gelegt und abschließend drei weitere in TBE getränkte Filterpapiere. Das Gerät wurde mit der Kathodenplatte geschlossen und eine Stromstärke von 250 mA für 2,5 h angelegt. Abschließend wurde die RNA wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben durch „crosslinken“ auf der Membran fixiert.

2.6.16 Labelling von Sonden für Northern-Hybridisierung

Zur Detektion bestimmter RNA-Transkripte auf Membranen nach dem Northern Blotting wurden DNA-Oligonukleotide oder kurze PCR-Produkte, die komplementär zu einem Abschnitt der zu detektierenden Transkripte sind, radioaktiv markiert. Diese Sonden wurden im Anschluss mit der Membran inkubiert, um mit der gebundenen Ziel-RNA zu hybridisieren (Abschnitt 2.6.17). Oligonukleotide wurden dabei zur Hybridisierung mit kleinen RNAs (sRNAs) und ribosomalen RNAs verwendet, PCR-Produkte zur Hybridisierung mit größeren RNA-Transkripten. Die Effizienz der Markierung wurde durch Messung der cpm (*counts per minute*) eines 2- μ l-Aliquots bestimmt. Markierte Sonden wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Alle Arbeiten mit radioaktivem Material wurden im Radioaktivlabor unter den dort vorgegebenen Sicherheitsmaßnahmen durchgeführt.

2.6.16.1 Oligo-labelling von PCR-Produkten

Bei der von Feinberg und Vogelstein (1983) entwickelten Methode werden doppelsträngige DNA-Fragmente denaturiert und die Einzelstränge mit kurzen Oligonukleotiden hybridisiert. An diese Primer bindet das große Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli* (Klenow-Fragment) und füllt die einzelsträngigen Bereiche mit radioaktiv markierten und nicht markierten Desoxyribonukleotiden auf. Die Reaktion wurde mit dem Prime-a-Gene® Labeling System (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 30 μ Ci radioaktiv markierte [α^{32} P]dCTP verwendet. Die Sonden wurden anschließend aus dem 50- μ l-Reaktionsgemisch durch eine G-50-Säule (illustra™ MicroSpin™ G-50 column, GE Healthcare) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.6.16.2 End-labelling von Oligonukleotiden

Die radioaktive Markierung einzelsträngiger Oligonukleotide wurde durch Endmarkierung (*end-labelling*) erreicht. Dabei wird das γ -Phosphat von radioaktiv markiertem [γ^{32} P]dATP durch eine Polynukleotidkinase (PNK) auf das 5'-Hydroxylende des Oligonukleotids übertragen. Die Reaktion enthält 2 μ M Oligonukleotid, 1 μ l PNK-Puffer A (Thermo Fisher Scientific), 1 μ l T4 PNK (10 u/ μ l; Thermo Fisher Scientific) und 3 μ l (30 μ Ci) [γ^{32} P]dATP in einem Volumen von 10 μ l. Die Reaktion wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und im Anschluss durch Zugabe von 40 μ l STE-Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5) gestoppt. Die Sonde wurde über eine G-25-Säule (illustra™ MicroSpin™ G-25 column, GE Healthcare) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.6.17 Northern-Hybridisierung und Entwicklung

2.6.17.1 Hybridisierung mit PCR-Sonden

Vor der Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde erfolgte eine Inkubation der Membran in 20 ml Prähybridisierungslösung (Tabelle 2.13) für ca. 3 Stunden. Die Membran wurde dabei in einer Hybridisierungsröhre bei 42 °C langsam gedreht. Anschließend wurde die Lösung gegen Hybridisierungslösung ausgetauscht. Ein Volumen der Sonde, das ca. 1 Million cpm entspricht, wurde in 440 μ l LSD (Lachssperma-DNA) gegeben und in einem Schraubdeckelgefäß bei 95 °C für 5 Minuten zur Denaturierung erhitzt. Die Sonde wurde in die Glasröhre zu der Hybridisierungslösung gegeben und durch langsames Drehen ü. N. bei 42 °C mit der Membran inkubiert.

Tabelle 2.13: Prähybridisierungs- und Hybridisierungslösung

Prähybridisierung		Hybridisierung	
Reagenz	Mengen für 20 ml	Reagenz	Mengen für 20 ml
DEPC-H ₂ O	2,28 ml	DEPC-H ₂ O	1,64 ml
50× Denhardt's ¹⁾	1,54 ml	50× Denhardt's ¹⁾	440 µl
Glycin	200 mg	20× SSPE	5,54 ml
20× SSPE ²⁾	5 ml	NaPPi (0,2 M) ⁴⁾	440 µl
Formamid	10 ml	Formamid	11,09 ml
10 % SDS	200 µl	10 % SDS	220 µl
LSD (5 mg/ml) ³⁾	440 µl	Dextransulfat	2,18 g
		LSD (5 mg/ml) ⁵⁾	440 µl

¹⁾ 50× Denhardt's Lösung (1 % Polyvinylpyrrolidon, 1 % Ficoll 400, 1 % BSA; sterilfiltriert)

²⁾ 200 mM NaH₂PO₄, 3 M NaCl, 20 mM EDTA, pH 7

³⁾ Lachssperma-DNA, direkt vor Zugabe erhitzen (95 °C, 5 Min).

⁴⁾ Natriumpyrophosphat

⁵⁾ Lachssperma-DNA mit radioaktiver Sonde, direkt vor Zugabe erhitzen (95 °C, 5 Min)

Nach der Hybridisierung wurde die Lösung entfernt und die Membran zunächst in der Glasröhre mit Waschlösung (2× SSC, 0,1 % SDS) gewaschen (ca. 3 Minuten). Die Membran wurde anschließend in eine flache Schale überführt und in dieser weitere 2–3-mal durch vorsichtiges Schwenken für jeweils 3–5 Minuten gewaschen, anschließend in eine Plastikfolie eingeschweißt und in einer Kassette auf einem *imaging screen* exponiert. Die Signale wurden anschließend durch *phosphoimaging* mit dem Molecular Imager FX™ (Bio-Rad) erfasst und mit der Software Quantity One (Bio-Rad) quantifiziert.

2.6.17.2 Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden (Church)

Die Hybridisierung von Membranen mit endmarkierten Oligonukleotidsonden erfolgte mit dem *Church and Gilbert Hybridization Buffer* (Church und Gilbert, 1984) der Variante *Low stringency* (Puffer „*Low Church*“, Tabelle 2.14). Die Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgte im gleichen Puffer. Die Membran wurde in einer Glasröhre zunächst für ca. 1 Stunde bei 42 °C in 20 ml Puffer prähybridisiert. Anschließend wurde ein Volumen der radioaktiv markierten Sonde, welches 1 Million cpm entspricht, hinzugegeben und mit der Membran bei 42 °C ü. N. inkubiert. Die Inkubation erfolgte unter konstantem Drehen der Glasröhre in einem Hybridisierungssofen.

Tabelle 2.14: Puffer für Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden

Puffer „ <i>Low Church</i> “	Menge	Endkonz.
BSA	3 g	10 mg/ml
DEPC-H ₂ O	45 ml	
NaP ¹⁾	150 ml	500 mM
EDTA (0,5 M pH 8)	0,6 ml	1 mM
SDS (20 % w/v)	105 ml	7 %

¹⁾ Natriumphosphatpuffer (1 M): 500 mM Na₂HPO₄, 0,34 % H₃PO₄

Nach der Hybridisierung wurde die Lösung verworfen und die Membran in *Church*-Waschlösung (5× SSC, 0,01 % SDS) wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben gewaschen. Die Signale wurden durch *phosphoimaging* detektiert.

2.6.18 „Strippen“ von Membranen

Membranen wurden zur Detektion verschiedener RNA-Transkripte mehrfach verwendet. Dazu wurden die radioaktiv markierten Sonden durch „stripfen“ von der Membran entfernt. Die Membran wurde in eine Glasschale überführt und zweimal für jeweils 10 Minuten in je ca. 250 ml Strippingpuffer (0,1 % SDS in DEPC-H₂O) in einem Wasserbad (95 °C) unter Schütteln (80 rpm) inkubiert. Die Membran wurde für eine erneute Sondenhybridisierung (Abschnitt 2.6.17) verwendet.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Proteinaufreinigung

Für die Aufreinigung von CryB und AppA wurden verschiedene, teils aufeinanderfolgende Verfahren angewendet, die im Folgenden beschrieben werden. Je nach Verwendungszweck war die Reinheit der Proteine relevant. Absorptionsspektren von CryB wurden, wenn nicht anders vermerkt, direkt nach Nickel-NTA-Aufreinigung (Abschnitt 2.7.1.2) gemessen. Für CryB-Proben zur Kristallisation, für den *in vitro* Reparaturassay sowie für Co-Kristallisation und SAXS-Messungen mit AppA folgten zwei weitere Aufreinigungsschritte über Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie und Gelfiltration (*size exclusion chromatography*, SEC). Die Aufreinigung von CryB durch Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie und Gelfiltration erfolgte weitgehend nach der in Geisselbrecht (2013) beschriebenen Vorgehensweise. Die drei Aufreinigungsschritte wurden an zwei bis drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Wenn möglich erfolgten Ni-NTA und Heparin-Aufreinigung am gleichen Tag, da die Lagerung im Ni-NTA-Elutionspuffer mit einer hohen Konzentration an Imidazol ein Ausfallen begünstigt. AppA wurde in zwei Stufen zunächst über Glutathion-Affinitätschromatographie und im Anschluss durch Gelfiltration aufgereinigt. Vor der Gelfiltration wurden die vereinigten Elutionsfraktionen des vorangegangenen Schrittes ü. N. in nicht konzentrierter oder verdünnter Form gelagert, um Ausfall zu vermeiden, und erst direkt vor dem Lauf aufkonzentriert. Alle Schritte erfolgten soweit wie möglich bei 4 °C oder auf Eis. Die Lagerung aufgereinigter Proteine erfolgte bei 4 °C. Alle verwendeten Puffer sind in Tabelle 2.15 und Tabelle 2.16 aufgeführt. Puffer für die Aufreinigung über den ÄKTApurifizier (GE Healthcare) wurden vor Verwendung durch einen 0,22-µM-Filter (Whatman™ Membrane Filters, rege-

Tabelle 2.15: Puffer für die Aufreinigung von CryB, pH 8,3

	Ni-NTA			Heparin		SEC
	Lysepuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer	HepA	HepB	SEC _T
NaH ₂ PO ₄	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	–
NaCl	300 mM	300 mM	300 mM	–	2 M	100 mM
Imidazol	10 mM	20 mM	250 mM	–	–	–
Tris	–	–	–	–	–	10 mM

Tabelle 2.16: Puffer für die Aufreinigung von AppA und Interaktionsstudien

	GST		SEC	
	PBS	Elutionspuffer	SEC _T	SEC _H
KH ₂ PO ₄	1,8 mM	–	–	–
Na ₂ HPO ₄	10 mM	–	–	–
NaCl	140 mM	–	100 mM	150 mM
KCl	2,7 mM	–	–	–
Tris	–	50 mM	10 mM	–
Reduziertes Glutathion	–	10 mM	–	–
HEPES	–	–	–	50 mM
pH	7,5	8,0	8,3	7,5

nerated cellulose, GE Healthcare Life Sciences) filtriert und anschließend durch 15-minütige Behandlung in einem Ultraschallbad (Sonorex, Bandelin) entgast. Puffer wurden bei 4 °C gelagert und verwendet.

2.7.1.1 Zellaufschluss von *E. coli*

Der Zellaufschluss zur Gewinnung von Lysat für die Aufreinigung überexprimierter Proteine erfolgte durch Ultraschallbehandlung (Sonikation). Die in Puffer gelösten Zellen aus Expressionskulturen (Abschnitt 2.5.12) wurden aufgetaut und auf Eis 7-mal für 30 Sekunden, dazwischen jeweils 30 Sekunden Pause zur Abkühlung, mit der Sonotrode Sonopuls GM70 (Bandelin) behandelt. Es wurde die Spitze KE 76 mit den Einstellungen MS 72/D (Power) und 70 % Cycle verwendet. Hierbei wurde Zellmaterial aus maximal einem Liter Kultur (aufgenommen in 25 ml Puffer) eingesetzt, bei größeren Mengen wurden entsprechende Portionen nacheinander behandelt. Die Zellsuspension wurde anschließend für 30–40 Minuten bei ca. 20.000 g (13.000 rpm Rotor SS-34) zentrifugiert, um Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugengefäß überführt und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das zellfreie Lysat (*cleared lysate*, CL) wurde anschließend für Ni-NTA-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von CryB bzw. Glutathion-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von AppA verwendet.

Zur Gewinnung von Protein aus der unlöslichen Fraktion wurde das Sediment nach Zellaufschluss und Zentrifugation in Harnstoffpuffer (8 M Harnstoff, 40 mM Tris, pH 8,0) rückgelöst. Diese Suspension wurde erneut sonifiziert und zentrifugiert und das daraus resultierende *cleared lysate* (CL) einer Ni-NTA-Aufreinigung unterzogen.

2.7.1.2 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie über Nickel-Nitrilotriessigsäure (*Nickel-nitrilotriacetic acid*, Ni-NTA) wird die Affinität der Aminosäure Histidin zu den an der NTA komplexierten Nickelionen nutzbar gemacht. Zu diesem Zweck wird ein Protein mit einem Polyhistidin-*tag* am N- oder C-terminalen Ende fusioniert. Dies besteht meist aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinen und wird auch als Hexahistidin-*tag* oder nur His-*tag* bezeichnet. Die Methode der His-*tag*-Aufreinigung wurde durch Hochuli et al. (1988) beschrieben. Das Anfügen der *tag*-Sequenz an die Gensequenz, die das Zielproteins kodiert, erfolgt über Vektoren, die sechs Histidine *up*- oder *downstream* der MCS kodieren (z. B. pET) oder durch Anfügen der

Sequenz über Primer bei der PCR. Durch Zugabe von Imidazol, das der Seitenkette von Histidinen entspricht, als Kompetitor um die Nickel-Matrix werden die gebundenen Proteine gelöst. Die Aufreinigung von CryB über Ni-NTA wurde im *gravity-flow*-Verfahren durchgeführt. Die Wasch- und Elutionsschritte erfolgen hierbei manuell durch Zugabe der entsprechenden Puffer auf die Bindungsmatrix in einer Polypropylensäule. Für Zellysate, das aus einem Liter Expressionskultur stammt, wurden 1,5 ml Ni-NTA-Matrix (Qiagen) zunächst mit 2 Säulenvolumen (*column volume*, cv) ddH₂O gewaschen und anschließend mit 2 cv Lysepuffer in einer 5-ml-Polypropylensäule (Qiagen) äquilibriert. Auf einer Säule wurde Protein aus maximal zwei Liter Expressionskultur (3 ml Ni-NTA-Matrix) aufgereinigt, bei größeren Mengen wurden mehrere Säulen verwendet. Für Lysate aus 0,5 Liter Kultur wurden 1-ml-Säulen mit 0,75 ml Matrix verwendet. Das äquilibrierte Säulenmaterial wurde zum Lysat gegeben und mit diesem in einem 50-ml-Gefäß für 2 Stunden unter leichtem Schwenken bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, um die Bindung der Zielproteine an die Matrix zu ermöglichen. Die Suspension wurde anschließend auf die Säule gegeben, der Durchfluss (*flow-through*, FT) auf Eis aufgefangen und erneut durch die Säule gegeben. Die Matrix wurde zunächst mit 2 cv Lysepuffer gewaschen und anschließend 20-mal mit je 2 ml Waschpuffer, wobei der 1., 10. und 20. Waschschrift aufgefangen wurde. Die Elution des Zielproteins erfolgte 4–5-mal mit je 2 ml Elutionspuffer bei präparativen Aufreinigungen von mehr als einem Liter Expressionskultur, sofern weitere Aufreinigungsschritte folgten. Für Aufreinigungen geringerer Mengen (0,5 Liter Expressionskultur) ohne weitere nachfolgende Aufreinigungsschritte wurde zunächst mit einem Volumen von 250 µl eluiert (Fraktion E₀) und im Anschluss 3–4-mal mit 500 µl (E₁ ff.). Dies diente dem Entfernen unspezifisch gebundener Proteine in E₀ und dem Konzentrieren des Zielproteins in einem geringeren Volumen in E₁. Sämtliche Wasch- und Elutionsschritte erfolgten auf Eis. Die Regeneration des Säulenmaterials erfolgte durch Waschen mit 1 cv ddH₂O, anschließend 5 cv 0,5 M NaOH, 2 cv ddH₂O und zuletzt 2 cv 20%igem Ethanol. Die Lagerung der Matrix erfolgte in 20%igem Ethanol bei 4 °C. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 2.15 zusammengefasst.

Bei der denaturierenden Aufreinigung wurde das nach Zellaufschluss aus der unlöslichen Fraktion gewonnene Lysat ebenfalls zweimal durch die Säule gegeben, die Matrix anschließend mit 1 cv Lysepuffer gewaschen und das Protein zweimal mit je 2 ml Elutionspuffer (150 mM Imidazol) und zweimal mit je 2 ml Elutionspuffer (250 mM Imidazol) eluiert.

2.7.1.3 Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie

Für präparative Aufreinigungen von CryB zum Zwecke der Kristallisation, für Reparaturassays oder SAXS-Messungen wurden zwei weitere Aufreinigungsschritte durchgeführt, um die Reinheit des Proteins zu erhöhen. Zunächst erfolgte eine Aufreinigung über Heparin-Sepharose. Heparin ist ein Glykosaminoglykan und aufgrund seiner Struktur und negativer Ladung den Eigenschaften von DNA ähnlich, daher wird es unter anderem zur Isolierung DNA-bindender Proteine verwendet. Für die Aufreinigung wurde die HiTrap™ Heparin HP Säule 5 ml (GE Healthcare) verwendet, in der Heparin gekoppelt an eine Sepharose-Matrix vorliegt. Die Säule wurde am ÄKTApurifier (GE Healthcare) zunächst mit 5 cv ddH₂O gewaschen und mit 10 cv Puffer HepA und einem Anteil von 2,5 % Puffer HepB (Tabelle 2.15) und somit einer NaCl-Konzentration von 50 mM äquilibriert. Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Aufreinigung wurden vereinigt und mit Puffer HepA auf eine NaCl-Konzentration von 75 mM verdünnt. Aufgrund des großen Volumens wurde die Proteinlösung manuell mit einer Spritze auf die Säule geladen, wobei die Lösung zeitgleich durch einen 0,45-µm-Filteraufsatz filtriert wurde. Das Laden erfolgte bei 4 °C im Kühlraum. Im Anschluss wurde die Säule am ÄKTApurifier zunächst mit 3 cv (15 ml) HepA5%B (100 mM NaCl) gewa-

schen. Im Anschluss folgte ein linearer Gradient bis HepA50%B (1 M NaCl). Die Flussrate betrug 2 ml/min. Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mit Puffer A auf eine NaCl-Konzentration von 300 mM für den letzten Aufreinigungsschritt über Gelfiltration verdünnt, da diese in einem Puffer mit einer NaCl-Konzentration von 300 mM erfolgte. Diese Verdünnung geschah auch, wenn kein weiterer Aufreinigungsschritt folgte, um eine definierte NaCl-Konzentration von 300 mM zu erhalten. Die verdünnte Probe wurde im Anschluss auf das gewünschte Volumen aufkonzentriert (Abschnitt 2.7.2). Die Säule wurde nach Verwendung mit 5 cv Puffer B, 10 cv ddH₂O und 10 cv 20%igem Ethanol gewaschen.

2.7.1.4 Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie

Die Fusion an das Glutathion-S-transferase-tag (GST-tag) erleichtert die Isolierung schwer löslicher Zielproteine und wurde für die Aufreinigung von AppA verwendet. Es wird das GST-Protein aus *Schistosoma japonicum* verwendet (26 kDa), die entsprechende *coding sequence* wird an die des Zielproteins über Vektoren wie beispielsweise pGEX angefügt (Smith und Johnson, 1988). Bei der Aufreinigung wird die spezifische Affinität der GST zu Glutathion ausgenutzt, welches durch die Bindung an eine Sepharose-Matrix immobilisiert wird. Durch Zugabe von reduziertem Glutathion im Elutionspuffer wird das Zielprotein von der Matrix gelöst. Die Aufreinigung erfolgte im *gravity-flow*-Verfahren. Für Zellysate, das aus einem Liter Expressionskultur stammte, wurden 400 µl Glutathion Sepharose 4B (GE Healthcare) in einer 5-ml-Polypropylensäule zunächst mit 2 cv ddH₂O gewaschen und anschließend mit 2 cv PBS (Tabelle 2.16) als Bindepuffer äquilibriert. Die äquilibrierte Matrix wurde anschließend zu dem Lysat gegeben und mit diesem in einem 50-ml-Gefäß für 2 Stunden bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde das Lysat mit der hybridisierten Matrix auf die Säule gegeben. Der Durchfluss (*flow-through*, FT) wurde aufgefangen und erneut über die Säule gegeben. Die Matrix wurde 10–20-mal mit je 2 ml PBS gewaschen und das Protein anschließend in 15 Fraktionen mit je 0,5 ml Elutionspuffer (Tabelle 2.16) eluiert.

2.7.1.5 Gelfiltration (SEC)

Durch Gelfiltration, auch Größenausschlusschromatographie oder *size exclusion chromatography* (SEC) genannt, werden Proteine eines Gemisches nach ihrer Größe aufgetrennt. Anders als bei SDS-Polyacrylamidgelen (Abschnitt 2.7.9) bewegen sich große Moleküle schneller durch die Matrix als kleinere, da erstere weniger zwischen die Poren der Gelmatrix gelangen und somit auf direkterem Weg durch die Säule migrieren können als kleinere Moleküle, die durch die Poren abgelenkt und verlangsamt werden. Die präparative Aufreinigung von vorgereinigtem CryB und AppA erfolgte mit der Säule HiLoad™ 16/60 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare), deren Superdex-Matrix aus Dextran und vernetzter Agarose besteht. Vor Verwendung wurde sie mit 1,2 cv ddH₂O gewaschen und mit 1,2 cv Gelfiltrationspuffer (SEC_T oder SEC_H, siehe Tabelle 2.16) äquilibriert. Diese Schritte erfolgten entweder bei geringer Flussrate (0,1 ml/min) über Nacht oder bei maximal 1 ml/min am ÄKTapurifier. Proteinproben wurden vor dem Laden auf ein Volumen von maximal 1 ml aufkonzentriert (Abschnitt 2.7.2). Direkt vor dem Laden wurde die Probe durch 15-minütige Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C von Präzipitat befreit und anschließend in die mit ddH₂O und Gelfiltrationspuffer gespülte 2-ml-Probenschleife gespritzt. Der Lauf erfolgte mit Gelfiltrationspuffer und bei einer Flussrate von 1 ml/min. Fraktionen, die anhand des Chromatogramms das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt, der Pool wurde bis zur benötigten

Konzentration aufkonzentriert. Die Säule wurde im Anschluss an den Lauf mit 1,2 cv ddH₂O und 1,2 cv 20%igem Ethanol gewaschen.

Neben der präparativen Aufreinigung von Proteinen wurde die Gelfiltration auch zu Analyse von Proteininteraktionen genutzt. Hierfür wurde zum einen die für präparative Aufreinigungen vorgesehene Säule HiLoad™ 16/60 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare) mit einem Säulenvolumen von 120 ml verwendet, zum anderen die für analytische Zwecke geeignete Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare) mit einem Säulenvolumen von 25 ml. Letztere wurde vor Verwendung mit 2 cv ddH₂O gewaschen und mit 2 cv Gelfiltrationspuffer (SEC_T oder SEC_H) äquilibriert. Es wurden unterschiedliche Flussraten angewendet. Die Säule wurde im Anschluss an den Lauf mit 2 cv ddH₂O und 2 cv 20%igem Ethanol gewaschen.

2.7.2 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Vor der Gelfiltration sowie für Experimente war es notwendig, Proteinproben in einem geringen Volumen bzw. in hoher Konzentration vorliegen zu haben. Das maximale Ladevolumen von ca. 1/100 des Säulenvolumens bei der Gelfiltration erforderte ein Aufkonzentrieren der Probe vor dem Lauf, ebenso das große Volumen der vereinigten Elutionsfraktionen nach dem Lauf (Heparin oder Gelfiltration) und die damit verbundene geringe Konzentration. Dies geschah mittels Konzentrationssäulen (Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit, Merck Millipore) mit einer Ausschlussgröße (*cutoff*) von 30 kDa. Die Membran wurde zunächst mit entsprechendem Puffer durch 5-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm (3200 g, Rotina 420R, Hettich Zentrifugen) äquilibriert. Die Proteinprobe wurde mehrmals für jeweils 5 Minuten unter den genannten Bedingungen zentrifugiert, bis das gewünschte Volumen erreicht war. Zwischen den Zentrifugationsschritten wurde die Probe über dem Filter durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt, um eine hohe Konzentration und einen Proteinausfall direkt über dem Filter zu verhindern. Das Aufkonzentrieren erfolgte auf gleiche Weise nach der Gelfiltration bis zur benötigten Proteinkonzentration. Zum Aufkonzentrieren des gleichen Proteins wurden Säulen mehrfach verwendet. Für kurze Zeiträume (z. B. über Nacht) wurde die Säule in ddH₂O bei RT aufbewahrt. Für die Aufbewahrung über längere Zeiträume wurde die Säule in ddH₂O und 20%igem Ethanol zentrifugiert und anschließend mit bedeckter Membran in 20%igem Ethanol bei RT gelagert. Vor der nächsten Benutzung wurde die Säule erneut mit ddH₂O zentrifugiert und mit Puffer äquilibriert.

2.7.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde mittels der spektroskopischen Bradford-Methode (Bradford, 1976) durchgeführt. Sie beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine und einer damit verbundenen Blaufärbung durch Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nach 595 nm. Die Intensität dieses Farbumschlags wird photometrisch bestimmt und ist ein Maß für die in der Lösung befindliche Proteinmenge. Anhand einer Eichgerade mit bekannten Proteinmengen von BSA (*bovine serum albumin*) wird die Proteinmenge unbekannter Proben bestimmt und anhand des eingesetzten Probenvolumens die Konzentration der Ausgangslösung berechnet. Die Messung erfolgte in einem Gesamtvolumen von 750 µl. Es wurden 1–2 µl Proteinlösung mit ddH₂O auf ein Volumen von 600 µl aufgefüllt und in einer Küvette mit 150 µl Roti®-Quant (5× Konzentrat, Roth) gründlich gemischt. Der Leerwert enthielt anstelle der Proteinlösung den entsprechenden Puffer und wurde wie die Proteinprobe behandelt. Die Absorption bei 595 nm wurde mit dem Spektralphotometer Specord 50 (Analytik Jena) bestimmt.

2.7.4 Dialyse von Proteinen

Um Proteine von einem Puffer in einen anderen zu überführen (umpuffern), wurde ein Dialysierschlauch (VISKING Typ 20/32, MW *cutoff* 14 kDa, Roth) in ca. 200–300 ml einer EDTA-Lösung (50 mM) in einem Becherglas kurz aufgekocht. Das Protein wurde anschließend in den Schlauch pipettiert und dieser mit zwei Klammern verschlossen. Der Schlauch wurde über Nacht unter langsamem Rühren bei 4 °C in 2–4 Liter des Zielpuffers inkubiert, sodass eine Diffusion beider Puffer durch den Schlauch erfolgen konnte. Aufgrund des großen Volumen des Zielpuffers im Verhältnis zum Probenpuffer, erfolgt ein fast vollständiger Austausch.

2.7.5 Reduktion von CryB

Zur Reduktion des CryB-gebundenen FAD wurde das Protein nach Ni-NTA- und Heparin-Chromatographie mit 10 mM Dithiothreitol (DTT) oder Natriumdithionit (NaD) versetzt. Dazu wurden 100 µl aufgereinigtes CryB (ca. 2 mg/ml) in einem Verhältnis von 1:1 mit dem entsprechenden Elutionspuffer (HepA/B: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,3) gemischt, der 20 mM des Reduktionsmittels enthielt. Die Endkonzentration des Proteins betrug somit ca. 1 mg/ml (17 µM). Die Proben wurden anschließend in einer Mikroküvette aus Quarzglas (Hellma) mit blauem Licht der Wellenlänge 450 nm durch eine externe High-Power-LED bestrahlt. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Absorptionsspektren im Zweistrahl-spektrophotometer V-660 (JASCO) gegen Puffer mit dem entsprechenden Reduktionsmittel als *baseline* gemessen. Während der Messungen wurde die Lichtbestrahlung kurzzeitig unterbrochen. Kontrollproben wurden zuvor einmalig auf gleiche Weise ohne Reduktionsmittel und ohne Lichtbehandlung gemessen. Diese Arbeiten wurden in der AG Essen (Philipps-Universität Marburg) durchgeführt.

Die Reduktion von CryB/FAD für den Reparaturassay (Abschnitt 2.7.15) erfolgte in HepA/B-Puffer mit 10 mM DTT und einer Proteinkonzentration von 10 µM in einem Volumen von 126 µl durch Anregung mit einer Wellenlänge von 450 nm (100 µmol/m²/s) im Spektrofluorometer RF-5301PC (Shimadzu). Die verwendete Quarzküvette (Suprasil®, Hellma) verfügt über drei lichtdurchlässige Seitenflächen. Die Anregung erfolgte durch das frontale Fenster. Zur Messung der Absorptionsspektren durch die seitlichen Fenster wurde die Küvette unter Ausschluss von Licht in ein Spektrophotometer (GeneQuant 1300, GE Healthcare) überführt. Spektren wurden gegen HepA/B-Puffer mit 10 mM DTT gemessen. Nach jeder Messung zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Küvette zur Weiterbestrahlung bis zur vollständigen FAD-Reduktion wieder in das Spektrofluorometer überführt. Das Protein wurde direkt im Anschluss für den Reparaturassay verwendet. Diese Arbeiten fanden in der AG Batschauer (Philipps-Universität Marburg) statt.

2.7.6 Messung von Protein-Absorptionsspektren

Zur Analyse von CryB und seinen Varianten wurden Protein-Absorptionsspektren in der Regel direkt nach der Aufreinigung durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie gemessen. Der Messbereich von 300–700 nm deckt dabei den Bereich der Absorption aller drei Cofaktoren ab. Für die Messungen wurde ein Volumen von mindestens 500 µl Proteinlösung eingesetzt und gegen Elutionspuffer (*baseline*) in Quarzküvetten (Suprasil®, Schichtdicke 10 mm, Hellma) gemessen. Im Falle der Messungen unter Anwesenheit von H₂O₂ in den Proteinlösungen wurde dieses ebenfalls dem Elutionspuffer für die *baseline* zugefügt. Die Messungen erfolgten mit dem UV/Vis Spektralphotometer Specord 50 (Analytik Jena).

2.7.7 Freisetzen der Cofaktoren

Um die lichtabsorbierenden Cofaktoren von CryB zu lösen, wurde das Protein (0,6–1 ml) nach Ni-NTA-Aufreinigung für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt, für wenige Minuten auf Eis abgekühlt und für 10 Minuten bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, erneut zentrifugiert und anschließend in einer Quarzküvette gegen Elutionspuffer gemessen (Abschnitt 2.7.6). Der Elutionspuffer wurde zu diesem Zweck genauso wie die Proteinprobe behandelt.

2.7.8 Zellaufschluss von *R. sphaeroides* für Western Blot

Für die Gewinnung von Gesamtprotein aus *R. sphaeroides*-Zellen wurden mikroaerob angezogene 75-ml-Kulturen komplett geerntet (Abschnitt 2.5.5). Das gefrorene Zellsediment wurde in 900 µl TBS_R (25 mM Tris, 137 mM NaCl; pH 8,3, Tabelle 2.19) mit 1 mM frisch hinzugefügtem Proteaseinhibitor PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, Roth) aufgenommen. Der Aufschluss erfolgte durch Ultraschall (Sonikation). Dazu wurden die Zellen auf Eis 7-mal für 30 Sekunden mit der Sonotrode Sonopuls GM70 (Bandelin) behandelt, jeweils unterbrochen durch 30 Sekunden Abkühlen. Es wurde die Spitze MS 73 mit den Einstellungen MS 72/D (Power) und 70 % Cycle verwendet. Zelltrümmer wurden im Anschluss durch Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 30–45 min entfernt, der Überstand (Lysat) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Trennung von löslicher und unlöslicher (Membran-)Fraktion wurde das Gesamtzelllysat einer Ultrazentrifugation unterzogen. Dazu wurden 450 µl Lysat bei 120.000 g (58.000 rpm Rotor TLA100.1, Optima™ TLX Ultrazentrifuge, Beckmann) und 4 °C für eine Stunde zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Fraktion) wurde vom Sediment (unlösliche Fraktion) getrennt und letzteres in 100 µl TBS_R mit 1 mM PMSF rückgelöst. Proteinkonzentrationen wurden durch die Bradford-Methode (Abschnitt 2.7.3) bestimmt und anschließend gleiche Mengen durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blot (Abschnitt 2.7.12) analysiert.

2.7.9 SDS-PAGE

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird verwendet, um Proteine zu analytischen Zwecken anhand ihrer Größe aufzutrennen. Durch das anionische SDS werden die Proteine denaturiert und erhalten eine negative Ladung, die deren Eigenladung überdeckt. So spielt die Sekundärstruktur sowie Eigenladung der Proteine, bedingt durch ihre Aminosäurezusammensetzung, keine Rolle und die Laufweite der Proteine im Gel spiegelt deren Länge wider. Das Anlegen einer Spannung bewirkt eine Migration der gleichermaßen negativ geladenen Proteine durch das Gel in Richtung Anode. Kleine Proteine wandern schneller durch die Poren des Gels und legen damit weitere Distanzen zurück, während größere Proteine stärker verlangsamt werden und eine geringere Laufweite erreichen. Die verwendete Methode basiert auf der von Laemmli (1970) entwickelten diskontinuierlichen SDS-PAGE, bei der die Proteine zunächst in einem Sammelgel konzentriert und anschließend in einem Trenngel aufgetrennt werden. Die Methode wurde angewandt, um das Vorhandensein und die Reinheit von Proteinen nach der Aufreinigung zu überprüfen, die Interaktion von Proteinen nach *in vivo pulldown*-Experimenten oder analytischer Gelfiltration zu untersuchen (Abschnitt 2.7.14 bzw. 2.7.1.5) sowie zur Auftrennung von Gesamtzelllysat von *R. sphaeroides*. Gele wurden zwischen Glasplatten einer Größe von 20 × 20 cm gegossen. Die Länge des Trenngels betrug 11 cm. Proteinproben wurden auf ein einheitliches Volumen angeglichen und mit Auftragspuffer (4× Stock, Tabelle 2.17) versetzt, zur Denaturierung für 5–10 Minuten auf 95 °C erhitzt und mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen des Sammelgels geladen. Der Lauf erfolgte

in Laemmli-Puffer bei 250 V für etwa 3 bis 3,5 Stunden, nach 10-minütigem Einlaufen der Proben in das Gel bei 100 V. Die Gel- und Pufferzusammensetzungen sind in Tabelle 2.17 zusammengefasst. Nach der Auftrennung wurden die Gesamtproteine im Gel entweder durch Färben sichtbar gemacht (Abschnitte 2.7.10 und 2.7.11) oder zum anschließenden Nachweis bestimmter Proteine über Antikörper auf eine Membran übertragen (Western Blot, Abschnitt 2.7.12). Als Größenstandard für Färbungsgele wurden 10 µl des Markers *Low Range* (SDS-PAGE Standards, Bio-Rad) verwendet; bei Gelen, die für einen anschließenden Western Blot bestimmt waren, wurden 8 µl des Markers PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Tabelle 2.17: SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAA-Gel), Laufpuffer (Laemmli) und Auftragspuffer für SDS-PAGE

SDS-PAA-Gel (20 × 20 cm)					Puffer				
Trenngel 12 %		Sammelgel 5 %			1× Laemmli	f. 1 Liter	Endkonz.		
[ml]	Endkonz.	[ml]	Endkonz.						
ddH ₂ O	10,7		5,8			Glycin	14,4 g	192 mM	
Acrylamid 40% ¹⁾	7,5	12 %	1,0	5 %		Tris	3 g	25 mM	
1,5 M Tris (pH 8,8)	6,3	375 mM	–			SDS	1 g	0,1 % (w/v)	
1 M Tris (pH 6,8)	–		1,0	125 mM		4× Auftragspuffer		f. 10 ml	Endkonz.
10 % SDS	0,25	0,1 %	0,08	0,1 %		Glycerin (100 %)	1,5 ml	15 % (v/v)	
10 % APS	0,25	0,1 %	0,08	0,1 %		SDS (10 %)	4 ml	4 %	
TEMED ²⁾	0,01	0,001 %	0,008	0,001 %		2-Mercaptoethanol	2 ml	20 %	
						Tris pH 6,8 (1 M)	1,25 ml	125 mM	
						Bromphenolblau	π × Daumen		

¹⁾ Acrylamid 4K Lösung (40 %) Mix 37,5:1: (AppliChem Panreac)

²⁾ AppliChem Panreac

2.7.10 Silberfärbung

Zur Sichtbarmachung von Proteinen in Polyacrylamidgelen nach der SDS-PAGE wurde die Silberfärbung oder die Coomassie-Färbung (Abschnitt 2.7.11) angewendet. Es wurde nach dem Protokoll von Blum et al. (1987) vorgegangen. Das Gel wird zunächst in einer Fixierlösung inkubiert, um Substanzen wie z. B. SDS und Tris zu eliminieren und eine Hintergrundfärbung zu vermeiden. Im zweiten Schritt wird das Gel mit Natriumthiosulfat behandelt, wodurch Sensitivität und Kontrast erhöht werden. Bei der anschließenden Inkubation mit Silbernitrat lagern sich Silberionen an die Proteine. Im letzten Schritt erfolgt das eigentliche Färben der Proteine durch die Zugabe von Entwicklerlösung. Durch das darin enthaltene Formaldehyd werden die Silberionen zu metallischem Silber reduziert und bewirken eine Dunkelfärbung der Proteine, die als Banden erscheinen. Die Reaktion wird nach wenigen Minuten durch die Zugabe von Essigsäure gestoppt, sobald die Banden die gewünschte Intensität erreicht haben (Rabilloud et al., 1994). Die verwendeten Reagenzien und Inkubationszeiten sind in Tabelle 2.18 aufgeführt. Lösungen 2 und 3 wurden vor Verwendung frisch hergestellt, die Zugabe von Formaldehyd erfolgte in allen Lösungen direkt vor Verwendung. Die Inkubationsschritte erfolgten unter Schwenken bei 50 rpm.

Tabelle 2.18: Lösungen und Inkubationszeiten der Silberfärbung von Proteingelen

Vorgang	Lösung	Volumen [ml]	Inkubationszeit
Fixierung	500 ml Methanol 120 ml Essigsäure ad 1 Liter VE-H ₂ O + 500 µl Formaldehyd	200	1 h oder ü. N.
Waschen	500 ml Ethanol ad 1 Liter VE-H ₂ O	3 × 200	3 × 20 min
Lösung 1	0,1 g Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O ad 500 ml VE-H ₂ O	250	1 min
Waschen	VE-H ₂ O	3 × 200–500	3 × 20 sec
Lösung 2	0,4 g AgNO ₃ ad 250 ml VE-H ₂ O + 187,5 µl Formaldehyd	250	20 min
Waschen	VE-H ₂ O	3 × 200–500	3 × 20 sec
Lösung 3	15 g Na ₂ CO ₃ 5 ml Lösung 1 ad 250 ml VE-H ₂ O + 125 µl Formaldehyd	250	wenige sec bis min
Stoppen	+ Essigsäure	20–40 ml	wenige min
Waschen	VE-H ₂ O	3 × 200–500	3 × 20 sec

2.7.11 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung stellt eine einfachere, jedoch weniger sensitive Färbemethode von Gelen nach SDS-PAGE dar, als die Silberfärbung. Gele wurden nach der Elektrophorese in 250 ml Färbelösung (125 ml Methanol, 25 ml Essigsäure, 100 ml VE-H₂O, 625 mg Serva Blue G) für 30–60 Minuten inkubiert. Zum Entfärben des Hintergrundes wurde das Gel für mehrere Stunden oder über Nacht in 250 ml VE-H₂O mit ca. 20 ml Entfärbelösung (50 ml Essigsäure, 75 ml Ethanol, 125 ml VE-H₂O) inkubiert. Die Lösung wurde während des Entfärbeprozesses mehrmals erneuert. Die Inkubationen erfolgten schwenkend bei 50 rpm. Die Färbelösung wurde mehrfach verwendet.

2.7.12 Western Blot

Der Western Blot dient der Übertragung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinstreifen aus Polyacrylamidgelen auf eine Membran, die auf dieser als zunächst nicht sichtbare „Flecke“ (*blots*) erscheinen. Die Methode wurde von Towbin et al. (1979) entwickelt. Die Mobilisierung der Proteine aus dem Gel erfolgte durch Anlegen einer elektrischen Spannung durch *semi-dry transfer*. Dazu wurden zunächst drei saugfähige Filterpapiere (Blotting Paper BP002, Albet LabScience) in Transferpuffer (62,5 mM Tris, 480 mM Glycin, pH 7,9; 20 % Methanol) getränkt und luftblasenfrei auf die Anodenplatte des Elektrobloppers (peqlab) gelegt. Eine Nitrocellulosemembran (Protran BA83, GE Healthcare Life Sciences) wurde für 10 Minuten in Methanol eingelegt und bündig auf die drei Filterpapiere gelegt. Das Gel wurde nach SDS-PAGE (Abschnitt 2.7.9) aus der Laufkammer entfernt und auf die Membran gelegt. Abschließend wurden drei weitere in Transferpuffer getränkte Filterpapiere auf das Gel gelegt und Luftblasen aus dem Stapel geschoben. Die Apparatur wurde mit der Kathodenplatte geschlossen und eine Spannung

von 1,1 mA/cm² für 2 Stunden angelegt. Nach dem Transfer wurde die Membran mit 50 ml Ponceau S (Sigma-Aldrich) für ca. 5 Minuten gefärbt, um die Übertragung der Proteine auf die Membran sowie eine gleichmäßige Auftragung bei der vorangegangenen Gelelektrophorese zu überprüfen. Der Farbstoff bindet an positiv geladene Aminogruppen und unpolare Bereiche der Proteine. Die Färbung wurde direkt im Anschluss durch kurzes Schwenken der Membran in 0,1 M NaOH und gründliches Waschen mit VE-H₂O entfernt. Nach dem Entfärben wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in 100 ml Blockierlösung (5 % Milchpulver in TBS_W, Tabelle 2.19) in einer Glasschale inkubiert, um freie Membranbereiche für die im nächsten Schritt folgende Inkubation mit Antikörpern zu besetzen und somit unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Das Blockieren von Membranen für eine folgende Inkubation mit His-tag-spezifischem Antikörper erfolgte in PBS mit 5 % Milchpulver.

Tabelle 2.19: Tris-Puffer (Tris-buffered saline) für Zellaufschluss von *R. sphaeroides* (TBS_R), Western Blot / Immunodetektion (TBS_W) und Phosphatpuffer (Phosphate-buffered saline, PBS) für Western Blot / Immunodetektion

	TBS _R		TBS _W		PBS	
Tris	25 mM	25 mM	KH ₂ PO ₄	1,8 mM		
NaCl	137 mM	137 mM	Na ₂ HPO ₄	10 mM		
pH	8,3	7,5	NaCl	140 mM		
			KCl	2,7 mM		
			pH	7,5		

2.7.13 Immunodetektion durch Chemolumineszenz

Der immunologische Nachweis von CryB und AppA nach dem Western Blot erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde ein gegen das Zielprotein gerichteter, polyklonaler Antikörper verwendet. Die hohe Affinität dieses primären Antikörpers ermöglicht eine spezifische Bindung an das Zielprotein nach Blockieren der Membran im Anschluss an das Western Blotting. Ein sekundärer Antikörper mit gekoppelter Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) bindet dann spezifisch an den primären Antikörper und kann im Anschluss durch eine Chemolumineszenz-Reaktion nachgewiesen werden. Dabei katalysiert das Enzym Meerrettich-Peroxidase in Anwesenheit von H₂O₂ die Oxidation des Substrates Luminol. Es erfolgt eine Lichtemission (Chemolumineszenz) auf Bereichen der Membran, an denen der sekundäre Antikörper gebunden ist.

Nach Entfernen der Blockierlösung wurde die Membran dreimal kurz mit TBS_W (Tabelle 2.19) gewaschen und im Anschluss mit einer 1:1000-Verdünnung (5 µl Antikörper in 5 ml TBS_W) von aufgereinigtem Anti-CryB (Hendrichk et al., 2009a) oder Anti-His-AppAΔN (Han et al., 2007) für 2 Stunden in einer Hybridisierungsröhre bei RT unter Schwenken inkubiert. Die Membran wurde anschließend zur Entfernung von schwach oder ungebundenem Antikörper dreimal kurz mit VE-H₂O und zweimal für jeweils 5 Minuten in TBS_W gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody, HRP conjugate (#31460, Thermo Fisher Scientific) in einer Verdünnung von 1:10.000 (0,5 µl Antikörper in 5 ml TBS_W) für 1 bis 1,5 Stunden. Die Membran wurde anschließend von der Röhre in eine Glasschale transferiert und in dieser erneut dreimal kurz mit VE-H₂O und zweimal für 5 Minuten mit TBS_W gewaschen und gut abgetropft.

Im Falle der CryB-Detektion über das His-tag ist der verwendete Antikörper bereits an eine Peroxidase gekoppelt und daher lediglich ein Inkubationsschritt nötig. Nach Entfernen der Blockierlösung wur-

de die Membran dreimal für jeweils 5 Minuten in einer Glasschale mit Waschlösung (PBS mit 0,05 % Tween 20) und im Anschluss dreimal kurz mit VE-H₂O gewaschen. Die Membran wurde in eine Hybridisierungsröhre überführt und der monoklonale Antikörper Anti-polyHistidine-Peroxidase Antibody (A7058, Sigma-Aldrich) in einer 1:3000-Verdünnung hinzugefügt (2 µl AK mit 6 ml Bindepuffer (PBS mit 0,05 % Tween 20 und 1 % BSA)). Die Membran wurde für 1 bis 2 Stunden bei RT unter Schwenken inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran in einer Glasschale dreimal für je 5 Minuten in Waschlösung gewaschen und gut abgetropft. Es folgte die Peroxidase-Reaktion durch Zugabe eines 1:1-Gemisches (je 0,8–1 ml) des Lumi-Light Western Blotting Substrates (1: Luminol/Enhancer Solution und 2: Stable Peroxide Solution, Roche) auf die Membran und eine Inkubation von ca. 2 Minuten. Die Membran wurde luftblasenfrei in eine Plastikfolie und diese für 20 Minuten in eine Kassette auf einen Röntgenfilm (CEA Medical X-Ray Screen) gelegt. Die Entwicklung des Films nach der Belichtung durch die Membran erfolgte unter Rotlicht. Der Film wurde zunächst in Röntgen-Entwicklerlösung (Adefo) geschwenkt, bis Banden zu sehen waren (bis zu 30 Sekunden), anschließend kurz in VE-H₂O gewaschen, für eine Minute in Röntgen-Fixierlösung (Adefo) geschwenkt und zuletzt wieder in VE-H₂O gewaschen. Je nach Signalstärke wurde ein weiterer Film für 1 bis 5 Minuten belichtet und entwickelt.

Tabelle 2.20: Verwendete Antikörper mit Verdünnungen und Inkubationszeiten

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Inkubationszeit
Anti-CryB	Hendrischk et al. (2009a)	1:1000	2 h
Anti-AppAΔN	Han et al. (2007)	1:1000	2 h
Anti-Rabbit IgG (#31460)	Thermo Fisher Scientific	1:10.000	1–1,5 h
Anti-polyHistidine (A7058)	Sigma-Aldrich	1:3000	1–2 h

2.7.14 *In vivo* Protein-pulldown

Die *pulldown*-Methode dient der Identifizierung potenzieller unbekannter Interaktionspartner eines Zielproteins oder der Verifizierung einer Interaktion zweier Proteine. Im Gegensatz zum *in vitro pulldown*, bei dem ein aufgereinigtes Zielprotein an eine Matrix gekoppelt und anschließend mit Zelllysat hybridisiert wird, um Interaktionspartner aus dem Lysat zu extrahieren, wird bei der *in vivo* Variante das mit einem Affinitäts-*tag* versehene Zielprotein in den Zellen überexprimiert und das Zelllysat anschließend einer Aufreinigung unterzogen. So besteht die Möglichkeit einer Bindung an Interaktionspartner bereits in der Zelle unter physiologischen Bedingungen. Neben Proteinen können auf diese Weise auch Interaktionen mit Nukleinsäuren nachgewiesen werden.

Kulturen wurden in einem Volumen von 400 ml unter mikroaeroben Bedingungen über Nacht angezogen und die Zellen bei einer OD₆₆₀ von 0,7 geerntet (8600 g / 7000 rpm Rotor F10S, Sorvall; 15 Minuten, 4 °C). Zellsedimente wurden in 5 ml Ni-NTA-Lysepuffer (Tabelle 2.15) gewaschen, erneut zentrifugiert (7600 g / 8000 rpm Rotor SS-34, Sorvall; 5 Minuten, 4 °C), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Für den Aufschluss wurden die Zellen in 5 ml Lysepuffer mit 0,1 mM PMSF aufgenommen und auf Eis 7-mal für 30 Sekunden sonifiziert (Spitze MS 73; MS 72/D (Power), 70 % Cycle). Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (14.000 g / 10.000 rpm Rotor SA-600, 30 Minuten, 4 °C) entfernt. Der Überstand (*cleared lysate*, CL) wurde zur Bindung des Proteins mit 0,5 ml in Lysepuffer äquilibrierter Ni-NTA-Matrix für eine Stunde bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend in eine 1-ml-Polypropylensäule (Qiagen) gegeben, der Durchfluss (*flow-through*,

FT) auf Eis aufgefangen und erneut auf die Säule gegeben. Zur Entfernung schwach gebundener Proteine wurde die Matrix dreimal mit je 1 ml Lysepuffer und sechsmal mit Waschpuffer (20 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution erfolgte einmal mit Elutionspuffer I (100 mM Imidazol) (E_1), einmal mit Elutionspuffer II (200 mM Imidazol) (E_2) und zweimal mit Elutionspuffer III (250 mM Imidazol) (E_3 – E_4), jeweils in einem Volumen von 250 μ l. Die Puffer entsprechen den in Tabelle 2.15 aufgeführten, es wurde lediglich die Imidazolkonzentration für die Elution graduell erhöht. Fraktionen wurden anschließend durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Gelfärbung sowie Western Blot analysiert.

2.7.15 *In vitro* Reparaturassay

Der in dieser Arbeit angewendete *in vitro* Reparaturassay ist eine spektroskopiebasierte Methode zum Monitoring der Reparatur von UV-Photoprodukten (CPD und (6-4)-PP) in DNA. Der Assay wurde in Zusammenarbeit mit Richard Pokorny (AG Batschauer, Philipps-Universität Marburg) nach der Methode von Brych et al. (2015) durchgeführt, die eine Modifikation der ursprünglich von Yamamoto et al. (2013) beschriebenen Methode darstellt, um die Reparatur von (6-4)-Schäden durch CryB zu untersuchen. Der Assay benötigt photoreduziertes Protein sowie ein Substrat, welches den zu untersuchenden Schadentyp enthält. Alle Telexperimente (Proteinreduktion, Schadeninduktion und Reparaturassay) wurden in einem abgedunkelten Raum unter Rotlicht durchgeführt, um einen Lichteinfluss bei der Überführung der Küvette zwischen Spektrofluorometer und Spektrophotometer zu vermeiden.

2.7.15.1 Induktion von UV-Schäden in Oligo(dT)₁₈-DNA

Für die Generierung von (6-4)-Photoprodukten wurde ein einzelsträngiges DNA-Oligonukleotid aus 18 Desoxythymidinen (Oligo(dT)₁₈) mit UV-C-Licht (265 nm) bestrahlt. Die gleichzeitige Entstehung von CPD-Schäden kann bei dieser Reaktion nicht vermieden werden. Die Schäden treten in einem Verhältnis von durchschnittlich vier CPD und einem (6-4)-PP je Molekül auf (Brych et al., 2015). Die Bestrahlung erfolgte in einem Volumen von 120 μ l mit 100 μ M Oligo(dT)₁₈ (Finnzymes) in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA) in einer Quarzküvette (Suprasil®, Hellma) im Spektrofluorometer RF-5301PC (Shimadzu) für einen Zeitraum von 2,5 Stunden. Währenddessen wurde die Küvette alle 15 bis 30 Minuten zur Messung von Absorptionsspektren (300–450 nm) in ein Spektrophotometer (GeneQuant 1300, GE Healthcare) überführt und direkt nach jeder Messung zur Weiterbestrahlung wieder in das Spektrofluorometer gesetzt. Dadurch wurden Veränderungen bei 325 nm erfasst, dem spezifischen Absorptionsmaximum von T(6-4)T-Dimeren (Yamamoto et al., 2013). Als *baseline* wurde TE-Puffer verwendet. Zur Überprüfung der Entstehung beider Schadentypen, CPD und (6-4)-PP, wurde vor und nach der Bestrahlung ein 6- μ l-Aliquot entnommen, mit 112 μ l TE-Puffer verdünnt (5 μ M Oligo(dT)₁₈) und jeweils ein Absorptionsspektrum (220–450 nm) gegen TE-Puffer gemessen. Damit wurden Veränderungen bei 265 nm erfasst, dem Absorptionsmaximum intakter Thymines (Kim und Sancar, 1991; Yamamoto et al., 2013).

Für die Herstellung eines doppelsträngigen Substrates wurde das UV-behandelte, einzelsträngige Oligo(dT)₁₈ mit intaktem Oligo(dA)₁₈ hybridisiert (*annealing*). Beide Moleküle wurden in einer Konzentration von jeweils 37,5 μ M in Photoreparaturpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl, 10 % Glycerin) vereinigt. Es wurden drei Reaktionen à 37 μ l angesetzt und diese in einem Thermocycler zunächst für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Im Anschluss wurde die Temperatur schrittweise (um 0,5 °C jeweils für 30 Sekunden) auf 10 °C abgekühlt, um ein Zusammenlagern beider Stränge zu ermöglichen. Beide Substra-

te wurden nach Herstellung im Dunkeln gehalten sowie bei 4 °C (dsDNA) aufbewahrt oder bei -20 °C eingefroren (ssDNA).

2.7.15.2 *In vitro* Reparaturassay mit CryB

Die Reparaturreaktion enthielt 1 µM photoreduziertes CryB (Abschnitt 2.7.5) und 30 µM UV-geschädigtes Oligo(dT)₁₈ oder 30 µM entsprechende dsDNA (Abschnitt 2.7.15.1) in Photoreparaturpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl; 10 % Glycerin; 10 mM DTT) sowie 10 mM DTT, in einem Gesamtvolumen von 125 µl. Die Bestrahlung der Reaktion zur Anregung des reduzierten FADH⁻ und zum Induzieren der Reparatur erfolgte in einer Quarzküvette (Suprasil®, Hellma) im Spektrofluorometer RF-5301PC (Shimadzu) mit UV-A-Licht von 385 nm (100 µmol/m²/s). In regelmäßigen Abständen wurde die Küvette zur Messung von Absorptionsspektren (300–450 nm) kurzzeitig in das Spektrophotometer (GeneQuant 1300, GE Healthcare) überführt, um das Absorptionsmaximum der (6-4)-PP der Substrat-DNA bei 325 nm zu überwachen. Als *baseline* wurde die gleiche Zusammensetzung wie bei der Reparaturreaktion, ohne DNA-Substrat und mit HepA/B-Puffer anstelle des Proteins, verwendet. Vor Beginn und nach Beendigung der Bestrahlung mit UV-A-Licht wurde eine Probe von 20 µl aus der Reaktion entnommen, mit 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA) verdünnt (entspricht 5 µM DNA-Substrat) und jeweils ein Absorptionsspektrum (220–450 nm) gemessen, um wie bei der Induktion des Schadens das Maximum bei 265 nm als Indikator für die Zu- oder Abnahme intakter Thymine zu überprüfen. Als *baseline* wurden 20 µl des für die Reparaturreaktion verwendeten *baseline*-Mix mit 100 µl TE-Puffer verdünnt.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeines zu CryB

CryB ist im Genom von *R. sphaeroides* 2.4.1 auf Chromosom II kodiert und unter dem Gen-Namen RSP_3077 und der UniProt-Nummer Q3IXP1 (UniProt, 2015) als „*deoxyribodipyrimidine photolyase-related protein*“ annotiert. Die kodierende Sequenz (CDS) inklusive Stopcodon ist 1527 Basenpaare lang und kodiert ein 508 Aminosäure langes Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 58 kDa (ExpASy; Gasteiger et al., 2003). Die Expression des Gens unterliegt der Kontrolle eines RpoH_{II}-abhängigen Promotors. Es wird als Reaktion auf Singulett-Sauerstoffstress, vermittelt durch den alternativen Sigmafaktor RpoH_{II}, verstärkt exprimiert (Hendrischk et al., 2009a; Nuss et al., 2010). Die Kristallstruktur des Proteins (Geisselbrecht et al., 2012) ist in der *Protein Database* wwPDB (Berman et al., 2003) mit der Nummer 3ZXS hinterlegt.

Im Rahmen der Untersuchung der drei Photolyase/Cryptochrom-Kandidaten aus *R. sphaeroides* wurde für die Photolyase PhrA eine Hauptrolle in der Photoreaktivierung festgestellt. Der Beitrag von CryB zur Überlebensfähigkeit der Zellen nach UV-Stress war geringer als der von PhrA. CryB wurde daher als mögliche zweite Photolyase erwogen. Der dritte Kandidat, RSP_1981, zeigte keine Beteiligung an dem Prozess (Hendrischk et al., 2007). CryB verfügt über drei Cofaktoren: Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (DLZ) und ein [4Fe4S]-Eisen-Schwefel-Cluster (Geisselbrecht et al., 2012). DLZ stellt einen neuartigen Antennenchromophor dar, ein FeS-Cluster hingegen ist bekannt als ubiquitärer Cofaktor vieler Proteine (White und Dillingham, 2012), jedoch ist es nicht in klassischen Photolyasen und Cryptochromen vorhanden.

3.1.1 Konstrukt zur heterologen Expression von CryB in *E. coli*

Das CryB-Protein und seine Varianten (Abschnitt 3.2) wurde in dieser Arbeit mit dem T7 Expressionssystem in *E. coli* BL21(DE3)pLysS vom Vektor pET28a heterolog exprimiert (pET_{CryB}), um für die Aufreinigung überexprimiert zu werden. Sofern abweichend *E. coli* Rosetta(DE3) für die Expression verwendet wurde, ist dies im Text vermerkt. Das Plasmid wurde von Yann Geisselbrecht (AG Essen, Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt. Das zu Beginn verwendete Expressionssystem in pQE32 (Hendrischk et al., 2009a) wurde aufgrund einer höheren Proteinausbeute bei der Verwendung des pET-Systems auf letzteres umgestellt (Geisselbrecht, 2013).

Durch den pET28a-Vektor wird die Sequenz für ein Hexahistidin-*tag* (*His-tag*) *upstream* an die *cryB*-CDS in der *multiple cloning site* angefügt und bewirkt die N-terminale Fusion des resultierenden Proteins an das *His-tag*. *Upstream* der *His-tag*-Sequenz befinden sich vier Codons, beginnend mit dem Startcodon ATG. Zwischen *tag* und Beginn der CDS befinden sich 10 Codons, gefolgt von einem vektor-eigenen ATG (als Teil der NdeI-Schnittstelle). Die erste Position der *cryB*-Sequenz, G, wurde bereits bei der Klonierung des Konstruktes pQECryB (Hendrischk et al., 2009a) gegen ein C ausgetauscht. Somit ist

das *cryB*-eigene GTG-Startcodon durch CTG ersetzt, gefolgt von der restlichen Sequenz ab ACA. Diese Änderung wurde bei der Konstruktion von pET-RsCryB (Geisselbrecht et al., 2012) übernommen. Die Gesamtlänge des His-Fusionsproteins beträgt 529 AS (in pQE*cryB* 522 AS), das theoretische Molekulargewicht beträgt 60,32 kDa (ExpASy, Gasteiger et al., 2003). Die Nummerierung der Aminosäuren beginnt bei der des ersten Codons (GTG bzw. CTG) der *cryB*-Sequenz (Geisselbrecht, 2013). Abbildung 3.1 zeigt einen Ausschnitt der Plasmidkarte von pET*cryB*. Die Aminosäuresequenz befindet sich in Anhang 9.5.

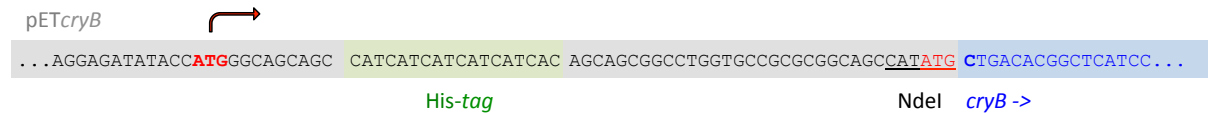


Abbildung 3.1: Beginn der *cryB*-Sequenz (blau) in pET28a (grau) mit His-tag-Sequenz (grün). Unterstrichen = NdeI-Schnittstelle. Beschreibung siehe Text.

3.1.2 Aufreinigung des CryB-Wildtyp-Proteins

Das CryB-Wildtyp-Protein wurde in dieser Arbeit für unterschiedliche Zwecke aufgereinigt. Zum einen wurde es als Kontrolle für den Vergleich mit neuen Aminosäureaustauschvarianten von CryB verwendet (Abschnitt 3.2), zum anderen für verschiedene Experimente wie Interaktionsstudien, Kristallisation oder den Reparaturassay. Ausbeute und Reinheit des Proteins hängen von der Anzahl der Aufreinigungsschritte ab. Bei einer Ni-NTA-Aufreinigung konnten im Schnitt 10 mg Protein (+/- 2,2) je Liter Expressionskultur erhalten werden. Die Ausbeute nach der Heparin-Aufreinigung von zuvor Ni-NTA gereinigtem Protein betrug 5,3 mg (+/- 1,6) je Liter Expressionskultur. Die Reinheiten nach diesen beiden Aufreinigungsschritten wurden einmalig durch Quantifizierung des Anteils der Intensität der CryB-Bande in einem Coomassie-gefärbten Gel im Verhältnis zu den Intensitäten aller vorhandenen Banden der gleichen Probe bestimmt (Abbildung 3.2 A). Die Bestimmung erfolgte mit dem Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) in Zusammenarbeit mit Richard Pokorny (AG Batschauer, Philipps-Universität Marburg). Die Reinheit nach Ni-NTA betrug lediglich 46 %, was durch das Vorhandensein unspezifischer Banden erkennbar ist (Abbildung 3.2 A). Durch anschließende Heparin-Aufreinigung wurde sie auf 95 % erhöht.

Für die meisten Anwendungen genühten Aufreinigungen durch Ni-NTA oder Ni-NTA und Heparin. Eine Gelfiltration wurde in wenigen Fällen angeschlossen. Die Ausbeute nach Gelfiltration von zuvor Ni-NTA- und Heparin-gereinigtem Protein betrug ca. 4 mg Protein (+/- 2) je Liter Expressionskultur; die Reinheit wurde nicht bestimmt, da sie nach der Heparin-Aufreinigung mit 95 % bereits sehr hoch war. Chromatogramme eines Heparin- sowie eines Gelfiltrationslaufs sind in Anhang 9.1 gezeigt. Die Absorptionsspektren nach Ni-NTA- und Heparin-Aufreinigung (Abbildung 3.2 B) entsprechen dem zuvor beschriebenen Spektrum von CryB mit mehreren auf oxidiertes FAD zurückzuführenden Maxima (Hendrischk et al., 2009a; Geisselbrecht et al., 2012). Das Spektrum nach der Heparin-Aufreinigung weist bei gleicher Proteinmenge eine höhere Gesamtabsorption auf als nach Ni-NTA-Aufreinigung, was auf den höheren CryB-Anteil im Verhältnis zu unspezifischen Verunreinigungen in ersterer Probe zurückzuführen ist. CryB weist eine Gelbfärbung auf, die durch die blaulichtabsorbierenden Cofaktoren entsteht (Hendrischk et al., 2009a). Bei sehr hohen Konzentrationen zeigt sich eine starke bräunliche Färbung, die auf das FeS-Cluster zurückzuführen ist (Abbildung 3.2 C). Die Stabilität hängt vom Puffer ab, in dem CryB aufbewahrt wird. Ni-NTA-Elutionspuffer mit einem hohen Imidazolgehalt begünstigt ein Ausfallen

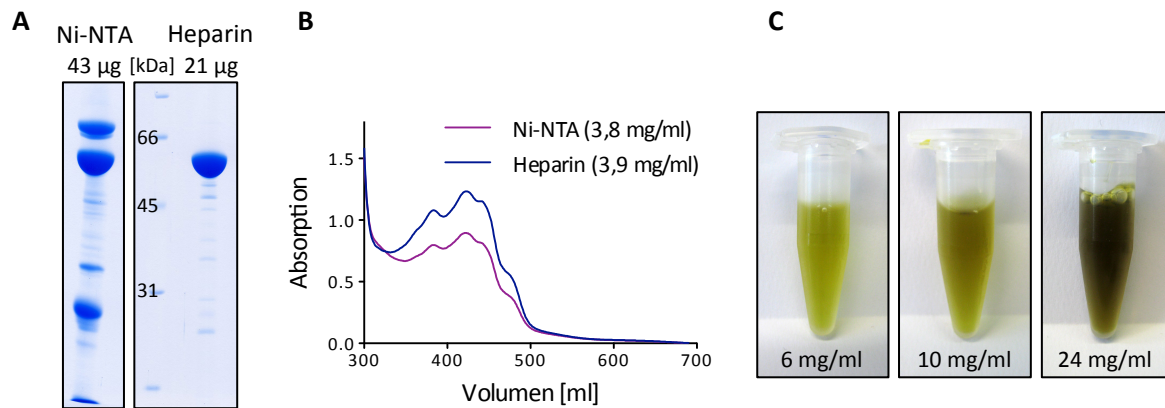


Abbildung 3.2: Aufreinigung des CryB-Wildtyp-Proteins. **A)** Coomassie-gefärbtes Gel der Proben nach Ni-NTA- und Heparin-Aufreinigung. Die Ausschnitte stammen von demselben Gel. **B)** Absorptionsspektren von CryB nach Ni-NTA- und Heparin-Aufreinigung, normalisiert auf 700 nm. **C)** Verschiedene Konzentrationen von CryB nach der Heparin-Aufreinigung.

des Proteins stärker als die anderen verwendeten Puffer, jedoch bleibt Wildtyp-CryB auch in Elutionspuffer für einige Tage stabil. Ein Verdünnen mit dem Puffer des nächsten Aufreinigungsschrittes oder Ni-NTA-Lysepuffer verbessert die Haltbarkeit.

In den jeweiligen Kapiteln ist beschrieben, welche Aufreinigungen vorgenommen wurden. Für Untersuchungen der CryB-Varianten (Abschnitte 3.3 und 3.4) genügte Ni-NTA. Die charakteristische Gelbfärbung diente bei den Untersuchungen der Varianten als erster offensichtlicher Indikator für das Vorhandensein oder die Abwesenheit der blaulichtabsorbierenden Cofaktoren. Dies wurde weiterhin durch Spektralmessungen der Proteine und der gelösten Cofaktoren untersucht.

3.1.3 Expression von CryB in *R. sphaeroides*

Als Basis für *in vivo* Untersuchungen dienten die Stämme *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 (Wildtyp) und 2.4.1 $\Delta cryB$ (im Folgenden nur $\Delta cryB$ genannt). Im Knockout-Stamm $\Delta cryB$ ist der Großteil des Gens durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt. Dieser Stamm wurde durch das Plasmid pRK $cryB$ komplementiert und ergibt den Stamm $\Delta cryB$ pRK $cryB$. Das Plasmid enthält die CDS von $cryB$ inklusive 127 bp *up-* und 67 bp *downstream* und umfasst somit den Gen-eigenen Promotor und Terminator (Hendrischk et al., 2007). Als Leervektorkontrolle dient entsprechend der Stamm $\Delta cryB$ pRK415. Ausgehend von pRK $cryB$ wurden diverse Komplementationen mit CryB-Varianten durchgeführt. Des Weiteren wurde CryB als eCFP-Fusion vom Plasmid pBE16ScryBeCFP zwecks Lokalisationsstudien exprimiert (Abschnitt 3.11) sowie als Überexpression von pRK $pufcryB$ für den *in vivo pull-down* (Abschnitt 3.9) und die Photoreaktivierung, entweder im Wildtyp oder in $\Delta cryB$.

3.2 Einführung zu den CryB-Varianten

Alle bisherigen *in vivo* Untersuchungen zu CryB betrafen das Wildtyp-Protein. Die detaillierte Betrachtung der Rolle der Cofaktoren von CryB bei der *in vivo* Photoreaktivierung geschah in dieser Arbeit durch den gezielten Austausch von Aminosäuren an den Bindestellen der Cofaktoren, wodurch Bindung oder Funktion von jeweils einem oder zwei der insgesamt drei Cofaktoren beeinträchtigt werden. Der Knockout-Stamm $\Delta cryB$ wurde mit den verschiedenen Varianten komplementiert. Es wurde untersucht, ob die jeweilige Variante die Überlebensfähigkeit von $\Delta cryB$ nach UV-Behandlung wiederherstellen kann. Darauf basierend konnte auf die Relevanz der einzelnen Cofaktoren im Prozess der Photoreaktivierung geschlossen werden. Neben den Cofaktor-Varianten wurden zwei CryB-Versionen untersucht, bei denen jeweils eine in (6-4)-Photolyasen konservierte Aminosäure des aktiven Zentrums ausgetauscht wurde. Diese Varianten sollten Aufschluss über die Funktion von CryB als potenzielle (6-4)-Photolyase geben.

Die Herstellung der ersten Aminosäureaustauschvarianten von CryB geschah durch Yann Geisselbrecht und diente vorwiegend der Aufklärung des proteininternen Elektronentransferweges zur Reduktion des FAD (Geisselbrecht, 2013). Außerdem wurden Aminosäuren an der Bindestelle des Antennenchromophors sowie des Eisen-Schwefel-Clusters vorgenommen. Letzteres wurde ebenso durch Sebastian Frühwirth begonnen (Frühwirth, 2012). Die Erkenntnisse der Untersuchungen auf Proteinebene wurden genutzt, um einige dieser Varianten für *in vivo* Untersuchungen auszuwählen. Im Laufe dieser Arbeit wurden weitere, bislang noch nicht vorhandene Varianten generiert, um die Reparaturaktivität sowie die Bindung von FAD und FeS-Cluster weiterführend zu untersuchen. Darunter befinden sich neben Austauschvarianten auch zwei C-terminal verkürzte CryB-Versionen. Die Analyse neuer Varianten geschah zunächst auf Proteinebene. Interessante Kandidaten wurden im Anschluss für *in vivo* Untersuchungen in *R. sphaeroides* $\Delta cryB$ exprimiert.

Alle Konstrukte für die heterologe Expression der CryB-Varianten in *E. coli* zur Untersuchung auf Proteinebene basieren auf dem in Abschnitt 3.1.1 vorgestellten Konstrukt pETCryB und unterscheiden sich nur in Basenaustauschen oder Verkürzungen der CDS. Entsprechend basieren alle für die *in vivo* Expression in *R. sphaeroides* $\Delta cryB$ ausgewählten Kandidaten zur Untersuchung der Photoreaktivierung auf dem Konstrukt pRKCryB (Abschnitt 3.1.3). Die Einbringung von Punktmutationen ins Chromosom würde eine natürlichere Situation darstellen und ist prinzipiell möglich, jedoch langwieriger. Der Weg der Komplementation von $\Delta cryB$ mit plasmidkodierten CryB-Varianten wurde gewählt, da auf diese Weise viele Aminosäureaustausche untersucht werden können, ohne die Erzeugung von chromosomalen Mutationen.

Aufgrund der Plasmidexpression der Varianten werden die entsprechenden Stämme immer mit der Wildtyp-Komplementation $\Delta cryB$ pRKCryB sowie mit der Leervektorkontrolle $\Delta cryB$ pRK415 verglichen. Tabelle 3.1 zeigt eine Übersicht der im Vorfeld und während dieser Arbeit entstandenen Varianten in den Vektoren pETCryB und pRKCryB. Außerdem wurde eine Überexpression des Wildtyp-Proteins in $\Delta cryB$ untersucht. Das dazu verwendete Plasmid pRKpufcryB ist in Konzer (2008) sowie in einem späteren Abschnitt (3.9) beschrieben.

Tabelle 3.1: CryB-Varianten mit Aminosäureaustausch oder Sequenzverkürzung zur Expression in *E. coli* (pETcryB) und *R. sphaeroides* (pRKcryB)

Name	AS-Austausch / Modifikation	Beteiligung der AS / Domäne	Quelle	
			in pETcryB	in pRKcryB
H362A	Histidin -> Alanin	DNA-Interaktion	d. A.	d. A.
Q302A	Glutamin -> Alanin	DNA-Interaktion	d. A.	d. A.
W338F	Tryptophan -> Phenylalanin	FAD-Reduktion	YG	d. A.
Y387F	Tyrosin -> Phenylalanin	FAD-Reduktion	YG ¹⁾	d. A.
Y391F	Tyrosin -> Phenylalanin	FAD-Reduktion	YG ¹⁾	d. A.
L366H	Leucin -> Histidin	FAD-Bindung	NK	HH
L366F	Leucin -> Phenylalanin	FAD-Bindung	d. A.	d. A.
L366A	Leucin -> Alanin	FAD-Bindung	d. A.	d. A.
E37F	Glutamat -> Phenylalanin	DLZ-Bindung	YG	d. A.
E37F/W338F	Glutamat -> Phenylalanin Tryptophan -> Phenylalanin	DLZ-Bindung FAD-Reduktion	d. A.	JS
E37F/L366H	Glutamat -> Phenylalanin Leucin -> Histidin	DLZ-Bindung FAD-Bindung	d. A.	d. A.
C346A	Cystein -> Alanin	FeS-Cluster-Bindung	d. A.	–
C434A	Cystein -> Alanin	FeS-Cluster-Bindung	d. A.	–
C437A	Cystein -> Alanin	FeS-Cluster-Bindung	YG	–
C450A	Cystein -> Alanin	FeS-Cluster-Bindung	d. A.	–
C434A/C437A	Cystein -> Alanin (2×)	FeS-Cluster-Bindung	d. A.	SF/KT
C437S	Cystein -> Serin	FeS-Cluster-Bindung	NSR	–
$\Delta_{C432-V508}$	C-terminale Deletion	FeS-Cluster-Bindung	NSR	–
$\Delta_{D431-P507}$	C-terminale Deletion mit terminalem Valin	FeS-Cluster-Bindung	d. A.	–

Abkürzungen: d. A. = diese Arbeit; NK = Nils Kawen (Bachelorarbeit 2014); HH = Helena Hantl (Bachelorarbeit 2015); JS = Jana Stein (Bachelorarbeit 2013); SF = Sebastian Frühwirth (Doktorarbeit 2012); KT = Kristin Teich (2012); YG = Yann Geisselbrecht (Doktorarbeit 2013); NSR = Sreenath Reddy Nayakanti (2013).

FAD = Flavin-Adenin-Dinukleotid; DLZ = 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin; FeS = Eisen-Schwefel.

¹⁾ in dieser Arbeit nur *in vivo*. Für *in vitro* Untersuchungen siehe Geisselbrecht (2013).

3.2.1 *In vivo* Expression und Photoreaktivierung – alle Varianten

Zur Überprüfung der Proteinlevel der in *R. sphaeroides* $\Delta cryB$ exprimierten CryB-Varianten wurden Gesamtzellextrakte der Stämme durch Western Blotting untersucht (Abbildung 3.3). Dabei wurden die Proben in lösliche und unlösliche Fraktionen getrennt. Im Falle von schlecht löslichen Proteinen sollte dadurch überprüft werden, ob ein Anteil des exprimierten Proteins in *inclusion bodies* gelangt. Die Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen (mikroaerob) angezogen und in der gleichen Wachstumsphase ($OD_{660} = 0,75$) geerntet, wie bei der Verwendung für die *in vivo* Photoreaktivierungsexperimente. Aufgrund einer geringen Expressionsrate von CryB (Hendrischk et al., 2009a) ist in der Wildtyp-Probe kein Signal zu erkennen. Auch im Knockout $\Delta cryB$ und in der Leervektorkontrolle $\Delta cryB$ pRK415 erscheint kein Signal. Ein deutliches Signal ist bei dem Komplementationsstamm $\Delta cryB$ pRKcryB erkennbar. Abbildung

3.3 dient als Übersicht und dem Vergleich aller CryB-Varianten sowie der Kontrollen, auf die bei der Charakterisierung in Bezug auf die *in vivo* Photoreaktivierung in den folgenden Abschnitten verwiesen wird. Diesbezüglich ist durch ein (+) oder (-) angegeben, ob die Photoreaktivierung im jeweiligen Stamm funktioniert oder nicht (vgl. Abbildung 3.4).

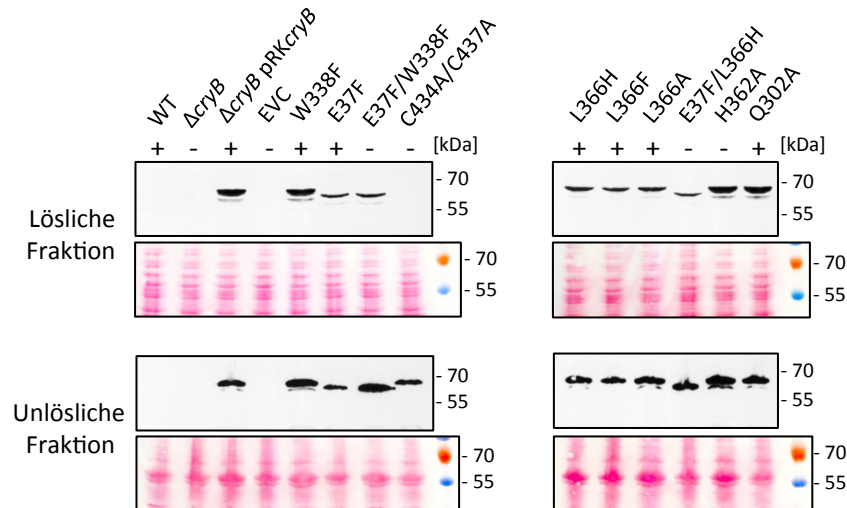


Abbildung 3.3: Western Blot gegen CryB aus Zelllysaten von 14 *R. sphaeroides*-Stämmen. Zellen wurden unter mikroaeroben Bedingungen angezogen und bei einer OD_{660} von 0,75 geerntet. Je 100 μ g Gesamtprotein der Überstände nach Ultrazentrifugation (lösliche Fraktion) bzw. der resuspendierten Sedimente (unlösliche Fraktion). Zu jedem Stamm ist angegeben, ob dieser zur Photoreaktivierung fähig ist (+) oder nicht (-) (vgl. Abbildung 3.4). Ponceau-gefärbte Membranen dienen als Ladekontrollen. Alle Stämme mit CryB-Varianten mit den angegebenen Aminosäureaustauschen basieren auf $\Delta cryB$ pRKcryB. EVC = Leervektorkontrolle $\Delta cryB$ pRK415. Das berechnete Molekulargewicht von CryB beträgt 58 kDa (ExpASy; Gasteiger et al., 2003).

Bereits zuvor wurde gezeigt, dass CryB an dem lichtabhängigen Überleben von UV-Strahlung beteiligt ist (Hendrischk et al., 2007). Die grundsätzliche Fähigkeit zur Photoreaktivierung in *R. sphaeroides* zeigt sich durch die stark unterschiedlichen Überlebensraten zwischen Wildtyp-Zellen, die nach der UV-Behandlung entweder im Licht oder in Dunkelheit inkubiert wurden. Die im Licht angezogenen Zellen weisen eine Überlebensrate von 81 % auf, während die der direkt nach dem UV-Stress in Dunkelheit inkubierten Zellen bei 2 % liegt. Keine der Überlebensraten der im Dunkeln angezogenen Stämme erreicht einen höheren Wert als 6 % (Abbildung 3.4). Für den Vergleich der Stämme in Bezug auf die Fähigkeit zur Photoreaktivierung werden im Folgenden nur die Werte der im Licht gewachsenen Zellen verglichen. Der Knockout-Stamm $\Delta cryB$ weist eine im Vergleich zum Wildtyp (81 %) stark verminderte Überlebensrate von 8 % auf. Dieser Effekt ist spezifisch, da er durch die Wiedereinführung des *cryB*-Gens auf einem Plasmid rückgängig gemacht wird, gezeigt durch den Komplementationsstamm $\Delta cryB$ pRKcryB. Der leere Vektor ist nicht in der Lage, die UV-Resistenz des Wildtyps wiederherzustellen, gezeigt durch den Stamm $\Delta cryB$ pRK415 mit einer Überlebensrate von 17 %. Die Überlebensrate des Komplementationsstammes liegt mit 91 % höher als die des Wildtyps, jedoch im Bereich der Standardabweichung. Das Proteinlevel von CryB in diesem Stamm ist zudem deutlich höher als im Wildtyp (Abbildung 3.3). Die Überexpression von CryB im Stamm $\Delta cryB$ pRKpufcryB bewirkt keine weitere Steigerung der Überlebensrate, sie liegt mit 84 % ebenfalls in diesem Bereich. Das residuale Überleben in $\Delta cryB$ und $\Delta cryB$ pRK415 ist wahrscheinlich auf die Aktivität der Photolyase PhrA (Hendrischk et al., 2007) zurückzuführen. Der Stamm $\Delta phrA$ zeigt unter den hier angewendeten Bedingungen kein Überleben (Daten nicht gezeigt). Alle weiteren auf die *in vivo* Photoreaktivierung untersuchten CryB-Varianten der in Abbildung 3.4 gezeigten Stämme werden

in den folgenden Abschnitten ausführlich charakterisiert und an den entsprechenden Stellen wird auf diese Abbildung verwiesen. Die Stämme $\Delta cryB$ pRK $cryB$ und $\Delta cryB$ pRK415 dienen dabei stets als Positiv- bzw. Negativkontrolle.

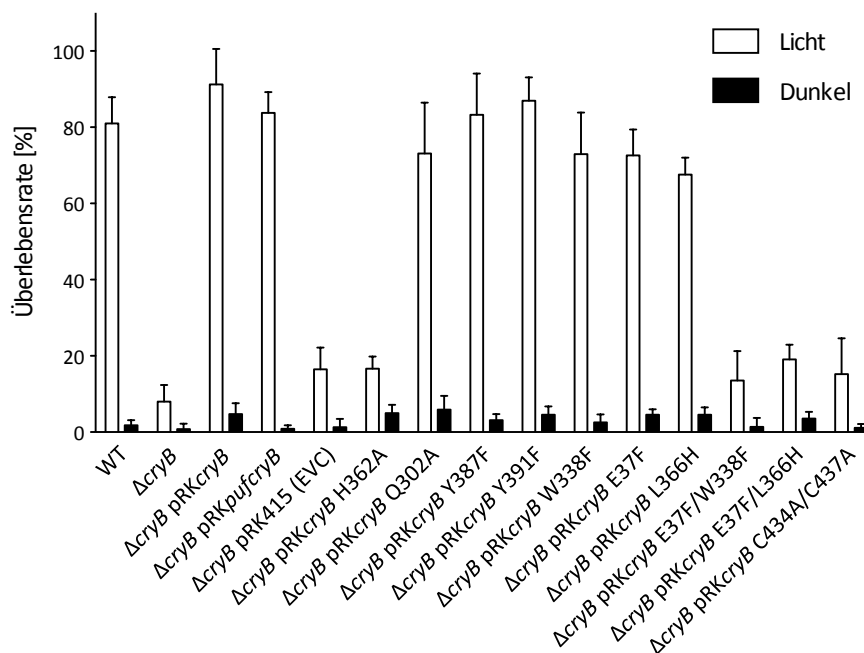


Abbildung 3.4: Überlebensraten verschiedener *R. sphaeroides*-Stämme nach UV-Bestrahlung. Zellen wurden mit 100 J/m^2 UV-Licht (254 nm) bestrahlt und anschließend zur Regenerierung bei einer Lichtintensität von $50 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ (weiße Balken) für 3 Stunden oder in Dunkelheit (schwarze Balken) inkubiert. Kolonien wurden nach 4 Tagen weiterer Inkubation in Dunkelheit gezählt. Die Überlebensraten sind als Verhältnis der CFU von UV-behandelten zu nicht behandelten Zellen in Prozent dargestellt. Mittelwerte aus drei bis vier biologischen Wiederholungen mit Standardabweichung.

3.3 Untersuchungen zur (6-4)-Photolyaseaktivität

3.3.1 Aktives Zentrum – H362A und Q302A

Eukaryotische (6-4)-Photolyasen besitzen drei konservierte Histidine als HHxxxH-Motiv im aktiven Zentrum, von denen zwei essenziell für die Reparatur von (6-4)-Schäden sind (Hitomi et al., 2001). Abbildung 3.5 zeigt einen Sequenzvergleich von vier eukaryotischen und zwei proteobakteriellen (6-4)-Photolyasen. Die Positionen der beiden relevanten Histidine sind hervorgehoben und gemäß der üblichen Bezeichnung als His1 und His2 markiert (Yamamoto et al., 2017). In der FeS-BCP-Unterfamilie bindet das erste Histidin, H362 in CryB, entsprechend H366 in *Agrobacterium fabrum* PhrB, an das erste (5') Thymin des T(6-4)T-Photoproduktes. Das zweite Histidin ist in der FeS-BCP-Gruppe durch ein Leucin ersetzt (L366 in CryB) und an der Bindung des zweiten (3') Thymins des Schadens beteiligt. Das Histidin direkt vor H362 ist nicht an der Bindung und Reparatur des Schadens beteiligt (Zhang et al., 2013).

	1	2
<i>D.melanogaster</i> (fly) 6-4Phot	351 DAIMRQLRQEGWIHHLARH	HAVACFL
<i>X.laevis</i> (frog) 6-4Phot	340 DAIMTQLRTEGWIHHLARH	HAVACFL
<i>D.salina</i> (green alga) 6-4Phot	387 DAAMTQLREWGWMHHLARH	HSVACFL
<i>U.maydis</i> (fungus) Phr2	423 DALMRQLRLEGWMHHLGRH	SVAAFL
<i>A.fabrum</i> (bacterium) PhrB	352 AKVITETIENAYAHHIQRL	MITGNF
<i>R.sphaeroides</i> (bacterium) CryB	348 SAAVAQTRDLAYAHHIQRL	MVVTGNF
	: : .: **: * :: :	

Abbildung 3.5: Alignment der Aminosäuren des aktiven Zentrums verschiedener (6-4)-Photolyasen. Konservierte Histidine/Leucine die an der Bindung des DNA-Schadens beteiligt sind, sind in rot hervorgehoben und mit Zahlen markiert. Die blauen Zahlen geben die Position der gezeigten Sequenz im Protein an. UniProt-Nummern (UniProt, 2015): *Drosophila melanogaster* (Q8SXX5), *Xenopus laevis* (Q9I910), *Dunaliella salina* (Q52Z99), *Ustilago maydis* (AOA0D1E060), *Agrobacterium fabrum* (A9CH39), *Rhodobacter sphaeroides* (Q3IXP1). Das Alignment wurde mit CLUSTAL OMEGA (Sievers et al., 2011) erstellt.

Zur Erörterung der Möglichkeit einer spezifischen (6-4)-Photolyaseaktivität bei CryB wurde das hochkonservierte und wichtige Histidin H362 durch Alanin ersetzt. Des Weiteren wurde das zu 99 % in der FeS-BCP-Gruppe konservierte Glutamin Q302 (Q306 in *AfPhrB*), welches ebenfalls an der Bindung des ersten Thymins des (6-4)-Schadens beteiligt und auch in der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* vorhanden ist (Zhang et al., 2013), durch Alanin ersetzt. Beide Varianten wurden zur Analyse auf Proteinebene heterolog exprimiert und aufgereinigt. Beide lassen sich in ausreichender Menge und in stabiler Form exprimieren, auch die charakteristische Gelbfärbung ist vorhanden (Abbildung 3.6 A und B). Bei CryB H362A ist nach einem Tag ein starker Ausfall zu beobachten, jedoch nur, wenn das Protein nach der Ni-NTA-Aufreinigung in Elutionspuffer mit hoher Imidazolkonzentration bleibt. Wird das Protein verdünnt oder umpuffert, so bleibt es wie Wildtyp-CryB für mehrere Tage stabil. CryB Q302A bleibt auch in Elutionspuffer für mehrere Tage stabil. Die Absorptionsspektren der Proteine nach Ni-NTA-Aufreinigung unterscheiden sich nicht von dem des Wildtyp-Proteins, ebenso die durch Aufkochen der Proteine erhaltenen löslichen Cofaktoren (Abbildung 3.6 C und D). Außerdem wurde der Besetzungsgrad von CryB H362A mit den Cofaktoren FAD und DLZ bestimmt, er beträgt 96 bzw. 77 %, was dem Wildtyp-Protein entspricht (Tabelle 3.2).

Diese Varianten wurden zur Untersuchung der Fähigkeit zur Photoreaktivierung plasmidkodiert in *R. sphaeroides* $\Delta cryB$ eingefügt und mit dem Stamm $\Delta cryB$ pRK $cryB$, der die *in vivo* Photoreaktivierung wiederherstellen kann, als Positivkontrolle verglichen. $\Delta cryB$ pRK415 diente als Negativkontrolle. Der Stamm $\Delta cryB$ pRK $cryB$ H362A zeigte eine mit der Negativkontrolle vergleichbare Überlebensrate nach UV-Behandlung von 17 % und war somit nicht in der Lage, die fehlende Photoreaktivierung wiederherzustellen (Abbildung 3.4). Der Stamm $\Delta cryB$ pRK $cryB$ Q302A zeigte nur eine geringfügig verringerte Überlebensrate (73 %) im Vergleich zur Positivkontrolle. Bei der *in vivo* Expression in $\Delta cryB$ weisen beide Varianten im Western Blot eine vergleichbare Bande wie das Wildtyp-Protein des Kontrollstammes $\Delta cryB$ pRK $cryB$ auf (Abbildung 3.3). Die Photoreaktivierung wurde auch kinetisch bestimmt, dies ist zusammen mit anderen CryB-Varianten in einem späteren Abschnitt (3.4.5) beschrieben.

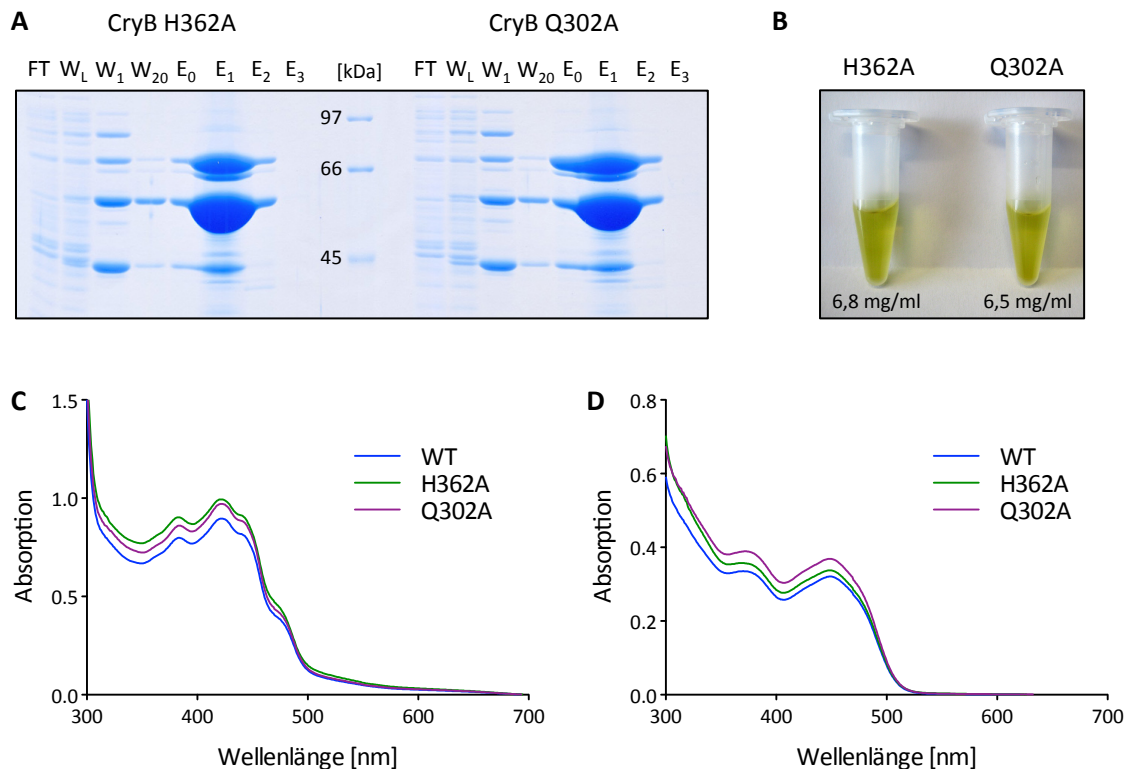
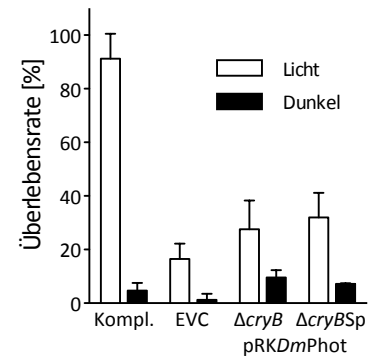


Abbildung 3.6: Untersuchung der CryB-Varianten H362A und Q302A nach Ni-NTA-Aufreinigung aus 0,5 Liter *E. coli* BL21(DE3)pLysS Expressionskultur. **A)** Coomassie-gefärbtes SDS-PAA-Gel mit Fraktionen der Ni-NTA-Aufreinigung. FT = *flow-through* (2 μ l einer 1:10 Verdünnung), WL = Waschfraktion mit Lysepuffer (10 μ l), W = Waschfraktion (je 10 μ l), E = Elutionsfraktion (je 10 μ l). **B)** Färbung der E₁-Fraktionen. **C)** Absorptionsspektren der E₁-Fraktionen (verdünnt auf ca. 3,8 mg/ml). **D)** Absorptionsspektren der gelösten Cofaktoren (Überstände nach Aufkochen der Proteine) aus 2,1–2,2 mg Protein (3,9–4 mg/ml). Spektren von Wildtyp-CryB (WT) wurden zum Vergleich eingefügt und stammen aus den Daten der in Abbildung 3.12 gezeigten Spektren. Normalisiert auf 700 nm.

3.3.2 Komplementation von $\Delta cryB$ mit der (6-4)-Photolyase aus *Drosophila melanogaster*

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Nils Kawen wurde die Gensequenz der gut charakterisierten (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* (Maul et al., 2008) in pRK415 kloniert (pRKDmPhot) und zur heterologen Expression in *R. sphaeroides* $\Delta cryB$ eingebracht (Kawen, 2014). So sollte untersucht werden, ob eine klassische (6-4)-Photolyase in der Lage ist, den Photoreaktivierungsdefekt von $\Delta cryB$ aufzuheben, wodurch gezeigt wäre, dass der Reparaturmechanismus von CryB dem von (6-4)-Photolyasen entspricht. Die Sequenz der *Dm*(6-4)-Photolyase wurde von der AG Essen (Philipps-Universität Marburg) auf dem Plasmid pET-28a-His6-*Dm*(6-4) (Kiontke, 2012) zur Verfügung gestellt und stammt ursprünglich von der AG Carell (Ludwig-Maximilians-Universität München). Der Aufbau des Konstruktes ist in Maul et al. (2008) beschrieben. Die Originalsequenz der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* (UniProt-Nummer Q24281) ist mit Introns 1686 bp lang. Die verwendete Sequenz ist aus cDNA gewonnen und sowohl in der Mitte als auch am Ende um jeweils 63 bp verkürzt. Somit beträgt die CDS 1563 bp inklusive Start- und Stopcodon und kodiert 520 Aminosäuren (Anhang 9.5). Außerdem weicht die Sequenz in der Position R36 (Lysin) von der bei UniProt hinterlegten Sequenz mit K36 (Arginin) ab. In dieser Arbeit wurden die Knockout-Stämme $\Delta cryB$ und $\Delta cryBSp$ (neuer *cryB*-Knockout mit Spectinomycinresistenz, siehe Abschnitt 3.6.2) mit dem Plasmid pRKDmPhot konjugiert und auf das Überleben von UV-Stress wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben untersucht. Beide Stämme erreichten eine Überlebensrate von ca. 30% (Abbildung 3.7), was im Vergleich zu $\Delta cryB$ pRK415 (Leervektorkontrolle) leicht höher ist. Die nach

Abbildung 3.7: Überlebensraten der mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* komplementierten Stämme $\Delta cryB$ pRKDmPhot und $\Delta cryB$ Sp pRKDmPhot nach UV-Bestrahlung. Zellen wurden mit 100 J/m^2 UV-Licht (254 nm) bestrahlt und anschließend zur Regenerierung bei einer Lichtintensität von $50 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ (weiße Balken) für mindestens 3 Stunden oder in Dunkelheit (schwarze Balken) inkubiert. Kolonien wurden nach 3–4 Tagen weiterer Inkubation in Dunkelheit gezählt. Die Überlebensraten sind als Verhältnis der CFU von UV-behandelten zu nicht behandelten Zellen in Prozent dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichung von zwei unabhängigen Wiederholungen. Zum Vergleich sind $\Delta cryB$ pRKcryB (Komplementation) und $\Delta cryB$ pRK415 (EVC, Leervektorkontrolle) aus Abbildung 3.4 eingefügt.



der UV-Behandlung im Dunkeln inkubierten Kontrollen erreichten Überlebensraten von 10 bzw. 7%, was leicht über den Werten anderer Dunkelkontrollen (Abbildung 3.4) liegt.

3.3.3 *In vitro* Reparatur von (6-4)-Schäden

Die Rolle von CryB bei der *in vivo* Photoreaktivierung wurde in der vorliegenden Arbeit im Detail untersucht (Abschnitte 3.3.1 und 3.4). Dem Prozess der Photoreaktivierung liegt die direkte und lichtabhängige Reparatur UV-geschädigter DNA durch Photolyasen zugrunde. Diese Merkmale sprechen vor dem Hintergrund der *in vivo* Beobachtungen (vgl. Abschnitt 3.2.1) für eine Photolyaseaktivität von CryB. Bisher wurde durch jeweils eine Methode untersucht, ob CryB CPD- oder (6-4)-Schäden reparieren kann (Hendrischk et al., 2009a; Geisselbrecht et al., 2012), in keiner der beiden Experimente konnte eine Reparatur festgestellt werden. Das Bekanntwerden der Reparaturaktivität von (6-4)-Schäden durch das CryB-Homolog PhrB aus *A. fabrum* (Zhang et al., 2013) legte eine erneute Prüfung nahe, um die Frage nach einer möglicherweise schwer nachzuweisenden Reparaturaktivität durch CryB zu klären. Deshalb wurde eine alternative Methode angewendet, die in der AG Batschauer (Philipps-Universität Marburg) etabliert ist (Brych et al., 2015) und dort im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Richard Pokorny durchgeführt wurde. Der Fokus lag dabei auf der Reparatur von (6-4)-Schäden, wobei durch diese Methode die Reparatur von beiden Schadentypen simultan beobachtet werden kann. Der DNA-Reparaturassay beruht auf der spektroskopischen Messung von Absorptionsänderungen UV-geschädigter DNA, die mit einer Photolyase behandelt wurde. Dabei ist der Einsatz geringer Mengen an Protein wichtig, da sonst bei der Messung die Absorption der DNA durch die des Proteins überdeckt würde. Intakte Thyminen in DNA weisen ein Absorptionsmaximum von 265 nm auf. Weder CPD- noch (6-4)-Schäden absorbieren in diesem Bereich. Die Ab- oder Zunahme dieses Maximums deutet demnach auf eine Entstehung bzw. auf die Reparatur von allen Typen von Thymindimeren hin. Da CPD die häufigere Schadenform darstellt, wird durch die Betrachtung dieses Peaks vor allem die CPD-Reparatur untersucht (Kao et al., 2005). T(6-4)T-Dimere weisen ein spezifisches Absorptionsmaximum bei 325 nm auf. Die Zunahme dieses Maximums zeigt demnach eine Entstehung, und die Abnahme eine Reparatur von T(6-4)T-Dimeren an (Yamamoto et al., 2013). In dieser Arbeit wurde Oligo(dT)₁₈ als Substrat eingesetzt, das durch Bestrahlung mit UV-C-Licht zunächst geschädigt wurde. Dabei entstehen CPD- und (6-4)-Schäden in einem Verhältnis von 4:1 (Brych et al., 2015). Bei Verwendung eines solchen DNA-Fragments mit beiden Schadentypen kann somit die Reparatur durch CPD-Photolyasen anhand eines Anstiegs der Absorption bei 265 nm auf ca. 4/5 der Intensität des gleichen DNA-Fragments vor dem Einfügen des Schadens sowie keine Veränderung bei 325 nm festgestellt werden; eine Reparatur durch (6-4)-Photolyasen ist durch einen Rückgang der Absorption bei 325 nm und einen Anstieg bei 265 nm auf ca. 1/5 der Intensität der

ungeschädigten DNA zu erkennen. Für den Assay wurde zunächst Schaden in Oligo(dT)₁₈-DNA hergestellt (Abschnitt 3.3.3.1) sowie CryB aufgereinigt und photoreduziert (Abschnitt 3.3.3.2); im Anschluss wurden beide Komponenten im Reparaturassay zusammengefügt (Abschnitt 3.3.3.3).

3.3.3.1 Herstellung von Schaden

Zur Induktion von Thymindimeren wurde einzelsträngige Oligo(dT)₁₈-DNA mit Licht einer Anregungswellenlänge von 265 nm für 2,5 Stunden bestrahlt. In diesem Zeitraum wurde alle 15–30 Minuten ein Absorptionsspektrum im Bereich 300–450 nm aufgenommen, um die Entstehung von T(6-4)T-Dimeren mit einem Absorptionsmaximum von 325 nm zu erfassen (Abbildung 3.8 A). Darüber hinaus wurde vor Beginn und nach Abschluss der Bestrahlung jeweils ein Aliquot aus der Reaktion entnommen und ein Absorptionsspektrum im Bereich von 220–450 nm gemessen, um den Rückgang des Absorptionsmaximums intakter Thymine bei 265 nm zu überprüfen (Abbildung 3.8 B).

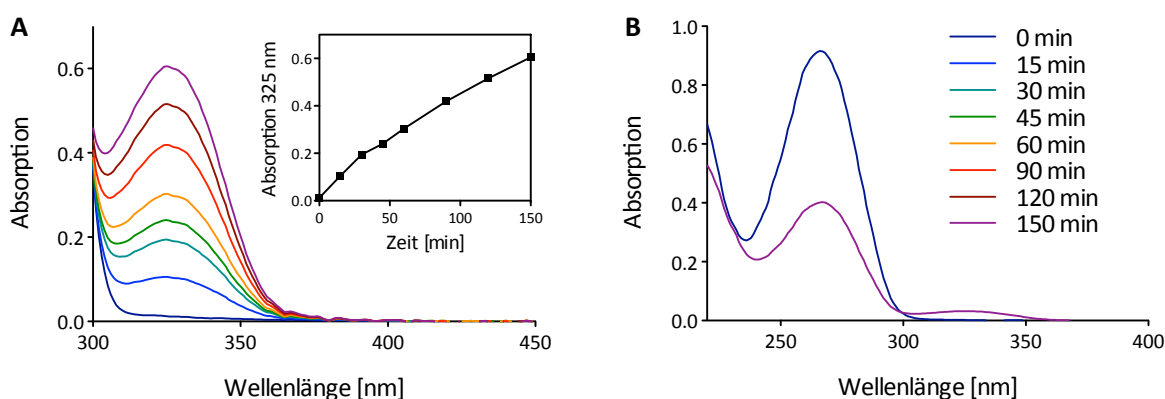
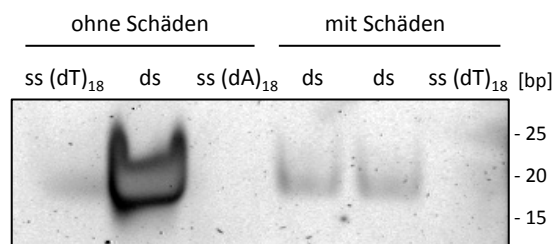


Abbildung 3.8: Schaden-Induktion in einzelsträngiger Oligo(dT)₁₈-DNA. **A)** Absorptionsspektren von 100 µM Oligo(dT)₁₈ zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Bestrahlung mit 265 nm UV-C-Licht zur Erzeugung von CPD- und (6-4)-Schäden. Die Absorptionsänderung bei 325 nm beschreibt die Zunahme von T(6-4)T-Produkten. Kleines Bild: Absorptionsverlauf bei 325 nm über einen Zeitraum von 150 Minuten. **B)** Absorptionsspektren von 5 µM Oligo(dT)₁₈ vor (0 min) und nach der Bestrahlung (150 min) mit 265 nm UV-C-Licht. Normalisiert auf 450 nm.

Die Absorption bei 325 nm nimmt im Laufe der Bestrahlung auf lineare Weise zu, was die Entstehung der T(6-4)T-Photoprodukte indiziert (Abbildung 3.8 A). Die Entstehung von Gesamtschäden ist durch den Rückgang des Absorptionsmaximums intakter Thymine bei 265 nm nach 150 Minuten Bestrahlung erkennbar (Abbildung 3.8 B). Bei dieser Messung wird auch die Absorption im Bereich 325 nm erfasst. Es ist eine leichte Erhebung in diesem Bereich nach 150 Minuten Bestrahlung erkennbar, wodurch die Entstehung von T(6-4)T bestätigt wird, die in A) aufgrund des Messbeginns bei 300 nm deutlicher aufgelöst ist. Bei dieser Methode ist es nicht möglich, lediglich einen Schadentyp zu generieren. Es entstehen im Durchschnitt ein (6-4)- und vier bis fünf CPD-Dimere je Substratmolekül (Brych et al., 2015). Für einen zweiten Reparaturassay wurde UV-geschädigte, einzelsträngige Oligo(dT)₁₈-DNA mit intakter Oligo(dA)₁₈-DNA aneinandergelagert, um auch die Reparatur von doppelsträngiger DNA zu untersuchen. Die gleiche *annealing*-Reaktion wurde als Kontrolle mit entsprechender ungeschädigter DNA durchgeführt. Die Produkte wurden auf einem PAA-Gel analysiert (Abbildung 3.9). Die Banden der doppelsträngigen Produkte mit Schäden sind deutlich schwächer als die der Kontrollreaktion mit intakten ssDNA-Molekülen. Die einzelsträngigen geschädigten und ungeschädigten Kontrollen sind schwach bis gar nicht zu erkennen. Die hergestellten UV-geschädigten DNA-Fragmente wurden als Substrate für die Reparaturassays verwendet (Abschnitt 3.3.3.3).

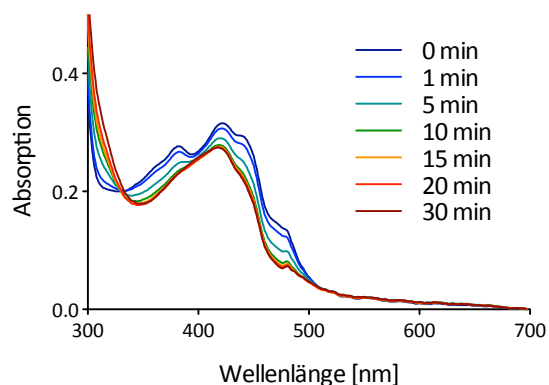
Abbildung 3.9: 10%iges PAA-Gel zur Überprüfung der Zusammenlagerung einzelsträngiger Oligo(dT)₁₈-DNA (mit und ohne UV-Schäden) mit Oligo(dA)₁₈-DNA zu dsDNA (Spuren 2, 4 und 5). Zur Kontrolle ist die einzelsträngige Ausgangs-DNA aufgetragen. Es wurden jeweils 20 pmol geladen.



3.3.3.2 Aufreinigung und Reduktion von CryB

Für den Reparaturassay wurde CryB über Ni-NTA- und Heparin-Chromatographie aufgereinigt. Die NaCl-Konzentration in den vereinigten Elutionsfraktionen nach der Heparin-Aufreinigung betrug ca. 460 mM und wurde mit HepA-Puffer auf 300 mM NaCl verdünnt. So befand sich das Protein in HepA/B-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,3). Zur vollständigen Photoreduktion des FAD in seine aktive Form FADH⁻ wurde das Protein in Anwesenheit eines Reduktionsmittels (DTT) für 30 Minuten mit Blaulicht (450 nm) bestrahlt. Dabei wurde der Vorgang der Reduktion alle 5 Minuten durch Messung von Absorptionsspektren überprüft (Abbildung 3.10). Nach 30 Minuten war eine vollständige Reduktion erreicht, erkennbar durch das Absinken der CryB-typischen Absorptionsmaxima. Das photoreduzierte Protein wurde direkt im Anschluss für den Reparaturassay verwendet.

Abbildung 3.10: Absorptionsspektren von CryB während der Photoreduktion. CryB wurde über Ni-NTA- und Heparin-Chromatographie aufgereinigt und in einer Konzentration von 10 µM in Anwesenheit von 10 mM DTT für 30 Minuten mit Blaulicht der Wellenlänge 450 nm (100 µmol/m²/s) bestrahlt. Spektren wurden alle 5–10 Minuten gemessen. Normalisiert auf 700 nm.



3.3.3.3 DNA-Reparaturassay

Für den Reparaturassay mit einzelsträngiger Oligo(dT)₁₈-DNA wurden photoreduziertes CryB und geschädigtes Substrat im Verhältnis 1:30 für 2 Stunden mit photoreaktivierendem Licht der Wellenlänge 385 nm bestrahlt. Alle 10 bis 30 Minuten wurden Absorptionsspektren im Bereich von 300–450 nm aufgenommen, um dem Intensitätsverlauf des Absorptionsmaximums von T(6-4)T-Dimeren bei 325 nm zu folgen. Außerdem wurde vor Beginn und nach Beendigung des Experiments jeweils ein Aliquot der Reaktion entnommen und die Absorption im Bereich 220–450 nm gemessen, um das Maximum bei 265 nm zu überprüfen, das das Vorhandensein intakter DNA anzeigt (Abbildung 3.8). Über einen Zeitraum von 120 Minuten ist keine erkennbare Veränderung des Absorptionsmaximums bei 325 nm festzustellen (Abbildung 3.11 A). Der Kurvenverlauf zeigt eine leichte Veränderung zwischen 200 und 320 nm, jedoch nicht das 325-nm-Maximum betreffend. Das Absorptionsmaximum bei 265 nm als Indikator für intakte DNA zeigt keinen Unterschied vor und nach dem Experiment (Abbildung 3.11 B). Beide Kurven sind vergleichbar mit der des puren Substrates nach Schaden-Induktion und deutlich niedriger als die von Oligo(dT)₁₈ ohne Schaden. Im Falle einer Reparatur von (6-4)-Schäden wäre ein deutlicher Abfall

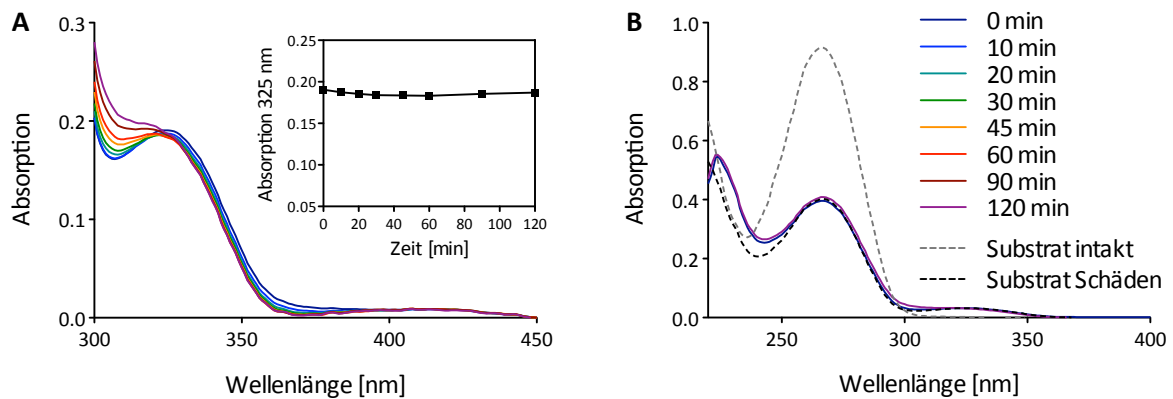


Abbildung 3.11: Reparaturassay mit 30 µM einzelsträngigem Oligo(dT)₁₈-Substrat und 1 µM photoreduziertem CryB. **A)** Absorptionsspektren der Gesamtreparaturreaktion zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Bestrahlung mit photoreaktivierendem Licht von 385 nm (100 µmol/m²/s). Die Absorption bei 325 nm zeigt das Vorhandensein von T(6-4)T-Dimeren an. Kleines Bild: Absorptionsverlauf bei 325 nm über einen Zeitraum von 120 Minuten. **B)** Absorptionsspektren von Aliquots der Reparaturreaktion mit 5 µM Oligo(dT)₁₈ vor (blau) und nach (rot) der Bestrahlung mit photoreaktivierendem Licht. Die Absorption bei 265 nm reflektiert das Vorhandensein intakter Thymine. Zum Vergleich sind die Absorptionsspektren des Substrates (5 µM) vor und nach Schaden-Induktion aus Abbildung 3.8 B hinzugefügt (gestrichelte Linien). Normalisiert auf 450 nm.

der 325-nm-Absorption sowie ein geringer Anstieg der 265-nm-Absorption zu erwarten gewesen. Die Ergebnisse können somit keine Reparaturaktivität von CryB unter den gewählten Bedingungen belegen.

Der beschriebene Reparaturassay wurde auf gleiche Weise mit einem doppelsträngigen Substrat aus UV-geschädigtem Oligo(dT)₁₈, nach der Zusammenlagerung mit Oligo(dA)₁₈, durchgeführt. Aufgrund des gleichen Ergebnisses einer ausbleibenden Absorptionsänderung bei 325 nm sind die Daten nicht erneut gezeigt.

Die Experimente zur (6-4)-Photolyaseaktivität von CryB wurden zu einem späteren Zeitpunkt unter veränderten Bedingungen in der AG Essen (Philipps-Universität Marburg) durch Elisabeth Ignatz wiederholt. Dabei wurde eine 10-fach höhere Menge Protein eingesetzt (10 µM anstelle von 1 µM) und dieses zuvor über einen weiteren Schritt (Gelfiltration) aufgereinigt. Es zeigte sich unter den optimierten Bedingungen eine schwache Reparaturaktivität durch CryB. Der Assay wurde zudem mit zwei Kontrollen, CryB W338F und CryB H362A, durchgeführt. Die Ergebnisse sind zusammen mit den in dieser Arbeit dargestellten Daten zur *in vivo* Photoreaktivierung in von Zadow et al. (2016) veröffentlicht.

3.4 Untersuchung der Cofaktoren

3.4.1 Der Elektronentransferweg zum FAD – die nicht reduzierbare CryB-Variante W338F

Ausführliche Studien zur Reduktion des FAD zu FADH⁻ haben gezeigt, dass zwei Tryptophane und zwei Tyrosine in der Nähe des aktiven Zentrums an der Elektronenübertragung auf FAD beteiligt sind. Die Untersuchungen wurden an den Varianten W338F, W386F, Y387F und Y391F durchgeführt. CryB W338F zeichnete sich durch eine komplett fehlende Ausprägung des FADH⁻-Zustandes *in vitro* aus, der unter gleichen Bedingungen beim Wildtyp-Protein erreicht wird (Geisselbrecht et al., 2012). Der Besetzungsgrad der Cofaktoren FAD und DLZ beträgt nach der heterologen Aufreinigung 99 bzw. 73 %, was dem Wildtyp entspricht (Tabelle 3.2). Um die Relevanz des Redoxzustandes von FAD zu klären, wurde diese Variante in $\Delta cryB$ exprimiert. In Bezug auf die *in vivo* Expression zeigt CryB W338F anhand des Western

Blots keinen Unterschied zum Wildtyp-Protein (Abbildung 3.3). Überraschenderweise ist diese Variante in der Lage, den Phänotyp der Photoreaktivierung in $\Delta cryB$ wiederherzustellen – die Überlebensrate des Stammes $\Delta cryB$ pRKcryB W338F liegt bei 71 % und in Betracht der Standardabweichung im Bereich des Positivkontrollstammes $\Delta cryB$ pRKcryB (Abbildung 3.4). Der Verlust der *in vitro* Reduktion des FAD von CryB W338F wirkt sich somit kaum auf die Photoreaktivierung aus. Eine Betrachtung der Photoreaktivierungskinetik ist mit weiteren Varianten in Abschnitt 3.4.5 aufgeführt.

Die beiden Tyrosine stellen wahrscheinlich einen verzweigten Weg mit zwei Möglichkeiten des Elektronentransfers dar; CryB Y387F und Y391F bewirken eine langsamere, jedoch nicht ausbleibende Reduktion des FAD (Geisselbrecht et al., 2012). Beide wurden in dieser Arbeit ebenso in $\Delta cryB$ exprimiert. Sie zeigen mit Überlebensraten von 83 bzw. 87 % eine funktionierende Photoreaktivierung, die der Positivkontrolle (91 %) entspricht (Abbildung 3.4).

3.4.2 Die Bindung von FAD – L366-Varianten

3.4.2.1 L366H

Der *in vitro* Nachweis einer (6-4)-Photolyaseaktivität von CryB hatte sich trotz der Anwendung verschiedener Methoden als schwierig erwiesen (Geisselbrecht et al., 2012 und Abschnitt 3.3.3) und es war lange Zeit unklar, welchem Mechanismus der Beitrag von CryB zur beobachteten *in vivo* Photoreaktivierung folgt. Durch die Anwendung und Optimierung des spektroskopischen Reparaturassays in Zusammenarbeit mit Elisabeth Ignatz und Richard Pokorny (AG Essen bzw. AG Batschauer, Philipps-Universität Marburg) konnte letztlich eine Reparaturaktivität von (6-4)-Schäden nachgewiesen werden (von Zadow et al., 2016). Zuvor war die Vermutung entstanden, dass die Photolyaseaktivität von CryB möglicherweise schwächer sein könnte als die anderer (6-4)-Photolyasen, wie beispielsweise der aus *Ustilago maydis*, für die der Reparaternachweis von (6-4)-Schäden durch die genannten Methode möglich war (Brych et al., 2015). Wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben ist eines von zwei in klassischen (6-4)-Photolyasen konservierten Histidinen des aktiven Zentrums in der FeS-BCP-Familie durch ein Leucin (L366 bei CryB) ersetzt (Abbildung 3.5). Die Tatsache, dass diese beiden Histidine der eukaryotischen Photolyasen essenziell für die Reparatur von (6-4)-Schäden sind (Hitomi et al., 2001), führte zu der Idee, CryB durch den Austausch des Leucins L366 zu einem Histidin den klassischen Photolyasen ähnlicher zu machen und somit die vermutete (6-4)-Photolyaseaktivität zu „verbessern“ und im *in vitro* Reparaturassay leichter nachweisen zu können.

Bei der Ni-NTA-Aufreinigung fiel CryB L366H bereits durch eine weniger starke Gelbfärbung auf. SDS-PAGE-Analyse und Western Blot zeigten keine deutlichen Unterschiede (Abbildung 3.12 A und B), die Ausbeute war nach Messung der Proteinkonzentration um etwa 10 % geringer als die des Wildtyp-Proteins. Es war außerdem eine verringerte Stabilität zu beobachten. Das Protein zeigte bereits nach einem Tag starken Ausfall, sofern es im Ni-NTA-Elutionspuffer verblieb, im Gegensatz zum Wildtyp, das unter diesen Bedingungen mehrere Tage stabil bleibt. Bei der Messung von Absorptionsspektren stellte sich überraschenderweise heraus, dass der für CryB erwartete Kurvenverlauf mit FAD-typischen Maximum nicht vorhanden war – stattdessen zeigte sich eine flachere Kurve mit nur einem Maximum bei ca. 420 nm (Abbildung 3.12 C). Dieser Kurvenverlauf ähnelt dem anderer Eisen-Schwefel-Cluster-Proteine, wie beispielsweise IscR aus *R. sphaeroides* (Remes et al., 2015). Es lag daher die Vermutung nahe, dass das sonst spektroskopisch dominierende FAD nicht mehr an das Protein gebunden ist und dadurch die Absorption des verbliebenen FeS-Clusters sichtbar wird. Um zu überprüfen, ob die Absorption von CryB

L366H auf das FeS-Cluster zurückzuführen ist, wurde eine Eisenbestimmung durchgeführt. Dies geschah im Rahmen der Bachelorarbeit von Helena Hantl. Für CryB L366H und CryB Wildtyp wurden gleiche Mengen an Eisen festgestellt, was darauf schließen lässt, dass das Cluster noch gebunden ist (Hantl, 2015). Der Verlust des FAD wurde durch Freisetzen der Cofaktoren und spektroskopische Messung der proteinfreien Überstände bestätigt (Abbildung 3.12 D). Es zeigte sich bei CryB L366H ein Verlust des typischen Absorptionsspektrums von freiem FAD, wie es im Wildtyp-Protein zu sehen ist. Zudem fällt auf, dass keine sonstige nennenswerte Absorption im Blaubereich mehr vorhanden ist, was auch auf eine Abwesenheit des Antennenchromophors DLZ hindeutet. Aufgrund des Verlustes des FAD-Cofaktors erwies sich diese Variante nicht als die ursprünglich geplante, optimierte Photolyase und somit als nicht geeignet für den *in vitro* Reparaturassay.

Nach der Beobachtung, dass die Reduktion des FAD möglicherweise nicht notwendig für die *in vivo* Photoreaktivierung ist (CryB W338F, Abschnitt 3.4.1) stellte sich die Frage, ob die potenziell FAD-lose Variante CryB L366H ebenso die *in vivo* Photoreaktivierung in $\Delta cryB$ wiederherstellen kann. Erstaunlicherweise zeigt der Stamm $\Delta cryB$ pRKcryB L366H eine Überlebensrate von 68 %, was deutlich höher als die Negativkontrolle $\Delta cryB$ pRK415 (17 %) ist (Abbildung 3.4). Auch CryB L366H wurde bezüglich der Photoreaktivierungskinetik untersucht und in Abschnitt 3.4.5 mit anderen Varianten verglichen.

3.4.2.2 L366F und L366A

Um den Effekt des *in vitro* beobachteten FAD-Verlustes bei CryB L366H genauer zu untersuchen, wurde Leucin L366 durch zwei weitere Aminosäuren ersetzt, mit dem Ziel, das FAD zu verdrängen. Phenylalanin wurde aufgrund seiner großen, aber unpolaren Seitenkette als Leucin-ähnlicheren, aber dennoch platzeinnehmenden Ersatz ausgewählt. Außerdem wurde Alanin verwendet, um zu testen, ob eine Destabilisierung des FAD auch durch eine kleinere, ebenfalls unpolare Aminosäure möglich ist. Beide Varianten wurden zunächst auf Proteinebene betrachtet und anschließend in *R. sphaeroides* exprimiert. CryB L366F (Phenylalanin) zeigte eine ähnliche hellere Gelbfärbung wie CryB L366H. In geringerem Maße war dies ebenso für CryB L366A (Alanin) zu beobachten, dieses zeigte jedoch größere Ähnlichkeit zum Gelbton des Wildtyp-Proteins (Abbildung 3.12 B). Auch diese beiden Varianten wiesen eine geringere Stabilität ähnlich der von CryB L366H auf. Die Ausbeute von CryB L366F war nach Messung der Proteinkonzentration um ca. 20 % geringer als die des Wildtyps, L366A hingegen nur um ca. 12 %. Dies ist auch im SDS-PAA-Gel zu sehen (Abbildung 3.12 A).

Die spektroskopischen Messungen zeigten den Verlust der typischen Maxima bei beiden Varianten, stattdessen erschien ein einziges schwaches Maximum bei ca. 420 nm, ähnlich wie für CryB L366H beschrieben. Die Kurve von CryB L366F verläuft noch flacher als die von L366H, während die von L366A fast mit L366H identisch ist. Ein sehr geringer Unterschied besteht in einer schwachen Schulter bei ca. 450 nm, die auf das Vorhandensein von restlichem FAD in CryB L366A hindeutet. Um dies zu überprüfen, wurden die Cofaktoren wie bei L366H freigesetzt und spektroskopisch untersucht. Es fällt nun deutlicher auf, dass sich die Alanin-Variante im Bereich der Blaulichtabsorption leicht von den beiden anderen abhebt (Abbildung 3.12 C und D). Die Absorption liegt jedoch weit unter der des Wildtyp-Proteins. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Restmengen von FAD möglicherweise bei allen drei Varianten noch gebunden sein könnten. Dies könnte ausreichend für die bei $\Delta cryB$ pRKcryB L366H beobachtete *in vivo* Photoreaktivierung sein. Auch CryB L366F und L366A sind in der Lage zur Photoreaktivierung (Daten nicht gezeigt). Die Spektrenmessungen der Proteinvarianten und der gelösten Cofaktoren wur-

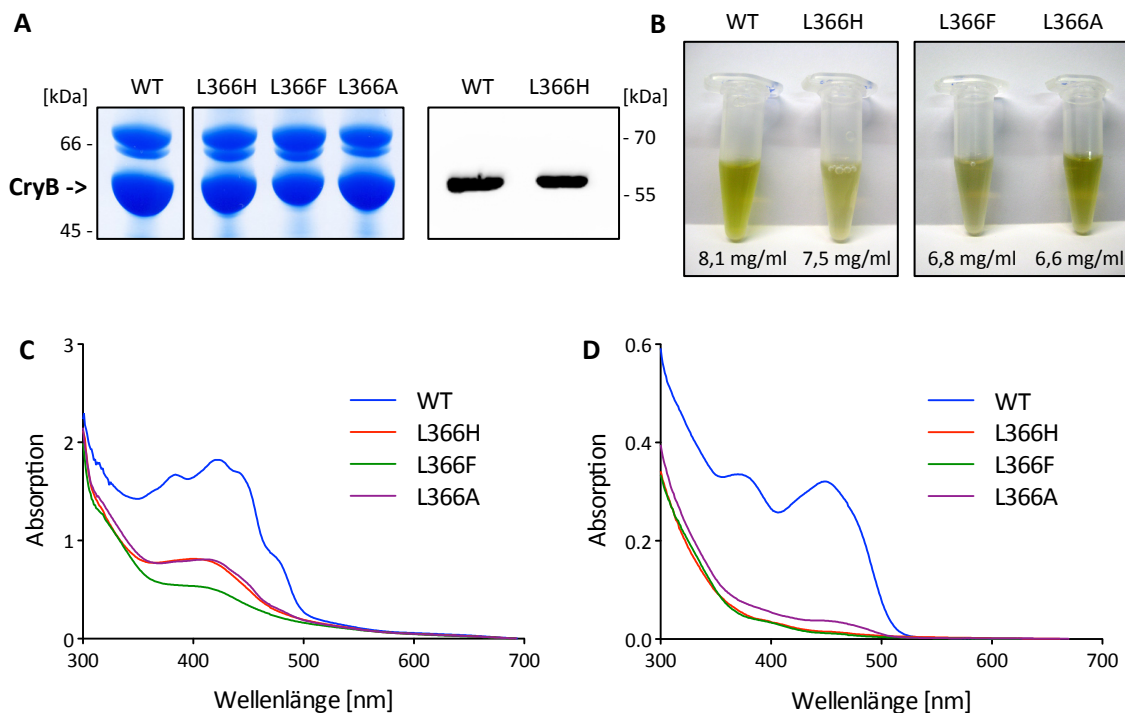


Abbildung 3.12: Untersuchung der CryB-Varianten mit Leucin366-Austauschen zu Histidin, Phenylalanin und Alanin, sowie CryB Wildtyp als Vergleich nach Ni-NTA-Aufreinigung aus 0,5 Liter *E. coli* BL21(DE3)pLysS Expressionskultur. **A**) Coomassie-gefärbtes SDS-PAA-Gel, Auftragung von je 10 μ l (entspricht ca. 65–80 μ g Gesamtprotein) der E₁-Fraktionen. Western Blot (Anti-CryB) von je 2,25 μ g Protein der E₁-Fraktionen von WT und L366H. **B**) Färbung der E₁-Fraktionen nach der Aufreinigung. **C**) Absorptionsspektren der E₁-Fraktionen. Wildtyp (8,1 mg/ml), L366H (7,5 mg/ml), L366F (6,8 mg/ml), L366A (6,6 mg/ml). **D**) Proteinfreie Absorptionsspektren der Cofaktoren, freigesetzt aus je ca. 3,2–3,8 mg/ml Gesamtprotein. Spektren sind auf 700 nm normalisiert.

de für L366H sechsmal aus unabhängigen Aufreinigungen durchgeführt, für L366F und L366A jeweils zweimal. Alle drei Varianten sind in Δ cryB in vergleichbaren Mengen vorhanden, jedoch geringer als das Wildtyp-Protein des Kontrollstammes Δ cryB pRKcryB (Abbildung 3.3).

Um genauer zu ermitteln, zu welchen Anteilen die Cofaktoren FAD und DLZ nach der Aufreinigung noch an die drei Leucin-Varianten gebunden sind, wurden diese durch Trichloressigsäure-(TCA)-Fällung von den Proteinen gelöst, da nicht bekannt ist, ob DLZ bei der sonst verwendeten Methode durch Aufkochen stabil bleibt. Bekannt ist, dass DLZ nach einer Behandlung des Proteins mit einer Temperatur von 70 °C nachweisbar ist (Geisselbrecht, 2013). Neben den drei L366-Varianten wurden außerdem die Cofaktorgehalte von CryB W338F und H362A (Abschnitte 3.4.1 und 3.3.1) bestimmt. Im Falle von Wildtyp, W338F und H362A wurde die Bestimmung durch Absorptionsspektroskopie durchgeführt und jeweils der Mittelwert aus zwei Messungen nach Ni-NTA-Aufreinigung sowie nach Ni-NTA- und Heparin-Aufreinigung berechnet. Bei den Leucin-Varianten wurden die Cofaktoren nach Ni-NTA-Aufreinigung anhand ihres Exzitationsmaximums (DLZ) und Emissionsmaximums (FAD) berechnet. Die Methode wurde in Zusammenarbeit mit Richard Pokorny (AG Batschauer, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt und ist ausführlich in von Zadow et al. (2016) beschrieben.

Die Cofaktorbestimmung bestätigt, dass in allen drei Leucin-Varianten geringe Mengen an FAD vorhanden sind. Am meisten (15 % Besetzung) ist in L366A vorhanden, bei L366H und L366F sind es nur 1 bzw. 0,5 % (Tabelle 3.2). Scheinbar ging als Nebeneffekt der Mutationen ebenso der Antennenchromophor DLZ zu großen Teilen oder vollständig verloren. Im Vergleich zeigt das Wildtyp-Protein eine voll-

Tabelle 3.2: Cofaktorbesetzung von CryB-Wildtyp und -Varianten als Verhältnisse DLZ:FAD:Apoprotein

CryB-Variante	DLZ	FAD	Apoprotein
Wildtyp	0,76	1,05	1,00
W338F	0,73	0,99	1,00
H362A	0,77	0,96	1,00
L366H	0,07	0,01	1,00
L366F	–	0,005	1,00
L366A	0,17	0,15	1,00

ständige Besetzung mit FAD sowie zu 76 % mit DLZ. CryB H362A und W338F entsprechen mit einem Cofaktorgehalt von 73 bzw. 77 % DLZ und 96 bzw. 99 % FAD dem Wildtyp-Protein.

3.4.3 Antennenbindung – CryB E37F

CryB bindet den Antennenchromophor 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (DLZ), der innerhalb der CPF bislang nur in der FeS-BCP-Familie als Cofaktor auftritt. Die Bindung des DLZ wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit durch den Austausch des Aspartats D10 durch Leucin, des Tyrosins Y40 durch Phenylalanin sowie des Glutamats E37 durch Phenylalanin untersucht. CryB D10L erwies sich als unlöslich, das Absorptionsspektrum von Y40F unterschied sich nicht von dem des Wildtyp-Proteins (Yann Geisselbrecht, persönliche Kommunikation). Bei der Variante E37F wurde anhand des Protein-Absorptionsspektrums ein potenzieller Verlust des Antennenchromophors DLZ festgestellt (Geisselbrecht, 2013). Bei der Aufreinigung von CryB E37F aus BL21(DE3)pLysS in dieser Arbeit konnte das Spektrum jedoch nicht reproduziert werden. Die typische FAD-Kurve des Wildtyp-Proteins fehlte und die Gesamtabsorption im Blaubereich war unerwartet gering (Abbildung 3.13 A). Verschiedene Optimierungsversuche, wie die erneute Expression in *E. coli* Rosetta(DE3)-Zellen unter den zuvor angewendeten Bedingungen mit Autoinduktion (Geisselbrecht et al., 2012) anstelle von IPTG-Induktion, konnten das Ergebnis geringfügig verändern, jedoch lässt sich aus den resultierenden Proteinspektren nicht herleiten, ob der Antennenchromophor noch gebunden ist. Zudem scheint die Bindung der anderen Cofaktoren sowie die generelle Proteinstruktur beeinträchtigt zu sein. Das Protein weist eine deutlich hellere Färbung auf und die Ausbeute ist geringer als die des Wildtyp-Proteins (siehe Abbildung 3.15). Das Spektrum der gelösten Cofaktoren lässt das Vorhandensein von FAD erkennen (Abbildung 3.13 B), jedoch in geringerer Menge als beim Wildtyp-Protein (Abbildung 3.15).

CryB E37F wurde dennoch in $\Delta cryB$ exprimiert, um den Effekt des potenziellen Verlustes der Antenne auf die Photoreaktivierung zu untersuchen. Das Protein ist auch bei der Expression in seiner natürlichen Umgebung erheblich beeinträchtigt, erkennbar durch ein leicht verändertes Molekulargewicht und eine geringere Signalintensität im Western Blot (Abbildung 3.3). Mit einer Überlebensrate von 73 % liegt $\Delta cryB$ pRKcryB E37F im Bereich der Stämme mit den Varianten W338F und L366H und leicht unterhalb der Positivkontrolle (91 %). Somit ist die Photoreaktivierung durch diese stark proteinverändernde Mutation nur leicht beeinflusst und der Antennenchromophor für die grundsätzliche Aktivität möglicherweise verzichtbar. Bei Betrachtung der Photoreaktivierungskinetik (Abschnitt 3.4.5) wird, wie bei anderen Varianten, eine erhebliche Beeinträchtigung deutlich.

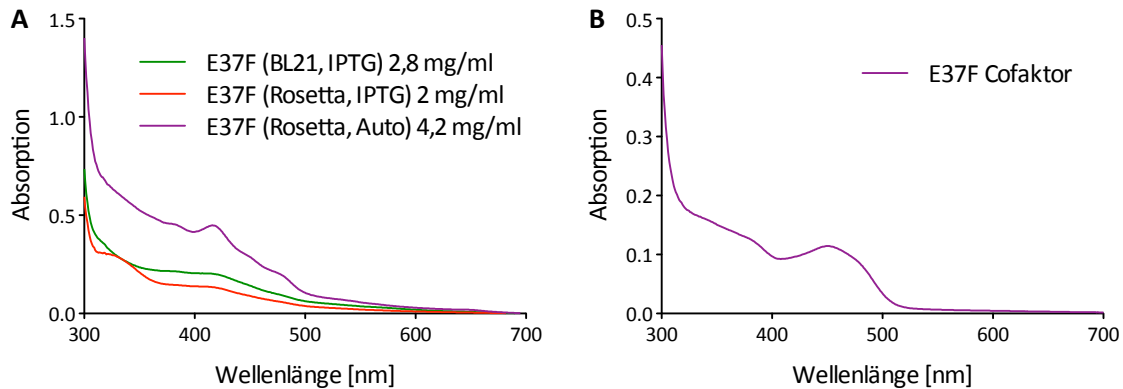
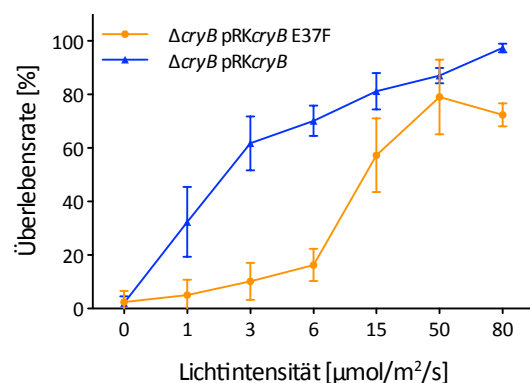


Abbildung 3.13: Untersuchung von CryB E37F. **A)** Protein-Absorptionsspektren nach Ni-NTA-Aufreinigungen nach Expression unter verschiedenen Bedingungen: BL21(DE3)pLysS oder Rosetta(DE3) mit IPTG- oder Autoinduktion. Normalisiert auf 700 nm. **B)** Proteinfreies Absorptionsspektrum der Cofaktoren der Probe aus Rosetta(DE3)-Expression mit Autoinduktion, freigesetzt aus 4,8 mg/ml Gesamtprotein.

3.4.3.1 Photoreaktivierung durch CryB E37F bei verschiedenen Lichtintensitäten

Die bisher beschriebenen Photoreaktivierungsexperimente wurden bei einer konstanten Intensität des regenerierenden Lichts von $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ durchgeführt. Durch ihre Aufgabe als Lichtsammelantennen zeigt sich die Relevanz dieser Chromophore jedoch oftmals erst bei einer geringen Verfügbarkeit von Licht. Der Antennenchromophor kann daher in einem experimentellen Aufbau mit ausreichend Lichtenergie verzichtbar sein. Durch die Inkubation der Zellen bei verschiedenen Lichtintensitäten nach dem UV-Stress sollte deshalb anhand der potenziell antennenlosen CryB-Variante E37F untersucht werden, ob geringere Intensitäten einen Effekt auf die Überlebensrate im Stamm $\Delta cryB$ pRK $cryB$ E37F im Vergleich zum Komplementationsstamm mit Wildtyp-CryB haben. Sowohl UV-behandelte als auch unbehandelte Kontrollplatten beider Stämme wurden Intensitäten von 0 (Dunkelheit), 1, 3, 6, 15, 50 und $80 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ausgesetzt und für mindestens 24 Stunden inkubiert. Da kein signifikanter Unterschied im Überleben der Zellen auf nicht UV-behandelten Kontrollplatten bei unterschiedlichen Lichtintensitäten zu beobachten war (Anhang 9.2), wurden Überlebensraten als Verhältnis der CFU auf UV-behandelten Platten zu dem Mittelwert der Kontrollplatten berechnet.

Abbildung 3.14: Überlebensraten der *R. sphaeroides*-Stämme $\Delta cryB$ pRK $cryB$ E37F und $\Delta cryB$ pRK $cryB$ (Positivkontrolle) nach Bestrahlung mit $100 \text{ J}/\text{m}^2$ UV-Licht (254 nm) und anschließender Behandlung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten zwischen 0 (Dunkelheit) und $80 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ für die Photoreaktivierung. Die Überlebensraten sind als Verhältnis der CFU von UV-behandelten zum Mittelwert der nicht behandelten Platten in Prozent dargestellt. Daten aus drei unabhängigen biologischen Wiederholungen mit Standardabweichung.



Im Bereich der geringen Intensitäten von 1, 3 und $6 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Stämmen $\Delta cryB$ pRK $cryB$ und $\Delta cryB$ pRK $cryB$ E37F (Abbildung 3.14). Während bei $\Delta cryB$ pRK $cryB$ E37F lediglich 5, 10 bzw. 16 % erreicht werden, so sind es für den Kontrollstamm 32, 62 bzw. 70 %. Erst bei einer Intensität von $15 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ steigt die Überlebensrate des mit CryB E37F komple-

mentierten Stammes auf 57 %, liegt jedoch immer noch unter der des Kontrollstammes (81 %). Bei der Standard-Lichtintensität von $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ liegt ΔcryB pRK cryB E37F (79 %) im Bereich der Kontrolle (87 %). Bei der höchsten Intensität von $80 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ist ein leichter, aber im Bereich der Standardabweichung der vorangegangenen Stufe liegender Rückgang der Überlebensrate zu beobachten, während die des Kontrollstammes weiter ansteigt.

3.4.4 Doppelaustausche – E37F/W338F, E37F/L366H

Aufgrund der geringen Effekte des nicht reduzierbaren FAD und der beeinträchtigten Bindung von FAD oder DLZ auf die UV-Überlebensraten (Abbildung 3.4) wurde der Aminosäureaustausch E37F (DLZ-Bindung) zum einen mit W338F (FAD-Reduktion) und zum anderen mit L366H (FAD-Bindung) kombiniert, um beide lichtabsorbierenden Cofaktoren gleichzeitig zu beeinträchtigen. Beide Doppelmutanten sind nicht in der Lage, die Fähigkeit zur Photoreaktivierung in ΔcryB wiederherzustellen, sie zeigen mit 14 % für ΔcryB pRK cryB E37F/W338F und 19 % für ΔcryB pRK cryB E37F/L366H vergleichbare Level mit der Leervektorkontrolle (17 %) (Abbildung 3.4). Beide weisen in ΔcryB exprimiert gleiche Molekulargewichte und Level wie die Einzelmutante CryB E37F auf (Abbildung 3.3), unterscheiden sich von dieser jedoch klar durch den Verlust der Photoreaktivierung.

Die Varianten wurden ebenso heterolog exprimiert und aufgereinigt. Wie CryB E37F sind die Protein-Absorptionsspektren sowie die der gelösten Cofaktoren sehr flach. Die Absorption von CryB E37F/L366H im Bereich zwischen 400 und 450 nm ist jedoch interessanterweise stärker als die der Einzelmutante E37F (Abbildung 3.15 C und D). Dies ist wie bei CryB L366H (Abschnitt 3.4.2.1) womöglich auf das Eisen-Schwefel-Cluster zurückzuführen. Die Färbung ist bei allen E37F-enthaltenden Varianten deutlich heller im Vergleich zum Wildtyp-Protein und die Ausbeuten sind geringer (Abbildung 3.15 A und B). Auch hier ist interessant, dass die Banden der Doppelmutanten leicht stärker sind als die der Einzelmutante. In allen Fällen ist CryB als Doppelbande zu sehen. Exemplarisch wurde CryB E37F/W338F nach der Ni-NTA-Aufreinigung auch über Heparin-Chromatographie aufgereinigt. Im Chromatogramm erscheinen zwei dicht aufeinander folgende Maxima, wobei das erste höher ist als das zweite (Anhang Abbildung 9.1 B). Im Western Blot gegen CryB E37F und E37F/W338F erscheint jeweils nur eine Bande. Diese ist wie bei den gleichen Varianten bei der Expression in *R. sphaeroides* ΔcryB (Abbildung 3.3) schwächer ausgeprägt als die von Wildtyp-CryB und weist ein geringeres Molekulargewicht auf (Abbildung 3.15 A). Als Kontrolle wurde BL21(DE3)pLysS mit dem leeren Vektor pET28a ohne CryB angezogen und das Lysat einer Ni-NTA-Aufreinigung unterzogen, um festzustellen, ob die geringen Absorptionen lediglich auf unspezifische Proteine zurückzuführen sind. Die Absorptionskurve verläuft etwas flacher als die der E37F-Varianten und die Färbung der entsprechenden Elutionsfraktion ist klar. Somit ist die leichte Gelbfärbung der Varianten auf geringe Mengen an Cofaktoren zurückzuführen. Die drei E37F-enthaltenden Varianten wurden außerdem in Rosetta(DE3) exprimiert und aufgereinigt. Die daraus resultierenden Spektren entsprechen den hier gezeigten.

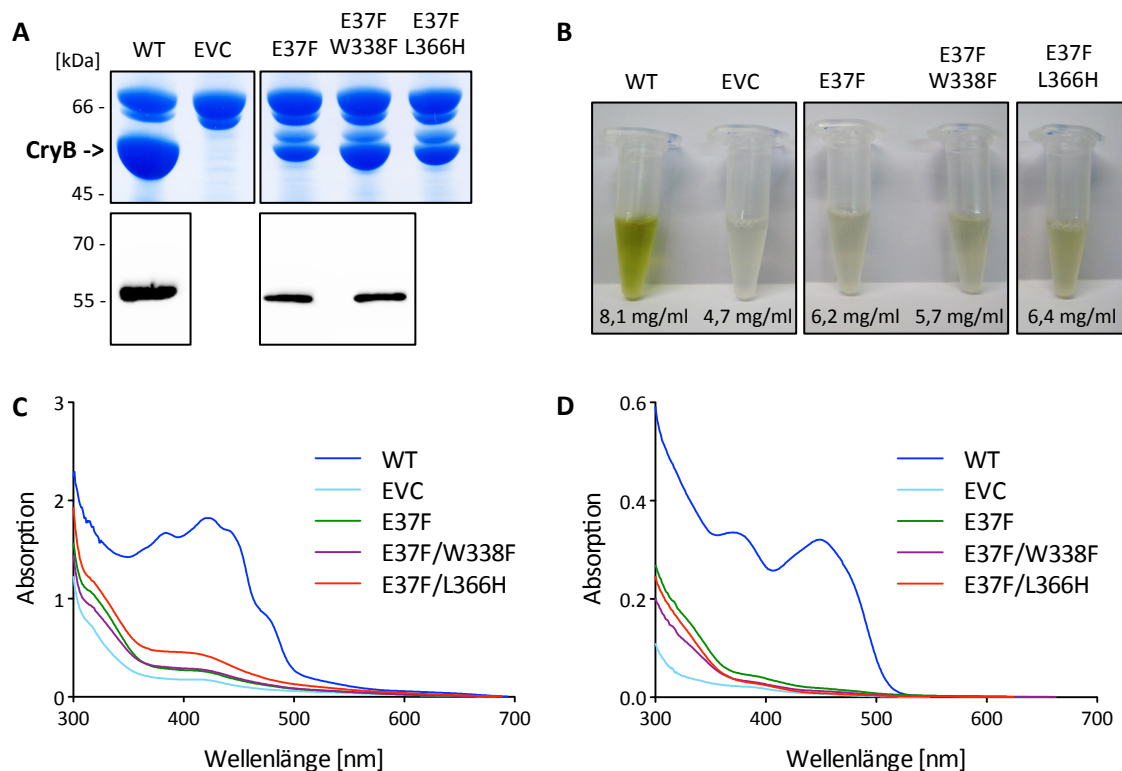


Abbildung 3.15: Untersuchung der CryB-Varianten E37F, E37F/W338F und E37F/L366H nach Ni-NTA-Aufreinigung aus 0,5 Liter *E. coli* BL21(DE3)pLysS Expressionskultur. **A)** Coomassie-gefärbtes SDS-PAA-Gel, Auftragung von je 10 μ l (entspricht ca. 57–80 μ g Gesamtprotein; 47 μ g bei EVC) der E₁-Fraktionen. Western Blot (Anti-CryB), Auftragung von je 5 μ l einer 1:10-Verdünnung der E₁-Fraktionen (entspricht 2,25 μ g (WT), 1,4 μ g (E37F) und 1,6 μ g (E37F/W338F)). Die Proben stammen von demselben Gel bzw. Western Blot wie in Abbildung 3.12 **B)** Färbung der E₁-Fraktionen nach der Aufreinigung. **C)** Protein-Absorptionsspektren der E₁-Fraktionen (Konzentrationen siehe B)). **D)** Proteinfreie Absorptionsspektren der Cofaktoren, freigesetzt aus 2,4–3 mg/ml Gesamtprotein (WT 3,8 mg/ml; EVC 2 mg/ml). Wildtyp-Proben sind zum Vergleich gezeigt (entsprechen Abbildung 3.12). Spektren sind auf 700 nm normalisiert.

3.4.5 Kinetik der *in vivo* Photoreaktivierung durch die CryB-Varianten

Anhand der Überlebensraten nach UV-Behandlung konnte zunächst nur die Erkenntnis „Photoreaktivierung funktioniert“ oder „funktioniert nicht mehr“ gewonnen werden. Aufgrund der überraschend geringen Effekte der meisten in den vorangegangenen Abschnitten erläuterten Einzelmutationen bezüglich der Endpunkt-Überlebensraten nach 3 Stunden (Abbildung 3.4), wurden die Effizienzen dieser Varianten durch Betrachtung der Kinetik der Photoreaktivierung genauer untersucht. Dabei waren vor allem die drei Cofaktor-Varianten CryB W338F (FAD-Reduktion), L366H (FAD-Bindung) und E37F (DLZ-Bindung) von Interesse. Die beiden Varianten der Schadenbindung, CryB Q302A und CryB H362A (Abschnitt 3.3.1), wurden ebenfalls untersucht. Es wurden alle vorhandenen Kontrollstämmen mit einbezogen.

Zunächst wurde die Geschwindigkeit der Photoreaktivierung im Wildtyp untersucht. Während der ersten 20 Minuten im Licht ist eine langsame, aber stetige Steigerung der Überlebensfähigkeit von 2 auf 17 % zu beobachten (Abbildung 3.16 A). Ab 30 Minuten steigt die Rate schneller an und geht von 41 % über 65 % nach einer Stunde bis auf 81 % nach drei Stunden. Die Inkubation für 4 Tage bewirkt keine weitere Veränderung, die Rate sinkt wieder leicht ab auf 76 %, unterscheidet sich aufgrund der Abweichung jedoch nicht von den beiden vorangegangenen Zeitpunkten. Die Photoreaktivierungskinetik des Komplementationsstammes $\Delta cryB$ pRKcryB unterscheidet sich deutlich von der des Wildtyps durch eine

starke anfängliche Beschleunigung. Bereits nach 5 Minuten liegt die Überlebensrate bei 58 % und hat mit 79 % nach 10 Minuten bereits fast den maximalen Wert erreicht. Dieser liegt bei 93 % nach einer Stunde und erfährt danach keine weitere Steigerung. Wie im Western Blot (Abbildung 3.3) zu erkennen, zeigt der Komplementationsstamm eine deutlich höhere Expression von CryB. Aufgrund der vergleichbaren Expressionsbedingungen der plasmidkodierten CryB-Varianten, wurden diese wie bisher mit dem Komplementationsstamm verglichen. Eine noch stärkere Überexpression durch den Stamm $\Delta cryB$ pRKpufcryB bewirkt keine zusätzliche Steigerung der Photoreaktivierungseffizienz. Die Überlebensraten der beiden CryB-losen Stämme $\Delta cryB$ und $\Delta cryB$ pRK415 (Leervektorkontrolle) steigen bis 20 Minuten mit einer zum Wildtyp vergleichbaren Geschwindigkeit an und erreichen einen Maximalwert von 17 % ($\Delta cryB$ pRK415, 1 Stunde). Die leicht höheren Werte der Leervektorkontrolle bei 30 Minuten sowie 1 und 3 Stunden unterscheiden sich nicht deutlich von denen des Stammes $\Delta cryB$. Bei beiden Stämmen zeigt sich ein Absinken der Überlebensrate nach 4-tägiger Lichtinkubation auf 4 bzw. 7 %.

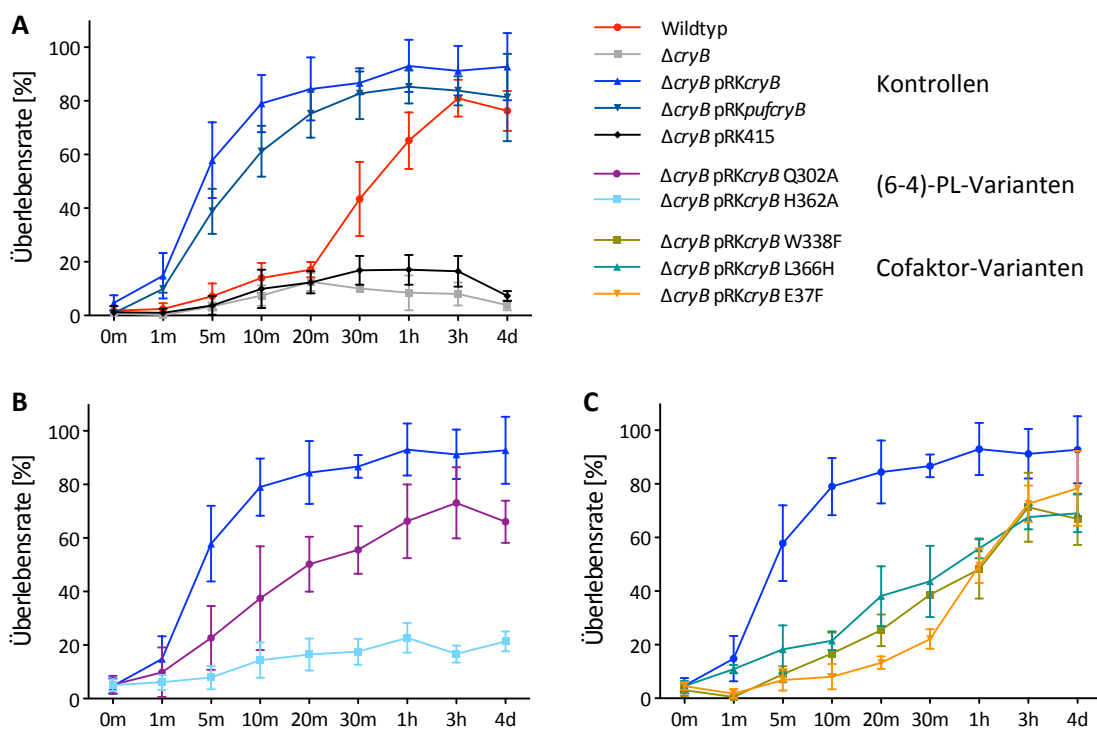


Abbildung 3.16: Überlebensraten von *R. sphaeroides*-Stämmen nach UV-Bestrahlung zu verschiedenen Zeitpunkten der Regenerationsphase im Licht. Zellen wurden mit 100 J/m^2 UV-Licht (254 nm) bestrahlt und anschließend für unterschiedliche Zeiträume von 0 Minuten (Dunkel) bis 4 Tage im Licht ($50 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) inkubiert. **A)** Wildtyp, $\Delta cryB$, $\Delta cryB$ pRKcryB (Komplementation), $\Delta cryB$ pRKpufcryB (Überexpression) und $\Delta cryB$ pRK415 (Leervektorkontrolle). **B)** Varianten der (6-4)-Schadenbindung: H362A und Q302A, sowie der Kontrollstamm aus A) als Vergleich. **C)** Cofaktor-Varianten: W338F, L366H und E37F, sowie der Kontrollstamm aus A) als Vergleich. Die Überlebensraten sind als Verhältnis der CFU von UV-behandelten zum Mittelwert der nicht behandelten Zellen in Prozent dargestellt. Mittelwerte aus drei unabhängigen biologischen Experimenten mit Standardabweichung.

Die relative hohe Endpunkt-Überlebensrate (73 %) des Stammes $\Delta cryB$ pRKcryB Q302A (Abbildung 3.4), wird erst nach einem im Vergleich zum Kontrollstamm deutlich verlangsamten Anstieg (Abbildung 3.16 B) erreicht. Die Überlebensrate des mit CryB H362A komplementierten $\Delta cryB$ -Stammes, steigt nur sehr schwach an und bleibt auch nach 4 Tagen konstant niedrig, der höchste Wert liegt bei 23 % Überleben nach einer Stunde Lichtinkubation. Die mit CryB W338F, L366H oder E37F komplementierten $\Delta cryB$ -Stämme sind alle in ihrer Photoreaktivierungskinetik stark verlangsamt. Die Höchstwerte von ca.

70 % sind erst nach 3 Stunden erreicht, im Vergleich zu 10–20 Minuten im Kontrollstamm. Weitere 4 Tage Lichtinkubation bewirken keine deutliche Veränderung. Die höchsten Werte liegen bei allen Stämmen leicht unter denen der Kontrolle. $\Delta cryB$ pRK $cryB$ E37F weist die langsamste Rate zu Beginn auf, holt die beiden anderen Stämme zu späteren Zeitpunkten (ab 1 Stunde) wieder ein. Insgesamt fällt auf, dass bei sechs Stämmen die Überlebensrate nach 4 Tage wieder leicht abfällt im Vergleich zu 3 Stunden.

Die Dauer der Lichtinkubation hatte keine Auswirkung auf das Überleben der nicht UV-behandelten Kontrollzellen (Anhang 9.2). Daher wurde nicht für jeden Zeitpunkt eine Kontrollplatte mitgeführt, sondern nur für 0 Minuten (Dunkelheit), 30 Minuten und 3 Stunden. Zur Berechnung der Überlebensrate wurde der Mittelwert der drei Kontrollen verwendet.

3.4.6 Das [4Fe4S]-Cluster

3.4.6.1 Doppelaustausch C434A/C437A

Das [4Fe4S]-Cluster wird durch die Schwefelatome der Seitenketten von vier im C-terminalen Bereich gelegenen Cysteinen an dessen Eisenatomen koordiniert. Die ersten Versuche, das Cluster durch zielgerichtete Mutagenese zu entfernen, waren der Austausch eines einzelnen Cysteins (Geisselbrecht, 2013) sowie von zwei der insgesamt vier Cysteine zu Alaninen (Frühwirth, 2012). Erste Hinweise zur Unlöslichkeit wurden bereits bei der Einzelaustauschvariante C437A beobachtet (Yann Geisselbrecht, persönliche Kommunikation) und in dieser Arbeit anhand der Doppelmutante C434A/C437A weiter überprüft. Im Kontrast zu der typischen Gelbfärbung der Elutionsfraktionen bei der Ni-NTA-Aufreinigung von Wildtyp-CryB blieb diese Färbung bei CryB C434A/C437A aus. Die Analyse der Fraktionen durch SDS-PAGE ergab nur eine sehr schwache Bande auf Höhe der entsprechenden Bande des Wildtyp-Proteins (Abbildung 3.17 B).

Bei der Ni-NTA-Aufreinigung mit Zellysat wird lediglich der lösliche Proteinanteil betrachtet. Um zu überprüfen, ob sich größere Mengen des Proteins aufgrund mangelnder Löslichkeit in der unlöslichen Fraktion befinden, wurden die nach Zellaufschluss und Zentrifugation entstandenen Sedimente aus Zelltrümmern und unlöslichen Bestandteilen, wie Membranfraktionen und *inclusion bodies*, einer denaturierenden Behandlung unterzogen. Dazu wurden die Sedimente in Harnstoffpuffer aufgenommen und sonifiziert, um unlösliche Bestandteile zugänglich zu machen. Nach Zentrifugation wurde der resultierende Überstand (*cleared lysate*) für die Aufreinigung ähnlich der normalen Ni-NTA-Aufreinigung mit anschließender SDS-PAGE eingesetzt. Die Schritte der nativen und denaturierenden Ni-NTA-Aufreinigung sind schematisch in Abbildung 3.17 A dargestellt. In den ersten drei Elutionsfraktionen der denaturierenden Aufreinigung des Wildtyp-Proteins sind eindeutige Banden der Größe von CryB zu erkennen (Abbildung 3.17 C), auch eine leichte Gelbfärbung der Proben lässt auf ein Vorhandensein geringer Mengen des Proteins in intakter Form schließen. Aus der unlöslichen Fraktion von CryB C434A/C437A hingegen konnte kein erkennbares Protein der erwarteten Größe eluiert werden.

Da CryB C434A/C437A weder aus der Fraktion, die die löslichen Bestandteile enthält, noch aus der Fraktion, die unlösliche Bestandteile enthält durch native bzw. denaturierende Ni-NTA aufgereinigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob dies entweder an einer mangelnden Expression oder rapider Degradation des möglicherweise falsch gefalteten und somit instabilen Proteins liegt. Die erneute Sequenzierung der Promotorregion des Plasmids pET $cryB$ C434A/C437A ergab keine Fehlerhaftigkeit. Bei funktionierender Expression ist das Protein vermutlich zumindest temporär im Lysat anwesend und wird möglicherweise erst während der Aufreinigung degradiert. Um eine fehlende Expression dieser Varian-

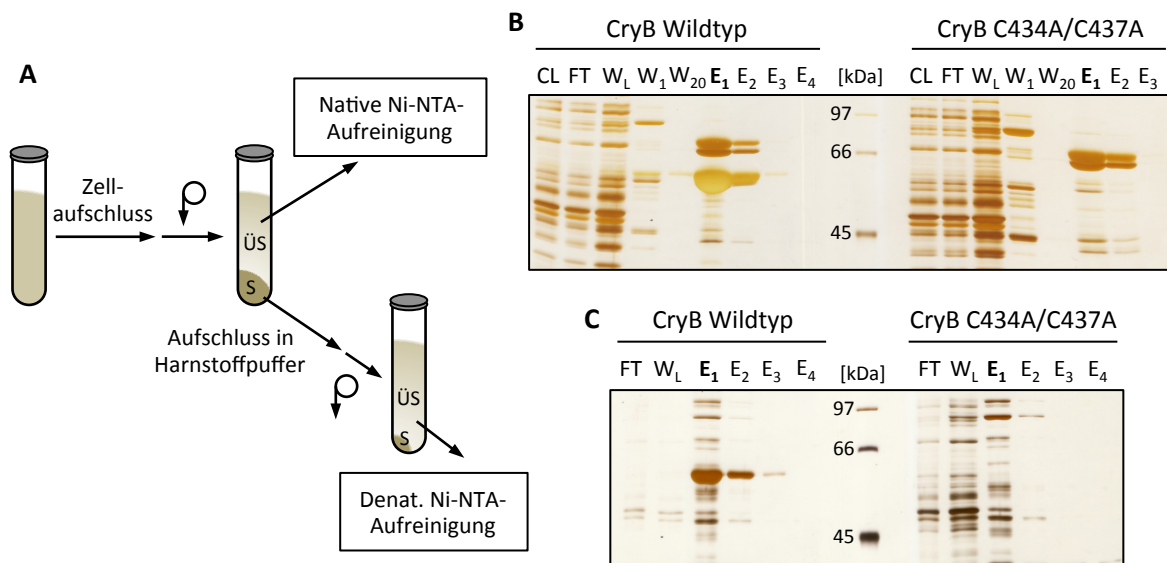


Abbildung 3.17: Native und denaturierende Ni-NTA-Aufreinigung von CryB Wildtyp und CryB C434A/C437A, exprimiert in je 1 Liter *E. coli* BL21(DE3)pLysS Expressionskultur. **A)** Schematische Darstellung der Probenbehandlung. **B)** Silbergefärbtes SDS-PAA-Gel der Fraktionen nach der nativen Aufreinigung. **C)** Silbergefärbtes SDS-PAA-Gel der Fraktionen nach der denaturierenden Aufreinigung. ÜS = Überstand, S = Sediment, Kreis mit Pfeil = Zentrifugation, CL = *cleared lysate* (1 μ l einer 1:10 Verdünnung), FT = *flow-through* (1 μ l einer 1:10 Verdünnung), W_L = Waschfraktion mit Lysepuffer, W = Waschfraktion (je 5 μ l), E = Elutionsfraktion (je 5 μ l).

te auszuschließen, wurde sowohl die native als auch die denaturierende Aufreinigung wiederholt und im Anschluss an die Gel-Auftrennung ein Westen Blot zur spezifischen Detektion von CryB in den verschiedenen Fraktionen durchgeführt. Die Expression fand abweichend von den anderen Expressionen in Rosetta(DE3) statt. Außerdem wurde allen verwendeten Puffern 1 mM DTT zugesetzt. Zur Überprüfung der Induktion wurden Gesamtzellproben aus der Expressionskultur vor der Induktion durch IPTG (t_0) und bei der Ernte nach 24 Stunden (t_{24}) entnommen und in Laemmli-Puffer gelöst. Die Auftragsvolumen wurden zur Vergleichbarkeit anhand der OD₆₀₀ einander angeglichen. Des Weiteren wurde eine Probe des Sedimentes nach Zellaufschluss und Zentrifugation (Zelltrümmer, unlösliche Fraktion) aufgetragen. Dazu wurde wenig Material mit einer Pipettenspitze abgenommen und in Lysepuffer gelöst. Der Rest wurde in Harnstoffpuffer aufgenommen und für die denaturierende Ni-NTA-Aufreinigung eingesetzt.

Die Auftragung von Gesamtzellen vor der Induktion und nach der Expression zeigt für beide Proteine ein vergleichbar starkes Signal nach Ende der Expressionszeit (t_{24}) und kein Signal vor der Induktion (t_0) (Abbildung 3.18). Auch in den Sedimentproben (S) tritt bei beiden ein Signal auf. Im *cleared lysate*, *flow-through* und den Waschfraktionen der nativen Aufreinigung von CryB C434A/C437A ist bei den eingesetzten Mengen kein Protein detektierbar, das Wildtyp-Protein ist im *cleared lysate* und den Waschfraktionen vorhanden. Ein sehr starkes Signal zeigt sich in der ersten Fraktion (E₁) des Wildtyp-Proteins und eine im Vergleich dazu deutlich schwächere Bande in der E₁-Fraktion von CryB C434A/C437A. Demnach befindet letzteres sich auch im *cleared lysate*, der Anteil ist jedoch zu gering für die Detektion. In der Sedimentprobe und den Fraktionen *cleared lysate*, *flow-through* und W₁ der denaturierenden Aufreinigung erscheinen vergleichbar starke Signale für CryB Wildtyp und CryB C434A/C437A. Erst bei der Elution ist kein Signal mehr für letztere erkennbar, hingegen beim Wildtyp-Protein in E₁ und E₂. Die Ergebnisse der Aufreinigungen lassen auf eine funktionierende Expression beider Proteine schließen, das Fehlen oder deutlich geringere Vorhandensein von CryB C434A/C437A in den Elutionsfraktionen deutet

auf einen Abbau des Proteins hin. Die Verwendung von Rosetta(DE3) sowie der Einsatz von 1 mM DTT bewirkte anhand der Färbungen der Proteinlösungen keine erkennbare Verbesserung der Löslichkeit gegenüber BL21(DE3)pLysS. Für beide nativen und denaturierenden Aufreinigungen wurden, abweichend von den anderen CryB-Aufreinigungen in dieser Arbeit, Puffer mit pH-Werten von 8,0 (Frühwirth, 2012) verwendet.



Abbildung 3.18: Western Blot gegen CryB. Fraktionen nach der nativen und denaturierenden Ni-NTA-Aufreinigung von CryB Wildtyp und CryB C434A/C437A, exprimiert in je 0,5 Liter *E. coli* Rosetta(DE3) Expressionskultur. t_0 = Zellen vor der Induktion, t_{24} = Zellen bei der Ernte, S = Sediment, CL = *cleared lysate* (2 μ l einer 1:10-Verdünnung), FT = *flow-through* (2 μ l einer 1:10 Verdünnung), WL = Waschfraktion mit Lysepuffer, W = Waschfraktion (je 10 μ l), E = Elutionsfraktion (je 10 μ l).

3.4.6.2 Einzelaustausch der Cysteine und C-terminale Deletion

Um auszuschließen, dass die Instabilität von CryB C434A/C437A (Abschnitt 3.4.6.1) an der Auswahl der ausgetauschten Cysteine liegt und ein Entfernen des FeS-Clusters möglicherweise durch den Wegfall eines der anderen Cysteine bewirkt werden könnte, wurden die übrigen Cysteine C346, C434 und C450 einzeln durch Alanine ersetzt. Die Varianten wurden gemeinsam mit dem bereits vorhandenen CryB C437A auf Löslichkeit untersucht. Die Proteine wurden über Ni-NTA aufgereinigt und jeweils die Elutionsfraktionen E_1 durch SDS-PAGE, Western Blot und Absorptionsspektroskopie analysiert. Bei keiner der Cystein-Austauschvarianten ist eine Bande auf Höhe der starken Bande des Wildtyp-Proteins im Coomassie-gefärbten Gel erkennbar (Abbildung 3.19). Im Western Blot, bei dem gleiche Mengen eingesetzt wurden wie für die Färbung, sind für jede Variante Signale detektierbar, die deutlich schwächer sind als die des Wildtyp-Proteins. Zum Vergleich ist die Doppelmutante C434A/C437A jeweils ebenfalls aufgetragen, sie verhält sich wie die Einzelmutanten. Die im Coomassie-gefärbten Gel stets bei gut 66 kDa zu sehenden Banden werden im Western Blot nicht durch den CryB-spezifischen Antikörper detektiert und sind unspezifisch durch die Ni-NTA mit aufgereinigte Proteine (vgl. auch Abbildung 3.2 A). Durch diese Banden ist eine Auftragung vergleichbarer Mengen erkenntlich. Eine weitere Variante, bei der das Cystein C437 durch Serin ersetzt wurde, sollte klären, ob die Wahl der Aminosäure die Löslichkeit beeinflusst. Serin weist eine größere Ähnlichkeit zu Cystein auf als Alanin, da es eine OH-Gruppe anstelle der SH-Gruppe trägt, die bei Alanin fehlt. Somit wäre die strukturelle Veränderung geringer als durch Alanin, aber die Bindung zwischen dem Schwefelatom der Aminosäure und dem Eisenatom des Clusters nicht mehr möglich. Auch für CryB C437S ergab sich jedoch die gleiche Beobachtung wie für alle Cystein-zu-Alanin-Varianten (Daten nicht gezeigt).

Ein anderer Versuch, das FeS-Cluster zu entfernen und dabei den Rest des Proteins möglichst intakt zu halten, war die Entfernung der gesamten C-terminalen „Dach“-Domäne, in die das Cluster eingebettet ist. Es wurden zwei leicht unterschiedliche Versionen konstruiert, in beiden wurde die Dach-Domäne ab Aspartat D432 entfernt. Somit fehlen drei der vier Cysteine sowie der Loop-Bereich vor der Domäne. Da-

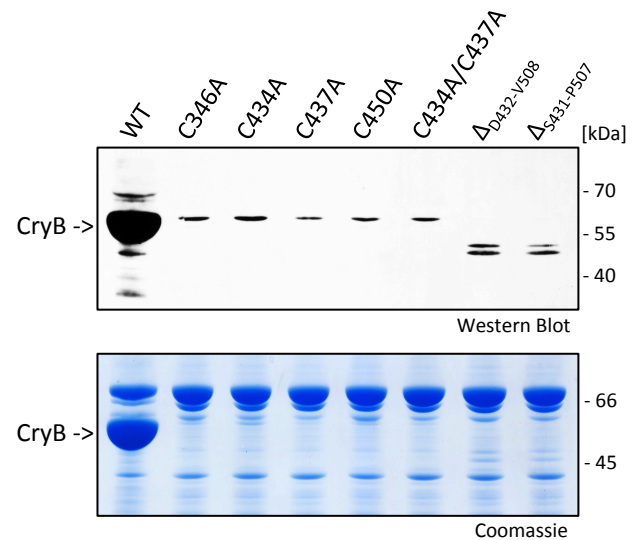


Abbildung 3.19: Western Blot und Coomassie-gefärbtes SDS-PAA-Gel mit Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Aufreinigung von CryB Wildtyp (WT) sowie fünf Cystein-zu-Alanin- und zwei C-terminal verkürzten Varianten. Je Spur sind 10 μ l der E₁-Fraktionen geladen (entspricht ca. 35 μ g Gesamtprotein bei den CryB-Varianten und 60 μ g bei CryB Wildtyp)

zu wurden die ersten 1293 bp der *cryB*-Gensequenz, gefolgt von einem Stopcodon, in pET28a kloniert (entspricht dem Beginn der Sequenz im Konstrukt pET*cryB*, beschrieben in Abschnitt 3.1.1). Das resultierende Protein CryB $\Delta_{D432-V508}$ ist somit am C-Terminus um 77 Aminosäuren verkürzt und Serin S431 die letzte Aminosäure. Weil Valin natürlicherweise die letzte Aminosäure des unverkürzten CryB-Proteins ist, wurde eine weitere Variante hergestellt, bei der Serin S431 durch Valin ersetzt wurde, sodass die Version CryB $\Delta_{S431-P507}$ mit einer unpolaren Aminosäure endet. Die Gesamtlänge beider verkürzter Proteine inklusive His-tag beträgt jeweils 452 Aminosäuren und das theoretische Molekulargewicht 51 kDa (ExpASY; Gasteiger et al., 2003). Die Planung der Varianten erfolgte mit freundlicher Beratung durch Yann Geisselbrecht. Die Aminosäuresequenz befindet sich in Anhang 9.5. Beide Versionen wurden heterolog in *E. coli* exprimiert und über Ni-NTA aufgereinigt. Im Coomassie-gefärbten Gel ist jeweils eine schwache Doppelbande der erwarteten Größe zu sehen, die durch Western-Blot-Analyse als CryB bestätigt werden konnten (Abbildung 3.19). Die untere der beiden Banden im Western Blot erscheint geringfügig stärker als die obere. Beide sind in vergleichbarer Menge vorhanden wie alle Cystein-Varianten und deutlich geringer als Wildtyp-CryB. Die Absorptionsspektroskopie der Varianten ergab eine mit der Leervektor-kontrolle (Abbildung 3.15 C) vergleichbare Absorption im Bereich 400–450 nm (Daten nicht gezeigt).

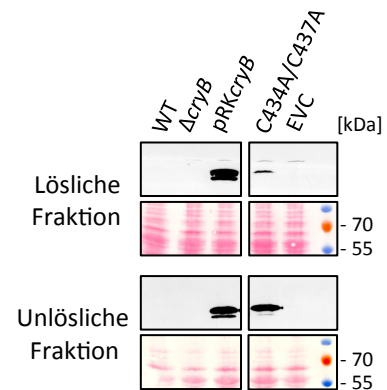
Durch Aminosäureaustausche und Sequenzverkürzung ist es demnach nicht gelungen, ein intaktes Protein ohne FeS-Cluster zu erzeugen.

3.4.6.3 *In vivo* Photoreaktivierung durch CryB C434A/C437A

Aufgrund der Erfahrung der anderen untersuchten Varianten, bei denen die Aktivität *in vivo* oft ungeachtet einer schlechten Proteinqualität nur beeinträchtigt, nicht jedoch verloren ist, wurde CryB C434A/C437A, stellvertretend für alle FeS-Cluster-Varianten, in *R. sphaeroides* Δ *cryB* exprimiert, da eine bessere Faltung unter natürlichen Bedingungen nicht ausgeschlossen werden kann. Im Western Blot (Abbildung 3.3) ist keine Expression von CryB C434A/C437A in der löslichen Fraktion erkennbar. Bei Auftragung der doppelten Menge Zelllysats (200 μ g Gesamtprotein) zeigt sich eine schwache Bande auch in der löslichen Fraktion (Abbildung 3.20). In der unlöslichen Fraktion ist es in größerer Menge vorhanden, während Wildtyp-CryB im Kontrollstamm Δ *cryB* pRK*cryB* in beiden Fraktionen etwa gleich verteilt ist. Der lösliche Anteil von CryB C434A/C437A ist zwar deutlich geringer als der von Wildtyp-CryB, aber dennoch größer als im Wildtyp 2.4.1, bei dem CryB auch bei dieser Auftragsmenge nicht detektierbar

ist, der aber zur Photoreaktivierung fähig ist. Trotz der Expression von CryB C434A/C437A in den Zellen ist diese Variante nicht in der Lage, die Photoreaktivierung in $\Delta cryB$ wiederherzustellen (Abbildung 3.4). Die Überlebensrate liegt bei 15 % und damit im Bereich der Leervektorkontrolle (17 %).

Abbildung 3.20: Western Blot gegen CryB aus Zelllysaten von *R. sphaeroides* 2.4.1 Wildtyp (WT), $\Delta cryB$, $\Delta cryB$ pRKcryB, $\Delta cryB$ pRKcryB C434A/C437A und $\Delta cryB$ pRK415 (EVC). Zellen wurden unter mikroaeroben Bedingungen angezogen und bei einer OD₆₆₀ von 0,75 geerntet. Je 200 µg Gesamtprotein der Überstände nach Ultrazentrifugation (lösliche Fraktion) bzw. der resuspendierten Sedimente (unlösliche Fraktion). Ponceau-gefärbte Membranen dienen als Ladekontrollen. Die nebeneinanderliegenden Ausschnitte stammen jeweils von der gleichen Membran.



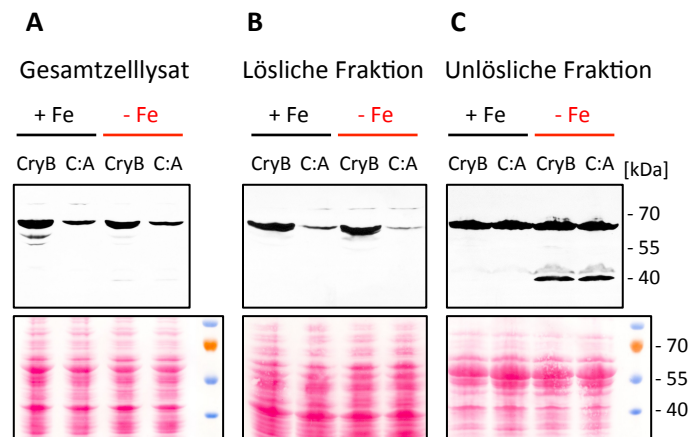
3.4.6.4 *In vivo* Expression von CryB und Photoreaktivierung unter Eisenmangelbedingungen

Die bisher beschriebenen Versuche, das FeS-Cluster zu entfernen, basieren auf Modifikationen des Proteins durch den Austausch von Aminosäuren. Um herauszufinden, ob die geringe Löslichkeit und der Funktionsverlust *in vivo* auf diese Modifikationen oder generell auf das Fehlen des Clusters zurückzuführen sind, wurde der Stamm $\Delta cryB$ pRKcryB, bei dem die CryB-Expression gut durch Western Blot zu detektieren ist, in Medium ohne Zusatz von Eisen sowie in Anwesenheit des Eisenchelators 2,2'-Dipyridyl kultiviert. So sollte die Bildung von FeS-Clustern unterbunden werden. Zunächst wurde die *in vivo* Expression untersucht. Als „Positivkontrolle“ wurde der bereits beschriebene Stamm $\Delta cryB$ pRKcryB C434A/C437A verwendet (Abschnitt 3.4.6.1), der in diesem Falle nicht ein intaktes, sondern ein aggregierendes Protein enthält. So sollte verglichen werden, ob Eisenmangel den gleichen Effekt hervorrufen würde wie der Austausch der Cysteine.

Im Western Blot ist zu sehen, dass die Bande des Wildtyp-CryB unter Eisenmangelbedingungen geringfügig schwächer ist als die des gleichen Stammes unter Normalbedingungen mit Eisen, die Intensität entspricht jedoch nicht dem deutlich geringeren Level von CryB C434A/C437A unter Normalbedingungen (Abbildung 3.21 A). Dieser Unterschied zwischen Wildtyp-CryB unter Eisenmangelbedingungen und CryB C434A/C437A unter Normalbedingungen ist bei Betrachtung der löslichen Fraktion noch deutlicher zu sehen und deutet darauf hin, dass die geringe Löslichkeit auf die Mutationen zurückzuführen ist und nicht auf die verminderte Verfügbarkeit von Eisen. Allgemein wirkt sich der Eisenmangel im Vergleich zu Normalbedingungen bei beiden Proteinen nicht auf die Menge ihres löslichen Anteils aus (Abbildung 3.21 B). In den unlöslichen Fraktionen ohne Eisen (Abbildung 3.21 C) sowie schwach auch in denen der Gesamtproteinfraktion (A) ist sowohl bei Wildtyp-CryB als auch bei der Cystein-Variante eine zusätzliche Bande knapp über 40 kDa zu erkennen, was darauf hindeutet, dass Eisenmangel einen Einfluss auf beide Proteine hat. Alle Banden der Größe von CryB in den unlöslichen Fraktionen sind gleich stark, unabhängig von Eisenverfügbarkeit und Mutation. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

Des Weiteren wurden UV-Überlebensexperimente mit dem Wildtyp-Stamm *R. sphaeroides* 2.4.1 unter Eisenmangelbedingungen durchgeführt. Dazu wurden Agarplatten mit dem entsprechenden Medium und Zusatz des Eisenchelators 2,2'-Dipyridyl verwendet. Die auf diesem Medium gewachsenen Kolonien wiesen jedoch eine Rotfärbung auf, was für eisenfrei gewachsene Zellen unüblich ist, sie sind durch

Abbildung 3.21: Western Blot gegen CryB aus Zellysaten der *R. sphaeroides*-Stämme $\Delta cryB$ pRK $cryB$ (CryB) und $\Delta cryB$ pRK $cryB$ C434A/C437A (C:A). Zellen wurden unter mikroaeroben Bedingungen mit (+Fe) oder ohne Zusatz von Eisen in Anwesenheit von $30 \mu\text{M}$ 2,2'-Dipyridyl (-Fe) kultiviert. **A)** Je $100 \mu\text{g}$ Gesamtprotein. **B)** Je $200 \mu\text{g}$ Protein der löslichen Fraktionen. **C)** Je $200 \mu\text{g}$ der unlöslichen Fraktionen. Ponceau-gefärbte Membranen dienen als Ladekontrollen.



Weißfärbung normalerweise deutlich von in eisenhaltigem Medium gewachsenen Zellen unterscheidbar (Peuser et al., 2011). Dieser Effekt ist möglicherweise auf im Agar enthaltenes Eisen zurückzuführen. Aus diesem Grund wurde die UV-Behandlung sowie die anschließende Lichtinkubation zur Photoreaktivierung abweichend von den anderen Photoreaktivierungsexperimenten in eisenfreiem Flüssigmedium durchgeführt. Erst nach Abschluss der Lichtinkubation von 5 Stunden wurden Zellen für eine spätere Bestimmung der CFU auf Agarplatten ausplattiert und diese im Dunkeln weiter inkubiert. So wurde sichergestellt, dass während der Photoreaktivierungsphase im Licht kein Eisen anwesend war. In dieser Zeit sollte demnach die Bildung von FeS-Clustern beeinträchtigt sein. Als Kontrolle wurde der Wildtyp auf gleiche Weise in normalem RÄ-Medium mit Eisen behandelt. Sowohl unter Eisenmangel- als auch unter Normalbedingungen zeigt der Wildtyp-Stamm gleiche Überlebensraten von ca. 88 %. (Abbildung 3.22 A). Auch die Dunkelkontrollen weisen keinen Unterschied zueinander auf (9 bzw. 10 %). Analog zur Bestimmung der Photoreaktivierungskinetik verschiedener Stämme (Abbildung 3.16) wurde auch unter Eisenmangelbedingungen die Überlebensrate des Wildtyps zu verschiedenen Zeitpunkten während der Photoreaktivierungsphase bestimmt (Abbildung 3.22 B). Zu fünf Zeitpunkten (0, 1, 10, 20 und 30

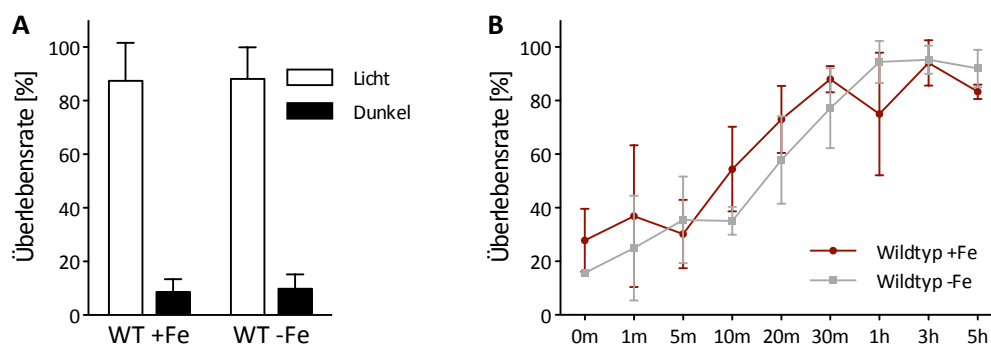


Abbildung 3.22: Überlebensraten von *R. sphaeroides* Wildtyp (WT) unter Normalbedingungen und Eisenmangelbedingungen. Zellen wurden bei einer OD_{660} von 0,6–0,7 in 20 ml Medium in Petrischalen verdünnt (10^{-6}), mit 100 J/m^2 UV-Licht (254 nm) bestrahlt und anschließend in Licht ($50 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) oder Dunkelheit inkubiert. **A)** Proben der Flüssigkulturen wurden nach 5 Stunden im Licht (weiße Balken) oder Dunkelheit (schwarze Balken) ausplattiert und für weitere 4 Tage im Dunkeln inkubiert. Die Überlebensraten sind als Verhältnis der CFU von UV-behandelten zu nicht behandelten Zellen in Prozent dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichung aus 4–5 unabhängigen biologischen Wiederholungen. **B)** Proben der Flüssigkulturen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während der Photoreaktivierungsphase ausplattiert und für weitere 4 Tage im Dunkeln inkubiert. Die Überlebensraten sind als Verhältnis der CFU von UV-behandelten zu nicht behandelten Zellen in Prozent dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichung aus 2–3 unabhängigen Wiederholungen.

Minuten) liegt die Überlebensrate bei Eisenmangelbedingungen leicht unter der bei Normalbedingungen, jedoch sind die Unterschiede nur sehr gering und die Standardabweichungen groß. Bei den letzten beiden Zeitpunkten (3 und 5 Stunden) sind die Überlebensraten fast gleich (94 bzw. 97 % und 83 bzw. 92 %).

3.4.6.5 Behandlung von CryB mit H₂O₂

Die Bindung des FeS-Clusters konnte nicht durch den Austausch von Cysteinen aufgehoben werden, ohne das gesamte Protein zu zerstören. Durch die Behandlung mit H₂O₂ als starkes Oxidationsmittel sollte untersucht werden, ob das Cluster von dem aufgereinigten Protein entfernt werden kann, wie im Falle des Eisenregulatorproteins IscR aus *R. sphaeroides*, dessen FeS-Cluster durch Behandlung mit 1 mM H₂O₂ verloren geht (Remes et al., 2015). Veränderungen im Protein wurden über die Messung von Absorptionsspektren überprüft. Die Behandlung wurde sowohl mit dem Wildtyp-Protein als auch mit der CryB-Variante L366H durchgeführt, bei der die Absorption des FeS-Clusters nicht durch die der anderen Cofaktoren überdeckt ist (Abbildung 3.12). 600 µl Protein (ca. 1 mg/ml) der E₁-Fraktionen nach der Ni-NTA-Aufreinigung wurden mit verschiedenen Mengen H₂O₂ versetzt. Die anfängliche Zugabe von 1 mM und 10 mM H₂O₂ bewirkte keine Veränderung, auch die Inkubation mit 1 mM H₂O₂ über Nacht (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden wurde die Konzentration zwischen 100 mM und 1 M stufenweise erhöht. Beim Wildtyp-CryB zeigte sich bis zu einer Konzentration von 200 mM keine starke Veränderung der Absorption. Ab 300 mM begann die Bildung von weißem Ausfall, was zu einer Erhöhung der Gesamtabsorption führte. Ab 400 mM wurde der Ausfall deutlich stärker. Der sonst maximale Peak ist nun auf gleicher Höhe mit dem ersten. Dies könnte auf einen Verlust der Absorption des FeS-Clusters bei 420 nm hindeuten. Dieser mögliche Verlust des FeS-Clusters geht jedoch mit starkem Proteinausfall einher, der die Absorption beeinflusst. Bei CryB L366H zeigte sich ein beginnender Ausfall des Proteins bereits bei 200 mM H₂O₂ und eine deutliche Steigerung bei 300 mM. Die stark erhöhte Absorption ab 300 mM ist auf den weißen Ausfall zurückzuführen, daher ist nicht erkennbar, ob das für CryB L366 typische Maximum bei 420 nm noch vorhanden ist. In Abbildung 3.23 A sind die Spektren des Wildtyp-Proteins bis 500 mM H₂O₂ gezeigt, in Abbildung 3.23 B die Spektren von CryB L366 bis 300 mM H₂O₂.

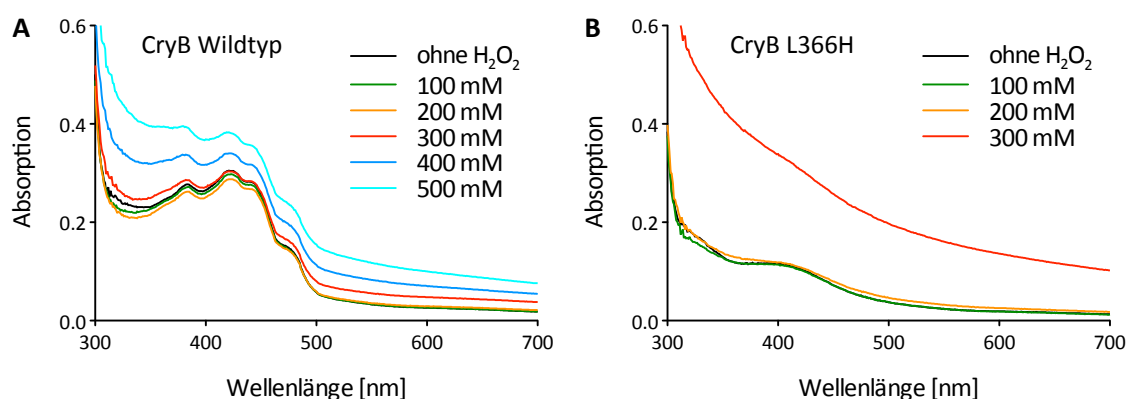


Abbildung 3.23: Absorptionsspektren von **A)** CryB Wildtyp und **B)** CryB L366H aus E₁-Fraktionen nach der Ni-NTA-Aufreinigung (jeweils ca. 1 mg/ml; ca. 17 µM), mit verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen behandelt.

3.5 Untersuchungen zur Genregulation durch *real-time* PCR

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der Cofaktoren von CryB nicht nur bei der Photoreaktivierung, sondern auch bei der Genregulation untersucht werden. Dazu sollten einige der in 3.2 aufgelisteten Komplementationsstämme von $\Delta cryB$, die plasmidkodiert eine veränderte Variante von CryB exprimieren, im Vergleich zum Komplementationsstamm mit Wildtyp-CryB ($\Delta cryB$ pRK $cryB$) sowie zur Leervektorkontrolle ($\Delta cryB$ pRK415) verwendet werden. Die CryB-Varianten tragen Aminosäureaustausche, wodurch Bindung oder Reduktion der Cofaktoren aufgehoben oder eingeschränkt sind (siehe Abschnitt 3.2). Die erhöhte plasmidbasierte Expression von CryB im Komplementationsstamm $\Delta cryB$ pRK $cryB$ (Abbildung 3.3) bewirkt jedoch, am Beispiel der verringerten Abundanz der *puf*- und *puc*-Transkripte, eine Verstärkung des Knockout-Phänotyps und nicht wie bei der Photoreaktivierung eine Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps (Hendrischk et al., 2009a). Deshalb sollte auch untersucht werden, ob es Expressionsunterschiede dieses Stammes im Vergleich zur Leervektorkontrolle $\Delta cryB$ pRK415 gibt.

Als Indikator einer Regulation durch CryB sollten zunächst ausgewählte Gene dienen, die zuvor durch *microarray*- und *real-time*-PCR-Analysen in $\Delta cryB$ als differenziell reguliert im Vergleich zum Wildtyp identifiziert wurden (Frühwirth et al., 2012). Die Untersuchungen waren unter drei verschiedenen Bedingungen – mikroaerob, Blaulicht und Singulett-Sauerstoffstress – durchgeführt worden. Die Expression dieser Gene sollte in dieser Arbeit in den Stämmen mit veränderten CryB-Versionen im Vergleich zu den Kontrollstämmen untersucht werden. Dies sollte Aufschluss über die Relevanz der entfernten oder beeinträchtigten Cofaktoren in der jeweiligen CryB-Variante geben, wenn der entsprechende Stamm entweder dem Verhalten von $\Delta cryB$ pRK $cryB$ oder dem von $\Delta cryB$ pRK415 im Bezug auf die Regulation bestimmter Gene entspricht. Als Vorbereitung wurde zunächst der Wildtyp- sowie der $\Delta cryB$ -Stamm erneut unter den in Frühwirth et al. (2012) beschriebenen Bedingungen angezogen und die Expression bestimmter Gene durch *real-time* PCR untersucht. Die Reproduktion der Ergebnisse erwies sich als nicht eindeutig bzw. einheitlich. Viele der Ergebnisse konnten in ihrer Tendenz (Herauf- oder Herabregulierung des Gens) reproduziert werden, die Unterschiede zwischen Wildtyp und $\Delta cryB$ waren meist geringer als in Frühwirth et al. (2012). Unter mikroaeroben Bedingungen zeigten 4 von 5 getesteten Genen die glei-

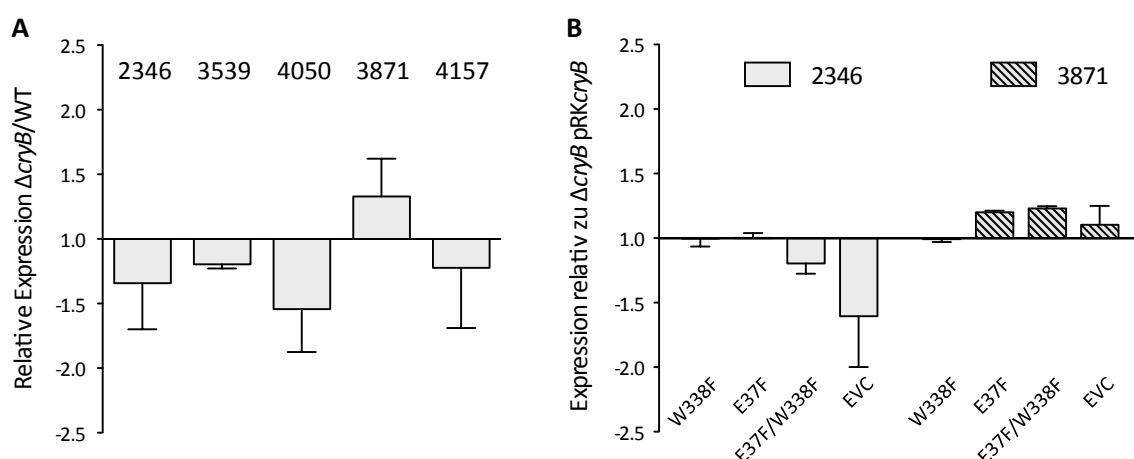


Abbildung 3.24: Bestimmung der relativen Expressionslevel bekannter in $\Delta cryB$ differenziell regulierter Gene (Frühwirth et al., 2012) durch *real-time* PCR unter mikroaeroben Bedingungen. **A)** Transkriptlevel von 5 Genen in $\Delta cryB$ relativ zum Wildtyp (WT) bei $OD_{660} = 0,8$. **B)** Transkriptlevel von RSP_2346 und RSP_3871 in den Stämmen $\Delta cryB$ pRK $cryB$ W338F, $\Delta cryB$ pRK $cryB$ E37F, $\Delta cryB$ pRK $cryB$ E37F/W338F und $\Delta cryB$ pRK415 (EVC) jeweils relativ zu $\Delta cryB$ pRK $cryB$ bei $OD_{660} = 0,6$. Mittelwerte aus biologischen Duplikaten mit Standardabweichung.

che Regulierung, jedoch nur zu einem sehr geringen Grad (Abbildung 3.24 A), ähnliches gilt für Untersuchungen unter Blaulicht (Daten nicht gezeigt). Von den unter mikroaeroben Bedingungen untersuchten Genen wurden RSP_2346 und RSP_3871 (*modA*) auch in den Stämmen $\Delta cryB$ pRK*cryB* (Komplementation) und $\Delta cryB$ pRK415 (Leervektorkontrolle) untersucht sowie in den Komplementationsstämmen mit den plasmidkodierten CryB-Varianten W338F, E37F und E37F/W338F (Abbildung 3.24 B). Dabei wurde $\Delta cryB$ pRK*cryB* als „Wildtyp“ und $\Delta cryB$ pRK415 als „Knockout“ betrachtet. Letzterer sowie die Stämme mit CryB-Varianten wurden jeweils relativ zu $\Delta cryB$ pRK*cryB* betrachtet. Das Transkript von RSP_2346 ist bei diesem Vergleich in $\Delta cryB$ pRK415 um das 1,6-Fache geringer vorhanden als in $\Delta cryB$ pRK*cryB*. Diese Tendenz entspricht dem Ergebnis des Vergleichs von Wildtyp und $\Delta cryB$. Die Level in den Stämmen mit CryB W338F und E37F sind unverändert, bei E37F/W338F liegt es dazwischen (-1,2). Bei RSP_3871 gibt es keinen deutlichen Unterschied zwischen $\Delta cryB$ pRK415 und $\Delta cryB$ pRK*cryB*, die Level in den drei Stämmen mit CryB-Varianten sind geringfügig höher (Abbildung 3.24 B).

Auch die Regulation unter photooxidativem Singulett-Sauerstoffstress (1O_2 -Stress) wurde betrachtet. Dabei wurden in dieser Arbeit erstmals die Gene RSP_0906 (*sitC*) und RSP_2878 (*coxS*) in die Analyse durch *real-time* PCR einbezogen. In der Rangliste der durch Singulett-Sauerstoff differenziell regulierten Gene fallen diese in den Daten des *microarrays* (Frühwirth, 2012) aufgrund ihrer sehr starken Herauf- bzw. Herabregulierung auf. Von über 2800 Transkripten ist *sitC* das am drittstärksten hochregulierte Gen, *coxS* das am achtstärksten herabregulierte. Zum Vergleich wurden außerdem *rpoE*, *prfB*, *pufL* und *znuA* einbezogen. Alle Gene zeigen ein geringfügig niedrigeres oder unverändertes Level in $\Delta cryB$ im Vergleich zum Wildtyp nach 20 Minuten Singulett-Sauerstoffstress (Abbildung 3.25 A). Weder *coxS* noch *sitC* zeigen eine starke Regulation, die Richtung ist nicht wie im *microarray* entgegengesetzt. Die Expression wurde des Weiteren durch den Vergleich der Transkriptlevel vor und nach Stressbeginn (t_0 und t_{20}) betrachtet. Unter Singulett-Sauerstoffstress wurde *rpoE* in $\Delta cryB$ in geringerem Maße induziert als im Wildtyp (Frühwirth et al., 2012). Diese Tendenz konnte nicht wiederholt gezeigt werden (Abbildung 3.25 B). Insgesamt ist die Induktion in beiden Stämmen geringer, jedoch etwa gleich stark (4,2- bzw. 4,7-fach). *sitC* zeigt eine starke Zunahme im Wildtyp nach 20 Minuten Stress und eine etwa halb so starke Zunahme in $\Delta cryB$. Die Transkriptlevel von *pufL* weisen eine Abnahme in beiden Stämmen auf, in $\Delta cryB$ etwas stärker. Die anderen Gene bleiben unbeeinflusst.

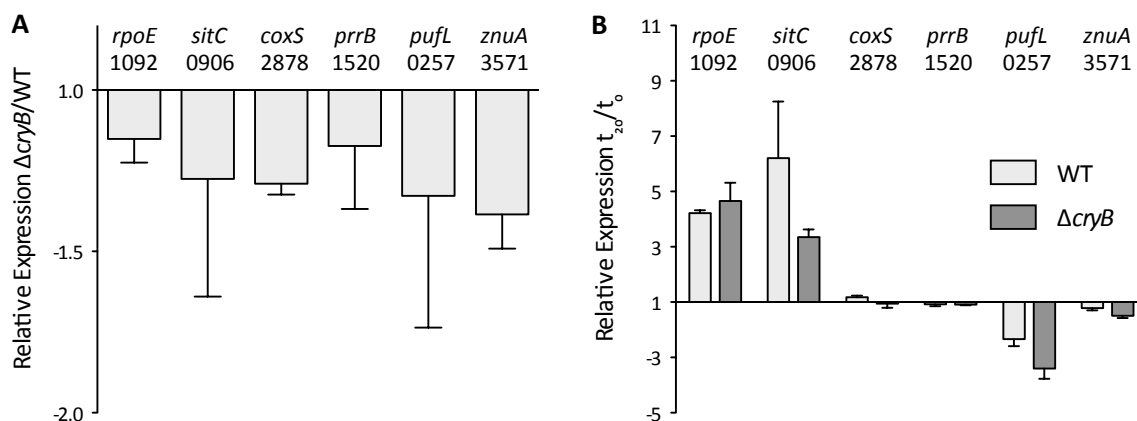


Abbildung 3.25: Bestimmung der relativen Expressionslevel bekannter in $\Delta cryB$ differenziell regulierter Gene (Frühwirth et al., 2012) sowie *sitC* und *coxS* durch *real-time* PCR nach photooxidativem (1O_2)-Stress. **A)** Transkriptlevel in $\Delta cryB$ relativ zum Wildtyp (WT) nach 20 Minuten (t_{20}) 1O_2 -Stress. **B)** Transkriptlevel zum Zeitpunkt t_{20} relativ zum Zeitpunkt t_0 (vor Stressbeginn), im Wildtyp und in $\Delta cryB$. Mittelwerte aus biologischen Duplikaten mit Standardabweichung.

3.6 Untersuchungen zur *puf*- und *puc*-Expression in $\Delta cryB$ unter Einfluss von Kanamycin

Eine der ersten phänotypischen Auffälligkeiten des *R. sphaeroides*-Knockout-Stammes 2.4.1 $\Delta cryB$ war die hellere Rotfärbung von mikroaerob gewachsenen Kulturen im Vergleich zum Wildtyp. Diese Beobachtung basierte auf der geringeren Ausbildung von photosynthetischen Komplexen und einer dadurch bedingten schwächeren Pigmentierung der Zellen, aufgrund einer verringerten Abundanz der mRNAs der *puf*- und *puc*-Operons, die in *R. sphaeroides* Komponenten des photosynthetischen Apparates kodieren. Die veränderten Transkriptlevel von *puc* und *puf* wurden durch Northern-Blot-Analyse gezeigt (Hendrischk et al., 2009a). Sie sind wahrscheinlich auf eine Herabregulierung auf transkriptioneller Ebene zurückzuführen, da die Halbwertszeiten von *puf* und *puc* in $\Delta cryB$ nicht beeinflusst sind. Diese Herabregulierung erwies sich als indirekt, da CryB nicht spezifisch an die *puf*- oder *puc*-Promotorregionen bindet (Frühwirth, 2012). Die genregulatorische Beteiligung von CryB wurde darüber hinaus anhand von *microarray*- und *real-time*-PCR-Analysen für weitere Gene festgestellt (Frühwirth et al., 2012).

Aufgrund der schweren Nachweisbarkeit der Expressionsunterschiede durch *real-time* PCR, die ursprünglich als Grundlage für nachfolgende Untersuchungen der CryB-Varianten dienen sollten (Abschnitt 3.5), wurden als alternativer Indikator für eine CryB-abhängige Regulation die durch Northern-Blot-Analyse beobachteten Expressionsunterschiede der *puf*- und *puc*-mRNAs zwischen Wildtyp und $\Delta cryB$ (Hendrischk et al., 2009a) ausgewählt. Diese hatten sich außerdem in der einfach erkennbaren, helleren Pigmentierung der Kulturen von $\Delta cryB$ geäußert. Hierbei stellte sich die Herausforderung, dass neuere Beobachtungen gezeigt hatten, dass dieser sichtbare Phänotyp vor allem in Anwesenheit von Kanamycin im Medium deutlich war. Kulturen von $\Delta cryB$, die wie der Wildtyp ohne das Antibiotikum kultiviert wurden, wiesen diesen Farbunterschied nicht auf (Sebastian Frühwirth, persönliche Kommunikation). Der Knockout des *cryB*-Gens in $\Delta cryB$ wurde durch die chromosomale Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette in den ORF des Gens erreicht (Hendrischk et al., 2007), der Zusatz von Kanamycin bei der Kultivierung dieses Stammes ist daher optional möglich. Dem Effekt der helleren Färbung liegt wie oben beschrieben ein verringertes Expressionslevel der *puf*- und *puc*-Operons zugrunde und es stellte sich daher die Frage, ob diese beiden zusammenhängenden Effekte auf bei der Kultivierung anwesendes Kanamycin zurückzuführen waren. Aus diesem Grund wurde bei den im Folgenden beschriebenen Untersuchungen getestet, welchen Einfluss die Anwesenheit von Antibiotikum im Medium auf den beobachteten Pigmentierungseffekt und die Expressionslevel von *puf* und *puc* hat. Die Bindungsbereiche der für Northern Blots verwendeten Sonden erstrecken sich jeweils über Teile der Gene B und A (Abbildung 3.26). Die Gene B und A befinden sich jeweils auf dem stabilsten Prozessierungsprodukt (ca. 0,5 kb) der mRNAs beider Operons (Rauhut und Klug, 1999).

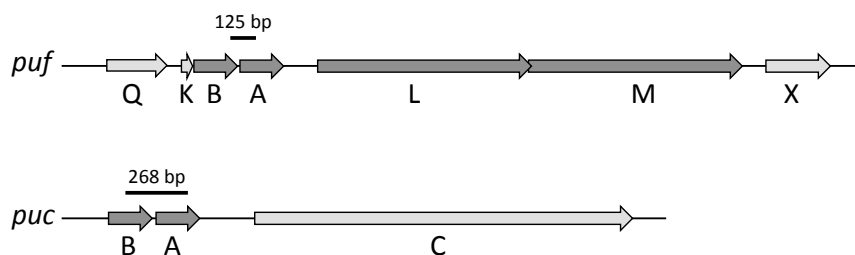


Abbildung 3.26: Bindungsbereiche der verwendeten PCR-Sonden zur Detektion der *puf*- und *puc*-mRNAs durch Northern Blot.

3.6.1 Expression von *puf* und *puc* im Wildtyp, $\Delta cryB$ pRK*cryB* und $\Delta cryB$ pRK415

Um den Effekt der verringerten Pigmentierung auf Genexpressionsebene zu untersuchen, wurden Kulturen von $\Delta cryB$ für die Northern-Blot-Analyse in An- und Abwesenheit von Kanamycin (+Km/-Km) im Medium angezogen. Bei der Anzucht der kanamycinfreien Kulturen von $\Delta cryB$ erfolgte lediglich das Ausstreichen auf kanamycinhaltigen Platten; sowohl die erste Flüssigkultur (Vorkultur), die von einer Einzelkolonie der Platte angeimpft wurde, als auch die aus dieser Vorkultur angeimpfte für die Zellernte bestimmte Hauptkultur (75 ml), wurden ohne Zusatz von Kanamycin kultiviert. Für Kanamycinbedingungen wurden sowohl Vor- als auch Hauptkulturen mit der Standardkonzentration (25 $\mu\text{g/ml}$) Kanamycin versetzt. Des Weiteren wurden die Kontrollstämme $\Delta cryB$ pRK*cryB* (Komplementation) sowie $\Delta cryB$ pRK415 (Leervektorkontrolle) als Vorbereitung für Vergleiche mit den CryB-Varianten untersucht. Um auch einen möglichen Einfluss von Tetracyclin zu untersuchen, das zur Aufrechterhaltung des pRK-Plasmids in geringer Konzentration (1,5 $\mu\text{g/ml}$) den Kulturen zugefügt wird, wurden diese ebenfalls mit und ohne das Antibiotikum angezogen. Anders als bei Kanamycin, dessen Zugabe im Falle der Anzucht von $\Delta cryB$ aufgrund der stabilen Integration des Kanamycin-Resistenzgens im Chromosom nicht notwendig ist, jedoch optional als Selektionsmittel eingesetzt werden kann, ist der Zusatz von Tetracyclin zum Erhalt des pRK-Plasmids in entsprechenden plasmidhaltigen Stämmen notwendig (Anhang 9.3). Daher wurden Vorkulturen von $\Delta cryB$ pRK*cryB* und $\Delta cryB$ pRK415 stets in Anwesenheit von Tetracyclin kultiviert. Erst beim Animpfen der Hauptkulturen wurde Tetracyclin entweder weggelassen (-Tc) oder weiterhin hinzugefügt (+Tc). Die plasmidhaltigen Stämme wurden auf kanamycin- und tetracyclinhaltigen Platten ausgestrichen, jedoch stets ohne Kanamycin in allen Flüssigkulturen kultiviert. Alle Stämme (Hauptkulturen) wurden unter mikroaeroben Bedingungen in Dunkelheit bis zu einer OD_{660} von 0,6 kultiviert.

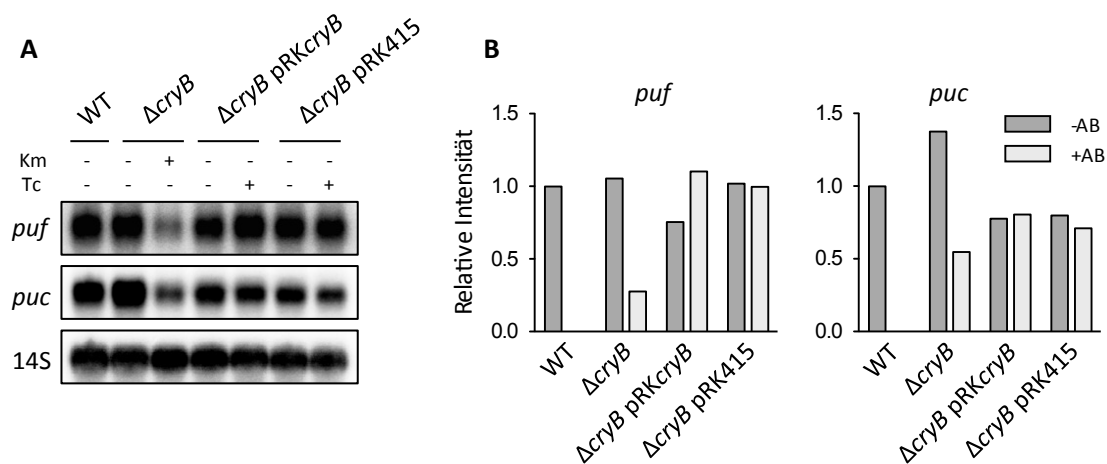


Abbildung 3.27: Northern-Blot-Analyse der *puf*- und *puc*-Expression in *R. sphaeroides* Wildtyp und $\Delta cryB$ in Anwesenheit (+Km) und Abwesenheit (-Km) von 25 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin im Medium, sowie $\Delta cryB$ pRK*cryB* und $\Delta cryB$ pRK415 jeweils in Anwesenheit (+Tc) und Abwesenheit (-Tc) von 1,5 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin im Medium. Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen bis zu einer OD_{660} von 0,6 kultiviert. **A)** Hybridisierung mit Sonden gegen *pufBA* und *pucBA* (500-kb-Fragmente) sowie die 14S rRNA als Ladekontrolle. Es wurden jeweils 10 μg RNA aufgetragen. **B)** Normalisierung der Signalintensitäten von *puf* und *puc* auf die der 14S rRNA. Die Stämme sind relativ zum Wildtyp dargestellt. AB = Antibiotikum.

Die Signalintensitäten der Hybridisierung mit *puf*- und *puc*-spezifischen Sonden (Abbildung 3.27 A) wurden jeweils auf die Intensitäten der Ladekontrolle 14S rRNA normalisiert (Abbildung 3.27 B), die Stämme wurden im Verhältnis zum Wildtyp betrachtet. Beim Vergleich von Wildtyp und $\Delta cryB$ (-Km) ist kein Unterschied des *puf*-Transkriptlevels zu erkennen. Das *puf*-Level von $\Delta cryB$ (+Km) ist im Ver-

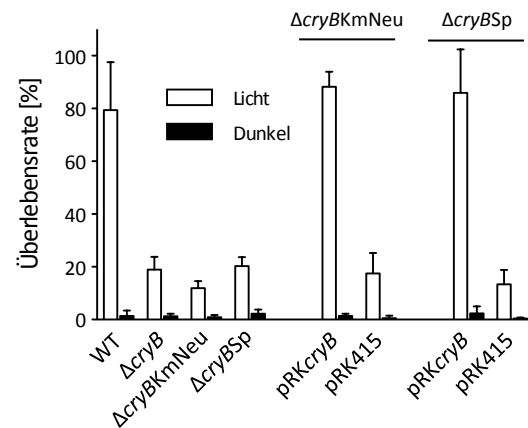
gleich zum Wildtyp und $\Delta cryB$ (-Km) hingegen deutlich verringert (28 % der Intensität). Beim Vergleich der plasmidhaltigen Stämme ist das *puf*-Transkriptlevel von $\Delta cryB$ pRK*cryB* (-Tc) geringer als das der drei anderen Stämme. Es gibt keinen Unterschied zwischen $\Delta cryB$ pRK415 mit oder ohne Tetracyclin und die Level sind vergleichbar mit dem des Wildtyps und $\Delta cryB$ (-Km). Die Ergebnisse der *puc*-Expression sind ähnlich. Hier ist eine Erhöhung der Signalintensität von $\Delta cryB$ (-Km) im Vergleich zum Wildtyp festzustellen sowie ebenfalls eine deutliche Verringerung bei der kanamycinhaltigen Kultur (55 % des Wildtyps). Alle plasmidhaltigen Stämme, ob mit oder ohne Tetracyclin kultiviert, weisen untereinander vergleichbare Level des *puc*-Transkriptes auf und liegen leicht unter dem des Wildtyps (71–80 %).

3.6.2 Herstellung neuer $\Delta cryB$ -Stämme

Der im vorangegangenen Abschnitt beschriebene deutliche Einfluss von Kanamycin auf die Transkriptlevel der *puf*- und *puc*-mRNAs in $\Delta cryB$ warf die Frage auf, ob der zuvor beobachtete Phänotyp der hellen Pigmentierung und der Herabregulierung von *puf* und *puc* im Stamm $\Delta cryB$ (Hendrischk et al., 2009a) möglicherweise durch Kanamycin hervorgerufen wird. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden die im nächsten Abschnitt (3.6.3) vorgestellten Kontrollstämme in die Analyse einbezogen. Eine andere Möglichkeit könnte der Verlust dieses Phänotyps in $\Delta cryB$ aufgrund von Sekundärmutationen sein, was erklären würde, dass $\Delta cryB$ -Kulturen ohne Kanamycin den Effekt nicht mehr zeigen. Um diese zweite Möglichkeit zu überprüfen, wurde der Knockout des *cryB*-Gens im Wildtyp auf zwei verschiedene Arten erneut generiert. Zum einen wurde das in Hendrischk et al. (2007) beschriebene Konstrukt pPHU Δ 3077 verwendet, um den Stamm auf identische Weise herzustellen. Dieser frische Stamm, $\Delta cryB$ KmNeu, wurde mit dem bisher verwendeten $\Delta cryB$ -Stamm verglichen. Vor allem der Vergleich der beiden Stämme in Abwesenheit von Kanamycin sollte klären, ob der Phänotyp der geringeren Pigmentierung unter diesen Bedingungen bei dem neuen Stamm wieder zu beobachten ist und somit bei dem ursprünglichen $\Delta cryB$ -Stamm verlorengegangen wäre. Zum anderen wurde ein weiteres Knockout-Konstrukt verwendet, durch das die Ω -Sm/Sp-Kassette in den ORF von *cryB* im Wildtyp inseriert wird und dem neuen Knockout-Stamm eine Streptomycin- und Spectinomycinresistenz verleiht. Dieses Konstrukt pPHU281-*cryB*- Ω -Sp wurde von Andreas Jäger kloniert. Mit diesem zweiten neuen Stamm, $\Delta cryB$ Sp, konnte nun überprüft werden, ob es einen Unterschied zu den kanamycinresistenten $\Delta cryB$ -Stämmen gibt sowie zwischen mit und ohne Spectinomycin gewachsenen Kulturen, um zu klären, ob das Fehlen von CryB in Kombination mit dem Antibiotikum Kanamycin den beobachteten Effekt auslöst. Zur Überprüfung des Knockouts von CryB in den neuen Stämmen wurde zunächst der bekannte Phänotyp des Photoreaktivierungsdefektes (vgl. Abschnitt 3.2.1) als Indikator untersucht. Dazu wurden die neuen Stämme sowie deren Komplementationen im UV-Experiment untersucht und mit dem Wildtyp und dem bisherigen $\Delta cryB$ -Stamm verglichen.

Alle drei Knockout-Stämme weisen eine untereinander vergleichbare Verringerung der Überlebensrate (12–20 %) nach UV-Stress und Lichtbehandlung auf (Abbildung 3.28). Die Überlebensrate des Wildtyps liegt bei 80 %. Die Überlebensfähigkeit wird durch Einbringen des *cryB*-Gens auf dem Plasmid pRK*cryB* (Komplementation) bei beiden neuen Stämmen wiederhergestellt (88 und 86 %), nicht jedoch durch das leere Plasmid pRK415 (18 und 13 %). Entsprechend verhält es sich für die Komplementation und Leervektorkontrolle des alten $\Delta cryB$ -Knockout-Stammes (Abbildung 3.4). Die Überlebensraten der Dunkelkontrollen aller Stämme liegen unter 3 %. Diese Überprüfungen bestätigen die Wirksamkeit der neuen *cryB*-Knockouts. Im Folgenden wird die Untersuchung der Stämme auf den Phänotyp der Pigmentierung und Genregulation beschrieben.

Abbildung 3.28: Überlebensraten der neuen *R. sphaeroides cryB*-Knockout-Stämme $\Delta cryBKmNeu$ und $\Delta cryBSp$, sowie deren Komplementationen und Leervektorkontrollen nach UV-Bestrahlung, im Vergleich zum Wildtyp und $\Delta cryB$. Zellen wurden mit 100 J/m^2 UV-Licht (254 nm) bestrahlt und anschließend zur Regenerierung bei einer Lichtintensität von $50 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ (weiße Balken) oder in Dunkelheit (schwarze Balken) für 3–4 Tage inkubiert. Die Überlebensraten sind als Verhältnis der CFU von UV-behandelten zu nicht behandelten Zellen in Prozent dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichung aus 2–3 unabhängigen biologischen Wiederholungen.



3.6.3 Untersuchung der Kontrollstämme

Neben den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen neuen kanamycin- und spectinomycinresistenten $\Delta cryB$ -Knockout-Stämmen wurden zwei weitere Kontrollstämme in die Analyse einbezogen. Im Knockout-Stamm der Photolyase PhrA (Hendrischk et al., 2007) wurde der Großteil des ORF (RSP_2143, *phrA*) auf gleiche Weise wie in $\Delta cryB$ durch die gleiche Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt. Dieser Stamm $\Delta phrA$ kann somit auch in Anwesenheit von Kanamycin kultiviert werden und wurde sowohl im Selbstvergleich (+/-Km) als auch zu $\Delta cryB$ betrachtet. Des Weiteren wurde der Wildtyp mit dem leeren Vektor pBBR1MCS-2 konjugiert, der eine Kanamycinresistenz vermittelt. Die Resistenzkassette von pBBR1MCS-2 stammt ursprünglich aus dem pKS-Plasmid (Kovach et al., 1995; Manoil und Beckwith, 1985) und unterscheidet sich von der aus pUC4K (Vieira und Messing, 1982) stammenden Kassette, die zum Ausschalten von *cryB* und *phrA* verwendet wurde. Der Stamm stellt eine kanamycinresistente Version des Wildtyps dar. Durch diese beiden Kontrollstämme sollte geklärt werden, ob der Effekt generell bei Anwesenheit von Kanamycin auftritt oder nur im $\Delta cryB$ -Stamm. Die fünf Stämme Wildtyp (bzw. Wildtyp pBBR1MCS-2), $\Delta cryB$, $\Delta cryBKmNeu$, $\Delta cryBSp$ und $\Delta phrA$ wurden unter mikroaeroben Bedingungen bis zu einer OD_{660} von 0,6 kultiviert. Alle Stämme wurden dabei sowohl mit als auch ohne Zusatz des jeweiligen Antibiotikums (Kanamycin oder Spectinomycin) angezogen.

3.6.3.1 Färbung und Chlorophyllgehalt

Die Färbungen der fünf Kulturen ohne Antibiotikum weisen keine sichtbaren Unterschiede auf. Werden die gleichen Stämme mit ihrem jeweiligen Antibiotikum kultiviert, so zeigt sich bei beiden identischen kanamycinresistenten $\Delta cryB$ -Knockout-Stämmen eine deutlich hellere Färbung als bei den anderen Kulturen mit Antibiotikum (Abbildung 3.29 A) sowie derselben Stämme ohne Kanamycin. Eine weitere Auffälligkeit ist das deutlich langsamere Wachstum der beiden $\Delta cryB$ -Stämme im Vergleich zu den anderen Stämmen in Anwesenheit der Antibiotika. Dieser Unterschied zeigt sich nicht bei Kultivierung ohne Antibiotikum. Der durch das Plasmid pBBR1MCS-2 kanamycinresistente Wildtyp weist keinen Farbunterschied zum Wildtyp ohne das Plasmid und Kanamycin auf. Die Kultur des Kontrollstammes $\Delta phrA$ zeigt eine geringfügig hellere Färbung mit Kanamycin im Vergleich zum selben Stamm ohne Kanamycin, der Unterschied ist jedoch weniger ausgeprägt als bei $\Delta cryB$. Der neue spectinomycinresistente Knockout-Stamm $\Delta cryBSp$ erscheint in Anwesenheit von Spectinomycin leicht dunkler als der entsprechende Stamm ohne das Antibiotikum.

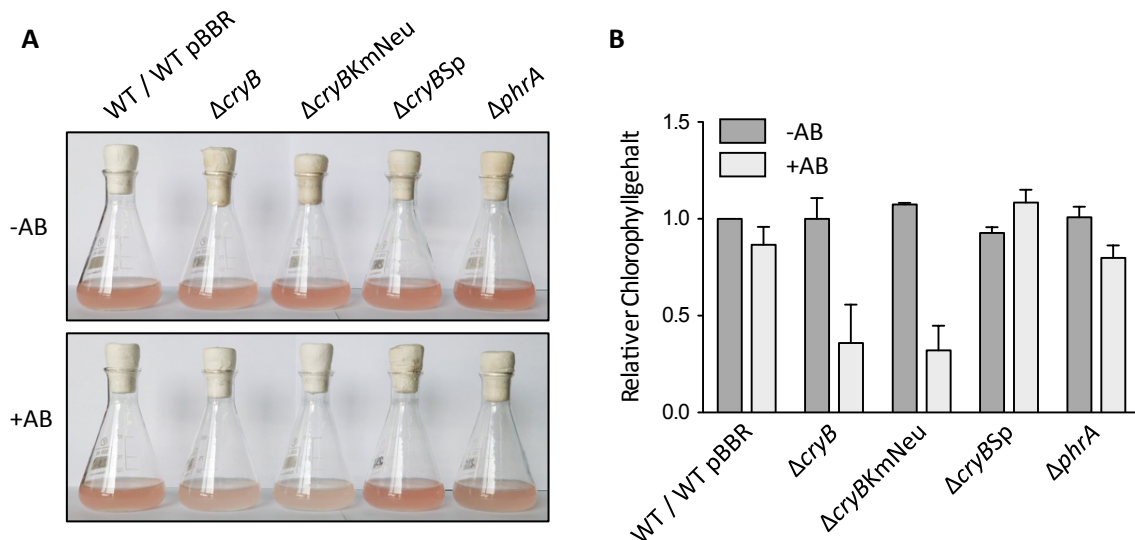


Abbildung 3.29: A) Färbung und **B)** Chlorophyllgehalt mikroaerob gewachsener Kulturen bei einer OD_{660} von 0,6 ohne und mit Zusatz der Antibiotika Kanamycin (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder Spectinomycin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). WT = Wildtyp, WT pBBR = Wildtyp mit Plasmid pBBR1MCS-2 (kanamycinresistent), $\Delta cryB$ = kanamycinresistenter *cryB*-Knockout aus Hendrischk et al. (2007), $\Delta cryBKmNeu$ = neuer *cryB*-Knockout mit der gleichen Kanamycin-Resistenzkassette wie in $\Delta cryB$, $\Delta cryBSp$ = neuer *cryB*-Knockout mit Spectinomycinresistenz, $\Delta phrA$ = kanamycinresistenter Knockout der Photolyase PhrA. AB = Antibiotikum. Absorptionswerte der Chlorophyllbestimmung wurden auf die OD_{660} normalisiert. Alle Stämme sind relativ zum Wildtyp ohne AB dargestellt. Mittelwerte aus zwei biologischen und zwei technischen Replikaten mit Standardabweichung.

Um diese visuelle Beobachtung zu quantifizieren, wurde eine Bestimmung des Bakteriochlorophyllgehaltes durchgeführt (Abbildung 3.29 B). Die Zellen aller antibiotikafreien Kulturen weisen untereinander keinen Unterschied im Chlorophyllgehalt auf. Bei beiden kanamycinresistenten $\Delta cryB$ -Stämmen zeigt sich ein stark verringerter Chlorophyllgehalt in Anwesenheit von Kanamycin von ca. 40 % im Vergleich zu den gleichen Stämmen ohne Kanamycin. Der Wildtyp mit dem Plasmid pBBR1MCS-2 weist in Anwesenheit von Kanamycin keine Veränderung gegenüber dem gleichen Stamm ohne Plasmid und Antibiotikum auf. Der Chlorophyllgehalt von $\Delta cryBSp$ -Kulturen mit und ohne Spectinomycin ist in der spectinomycinhaltigen Kultur geringfügig erhöht. Im Knockout-Stamm der Photolyase PhrA ist der Chlorophyllgehalt in Anwesenheit von Kanamycin leicht niedriger (ca. 78 %) als in der entsprechenden kanamycinfreien Kultur. Der Chlorophyllgehalt spiegelt sich somit in der Färbung der Kulturen wider.

3.6.3.2 Analyse der *puf*- und *puc*-Expression

Zur Überprüfung, ob die in An- oder Abwesenheit von Antibiotika beobachteten Unterschiede der Kulturen in Färbung und Chlorophyllgehalt, vor allem in Hinblick auf die beiden auffälligen Stämme $\Delta cryB$ und $\Delta cryBKmNeu$, auf unterschiedliche Expressionsraten der *puf*- und *puc*-Operons zurückzuführen sind, wurden diese beiden Transkripte in den fünf Stämmen durch Northern-Blot-Analyse quantifiziert. Dazu wurden die Kulturen wie beschrieben mit und ohne Antibiotika bis zu einer OD_{660} von 0,6 kultiviert. Die Signalintensitäten der *puf*- und *puc*-Hybridisierung wurden quantifiziert und auf die der 16S rRNA normalisiert (Abbildung 3.30). Sowohl die *puf*- als auch *puc*-Transkripte zeigen in Kulturen ohne Antibiotikum keine oder sehr geringe Unterschiede, lediglich das *puf*-Level in $\Delta cryBKmNeu$ weist eine leichte Erhöhung im Vergleich zu den anderen Stämmen auf. Die Tendenzen der Transkriptlevel von *puf* und *puc* in den antibiotikahaltigen im Vergleich zu den antibiotikafreien Kulturen sind gleich, jedoch mit unterschiedlicher Intensität. Am auffälligsten ist die Reduktion des Levels der *puf*-Transkripte im alten und

neuen kanamycinresistenten $\Delta cryB$ -Stamm unter Anwesenheit von Kanamycin um deutlich mehr als die Hälfte im Vergleich zu denselben Stämmen, die ohne Kanamycin kultiviert wurden. Diese Reduktion zeigt sich ebenfalls für die *puc*-Transkripte, aber in leicht geringerem Maße um ca. die Hälfte der antibiotikafreien Vergleichskulturen. Reduzierte *puf*-Level in den kanamycinhaltigen Kulturen im Vergleich zu den kanamycinfreien zeigen sich auch in den beiden Kontrollstämmen Wildtyp bzw. Wildtyp pBBR1MCS-2 und $\Delta phrA$. Die Level sind bei Anwesenheit von Kanamycin um 66 bzw. 73 % reduziert. Dieser Effekt ist bei *puc* in deutlich geringerem Maße zu beobachten. Die An- oder Abwesenheit von Spectinomycin bei der Anzucht des Knockout-Stammes $\Delta cryBSp$ hat weder einen Einfluss auf die Transkriptlevel der *puf*- noch der *puc*-mRNAs.

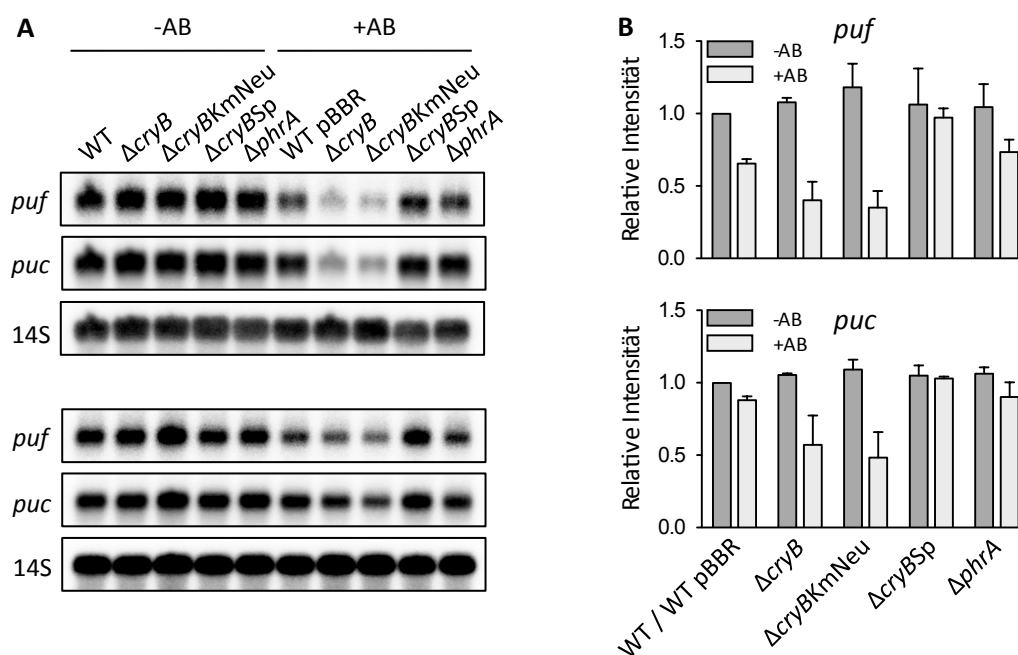


Abbildung 3.30: Northern-Blot-Analyse der *puf*- und *puc*-Expression in verschiedenen *R. sphaeroides*-Stämmen in Abwesenheit oder Anwesenheit der Antibiotika Kanamycin (25 μ g/ml) oder Spectinomycin (10 μ g/ml) im Medium. Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen bis zu einer OD_{660} von 0,6 kultiviert. **A)** Hybridisierung mit Sonden gegen *pufBA* und *pucBA* (500-kb-Fragmente) sowie die 14S rRNA als Ladekontrolle. Es wurden jeweils 10 μ g RNA geladen. **B)** Normalisierung der Signalintensitäten von *puf* und *puc* auf die der 14S rRNA. WT = Wildtyp, WT pBBR = Wildtyp mit Plasmid pBBR1MCS-2 (kanamycinresistent), $\Delta cryB$ = kanamycinresistenter *cryB*-Knockout aus Hendrischk et al. (2007), $\Delta cryBKmNeu$ = neuer *cryB*-Knockout mit der gleichen Kanamycin-Resistenzkassette wie in $\Delta cryB$, $\Delta cryBSp$ = neuer *cryB*-Knockout mit Spectinomycinresistenz, $\Delta phrA$ = kanamycinresistenter Knockout der Photolyase PhrA. AB = Antibiotikum. Alle Stämme sind relativ zum Wildtyp ohne AB dargestellt. Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten mit Standardabweichung.

3.6.4 Untersuchung des Kontrollstammes $\Delta cryBSp$ pBBR1MCS-2

Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Beobachtungen der helleren Färbung durch einen geringeren Chlorophyllgehalt sowie die Herabregulierung von *puf* und *puc* zeigten sich in unterschiedlichem Maße bei allen in kanamycinhaltigem Medium gewachsenen Stämmen. Sowohl bei dem alten als auch dem neuen kanamycinresistenten $\Delta cryB$ -Knockout-Stamm sind diese Effekte am stärksten ausgeprägt. Das Ausbleiben dieser Effekte im Stamm $\Delta cryBSp$, bei dem das Gen durch die Ω -Sm/Sp-Resistenzkassette ausgeschaltet wurde, zeigt, dass diese nicht auf das Fehlen von CryB zurückzuführen sind. Dazu kommt, dass die Anwesenheit von Kanamycin in den beiden kanamycinresistenten Kontrollstämmen Wildtyp pBBR1MCS-2 und $\Delta phrA$ einen deutlich geringeren Effekt auf die betrachteten Eigen-

schaften hatte. Diese Beobachtungen suggerieren, dass es einen spezifischen Kombinationseffekt aus der Abwesenheit von CryB und der Anwesenheit von Kanamycin geben könnte, der einzeln betrachtet nicht auftritt. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass die Kanamycinresistenz in den Stämmen $\Delta cryB$ und $\Delta cryBKmNeu$ nur eingeschränkt exprimiert wird, sodass diese Stämme die Anwesenheit von Kanamycin weniger gut tolerieren würden als andere kanamycinresistente Stämme. In diesem Abschnitt soll daher durch den Einbezug eines weiteren Kontrollstammes zunächst geklärt werden, ob der beschriebenen Phänotyp spezifisch durch die Kombination „-CryB +Km“ ausgelöst wird. Dazu wurde der Stamm $\Delta cryBSp$ mit dem Plasmid pBBR1MCS-2 konjugiert. So lag ein Stamm vor, bei dem CryB nicht durch eine Kanamycin-Resistenzkassette wie in den Stämmen $\Delta cryB$ und $\Delta cryBKmNeu$ ausgeschaltet ist, der aber dennoch über eine *trans*-kodierte Kanamycinresistenz durch das Plasmid verfügt. So konnte dieser CryB-lose Stamm unter Anwesenheit von Kanamycin kultiviert werden, ohne dass die Kanamycinresistenz mit dem Fehlen von *cryB* zusammenhängt. Zwei verschiedene Klone dieses Stammes wurden sowohl in Anwesenheit beider Antibiotika, Spectinomycin und Kanamycin, als auch nur mit Kanamycin unter mikroaeroben Bedingungen angezogen. Als Kontrollstämme dienten Wildtyp bzw. Wildtyp pBBR1MCS-2, $\Delta cryB$ und $\Delta cryBSp$, die erneut sowohl mit als auch ohne Antibiotika parallel zu den neuen Stämmen kultiviert wurden.

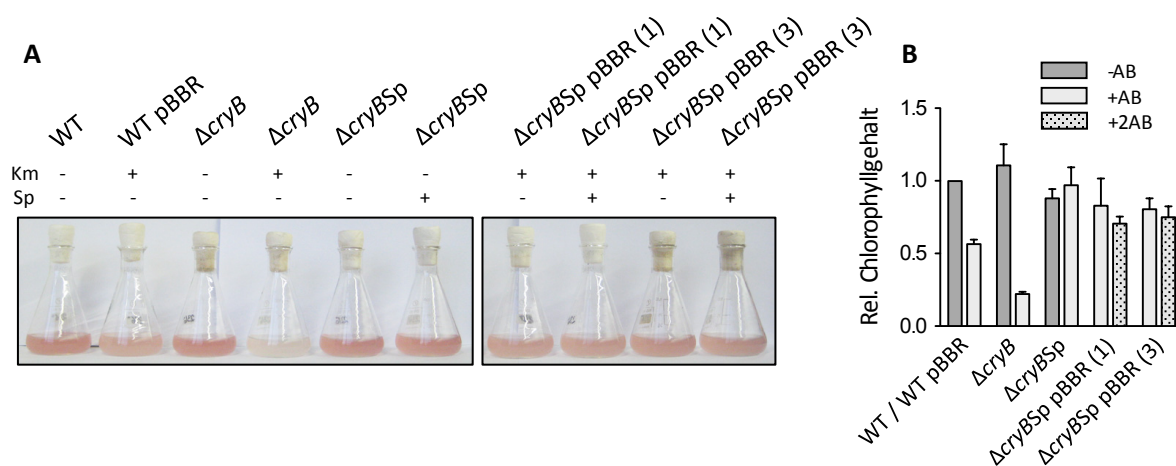


Abbildung 3.31: A) Färbung und **B)** Chlorophyllgehalt mikroaerob gewachsener Kulturen bei einer OD_{660} von 0,6 ohne und mit Zusatz der Antibiotika Kanamycin (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder Spectinomycin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). WT = Wildtyp, WT pBBR = Wildtyp mit Plasmid pBBR1MCS-2 (kanamycinresistent), $\Delta cryB$ = kanamycinresistenter *cryB*-Knockout aus Hendrischk et al. (2007), $\Delta cryBSp$ = *cryB*-Knockout mit Spectinomycinresistenz, $\Delta cryBSp$ pBBR = *cryB*-Knockout $\Delta cryBSp$ mit Plasmid pBBR1MCS-2 (spectinomycin- und kanamycinresistent), Klon (1) und (3). Km = Kanamycin, Sp = Spectinomycin, AB = Antibiotikum. Absorptionswerte der Chlorophyllbestimmung wurden auf die OD_{660} normalisiert; alle Stämme sind relativ zum Wildtyp ohne AB dargestellt. Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten mit Standardabweichung.

Die in Abschnitt 3.6.3.1 beschriebenen Beobachtungen für die Kontrollstämme bezüglich Färbung und Chlorophyllgehalt bestätigen sich erneut, wobei die Unterschiede zwischen Wildtyp pBBR1MCS-2 (+Km) und Wildtyp (-Km) größer sind (Abbildung 3.31). Die Pigmentierung in $\Delta cryB$ ist stark verringert im Vergleich zu den anderen Stämmen. Beide Klone des neuen Kontrollstammes $\Delta cryBSp$ pBBR1MCS-2 zeigen nur eine geringfügige Senkung des Chlorophyllgehaltes im Vergleich zum Wildtyp, $\Delta cryB$ (-Km) sowie $\Delta cryBSp$ (-/+Sp). Die Kombination Sp/Km im Vergleich zur alleinigen Anwesenheit von Kanamycin bewirkt keinen Unterschied. Im Vergleich zu $\Delta cryB$ (+Km) ist der Chlorophyllgehalt deutlich höher und die Pigmentierung stärker.

Die Transkriptlevel von *puf* und *puc* in den Kontrollstämmen entsprechen den Ergebnissen aus Abschnitt 3.6.3.2. Die *puf*-Level beider Klone des neuen Stammes $\Delta cryBSp$ pBBR1MCS-2 weisen ein mit den anderen Stämmen (Ausnahme $\Delta cryB + Km$) vergleichbares *puf*-Level auf, unabhängig davon, ob nur Spectinomycin oder beide Antibiotika anwesend sind (Abbildung 3.32). Das *puf*-Level von Klon (1) liegt geringfügig niedriger, das von Klon (3) leicht höher. Das gleiche ist für die Transkriptlevel von *puc* zu erkennen, auch hier liegt Klon (3) etwas höher als Klon (1). Kein Stamm zeigt ein so stark verringertes Level wie $\Delta cryB (+Km)$. Die Northern-Blot-Analyse bestätigt somit die Beobachtungen bezüglich Färbung und Chlorophyllgehalt. In Tabelle 3.3 sind die in Abschnitt 3.6. untersuchten Stämme zusammengefasst.

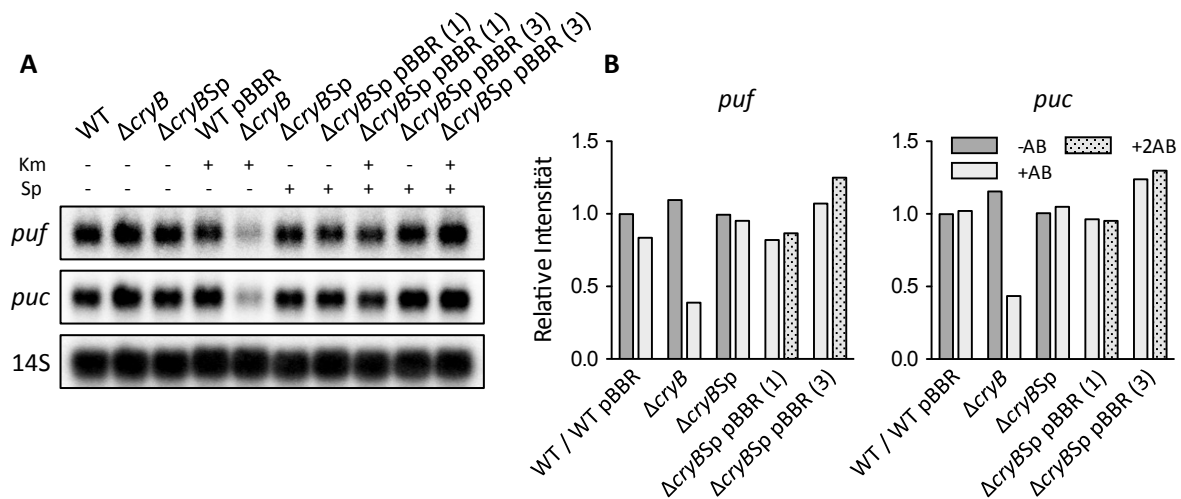


Abbildung 3.32: Northern-Blot-Analyse der *puf*- und *puc*-Expression in verschiedenen *R. sphaeroides*-Stämmen in Abwesenheit oder Anwesenheit der Antibiotika Kanamycin (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und/oder Spectinomycin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) im Medium. Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen bis zu einer OD_{660} von 0,6 kultiviert. **A)** Hybridisierung mit Sonden gegen *pufBA* und *pucBA* (500-kb-Fragmente) sowie die 14S rRNA als Ladekontrolle. Es wurden jeweils 10 μg RNA geladen. **B)** Normalisierung der Signalintensitäten von *puf* und *puc* auf die der 14S rRNA. WT = Wildtyp, WT pBBR = Wildtyp mit Plasmid pBBR1MCS-2 (kanamycinresistent), $\Delta cryB$ = kanamycinresistenter *cryB*-Knockout aus Hendrischk et al. (2007), $\Delta cryBSp$ = *cryB*-Knockout mit Spectinomycinresistenz, $\Delta cryBSp$ pBBR = *cryB*-Knockout $\Delta cryBSp$ mit Plasmid pBBR1MCS-2 (spectinomycin- und kanamycinresistent), Klon (1) und (3). Alle Stämme sind relativ zum Wildtyp ohne AB dargestellt. Km = Kanamycin, Sp = Spectinomycin. AB = Antibiotikum.

Tabelle 3.3: Stämme zur Untersuchung des Einflusses von Antibiotika

Stamm	Resistenz		„AB-Phänotyp“ ¹⁾	Quelle
	Chromosom	Plasmid		
Wildtyp	–	–	–	van Niel (1944)
Wildtyp pBBR1MCS-2	–	Km	Schwach	Diese Arbeit
$\Delta cryB$	Km	–	Stark	Hendrischk et al. (2007)
$\Delta cryBKmNeu$	Km	–	Stark	Diese Arbeit
$\Delta cryBSp$	Sp	–	–	Diese Arbeit
$\Delta cryBSp$ pBBR1MCS-2	Sp	Km	Schwach	Diese Arbeit
$\Delta phrA$	Km	–	Schwach	Hendrischk et al. (2007)

¹⁾ Durch Anwesenheit von Antibiotikum (AB) im Kulturmedium hervorgerufene Ausprägung eines oder mehrerer der in Abschnitt 3.6 beschriebenen Phänotypen: helle Färbung, verringerter Chlorophyllgehalt, verringerte *puf*- und *puc*-Transkriptlevel.

Die Ergebnisse der Untersuchung des Stammes $\Delta cryB$ Sp pBBR1MCS-2 zeigen, dass nicht die Kombination aus fehlendem CryB und Anwesenheit von Kanamycin den in $\Delta cryB$ beobachteten Phänotyp auslöst. Der Stamm $\Delta cryB$ scheint eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin zu haben. Im folgenden Abschnitt wird daher die Frage behandelt, ob die Expression der Kanamycin-Resistenzkassette in $\Delta cryB$ fehlerhaft ist.

3.6.5 Expressionsanalyse des Kanamycin-Resistenzgens in $\Delta cryB$ durch *real-time* PCR

Aufgrund der festgestellten, im Vergleich zu den Kontrollstämmen $\Delta phrA$ und Wildtyp pBBR1MCS-2 erhöhten Sensitivität der Stämme $\Delta cryB$ und $\Delta cryBKmNeu$ gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin, die keinen spezifischen Zusammenhang mit dem Fehlen von CryB hat (Abschnitt 3.6.4), wurde das Expressionslevel des Kanamycin-Resistenzgens in $\Delta cryB$ mittels quantitativer *real-time* PCR untersucht und mit dem Level des gleichen Resistenzgens in $\Delta phrA$, der die beschriebenen Effekte in viel geringerer Ausprägung aufweist, verglichen. So sollte geklärt werden, ob dieser Sensitivität eine mangelhafte Expression des Kanamycin-Resistenzgens zugrunde liegt. Dazu wurden die Stämme $\Delta cryB$ und $\Delta phrA$ sowohl in An- als auch Abwesenheit von Kanamycin unter mikroaeroben Bedingungen bis zu einer OD_{660} von 0,6 kultiviert, die RNA wurde für eine *real-time*-PCR-Analyse isoliert und behandelt. Es zeigte sich, dass die Expressionsrate des Kanamycin-Resistenzgens im Stamm $\Delta cryB$ um das 3–4-Fache geringer ist als im Stamm $\Delta phrA$ (Abbildung 3.33). Dieses Ergebnis tritt sowohl bei An- als auch Abwesenheit von Kanamycin in den Kulturen auf.

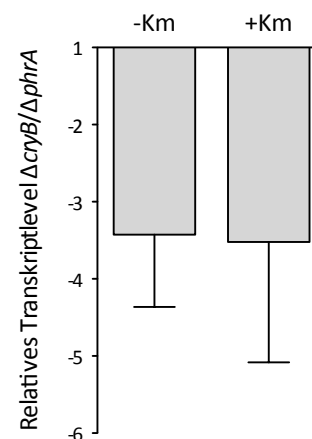


Abbildung 3.33: Relative mRNA-Level des Kanamycin-Resistenzgens in $\Delta cryB$ im Verhältnis zu dem in $\Delta phrA$ in Abwesenheit (-Km) und Anwesenheit (+Km) von Kanamycin, bestimmt durch *real-time* PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten mit Standardabweichung.

3.7 Genexpression unter Singulett-sauerstoffstress

3.7.1 Expression der kleinen RNA CcsR1

Bei der Suche nach einem Indikator für regulatorische Unterschiede zwischen *R. sphaeroides* $\Delta cryB$ und Wildtyp hatte sich herausgestellt, dass der zuvor beschriebene Expressionsunterschied von *puf* und *puc* unter mikroaeroben Bedingungen (Hendrischk et al., 2009a) nur mit Zusatz von Kanamycin in Kulturen von $\Delta cryB$ vorhanden ist (Abschnitt 3.6). Daraufhin wurde stattdessen die Expression der kleinen RNA CcsR1 (RSs0680a), die in $\Delta cryB$ im Vergleich zum Wildtyp eine vierfach höhere Abundanz unter aeroben Bedingungen aufweist und nach 20 Minuten Singulett-sauerstoffstress (1O_2 -Stress) etwas stärker induziert wird (Frühwirth et al., 2012), als Indikator in Erwägung gezogen. Diese regulatorische sRNA

wird zusammen mit CcsR2–4 unter oxidativem Stress verstärkt exprimiert und reguliert Gene des C1-Stoffwechsels (Billenkamp et al., 2015). Die Untersuchung geschah durch Northern Blotting nach vorheriger Harnstoff-PAA-Gelelektrophorese. Zunächst wurden die Kulturen in Dunkelheit und unter aeroben Bedingungen sowie mit Zusatz von Methylenblau als späteren *photosensitizer* für eine Verdopplungszeit kultiviert. Die Induktion des photooxidativen Stresses geschah durch Starklicht zur Generierung von Singulett-Sauerstoff. Zunächst wurden Wildtyp und $\Delta cryB$ verglichen. Die Bestimmung der Abundanz von CcsR1 geschah zu zwei Zeitpunkten (7 und 20 Minuten) nach Stressbeginn sowie direkt davor (0 Minuten). Keine der Kulturen enthielt Kanamycin oder Spectinomycin.

Im vorliegenden Experiment ist das Level von CcsR1 in $\Delta cryB$ vor Stressbeginn (t_0) im Vergleich zum Wildtyp um das 1,6-Fache erhöht (Abbildung 3.34 A und B). Die Induktion nach 20 Minuten photooxidativem Stress ist in beiden Stämmen ähnlich, das Level erhöht sich im Wildtyp um das 3-Fache im Vergleich zu t_0 , in $\Delta cryB$ um das 2,4-Fache. Dieses Level ist bereits nach 7 Minuten in beiden Stämmen erreicht und erfährt nach 20 Minuten keine weitere Steigerung. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

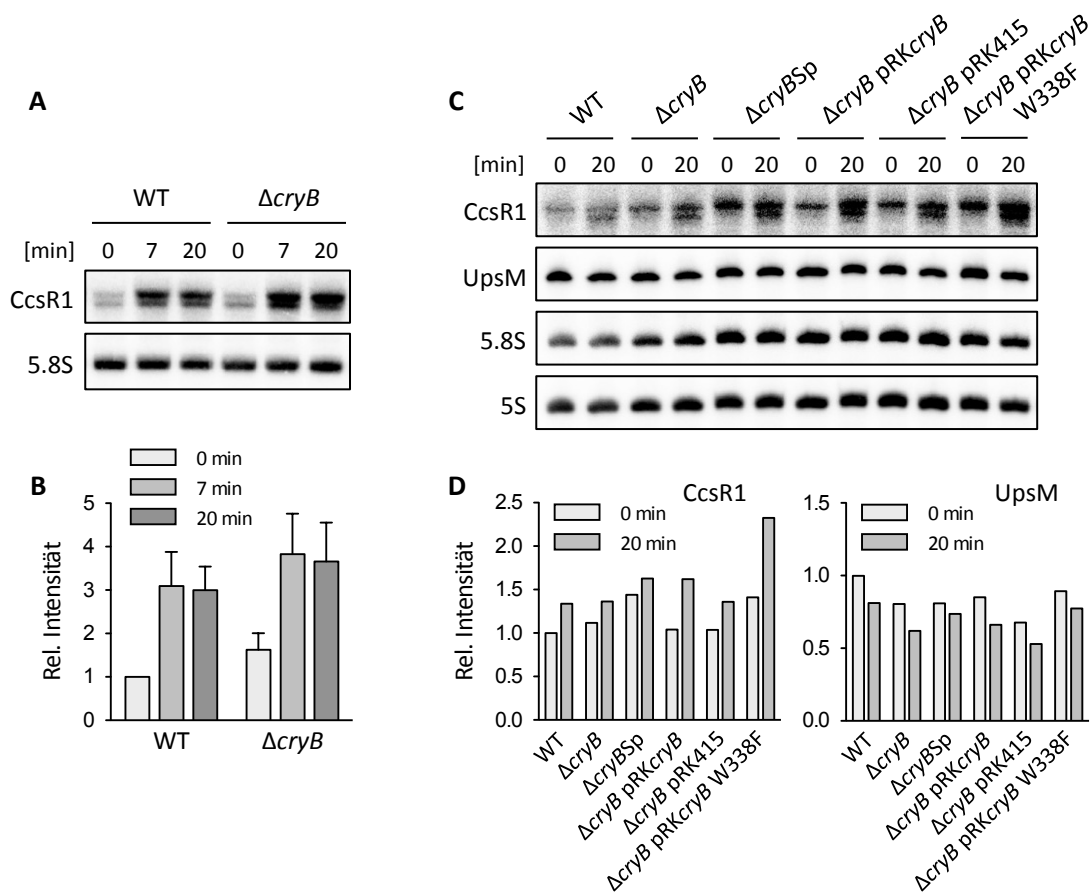


Abbildung 3.34: Northern-Blot-Analyse der Expression von CcsR1 (RSs0680a) und UpsM (RSs0682) in verschiedenen *R. sphaeroides*-Stämmen nach photooxidativem 1O_2 -Stress. **A)** Hybridisierung mit Sonden gegen CcsR1 und die 5.8S rRNA als Ladekontrolle. Es wurden jeweils 10 μ g RNA geladen. **B)** Normalisierung der Signalintensitäten von CcsR1 auf die der 5.8S rRNA. Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten mit Standardabweichung. **C)** Hybridisierung mit Sonden gegen CcsR1 und UpsM sowie die 5.8S und 5S rRNAs als Ladekontrollen. Es wurden jeweils 10 μ g RNA geladen. **D)** Normalisierung der Signalintensitäten von CcsR1 und UpsM auf die der 5S rRNA. WT = Wildtyp, $\Delta cryB$ = kanamycinresistenter *cryB*-Knockout aus Hendrischk et al. (2007), $\Delta cryBSp$ = neuer *cryB*-Knockout mit Spectinomycinresistenz. $\Delta cryB pRKcryB$ = Komplementationsstamm, $\Delta cryB pRK415$ = Leervektorkontrolle, $\Delta cryB pRKcryB W338F$ = Komplementation mit *CryB W338F* mit beeinträchtiger FAD-Reduktion.

Im Hinblick auf die Analyse der verschiedenen Komplementationsstämme mit CryB-Varianten wurde das Experiment erneut unter Einbezug der Stämme $\Delta cryB$ pRK*cryB* (Komplementation), $\Delta cryB$ pRK415 (Leervektorkontrolle) und $\Delta cryB$ pRK*cryB* W338F (beeinträchtigte FAD-Reduktion; Abschnitt 3.4.1) sowie des neuen Knockout-Stammes $\Delta cryB$ Sp durchgeführt. Dabei wurden nur die Zeitpunkte t_0 und t_{20} betrachtet. Bei plasmidhaltigen Stämmen wurde ab dem Animpfen der Übernachtskulturen kein Tetracyclin mehr hinzugefügt. Das Level von CcsR1 zum Zeitpunkt t_0 ist in beiden $\Delta cryB$ -Knockout-Stämmen leicht erhöht im Vergleich zum Wildtyp, die Induktion nach 20 Minuten 1O_2 -Stress ist vergleichbar, aber insgesamt schwach (Abbildung 3.34 C und D). Die Abundanz von CcsR1 in $\Delta cryB$ pRK*cryB* und $\Delta cryB$ pRK415 zum Zeitpunkt t_0 ist untereinander sowie mit dem Wildtyp auf gleichem Level. Die Stärke der Induktion in beiden Stämmen liegt ebenfalls im Bereich der anderen Stämme. Im Stamm $\Delta cryB$ pRK*cryB* W338F ist die Induktion am stärksten (1,6-fach). Neben CcsR1 wurde die Expression einer weiteren sRNA, UpsM (RSs0682), auf der gleichen Membran untersucht. UpsM wird bei Singulett-Sauerstoffstress prozessiert (Berghoff et al., 2009) und ist in der 5'-UTR des *division and cell wall* (Dcw) Genclusters lokalisiert (Weber et al., 2016). Es wurde das 206 nt lange Primärtranskript betrachtet. Im Zusammenhang mit $\Delta cryB$ hatte es in *microarray*-Experimenten ein im Vergleich zum Wildtyp geringeres Level zum Zeitpunkt t_{20} gezeigt. In allen untersuchten Stämmen findet ein leichter Rückgang des Transkriptlevels nach 20 Minuten Singulett-Sauerstoffstress statt (Abbildung 3.34 D). Alle Startlevel (Zeitpunkt t_0) liegen geringfügig unterhalb des Levels im Wildtyp. Die Experimente wurden einmal durchgeführt.

3.7.2 Expression von *puf* und *puc*

Neben den sRNAs CcsR1 und UpsM wurde die Expression der *puf*- und *puc*-mRNAs unter Singulett-Sauerstoffstress im Wildtyp und in $\Delta cryB$ sowie der Komplementation und der Leervektorkontrolle untersucht. Die Stämme wurden wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben kultiviert und für 20 Minuten 1O_2 -Stress ausgesetzt. Die Ausgangslevel von *puf* sind in $\Delta cryB$ und $\Delta cryB$ Sp leicht erhöht im Vergleich zum Wildtyp (1,3- bzw. 1,5-fach), ebenso verhält es sich für *puc* (1,4- bzw. 1,6-fach). In den drei Stämmen zeigt sich ein leichter Rückgang der *puf*-Abundanz nach 20 Minuten 1O_2 -Stress (Abbildung 3.35). Bei *puc* ist

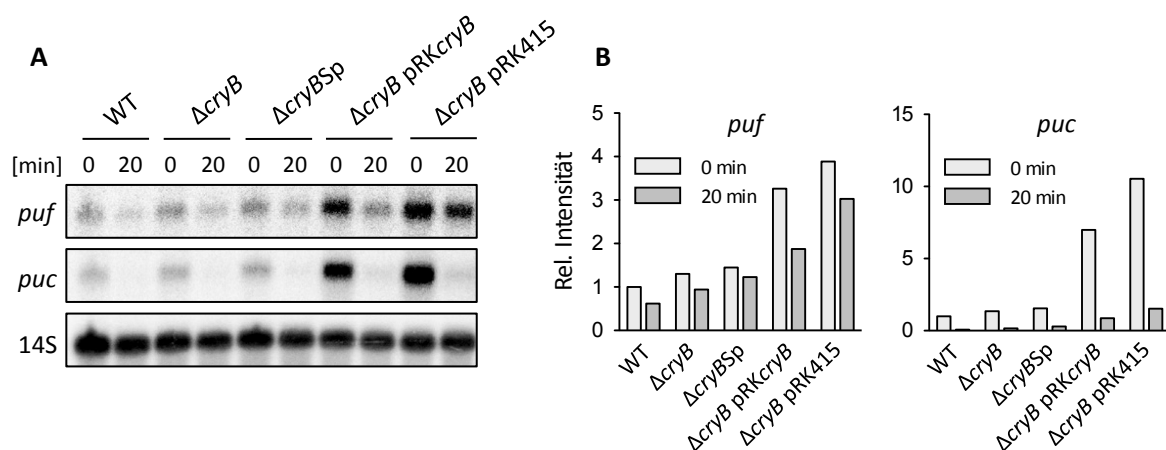


Abbildung 3.35: Northern-Blot-Analyse der Expression von *puf* und *puc* in verschiedenen *R. sphaeroides*-Stämmen nach photooxidativem 1O_2 -Stress. **A)** Hybridisierung mit Sonden gegen *pufBA* und *pucBA* (500-kb-Fragmente) sowie die 14S rRNA als Ladekontrolle. Es wurden jeweils 10 μ g RNA geladen. **B)** Normalisierung der Signalintensitäten von *puf* und *puc* auf die der 14S rRNA. WT = Wildtyp, $\Delta cryB$ = kanamycinresistenter *cryB*-Knockout aus Hendrischk et al. (2007), $\Delta cryB$ Sp = neuer *cryB*-Knockout mit Spectinomycinresistenz. $\Delta cryB$ pRK*cryB* = Komplementationsstamm, $\Delta cryB$ pRK415 = Leervektorkontrolle.

dieser Rückgang in den drei Stämmen sehr viel stärker (um 80–90 % weniger als bei t_0). Interessanterweise sind die Level beider Transkripte in den beiden plasmidhaltenden Stämmen bereits zum Zeitpunkt t_0 deutlich erhöht im Vergleich zu den Stämmen ohne Plasmid. Das *puf*-Level in $\Delta cryB$ pRK*cryB* liegt um das 3,3-Fache höher als im Wildtyp, bei $\Delta cryB$ pRK415 um das 3,9-Fache. Bei *puc* sind die Level in diesen beiden Stämmen sogar um das 7- bzw. 10-Fache erhöht. Der Grad der Herabregulierung nach 20 Minuten Stress ist bei *puf* in $\Delta cryB$ pRK*cryB* vergleichbar mit dem des Wildtyps (ca. 40 % weniger als zu t_0) und liegt bei $\Delta cryB$ pRK415 (ca. 22 % weniger) zwischen den beiden $\Delta cryB$ -Knockout-Stämmen. Die Herabregulierung des *puc*-Levels in beiden plasmidhaltenden Stämmen (87 bzw. 85 %) ist vergleichbar stark wie in den drei Stämmen ohne Plasmid. Insgesamt sind die Unterschiede zwischen den vergleichbaren Stämmen (mit und ohne Plasmid) gering. Das Experiment wurde nur einmal durchgeführt.

3.8 Kristallisation von CryB

Da die Kristallisation von CryB, die zur Aufklärung der 3D-Struktur geführt hatte (Geisselbrecht et al., 2012), schwer zu reproduzieren war (Geisselbrecht, 2013), wurde versucht, das Protein unter veränderten Bedingungen zu kristallisieren. Eine erneute Kristallisation hatte vorrangig das Ziel, neben der vorhandenen Dunkelstruktur eine weitere Struktur zu generieren, bei der das Protein im lichtreduzierten Zustand vorliegt, um mögliche Konformationsänderungen feststellen zu können (vgl. Abschnitt 3.8.1). Die Expression erfolgte in Rosetta(DE3) und in BL21(DE3)pLysS, die Aufreinigung über Ni-NTA-, Heparin-Chromatographie und Gelfiltration. Das aufkonzentrierte Protein wurde anschließend in der AG Essen (Philipps-Universität Marburg) unter verschiedenen Bedingungen kristallisiert. Dies geschah einmal durch Yann Geisselbrecht und ein weiteres Mal durch Ankan Banerjee. Keine der getesteten Bedingungen führte jedoch zu einem auswertbaren Datensatz, da im Falle einer Kristallbildung keine ausreichende Streuung vorhanden war.

3.8.1 CryB-Reduktion mit Natriumdithionit für die Kristallisation

Die Anzucht der Kristalle für die Strukturlösung von CryB (Geisselbrecht et al., 2012) wurde im Dunkeln durchgeführt. Dabei liegt das FAD in seiner oxidierten Form vor. In dieser Arbeit sollte getestet werden, ob eine Kristallisation unter reduzierenden Bedingungen möglich ist, um eventuelle Konformationsänderungen im aktiven Zentrum detektieren zu können. Da eine permanente Belichtung während des Kristallwachstums schwierig ist, wurde getestet, ob Natriumdithionit (NaD) als stärkeres Reduktionsmittel anstelle des normalerweise verwendeten Dithiothreitol (DTT) in der Lage ist, ohne Lichtzufuhr durch rein chemische Reduktion das FAD von CryB zu reduzieren sowie ein längeres Verweilen im reduzierten Zustand zu ermöglichen. Die Aufreinigung und Reduktion wurde in Zusammenarbeit mit Yann Geisselbrecht (AG Essen, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt. Für die Experimente wurde CryB in Rosetta(DE3) exprimiert und nach zwei Aufreinigungsschritten (Ni-NTA- und Heparin-Chromatographie) verwendet. Zunächst wurden Absorptionsspektren des Proteins ohne Behandlung mit Reduktionsmitteln im Dunkeln gemessen. Anschließend wurde die gleiche Menge Protein mit jeweils 10 mM DTT oder NaD versetzt und sofort erneut ein Spektrum im Dunkeln gemessen. Im Gegensatz zur DTT-behandelten Probe entstand bei Zugabe von NaD ein starker Absorptionsabfall unterhalb von ca. 380 nm. Der charakteristische Kurvenverlauf von CryB mit oxidiertem FAD ist dennoch erkennbar. Um zu testen, ob NaD in der Lage ist, ohne Lichtbestrahlung eine Reduktion des FAD zu bewirken, wurde die Probe für 10 Minuten nach NaD-Zugabe in Dunkelheit gelassen und erneut ein Spektrum gemessen. Es

zeigte sich keine Veränderung des Kurvenverlaufs, der auf eine beginnende FAD-Reduktion hindeuten würde. Es folgten die Bestrahlung der Proben mit Blaulicht und Spektrenmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Belichtung. Die einsetzende Reduktion des FAD ist bei der DTT-behandelten Probe nach 5 Minuten Belichtung erkennbar, wobei es insgesamt 30 Minuten dauert, bis eine vollständige Reduktion erreicht ist, die durch das Absinken der vier Absorptionsmaxima des oxidierten Zustandes erkennbar ist (Geisselbrecht et al., 2012). Im Gegensatz zur Reduktion mit DTT ist eine vollständige Reduktion durch NaD bereits nach 5 Minuten festzustellen (Abbildung 3.36). Die Konvertierung verläuft somit deutlich schneller als durch DTT. Um zu überprüfen, ob Licht nur zur Herstellung des reduzierten Zustandes nötig ist oder auch zu dessen Aufrechterhaltung, d. h. ob eine Rückoxidation bei Abwesenheit des Lichts stattfindet, wurde die Probe nach weiteren 80 Minuten in Dunkelheit erneut gemessen. Es zeigte sich fast keine Veränderung der Absorption im Vergleich zu der 5 Minuten nach NaD-Zugabe gemessenen, was darauf schließen lässt, dass sich FAD nach diesem Zeitraum immer noch im reduzierten Zustand befindet. Die gleiche Probe wurde für weitere 40 Stunden bei 4 °C in Dunkelheit aufbewahrt und erneut ein Spektrum gemessen. Der Kurvenverlauf entsprach nach diesem Zeitraum ohne Belichtung wieder dem der Kurve vor der Reduktion und wies die Maxima des oxidierten FAD auf. Somit ist unter den gewählten Bedingungen keine dauerhafte Erhaltung des FAD im reduzierten Zustand möglich.

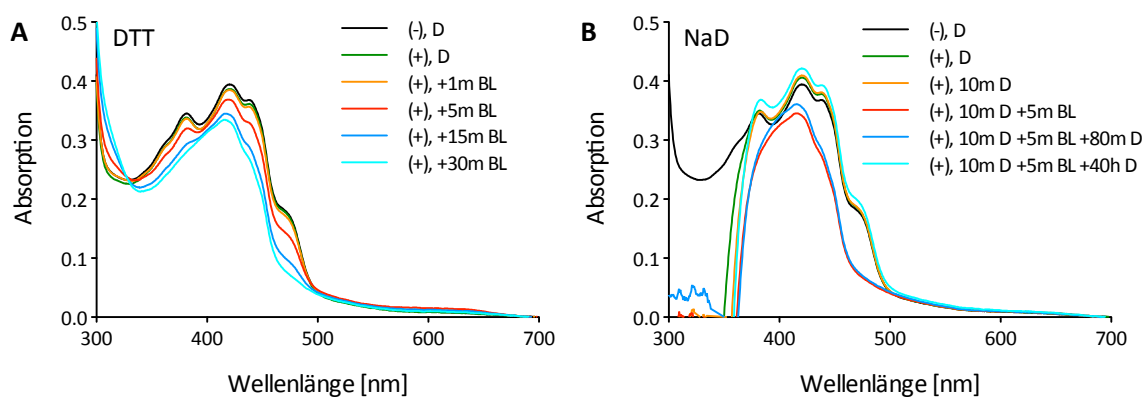


Abbildung 3.36: Absorptionsspektren von CryB vor und nach Reduktion durch **A)** Dithiothreitol (DTT) und **B)** Natriumdithionit (NaD), normalisiert auf 700 nm. 18 μ M CryB wurden mit jeweils 10 mM DTT oder NaD versetzt und mit Blaulicht (450 nm) bestrahlt. Absorptionsspektren wurden zunächst vor Zugabe der Reduktionsmittel gegen Puffer gemessen (schwarz) und im Anschluss gegen Puffer mit dem jeweiligen Reduktionsmittel zu verschiedenen Zeitpunkten im Dunkeln (D) und nach Blaulichtbestrahlung (BL).

3.9 Interaktionsanalyse durch *in vivo* Protein-pulldown

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden bereits Studien zur Interaktion von CryB mit anderen Proteinen durchgeführt. Ausführlich wurde dabei die Interaktion mit dem Blaulicht-Photorezeptor AppA untersucht (Metz et al., 2012a). Darüber hinaus gab es Studien zur Identifizierung möglicher weiterer Interaktionspartner (Teich, 2011; Breitenbach, 2012). In dieser Arbeit wurde ein *in vivo pulldown* durchgeführt, um die Identifizierung von Interaktionspartnern erneut aufzugreifen.

Für den *in vivo pulldown* wurde ein *R. sphaeroides*-Stamm verwendet, der CryB durch das Plasmid pRKpufcryB überexprimiert. Bei diesem auf pRK415 basierenden Plasmid ist der starke Promotor des puf-Operons (431 bp) der cryB-CDS vorangeschaltet (Konzer, 2008). Die CDS verfügt außerdem über

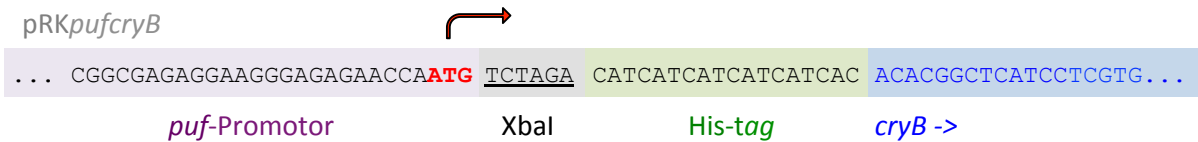


Abbildung 3.37: Ausschnitt aus pRKpufcryB zur Überexpression von His-CryB in *R. sphaeroides*. Das Plasmid enthält den *upstream* des *puf*-Operons gelegenen Abschnitt (431 bp), in dem der *puf*-Promotor liegt, sowie das Startcodon des ersten Gens des *puf*-Operons. Das Startcodon von *cryB* wurde entfernt. Abbildung erstellt nach Informationen aus Konzer (2008).

eine direkte Fusion mit den Codons für ein Hexahistidin-*tag* (Abbildung 3.37). Das Konstrukt wurde in dieser Arbeit ebenfalls für Photoreaktivierungsexperimente verwendet (Abbildungen 3.4 und 3.16 A).

Das resultierende Protein weist ein theoretisches Molekulargewicht von 59,1 kDa auf (ExpPASy; Gastegger et al., 2003). Dieses Konstrukt kann sowohl zur präparativen Aufreinigung von CryB aus *R. sphaeroides* über Ni-NTA-Affinitätschromatographie als auch wie in diesem Fall zur analytischen Aufreinigung zwecks der Identifikation gebundener Interaktionspartner verwendet werden. Dazu wurde parallel ein Stamm mit dem leeren Plasmid (pRK415 oder pRKpuf) mitgeführt, um unspezifisch an die Ni-NTA-Matrix gebundene Proteine von den durch die Anwesenheit von CryB mitaufgereinigten Proteinen unterscheiden zu können. Das Experiment wurde sowohl im Wildtyp 2.4.1 pRKpufcryB als auch im Δ *cryB*-Knockout-Hintergrund (Δ *cryB* pRKpufcryB) sowie mit Leervektor-Kontrollstämmen durchgeführt. Die Kulturen wurden in einem Volumen von 400 ml unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert. Das Zelllysat wurde über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt und die Proteinzusammensetzung zunächst durch SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3.38).

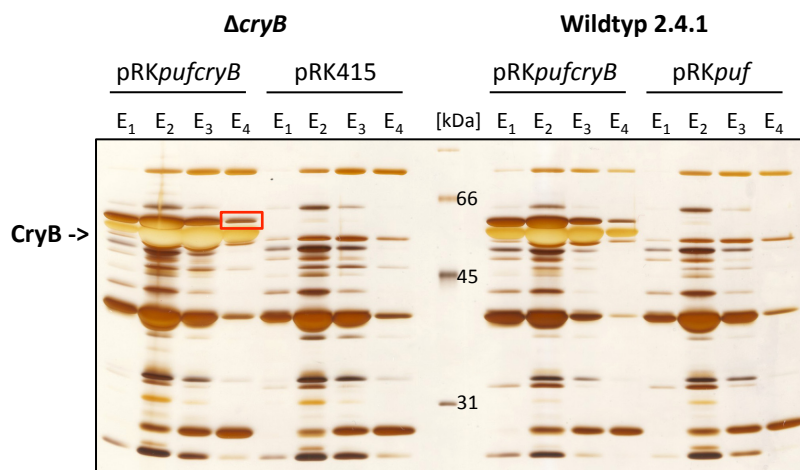


Abbildung 3.38: Silbergefärbtes SDS-PAA-Gel der Elutionsfraktionen des *in vivo pulldowns* durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit den *R. sphaeroides*-Stämmen Δ *cryB* pRKpufcryB (Überexpression im Δ *cryB*-Knockout) und 2.4.1 pRKpufcryB (Überexpression im Wildtyp) sowie der Leervektorkontrollen Δ *cryB* pRK415 und Wildtyp pRKpuf. Es wurden jeweils 15 μ l der Elutionsfraktionen E₁–E₄ aufgetragen. Die Bande, die für die massenspektrometrische Analyse ausgeschnitten wurde, ist markiert.

In den Elutionsfraktionen E₁–E₄ ist in beiden CryB-überexprimierenden Stämmen das Vorhandensein von CryB bei ca. 60 kDa zu erkennen (vgl. Abbildung 3.2 A). Direkt darüber befindet sich in beiden Fällen eine deutliche Bande, die nur in den Stämmen mit CryB, nicht aber in den Leervektorkontrollen auftritt. Hierbei kann es sich um einen potenziellen Interaktionspartner von CryB handeln. Alle ande-

ren sichtbaren Banden sind sowohl in den Stämmen mit pRKpufcryB als auch mit den leeren Plasmiden präsent und stellen unspezifisch an die Matrix gebundene Proteine dar.

Um zu überprüfen, ob die zusätzliche Bande oberhalb von CryB nur in den Stämmen mit CryB auftritt und um die Identität von CryB zu verifizieren, wurde ein Western Blot sowohl mit CryB- als auch His-tag-spezifischem Antikörper durchgeführt. Es wurden Proben der E₃-Fraktionen des pulldowns mit Wildtyp-Hintergrund verwendet. Als Positivkontrolle wurde in *E. coli* exprimiertes, aufgereinigtes His-CryB verwendet. Bei 2.4.1 pRKpufcryB sind mit beiden Antikörpern Signale zu erkennen (Abbildung 3.39). Die Signale der Positivkontrollen befinden sich leicht oberhalb der des in *R. sphaeroides* exprimierten CryB, die beiden Proteine weisen einen unterschiedlichen Abstand zum jeweiligen His-tag und ein leicht differierendes theoretisches Molekulargewicht (60,32 bzw. 59,1 kDa) auf. Im Leervektor-Kontrollstamm 2.4.1 pRKpuf ist weder durch den CryB- noch durch den His-tag-spezifischen Antikörper ein Signal detektierbar. Auffällig ist die zusätzliche Bande etwas oberhalb des sehr starken Hauptsignals der Elutionsfraktion von 2.4.1 pRKpufcryB bei der Detektion durch den CryB-Antikörper. Dies deutet auf ein zusätzliches Vorhandensein von CryB in der Bande oberhalb der Haupt-CryB-Bande hin.

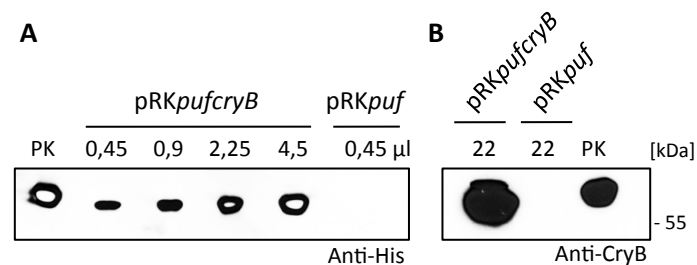


Abbildung 3.39: Western Blot von Elutionsfraktionen des *in vivo* pulldowns mit *R. sphaeroides* 2.4.1 pRKpufcryB (Überexpression im Wildtyp) sowie 2.4.1 pRKpuf (Leervektorkontrolle im Wildtyp). **A)** Detektion mit Anti-Polyhistidin-Antikörper. **B)** Detektion mit Anti-CryB-Antikörper. PK = Positivkontrolle (0,75 µg His-CryB, aufgereinigt aus *E. coli*). Es wurden verschiedene Mengen (Angaben in µl) der jeweiligen E₃-Elutionsfraktion (vgl. Abbildung 3.38) aufgetragen. Beide Abbildungen stammen von der gleichen Membran.

Um abschließend die Identität des Proteins in dieser Bande zu klären, wurde sie aus dem silbergefärbten Gel (markiert in Abbildung 3.38) ausgeschnitten und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Dies geschah in der AG Proteinanalytik von Prof. Dr. Lochnit (Biochemisches Institut, Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen). Dabei wurde ein Gemisch aus zwei Proteinen identifiziert, das „molecular chaperone GroEL [*Rhodobacter*]“ (57,9 kDa) sowie die „deoxyribopyrimidine photolyase [*Rhodobacter sphaeroides*]“ (58 kDa). Da die Massenspektrometrie keine quantitative Methode ist, lässt sich nicht bestimmen, zu welchen Anteilen beide Proteine vorhanden sind. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass es sich hauptsächlich um das Chaperon handelt und dieses stark mit CryB assoziiert ist, da CryB auch im Western Blot in der entsprechenden Bande detektierbar ist.

3.10 Interaktionsanalysen mit CryB und AppA

Die Interaktion von AppA mit CryB wurde bereits durch Metz et al. (2012a) untersucht. In dieser Arbeit wurden Experimente zur Vorbereitung auf eine Co-Kristallisation von CryB und AppA durchgeführt. Zur Ermittlung geeigneter Bedingungen wurden zunächst Interaktionsexperimente durch Gelfiltration (Abschnitt 3.10.2) sowie durch *Small Angle X-ray Scattering* (SAXS) durchgeführt und schließlich ein Versuch der Co-Kristallisation selbst (Abschnitte 3.10.3 und 3.10.4). An dieser Stelle wird zunächst das Protein

AppA und dessen Aufreinigung beschrieben. Die Eigenschaften und die Aufreinigung von CryB wurden bereits an anderer Stelle (Abschnitt 3.1.2) vorgestellt.

3.10.1 AppA

Das *appa*-Gen (RSP_1565) von *R. sphaeroides* 2.4.1 besteht aus 1353 Basenpaaren und kodiert ein Protein von 450 Aminosäuren (UniProt-Nummer Q3J677; UniProt, 2015). In dieser Arbeit wurde eine N-terminal verkürzte Version, AppA Δ N, verwendet, bei der die AS 5–190 entfernt wurden (Han, 2006). Dieser Version fehlt die FAD-bindende BLUF-Domäne (AS 16–107), sie besteht aus der Häm-bindenden SCHIC-Domäne von AS 274–393, der C-terminalen cysteinreichen Region (AS 397–450) sowie dem zentralen Verbindungsstück zur BLUF-Domäne (Han et al., 2007; Moskvina et al., 2007). Das theoretische Molekulargewicht beträgt 28,29 kDa (ExpASY; Gasteiger et al., 2003). AppA Δ N wird vom Vektor pGEX-4T-1 als N-terminales Fusionsprotein mit einem Glutathion-S-Transferase-*tag* (GST-*tag*) exprimiert. Die GST besteht aus 218 Aminosäuren (UniProt-Nummer P08515) und hat ein Molekulargewicht von 26 kDa (Smith und Johnson, 1988). Somit hat GST-AppA Δ N ein Molekulargewicht von 54,29 kDa und eine ähnliche Größe wie das verwendete His-CryB (60,32 kDa, Abschnitt 3.1.1). Die N-terminal verkürzte Version von AppA ist ausreichend für eine Interaktion mit CryB (Metz et al., 2012a) und wird aufgrund einer besseren Löslichkeit im Vergleich zum vollständigen AppA (Han, 2006) verwendet.

AppA wurde in dieser Arbeit für verschiedene Zwecke aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte in zwei Schritten zunächst über das GST-*tag* durch Glutathion-Affinitätschromatographie und anschließend über Gelfiltration. Im Falle der analytischen Gelfiltration (Abschnitt 3.10.2) stellt diese keinen Aufreinigungsschritt zur Gewinnung von reinem Protein dar, sondern dient der Analyse der Interaktion mit CryB. GST-AppA Δ N erscheint sowohl nach der GST-Aufreinigung als auch nach der Gelfiltration in bis zu drei direkt übereinanderliegenden Banden zwischen 45 und 66 kDa. Alle drei Banden werden durch den spezifischen Antikörper gegen AppA Δ N detektiert (Abbildung 3.40 A und B). Das Erscheinen einer Mehrfachbande wurde bereits zuvor beobachtet und liegt wahrscheinlich an der teilweisen Degradation des Proteins (Han, 2006). Im Chromatogramm der Gelfiltration erscheint ein kleiner Peak sowie eine Schulter vor dem Hauptpeak (Anhang Abbildung 9.2 B). Das Absorptionsspektrum des aufgereinigten Proteins

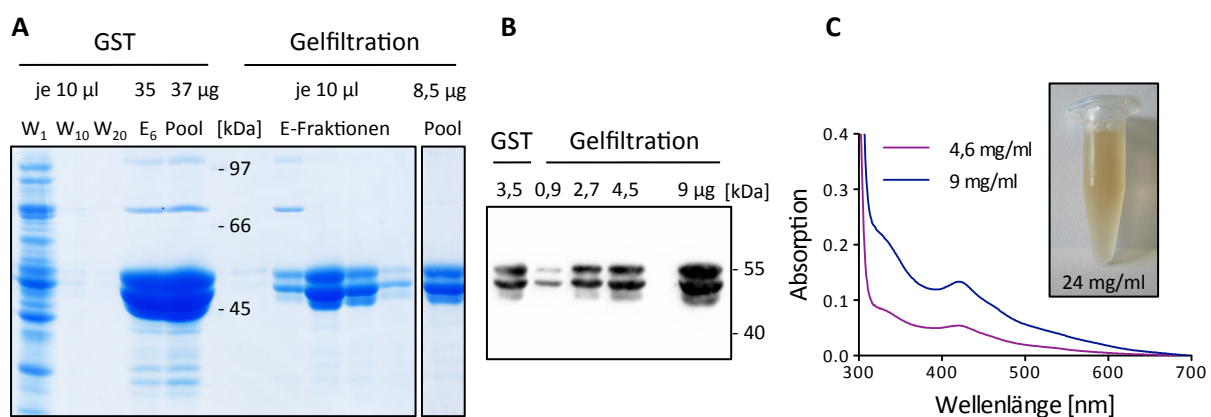


Abbildung 3.40: Aufreinigung von AppA Δ N mit GST-*tag*. **A)** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel mit Fraktionen der GST-Aufreinigung und Gelfiltration. **B)** Western Blot gegen AppA Δ N einer Elutionsfraktion nach GST-Aufreinigung sowie eines Pools nach der Gelfiltration (verschiedene Mengen). Angaben in μ g. **C)** Absorptionsspektren von AppA Δ N aus zwei verschiedenen Elutionsfraktionen direkt nach GST-Aufreinigung. Kleines Bild: AppA (24 mg/ml) nach GST-Aufreinigung und Konzentration des Pools der Elutionsfraktionen. Normalisiert auf 700 nm.

bildet ein Maximum bei 420 nm aus. Dieses Maximum ist nur bei sehr hohen Konzentrationen sichtbar und spiegelt sich auch in der rosa Färbung des stark konzentrierten AppA Δ N wider (Abbildung 3.40 D). Es repräsentiert den Häm-Cofaktor der SCHIC-Domäne, der nach der Aufreinigung wahrscheinlich nur zu einem geringen Anteil gebunden ist (Han, 2006). Die Ausbeute von AppA nach GST-Aufreinigung betrug zwischen ca. 26 und 45 mg Protein je Liter Expressionskultur. Die Ausbeute hängt unter anderem von der Frische des Zellmaterials sowie der verwendeten Matrix ab. Es ist zu vermerken, dass das Protein nach diesem ersten Aufreinigungsschritt noch stark mit unspezifisch aufgereinigten Proteinen verunreinigt ist. Die Ausbeute nach der anschließenden Gelfiltration betrug durchschnittlich 13 mg (11–18 mg) je Liter Expressionskultur. In hohen Konzentrationen fällt das Protein nach einem Tag stark aus, bei geringeren Konzentrationen (1–2 mg/ml) kann es für mehrere Tage gelagert werden.

3.10.2 Analytische Gelfiltration

Bilden Proteine einen Komplex, so eluiert dieser aufgrund seiner Größe zu einem früheren Zeitpunkt von der Gelfiltrationssäule als die einzelnen Proteine. Zunächst wurden die beiden Proteine CryB und AppA separat durch Ni-NTA- bzw. Glutathion-Affinitätschromatographie aufgereinigt und in einem molaren Verhältnis von etwa 1:1 gemischt. Das Proteingemisch wurde unterschiedlichen Behandlungen unterzogen und auf zwei verschiedenen Gelfiltrationssäulen analysiert. Für alle Versuche wurde Protein aus insgesamt zwei unabhängigen Aufreinigungen verwendet. Das Eluat wurden à 1 ml fraktioniert, die Fraktionen sind als ml Elutionsvolumen angegeben.

3.10.2.1 Dunkel vs. Licht

Zunächst wurde die präparative Säule (Säulenvolumen 120 ml) und der Tris-Puffer SEC_T (pH 8,3) verwendet. Die Proteine wurden nach der individuellen Aufreinigung in SEC_T-Puffer dialysiert und anschließend zusammengefügt. Das Proteingemisch (70 μ M Gesamtprotein, d. h. jeweils ca. 35 μ M) wurde zwei verschiedenen Behandlungen unterzogen: a) Inkubation im Dunkeln für 45 Minuten und b) Zugabe von 25 mM DTT und Inkubation im Licht (50 μ mol/m²/s) für 45 Minuten, jeweils auf Eis. Der Gelfiltrationslauf erfolgte in beiden Fällen bei Raumlicht, die Flussrate betrug 1 ml/min. Proben aus etwa jeder zweiten Elutionsfraktion wurden anschließend auf ein SDS-PAA-Gel aufgetragen, um die Identität der Peaks des Chromatogramms zu identifizieren. Im ersten Lauf mit vorheriger Probeninkubation im Dunkeln sind vier Peaks (Fraktionen 45, 52, 59, 70) erkennbar (Abbildung 3.41 A). AppA eluiert früher als CryB und erstreckt sich über einen weiteren Bereich von mehr als 25 ml. Dabei bilden sich im Chromatogramm drei Peaks, die AppA enthalten. CryB eluiert später und bildet nur einen Peak einer Breite von etwa zehn Fraktionen. In Fraktion 56 findet eine Überschneidung statt und beide Proteine sind anwesend. In Peak 45 sind weitere Produkte höheren Molekulargewichts und in späteren Fraktionen (ab 59) Produkte niedrigeren Molekulargewichts vorhanden. Eine Komplexbildung von CryB und AppA, durch die beide Proteine gemeinsam in einer frühen Fraktion vorhanden wären, ist nicht erkennbar. Im zweiten Lauf mit vorheriger Probenbehandlung durch Licht und DTT eluiert AppA ebenfalls vor CryB, diesmal bildet der Großteil jedoch einen sehr viel deutlicher ausgeprägten Peak (67) (Abbildung 3.41 B). CryB eluiert wieder in einem Bereich von etwa zehn Fraktionen und überschneidet sich leicht mit den AppA-Fraktionen. Diesmal ist in Fraktion 39 eine sehr schwache Bande auf Höhe von CryB erkennbar, nicht jedoch für AppA. Bei Peak 53 handelt es sich hauptsächlich um Proteine höheren Molekulargewichts. Insgesamt sind beim zweiten Lauf mehr unspezifische Banden vorhanden.

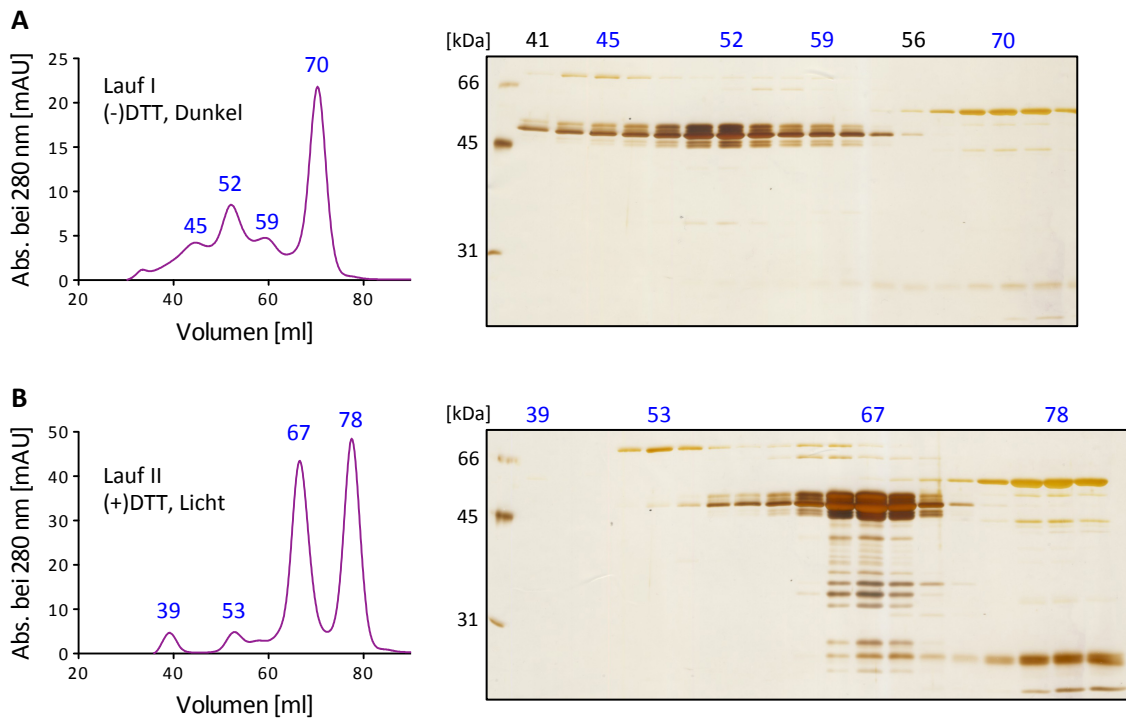


Abbildung 3.41: Chromatogramme der Gelfiltration eines 1:1 AppA-CryB-Gemisches in Tris-Puffer (SEC_T, pH 8,3) durch die HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade Säule (cv 120 ml) und silbergefärbte SDS-PAA-Gele mit je 40 μ l der Elutionsfraktionen. Die Peakfraktionen (ml Elutionsvolumen) der Chromatogramme sind bei den Gelen hervorgehoben (blau). **A)** Inkubation des Proteingemisches vor dem Lauf im Dunkeln für 45 Minuten. **B)** Inkubation des Proteingemisches vor dem Lauf im Licht für 45 Minuten ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) mit 25 mM DTT.

3.10.2.2 Tris- vs. HEPES-Puffer

Im zweiten Versuch wurden zwei verschiedene Puffer verglichen, außerdem wurden ausgewählte Elutionsfraktionen durch Western Blot untersucht. Die Inkubation der Proteinmischung (ca. 80 μM Gesamtprotein, d. h. jeweils ca. 40 μM) erfolgte diesmal ohne vorherige Dialyse direkt nach den Aufreinigungen im Dunkeln bei 4 °C über Nacht. Der erste Lauf erfolgte mit Tris-Puffer SEC_T (pH 8,3), der zweite mit HEPES-Puffer SEC_H (pH 7,5), jeweils bei einer Flussrate von 1 ml/min. Der Puffer SEC_H wurde bereits für Thermophorese-Experimente verwendet (Metz et al., 2012a). Diesmal wurden die Fraktionen nicht durchgängig, sondern nur die Peakfraktionen der beiden Gelfiltrationsläufe auf ein SDS-PAA-Gel aufgetragen. Die Peakfraktionen von Lauf II (SEC_H-Puffer) wurden für den Western Blot verwendet. Außerdem wurden die separaten Proteine und das Gemisch vor dem Lauf als Referenz aufgetragen. Die Elutionsprofile beider Läufe sehen fast identisch aus. Abbildung 3.42 A zeigt exemplarisch das Profil von Lauf II. Es sind mehrere kleine Peaks zu frühen Elutionszeitpunkten sowie zwei spätere Hauptpeaks zu erkennen. Bei Peak 67 beider Läufe handelt es sich um AppA. Dieses eluiert auch in den Fraktionen der beiden vorangehenden Peaks (Abbildung 3.42 B). CryB ist fast ausschließlich in den Fraktionen des jeweils letzten Peaks (78 bzw. 79) zu sehen. In den Fraktionen des jeweils ersten Peaks (41) ist bei beiden Läufen eine sehr schwache Bande von CryB zu erkennen und eine noch schwächere Bande der Größe von AppA. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Protein eines Komplexes, der aufgrund der Größe als erstes eluiert. Durch den Western Blot der Proben von Lauf II wurde die Anwesenheit von AppA im vorletzten Peak (67) sowie die von CryB im letzten (79) bestätigt. Beide Proteine sind auch jeweils in der Fraktion des vorangehenden Peaks zu detektieren (Abbildung 3.42 C). Beide Antikörper scheinen zu schwach,

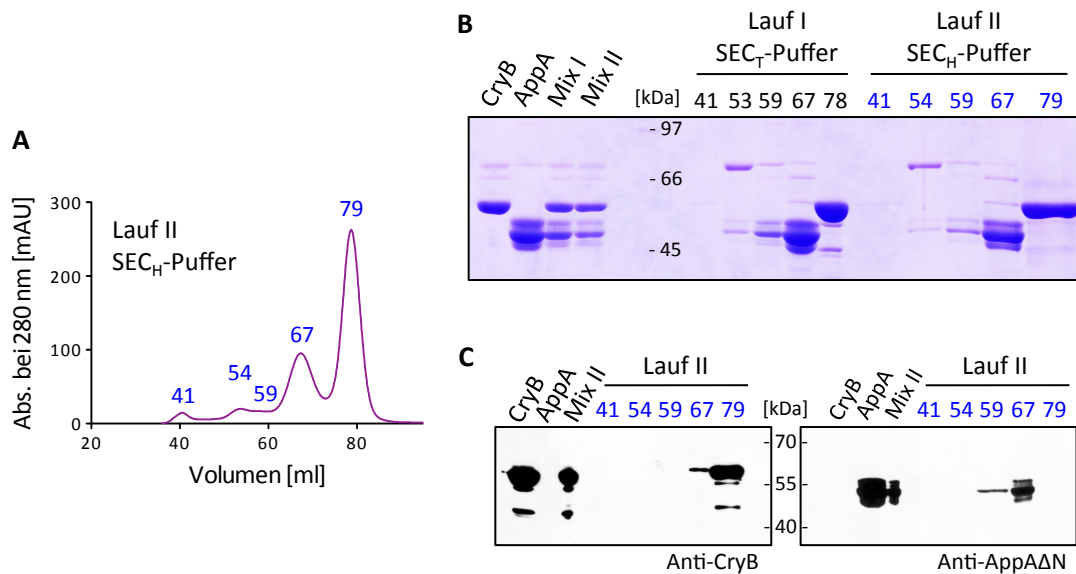


Abbildung 3.42: Gelfiltrationen eines 1:1 AppA-CryB-Gemisches in Tris-Puffer (SEC_T, pH 8,3, Lauf I) und HEPES-Puffer (SEC_H, pH 7,5, Lauf II) durch die HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade Säule (cv 120 ml). Das Gemisch wurde vor dem Lauf über Nacht im Dunkeln inkubiert. **A)** Chromatogramm von Lauf II (SEC_H Puffer). **B)** Coomassiegefärbtes SDS-PAA-Gel mit je 35 µl der Elutionsfraktionen der Peaks von Lauf I und II, sowie CryB (5 µg), AppA (6 µg) und CryB/AppA-Mix (5 µg). **C)** Western Blots der Peakfraktionen von Lauf II (jeweils 20 µl der Elutionsfraktionen 41, 54 und 59; jeweils 10 µl der Elutionsfraktionen 67 und 79), sowie CryB (5 µg), AppA (6 µg) und CryB/AppA-Mix (5 µg). Antikörper gegen CryB und AppAΔN.

um die im Coomassie-gefärbten Gel außerdem sichtbaren Banden, z. B. AppA in Fraktion 54, zu detektieren. So ist unklar, ob sich in der Fraktion des ersten Peaks (41) geringe Mengen AppA, neben der durch Coomassie-Färbung sichtbaren CryB-Bande, befinden.

3.10.2.3 Analytische Säule

Da die präparative Säule nicht für analytische Zwecke geeignet ist, wurden die Experimente auf einer analytischen Säule (Säulenvolumen 25 ml) wiederholt. Während der langen Zeit auf der Säule konnten sich zuvor entstandene Proteinkomplexe wieder trennen. Die Zeit des Laufs wird durch die kleinere Säule verkürzt. Es wurde der HEPES-Puffer SEC_H (pH 7,5) verwendet. Insgesamt wurden drei Läufe mit unterschiedlichen Flussraten (0,25 ml/min, 3 ml/min, 1 ml/min) durchgeführt. Die Probe wurden nach dem Mischen für 4 Tage bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Es wurden jeweils 200 µl (ca. 100 µM Gesamtprotein) für einen Lauf geladen. Alle Versuche lieferten vergleichbare Ergebnisse. Abbildung 3.43 zeigt das Chromatogramm sowie ein SDS-PAA-Gel ausgewählter Fraktionen des Laufs mit einer Flussrate von 0,25 ml/min. Wie bei den vorangegangenen Versuchen eluiert AppA vor CryB (Fraktion 12) und ist auch in dem vorausgehenden kleinen Peak vorhanden. CryB eluiert hauptsächlich in Fraktion 14.

In einem weiteren Versuch mit der analytischen Säule wurde mehr Protein geladen und dieses vorher gemeinsam aufkonzentriert, sodass die Proteine während des Konzentrationsvorgangs bereits vereinigt waren. Außerdem wurden 10 mM DTT eingesetzt. Beide Proteine eluierten wieder in getrennten Fraktionen (Daten nicht gezeigt). Durch die Verwendung der analytischen Säule konnte somit keine Verbesserung der Bedingungen erzielt werden, es ist keine Anwesenheit beider Proteine in einer frühen Fraktion erkennbar.

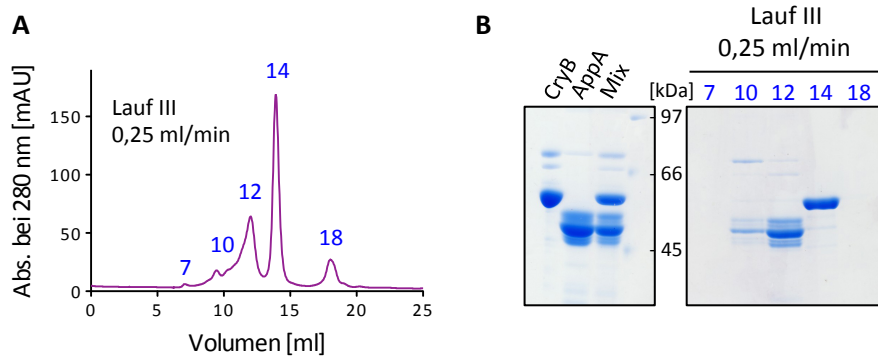


Abbildung 3.43: Gelfiltrationen eines 1:1 AppA-CryB-Gemisches in HEPES-Puffer (SEC_H, pH 7,5) durch die Superdex 200 HR 10/30 Säule (cv = 25 ml). Das Gemisch wurde vor dem Lauf für 4 Tage im Dunkeln inkubiert. **A)** Chromatogramm des 3. Laufs (Flussrate 0,25 ml/min) und **B)** Coomassie-gefärbtes SDS-PAA-Gel mit je 35 µl der Elutionsfraktionen der Peaks des 3. Laufs. Die Ausschnitte stammen von demselben Gel.

3.10.3 Small Angle X-ray Scattering (SAXS)

Small Angle X-ray Scattering ist eine Methode zur Auflösung struktureller Eigenschaften von Makromolekülen und kann zur Charakterisierung von Proteinen und Proteinkomplexen angewendet werden. Ein Vorteil von Strukturanalysen durch SAXS gegenüber der Kristallographie ist die Möglichkeit von Hochdurchsatzanalysen. Strukturmessungen werden in Lösung durchgeführt und die Probenvorbereitung ist wenig aufwändig. Durch SAXS-Daten können dreidimensionale Oberflächen (*envelopes*) abgegrenzt werden, die die Form eines Makromoleküls in Lösung in einer Auflösung von 15 Å oder besser darstellen. SAXS wird als Ergänzung oder Alternative zu anderen strukturellen Methoden wie der Kristallographie verwendet (Hura et al., 2009). In dieser Arbeit wurde die Interaktion von AppA und CryB vor der Kristallisation zunächst durch SAXS untersucht.

Die SAXS-Experimente wurden durch Ankan Banerjee (AG Essen, Philipps-Universität Marburg) an der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) in Grenoble (Frankreich) durchgeführt. Die Aufreinigung der Proteine geschah in Gießen, die Probenvorbereitung für die SAXS-Messungen (Mischung der Proteine und DTT-Zugabe) in Marburg.

Insgesamt wurden zwei Durchgänge aus unterschiedlichen Proteinaufreinigungen durchgeführt. Für den ersten Durchgang wurde AppA über Glutathion-Affinitätschromatographie und Gelfiltration aufgereinigt, wobei für letztere der Puffer SEC_H (pH 7,5) verwendet wurde. CryB wurde über Ni-NTA- und Heparin-Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend in SEC_H-Puffer dialysiert. Die Proteine wurden auf jeweils ca. 8,5 mg/ml aufkonzentriert. Die Messungen wurden sowohl mit als auch ohne DTT durchgeführt. Für den zweiten Durchgang wurde AppA auf gleiche Weise aufgereinigt, CryB wurde diesmal nach der Heparin-Aufreinigung ebenso über Gelfiltration mit SEC_H-Puffer weiter aufgereinigt. Die Proteine wurden auf 9 mg/ml (CryB) und 12 mg/ml (AppA) aufkonzentriert. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungsstufen in SEC_H-Puffer mit DTT (5 mM final) erstellt (CryB 4,5; 2,25; 1,125 und 0,5625 mg/ml und AppA 6; 3; 1,5 und 0,75 mg/ml). Proteine der Verdünnungen 4,5 mg/ml (CryB) und 6 mg/ml (AppA) wurden gemischt und davon drei 1:1 Verdünnungsstufen angesetzt (7; 3,5; 1,75 und 0,875 mg/ml).

Die Ergebnisse der SAXS-Messungen zeigen eine Komplexbildung von AppA mit CryB in einem Verhältnis von 1:1, wobei wahrscheinlich die C-Termini beider Proteine miteinander interagieren. Die genaue Interaktionsoberfläche konnte nicht bestimmt werden. DTT ist nicht notwendig für eine Interaktion

- sie ist in Abwesenheit von DTT sogar besser als in dessen Anwesenheit. Beide Proteine wurden auch einzeln betrachtet. CryB bildet Monomere, bei AppA ist eine konzentrationsabhängige Aggregation zu beobachten, es gibt möglicherweise eine Dimerisierung. Abbildung 3.44 zeigt ein Modell der Interaktion von AppA (mit GST-tag) und CryB. Das Modell stammt aus dem ersten Durchgang. Die Ergebnisse bestätigen, dass die Proteine unter den gewählten Bedingungen einen Komplex bilden und liefern einen ersten Einblick über die interagierenden Bereiche der Proteine.

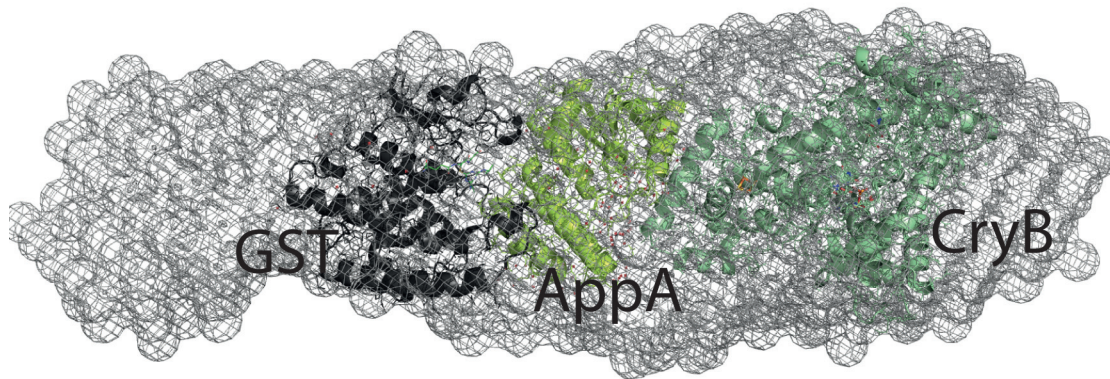


Abbildung 3.44: Modell der Interaktion eines AppA-CryB-Komplexes auf Grundlage der Daten der ersten *Small Angle X-ray Scattering* (SAXS)-Messung. GST = Glutathion-S-Transferase-tag. Erstellt von Ankan Banerjee (AG Essen, Philipps-Universität Marburg).

3.10.4 Co-Kristallisation

In dieser Arbeit wurde ein Versuch der Generierung eines Co-Kristalls von AppA und CryB unternommen. Wie bei den SAXS-Experimenten wurde auch die Co-Kristallisation in Zusammenarbeit mit Ankan Banerjee sowie dem Kristallisationslabor MarXtal (Philipps-Universität Marburg) durchgeführt. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte in Gießen, die Konzentration und Mischung sowie die Herstellung der Kristallisationsplatten in Marburg. CryB und AppA wurden über Ni-NTA- und Heparin- bzw. Glutathion-Affinitätschromatographie sowie beide im Anschluss über Gelfiltration mit SEC_H-Puffer, welcher auch für die SAXS-Experimente verwendet wurde, aufgereinigt. Die Proteine wurden direkt vor dem Zusammengeben auf ca. 21–23 mg/ml aufkonzentriert, anschließend 1:1 gemischt und auf eine Endkonzentration von 15 mg/ml eingestellt. Die Kristallisation erfolgt im Dunkeln. Leider brachte dieser Kristallisations-*screen* keine Kristalle hervor.

3.11 Lokalisation von CryB

Für die Untersuchung der zellulären Lokalisation von CryB durch Fluoreszenzmikroskopie wurde das für Lokalisationszwecke konstruierte Plasmid pBE16*ScryBe*CFP freundlicherweise durch Benjamin Eisenhardt zur Verfügung gestellt. Das Plasmid basiert auf pBBR1MCS-2 und enthält die CDS von *cryB* *upstream* der Sequenz für das *enhanced Cyan Fluorescent Protein* (eCFP), sodass eine C-terminale Fusion von CryB an eCFP entsteht. Die Sequenz ist unter der Kontrolle des Promotors der 16S rRNA (RSP_4352). Dieser bewirkt eine starke Expression der *downstream* gelegenen Sequenzen (Mank et al., 2012; Remes et al., 2015). Das Plasmid wurde in Wildtyp-Zellen von *R. sphaeroides* konjugiert. Die Aufnahme

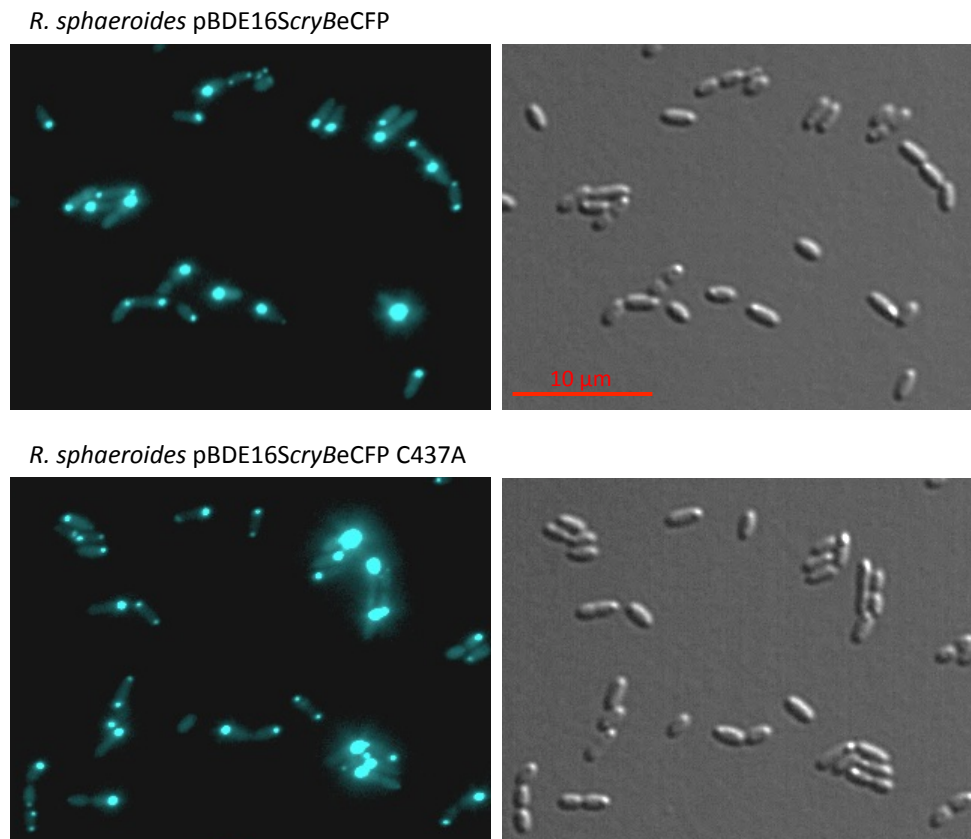


Abbildung 3.45: Lokalisation von CryB Wildtyp und CryB C437A (Kontrolle) in *R. sphaeroides*. Fluoreszenzmikroskopie- (links) und Differentialinterferenzkontrast-(DIC-)Aufnahmen (rechts).

der fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurde in Zusammenarbeit mit der AG Thormann (Justus-Liebig-Universität Gießen) durchgeführt. Bei den meisten Zellen konnte eine sehr starke Fluoreszenz an mindestens einem der Zellpole festgestellt werden (Abbildung 3.45), die sich deutlich von dem schwachen, gleichmäßig in der Zelle verteilten Hintergrundsignal abhob. Um herauszufinden, ob es sich bei dem Signal um eine Ansammlung von möglicherweise aggregiertem Protein oder um eine spezifische Pol-Lokalisation von CryB handelt, wurde die CryB-Variante C437A auf gleiche Weise als Kontrolle exprimiert (pBE16ScryBeCFP C437A). Bei dieser handelt es sich um eine unlösliche Version von CryB aufgrund des Austausches eines von vier Cysteinen, die das FeS-Cluster koordinieren (Abschnitt 3.4.6.2). CryB mit Veränderungen an an diesen Cysteinen kann nur in sehr geringer Menge in löslicher Form *in vivo* exprimiert werden (Abschnitt 3.4.6.3). CryB C437A löst genau wie Wildtyp-CryB eine starke Fluoreszenz des fusionierten eCFP an den Zellpolen aus (Abbildung 3.45). Diese Beobachtung deutet auf einen unspezifischen Lokalisationseffekt durch Aggregation hin. So konnte auf diese Weise nicht festgestellt werden, ob es einen Zellbereich mit spezifisch erhöhter CryB-Expression gibt. Durch Expression des Leervektor-Kontrollkonstruktes pBE16SeCFP entsteht ein gleichmäßiges Fluoreszenzsignal in der ganzen Zelle (Benjamin Eisenhardt, persönliche Kommunikation), wodurch ausgeschlossen ist, dass die Pol-Lokalisation ein durch das eCFP bedingter Effekt ist.

Um in Zukunft die Lokalisation auf eine andere Weise zu untersuchen, wurde ein Konstrukt zur chromosomalen Integration des Fluoreszenzproteins sfGFP (*superfolder Green Fluorescent Protein*) hergestellt. Es enthält die Sequenz des sfGFP, flankiert von den Sequenzbereichen *up-* und *downstream* des Stopcodons der *cryB*-CDS, im *suicide*-Vektor pNPTS138-R6KT. Der Vektor sowie das Plasmid pET21sfGFP

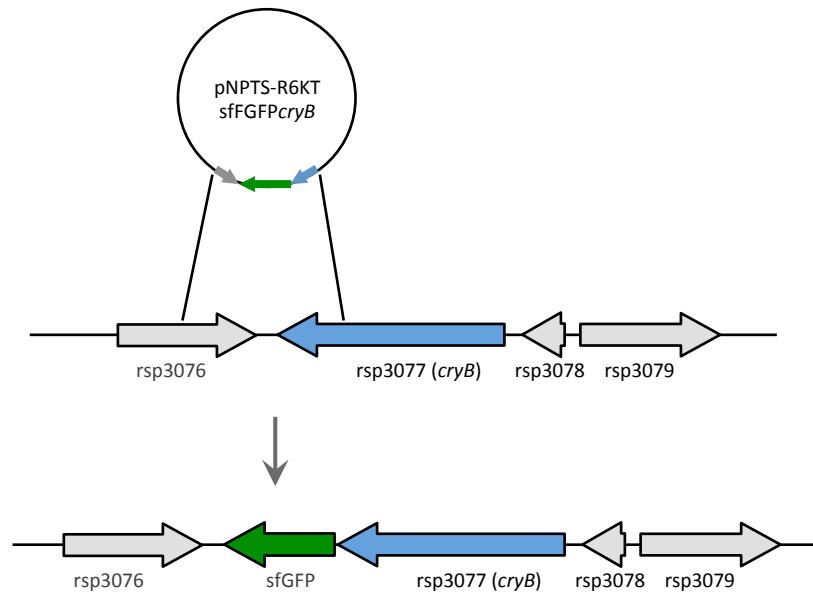


Abbildung 3.46: Schema der chromosomalen Integration der sfGFP-Sequenz *downstream* von *cryB*.

als Quelle für die Sequenz des sfGFP wurden von der AG Thormann zur Verfügung gestellt. Das Stop-codon von *cryB* wurde entfernt und durch einen *linker* aus drei Codons ersetzt. Durch Konjugation des resultierenden Plasmids pNPTS138-R6KT*cryB*sfGFP in *R. sphaeroides* 2.4.1 Wildtyp wird die Sequenz von sfGFP an die entsprechende Stelle ins Chromosom direkt *downstream* von *cryB* integriert. Es entsteht ein C-terminales Fusionsprotein, dessen Expression unter der Kontrolle des CryB-eigenen Promotors steht (Abbildung 3.46). Die Erstellung und Untersuchung dieses Stammes kann Aufschluss über die tatsächliche Lokalisation von CryB unter natürlichen Expressionsbedingungen geben.

4 Diskussion

4.1 Die (6-4)-Photolyaseaktivität von CryB

Dem Phänomen der Photoreaktivierung liegt die Aktivität von CPD- oder (6-4)-Photolyasen zugrunde. In *R. sphaeroides* wird dies durch die beiden CPF-Mitglieder PhrA und CryB deutlich; der Beitrag zur Photoreaktivierung von PhrA ist dabei größer als der von CryB (Hendrischk et al., 2007). Lange war unklar, ob CryB über eine Photolyaseaktivität verfügt. Frühere Experimente konnten weder eine CPD- noch eine (6-4)-Reparatur nachweisen (Hendrischk et al., 2009a; Geisselbrecht et al., 2012). Auch *Agrobacterium fabrum* verfügt über zwei CPF-Mitglieder, AfPhrA und AfPhrB. Beide tragen in vergleichbarer Weise wie RsPhrA bzw. RsCryB zur *in vivo* Photoreaktivierung bei. Eine klassische CPD-Photolyaseaktivität konnte für AfPhrA nachgewiesen werden und kurz darauf eine (6-4)-Photolyaseaktivität bei dem CryB-Homolog AfPhrB (Oberpichler et al., 2011; Zhang et al., 2013). Dies war das erste Beispiel einer prokaryotischen (6-4)-Photolyase und es wurde postuliert, dass alle Mitglieder der FeS-BCP-Gruppe, zu denen AfPhrB und RsCryB gehören, (6-4)-Photolyasen sind. Daher wurde die Frage nach einer Reparatur von (6-4)-Photoprodukten durch CryB erneut aufgegriffen.

4.1.1 Histidin H362 bei der *in vivo* Photoreaktivierung und *in vitro* Reparatur

Einen wichtigen initialen Indikator, dass eine (6-4)-Photolyaseaktivität vorliegen könnte, lieferte die *in vivo* Untersuchung der CryB-Mutante H362A. Dieses Histidin entspricht einem von zwei in eukaryotischen (6-4)-Photolyasen hochkonservierten Histidinen des aktiven Zentrums, die essenziell für die DNA-Reparatur sind. Es steht in direktem Kontakt mit dem (6-4)-Schaden und dient wahrscheinlich als Protonendonator für die Reparaturreaktion (Hitomi et al., 2001; Schleicher et al., 2007; Maul et al., 2008; Hitomi et al., 2009; Li et al., 2010; Yamamoto et al., 2017). CryB H362A wird sowohl *in vivo* als auch *in vitro* intakt exprimiert, weist jedoch keinerlei Photoreaktivierungsaktivität auf (Abschnitt 3.3.1). Dies war ein klarer Hinweis auf eine spezifische (6-4)-Reparatur. Es handelt sich um die einzige der in dieser Arbeit untersuchten Aminosäureaustauschvarianten, die intakt exprimiert wird, aber *in vivo* nicht mehr funktionell ist (siehe Abbildung 4.1). CryB H362A wurde daraufhin auch als Negativkontrolle in dem in Abschnitt 4.1.3 diskutierten *in vitro* Reparaturassay eingesetzt – es zeigte sich wie zu erwarten keine Reparaturaktivität (von Zadow et al., 2016). Das FAD lässt sich, wie im Wildtyp-Protein, bei der dem Experiment vorangehenden Photoreduktion vollständig reduzieren. Dies ist auch bei entsprechenden Histidin-Mutanten anderer Organismen der Fall (Schleicher et al., 2007). Die funktionierende Reduktion unterstützt die Beobachtung, dass die ausbleibende Reparatur durch CryB H362A an dem fehlenden, für (6-4)-Photolyasen essenziellen Histidin liegt. Im CryB-Homolog AfPhrB ist das entsprechende H366 ebenfalls unverzichtbar für die Reparatur (Graf et al., 2015).

4.1.2 Komplementation mit der (6-4)-Photolyase aus *Drosophila melanogaster*

Die heterologe Expression funktionell bekannter Proteine in Deletionsstämmen ist eine gängige Methode, um die unbekannte Funktion verwandter Proteine zu ergründen. So gibt es zahlreiche Beispiele für die Wiederherstellung der UV-Resistenz in photoreaktivierungsdefizienten *E. coli*-Stämmen durch die heterologe Expression verschiedener artfremder CPD-Photolyasen, beispielsweise die des Cyanobakteriums *Anacystis nidulans*, der Hefe *S. cerevisiae* oder der Pflanze *A. thaliana* (Takao et al., 1989; Sancar, 1985; Ahmad et al., 1997). Auch die Feststellung der CPD-Photolyaseaktivität von CryA aus *Aspergillus nidulans* und somit die Aufdeckung einer doppelten Funktion als Regulator- und Reparaturprotein wurde durch Komplementation von *E. coli* (*phr*⁻) erreicht (Bayram et al., 2008).

Aufgrund der Vermutung einer (6-4)-Photolyaseaktivität bei CryB wurde versucht, die fehlende Photoreaktivierung in *R. sphaeroides* Δ *cryB* durch Komplementation mit einer klassischen (6-4)-Photolyase eines anderen Organismus auszugleichen. Dazu wurde die (6-4)-Photolyase aus *Drosophila melanogaster* verwendet. Sie ist das erste Beispiel einer (6-4)-Photolyase (Todo et al., 1993) und einer der am besten untersuchten Vertreter (Maul et al., 2008; Glas et al., 2009a,b). Leider konnte die Photoreaktivierung nur zu einem sehr geringen Grad verbessert werden – dabei blieb unklar, ob es sich um einen spezifischen Effekt handelt, da in dieser Versuchsreihe die Dunkelkontrollen recht hohe Werte im Vergleich zu denen der meisten anderen Stämme aufwiesen (Abbildungen 3.7 und 3.4). Dies war bereits bei der ersten Untersuchung zu beobachten (Kawen, 2014). Es ist davon auszugehen, dass die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* unter den gegebenen Bedingungen nicht in der Lage ist, die Funktion von CryB in *R. sphaeroides* zu ersetzen. Die *Dm*(6-4)-Photolyase verwendet, anders als CryB, 7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin (8-HDF bzw. F_O) als Antennenchromophor (Glas et al., 2009a). Unter ausreichend guten Lichtbedingungen, wie im Photoreaktivierungsexperiment, ist ein Antennenchromophor jedoch verzichtbar (Sancar, 2003). Die 8-HDF-Antenne ist in der aus *E. coli* aufgereinigten *Dm*(6-4)-Photolyase nicht vorhanden, das Protein ist jedoch trotzdem in der Lage zur *in vitro* Reparatur von (6-4)-Schäden (Maul et al., 2008; Glas et al., 2009a). Auch die CPD-Photolyase aus *Anacystis nidulans* funktioniert ohne ihre 8-HDF-Antenne (Takao et al., 1989; Aubert et al., 1999). 8-HDF/F_O wird aus einer Riboflavin-Zwischenstufe durch die F_O-Synthase synthetisiert (Graham et al., 2003). Diese, und somit auch ihr Produkt 8-HDF, ist jedoch nur in wenigen Organismengruppen verbreitet, beispielsweise in Actinobakterien, Archaeen und einigen photosynthetischen Eukaryoten, nicht jedoch in *E. coli* und interessanterweise auch nicht in *Drosophila* (Decamps et al., 2012; Selby und Sancar, 2012). *Drosophila* behilft sich vermutlich durch einen proteobakteriellen Symbionten zu 8-HDF (Glas et al., 2009a). Bakterien ohne F_O-Synthase sind möglicherweise auf die Versorgung mit 8-HDF aus der Umwelt angewiesen (Kiontke et al., 2014). Obwohl *E. coli* kein 8-HDF produziert und dessen eigene Photolyase MTHF als Antennenchromophor bindet, sind die eingangs genannten CPD-Photolyasen aus *Aspergillus* und *Anacystis*, die natürlicherweise 8-HDF binden, in diesem funktionell. Somit funktionieren zumindest manche Deazaflavin-CPD-Photolyasen auch ohne ihre Antenne (Malhotra et al., 1992). Das bisher einzige Gegenbeispiel stellt die CPD-Photolyase der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* dar. Diese trägt ein Gen (*phr1*), das die F_O-Synthase kodiert, und produziert somit 8-HDF, das für die Funktion der Photolyase PHR2 essenziell ist (Petersen und Small, 2001; Petersen und Ronan, 2010). Es ist unwahrscheinlich, dass die ausbleibende Photoreaktivierung durch die *Dm*(6-4)-Photolyase in Δ *cryB* durch das Fehlen des Antennenchromophors zu erklären ist, da sie auch ohne Antenne funktioniert. Dennoch könnte versucht werden, die F_O-Synthase in Δ *cryB* plasmidkodiert zur Verfügung zu stellen. Dies wurde bereits

erfolgreich zur heterologen *in vivo* Rekonstitution der Photolyasen *MmCPDII* aus *Methanosarcina mazei*, *AnCPDI* aus *Anacystis nidulans* sowie *Dm(6-4)* aus *Drosophila melanogaster* in *E. coli* durchgeführt, indem die F₀-Synthase des Actinobakteriums *Streptomyces coelicolor* (*ScFbiC*) co-exprimiert wurde (Kiontke et al., 2014). Die Gensequenz ist auf dem Plasmid pCDF-Duet1-His6-ScFbiC (AG Essen, Marburg) verfügbar und kann in einen zur Expression in *R. sphaeroides* geeigneten Vektor umklontiert werden. Möglich ist jedoch auch, dass die eukaryotische (6-4)-Photolyase aus *Drosophila* aus anderen Gründen in *R. sphaeroides* nicht funktioniert. Heterolog exprimierte Photolyasen können beispielsweise unterschiedliche Mengen an FAD gebunden haben. So enthält die *Dm(6-4)*-Photolyase, exprimiert in *E. coli*, nur 1–5 % FAD (Zhao et al., 1997), die *Xl(6-4)*-Photolyase aus *Xenopus laevis*, ebenfalls exprimiert in *E. coli*, hingegen stöchiometrische Mengen (Hitomi et al., 1997). Es wäre interessant, weitere Vertreter zu testen. Leider ist bislang außer den sehr ähnlichen Vertretern der FeS-BCP-Gruppe keine weitere bakterielle (6-4)-Photolyase bekannt, die sich als näher verwandtes Beispiel zur Testung einer funktionellen Komplementation in $\Delta cryB$ anbieten würde. Man könnte es jedoch mit (6-4)-Photolyasen einzelliger Eukaryoten versuchen, beispielsweise der kürzlich charakterisierten Phr2 aus dem Pilz *Ustilago maydis* (Brych et al., 2015) oder dem *dual-function*-Mitglied *PtCPF1* aus der Alge *Phaeodactylum tricornutum*.

Die funktionelle Komplementation der (6-4)-Photoreparatur ist im viel verwendeten Modellorganismus *E. coli* nicht möglich, da dieser selbst keine (6-4)-Photolyase besitzt (Sancar und Sancar, 2006). Interessanterweise gibt es dennoch einige Beispiele heterologer Aktivität von (6-4)-Photolyasen in *E. coli*. So verleiht die in *E. coli* exprimierte eukaryotische (6-4)-Photolyase aus *A. thaliana* den Zellen eine verbesserte UV-Resistenz (Nakajima et al., 1998). Ebenso verhält es sich mit der (6-4)-Photolyase aus *X. laevis*, deren Funktion ausführlich in *E. coli in vivo* untersucht wurde (Hitomi et al., 2001), sowie mit *PtCPF1* aus *P. tricornutum* (Coesel et al., 2009). Ein solches Experiment bietet sich auch für CryB an, um zu testen, ob das Protein in *E. coli* zusätzlich zu dessen eigener CPD-Photoreparatur die allgemeine UV-Resistenz fördert, da dieser sonst keine (6-4)-Schäden reparieren kann. Da bisher außer CryB und *AfPhrB* keine bakteriellen (6-4)-Photolyasen charakterisiert sind, gibt es noch keine Beispiele für eine heterologe Expression von (6-4)-Photolyasen in (6-4)-reparaturdefizienten Bakterien.

4.1.3 *In vitro* Reparatur von (6-4)-Schäden

In dieser Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Richard Pokorny (AG Batschauer, Philipps-Universität Marburg) der in Brych et al. (2015) und Abschnitt 3.3.3 beschriebene Reparaturassay zur Detektion einer (6-4)-Photolyaseaktivität erstmals für CryB angewendet. Er basiert auf der Methode des spektroskopischen Nachweises von (6-4)-Photoprodukten nach Yamamoto et al. (2013). Dabei wurden Protein und Substrat in den in Brych et al. (2015) verwendeten Konzentrationen eingesetzt. Bei der darin untersuchten (6-4)-Photolyase aus *Ustilago maydis* konnte eine Reparatur problemlos nachgewiesen werden. Für CryB konnte unter gleichen Bedingungen keine Reparaturaktivität festgestellt werden (Abschnitt 3.3.3.3). Das Experiment wurde später durch Elisabeth Ignatz (AG Essen, Philipps-Universität Marburg) wieder aufgegriffen, mit der entscheidenden Änderung eines 10-fach höheren Einsatzes von CryB (10 μ M). Die gleiche Menge Protein wurde auch in der *baseline*-Messung hinzugefügt, um dessen Absorption auszugleichen und so die Änderungen bei 325 nm (Absorption von (6-4)-Photoprodukten) erfassen zu können. Es wurde eine Reparatur von 16 % der (6-4)-Photoprodukte nach 90 Minuten Belichtung festgestellt und eine Quantenausbeute der Reparatur von 0,4 % berechnet. In der Dunkelkontrolle fand keine Reparatur statt. So konnte erstmals *in vitro* eine zwar geringe, aber eindeutige lichtabhängige Reparatur von (6-4)-Photoprodukten durch CryB nachgewiesen werden (von Zadow et al., 2016).

Verglichen mit den ohnehin schon geringen Quantenausbeuten von etwa 10 % bei klassischen (6-4)-Photolyasen, im Unterschied zu 90 % bei CPD-Photolyasen (Li et al., 2010), ist die Effizienz von CryB mit einer Quantenausbeute von 0,4 % nochmals deutlich geringer. Dies steht nicht im Einklang mit den Beobachtungen zur effizienten *in vivo* Photoreaktivierung (Abschnitte 3.2.1 und 3.4.5). Eine mögliche Erklärung für die geringe Reparaturaktivität war die Qualität des verwendeten Substrates. Es handelt sich um ein Oligo(dT)₁₈-Molekül, das neben durchschnittlich einem (6-4)-Schaden auch 4–5 CPD-Schäden enthält. Letztere könnten sterisch die Anlagerung von CryB an das Molekül verhindern. Das gleiche Substrat wurde jedoch durch die (6-4)-Photolyase aus *U. maydis* effizient repariert (Brych et al., 2015). Außerdem wurde in Zhang et al. (2013) für AfPhrB ein anderes Substrat mit nur einem zentralen T(6-4)T-Dimer verwendet und mit diesem ebenfalls eine geringe Reparatureffizienz erreicht.

Die Vermutung, dass bei den *in vitro* Bedingungen etwas Entscheidendes fehlt, war bereits nach den ersten Versuchen des Reparturnachweises (Oberpichler et al., 2011; Geisselbrecht et al., 2012; Zhang et al., 2013) sowie bei der aktuellen Studie naheliegend. Es wurde unter anderem vermutet, dass der „unbekannte Faktor“ ein weiteres in der Zelle vorhandenes Protein sein könnte (Oberpichler et al., 2011) oder dass der evolutionäre Austausch des zweiten konservierten Histidins zu Leucin (L366 in CryB) möglicherweise eine negative Auswirkung hat (von Zadow et al., 2016 und Abschnitt 4.2.1.2). Die Frage nach der fehlenden Komponente wurde kürzlich durch Ma et al. (2017) geklärt: Magnesium-Ionen (Mg²⁺) erzielen eine Steigerung der *in vitro* Reparatureffizienz von (6-4)-Photoprodukten durch AfPhrB und RsCryB auf ein mit anderen untersuchten Photolyasen vergleichbares Level. Dies geschieht zu einem noch stärkeren Grad auch durch Mangan (Mn²⁺) und zu einem geringeren Grad durch Calcium (Ca²⁺). Die in der Studie ebenso untersuchte Photolyase AfPhrA vom Typ CPD III sowie die (6-4)-Photolyase OtCPF1 aus der Grünalge *Ostreococcus tauri* zeigen keine Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen. Somit wurde eine Mg²⁺/Mn²⁺-Abhängigkeit bislang nur für Mitglieder der FeS-BCP-Gruppe beschrieben.

Kationen sind normalerweise kein Bestandteil der in der Literatur beschriebenen Reparaturassays mit Photolyasen. Die Erkenntnisse zur positiven Wirkung zweiwertiger Kationen auf die Reparatureffizienz bakterieller (6-4)-Photolyasen der FeS-BCP-Gruppe erklären, warum bei den bisherigen Versuchen (Zhang et al., 2013; von Zadow et al., 2016) so viel Protein eingesetzt werden musste, um eine Reparatur nachzuweisen (Ma et al., 2017). Im ersten Versuch für CryB (Geisselbrecht et al., 2012) waren Protein und DNA-Substrat in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt worden, entsprechend dem Vorgehen aus Maul et al. (2008); das Substrat war einzelsträngig mit einem zentralen T(6-4)T-Dimer. Es zeigte sich keinerlei Reparatur durch CryB. Das gleiche Experiment wurde parallel auch für die Ds(6-4)-Photolyase aus *Dunaliella salina* durchgeführt, bei dieser erfolgreich (Geisselbrecht, 2013), sowie auf gleiche Weise für die Dm(6-4)-Photolyase (Maul et al., 2008; Glas et al., 2009b), sodass bei CryB auf eine fehlende Reparaturaktivität geschlossen wurde. Auch der erste Versuch, für AfPhrB eine Reparaturaktivität nachzuweisen, war nicht erfolgreich, hier wurde noch ein anderes Substrat als in den darauffolgenden Versuchen verwendet (Oberpichler et al., 2011). Beim ersten erfolgreichen Nachweis der (6-4)-Reparatur durch AfPhrB wurde dreifach mehr Protein als Substrat eingesetzt und nur eine unvollständige Reparatur von 20 % eines einzelsträngigen Substrates nach 120 Minuten Blaulichtbestrahlung festgestellt. Überraschenderweise war die Reparatur von doppelsträngiger DNA durch AfPhrB deutlich effizienter und war nach 15 Minuten abgeschlossen (Zhang et al., 2013; Ma et al., 2017). Das in dieser Arbeit eingesetzte Protein:DNA-Verhältnis von 1:30 bei Verwendung von einzelsträngigem DNA-Substrat führte zu keiner nachweisbaren Reparatur – der gleiche Assay funktionierte jedoch für die (6-4)-Photolyase Phr2 aus *Ustilago maydis*, sogar bei einem Verhältnis von 1:47, und erzielte eine Reparatur von ca. 60 % der

(6-4)-Schäden nach 60 Minuten (Brych et al., 2015). Zwar ließ sich die Reparatur daraufhin wie beschrieben mit der 10-fachen Menge an CryB nachweisen (von Zadow et al., 2016), die Notwendigkeit dieses Verhältnisses entspricht jedoch nicht dem, was man von einer enzymatischen Reaktion wie in Brych et al. erwarten würde. Obwohl die Reparatur doppelsträngiger DNA durch *AfPhrB* deutlich effizienter war als bei einzelsträngiger (Zhang et al., 2013), konnte auch diese bei dem in dieser Arbeit eingesetzten Verhältnis (1:30) bei CryB nicht nachgewiesen werden. Hier ist jedoch, neben der zu geringen Proteinmenge, wahrscheinlich auch die Qualität des verwendeten doppelsträngigen Substrates mit multiplen Thymin-dimeren je Molekül ausschlaggebend, das im Gegensatz zu einem DNA-Fragment mit nur einem zentralen Dimer möglicherweise viel schlechter mit dem dazugehörigen Oligo(dA)₁₈-Strang *annealt* (Abschnitt 3.3.3.1). Graf et al. (2015) konnten durch veränderte Puffer- und Belichtungsbedingungen die Effizienz von PhrB erheblich verbessern, sodass 75 % der (6-4)-Schäden nach 30 min repariert waren und 90 % nach 90 min, bei einem Protein:DNA-Verhältnis von 3:1. Der Zusatz von Mg²⁺ oder Mn²⁺ ermöglichte schließlich ein Protein:DNA-Verhältnis von 1:5,9 und eine vollständige Reparatur von (6-4)-Schäden in einzelsträngiger DNA durch *AfPhrB* nach 10 Minuten. Die hohe Effizienz wurde durch Verkürzung der Reparaturzeit noch deutlicher. Bereits nach 3 Minuten war, in Anwesenheit von Mg²⁺ oder Mn²⁺, eine Reparatur von 48 bzw. 68 % durch *AfPhrB* sowie von 82 bzw. 97 % durch *RsCryB* festzustellen. Ohne zweiwertige Ionen liegt der Reparaturerefolg beider Proteine unter den gleichen Bedingungen auch nach 120 Minuten Belichtung bei unter 5 % (Ma et al., 2017). In der Studie wurde der Fokus auf die Reparatur *einzelsträngiger* DNA gelegt. Interessanterweise weist CryB im Falle von *ungeschädigter* DNA eine viel höhere Affinität zu einzelsträngiger als zu doppelsträngiger DNA auf (Hendrischk et al., 2009a), was im Kontrast zur Reparaturaktivität durch *AfPhrB* (Zhang et al., 2013) steht. Die Affinität von *AfPhrB* zu ssDNA mit (6-4)-Schäden ist des Weiteren deutlich höher als zu ungeschädigter ssDNA (Graf et al., 2015).

Unabhängig von den Kationen haben jedoch auch der pH-Wert oder die Lichtbedingungen einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität des Proteins. Bei pH 7,0 (statt 7,5) und geringerer Lichtintensität einer höheren Wellenlänge konnte eine deutlich bessere Effizienz erzielt werden (Graf et al., 2015). Die mögliche pH-Abhängigkeit steht im Kontrast zu eukaryotischen (6-4)-Photolyasen, deren Aktivität mit zunehmendem pH steigt und deren Optimum bei einem pH von 8,5–9,0 liegt (Hitomi et al., 2001). Womöglich liegen die Unterschiede aber weniger am pH-Wert und mehr an den unterschiedlichen Lichtintensitäten. Lichtbedingungen, die zuvor für die Photoreduktion vor der Reparatur verwendet wurden (470 nm, 55 μmol/m²/s) (Oberpichler et al., 2011), wurden später für die Photoreaktivierung im Reparaturassay eingesetzt (Graf et al., 2015) und erzielten eine hohe Reparaturaktivität. Die Verwendung zu geringer Wellenlängen (300–350 nm) bei der Reparatur birgt die Gefahr, dass die (6-4)-Dimere in die weniger effizient zu reparierenden (Glas et al., 2009b) Dewar-Isomere konvertiert werden (Weber, 2005). Bei Betrachtung der sehr unterschiedlichen Effizienzen verschiedener (6-4)-Photolyasen unter gleichen Bedingungen wird deutlich, dass jedes Protein sehr individuelle Ansprüche an Licht- und Reaktionsbedingungen hat, möglicherweise unter anderem aufgrund der unterschiedlichen Cofaktorzusammensetzungen und Gegebenheiten im aktiven Zentrum.

Das Prinzip der beiden angewendeten Assays ist gleich: Protein und Substrat werden zusammen unter photoreaktivierendem Licht für eine bestimmte Zeitdauer inkubiert. Im spektroskopiebasierten Assay erfolgt die Detektion der (6-4)-Schäden durch Messung der Gesamtreaktion bei 325 nm. Bei der HPLC-basierten Methode wird die DNA nach Ablauf der Reaktion von dem Protein isoliert und aufgetrennt. Eine Identifizierung der DNA-Spezies der HPLC-Peaks erfolgt hier ebenfalls durch Messung bei 260 und 325 nm zur Detektion intakter bzw. (6-4)-geschädigter DNA. Ein Nachteil der ersten Methode

ist die Anwesenheit des Proteins mit seinen lichtabsorbierenden Chromophoren bei der spektroskopischen Messung, ein Vorteil ist die einfachere Möglichkeit der Messung zu vielen Zeitpunkten während der Reaktion. Die in diesem Abschnitt diskutierten Experimente sind in Tabelle 4.1 zusammengestellt.

Tabelle 4.1: Übersicht der *in vitro* Reparaturassays zur (6-4)-Photolyaseaktivität von *RsCryB* und *AfPhrB* sowie eukaryotischer (6-4)-Photolyasen und einer CPD-Photolyase. P:D = molares Protein:DNA-Verhältnis.

Name	Meth.	Substrat	P:D	Licht	Reparatur	Referenz
<i>Dm</i> (6-4)	H ¹⁾	T(6-4)T ³⁾ ss	1:1	Weißlicht	100 % (1 h)	Maul et al. (2008) Glas et al. (2009b)
<i>AfPhrB</i>	S ²⁾	(dT) ₁₈ ⁴⁾ ss	k.A.	405 nm 150 µmol ⁶⁾	–	Oberpichler et al. (2011)
<i>RsCryB</i>	H	T(6-4)T ss	1:1	Weißlicht	–	Geisselbrecht et al. (2012)
<i>AfPhrB</i>	H	T(6-4)T ss ds	3:1	405 nm 40 µmol	20 % ss (2 h) 100 % ds (15 min)	Zhang et al. (2013)
<i>AfPhrB</i>	H	T(6-4)T ss	3:1	400 nm 200 µmol	18 % (30 min)	Graf et al. (2015)
<i>AfPhrB</i>	H	T(6-4)T ss	3:1	470 nm 55 µmol	75 % (30 min) 90 % (90 min) 100 % (2h)	Graf et al. (2015)
<i>Um</i> (6-4)	S	(dT) ₁₈ ss	1:47	385 nm 100 µmol	60 % (1 h)	Brych et al. (2015)
<i>RsCryB</i>	S	(dT) ₁₈ ss ds	1:30	385 nm 100 µmol	–	Diese Arbeit
<i>RsCryB</i>	S	(dT) ₁₈ ss	1:3,3	385 nm 100 µmol	16 % (90 min)	von Zadow et al. (2016)
<i>AfPhrB</i> <i>RsCryB</i>	H	T(6-4)T ss	1:5,9	400 nm 250 µmol	3 % (120 min) -Mg ²⁺ 100 % (10 min) +Mg ²⁺	Ma et al. (2017)
<i>OtCPF1</i> (6-4)	H	T(6-4)T ss	1:100	400 nm 250 µmol	ca. 40 % (1 min)	Ma et al. (2017)
<i>AfPhrA</i> CPD III	H	T<>T ⁵⁾ ss	1:100	400 nm 250 µmol	ca. 20 % (60 min)	Ma et al. (2017)

¹⁾ HPLC-basierte Detektion der Reparatur

²⁾ spektroskopiebasierte Detektion der Reparatur

³⁾ AGGTTGGC mit zentralem T(6-4)T-Schaden

⁴⁾ Oligo(dT)₁₈ mit durchschnittlich einem (6-4) Schaden und 4–5 CPD-Schäden

⁵⁾ AGGTTGGC mit zentralem CPD-Schaden

⁶⁾ µmol/m²/s

Es ist auffallend, dass die Reparatur doppelsträngiger DNA durch *AfPhrB* ohne Kationen gut funktioniert (Zhang et al., 2013), während die von einzelsträngiger so stark positiv von ihnen beeinflusst wird. Es wäre interessant, den Effekt von Kationen ebenso bei der Reparatur von doppelsträngiger DNA zu untersuchen. Da die Bindungsaffinität für geschädigte ssDNA ohnehin hoch ist, wurde vermutet, dass die verbesserte Reparatur durch Kationen nicht aufgrund einer verbesserten Substratbindung zustande kommt. Somit spielen die Ionen scheinbar eine direkte oder indirekte Rolle beim Reparaturvorgang. Als Ursache für den Kationeneinfluss wurde ein Zusammenhang mit einer der einzigartigen Eigenschaften der FeS-BCP postuliert: Das Mg²⁺-Ion könnte zwischen zwei konservierten Aspartaten in der ungewöhn-

lich langen und möglicherweise flexiblen *linker*-Region zwischen N- und C-terminaler Domäne gebunden sein und das (6-4)-PP während der Reparatur stabilisieren (Ma et al., 2017).

Die Unabhängigkeit anderer Photolyasen von Mg^{2+}/Mn^{2+} geht mit dem evolutionären Verlust des FeS-Clusters (Abschnitt 4.2.3) einher (Ma et al., 2017). Auch dieser mögliche Zusammenhang ist bislang nicht geklärt. Bei der ATPase aus *Pyrococcus abyssi* (Archaeen) hängt die Aktivität vom Status ihrer beiden [4Fe4S]-Cluster sowie von Mg^{2+} ab (Sims und Igarashi, 2012). Viele Enzyme, die im Zusammenhang mit der Prozessierung von DNA oder RNA stehen, benötigen zweiwertige Metallionen als Liganden, beispielsweise die DNase I (Guérout et al., 2010). Sie fördern die katalytische Aktivität, wobei meistens vor allem Mg^{2+} -Ionen eine wichtige Rolle spielen (Cowan, 1998). Im Gegensatz zu anderen Metallionen interagieren diese mit dem Enzym meist nur vorübergehend. Die intrazelluläre Magnesiumkonzentration ist genau reguliert und hängt eng mit Protein-Syntheseraten zusammen (Terasaki und Rubin, 1985). In Zellen liegt Mg^{2+} meist in sehr hohen Konzentrationen (mM) vor, während Mn^{2+} (μM) viel weniger abundant ist. Mn^{2+} ist austauschbar, vor allem durch Mg^{2+} und Zn^{2+} (Andreini et al., 2008), daher ist die biologische Relevanz von Magnesium bei der Reparatur durch FeS-BCP höher, auch wenn der positive Effekt durch Mangan stärker ist.

Eine Co-Kristallisation des Proteins mit gebundenem DNA-Schaden könnte Aufschluss über die Position der Ionen sowie den Reparaturmechanismus geben.

4.2 Die Cofaktoren von CryB und ihre Rolle bei der Photoreaktivierung

4.2.1 Der katalytische Cofaktor FAD

4.2.1.1 CryB W338F: Funktionelle *in vivo* Photoreaktivierung bei fehlender FAD-Reduktion

Der FAD-Cofaktor von CryB wird durch Elektronentransfer über die essenzielle Tryptophan-Diade aus W338 und W386 photoreduziert, die Effizienz der Reduktion wird durch die zwei nicht essenziellen Tyrosine Y387 und Y391 verstärkt. CryB W338F zeichnet sich durch eine vollständig fehlende Reduzierbarkeit des FAD *in vitro* aus (Geisselbrecht, 2013). Es war davon auszugehen, dass diese Variante nicht mehr funktionell ist. Überraschenderweise vermittelte sie jedoch, exprimiert in *R. sphaeroides* $\Delta cryB$, eine hohe *in vivo* Photoreaktivierungsaktivität, was mit oxidiertem FAD nicht zu erwarten war. Denkbar wäre daher, dass die Reparatur allein durch das FeS-Cluster mithilfe des Antennenchromophors geschieht. Die Möglichkeit einer Beteiligung des FeS-Clusters an der Reparatur wird an späterer Stelle diskutiert (Abschnitt 4.2.3). In unserer Studie (von Zadow et al., 2016) konnte gezeigt werden, dass CryB W338F zwar in der Lage zur *in vivo* Photoreaktivierung ist, jedoch keine Reparaturaktivität von (6-4)-Photoprodukten *in vitro* zeigt. Es ist daher vorstellbar, dass der *in vitro* verwendete Elektronentransferweg zum FAD *in vivo* verzichtbar ist. Betrachtet man die Notwendigkeit der Reduktion für die Reparatur (von Zadow et al., 2016), die im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen und allgemein akzeptierten Erfordernis des vollständig reduzierten $FADH^-$ zur Reparatur steht (Sancar, 2003), so schien das Ergebnis der funktionierenden Photoreaktivierung zunächst ungewöhnlich. Es gibt jedoch einige aktuelle Studien, sowohl von Cryptochromen als auch Photolyasen, in denen gezeigt wird, dass der Verlust der *in vitro* Photoreduzierbarkeit und Reparatur nicht notwendigerweise mit einem Funktionsverlust *in vivo* einhergeht. Tryptophan-Mutationen in der kanonischen „Trp-Triade“ des Cryptochroms dCRY aus *Drosophila* und der Cryptochrome CRY1 und CRY2 aus *Arabidopsis*, die eine ausbleibende Reduzierbarkeit des jeweiligen FAD-Cofaktors *in vitro* bewirken, haben keinen Einfluss auf die physiologi-

sche Aktivität der Proteine *in vivo* (Öztürk et al., 2014; Gao et al., 2015; Li et al., 2011). Die Photolyase mit Tryptophan-Austausch W306F aus *E. coli*, welche ebenso eine defekte *in vitro* Photoreduktion aufweist, ist in der Lage, einen photoreaktivierungsinaktiven *E. coli*-Stamm zu komplementieren (Li et al., 1991). Durch Betrachtung der Kinetik der Photoreaktivierung konnten erhebliche Unterschiede bezüglich der Reparatureffizienz von CryB W338F aufgedeckt werden, das bei der Endpunktbetrachtung nur wenig Unterschied zu Wildtyp-CryB gezeigt hatte (Abschnitt 3.4.5). Anders als CryB W338F weist die Phr-W306F-Mutante aus *E. coli* keine verlangsamte Photoreaktivierung im Vergleich zum Wildtyp auf (Kavakli und Sancar, 2004), was auf eine Aktivität unabhängig einer vorherigen Photoaktivierung hindeutet.

Der Normalzustand von Photolyasen in der Zelle ist der vollständig reduzierte (Chaves et al., 2011). Außerdem sind die künstlichen Reduktionsbedingungen für aufgereinigte Proteine anders als die physiologischen Bedingungen in der Zelle. Am Beispiel von *cry2* aus *Arabidopsis* wurde gezeigt, dass die Abweichung zwischen *in vivo* und *in vitro* Reduktion durch die Anwesenheit von Metaboliten in der Zelle erklärt werden kann, die die Photoreduktion auch bei Unterbrechung der klassischen Elektronentransferroute über die Tryptophane ermöglichen (Engelhard et al., 2014). Vermutlich ist CryB teilweise unabhängig von der intrinsischen Photoreduktion über die beiden Tryptophane und Tyrosine. Dieser konservierte Elektronentransferweg kann verzichtbar sein, nicht jedoch der reduzierte Zustand des FAD. Den Nachweis, dass CryB nicht im oxidierten Zustand reparieren kann, lieferte der Einsatz von CryB W338F als Kontrolle im *in vitro* Reparaturassay. Hier zeigte sich im Gegensatz zu der positiven *in vivo* Photoreaktivierung keine Reparatur von (6-4)-Photoprodukten (von Zadow et al., 2016). Dies bedeutet, dass die Photoreaktivierungsaktivität nicht darauf beruht, dass CryB mit oxidiertem FAD reparaturfähig ist, sondern dass der Elektronentransfer bei dieser Variante *in vivo* entweder über einen alternativen Weg abläuft oder ein Anteil an CryB W338F bereits mit reduziertem FADH⁻ synthetisiert wird und ohne Neureduktion über den 2Trp/2Tyr-Weg zumindest einige Reparaturzyklen ausführen kann. Entsprechendes wurde für die Photolyase-Mutante W306F aus *E. coli* berichtet, die in der Lage ist, mindestens 25 Runden Photoreparatur *in vivo* durchzuführen (Kavakli und Sancar, 2004). Eine *in vivo* Reduktion ist daher möglicherweise nur im Falle eines Elektronenverlustes des reduzierten FAD nötig. Zudem ist das Reduktionsmittel bei der *in vitro* Reduktion (hier DTT) ein anderes als in der Zelle. Dort könnte es möglicherweise über NADH oder eine andere Substanz geschehen. Dennoch ist es denkbar, dass eine *in vivo* Reduktion unabhängig des beschriebenen Elektronentransferweges über W386 und W338 von CryB stattfinden könnte, so wie es bei Mutanten von W321, W374 oder W397 der Tryptophan-Triade von *cry2* aus *Arabidopsis* der Fall ist (Engelhard et al., 2014). Die Elektronentransferwege dieser beiden Proteine sind jedoch nicht notwendigerweise direkt vergleichbar. Die Ergebnisse zu CryB W338F zeigen, dass auch hier der obligatorische Weg über konservierte Aminosäuren für die *in vivo* Photoreaktivierung nicht benötigt wird und unterstreichen die Bedeutung von *in vivo* Untersuchungen.

Vor dem Hintergrund der *in vivo* Ergebnisse zu CryB W338F war die Fähigkeit zur Photoreaktivierung durch CryB Y387F und Y391F in $\Delta cryB$ (Abschnitt 3.4.1) nicht überraschend. Beide sind *in vitro* in ihrer Photoreduzierung des FAD lediglich verlangsamt, nicht jedoch defekt wie CryB W338F (Geisselbrecht et al., 2012).

4.2.1.2 Beeinträchtigte FAD-Bindung durch CryB-L366-Varianten

Wie in Abschnitt 3.4.2.1 beschrieben zielte der Austausch des Leucins L366 zu Histidin ursprünglich auf eine Verbesserung der Photolyaseaktivität von CryB für den *in vitro* Reparaturassay ab, denn an dieser Position befindet sich bei eukaryotischen (6-4)-Photolyasen ein konserviertes und für die Reparatur

essenzielles Histidin, das in der FeS-BCP-Familie nicht vorhanden ist (vgl. Abbildung 3.5). Aufgrund der zunächst nicht nachweisbaren *in vitro* Reparatur durch die hier angewendeten Bedingungen (Abschnitt 3.3.3.3) sollte durch diese Variante untersucht werden, ob der evolutionäre Ersatz des Leucins durch ein Histidin eine gesteigerte Effizienz von (6-4)-Photolyasen mit sich brachte. Der überraschende Verlust des FAD in CryB L366H verhinderte die Umsetzung dieses Vorhabens, ermöglichte stattdessen jedoch die *in vivo* Untersuchung einer Variante mit eingeschränkter FAD-Bindung. Überraschenderweise bewirkte CryB L366H eine Wiederherstellung der Photoreaktivierung in $\Delta cryB$ (Abschnitt 3.4.2.1). Da FAD der katalytische und unverzichtbare Cofaktor von Cryptochromen und Photolyasen ist, war die funktionierende *in vivo* Photoreaktivierung durch diese scheinbar FAD-lose Variante noch unerwarteter als durch das nicht reduzierbare CryB W338F. Die Entfernung des FAD wurde bei anderen Photolyasen beispielsweise durch Dialyse des aufgereinigten Proteins erreicht (Malhotra et al., 1992; Payne et al., 1990), aber die DNA-Affinität und *in vitro* Reparaturaktivität gingen dabei verloren. Ebenso verlor die FAD-lose CPD-III-Photolyase aus *Caulobacter crescentus* ihre spezifische Bindung zu DNA (Öztürk et al., 2008). Die Entfernung des FAD des Cryptochroms CRY2 aus *Arabidopsis* durch Mutagenese führte zu einem Funktionsverlust des Proteins *in vivo* (Liu et al., 2008). Die Untersuchung von CryB L366A und L366F sowie die Quantifizierung der Cofaktoren der drei Leucin-Varianten machten deutlich, dass noch residuale Mengen an FAD vorhanden sind (Tabelle 3.2), was in diesen Fällen die Fähigkeit zur Wiederherstellung der Photoreaktivierung erklärt. Wahrscheinlich sind dabei die Bedingungen für eine Cofaktorbindung in der Zelle noch besser als bei den isolierten Proteinen. Der Ersatz des entsprechenden Leucins im CryB-Homolog AfPhrB, L370, durch Methionin führte zu einer verlangsamten *in vitro* Reparatur, auch hier wurde eine Verdrängung des FAD berichtet (Graf et al., 2015). Dies steht im Einklang mit der *in vivo* beobachteten verringerten Photoreaktivierungskinetik durch CryB L366H (Abschnitt 3.4.5). In Anbetracht der Tatsache, dass es keine Berichte über funktionierende FAD-lose Cryptochrome oder Photolyasen gibt, kann darauf geschlossen werden, dass L366 eine strukturelle Rolle einnimmt und essenziell für die FAD-Bindung in der FeS-BCP-Gruppe ist, sein Fehlen führt zu einer Destabilisierung des FAD. Geringe Mengen an gebundenem FAD sind jedoch ausreichend, um die Reparaturaktivität *in vivo* zu gewährleisten.

Das erste der zwei relevanten Histidine, H362 in CryB, entspricht dem Histidin, das in eukaryotischen (6-4)-Photolyasen der Protonendonator für die Reparatur des Schadens ist, wie H354 in der XI(6-4)-Photolyase aus *Xenopus laevis* (Schleicher et al., 2007). Es ist somit plausibel, dass das zweite Histidin, H358 am Beispiel der XI(6-4)-Photolyase, in der FeS-BCP-Gruppe durch eine andere Aminosäure ersetzt sein kann und das Protein trotzdem als Photolyase funktioniert. Das hochkonservierte erste Histidin scheint wichtiger zu sein: die Mutation von H365 in der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* führt zu einem vollständigen Verlust der Reparatur, während das Protein beim Austausch des zweiten Histidins (H369) noch eine residuale Reparaturaktivität behält (Maul et al., 2008). Auch der Austausch von L366 in CryB führt nicht wie bei CryB H362A zu einem Funktionsverlust, obwohl ersteres deutlich beeinträchtigt ist (Abbildung 3.3). Hier ist sogar noch deutlicher, dass die zweite Position verzichtbarer ist, da die Auswirkungen sowohl für die *in vitro* Reparatur (bei AfPhrB entsprechend H366 und L370; Graf et al., 2015) als auch *in vivo* weniger gravierend sind. L370 und M410 in AfPhrB stabilisieren das erste Histidin durch van-der-Waals-Wechselwirkungen, während das Äquivalent in eukaryotischen (6-4)-Photolyasen durch ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk stabilisiert wird (Zhang et al., 2013). Die Konservierung des Leucins in der FeS-BCP-Familie hat vermutlich einen evolutionären Sinn und ist nicht der Grund für die geringe *in vitro* Reparaturaktivität (vgl. Abschnitt 4.1.3), was dadurch gezeigt werden konnte, dass es nicht einfach durch das „modernere“ Histidin ersetzbar ist. Der Ersatz des Leucins durch His-

tidin bei der Entstehung eukaryotischer (6-4)-Photolyasen muss daher mit weiteren Veränderungen im aktiven Zentrum einhergegangen sein.

4.2.2 Der Antennenchromophor DLZ

Der ungewöhnliche potenzielle Antennenchromophor 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (DLZ) liegt wie andere Antennenchromophore klassischer Photolyasen im N-terminalen Teil des Proteins. Aufgrund des Vorhandenseins eines lichtabsorbierenden Moleküls in diesem Bereich wurde seit seiner Entdeckung (Geisselbrecht et al., 2012) stark vermutet, dass es sich dabei um einen als Antennenchromophor fungierenden Cofaktor handelt, obwohl DLZ zuvor nicht als ein solcher in Photolyasen oder Cryptochromen beschrieben wurde. 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin ist bereits lange bekannt als Cofaktor des „Lumazin-Proteins“ in *Photobacterium*. Auch aktuelle Studien zeigen, dass Lumazinderivate in vielen Fällen mehr als nur Vorstufen in der Riboflavinbiosynthese sind (Paulus et al., 2014).

Der aromatische Ring des Moleküls liegt in CryB zwischen den Aminosäuren E37, I51, M55 und I83, die Ribitylseitenkette interagiert über Wasserstoffbrücken mit D10, E37 und Y40, die beiden Methylgruppen liegen in einer hydrophoben Tasche aus I48, I50 und K47 (Geisselbrecht et al., 2012). Im Vorfeld dieser Arbeit wurden Einzelaustausche dreier dieser Aminosäuren vorgenommen, um die Bindung des Chromophors zu stören (Geisselbrecht, 2013). CryB E37F erwies sich anhand von Spektroskopiedaten als vielversprechender Kandidat, für den ein Antennenverlust vermutet wurde. Bei einer späteren heterologen Expression und Aufreinigung von CryB E37F in dieser Arbeit konnte das ursprüngliche Spektrum (Geisselbrecht, 2013) auch durch verschiedene Optimierungsversuche nicht reproduziert werden. Es zeigte sich eine erhebliche Beeinträchtigung der Integrität des Proteins und ein dadurch bedingter zusätzlicher Verlust des FAD (Abschnitt 3.4.3). Die Expression erfolgte vom Originalplasmid. Durch das zusätzliche Einfügen der Mutation für E37F in bestehende Plasmide mit Mutationen für W338F oder L366H und die Aufreinigung dieser Doppelvarianten wurde bestätigt, dass die Beeinträchtigung der Proteinestabilität an dem Austausch E37F liegt, da dieser auch eine Destabilisierung des FAD in CryB W338F bewirkt. Interessanterweise wurde die bereits FAD-lose Variante L366H durch diese zusätzliche Mutation weniger stark beeinflusst als CryB E37F einzeln oder in Kombination mit W338F (Abschnitt 3.4.4). Dennoch konnten durch *in vivo* Untersuchungen Erkenntnisse über die Relevanz der Antenne gewonnen werden. Alle drei E37F-enthaltenden Varianten weisen die gleiche beeinträchtigte Expression in $\Delta cryB$ auf (Abbildung 3.3), jedoch geht nur bei den beiden Doppelmutanten die Fähigkeit zur Photoreaktivierung verloren. CryB E37F ist hingegen in der Lage, diese in $\Delta cryB$ wiederherzustellen. So kann darauf geschlossen werden, dass die lichtabsorbierenden Cofaktoren zusammen essenziell für die Reparatur sind, da das Fehlen oder die Beeinträchtigung von beiden gleichzeitig einen Funktionsverlust bewirkt. Durch die Experimente mit variierenden Lichtintensitäten bei der Photoreaktivierung des Stammes $\Delta cryB$ pRKcryB E37F konnte weiterhin deutlich gezeigt werden, dass der potenzielle Verlust der Antenne die Überlebensrate vor allem bei geringen Lichtintensitäten stark beeinträchtigt (Abschnitt 3.4.3.1). Die Bedeutung von Antennenchromophoren wird oft nur bei eingeschränkten Lichtverhältnissen deutlich (Sancar, 2003).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Zhang et al. (2017) wurde die Rolle von DLZ als Antennenchromophor anhand des CryB-Homologs AfPhrB auf Proteinebene bestätigt. AfPhrB I51W zeichnet sich durch einen Verlust des Chromophors aus, was durch Spektroskopie und HPLC-Analyse gezeigt wurde. Die Integrität des Gesamtproteins ist anhand seiner Kristallstruktur unbeeinflusst. Das ursprünglich

erzielte Spektrum von CryB E37F (Geisselbrecht, 2013) weist Ähnlichkeiten mit dem von AfPhrB I51W auf, zeigt jedoch insgesamt eine stärkere Absorption im 400-nm-Bereich. Durch Fluoreszenzspektroskopie wurde gezeigt, dass Energie von der Antenne zum FAD übertragen wird, ein Teil der durch DLZ absorbierten Lichtenergie geht dabei als Fluoreszenz verloren (Zhang et al., 2017). Die verringerte *in vitro* Reparatureffizienz durch AfPhrB I51W (4-fach weniger reparierte (6-4)-Schäden) steht im Einklang mit der in dieser Arbeit beobachteten verlangsamten *in vivo* Photoreaktivierung (Abbildung 3.16). Die Endpunkt-Überlebensrate von $\Delta cryB$ pRKcryB E37F nach 3 Stunden liegt mit 73 % Überleben jedoch nur leicht unter der der Kontrolle $\Delta cryB$ pRKcryB (91 %) (Abbildung 3.4). *In vivo* ist der Unterschied Antennenmutante/Wildtyp somit weniger gravierend als *in vitro*, was womöglich an den natürlicheren Bedingungen in der Zelle liegt. Die Photoreduktion des FAD in AfPhrB I51W erfolgt langsamer als im Wildtyp, außerdem zeigt sich die Semichinonform, die sonst nur eine Zwischenstufe auf dem Weg zur vollständigen Reduktion darstellt, auch nach 90 Minuten. Diese Form ist im Wildtyp AfPhrB zu diesem Zeitpunkt nicht mehr vorhanden, somit ist die Reduktion der Variante I51W unvollständig, was die beeinträchtigte Reparatureffizienz erklärt (Zhang et al., 2017). Diese Daten, gemeinsam mit den *in vivo* Ergebnissen dieser Arbeit zeigen, dass DLZ in der FeS-BCP-Gruppe die Aufgabe des Antennenchromophors zur Versorgung des katalytischen FAD mit Lichtenergie übernimmt.

Insgesamt wurde die Relevanz der lichtabsorbierenden Cofaktoren FAD und DLZ bei der Photoreaktivierung erst bei Betrachtung der Kinetik einiger Varianten deutlich (Abbildung 3.16). Die Endpunktanalyse (Abbildung 3.4) hatte nur sehr geringe Beeinträchtigungen durch die Einzelmutationen indiziert. Die Kinetik des Wildtyp- sowie des Komplementationsstammes stimmt mit der in der Literatur beschriebenen *in vivo* Photoreaktivierungskinetik anderer Stämme mit Photolyasen überein (Bennett et al., 2003; Sancar und Smith, 1989; Salcedo et al., 2007). Da die plasmidbasierte Expression keinen direkten Vergleich mit dem Wildtyp zulässt, wäre es sinnvoll, ausgewählte Varianten chromosomal und somit auf einem natürlichen Level zu exprimieren. Die Einbringung von Mutationen ist mithilfe von *counter*-selektierbaren *suicide*-Vektoren wie pLO1 (vgl. Abschnitt 4.3.5) möglich. Der resultierende Stamm würde sich lediglich in einer Punktmutation vom Wildtyp unterscheiden und wäre über die mutationsspezifische PCR (Anhang 9.4) nachweisbar. Ein Konstrukt für die Einbringung der W338F-Mutation wurde in dieser Arbeit bereits kloniert.

4.2.3 Das [4Fe4S]-Eisen-Schwefel-Cluster

Laut phylogenetischer Analysen stellen die Vertreter der FeS-BCP-Untergruppe eine evolutionär betrachtet frühe Form der CPF dar. Das FeS-Cluster ist ein altes Merkmal, das später verloren gegangen ist (Zhang et al., 2013). Die typischen Funktionen von FeS-Clustern sind Elektronenübertragung oder eine Stabilisierung des Proteins, sie kommen häufig in DNA-bindenden Proteinen vor (Abschnitt 1.11).

4.2.3.1 *In vitro* Experimente zur Entfernung des FeS-Clusters

Der Austausch von Cysteinen zu Alaninen oder anderen Aminosäuren ist die übliche Strategie zur Entfernung eines gebundenen FeS-Clusters. So kann seine Funktion anhand des verbleibenden Apoproteins untersucht werden. Alle Versuche, das FeS-Cluster durch Mutagenese an den Cystein-Bindestellen oder durch Entfernung der gesamten Bindedomäne zu destabilisieren, bewirkten im Fall von CryB eine fast vollständige Aggregation des Proteins (Abschnitt 3.4.6). Die gleiche Beobachtung wurde für AfPhrB ge-

macht, hier wurden die Cysteine durch Serine ersetzt und ebenfalls zwei unterschiedliche C-terminale Verkürzungen vorgenommen (Graf et al., 2015).

H₂O₂ ist eine von mehreren ROS, die FeS-Cluster angreifen (Abschnitt 1.12). Deshalb wurde es verwendet, um als Alternative zu den Aminosäureaustauschen das FeS-Cluster *in vitro* zu destabilisieren. Geringe Konzentrationen (1 mM), die bei IscR bereits ausreichten, das Cluster bei gleichzeitiger Erhaltung des Apoproteins zu entfernen (Remes et al., 2015), hatten bei CryB keinen Einfluss. Erhöhte Konzentrationen führten nicht lediglich zu einer Entfernung des Clusters, sondern gingen mit einer kompletten Zerstörung des Proteins einher (Abschnitt 3.4.6.5). Dass das FeS-Cluster von IscR sowohl in *E. coli* als auch in *R. sphaeroides* leicht entfernt werden kann, ist durch dessen Rolle als Sensor des Sauerstoff- und Eisenstatus in der Zelle und als globaler Regulator des Eisenmetabolismus erklärbar. Durch eine lockere und exponierte Bindung ist sein Cluster im Falle von oxidativem Stress eines der ersten, das sich seinem dem Protein löst, auf diese Weise wird seine Aktivität als transkriptioneller Repressor reguliert (Remes et al., 2015). Auch das [4Fe4S]-Cluster von FNR zerfällt bei Kontakt mit Sauerstoff (Khoroshilova et al., 1997). In diesen Fällen hat der Verlust des Clusters einen biologischen Sinn. In vielen Fällen ist die der Analyse dienende Entfernung eines gut integrierten FeS-Clusters durch Mutagenese möglich, bei gleichzeitigem Erhalt der allgemeinen Proteinstabilität, wie am Beispiel der Helikase XPD aus *Sulfolobus acidocaldarius* oder der Helikase-Nuklease AddAB aus *Bacillus subtilis* gezeigt, die durch Cystein-Austausch entfernt wurden (Rudolf et al., 2006; Yeeles et al., 2009). Die Mutagenese der Cysteine zur Koordination des [4Fe4S]-Clusters der bakteriellen Helikase DinG aus *E. coli* hingegen geht wie bei CryB mit einem starken Stabilitätsverlust einher. Ebenso wie bei CryB ist das Cluster von DinG resistent gegenüber der Oxidation durch H₂O₂. Bei der wie in dieser Arbeit als niedrigste Stufe getesteten H₂O₂-Konzentration von 1 mM (bei 10 µM DinG; hier: 17 µM CryB) zeigte sich weder eine Destabilisierung des Clusters noch des Proteins und auch kein Aktivitätsverlust (Ren et al., 2009). CryB blieb sogar bis zu einer Konzentration von 200 mM H₂O₂ stabil. Im Gegensatz dazu wird das [4Fe4S]-Cluster der Dihydroxyacid-Dehydratase aus *E. coli* bei 1 mM H₂O₂ destabilisiert und das Enzym verliert seine Aktivität (Ren et al., 2009). Bei der mit CryB sehr nah verwandten archaealen/eukaryotischen C-terminalen Domäne der großen Primase-Untereinheit (PriL-CTD) aus *S. cerevisiae* hatte der Einzelaustausch der vier Cysteine zu Alaninen nur einen geringen Effekt auf die Bindung des [4Fe4S]-Clusters und keinen Einfluss auf die Aktivität. Der Austausch des ersten und letzten Cysteins gleichzeitig bewirkte eine Entfernung des Clusters, ohne dass das Protein zerstört wurde, die *in vitro* Aktivität ohne das Cluster war dadurch jedoch stark beeinträchtigt. Der Austausch des ersten und zweiten oder des ersten und dritten Cysteins hingegen führte zu einer Unlöslichkeit des gesamten PriL-Proteins. Im Gegensatz zu CryB funktionierte hier auch die Entfernung der C-terminalen Domäne ohne das Gesamtprotein zu beeinflussen, die Primaseaktivität ging dabei verloren (Klinge et al., 2007). *In vivo* Studien zur Relevanz der vier Cysteine der gleichen Primase bestätigten die individuell unterschiedlichen Beiträge der einzelnen Cysteine für die Funktion der Primase (Liu und Huang, 2015). Da bei CryB bereits der Austausch der einzelnen Cysteine zu einer Aggregation führte, hätte die individuelle Kombination anderer Cysteine für Doppelaustausche vermutlich keinen Erfolg. Bei der großen Untereinheit der humanen Primase (p58) lässt sich das Cluster durch eine einzelne Cystein-Mutation entfernen und führt zu einer reduzierten enzymatischen Aktivität. Dies funktioniert jedoch nur, wenn p58 mit der kleinen Untereinheit p48 als Dimer vorliegt, die einzelne p58 mit Cystein-Mutation ist unlöslich (Weiner et al., 2007).

In vielen nukleinsäurebindenden Proteinen ist es üblich, dass das Cluster von großen aromatischen Aminosäuren umgeben ist, die einen möglichen Schutz vor Oxidation darstellen. Die Abschirmung von

der umgebenden Lösung macht sie weniger zugänglich für ROS. In der Helikase XPD und der DNA-Primase ist das Cluster tief eingebettet und somit weit von der Oberfläche (4 bzw. 3 Å) entfernt. Das Cluster der D-Untereinheit der RNA-Polymerase hingegen ist nur 1,7 Å von der Proteinoberfläche entfernt. Diese bessere Zugänglichkeit ist ein Hinweis für eine mögliche Aufgabe des Clusters bei der Redoxwahrnehmung (Imlay, 2006; White und Dillingham, 2012). Das FeS-Cluster von CryB ist von der Oberfläche verdeckt und hat keinen Zugang zur Umgebung (Geisselbrecht et al., 2012).

Die nicht mögliche Entfernung des FeS-Clusters von CryB lässt den eindeutigen Rückschluss zu, dass es für die strukturelle Integrität des Proteins essenziell ist. Gleichzeitig macht dies jedoch die funktionelle Analyse schwierig. Wie eingangs beschrieben haben FeS-Proteine aus der Gruppe der Regulatoren wie FNR oder IscR (vgl. Abschnitte 1.11 und 1.10.3) instabile und besser zugängliche FeS-Cluster, die die Sauerstoffwahrnehmung über Veränderungen des Clusterzustandes gewährleisten und dadurch aktiviert oder inaktiviert werden. In der Gruppe der Proteine, die Nukleinsäuren modifizieren, zu denen vor allem DNA-Reparaturenzyme wie die Endonuklease III, MutY oder die Helikasen XPD und DinG gehören, haben die Cluster oft katalytische Funktionen (Ren et al., 2009; Wu und Brosh, 2012). CryB gehört aufgrund seiner Reparaturfunktion zu der zweiten Gruppe, jedoch wird die katalytische Aktivität zweifelsfrei durch das FAD gewährleistet. Es gibt mehrere aktuelle Beispiele von FeS-Clustern in Enzymen, für die es keine offensichtliche Funktion in Elektronentransfer, Redoxwahrnehmung oder clustervermittelter Katalyse gibt (White und Dillingham, 2012).

Aufgrund der Distanz zwischen FAD und FeS-Cluster in CryB von 22,9 Å wurde eine Elektronenübertragung zwischen beiden Cofaktoren als unwahrscheinlich erachtet, dennoch wurde das Cluster nicht als möglicher Ursprung von Elektronen für das FAD ausgeschlossen (Geisselbrecht et al., 2012; Geisselbrecht, 2013). Es gibt Hinweise aus aktuellen Untersuchungen des CryB-Homologs *AfPhrB*, dass das Cluster eine Beteiligung an dem Prozess der Reparatur durch Elektronenübertragung über Tyrosine haben könnte. Y424 in *AfPhrB* liegt nahe am aktiven Zentrum und ist essenziell für die Bindung des T(6-4)T-Schadens. Ohne dieses Tyrosin findet keine DNA-Reparatur statt, was mit dem Verlust der DNA-Bindung korreliert (Graf et al., 2015). In der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* ist ebenfalls ein zentrumsnahes Tyrosin als Teil der H-H-Y-Triade für die Katalyse wichtig (Maul et al., 2008). Viel interessanter ist jedoch ein weiteres Tyrosin in *AfPhrB*, Y430, das auf halbem Weg zwischen dem Y424 des aktiven Zentrums und dem FeS-Cluster liegt. Es ist nicht an der Schadenbindung beteiligt, sein Austausch bewirkt jedoch eine um 70 % verringerte Reparatureffizienz im Vergleich zum Wildtyp. Gemeinsam könnten diese beiden Tyrosine eine Elektronenbrücke zwischen FeS-Cluster und DNA-Schaden herstellen und somit eine Beteiligung des Clusters an der DNA-Reparatur ermöglichen. Sowohl Y424 als auch Y430 sind oberflächenexponiert und haben somit Zugang zur Umgebung. Des Weiteren sind zwei periphere Tyrosine, Y437 und Y433, möglicherweise an der Verbindung des FeS-Clusters mit der Proteinoberfläche für einen Elektronenaustausch beteiligt. Interessanterweise fehlen diese beiden Tyrosine in den wenigen Mitgliedern der FeS-BCP, die vermutlich nicht über ein FeS-Cluster verfügen (Graf et al., 2015). Es wäre interessant, diese Vertreter der FeS-BCP, die kein FeS-Cluster binden, auf ihre Reparaturaktivität zu untersuchen. Dies würde Aufschluss über die Notwendigkeit des Clusters zur Reparatur in dieser Gruppe geben. Eine Übertragung von Elektronen von einem FeS-Cluster zu FAD innerhalb eines Proteinkomplexes wurde am Beispiel der Fumarat-Reduktase aus *E. coli* gezeigt (Sucheta et al., 1993). Eine Beteiligung des FeS-Clusters an der Reduktion des FAD könnte auch die Verzichtbarkeit des Elektronentransferweges über W338 (Abschnitt 4.2.1.1) erklären.

Aufgrund des Einflusses von CryB bei der Genregulation (Frühwirth et al., 2012) ist weiterhin eine Rolle des FeS-Clusters als Redoxsensor nicht auszuschließen. Auch eine Rolle bei der DNA-vermittelten Redoxsignalweiterleitung wie bei anderen Reparaturproteinen mit FeS-Cluster wäre möglich (Genereux et al., 2010; Boal et al., 2009). Eine oxidative Schädigung des Clusters scheint nicht, wie in vielen anderen FeS-Proteinen (z. B. FNR, IscR, Aconitase; Abschnitt 1.11), reversibel zu sein, sondern zerstört das Protein, daher ist eine Rolle als ROS-Sensor über den Weg der Destabilisierung des Clusters eher unwahrscheinlich.

4.2.3.2 *In vivo* Untersuchungen des FeS-Clusters

Obwohl alle Cystein-Varianten unlöslich waren, wurde CryB C434A/C437A exemplarisch in $\Delta cryB$ exprimiert, da anhand anderer CryB-Varianten bereits abweichende Erkenntnisse aus *in vivo* und *in vitro* Experimenten gewonnen worden waren (Abschnitt 4.2.1). Anhand des Western Blots (Abbildung 3.20) ist ein Vorhandensein des Proteins in $\Delta cryB$ pRK $cryB$ C434A/C437A erkennbar, zwar deutlich schwächer im Vergleich zur Komplementation $\Delta cryB$ pRK $cryB$, aber stärker als im Wildtyp, in dem CryB bei den eingesetzten Mengen nicht detektierbar ist. Photolyasen zeigen eine geringe Abundanz, eine *E. coli*-Zelle enthält beispielsweise nur 16–17 Moleküle (Kavakli und Sancar, 2004). Dennoch wird durch die Variante trotz erkennbarer Expression keine Steigerung der UV-Überlebensrate erreicht, der Stamm liegt im Bereich der Leervektorkontrolle. Somit bewirken die Mutationen einen vollständigen Funktionsverlust.

Um über einen alternativen Weg Rückschlüsse auf die Rolle des FeS-Clusters zu ziehen, wurden Photoreaktivierungsexperimente unter Eisenmangelbedingungen durchgeführt (Abschnitt 3.4.6.4). Die Verfügbarkeit von Eisen hatte keinen Einfluss auf die Endpunkt-Photoreaktivierung von *R. sphaeroides*. Für die Kinetik der Photoreaktivierung unter Eisenmangelbedingungen liegen nur Daten aus zwei Wiederholungen für -Fe und drei Wiederholungen für +Fe vor, wobei letztere stark voneinander abweichen. Die Unterschiede zwischen +Fe und -Fe sind gering. Es kann daher nicht klar daraus geschlossen werden, ob der Eisenmangel einen Einfluss auf die Reparaturrate hat. Wenn dies der Fall, ist besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass andere Prozesse in der Zelle durch den Mangel an Eisen verlangsamt sind und ein Effekt nicht nur auf ein möglicherweise fehlendes FeS-Cluster in CryB zurückzuführen ist. Auffällig ist die zusätzliche Bande bei etwa 40 kDa unter Eisenmangelbedingungen im Western Blot. Es könnte sich um ein unvollständig synthetisiertes Protein handeln, das bei ausbleibendem Clustereinbau ab der FeS-Domäne abbricht. Dennoch wird auch bei Überexpression von CryB von pRK415 eine große Menge an löslichem Protein auch unter Eisenmangel produziert (Abbildung 3.21). Daher lässt sich vermuten, dass bei der sehr viel geringeren Menge an CryB im Wildtyp-Stamm 2.4.1 ebenfalls ausreichend vollständige CryB-Moleküle produziert werden. Zudem ist das Eisenmangelmedium nicht komplett eisenfrei (Peuser et al., 2011) und wenige Moleküle CryB mit intaktem FeS-Cluster mögen ausreichend sein, um eine Reparatur zu gewährleisten.

Damit ist, neben der strukturellen Rolle, die Frage nach der Funktion nach wie vor nicht abschließend geklärt. Auch hier kann, wie bei der Beteiligung von zweiwertigen Ionen (Abschnitt 4.1.3) eine Co-Kristallisation mit DNA Aufschluss geben.

Abbildung 4.1 zeigt zusammenfassend die unterschiedlichen Auswirkungen aller in 3.3.1 und 3.4 beschriebenen Aminosäureaustausche *in vivo* und *in vitro*.

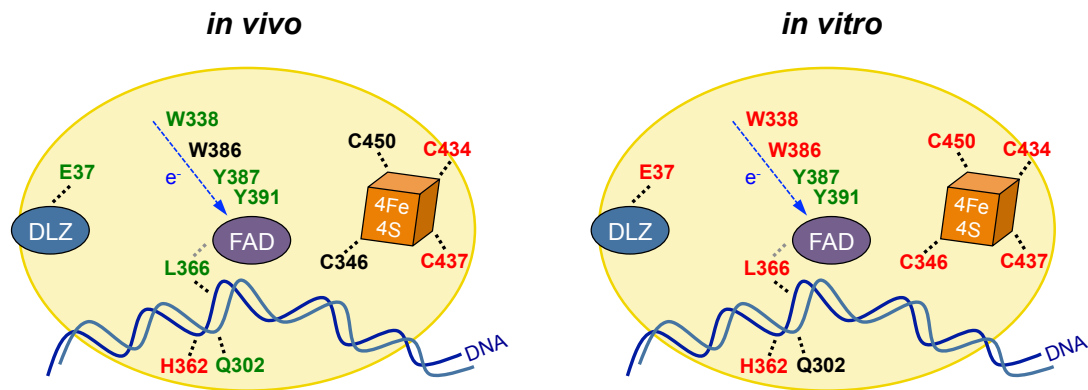


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der untersuchten Aminosäuren (AS) in CryB. *In vivo*: grün = AS ist verzichtbar für die Photoreaktivierung; rot = AS ist essenziell für die Photoreaktivierung. *In vitro*: grün = AS ist verzichtbar für die FAD-Reduktion; rot = AS ist essenziell für die Stabilität, Cofaktor-Bindung, FAD-Reduktion oder Reparatur. Schwarz = nicht untersucht. FAD = Flavin-Adenin-Dinukleotid, DLZ = 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin. Die Erkenntnisse stammen aus dieser Arbeit und aus Geisselbrecht (2013).

4.3 Untersuchungen zur *puf*- und *puc*-Expression in $\Delta cryB$ unter Einfluss von Kanamycin

Einer der auffälligsten Phänotypen von $\Delta cryB$ war seine hellere Färbung im Vergleich zum Wildtyp unter mikroaeroben Bedingungen. Dieser Unterschied basiert auf der Herabregulierung der Transkripte von *puf* und *puc*, die Komponenten des photosynthetischen Apparates kodieren. Dieser Effekt zeigte sich noch stärker in der Komplementation $\Delta cryB$ pRK*cryB* (Hendrischk et al., 2009a). Er sollte in dieser Arbeit als Referenz dienen, um verschiedene Komplementationen des Stammes $\Delta cryB$ mit veränderten CryB-Varianten zu untersuchen. Bei der Kultivierung fiel auf, dass der zuvor beschriebene Effekt der helleren Färbung bei $\Delta cryB$ ausblieb. Nur bei Zugabe des Antibiotikums Kanamycin, gegen das der Stamm $\Delta cryB$ aufgrund einer chromosomal integrierten Resistenzkassette resistent ist, trat der Effekt auf. Dies war bereits zuvor berichtet worden (Sebastian Frühwirth, persönliche Kommunikation). Um die Ursache dieser Beobachtung zu klären, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Kanamycin auf den Stamm $\Delta cryB$ untersucht. Dabei wurden ein vorhandener sowie verschiedene in dieser Arbeit generierte Kontrollstämme hinzugezogen. Durch die Neuherstellung des Stammes $\Delta cryB$ mit dem gleichen Knockout-Konstrukt wie in Hendrischk et al. (2007) konnte zunächst ausgeschlossen werden, dass der Effekt früher vorhanden war und mit der Zeit verloren gegangen ist. Dieser identische Stamm $\Delta cryB$ KmNeu zeigte genau wie $\Delta cryB$ den hellen Phänotyp in stark ausgeprägter Form nur in Anwesenheit von Kanamycin, nicht jedoch ohne (Abschnitt 3.6.3). Außerdem ist die stabile Ausprägung des Photoreaktivierungsdefektes (Abbildung 3.28) ein Zeichen für die fortwährende Wirksamkeit des Knockouts in $\Delta cryB$. Der zweite neue Kontrollstamm, $\Delta cryB$ Sp, stellt einen Knockout von *cryB* dar, der jedoch durch Insertion einer Spectinomycin-anstelle einer Kanamycin-Resistenzkassette erfolgte. Dieser Stamm zeigte weder unter An- noch unter Abwesenheit von Spectinomycin eine schwächere Pigmentierung oder verringerte *puf*- und *puc*-Level und lieferte somit den Nachweis, dass der Phänotyp nicht auf das Fehlen von CryB zurückzuführen ist.

4.3.1 Kanamycin und Spectinomycin in Bezug auf oxidativen Stress

Sowohl Kanamycin als auch Spectinomycin gehören zur Klasse der Aminocyclitol-Antibiotika. Diese Klasse umfasst Spectinomycin sowie die Gruppe der Aminoglykoside, zu denen u. a. Kanamycin, Streptomycin und Gentamicin gehören. Sie wirken als Inhibitoren der ribosomalen 30S-Untereinheit durch Bindung an die 16S rRNA. Alle Aminoglykoside, so auch Kanamycin, wirken dabei *bakterizid*, Spectinomycin hingegen *bakteriostatisch*. Obwohl das zelluläre Ziel der 30S-Untereinheit gleich ist, unterscheiden sich die Wirkmechanismen geringfügig: Spectinomycin blockiert den Initiationskomplex komplett, während Aminoglykoside diesen zwar ebenfalls blockieren, sich jedoch von Spectinomycin dadurch unterscheiden, dass sie auch Fehltranslationen von Proteinen auslösen (Kohanski et al., 2010; Davis, 1987). In einer Studie von Kohanski et al. (2007) wurde gezeigt, dass alle drei Hauptklassen der bakteriziden Antibiotika (Chinolone, β -Lactam- und Aminoglykosid-Antibiotika) die Bildung von ROS, speziell von Hydroxylradikalen, in Bakterien stimulieren, egal welchen Wirkmechanismus (Hemmung der DNA-Replikation, der Zellwandbildung bzw. der Proteinsynthese) sie aufweisen. Diese Hydroxylradikalbildung trägt zur Effizienz der Antibiotika bei. Interessanterweise induzieren die bakteriostatischen Antibiotika, somit auch Spectinomycin, *keine* Bildung von Hydroxylradikalen. Diese Beobachtungen könnten erklären, warum Spectinomycin, am Beispiel des Stammes $\Delta cryB$ Sp, keinerlei Auswirkungen hat, Kanamycin jedoch in allen in dieser Arbeit betrachteten Stämmen. Die Ergebnisse aus Kohanski et al. (2007) haben eine Relevanz für experimentelle Untersuchungen, in denen es um die Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies geht.

Die Beobachtung des mehr oder weniger stark ausgeprägten heller gefärbten Phänotyps bei Kulturen von *R. sphaeroides*-Stämmen in Anwesenheit von Kanamycin (Abschnitt 3.6), könnte somit durch kanamycininduzierten oxidativen Stress erklärt werden. Die Bildung von Hydroxylradikalen geschieht durch die Fenton-Reaktion, bei der H_2O_2 mit Eisen reagiert und OH^\bullet entsteht (Imlay et al., 1988). Eisenmangel löst in *R. sphaeroides* eine starke Aufhellung der Kulturen aus, da unter anderem Proteine der Photosynthese (z. B. Fe^{2+} im Reaktionszentrum) und der Bakteriochlorophyllsynthese (FeS-Cluster) Eisen benötigen. Dabei kann ein indirekter Effekt des Chlorophyllmangels die Herabregulierung von Photosynthesegenen sein (Peuser et al., 2011). Bei der aminoglykosidinduzierten ROS-Generierung scheinen intrazelluläre FeS-Cluster eine Eisenquelle für die Stimulation der Fenton-Reaktion zu sein (Kohanski et al., 2007). Der Effekt der Aufhellung der mit Kanamycin behandelten Kulturen könnte eine Folge dieses Eisenentzugs aus FeS-Clustern sein und bei erhöhter Kanamycinsensitivität ($\Delta cryB$, siehe Abschnitt 4.3.3) entsprechend noch stärker ausfallen. Eine Entfärbung durch Chlorophyllmangel ist ebenso bei der Behandlung von Pflanzen mit Kanamycin zu beobachten (Conte et al., 2009). Aufgrund ihres prokaryotischen Ursprungs sind die Ribosomen der Chloroplasten der Angriffspunkt für Aminoglykoside in Pflanzen. Kanamycin löst in *A. thaliana* transkriptionelle Veränderungen aus, die u. a. eine Anpassung des photosynthetischen Apparates bewirken. Außerdem ist der Eisengehalt durch den Einfluss von Kanamycin drastisch reduziert. Wie in *R. sphaeroides* wird auch in Pflanzen Eisen für die Photosynthese und Chlorophyllsynthese benötigt (Mentewab et al., 2014). Diese möglichen Zusammenhänge zwischen Eisenmangel, ROS und Antibiotika sind jedoch spekulativ, zumal die beschriebene antibiotikainduzierte ROS-Generierung aktuell umstritten ist (Van Acker und Coenye, 2017).

4.3.2 Ausschluss eines Kombinationseffektes

Dennoch blieb die Frage, warum vor allem in den $\Delta cryB$ -Stämmen mit Kanamycinresistenz eine so starke Beeinträchtigung des Photosyntheseapparates auftritt. Der hier als Kontrolle eingesetzte Stamm $\Delta phrA$

(Hendrischk et al., 2007), in welchem das Gen *phrA* durch die gleiche Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt ist wie in $\Delta cryB$, zeigt zwar auch eine leicht abgeschwächte Rotfärbung, aber in weitaus geringerem Maße als in $\Delta cryB$. Der weiterhin verwendete Kontrollstamm Wildtyp pBBR1MCS-2 ermöglichte das Wachstum des Wildtyps unter Anwesenheit von Kanamycin, aufgrund des resistenzvermittelnden Plasmids pBBR1MCS-2. Auch in diesem Stamm zeigte sich, ähnlich wie bei $\Delta phrA$, nur eine leichte Herabregulierung der *puf*- und *puc*-Transkriptlevel unter Anwesenheit von Kanamycin (Abbildung 3.30). Eine mögliche Erklärung war daher ein „Kombinationseffekt“ aus der Abwesenheit von CryB und der gleichzeitigen Anwesenheit von Kanamycin. Ein genereller Antibiotika-Einfluss wurde durch den Stamm $\Delta cryB$ Sp ausgeschlossen. In einer Studie mit *E. coli* wurde gezeigt, dass Kanamycin und Neomycin DNA-Schäden hervorrufen und dabei das Fehlen von jeweils einem von diversen DNA-Reparaturenzymen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber beiden Antibiotika führen kann (Kang et al., 2012). In der Studie verleiht das *neo*-Gen (Beck et al., 1982) dem verwendeten Wildtyp-Stamm eine Resistenz gegen eine Kanamycinkonzentration von mehr als 300 $\mu\text{g/ml}$. Die *E. coli*-Photolyase-Mutante *phrB* zeigt bereits bei 200 $\mu\text{g/ml}$ eine erhöhte Sensitivität gegenüber Kanamycin. Dennoch war es unwahrscheinlich, dass dies der Grund für die bei $\Delta cryB$ beobachteten, vergleichsweise sehr stark ausgeprägten Effekte sind. Im hier verwendeten Kontrollstamm $\Delta phrA$ ist ebenfalls eine Photolyase ausgeschaltet, der Phänotyp bei diesem Stamm aber viel geringer ausgeprägt. PhrA ist eine CPD-Photolyase, ebenso wie die in Kang et al. (2012) untersuchte einzige Photolyase (PhrB) aus *E. coli*. Es ist plausibel, dass Kanamycin in diesen Stämmen mit fehlenden Photolyasen einen Effekt hervorruft, jedoch zeigt sich ein geringer Effekt bei Anwesenheit von Kanamycin auch im Stamm Wildtyp pBBR1MCS-2, der über alle vorhandenen Reparaturmechanismen verfügt (Abschnitt 3.6.3).

Die Widerlegung des Kombinationseffektes lieferte der Kontrollstamm $\Delta cryB$ Sp pBBR1MCS-2. Dieser verfügt, anders als $\Delta cryB$, über eine *plasmidlokalisierte* Kanamycinresistenz und exprimiert kein CryB. In Anwesenheit von Kanamycin im Medium verhält sich dieser Stamm bezüglich Färbung, Chlorophyllgehalt und Expression von *puf* und *puc* wie der Wildtyp (Abschnitt 3.6.4). Somit ist nachgewiesen, dass der Phänotyp nicht aufgrund der Abwesenheit von CryB und gleichzeitiger Anwesenheit von Kanamycin zustande kommt.

4.3.3 Eingeschränkte Ausprägung der Resistenz in $\Delta cryB$

Durch die Untersuchung der Expression des Kanamycin-Resistenzgens konnte gezeigt werden, dass das Level in $\Delta cryB$ um das 3–4-Fache geringer ist als das des identischen Resistenzgens im Stamm $\Delta phrA$ (Abschnitt 3.6.5). Dieses abschließende Ergebnis legt nahe, dass die beobachteten Effekte durch eine erhöhte Kanamycinsensitivität des Stammes $\Delta cryB$ im Vergleich zu anderen resistenten Stämmen zustande kommen und somit CryB-unabhängig sind. Aufgrund der schwächeren Expression des Kanamycin-Resistenzgens ist der Stamm scheinbar weniger resistent als die untersuchten Vergleichsstämme. Somit stellt die Verwendung der normalen Kanamycinkonzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ eine Überdosierung für $\Delta cryB$ dar. Warum die Resistenz nur in diesem Stamm abgeschwächt ausgeprägt wird, ist unklar. Naheliegend wäre ein eingeschränkter Zugang bei der Transkription aufgrund der Lage der Kassette. Dies scheint jedoch bei der Ω -Sm/Sp-Kassette in $\Delta cryB$ Sp nicht der Fall zu sein, obwohl sie im gleichen Gen liegt. Durch die Kontrollsequenzierung der Kanamycin-Resistenzkassette des Knockout-Konstruktes pPHU Δ 3077 konnten Defekte im Resistenzgen ausgeschlossen werden.

4.3.4 Vergleich der Resistenzmechanismen

Ein Mechanismus, der Bakterien eine Resistenz gegen Aminoglykosid-Antibiotika verleiht, ist die enzymatische Modifikation bestimmter Amino- oder Hydroxylgruppen des Antibiotikums, wodurch das modifizierte Molekül nicht mehr an das Ribosom binden und seine Wirkung entfalten kann. Die Modifizierung kann durch *N*-Acetyltransferasen, *O*-Nukleotidyltransferasen oder *O*-Phosphotransferasen geschehen (Mingeot-Leclercq et al., 1999). In $\Delta cryB$ und $\Delta phrA$ wurden die jeweiligen Gene durch die Kanamycin-Resistenzkassette von pUC4K (Vieira und Messing, 1982) ausgeschaltet. Das Genprodukt ist in diesem Fall eine Aminoglykosid-3'Phosphotransferase (Typ I APH) vom Transposon Tn903 (Oka et al., 1981). Das Kanamycin-Resistenzgen von pBBR1MCS-2 hingegen stammt vom Tn5-Transposon (Kovach et al., 1995; Manoil und Beckwith, 1985). Die Sequenz aus Tn5 ist nicht identisch mit der aus Tn903, kodiert jedoch ebenso eine Aminoglykosid-3'Phosphotransferase, allerdings vom Typ II (Beck et al., 1982). Beide Typen zeigen Homologien in ihren Aminosäuresequenzen und eine ähnliche Länge von 271 bzw. 264 Aminosäuren. Beide Gensequenzen enthalten keinen transkriptionellen Terminator (Oka et al., 1981; Beck et al., 1982). Typ I und II deaktivieren jeweils sechs verschiedene Aminoglykosid-Antibiotika (u. a. Kanamycin), sie unterscheiden sich lediglich in einem von diesen sowie in ihrer natürlichen Verbreitung (Shaw et al., 1993). Es ist unwahrscheinlich, dass diese beiden verschiedenen Genprodukte einen Einfluss auf die Resistenz der in dieser Arbeit verwendeten Stämme haben, da der Mechanismus der Inaktivierung von Kanamycin durch dessen Modifikation gleich ist. Zudem zeigen die Stämme Wildtyp pBBR1MCS-2 und $\Delta phrA$ mit unterschiedlichen Resistenzgenen ähnliche Phänotypen (Abschnitt 3.6.3).

Möglicherweise kann es durch die Kanamycinkassette aus pUC4K aufgrund einer fehlenden transkriptionellen Terminationssequenz zu sekundären Effekten auf benachbarte Gene in Knockout-Stämmen kommen. Die Transkriptionsrichtungen von *cryB* und des inserierten Kanamycin-Resistenzgens in $\Delta cryB$ sind gleich. Das *downstream* von *cryB* liegende Gen RSP_3076 ist in entgegengesetzter Richtung orientiert, sodass es wahrscheinlich nicht zu einer Beeinflussung der Transkription dieses Gens kommt (Abbildung 4.2). Dennoch wäre es möglich, analog zum neuen Knockout $\Delta cryB_{Sp}$, für den die Ω -Sm/Sp-Kassette mit transkriptionellen und translationellen Terminationssequenzen aus pHP45 Ω (Prentki und Krisch, 1984) verwendet wurde, die davon abgeleitete Ω -Km-Kassette aus pHP45 Ω -Km (Fellay et al., 1987) für eine Kanamycinresistenz zu inserieren, anstelle der verwendeten Kanamycinkassette aus pUC4K. In $\Delta cryB_{Sp}$ ist die durch die Ω -Sm/Sp-Kassette vermittelte Spectinomycinresistenz voll funktionell (Abschnitt 3.6.3). So können sekundäre Effekte eher ausgeschlossen werden.

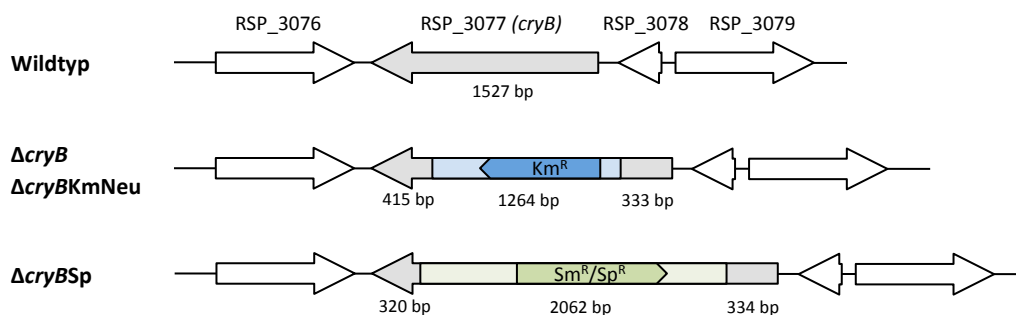


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Lage der Kanamycin- und Ω -Streptomycin/Spectinomycinkassetten im Chromosom. Hellblau = Kanamycinkassette (1264 bp), dunkelblau = Kanamycin-Resistenzgen (816 bp); hellgrün = Ω -Sm/Sp-Kassette (2062 bp), dunkelgrün = Streptomycin/Spectinomycin-Resistenzgen (1011 bp).

4.3.5 Einsatz von Antibiotika

Bei der chromosomalen Integration eines Resistenzgens zum Ausschalten eines Gens oder Operons dient die Resistenz der Selektion der Mutanten. Sie ermöglicht somit die Generierung von Knockout-Stämmen. Die Anwesenheit der Resistenz verliert jedoch nach der Herstellung des Stammes an Bedeutung, da sie nur ein Mittel zum Zweck bei der Herstellung ist. Als Nebeneffekt wird jedoch die Möglichkeit der Antibiotikazugabe genutzt, um den Stamm vor der Verwendung in einem Experiment zu selektionieren und durch das Antibiotikum von anderen Stämmen, wie dem Wildtyp, zu unterscheiden. So können auch Verwechslungen leichter ausgeschlossen werden. Dieser Vorteil wird allerdings hinfällig, sobald zwei oder mehrere Stämme mit der gleichen Resistenz parallel bearbeitet werden. Viel gravierender ist jedoch der hier beschriebene *unterschiedliche* Effekt auf kanamycinresistente Stämme. So kann man keinesfalls sicher sein, dass ein Stamm mit der gleichen Resistenz eine hinreichende Kontrolle für etwaige Effekte ist, selbst wenn beide mit gleichen Mengen des gleichen Antibiotikums angezogen werden (vgl. $\Delta cryB$ und $\Delta phrA$, Abschnitt 3.6.3).

Eine gute Alternative ist daher die Herstellung von Deletionsstämmen, bei denen der Großteil des Gens entfernt und nicht durch ein Resistenzgen ersetzt wird. Die Generierung des Knockouts erfolgt über *counter*-Selektion, beispielsweise mithilfe des Vektors pLO1 (Lenz et al., 1994). Der entstehende Stamm ist später nicht durch Antibiotikaselektion von anderen Stämmen zu unterscheiden. Es kann jedoch durch Kolonie-PCR nach dem Ausstreichen des Stammes für Experimente überprüft werden, ob es sich um den Deletionsstamm handelt, um Verwechslungen zu vermeiden. So entstehen keine sekundären Effekte durch den Einsatz von Antibiotika. Diese sekundären Effekte können jedoch in Stämmen mit chromosomalen Resistenzgenen ebenso ausgeschlossen werden, indem die Stämme vor allem in Flüssigkulturen komplett ohne das entsprechende Antibiotikum angezogen werden. Das Antibiotikum sollte bereits ab der ersten Flüssigkultur weggelassen werden, um nicht in nachfolgende Kulturen übertragen zu werden. Grundsätzlich ist jedoch zu beachten, dass durch den Knockout eines Gens, ob durch Deletion oder Ersatz, immer sekundäre Effekte auftreten können.

Es hat sich herausgestellt, dass im hier beschriebenen Fall das Antibiotikum Spectinomycin praktisch keine Auswirkung hat. Dies spricht für eine bevorzugte Verwendung von Spectinomycinresistenzen, gerade bei der Untersuchung des Photosyntheseapparates. Dennoch ist der Einsatz von Antibiotika beim Vorhandensein eines chromosomal lokalisierten Resistenzgens nicht nötig und sollte vermieden werden, da es Kombinationseffekte (Kang et al., 2012) oder unterschiedliche Resistenzausprägungen immer geben kann. Zwar ist zu vermuten, dass eine wie in $\Delta cryB$ festgestellte beeinträchtigte Resistenzausprägung eine seltene Ausnahme darstellt, dennoch hat sich durch dieses Beispiel gezeigt, dass es vorkommen kann.

4.3.6 Komplementationsstämme

Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass die erhöhte Expression von CryB im Komplementationsstamm $\Delta cryB$ pRK $cryB$ den durch den Knockout von $cryB$ beobachteten Effekt der Herabregulierung von puf und puc nicht wiederherstellt, sondern diesen im Gegenteil weiter verstärkt (Hendrischk et al., 2007). Bei den Northern-Blot-Untersuchungen zur Wirkung von Antibiotika unter mikroaeroben Bedingungen wurde auch die Leervektorkontrolle einbezogen (Abbildung 3.27). Die An- oder Abwesenheit von CryB sowie von Tetracyclin zum Erhalt der Plasmide hatte in diesen Stämmen keinen oder nur einen

geringen Einfluss auf die Transkriptlevel von *puf* und *puc*. In keiner der Kulturen befand sich Kanamycin. Dieses Experiment wurde jedoch nur einmal durchgeführt.

4.4 Expressionsanalysen unter Singulett-sauerstoffstress

Die Analyse der kleinen RNA CcsR1 (RSs0680a; Billenkamp et al., 2015) wurde in dieser Arbeit als mögliche Alternative zur Betrachtung der *puf*- und *puc*-Expression (Abschnitt 3.7.1) für nachfolgende vergleichende Untersuchungen der Stämme mit CryB-Varianten durchgeführt. CcsR1 war durch eine 4-fach höhere Expression unter aeroben Bedingungen sowie eine leicht erhöhte Induktion durch Singulett-sauerstoffstress in $\Delta cryB$ im Vergleich zum Wildtyp aufgefallen (Frühwirth et al., 2012). Zwar konnte in der vorliegenden Wiederholung eindeutig die gleiche Tendenz festgestellt werden, der Unterschied war jedoch mit einem nur 1,6-fach erhöhten Level in $\Delta cryB$ im Vergleich zum Wildtyp vor Beginn der Stress-induktion deutlich geringer. Die Stärke der Induktion nach Singulett-sauerstoffstress entspricht in beiden Stämmen etwa der in Berghoff et al. (2009) beschriebenen. Warum bei $\Delta cryB$ pRK*cryB* W338F, der Variante mit beeinträchtigter FAD-Reduktion (Abschnitt 3.4.1), eine deutlich stärkere Induktion von CcsR1 stattfindet als bei beiden Kontrollstämmen, ist unklar. Die beiden Kontrollen $\Delta cryB$ pRK*cryB* und $\Delta cryB$ pRK415 mit bzw. ohne plasmidkodiertes CryB zeigen keine deutlichen Unterschiede. Der Vergleich mit pRK-haltigen Stämmen wurde jedoch nur einmal durchgeführt. Ähnliche Ergebnisse hatten sich bei der gleichen Untersuchung im Rahmen einer Bachelorarbeit gezeigt (Hantl, 2015).

Somit hat sich, neben der Regulation von *puf* und *puc*, auch bei der sRNA CcsR1 herausgestellt, dass die Unterschiede zwischen Wildtyp und $\Delta cryB$ bzw. Komplementation und Leervektorkontrolle zu gering sind, um nachfolgende Untersuchungen durchzuführen. Die Gründe dafür sind unklar. Es ist möglich, dass sekundäre Effekte wie bei der *puf*- und *puc*-Regulation durch Kanamycin (Abschnitt 4.3) die zuvor stärker sichtbaren Unterschiede beeinflusst haben. Hier bedarf es jedoch weiteren Wiederholungen, um eine klare Aussage treffen zu können.

Besonders auffällig im Hinblick auf die Genregulationen ist das Ergebnis der RpoE-Expression durch *real-time* PCR in dieser Arbeit. Der globale Regulator RpoE ist ein alternativer Sigmafaktor der RNA-Polymerase, der vor allem bei 1O_2 -Stress aktiv ist und einige Gene reguliert, darunter auch den Sigmafaktor RpoH_{II}, der wiederum die Expression vieler 1O_2 -abhängiger Gene reguliert (Nuss et al., 2009; Abschnitt 1.12). Die zuvor beobachtete Regulation von alternativen Sigmafaktoren wie RpoE durch CryB (Frühwirth et al., 2012) erklärte den globalen Einfluss von CryB auf die Regulation vieler Gene, die deren Kontrolle unterliegen. Da die differenzielle Regulation von RpoE in $\Delta cryB$ in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte (Abbildung 3.25 B), ist unklar, ob CryB über die Regulation von RpoE unter 1O_2 -Stress einen Einfluss auf die Genexpression nimmt. Die Expression von RpoE wurde auch in den plasmidhaltigen Stämmen $\Delta cryB$ pRK*cryB*, $\Delta cryB$ pRK415 sowie $\Delta cryB$ pRK*cryB* W338F unter Singulett-sauerstoffstress untersucht (Kawen, 2014). In allen drei Stämmen zeigt sich eine vergleichbare Induktion von RpoE nach 20 Minuten Stress und somit keine differenzielle CryB-abhängige Regulation.

Da CcsR1 unter der Kontrolle eines RpoH_I/RpoH_{II}-abhängigen Promotors steht und somit nicht nur durch RpoH_{II} (und damit indirekt durch RpoE), sondern auch durch RpoH_I reguliert wird (Billenkamp et al., 2015), lässt eine Beeinflussung der Expression von CcsR1 nicht notwendigerweise Rückschlüsse auf die Aktivität von RpoE zu. Keines der in dieser Arbeit durch *real-time* PCR betrachteten Gene ist unter direkter Kontrolle des bisher bekannten RpoE-Regulons (Ziegelhoffer und Donohue, 2009). Die kürzlich charakterisierte sRNA Pos19 (RSs0019) ist die einzige bislang bekannte sRNA, die in *R. sphaero-*

ides unter direkter transkriptioneller Kontrolle von RpoE steht (Müller et al., 2016). Interessanterweise zeigt sie keine differenzielle Regulation in $\Delta cryB$ unter Singulett-Sauerstoffstress (Frühwirth, 2012).

Durch *real-time* PCR wurden außerdem die drei Gene *prxB*, *znuA* und *pufL* betrachtet (Abschnitt 3.5). Sie wurden jeweils als ein Vertreter eines herab- und herauf- bzw. eines nicht regulierten Gens in $\Delta cryB$ unter 1O_2 -Stress herangezogen (Frühwirth et al., 2012). Lediglich *pufL* erwies sich erneut als nicht reguliert, die anderen beiden Gene zeigten abweichende Tendenzen. Die im *microarray* stark differenziell regulierten Gene *coxS* und *sitC* (Frühwirth, 2012) zeigten ebenfalls nur eine geringe Regulation.

Auffällig ist außerdem die starke Expression der *puf*- und *puc*-mRNAs in beiden plasmidhaltigen Kontrollstämmen unter aeroben Bedingungen (Abbildung 3.35) vor Beginn des Singulett-Sauerstoffstresses. In diesem Fall ist die starke Abundanz sehr wahrscheinlich auf einen CryB-unabhängigen Effekt zurückzuführen, der womöglich im Zusammenhang mit den Plasmiden steht. Dieser Fall zeigt erneut die Relevanz der Leervektorkontrolle.

Möglicherweise ist der Einfluss von CryB auf die Regulation der Photosynthesegene unter mikroaeroben und 1O_2 -Bedingungen geringer als bislang angenommen. Die Expression von CryB von einem RpoH_{II}-abhängigen Promotor und somit im Zuge der 1O_2 -Stressantwort ist nicht zwangsläufig ein Hinweis darauf, dass das Protein eine Funktion als sauerstoffabhängiger Regulator besitzt. Auch die Phosphatase PhrA wird unter 1O_2 -Bedingungen direkt durch RpoE induziert. In einer Stress-Situation im Zusammenhang mit Licht ist davon auszugehen, dass neben Schäden durch 1O_2 auch direkte DNA-Schäden entstehen. Daher ist die Induktion von DNA-Reparaturproteinen in einer solchen Situation sinnvoll.

Die Regulation unter Blaulicht- und weiteren Bedingungen sollte erneut betrachtet werden. Unter phototrophen Bedingungen hat Blaulicht beispielsweise einen deutlichen, CryB-abhängigen Einfluss (Hendrischk et al., 2009a). Es ist wahrscheinlich, dass wie bei anderen Cryptochromen ein großer Teil der regulatorischen Einflussnahme von CryB durch Blaulicht vermittelt wird.

CryB-Homologe der FeS-BCP-Familie sind auch in nicht photosynthetisch aktiven Bakterien vertreten, darunter *Agrobacterium*. Bislang wurde in keiner anderen Spezies der Einfluss dieser Proteine auf die Genexpression untersucht und somit die Cryptochrom-Seite beleuchtet. Dies wäre eine interessante Frage für zukünftige Untersuchungen. Die Charakterisierung des FeS-BCP-Vertreters PhIK aus dem UV-resistenten Bakterium *Acinetobacter* sp. Ver3 (Kurth et al., 2015), könnte demnächst die Erkenntnisse erweitern.

4.5 Interaktionsanalysen

4.5.1 Assoziation von CryB mit dem Chaperon GroEL

Bei der *in vivo pulldown*-Analyse wurde eine Assoziation von CryB mit dem Chaperon GroEL festgestellt (Abschnitt 3.9). Somit sind, zusammen mit dem *small heat shock protein* RSP_1016 und dem *heat shock protein* RSP_1572 aus der Hsp20-Familie (Breitenbach, 2012), nun drei Hitzeschockproteine (Hsp) identifiziert, die zumindest bei der Überexpression von CryB mit diesem assoziiert sind. Hitzeschockproteine sind weit verbreitet und werden in Eukaryoten und Prokaryoten verstärkt bei Temperaturanstieg oder unter anderen Stresseinflüssen exprimiert, sie dienen dem Schutz und der Wiederherstellung von Proteinen (Jakob und Buchner, 1994). Auch unter Normalbedingungen spielen einige Hsp eine wichtige Rolle bei der Faltung und Reifung während der Neusynthese von Proteinen (Welch, 1993). RSP_1016 ist als molekulares Chaperon IbpA annotiert. In *E. coli* ist IbpA (16 kDa) eines von zwei *small-heat*-

shock-Proteinen. Es ist eng mit heterolog überexprimierten Proteinen in *inclusion bodies* assoziiert (Allen et al., 1992) und verhindert die Aggregation eigener Proteine bei Hitzeschock und oxidativem Stress (Kuczyńska-Wiśnik et al., 2002; Kitagawa et al., 2002). Molekulare Chaperone stellen eine große Gruppe von Proteinen dar, die bei der Faltung und dem Zusammenbau sowie dem Abbau anderer Makromoleküle (RNA oder Proteine) assistieren und dabei temporär mit diesen assoziiert sind. Manche, nicht jedoch alle Chaperone sind auch Stress- oder Hitzeschockproteine, da ihr Bedarf unter denaturierenden Bedingungen besonders hoch ist. Umgekehrt sind manche, nicht jedoch alle Stressproteine auch Chaperone (Ellis, 2006). Das bakterielle Chaperon GroEL aus *E. coli* gehört zur Unterfamilie der Chaperonine, sein eng verwandtes Homolog in eukaryotischen Organellen ist Hsp60. Es ist durch erhöhte Temperaturen induzierbar und spielt als Hitzeschockprotein unter Stressbedingungen eine zusätzliche Rolle durch die Reparatur fehlgefalteter Proteine. GroEL besteht aus einer Ringstruktur im Megadalton-Bereich und stellt eine Art Fass dar. Dieses agiert gemeinsam mit seinem Interaktionspartner GroES (Hsp10), das dabei wie ein Deckel fungiert (Horwich et al., 2007). Ein GroEL-Homolog gibt es ebenfalls in *R. sphaeroides* (Watson et al., 1990). Unter normalen Bedingungen scheinen in Bakterien lediglich 10–15 % der Gesamtproteine in der Zelle bei der Synthese eine Faltungshilfe durch das Chaperon GroEL, mit Vorarbeit durch das Chaperon DnaK (Hsp70), zu benötigen (Pfanner, 1999). Ein naheliegender Grund für die starke Assoziation von CryB mit Chaperonen bei der heterologen Expression sowie deren Co-Aufreinigung ist der Einbau des FeS-Clusters und dessen strukturelle Essenzialität (vgl. Abschnitt 4.2.3). Bei hohen Expressionsraten erfolgt die Synthese von FeS-Clustern womöglich nicht schnell genug, ohne eines ist CryB jedoch nicht stabil. Die 100%ige Besetzung von CryB mit FAD, jedoch nur zu ca. 76 % mit DLZ (Tabelle 3.2), lässt vermuten, dass auch die Abwesenheit von FAD möglicherweise eine Destabilisierung des Proteins hervorrufen würde; DLZ hingegen übt vermutlich die am wenigsten tragende Funktion aus und ist strukturell verzichtbar. Die L366-Varianten mit destabilisierter FAD-Bindung zeigen außerdem eine geringere Stabilität als das CryB Wildtyp-Protein. Der Mechanismus der Erkennung von fehlgefalteten Zielproteinen als Substrate für Komponenten der zellulären Qualitätskontrolle, wie beispielsweise Chaperone, ist nicht genau geklärt. Exponierte hydrophobe Bereiche von Polypeptiden spielen eine Rolle, sind aber nicht einzig entscheidend für die Erkennung (Shao und Hegde, 2016). Kürzlich wurde gezeigt, dass Riboflavin-, und somit Cofaktormangel, eine Destabilisierung eines großen Anteils der flavinhaltigen Enzyme verursacht (Martínez-Limón et al., 2016). Durch die Überexpression von CryB entsteht ebenso ein relativer Mangel an FAD für die großen Mengen an Proteinen in der Zelle.

Neben dieser nicht als funktionelle Interaktion einzustufenden Assoziation mit Chaperonen konnten durch den *pull-down* keine weiteren Interaktionspartner identifiziert werden.

4.5.2 CryB und AppA

In einer Studie von Metz et al. (2012a) wurde gezeigt, dass die beiden Photorezeptoren AppA und CryB aus *R. sphaeroides* miteinander interagieren. Diese Interaktion ist lichtabhängig und beeinflusst die Bindung von AppA zum transkriptionellen Repressor PpsR, wodurch die Expression verschiedener Gene indirekt durch CryB beeinflusst wird (Abschnitt 1.10.1). In dieser Arbeit wurde die Untersuchung dieser Interaktion erneut aufgegriffen, mit dem Ziel, einen Co-Kristall von AppA und CryB zu generieren. Zuvor wurden dazu einige Interaktionsexperimente durchgeführt, um geeignete Bedingungen zu ermitteln.

Bei der analytischen Gelfiltration ist das Vorhandensein von CryB in einer frühen Fraktion bei drei Läufen auf der präparativen Säule (Abbildungen 3.41 B und 3.42 B) ein Hinweis darauf, dass CryB im Komplex mit einem anderen Protein in dieser Fraktion eluiert. AppA ist in diesen Fraktionen nicht oder

nur sehr schwach zu sehen. Es ist wahrscheinlich, dass es eine Komplexbildung gibt, die möglicherweise während des Laufs nicht stabil bleibt. Die Peaks zu frühen Zeitpunkten der Elution sind meist sehr klein, sodass das darin enthaltene Protein schwer nachzuweisen ist. Wahrscheinlich ist die Interaktion zwischen AppA und CryB zu schwach, um durch Gelfiltration detektiert zu werden. Die Methode eignet sich vor allem bei einer sehr starken natürlicher Komplexbildung. In diesen Fällen ist es möglich, Interaktionen durch einfaches Mischen aufgereinigter Proteine durch diese Methode zu ermitteln. Meistens ist es jedoch nötig, Zellen sehr schonend aufzuschließen, um zuvor in der Zelle existierende Assoziationen nicht zu trennen. Auch dann jedoch eluiert ein Großteil der Proteine noch bei einem dem eigenen Molekulargewicht entsprechenden Volumen, nur ein kleiner Teil bleibt als höhermolekulare Interaktion zusammen (Beeckmans, 1999). Die Interaktionen von RpoE mit seinem Anti-Sigmafaktor ChrR sowie der RNA-Polymerase konnten beispielsweise durch Gelfiltration gezeigt werden (Anthony et al., 2004). Des Weiteren können bestimmte Bedingungen (Licht, Redox) entscheidend für die Interaktion sein. Auch die Interaktion von AppA und PpsR konnte durch Gelfiltration nachgewiesen werden. Hier spielten die Bedingungen eine deutliche Rolle. Bei Dunkelheit während des Laufs eluieren die Proteine sowohl einzeln als auch im Komplex, letzterer verschwindet in Gegenwart von Licht fast vollständig. Zudem wurde ein 4-facher Überschuss an reduziertem AppA eingesetzt. Die Komplexbildung war durch die Entstehung eines zusätzlichen Peaks erkennbar, der beide Proteine enthielt (Masuda und Bauer, 2002). In diesem Fall befinden sich die eingesetzten Konzentrationen nahe der Dissoziationskonstante (K_D) des Komplexes, geringe Schwankungen der Affinität wirken sich stark auf die Komplexbildung aus. Der Einsatz von höheren AppA-Konzentrationen als der K_D des Komplexes AppA-PpsR₂ (1,3 μ M) führten nicht zu einer Dissoziation und Licht hatte nur einen geringen Einfluss auf die AppA-PpsR-Affinität (Winkler et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich die vorherige Inkubation im Dunkeln durchgeführt, der Lauf erfolgte nicht unter Lichtausschluss. Es sind Unterschiede im Elutionsprofil von AppA, nicht jedoch in dem von CryB, in Abhängigkeit der vorherigen Behandlung des Proteingemisches mit DTT und Licht zu erkennen (Abbildung 3.41). Licht begünstigt die Interaktion von CryB und AppA, was *in vivo* deutlich anhand von *Yeast-Two-Hybrid*-Experimenten nachgewiesen wurde. Dafür ist jedoch nicht die FAD-enthaltende BLUF-Domäne zuständig (Metz et al., 2012a). Auch die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen des Elutionsprofils bei der analytischen Gelfiltration in Abhängigkeit von Licht sind aufgrund der Verwendung von AppA Δ N auf die C-terminale SCHIC-Domäne zurückzuführen. Auch wenn die Elutionsprofile keine genaue Auskunft über die Konformation der Proteine geben, wäre es möglich, dass die lichtabhängige Interaktion (Metz et al., 2012a) vom AppA-Zustand abhängig ist und nicht von CryB. Die eingesetzten CryB- und AppA-Konzentrationen bei der analytischen Gelfiltration liegen deutlich über dem K_D des Komplexes von 0,6 μ M (Metz et al., 2012a), dennoch konnte die Interaktion durch die Methode nicht deutlich gesehen werden. Obwohl das Molekulargewicht von GST-AppA Δ N (54,29 kDa) geringer ist, eluiert es früher als als His-CryB (60,32 kDa). Dies ist auch bei den Einzelaufreinigungen der Fall (Anhang Abbildung 9.2). Möglicherweise interagiert CryB in geringem Maße mit der Säulenmatrix und eluiert daher später.

Durch SAXS konnte gezeigt werden, dass die Proteine wahrscheinlich mit ihren jeweiligen C-Termini interagieren. Dies steht im Einklang mit der zuvor gezeigten Interaktion von CryB mit der C-terminalen Domäne von AppA (Metz et al., 2012a). In beiden C-terminalen Domänen befindet sich das FeS-Cluster bzw. der Häm-Cofaktor. Je nach der Position von FeS- und Häm-Cofaktoren zueinander ist ein Elektronenaustausch zwischen diesen möglich, wie bereits durch Yann Geisselbrecht (2013) vorgeschlagen. Dies wurde auch am Beispiel des Enzymkomplexes Cytochrom *bc*₁ aus *R. capsulatus* gezeigt (Sarewicz et al.,

2009). Die FeS- und Häm-Cofaktoren befinden sich dabei in verschiedenen Untereinheiten des aus drei Proteinen (Rieske FeS-Protein, Cytochrom *b*, Cytochrom *c*₁) bestehenden Komplexes (Trumpower, 1990). So ist auch bei der temporären Interaktion von Proteinen wie AppA und CryB eine Elektronenübertragung zwischen diesen beiden Cofaktoren denkbar. Die Besetzung von AppA mit Häm hat jedoch keinen Einfluss auf deren Interaktion (Metz et al., 2012a). Möglich ist jedoch auch lediglich der Nutzen der Verdrängung von PpsR durch CryB bei der Interaktion mit AppA, die ebenfalls am C-Terminus von AppA stattfindet, und die dadurch vermittelte regulatorische Funktion durch CryB. Unter reduzierenden Bedingungen in Anwesenheit von DTT begünstigt CryB durch Interaktion mit AppA dessen Loslösung von PpsR (Metz et al., 2012a). Im SAXS-Experiment wurde die Interaktion hingegen ohne DTT stabilisiert.

Die Interaktion von Cryptochromen mit anderen Proteinen ist gut untersucht. In Tieren interagieren sie beispielsweise als Bestandteile der circadianen Uhr mit anderen Proteinkomponenten. In *Drosophila* geschieht die Interaktion von CRY mit den Uhr-Proteinen PER und TIM durch den C-Terminus von CRY in Abhängigkeit von Licht (Rosato et al., 2001). Bei pflanzlichen Cryptochromen, gezeigt am Beispiel von CRY1 und CRY2 aus *Arabidopsis*, erfolgt die lichtabhängige Signalweiterleitung über ihre lange C-terminale Domäne (Yang et al., 2000). Außerdem wurde eine direkte Interaktion der C-terminalen Domänen beider Cryptochrome zu COP1, einem Regulator der Photomorphogenese, gezeigt (Wang et al., 2001). Diese zusätzlichen C-terminalen Domänen bei Cryptochromen (CCT) gehen über den in Photolyasen und Cryptochromen hochkonservierten Bereich der PHR-Domäne hinaus. Sie sind zwischen 80 und mehreren 100 Aminosäuren lang und nur wenig konserviert, bei pflanzlichen meist länger als bei tierischen Cryptochromen, fehlen aber in Cry-DASH sowie in FeS-BCP (Lin und Todo, 2005; Chaves et al., 2011; Geisselbrecht et al., 2012). Die CCT verschiedener pflanzlicher Vertreter haben ein gemeinsames DAS-Motiv, das nicht in tierischen CCT vorhanden ist. Dieses ist auch in der kurzen N-terminalen Erweiterung des DASH-Cryptochroms cry3 aus *A. thaliana* vorhanden (Klar et al., 2007), nicht jedoch bei den beiden *dual-function*-Mitgliedern PtCPF1 und OtCPF1 der Algen *P. tricornutum* und *O. tauri* (Yu et al., 2010). PtCPF1 ist aufgrund der evolutionären Entstehungsgeschichte von Diatomeen näher verwandt mit tierischen als mit pflanzlichen Cryptochromen. Durch die Interaktion mit CLOCK:BMAL Heterodimeren der circadianen Uhr regulieren sie die Transkription in einem heterologen System (Coesel et al., 2009; Heijde et al., 2010), wodurch sie ihre Cryptochrom-Funktion ausüben. PtCPF1 war das erste Beispiel eines Proteins mit (6-4)-Photolyaseaktivität, das mit Uhr-Proteinen interagiert (Coesel et al., 2009). Diese Interaktion geschieht jedoch offensichtlich zum Zwecke der Regulation und hat keine Relevanz für die Reparaturaktivität des Proteins. Die Notwendigkeit eines Protein-Interaktionspartners für Photolyasen zur Ausführung der Reparaturreaktion ist bislang nicht berichtet worden. Ebenso sind keine Interaktionspartner von Cry-DASH-Proteinen bekannt, denen die C-terminale Erweiterung fehlt. In Anbetracht der mittlerweile erfolgreich nachgewiesenen Reparaturaktivität von CryB, ohne dass dafür *in vitro* ein Interaktionspartner benötigt wird (Abschnitt 4.1.3), ist davon auszugehen, dass die Interaktion von CryB und AppA eine regulatorische Relevanz bei der Cryptochrom-Funktion des Proteins hat.

4.6 Lokalisation

CryB liegt in der Zelle größtenteils in löslicher Form vor und ist in geringem Maße auch mit Membranbereichen assoziiert; die genaue zelluläre Lokalisation von CryB ist bislang nicht bekannt (Frühwirth, 2012). Die Untersuchungen zur Lokalisation wurden in dieser Arbeit wieder aufgegriffen. Es wurde das Plasmid pBE16ScryBeCFP verwendet, durch dieses wird CryB C-terminal an eCFP fusioniert. Es konnte

ein sehr starkes an den Zellpolen konzentriertes Fluoreszenzsignal beobachtet werden (Abschnitt 3.11). Durch Verwendung der Kontrolle CryB C437A, auf gleiche Weise überexprimiert als Fusionsprotein mit eCFP, konnte gezeigt werden, dass auch diese als unlöslich bekannte Variante (Abschnitt 3.4.6.2) eine Pol-Lokalisation aufweist. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei der Ansammlung von CryB am Zellpol nicht um eine spezifische Lokalisation handelt, etwa durch eine Signalsequenz oder eine funktionale Aufgabe an den Zellpolen. Es ist zu vermuten, dass es durch die stark erhöhte Expression durch den Promotor der 16S rRNA zu einer Aggregation der Proteine und einer Ansammlung in Form von *inclusion bodies* kommt. Hohe Expressionsraten sind auch bei anderen Proteinen ein Auslöser für die Bildung von *inclusion bodies* (Georgiou et al., 1986; Williams et al., 1982). Dies kann durch das Aggregieren von Protein-Zwischenstufen während des Reifungsprozesses geschehen, wenn ein wichtiger Faktor, beispielsweise ein Cofaktor, eine Untereinheit oder ein Chaperon fehlt (Mitraki und King, 1989). Vor allem im Fall von CryB kann die starke Expression wahrscheinlich dazu führen, dass die drei Cofaktoren bei der Translation nicht schnell genug in das Protein eingebaut werden können und die Überexpression somit große Mengen an falsch gefaltetem Protein hervorbringt. Ein solcher relativer Cofaktormangel durch Überexpression des Proteins (vgl. Abschnitt 4.5.1) kann zu einer Überbeanspruchung der zellulären Qualitätskontrollsysteme führen, sodass es zu einer erhöhten Aggregation kommt (Martínez-Limón et al., 2016). Die Akkumulation von unlöslichem CryB ist auch im Western Blot bei der starken Expression im Stamm $\Delta cryB$ pRKcryB sichtbar (Abbildung 3.3). Möglicherweise findet eine Konzentration der aggregierten Proteine in Form von *inclusion bodies* statt, von welchen aufgrund des intakten eCFP ein starkes Signal ausgeht. Eine mit dem hier beschriebenen Fall vergleichbare Lokalisation von *inclusion bodies* aggregierter Proteine an den Zellpolen wurde erstmals in *E. coli* durch Fluoreszenzexperimente beobachtet (Lindner et al., 2008). Durch diese asymmetrische Aufteilung erhält bei der Zellteilung nur eine der Tochterzellen im Sinne der Gesamtpopulation das beschädigte Material, sodass die andere ohne die „Last“ besser weiterwachsen kann (Winkler et al., 2010). Auch in *Saccharomyces cerevisiae* wurde dieses Phänomen beobachtet (Coelho et al., 2014). Der Transport von Aggregaten zu den Polen und somit deren Konzentration als *large polar aggregates* (LPA) dient zunächst der schnellen Entsorgung. Im zweiten, langsameren Schritt werden die Aggregate zerlegt und die Proteine entweder wiederhergestellt und in einen löslichen Zustand überführt oder abgebaut (Rokney et al., 2009).

Durch die chromosomale Integration der Sequenz eines Fluoreszenzproteins soll in Zukunft das Problem der Überexpression des CryB-Fusionsproteins vermieden werden, um die nach wie vor offene Frage der zellulären Lokalisation zu klären. Durch das Konstrukt pNPTS138-R6KTCryBsfGFP kann die Sequenz des *superfolder Green Fluorescent Protein downstream* der cryB-Sequenz in das Chromosom inseriert und das resultierende Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des eigenen Promotors und somit unter natürlichen Bedingungen exprimiert werden (Abbildung 3.46). Es kann passieren, dass aufgrund der geringen natürlichen Expression von CryB auf diese Weise keine Lokalisation möglich ist. Die Expression vom eigenen RpoH_{II}-abhängigen Promotor lässt sich jedoch durch die Behandlung der Zellen mit oxidativem Stress erhöhen, dabei bleibt sie aber im natürlichen Rahmen. Auch wäre eine Lokalisation von CryB in Zellen unter Normalbedingungen im Vergleich zu Zellen direkt nach UV-Stress interessant. So könnte festgestellt werden, ob sich CryB aufgrund seiner Reparaturfunktion in dieser Situation verstärkt im Bereich des Nukleoids aufhält. Aufgrund der DNA-Reparaturfunktion von Photolyasen wäre eine Lokalisation im Bereich der DNA naheliegend. Die ebenfalls zu den *dual-function*-Mitgliedern zählenden Vertreter CryA aus *Aspergillus nidulans* (Fungus) sowie CPF1 aus *P. tricornutum* (Kieselalge) weisen eine Nukleus-Lokalisation auf – vermutlich, um regulatorische und DNA-Reparaturfunktionen auszuführen

(Bayram et al., 2008; Coesel et al., 2009). Auch die beiden viralen Photolyasen PHR1 und PHR2 des Baculovirus *Chrysodeixis chalcites* sind für den Nukleus der infizierten Insektenzellen bestimmt, um dort die viruseigene DNA zu reparieren, deren Replikation im Nukleus stattfindet (Xu et al., 2010). Eine weitere Möglichkeit ist die Expression von einem zur Verfügung stehenden pRK-basierten Plasmid mit IPTG-induzierbarem Promotor (Hu et al., 2010). Dadurch kann die Stärke der Expression durch die Zugabe von IPTG genau gesteuert und auf ein detektierbares Level eingestellt werden.

4.7 Fazit

Dass CryB über zwei Funktionen verfügen könnte, wurde bereits zu Beginn der Untersuchungen postuliert (Hendrischk, 2009). In dieser Zeit kamen die ersten Beispiele von Doppelfunktionen bei Proteinen der CPF auf. Neben den Vertretern der Cry-DASH-Gruppe sind mittlerweile sieben bifunktionelle Mitglieder aus verschiedenen Untergruppen der CPF bekannt (Anhang Tabelle 9.1). Aufgrund dieser geringen Anzahl lassen sich schwer Rückschlüsse auf Gemeinsamkeiten oder ein gehäuftes Vorkommen in bestimmten Gruppen oder unter bestimmten Gegebenheiten ziehen. Vier der Mitglieder stammen aus Pilzen, zwei aus Algen und eines aus Bakterien. Es gibt keinen erkennbaren Zusammenhang des Auftretens eines *dual-function*-Proteins mit dem Vorhandensein weiterer CPF-Vertreter im selben Organismus. So verfügt *Aspergillus nidulans* über ein einziges CPF-Mitglied, das beide Funktionen besitzt. Dies scheint eine effiziente Strategie, jedoch die Ausnahme zu sein. *Phaeodactylum tricornutum* hingegen verfügt über drei weitere CPF-Mitglieder aus unterschiedlichen Gruppen. Außer Cry1 aus *Trichoderma reesei* verfügt keiner der Vertreter über eine C-terminale Verlängerung wie bei den klassischen Cryptochromen. Als Antennenchromophor wurde häufig MTHF oder kein Chromophor identifiziert. Es kommt sowohl die Kombination der CPD- als auch der (6-4)-Reparatur mit regulatorischen Eigenschaften vor.

Die Entdeckung der Photolyaseaktivität von CryB steht nun auch im Einklang mit der für Photolyasen und Cry-DASH typischen vollständigen Reduzierbarkeit des FAD, das bei Cryptochromen im semichinoiden Signalfunktionszustand verbleibt (vgl. Abschnitt 1.3).

Zusammengenommen gehören alle bisher beschriebenen bakteriellen Cryptochrome zu den *dual-function*-Mitgliedern oder ssDNA-Photolyasen (aus den Gruppen Cry-DASH und FeS-BCP). Demnach sind nach wie vor noch keine klassischen „reinen“ bakteriellen Cryptochrome bekannt, wie sie in Tieren und Pflanzen vorkommen. Anhand der Häufigkeit von Gensequenzen gehören Cryptochrome, zusammen mit Rhodopsinen und PYP, zu den am wenigsten verbreiteten Blaulichtrezeptoren in Bakterien. Ihre genaue Anzahl zu bestimmen ist aufgrund ihrer Homologie zu Photolyasen schwierig. Viele Bakterien verfügen über stärker verbreitete Photorezeptoren, vor allem solche mit LOV- und BLUF-Domänen (Gomelsky und Hoff, 2011), sodass weitere möglicherweise nicht zwingend gebraucht werden. Auch in Pilzen sind weitere Blaulichtrezeptoren wie die *White Collars* (WC) üblich. Bestimmte Algengruppen (Stramenopile), zu denen auch *P. tricornutum* gehört, verfügen über einen speziellen Blaulichtrezeptor, dem Aureochrom (Takahashi et al., 2007). Es wurde spekuliert, dass die Existenz anderer Blaulichtrezeptoren möglicherweise zu einer Verlangsamung der Evolution des *dual-function*-Cryptochroms CryA aus *A. nidulans* geführt haben könnte (Bayram et al., 2008). Viele Eigenschaften der FeS-BCP sind evolutionär alt, so auch insgesamt die Reparaturaktivität der CPF, die in Cryptochromen verloren ging – daher könnte, aufgrund der Ursprünglichkeit der FeS-BCP, vermutet werden, dass die Photolyaseaktivität bei diesen Proteinen die dominierende Aufgabe ist.

5 Zusammenfassung

Photolyasen reparieren UV-induzierte Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD) oder (6-4)-Photoprodukte in der DNA durch den lichtabhängigen Prozess der Photoreaktivierung. Sie sind nah verwandt mit den Cryptochromen, die als Blaulicht-Photorezeptoren regulatorische Funktionen ausüben. Mitglieder der Cryptochrom/Photolyase-Familie (CPF) sind in allen Domänen des Lebens vertreten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Cryptochrom CryB aus *Rhodobacter sphaeroides* aus der Untergruppe der FeS-BCP neben seiner regulatorischen Funktion auch eine Reparaturaktivität zur Spaltung von (6-4)-Photoprodukten besitzt. Damit kann CryB den *dual-function*-Mitgliedern der CPF zugeordnet werden.

Durch den Austausch von Aminosäuren konnten neue Erkenntnisse über die Rolle der drei Cofaktoren von CryB bei der Photoreaktivierung gewonnen werden. Der Fokus lag dabei auf *in vivo* Untersuchungen der CryB-Varianten im Knockout-Stamm *R. sphaeroides* $\Delta cryB$. Es wurde festgestellt, dass der Elektronentransferweg über die Tryptophan-Diade, die essenziell für die *in vitro* Reduktion des FAD und die Reparaturfunktion von CryB ist, für die *in vivo* Photoreaktivierung verzichtbar ist. Der in der CPF neuartige Antennenchromophor 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (DLZ) ist bei geringen Lichtintensitäten von Bedeutung für eine effiziente Reparatur. Die Entfernung oder Beeinträchtigung einer der lichtabsorbierenden Cofaktoren, FAD oder DLZ, bewirkte keinen Funktionsverlust, jedoch eine stark verringerte Effizienz der Photoreaktivierung. Die Beeinträchtigung beider Cofaktoren zusammen durch Mutagenese verringerte die CryB-abhängige Photoreaktivierungsfähigkeit auf das Level von $\Delta cryB$.

Ein Eisen-Schwefel-Cluster kommt als Cofaktor von Photolyasen und Cryptochromen nur in der FeS-BCP-Untergruppe vor. Es konnte gezeigt werden, dass das Cluster für die strukturelle Integrität des Proteins unverzichtbar ist. Seine Funktion bei der DNA-Reparatur oder bei regulatorischen Prozessen ist nicht abschließend geklärt, dies bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Kultivierung verschiedener *cryB*-Knockoutstämme in An- und Abwesenheit von Antibiotika hat ergeben, dass Kanamycin einen deutlich stärkeren Einfluss auf den kanamycinresistenten Stamm $\Delta cryB$ hat, als dies bei anderen kanamycinresistenten Stämmen der Fall ist. Der Stamm zeigt vermutlich aufgrund einer eingeschränkten Expression seines Resistenzgens eine erhöhte Sensitivität gegenüber Kanamycin. Ein zuvor unter mikroaeroben Bedingungen beobachteter Phänotyp ist somit wahrscheinlich auf einen durch Kanamycin beeinflussten Effekt zurückzuführen.

CryB interagiert mit dem Photorezeptor AppA. Durch Interaktionsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Proteine wahrscheinlich an ihren jeweiligen C-Termini miteinander interagieren. Eine Co-Kristallisation war bislang nicht erfolgreich; weitere Versuche können in Zukunft Aufschluss über Details der Interaktion geben.

6 Summary

Photolyases repair UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) or (6-4) photoproducts in DNA through the light-dependent process of photoreactivation. They are closely related to the cryptochrome blue light photoreceptors, which carry out regulatory functions. Members of the cryptochrome/photolyase family (CPF) are present in all domains of life. This study demonstrates that *Rhodobacter sphaeroides* cryptochrome CryB, belonging to the sub-group of FeS-BCP, exhibits a repair activity allowing cleavage of (6-4) photoproducts in addition to its regulatory function. Thus, CryB can be assigned to the dual function members of the CPF.

Through amino acid exchanges, new insights about the role of the three cofactors of CryB in photoreactivation were obtained. The focus of this work was on *in vivo* investigations of the CryB variants in the knockout strain *R. sphaeroides* $\Delta cryB$. It was found that the electron transfer pathway via a tryptophane diad, which is crucial for *in vitro* reduction of FAD and the repair function of CryB, is not required for *in vivo* photoreactivation. The novel antenna chromophore of the CPF, 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine (DLZ), is of importance for an efficient repair at low light intensities. Removal or impairment of one of the two light-absorbing cofactors, FAD or DLZ, did not cause a loss of function, but strongly affected the efficiency of photoreactivation. The impairment of both cofactors together through mutagenesis decreased CryB-dependent photoreactivation to the level of $\Delta cryB$.

The occurrence of an iron-sulfur cluster as a cofactor of photolyases and cryptochromes is restricted to the FeS-BCP sub-group. It could be shown that the cluster is indispensable for the structural integrity of the protein. Its function in DNA repair or in regulatory processes has not yet been conclusively settled, this requires further investigations.

The cultivation of different knockout strains of CryB in presence or absence of antibiotics has shown that kanamycin has a much stronger influence on the kanamycin-resistant strain $\Delta cryB$ than on other strains resistant to kanamycin. This strain shows an increased sensitivity towards kanamycin, probably due to a decreased expression of its resistance gene. A phenotype previously observed under microaerobic conditions thus probably results from a kanamycin-induced effect.

CryB interacts with the photoreceptor AppA. Interaction analyses could show that both proteins probably interact at their respective C-termini. A co-crystallisation has not been successful, but further attempts may give information about details of their interaction in the future.

7 Literaturverzeichnis

- Aagaard, J. und Sistrom, W. R. (1972).** Control of synthesis of reaction center bacteriochlorophyll in photosynthetic bacteria. *Photochem Photobiol*, 15(2): 209–25.
- Ahmad, M. und Cashmore, A. R. (1993).** *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 366(6451): 162–6.
- Ahmad, M., Jarillo, J. A., Klimczak, L. J., Landry, L. G., Peng, T., Last, R. L. und Cashmore, A. R. (1997).** An enzyme similar to animal type II photolyases mediates photoreactivation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 9(2): 199–207.
- Allen, S. P., Polazzi, J. O., Gierse, J. K. und Easton, A. M. (1992).** Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 174(21): 6938–47.
- Alwine, J. C., Kemp, D. J. und Stark, G. R. (1977).** Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12): 5350–4.
- Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G. L. und Thornton, J. M. (2008).** Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J Biol Inorg Chem*, 13(8): 1205–18.
- Anthony, J. R., Newman, J. D. und Donohue, T. J. (2004).** Interactions between the *Rhodobacter sphaeroides* ECF sigma factor, σ^E , and its anti-sigma factor, ChrR. *J Mol Biol*, 341(2): 345–60.
- Anthony, J. R., Warczak, K. L. und Donohue, T. J. (2005).** A transcriptional response to singlet oxygen, a toxic byproduct of photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(18): 6502–7.
- Aubert, C., Mathis, P., Eker, A. P. und Brettel, K. (1999).** Intraprotein electron transfer between tyrosine and tryptophan in DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(10): 5423–7.
- Aubert, C., Vos, M. H., Mathis, P., Eker, A. P. und Brettel, K. (2000).** Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature*, 405(6786): 586–90.
- Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Kis, K. und Richter, G. (2000).** Biosynthesis of vitamin B₂ (riboflavin). *Annu Rev Nutr*, 20: 153–67.
- Balland, V., Byrdin, M., Eker, A. P., Ahmad, M. und Brettel, K. (2009).** What makes the difference between a cryptochrome and DNA photolyase? A spectroelectrochemical comparison of the flavin redox transitions. *J Am Chem Soc*, 131(2): 426–7.
- Barsanti, L. und Gualtieri, P. (2005).** *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Boca Raton: CRC Press, 135–158.
- Bayram, Ö., Biesemann, C., Krappmann, S., Galland, P. und Braus, G. H. (2008).** More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Mol Biol Cell*, 19(8): 3254–62.
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E. A., Reiss, B. und Schaller, H. (1982).** Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene*, 19(3): 327–36.
- Beeckmans, S. (1999).** Chromatographic methods to study protein-protein interactions. *Methods*, 19(2): 278–305.
- Beinert, H., Kennedy, M. C. und Stout, C. D. (1996).** Aconitase as iron-sulfur protein, enzyme, and iron-regulatory protein. *Chem Rev*, 96(7): 2335–2374.

- Bennett, C. J., Webb, M., Willer, D. O. und Evans, D. H. (2003).** Genetic and phylogenetic characterization of the type II cyclobutane pyrimidine dimer photolyases encoded by Leporipoxviruses. *Virology*, 315(1): 10–9.
- Berghoff, B. A., Glaeser, J., Sharma, C. M., Vogel, J. und Klug, G. (2009).** Photooxidative stress-induced and abundant small RNAs in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol*, 74(6): 1497–512.
- Berman, H., Henrick, K. und Nakamura, H. (2003).** Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat Struct Biol*, 10(12): 980.
- Berrocal-Tito, G. M., Esquivel-Naranjo, E. U., Horwitz, B. A. und Herrera-Estrella, A. (2007).** *Trichoderma atroviride* PHR1, a fungal photolyase responsible for DNA repair, autoregulates its own photoinduction. *Eukaryot Cell*, 6(9): 1682–92.
- Billenkamp, F., Peng, T., Berghoff, B. A. und Klug, G. (2015).** A cluster of four homologous small RNAs modulates C₁ metabolism and the pyruvate dehydrogenase complex in *Rhodobacter sphaeroides* under various stress conditions. *J Bacteriol*, 197(10): 1839–52.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7(6): 1513–23.
- Blankenship, R. E. (2014).** *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. 2. Aufl. Hoboken: Wiley-Blackwell.
- Bluhm, B. H. und Dunkle, L. D. (2008).** *PHL1* of *Cercospora zeaе-maydis* encodes a member of the photolyase/cryptochrome family involved in UV protection and fungal development. *Fungal Genet Biol*, 45(10): 1364–72.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987).** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2): 93–99.
- Boal, A. K., Genereux, J. C., Sontz, P. A., Gralnick, J. A., Newman, D. K. und Barton, J. K. (2009).** Redox signaling between DNA repair proteins for efficient lesion detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(36): 15 237–42.
- Bouly, J. P., Schleicher, E., Dionisio-Sese, M., Vandenbussche, F., Van Der Straeten, D., Bakrim, N., Meier, S., Batschauer, A., Galland, P., Bittl, R. und Ahmad, M. (2007).** Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. *J Biol Chem*, 282(13): 9383–91.
- Braatsch, S., Gomelsky, M., Kuphal, S. und Klug, G. (2002).** A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol*, 45(3): 827–36.
- Braatsch, S. und Klug, G. (2004a).** Blue light perception in bacteria. *Photosynth Res*, 79(1): 45–57.
- Braatsch, S. und Klug, G. (2004b).** ORF90, a Gene Required for Photoreactivation in *Rhodobacter capsulatus* SB1003 Encodes a Cyclobutane Pyrimidine Dimer Photolyase. *Photosynth Res*, 79(2): 167–77.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248–54.
- Brautigam, C. A., Smith, B. S., Ma, Z., Palnitkar, M., Tomchick, D. R., Machius, M. und Deisenhofer, J. (2004).** Structure of the photolyase-like domain of cryptochrome 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(33): 12 142–7.
- Breitenbach, J. (2012).** Rolle der Blaulichtrezeptoren LOV und CryB in *R. sphaeroides*. Masterarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Brettel, K. und Byrdin, M. (2010).** Reaction mechanisms of DNA photolyase. *Curr Opin Struct Biol*, 20(6): 693–701.
- Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V. A., Todo, T., Tainer, J. A. und Getzoff, E. D. (2003).** Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Mol Cell*, 11(1): 59–67.
- Bryant, D. A. und Frigaard, N. U. (2006).** Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends Microbiol*, 14(11): 488–96.

- Brych, A., Mascarenhas, J., Jaeger, E., Charkiewicz, E., Pokorny, R., Bölker, M., Doehlemann, G. und Batschauer, A. (2015). White collar 1-induced photolyase expression contributes to UV-tolerance of *Ustilago maydis*. *Microbiologyopen*, 5(2): 224–243.
- Byrdin, M., Lukacs, A., Thiagarajan, V., Eker, A. P., Brettel, K. und Vos, M. H. (2010). Quantum yield measurements of short-lived photoactivation intermediates in DNA photolyase: toward a detailed understanding of the triple tryptophan electron transfer chain. *J Phys Chem A*, 114(9): 3207–14.
- Byrdin, M., Sartor, V., Eker, A. P., Vos, M. H., Aubert, C., Brettel, K. und Mathis, P. (2004). Intraprotein electron transfer and proton dynamics during photoactivation of DNA photolyase from *E. coli*: review and new insights from an “inverse” deuterium isotope effect. *Biochim Biophys Acta*, 1655(1-3): 64–70.
- Cabiscol, E., Tamarit, J. und Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol*, 3(1): 3–8.
- Cadet, J., Sage, E. und Douki, T. (2005). Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res*, 571(1-2): 3–17.
- Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y. J. und Liu, D. (1999). Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, 284(5415): 760–5.
- Castrillo, M., Bernhardt, A., Ávalos, J., Batschauer, A. und Pokorny, R. (2015). Biochemical characterization of the DASH-type cryptochrome CryD from *Fusarium fujikuroi*. *Photochem Photobiol*, 91(6): 1356–67.
- Castrillo, M., García-Martínez, J. und Avalos, J. (2013). Light-dependent functions of the *Fusarium fujikuroi* CryD DASH cryptochrome in development and secondary metabolism. *Appl Environ Microbiol*, 79(8): 2777–88.
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L. O., van der Horst, G. T., Batschauer, A. und Ahmad, M. (2011). The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu Rev Plant Biol*, 62: 335–64.
- Cheng, Z., Li, K., Hammad, L. A., Karty, J. A. und Bauer, C. E. (2014). Vitamin B₁₂ regulates photosystem gene expression via the CrtJ antirepressor AerR in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Microbiol*, 91(4): 649–64.
- Choudhary, M. und Kaplan, S. (2000). DNA sequence analysis of the photosynthesis region of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Nucleic Acids Res*, 28(4): 862–7.
- Church, G. M. und Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(7): 1991–5.
- Coelho, M., Lade, S. J., Alberti, S., Gross, T. und Tolić, I. M. (2014). Fusion of protein aggregates facilitates asymmetric damage segregation. *PLoS Biol*, 12(6): e1001886.
- Coesel, S., Mangogna, M., Ishikawa, T., Heijde, M., Rogato, A., Finazzi, G., Todo, T., Bowler, C. und Falciatore, A. (2009). Diatom PtCPF1 is a new cryptochrome/photolyase family member with DNA repair and transcription regulation activity. *EMBO Rep*, 10(6): 655–61.
- Cogdell, R. J., Howard, T. D., Bittl, R., Schlodder, E., Geisenheimer, I. und Lubitz, W. (2000). How carotenoids protect bacterial photosynthesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 355(1402): 1345–9.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W. und Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70(11): 3240–4.
- Conte, S., Stevenson, D., Furner, I. und Lloyd, A. (2009). Multiple antibiotic resistance in Arabidopsis is conferred by mutations in a chloroplast-localized transport protein. *Plant Physiol*, 151(2): 559–73.
- Cowan, J. A. (1998). Metal activation of enzymes in nucleic acid biochemistry. *Chem Rev*, 98(3): 1067–1088.
- Daiyasu, H., Ishikawa, T., Kuma, K., Iwai, S., Todo, T. und Toh, H. (2004). Identification of cryptochrome DASH from vertebrates. *Genes Cells*, 9(5): 479–95.
- Danna, K. und Nathans, D. (1971). Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of Hemophilus influenzae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68(12): 2913–7.

- Das, K. C. und Das, C. K. (2000).** Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: redox independent functions. *Biochem Biophys Res Commun*, 277(2): 443–7.
- Davies, M. J. (2004).** Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem Photobiol Sci*, 3(1): 17–25.
- Davis, B. D. (1987).** Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol Rev*, 51(3): 341–50.
- De Riso, V., Raniello, R., Maumus, F., Rogato, A., Bowler, C. und Falciatore, A. (2009).** Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Nucleic Acids Res*, 37(14): e96.
- Decamps, L., Philmus, B., Benjdia, A., White, R., Begley, T. P. und Berteau, O. (2012).** Biosynthesis of F₀, precursor of the F₄₂₀ cofactor, requires a unique two radical-SAM domain enzyme and tyrosine as substrate. *J Am Chem Soc*, 134(44): 18 173–6.
- Ding, H., Hidalgo, E. und Demple, B. (1996).** The redox state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor. *J Biol Chem*, 271(52): 33 173–5.
- Dong, C., Elsen, S., Swem, L. R. und Bauer, C. E. (2002).** AerR, a second aerobic repressor of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol*, 184(10): 2805–14.
- Donovan, R. S., Robinson, C. W. und Glick, B. R. (1996).** Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *J Ind Microbiol*, 16(3): 145–54.
- Douki, T., Reynaud-Angelin, A., Cadet, J. und Sage, E. (2003).** Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry*, 42(30): 9221–6.
- Douki, T. und Sage, E. (2016).** Dewar valence isomers, the third type of environmentally relevant DNA photoproducts induced by solar radiation. *Photochem Photobiol Sci*, 15(1): 24–30.
- Drews, G. (1983).** *Mikrobiologisches Praktikum*. Heidelberg: Springer.
- Dufour, Y. S., Kiley, P. J. und Donohue, T. J. (2010).** Reconstruction of the core and extended regulons of global transcription factors. *PLoS Genet*, 6(7): e1001 027.
- Dulbecco, R. (1949).** Reactivation of ultra-violet-inactivated bacteriophage by visible light. *Nature*, 163(4155): 949.
- Eker, A. P., Kooiman, P., Hessels, J. K. und Yasui, A. (1990).** DNA photoreactivating enzyme from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J Biol Chem*, 265(14): 8009–15.
- Ellis, R. J. (2006).** Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends Biochem Sci*, 31(7): 395–401.
- Engelhard, C., Wang, X., Robles, D., Moldt, J., Essen, L. O., Batschauer, A., Bittl, R. und Ahmad, M. (2014).** Cellular metabolites enhance the light sensitivity of *Arabidopsis* cryptochrome through alternate electron transfer pathways. *Plant Cell*, 26(11): 4519–31.
- Eraso, J. M. und Kaplan, S. (1994).** *prpA*, a putative response regulator involved in oxygen regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol*, 176(1): 32–43.
- Erbakan, M., Curtis, B. S., Nixon, B. T., Kumar, M. und Curtis, W. R. (2015).** Advancing *Rhodobacter sphaeroides* as a platform for expression of functional membrane proteins. *Protein Expr Purif*, 115: 109–17.
- Ernst, O. P., Lodowski, D. T., Elstner, M., Hegemann, P., Brown, L. S. und Kandori, H. (2014).** Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms. *Chem Rev*, 114(1): 126–63.
- Faraji, S. und Dreuw, A. (2014).** Physicochemical mechanism of light-driven DNA repair by (6-4) photolyases. *Annu Rev Phys Chem*, 65: 275–92.
- Faraji, S., Zhong, D. und Dreuw, A. (2016).** Characterization of the intermediate in and identification of the repair mechanism of (6-4) photolesions by photolyases. *Angew Chem Int Ed Engl*, 55(17): 5175–8.

- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983).** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, 132(1): 6–13.
- Fellay, R., Frey, J. und Krisch, H. (1987).** Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of gram-negative bacteria. *Gene*, 52(2-3): 147–54.
- Friedberg, E. C. (2003).** DNA damage and repair. *Nature*, 421(6921): 436–40.
- Froehlich, A. C., Chen, C. H., Belden, W. J., Madeti, C., Roenneberg, T., Merrow, M., Loros, J. J. und Dunlap, J. C. (2010).** Genetic and molecular characterization of a cryptochrome from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*, 9(5): 738–50.
- Frühwirth, S. (2012).** Der Blaulichtrezeptor Cryptochrom B aus *Rhodobacter sphaeroides* und dessen Einfluss auf licht- und sauerstoffabhängige Regulationswege. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Frühwirth, S., Teich, K. und Klug, G. (2012).** Effects of the cryptochrome CryB from *Rhodobacter sphaeroides* on global gene expression in the dark or blue light or in the presence of singlet oxygen. *PLoS One*, 7(4): e33 791.
- Fujihashi, M., Numoto, N., Kobayashi, Y., Mizushima, A., Tsujimura, M., Nakamura, A., Kawarabayasi, Y. und Miki, K. (2007).** Crystal structure of archaeal photolyase from *Sulfolobus tokodaii* with two FAD molecules: implication of a novel light-harvesting cofactor. *J Mol Biol*, 365(4): 903–10.
- Gao, J., Wang, X., Zhang, M., Bian, M., Deng, W., Zuo, Z., Yang, Z., Zhong, D. und Lin, C. (2015).** Trp triad-dependent rapid photoreduction is not required for the function of *Arabidopsis* CRY1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(29): 9135–40.
- Gao, P., Yoo, S. H., Lee, K. J., Rosensweig, C., Takahashi, J. S., Chen, B. P. und Green, C. B. (2013).** Phosphorylation of the cryptochrome 1 C-terminal tail regulates circadian period length. *J Biol Chem*, 288(49): 35 277–86.
- García-Esquivel, M., Esquivel-Naranjo, E. U., Hernández-Oñate, M. A., Ibarra-Laclette, E. und Herrera-Estrella, A. (2016).** The *Trichoderma atroviride* cryptochrome/photolyase genes regulate the expression of *blr1*-independent genes both in red and blue light. *Fungal Biol*, 120(4): 500–12.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. und Bairoch, A. (2003).** ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, 31(13): 3784–8.
- Geisselbrecht, Y. (2013).** Strukturelle und funktionelle Charakterisierung eines neuartigen bakteriellen Cryptochroms sowie Analysen von mikrobiellen Photolyasen. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Geisselbrecht, Y., Frühwirth, S., Schroeder, C., Pierik, A. J., Klug, G. und Essen, L. O. (2012).** CryB from *Rhodobacter sphaeroides*: a unique class of cryptochromes with new cofactors. *EMBO Rep*, 13(3): 223–9.
- Genereux, J. C., Boal, A. K. und Barton, J. K. (2010).** DNA-mediated charge transport in redox sensing and signaling. *J Am Chem Soc*, 132(3): 891–905.
- Georgiou, G., Telford, J. N., Shuler, M. L. und Wilson, D. B. (1986).** Localization of inclusion bodies in *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or alkaline phosphatase. *Appl Environ Microbiol*, 52(5): 1157–61.
- Gibbs, P. E., Borden, A. und Lawrence, C. W. (1995).** The T-T pyrimidine (6-4) pyrimidinone UV photoproduct is much less mutagenic in yeast than in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 23(11): 1919–22.
- Giovani, B., Byrdin, M., Ahmad, M. und Brettel, K. (2003).** Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nat Struct Biol*, 10(6): 489–90.
- Glaeser, J. und Klug, G. (2005).** Photo-oxidative stress in *Rhodobacter sphaeroides*: protective role of carotenoids and expression of selected genes. *Microbiology*, 151(Pt 6): 1927–38.
- Glas, A. F., Kaya, E., Schneider, S., Heil, K., Fazio, D., Maul, M. J. und Carell, T. (2010).** DNA (6-4) photolyases reduce Dewar isomers for isomerization into (6-4) lesions. *J Am Chem Soc*, 132(10): 3254–5.
- Glas, A. F., Maul, M. J., Cryle, M., Barends, T. R., Schneider, S., Kaya, E., Schlichting, I. und Carell, T. (2009a).** The archaeal cofactor F₀ is a light-harvesting antenna chromophore in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(28): 11 540–5.

- Glas, A. F., Schneider, S., Maul, M. J., Hennecke, U. und Carell, T. (2009b).** Crystal structure of the T(6-4)C lesion in complex with a (6-4) DNA photolyase and repair of UV-induced (6-4) and Dewar photolesions. *Chemistry*, 15(40): 10 387–96.
- Gomelsky, L., Moskvin, O. V., Stenzel, R. A., Jones, D. F., Donohue, T. J. und Gomelsky, M. (2008).** Hierarchical regulation of photosynthesis gene expression by the oxygen-responsive PrrBA and AppA-PpsR systems of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol*, 190(24): 8106–14.
- Gomelsky, L., Sram, J., Moskvin, O. V., Horne, I. M., Dodd, H. N., Pemberton, J. M., McEwan, A. G., Kaplan, S. und Gomelsky, M. (2003).** Identification and *in vivo* characterization of PpaA, a regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology*, 149(Pt 2): 377–88.
- Gomelsky, M. und Hoff, W. D. (2011).** Light helps bacteria make important lifestyle decisions. *Trends Microbiol*, 19(9): 441–8.
- Gomelsky, M. und Kaplan, S. (1995).** *appA*, a novel gene encoding a *trans*-acting factor involved in the regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol*, 177(16): 4609–18.
- Gomelsky, M. und Kaplan, S. (1998).** AppA, a redox regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, is a flavoprotein. Identification of a novel fad binding domain. *J Biol Chem*, 273(52): 35 319–25.
- Gomelsky, M. und Klug, G. (2002).** BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem Sci*, 27(10): 497–500.
- Graf, D., Wesslowski, J., Ma, H., Scheerer, P., Krauß, N., Oberpichler, I., Zhang, F. und Lamparter, T. (2015).** Key amino acids in the bacterial (6-4) photolyase PhrB from *Agrobacterium fabrum*. *PLoS One*, 10(10): e0140 955.
- Graham, D. E., Xu, H. und White, R. H. (2003).** Identification of the 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin synthase required for coenzyme F₄₂₀ biosynthesis. *Arch Microbiol*, 180(6): 455–64.
- Green, J., Crack, J. C., Thomson, A. J. und LeBrun, N. E. (2009).** Bacterial sensors of oxygen. *Curr Opin Microbiol*, 12(2): 145–51.
- Gregor, J. und Klug, G. (1999).** Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light. *FEMS Microbiol Lett*, 179(1): 1–9.
- Gressel, J. (1979).** Blue light photoreception. *Photochemistry and Photobiology*, 30(6): 749–754.
- Guérout, M., Picot, D., Abi-Ghanem, J., Hartmann, B. und Baaden, M. (2010).** How cations can assist DNase I in DNA binding and hydrolysis. *PLoS Comput Biol*, 6(11): e1001 000.
- Guzmán-Moreno, J., Flores-Martínez, A., Briebe, L. G. und Herrera-Estrella, A. (2014).** The *Trichoderma reesei* Cry1 protein is a member of the cryptochrome/photolyase family with 6-4 photoproduct repair activity. *PLoS One*, 9(6): e100 625.
- Haker, A., Hendriks, J., Gensch, T., Hellingwerf, K. und Crielgaard, W. (2000).** Isolation, reconstitution and functional characterisation of the *Rhodobacter sphaeroides* photoactive yellow protein. *FEBS Lett*, 486(1): 52–6.
- Han, Y. (2006).** Integration of redox and light signals by the regulator protein AppA in *Rhodobacter sphaeroides*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Han, Y., Meyer, M. H., Keusgen, M. und Klug, G. (2007).** A haem cofactor is required for redox and light signalling by the AppA protein of *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol*, 64(4): 1090–104.
- Hantl, H. D. (2015).** Die Rolle des Blaulichtrezeptors CryB und dessen Cofaktor FAD bei der lichtabhängigen DNA-Reparatur und Regulationsprozessen in *Rhodobacter sphaeroides*. Bachelorarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Happ, H. N., Braatsch, S., Broschek, V., Osterloh, L. und Klug, G. (2005).** Light-dependent regulation of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 is coordinately controlled by photosynthetic electron transport via the PrrBA two-component system and the photoreceptor AppA. *Mol Microbiol*, 58(3): 903–14.

- Heijde, M., Zabulon, G., Corellou, F., Ishikawa, T., Brazard, J., Usman, A., Sanchez, F., Plaza, P., Martin, M., Falciatore, A., Todo, T., Bouget, F. Y. und Bowler, C. (2010). Characterization of two members of the cryptochrome/photolyase family from *Ostreococcus tauri* provides insights into the origin and evolution of cryptochromes. *Plant Cell Environ*, 33(10): 1614–26.
- Hendrischk, A. K. (2009). Charakterisierung möglicher Blaulichtrezeptoren in *Rhodobacter sphaeroides*: Funktion und Regulation von Photolyase/Cryptochromhomologen und eines LOV Domänen Proteins. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Hendrischk, A. K., Braatsch, S., Glaeser, J. und Klug, G. (2007). The *phrA* gene of *Rhodobacter sphaeroides* encodes a photolyase and is regulated by singlet oxygen and peroxide in a σ^E -dependent manner. *Microbiology*, 153(Pt 6): 1842–51.
- Hendrischk, A. K., Frühwirth, S. W., Moldt, J., Pokorny, R., Metz, S., Kaiser, G., Jäger, A., Batschauer, A. und Klug, G. (2009a). A cryptochrome-like protein is involved in the regulation of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol*, 74(4): 990–1003.
- Hendrischk, A. K., Moldt, J., Frühwirth, S. W. und Klug, G. (2009b). Characterization of an unusual LOV domain protein in the α -proteobacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Photochem Photobiol*, 85(5): 1254–9.
- Hitomi, K., DiTacchio, L., Arvai, A. S., Yamamoto, J., Kim, S. T., Todo, T., Tainer, J. A., Iwai, S., Panda, S. und Getzoff, E. D. (2009). Functional motifs in the (6-4) photolyase crystal structure make a comparative framework for DNA repair photolyases and clock cryptochromes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(17): 6962–7.
- Hitomi, K., Kim, S. T., Iwai, S., Harima, N., Otsoshi, E., Ikenaga, M. und Todo, T. (1997). Binding and catalytic properties of *Xenopus* (6-4) photolyase. *J Biol Chem*, 272(51): 32 591–8.
- Hitomi, K., Nakamura, H., Kim, S. T., Mizukoshi, T., Ishikawa, T., Iwai, S. und Todo, T. (2001). Role of two histidines in the (6-4) photolyase reaction. *J Biol Chem*, 276(13): 10 103–9.
- Hitomi, K., Okamoto, K., Daiyasu, H., Miyashita, H., Iwai, S., Toh, H., Ishiura, M. und Todo, T. (2000). Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Nucleic Acids Res*, 28(12): 2353–62.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R. und Stüber, D. (1988). Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Nat Biotech*, 6(11): 1321–1325.
- Horsfall, M. J. und Lawrence, C. W. (1994). Accuracy of replication past the T-C (6-4) adduct. *J Mol Biol*, 235(2): 465–71.
- Horwich, A. L., Fenton, W. A., Chapman, E. und Farr, G. W. (2007). Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23: 115–45.
- Hsu, D. S., Zhao, X., Zhao, S., Kazantsev, A., Wang, R. P., Todo, T., Wei, Y. F. und Sancar, A. (1996). Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *Biochemistry*, 35(44): 13 871–7.
- Hu, X., Damjanović, A., Ritz, T. und Schulten, K. (1998). Architecture and mechanism of the light-harvesting apparatus of purple bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11): 5935–41.
- Hu, Z., Zhao, Z., Pan, Y., Tu, Y. und Chen, G. (2010). A powerful hybrid *puc* operon promoter tightly regulated by both IPTG and low oxygen level. *Biochemistry (Mosc)*, 75(4): 519–2.
- Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Han, I. S., Larsen, E. und Briggs, W. R. (1997). *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science*, 278(5346): 2120–3.
- Hübner, P., Masepohl, B., Klipp, W. und Bickle, T. A. (1993). *nif* gene expression studies in *Rhodobacter capsulatus*: *ntrC*-independent repression by high ammonium concentrations. *Mol Microbiol*, 10(1): 123–32.
- Hura, G. L., Menon, A. L., Hammel, M., Rambo, R. P., Poole, n., F. L., Tsutakawa, S. E., Jenney, J., F. E., Classen, S., Frankel, K. A., Hopkins, R. C., Yang, S. J., Scott, J. W., Dillard, B. D., Adams, M. W. und Tainer, J. A. (2009). Robust, high-throughput solution structural analyses by small angle X-ray scattering (SAXS). *Nat Methods*, 6(8): 606–12.

- Ikehata, H. und Ono, T. (2011). The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res*, 52(2): 115–25.
- Imam, S., Noguera, D. R. und Donohue, T. J. (2014). Global analysis of photosynthesis transcriptional regulatory networks. *PLoS Genet*, 10(12): e1004837.
- Imhoff, J. F. (2006). The Phototrophic Alpha-Proteobacteria. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. und Stackenbrandt, E., Hrsg. *The Prokaryotes*. 3. Aufl. New York: Springer, 5:41-64.
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*, 57: 395–418.
- Imlay, J. A. (2006). Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol*, 59(4): 1073–82.
- Imlay, J. A., Chin, S. M. und Linn, S. (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*, 240(4852): 640–2.
- Iseki, M., Matsunaga, S., Murakami, A., Ohno, K., Shiga, K., Yoshida, K., Sugai, M., Takahashi, T., Hori, T. und Watanabe, M. (2002). A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature*, 415(6875): 1047–51.
- Jäger, A., Braatsch, S., Habertzettl, K., Metz, S., Osterloh, L., Han, Y. und Klug, G. (2007). The AppA and PpsR proteins from *Rhodobacter sphaeroides* can establish a redox-dependent signal chain but fail to transmit blue-light signals in other bacteria. *J Bacteriol*, 189(6): 2274–82.
- Jakob, U. und Buchner, J. (1994). Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem Sci*, 19(5): 205–11.
- Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D. und Johnson, M. K. (2005). Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem*, 74: 247–81.
- Johnson, J. L., Hamm-Alvarez, S., Payne, G., Sancar, G. B., Rajagopalan, K. V. und Sancar, A. (1988). Identification of the second chromophore of *Escherichia coli* and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(7): 2046–50.
- Joosten, V. und van Berkel, W. J. (2007). Flavoenzymes. *Curr Opin Chem Biol*, 11(2): 195–202.
- Juhas, M., von Zadow, A., Spexard, M., Schmidt, M., Kottke, T. und Büchel, C. (2014). A novel cryptochrome in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* influences the regulation of light-harvesting protein levels. *FEBS J*, 281(9): 2299–311.
- Kamiya, H., Iwai, S. und Kasai, H. (1998). The (6-4) photoproduct of thymine-thymine induces targeted substitution mutations in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 26(11): 2611–7.
- Kang, T. M., Yuan, J., Nguyen, A., Becket, E., Yang, H. und Miller, J. H. (2012). The aminoglycoside antibiotic kanamycin damages DNA bases in *Escherichia coli*: caffeine potentiates the DNA-damaging effects of kanamycin while suppressing cell killing by ciprofloxacin in *Escherichia coli* and *Bacillus anthracis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(6): 3216–23.
- Kao, Y. T., Saxena, C., Wang, L., Sancar, A. und Zhong, D. (2005). Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(45): 16128–32.
- Kavakli, I. H., Baris, I., Tardu, M., Gül, S., Öner, H., Çal, S., Bulut, S., Yarpurvar, D., Berkel, C., Ustaoglu, P. und Aydın, C. (2017). The photolyase/cryptochrome family of proteins as DNA repair enzymes and transcriptional repressors. *Photochem Photobiol*, 93(1): 93–103.
- Kavakli, I. H. und Sancar, A. (2004). Analysis of the role of intraprotein electron transfer in photoreactivation by DNA photolyase in vivo. *Biochemistry*, 43(48): 15103–10.
- Kawen, N. (2014). Die Rolle des Blaulichtrezeptors CryB bei der lichtabhängigen DNA-Reparatur und Regulationsprozessen in *Rhodobacter sphaeroides*. Bachelorarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D. und Trollinger, D. (1988). Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene*, 70(1): 191–7.

- Kelner, A. (1949a).** Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces griseus* conidia from ultra-violet irradiation injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 35(2): 73–9.
- Kelner, A. (1949b).** Photoreactivation of ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*, with special reference to the dose-reduction principle and to ultraviolet-induced mutation. *J Bacteriol*, 58(4): 511–22.
- Khoroshilova, N., Popescu, C., Munck, E., Beinert, H. und Kiley, P. J. (1997).** Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(12): 6087–92.
- Kiley, P. J. und Beinert, H. (1998).** Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol Rev*, 22(5): 341–52.
- Kiley, P. J. und Beinert, H. (2003).** The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 6(2): 181–5.
- Kiley, P. J. und Kaplan, S. (1988).** Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiol Rev*, 52(1): 50–69.
- Kim, S. T., Heelis, P. F. und Sancar, A. (1992).** Energy transfer (deazaflavin→FADH₂) and electron transfer (FADH₂→T<>T) kinetics in *Anacystis nidulans* photolyase. *Biochemistry*, 31(45): 11 244–8.
- Kim, S. T. und Sancar, A. (1991).** Effect of base, pentose, and phosphodiester backbone structures on binding and repair of pyrimidine dimers by *Escherichia coli* DNA photolyase. *Biochemistry*, 30(35): 8623–30.
- Kiontke, S. (2012).** Strukturbasierte Charakterisierung von Klasse II CPD Photolyasen. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Kiontke, S., Geisselbrecht, Y., Pokorny, R., Carell, T., Batschauer, A. und Essen, L. O. (2011).** Crystal structures of an archaeal class II DNA photolyase and its complex with UV-damaged duplex DNA. *EMBO J*, 30(21): 4437–49.
- Kiontke, S., Gnau, P., Haselsberger, R., Batschauer, A. und Essen, L. O. (2014).** Structural and evolutionary aspects of antenna chromophore usage by class II photolyases. *J Biol Chem*, 289(28): 19 659–69.
- Kis, K., Volk, R. und Bacher, A. (1995).** Biosynthesis of riboflavin. Studies on the reaction mechanism of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *Biochemistry*, 34(9): 2883–92.
- Kitagawa, M., Miyakawa, M., Matsumura, Y. und Tsuchido, T. (2002).** *Escherichia coli* small heat shock proteins, lbpA and lbpB, protect enzymes from inactivation by heat and oxidants. *Eur J Biochem*, 269(12): 2907–17.
- Klar, T., Pokorny, R., Moldt, J., Batschauer, A. und Essen, L. O. (2007).** Cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*: structural and functional analysis of its complex with a folate light antenna. *J Mol Biol*, 366(3): 954–64.
- Kleine, T., Lockhart, P. und Batschauer, A. (2003).** An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *Plant J*, 35(1): 93–103.
- Klinge, S., Hirst, J., Maman, J. D., Krude, T. und Pellegrini, L. (2007).** An iron-sulfur domain of the eukaryotic primase is essential for RNA primer synthesis. *Nat Struct Mol Biol*, 14(9): 875–7.
- Kobayashi, K., Kanno, S., Smit, B., van der Horst, G. T., Takao, M. und Yasui, A. (1998).** Characterization of photolyase/blue-light receptor homologs in mouse and human cells. *Nucleic Acids Res*, 26(22): 5086–92.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. und Collins, J. J. (2010).** How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*, 8(6): 423–35.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A. und Collins, J. J. (2007).** A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5): 797–810.
- Kondoh, M., Shiraishi, C., Müller, P., Ahmad, M., Hitomi, K., Getzoff, E. D. und Terazima, M. (2011).** Light-induced conformational changes in full-length *Arabidopsis thaliana* cryptochrome. *J Mol Biol*, 413(1): 128–37.
- Konzer, A. (2008).** Analyse eines LOV Domänen Proteins und putativer Cryptochrome und deren Rolle bei der Regulation von Photosynthesegenen in *Rhodobacter sphaeroides*. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.

- Körner, H., Sofia, H. J. und Zumft, W. G. (2003).** Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev*, 27(5): 559–92.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, n., R. M. und Peterson, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166(1): 175–6.
- Kuczyńska-Wiśnik, D., Kędzierska, S., Matuszewska, E., Lund, P., Taylor, A., Lipińska, B. und Laskowska, E. (2002).** The *Escherichia coli* small heat-shock proteins IbpA and IbpB prevent the aggregation of endogenous proteins denatured *in vivo* during extreme heat shock. *Microbiology*, 148(Pt 6): 1757–65.
- Kurth, D., Belfiore, C., Gorriti, M. F., Cortez, N., Farias, M. E. und Albarracín, V. H. (2015).** Genomic and proteomic evidences unravel the UV-resistome of the poly-extremophile *Acinetobacter* sp. Ver3. *Front Microbiol*, 6: 328.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680–5.
- Lassak, J., Henche, A. L., Binnenkade, L. und Thormann, K. M. (2010).** ArcS, the cognate sensor kinase in an atypical Arc system of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol*, 76(10): 3263–74.
- Lawrence, C. W., Gibbs, P. E., Borden, A., Horsfall, M. J. und Kilbey, B. J. (1993).** Mutagenesis induced by single UV photoproducts in *E. coli* and yeast. *Mutat Res*, 299(3-4): 157–63.
- Le Pecq, J. B. und Paoletti, C. (1966).** A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Anal Biochem*, 17(1): 100–7.
- LeClerc, J. E., Borden, A. und Lawrence, C. W. (1991).** The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone(6-4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transitions in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(21): 9685–9.
- Lenz, O., Schwartz, E., Dervedde, J., Eitinger, M. und Friedrich, B. (1994).** The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation. *J Bacteriol*, 176(14): 4385–93.
- Li, J., Liu, Z., Tan, C., Guo, X., Wang, L., Sancar, A. und Zhong, D. (2010).** Dynamics and mechanism of repair of ultraviolet-induced (6-4) photoproduct by photolyase. *Nature*, 466(7308): 887–890.
- Li, X., Wang, Q., Yu, X., Liu, H., Yang, H., Zhao, C., Liu, X., Tan, C., Klejnot, J., Zhong, D. und Lin, C. (2011).** Arabidopsis cryptochrome 2 (CRY2) functions by the photoactivation mechanism distinct from the tryptophan (trp) triad-dependent photoreduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(51): 20 844–9.
- Li, Y. F., Heelis, P. F. und Sancar, A. (1991).** Active site of DNA photolyase: tryptophan-306 is the intrinsic hydrogen atom donor essential for flavin radical photoreduction and DNA repair *in vitro*. *Biochemistry*, 30(25): 6322–9.
- Li, Y. F., Kim, S. T. und Sancar, A. (1993).** Evidence for lack of DNA photoreactivating enzyme in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(10): 4389–93.
- Lin, C., Ahmad, M., Gordon, D. und Cashmore, A. R. (1995).** Expression of an *Arabidopsis* cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue, UV-A, and green light. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(18): 8423–7.
- Lin, C. und Todo, T. (2005).** The cryptochromes. *Genome Biol*, 6(5): 220.
- Lindner, A. B., Madden, R., Demarez, A., Stewart, E. J. und Taddei, F. (2008).** Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(8): 3076–81.
- Liu, B., Liu, H., Zhong, D. und Lin, C. (2010).** Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors. *Curr Opin Plant Biol*, 13(5): 578–86.
- Liu, H. und Naismith, J. H. (2008).** An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol*, 8: 91.
- Liu, H., Yu, X., Li, K., Klejnot, J., Yang, H., Lisiero, D. und Lin, C. (2008).** Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis*. *Science*, 322(5907): 1535–9.

- Liu, L. und Huang, M. (2015).** Essential role of the iron-sulfur cluster binding domain of the primase regulatory subunit Pri2 in DNA replication initiation. *Protein Cell*, 6(3): 194–210.
- Liu, Z., Tan, C., Guo, X., Kao, Y. T., Li, J., Wang, L., Sancar, A. und Zhong, D. (2011).** Dynamics and mechanism of cyclobutane pyrimidine dimer repair by DNA photolyase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(36): 14 831–6.
- Liu, Z., Wang, L. und Zhong, D. (2015).** Dynamics and mechanisms of DNA repair by photolyase. *Phys Chem Chem Phys*, 17(18): 11 933–49.
- Losi, A. und Gärtner, W. (2012).** The evolution of flavin-binding photoreceptors: an ancient chromophore serving trendy blue-light sensors. *Annu Rev Plant Biol*, 63: 49–72.
- Losi, A., Mandalari, C. und Gärtner, W. (2015).** The Evolution and Functional Role of Flavin-based Prokaryotic Photoreceptors. *Photochem Photobiol*, 91(5): 1021–31.
- Lucas-Lledó, J. I. und Lynch, M. (2009).** Evolution of mutation rates: phylogenomic analysis of the photolyase/cryptochrome family. *Mol Biol Evol*, 26(5): 1143–53.
- Ma, H., Zhang, F., Ignatz, E., Suehnel, M., Xue, P., Scheerer, P., Essen, L. O., Krauß, N. und Lamparter, T. (2017).** Divalent cations increase DNA repair activities of bacterial (6-4) photolyases. *Photochem Photobiol*, 93(1): 323–330.
- Mackenzie, C., Eraso, J. M., Choudhary, M., Roh, J. H., Zeng, X., Bruscella, P., Puskás, A. und Kaplan, S. (2007).** Postgenomic adventures with *Rhodobacter sphaeroides*. *Annu Rev Microbiol*, 61: 283–307.
- Malhotra, K., Kim, S. T., Batschauer, A., Dawut, L. und Sancar, A. (1995).** Putative blue-light photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity. *Biochemistry*, 34(20): 6892–9.
- Malhotra, K., Kim, S. T., Walsh, C. und Sancar, A. (1992).** Roles of FAD and 8-hydroxy-5-deazaflavin chromophores in photoreactivation by *Anacystis nidulans* DNA photolyase. *J Biol Chem*, 267(22): 15 406–11.
- Maniatis, T., Jeffrey, A. und van deSande, H. (1975).** Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry*, 14(17): 3787–94.
- Mank, N. N., Berghoff, B. A., Hermanns, Y. N. und Klug, G. (2012).** Regulation of bacterial photosynthesis genes by the small noncoding RNA PcrZ. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(40): 16 306–11.
- Manoil, C. und Beckwith, J. (1985).** TnphoA: a transposon probe for protein export signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(23): 8129–33.
- Martínez-Limón, A., Alriquet, M., Lang, W. H., Calloni, G., Wittig, I. und Vabulas, R. M. (2016).** Recognition of enzymes lacking bound cofactor by protein quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(43): 12 156–12 161.
- Masuda, S. und Bauer, C. E. (2002).** AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Cell*, 110(5): 613–23.
- Maul, M. J., Barends, T. R., Glas, A. F., Cryle, M. J., Domratcheva, T., Schneider, S., Schlichting, I. und Carell, T. (2008).** Crystal structure and mechanism of a DNA (6-4) photolyase. *Angew Chem Int Ed Engl*, 47(52): 10 076–80.
- Mees, A., Klar, T., Gnau, P., Hennecke, U., Eker, A. P., Carell, T. und Essen, L. O. (2004).** Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair. *Science*, 306(5702): 1789–93.
- Mentewab, A., Matheson, K., Adebisi, M., Robinson, S. und Elston, B. (2014).** RNA-seq analysis of the effect of kanamycin and the ABC transporter AtWBC19 on *Arabidopsis thaliana* seedlings reveals changes in metal content. *PLoS One*, 9(10): e109 310.
- Meselson, M. und Yuan, R. (1968).** DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature*, 217(5134): 1110–4.
- Metz, S., Haberzettl, K., Frühwirth, S., Teich, K., Hasewinkel, C. und Klug, G. (2012a).** Interaction of two photoreceptors in the regulation of bacterial photosynthesis genes. *Nucleic Acids Res*, 40(13): 5901–9.
- Metz, S., Jäger, A. und Klug, G. (2012b).** Role of a short light, oxygen, voltage (LOV) domain protein in blue light- and singlet oxygen-dependent gene regulation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology*, 158(Pt 2): 368–79.

- Miller, V. L. und Mekalanos, J. J. (1988). A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J Bacteriol*, 170(6): 2575–83.
- Minato, S. und Werbin, H. (1972). Excitation and fluorescence spectra of the chromophore associated with the DNA-photoreactivating enzyme from the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Photochem Photobiol*, 15(1): 97–100.
- Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y. und Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(4): 727–37.
- Mitraki, A. und King, J. (1989). Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Nat Biotech*, 7(7): 690–697.
- Moskvin, O. V., Gomelsky, L. und Gomelsky, M. (2005). Transcriptome analysis of the *Rhodobacter sphaeroides* PpsR regulon: PpsR as a master regulator of photosystem development. *J Bacteriol*, 187(6): 2148–56.
- Moskvin, O. V., Kaplan, S., Gilles-Gonzalez, M. A. und Gomelsky, M. (2007). Novel heme-based oxygen sensor with a revealing evolutionary history. *J Biol Chem*, 282(39): 28 740–8.
- Müller, K. M., Berghoff, B. A., Eisenhardt, B. D., Remes, B. und Klug, G. (2016). Characteristics of Pos19 – a small coding RNA in the oxidative stress response of *Rhodobacter sphaeroides*. *PLoS One*, 11(9): e0163 425.
- Nakajima, S., Sugiyama, M., Iwai, S., Hitomi, K., Otoshi, E., Kim, S. T., Jiang, C. Z., Todo, T., Britt, A. B. und Yamamoto, K. (1998). Cloning and characterization of a gene (*UVR3*) required for photorepair of 6-4 photoproducts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res*, 26(2): 638–44.
- Newton, C. R., Graham, A., Heptinstall, L. E., Powell, S. J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J. C. und Markham, A. F. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*, 17(7): 2503–16.
- Nsa, I. Y., Karunarathna, N., Liu, X., Huang, H., Boettger, B. und Bell-Pedersen, D. (2015). A novel cryptochrome-dependent oscillator in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 199(1): 233–45.
- Nuss, A. M., Glaeser, J., Berghoff, B. A. und Klug, G. (2010). Overlapping alternative sigma factor regulons in the response to singlet oxygen in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol*, 192(10): 2613–23.
- Nuss, A. M., Glaeser, J. und Klug, G. (2009). RpoH_{II} activates oxidative-stress defense systems and is controlled by RpoE in the singlet oxygen-dependent response in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol*, 191(1): 220–30.
- Oberpichler, I., Pierik, A. J., Wesslowski, J., Pokorny, R., Rosen, R., Vugman, M., Zhang, F., Neubauer, O., Ron, E. Z., Batschauer, A. und Lamparter, T. (2011). A photolyase-like protein from *Agrobacterium tumefaciens* with an iron-sulfur cluster. *PLoS One*, 6(10): e26 775.
- Oh, J. I. und Kaplan, S. (2000). Redox signaling: globalization of gene expression. *EMBO J*, 19(16): 4237–47.
- Oh, J. I., Ko, I. J. und Kaplan, S. (2001). The default state of the membrane-localized histidine kinase PrrB of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 is in the kinase-positive mode. *J Bacteriol*, 183(23): 6807–14.
- Oka, A., Sugisaki, H. und Takanami, M. (1981). Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *J Mol Biol*, 147(2): 217–26.
- Öztürk, N., Kao, Y. T., Selby, C. P., Kavakli, I. H., Partch, C. L., Zhong, D. und Sancar, A. (2008). Purification and characterization of a type III photolyase from *Caulobacter crescentus*. *Biochemistry*, 47(39): 10 255–61.
- Öztürk, N., Selby, C. P., Zhong, D. und Sancar, A. (2014). Mechanism of photosignaling by *Drosophila* cryptochrome: role of the redox status of the flavin chromophore. *J Biol Chem*, 289(8): 4634–42.
- Park, H. W., Kim, S. T., Sancar, A. und Deisenhofer, J. (1995). Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *Science*, 268(5219): 1866–72.
- Paulus, B., Illarionov, B., Nohr, D., Roellinger, G., Kacprzak, S., Fischer, M., Weber, S., Bacher, A. und Schleicher, E. (2014). One protein, two chromophores: comparative spectroscopic characterization of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine and riboflavin bound to lumazine protein. *J Phys Chem B*, 118(46): 13 092–105.

- Payne, G. und Sancar, A. (1990).** Absolute action spectrum of E-FADH₂ and E-FADH₂-MTHF forms of *Escherichia coli* DNA photolyase. *Biochemistry*, 29(33): 7715–27.
- Payne, G., Wills, M., Walsh, C. und Sancar, A. (1990).** Reconstitution of *Escherichia coli* photolyase with flavins and flavin analogues. *Biochemistry*, 29(24): 5706–11.
- Pédelacq, J. D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C. und Waldo, G. S. (2006).** Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 24(1): 79–88.
- Penfold, R. J. und Pemberton, J. M. (1994).** Sequencing, chromosomal inactivation, and functional expression in *Escherichia coli* of *ppsR*, a gene which represses carotenoid and bacteriochlorophyll synthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol*, 176(10): 2869–76.
- Petersen, J. L. und Ronan, P. J. (2010).** Critical role of 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin for photoreactivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*, 285(42): 32 467–75.
- Petersen, J. L. und Small, G. D. (2001).** A gene required for the novel activation of a class II DNA photolyase in *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res*, 29(21): 4472–81.
- Peuser, V., Metz, S. und Klug, G. (2011).** Response of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* to iron limitation and the role of a Fur orthologue in this response. *Environ Microbiol Rep*, 3(3): 397–404.
- Pfaffl, M. W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9): e45.
- Pfanner, N. (1999).** Protein folding: Who chaperones nascent chains in bacteria? *Curr Biol*, 9(19): R720–4.
- Pokorny, R., Klar, T., Essen, L. O. und Batschauer, A. (2005).** Crystallization and preliminary X-ray analysis of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 61(Pt 10): 935–8.
- Pokorny, R., Klar, T., Hennecke, U., Carell, T., Batschauer, A. und Essen, L. O. (2008).** Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(52): 21 023–7.
- Porello, S. L., Cannon, M. J. und David, S. S. (1998).** A substrate recognition role for the [4Fe-4S]²⁺ cluster of the DNA repair glycosylase MutY. *Biochemistry*, 37(18): 6465–75.
- Prentki, P. und Krisch, H. M. (1984).** In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene*, 29(3): 303–13.
- Purcell, E. B. und Crosson, S. (2008).** Photoregulation in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol*, 11(2): 168–78.
- Rabilloud, T., Vuillard, L., Gilly, C. und Lawrence, J. J. (1994).** Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 40(1): 57–75.
- Rauhut, R. und Klug, G. (1999).** mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 23(3): 353–70.
- Remes, B., Berghoff, B. A., Förstner, K. U. und Klug, G. (2014).** Role of oxygen and the OxyR protein in the response to iron limitation in *Rhodobacter sphaeroides*. *BMC Genomics*, 15: 794.
- Remes, B., Eisenhardt, B. D., Srinivasan, V. und Klug, G. (2015).** IscR of *Rhodobacter sphaeroides* functions as repressor of genes for iron-sulfur metabolism and represents a new type of iron-sulfur-binding protein. *Microbiologyopen*, 4(5): 790–802.
- Ren, B., Duan, X. und Ding, H. (2009).** Redox control of the DNA damage-inducible protein DinG helicase activity via its iron-sulfur cluster. *J Biol Chem*, 284(8): 4829–35.
- Rockwell, N. C., Su, Y. S. und Lagarias, J. C. (2006).** Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 837–58.
- Rokney, A., Shagan, M., Kessel, M., Smith, Y., Rosenshine, I. und Oppenheim, A. B. (2009).** *E. coli* transports aggregated proteins to the poles by a specific and energy-dependent process. *J Mol Biol*, 392(3): 589–601.

- Rosato, E., Codd, V., Mazzotta, G., Piccin, A., Zordan, M., Costa, R. und Kyriacou, C. P. (2001). Light-dependent interaction between *Drosophila* CRY and the clock protein PER mediated by the carboxy terminus of CRY. *Curr Biol*, 11(12): 909–17.
- Rudolf, J., Makrantonis, V., Ingledew, W. J., Stark, M. J. und White, M. F. (2006). The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Mol Cell*, 23(6): 801–8.
- Rupert, C. S. (1960). Photoreactivation of transforming DNA by an enzyme from bakers' yeast. *J Gen Physiol*, 43: 573–95.
- Rupert, C. S., Goodgal, S. H. und Herriott, R. M. (1958). Photoreactivation in vitro of ultraviolet-inactivated *Hemophilus influenzae* transforming factor. *J Gen Physiol*, 41(3): 451–71.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839): 487–91.
- Salcedo, I., Andrade, J. A., Quiroga, J. M. und Nebot, E. (2007). Photoreactivation and dark repair in UV-treated microorganisms: effect of temperature. *Appl Environ Microbiol*, 73(5): 1594–600.
- Sancar, A. (1996). No "End of History" for photolyases. *Science*, 272(5258): 48–9.
- Sancar, A. (2003). Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev*, 103(6): 2203–37.
- Sancar, A. (2008). Structure and function of photolyase and *in vivo* enzymology: 50th anniversary. *J Biol Chem*, 283(47): 32 153–7.
- Sancar, G. B. (1985). Expression of a *Saccharomyces cerevisiae* photolyase gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 161(2): 769–71.
- Sancar, G. B. und Sancar, A. (2006). Purification and characterization of DNA photolyases. *Methods Enzymol*, 408: 121–56.
- Sancar, G. B. und Smith, F. W. (1989). Interactions between yeast photolyase and nucleotide excision repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Mol Cell Biol*, 9(11): 4767–76.
- Sarewicz, M., Dutka, M., Froncisz, W. und Osyczka, A. (2009). Magnetic interactions sense changes in distance between heme b_L and the iron-sulfur cluster in cytochrome bc_1 . *Biochemistry*, 48(24): 5708–20.
- Sauguet, L., Klinge, S., Perera, R. L., Maman, J. D. und Pellegrini, L. (2010). Shared active site architecture between the large subunit of eukaryotic primase and DNA photolyase. *PLoS One*, 5(4): e10 083.
- Saxena, C., Wang, H., Kavakli, I. H., Sancar, A. und Zhong, D. (2005). Ultrafast dynamics of resonance energy transfer in cryptochrome. *J Am Chem Soc*, 127(22): 7984–5.
- Scheerer, P., Zhang, F., Kalms, J., von Stetten, D., Krauß, N., Oberpichler, I. und Lamparter, T. (2015). The class III cyclobutane pyrimidine dimer photolyase structure reveals a new antenna chromophore binding site and alternative photoreduction pathways. *J Biol Chem*, 290(18): 11 504–14.
- Schleicher, E., Hitomi, K., Kay, C. W., Getzoff, E. D., Todo, T. und Weber, S. (2007). Electron nuclear double resonance differentiates complementary roles for active site histidines in (6-4) photolyase. *J Biol Chem*, 282(7): 4738–47.
- Schmoll, M., Esquivel-Naranjo, E. U. und Herrera-Estrella, A. (2010). *Trichoderma* in the light of day – physiology and development. *Fungal Genet Biol*, 47(11): 909–16.
- Selby, C. P. und Sancar, A. (1990). Molecular mechanisms of DNA repair inhibition by caffeine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(9): 3522–5.
- Selby, C. P. und Sancar, A. (2006). A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(47): 17 696–700.

- Selby, C. P. und Sancar, A. (2012). The second chromophore in *Drosophila* photolyase/cryptochrome family photoreceptors. *Biochemistry*, 51(1): 167–71.
- Shalitin, D., Yang, H., Mockler, T. C., Maymon, M., Guo, H., Whitelam, G. C. und Lin, C. (2002). Regulation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature*, 417(6890): 763–7.
- Shao, S. und Hegde, R. S. (2016). Target selection during protein quality control. *Trends Biochem Sci*, 41(2): 124–37.
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S. und Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev*, 57(1): 138–63.
- Shinohara, A. und Ogawa, T. (1995). Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(10): 387–391.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D. und Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*, 7: 539.
- Simon, R., Priefer, U. und Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *In vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio-Technology*, 1(9): 784–791.
- Sims, L. M. und Igarashi, R. Y. (2012). Regulation of the ATPase activity of ABCE1 from *Pyrococcus abyssi* by Fe-S cluster status and Mg²⁺: implication for ribosomal function. *Arch Biochem Biophys*, 524(2): 114–22.
- Sinha, R. P. und Häder, D. P. (2002). UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci*, 1(4): 225–36.
- Smith, D. B. und Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67(1): 31–40.
- Spiro, S. und Guest, J. R. (1990). FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev*, 6(4): 399–428.
- Spudich, J. L. und Bogomolni, R. A. (1984). Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. *Nature*, 312(5994): 509–13.
- Stein, J. C. (2013). Die Rolle der Cofaktoren im Blaulichtrezeptor CryB von *Rhodobacter sphaeroides*. Bachelorarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Sucheta, A., Cammack, R., Weiner, J. und Armstrong, F. A. (1993). Reversible electrochemistry of fumarate reductase immobilized on an electrode surface. Direct voltammetric observations of redox centers and their participation in rapid catalytic electron transport. *Biochemistry*, 32(20): 5455–65.
- Tagua, V. G., Pausch, M., Eckel, M., Gutiérrez, G., Miralles-Durán, A., Sanz, C., Eslava, A. P., Pokorny, R., Corrochano, L. M. und Batschauer, A. (2015). Fungal cryptochrome with DNA repair activity reveals an early stage in cryptochrome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(49): 15 130–5.
- Takahashi, F., Yamagata, D., Ishikawa, M., Fukamatsu, Y., Ogura, Y., Kasahara, M., Kiyosue, T., Kikuyama, M., Wada, M. und Kataoka, H. (2007). AUREOCHROME, a photoreceptor required for photomorphogenesis in stramenopiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(49): 19 625–30.
- Takao, M., Oikawa, A., Eker, A. P. und Yasui, A. (1989). Expression of an *Anacystis nidulans* photolyase gene in *Escherichia coli*; functional complementation and modified action spectrum of photoreactivation. *Photochem Photobiol*, 50(5): 633–7.
- Tarutina, M., Ryjenkov, D. A. und Gomelsky, M. (2006). An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem*, 281(46): 34 751–8.
- Teich, K. (2011). Lichtabhängige Genregulation und Interaktion in *Rhodobacter sphaeroides*. Masterarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Terasaki, M. und Rubin, H. (1985). Evidence that intracellular magnesium is present in cells at a regulatory concentration for protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(21): 7324–6.

- Thompson, C. L. und Sancar, A. (2002).** Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. *Oncogene*, 21(58): 9043–56.
- Todo, T., Takemori, H., Ryo, H., Ihara, M., Matsunaga, T., Nikaido, O., Sato, K. und Nomura, T. (1993).** A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4)photoproducts. *Nature*, 361(6410): 371–4.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9): 4350–4.
- Trumpower, B. L. (1990).** Cytochrome *bc*₁ complexes of microorganisms. *Microbiol Rev*, 54(2): 101–29.
- Ueda, T., Kato, A., Kuramitsu, S., Terasawa, H. und Shimada, I. (2005).** Identification and characterization of a second chromophore of DNA photolyase from *Thermus thermophilus* HB27. *J Biol Chem*, 280(43): 36 237–43.
- UniProt, C. (2015).** UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue): D204–12.
- Van Acker, H. und Coenye, T. (2017).** The role of reactive oxygen species in antibiotic-mediated killing of bacteria. *Trends Microbiol.*
- van Niel, C. B. (1944).** The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriol Rev*, 8(1): 1–118.
- Verméglio, A. und Joliot, P. (1999).** The photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. *Trends Microbiol*, 7(11): 435–40.
- Vermeulen, A. J. und Bauer, C. E. (2015).** Members of the PpaA/AerR antirepressor family bind cobalamin. *J Bacteriol*, 197(16): 2694–703.
- Vieira, J. und Messing, J. (1982).** The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19(3): 259–68.
- von Zadow, A., Ignatz, E., Pokorny, R., Essen, L. O. und Klug, G. (2016).** *Rhodobacter sphaeroides* CryB is a bacterial cryptochrome with (6-4) photolyase activity. *FEBS J*, 283(23): 4291–4309.
- Wang, H., Ma, L. G., Li, J. M., Zhao, H. Y. und Deng, X. W. (2001).** Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science*, 294(5540): 154–8.
- Watson, G. M., Mann, N. H., MacDonald, G. A. und Dunbar, B. (1990).** Identification and characterization of a GroEL homologue in *Rhodobacter sphaeroides*. *FEMS Microbiol Lett*, 60(3): 349–53.
- Weber, L., Thoenken, C., Volk, M., Remes, B., Lechner, M. und Klug, G. (2016).** The conserved *Dcw* gene cluster of *R. sphaeroides* is preceded by an uncommonly extended 5' leader featuring the sRNA UpsM. *PLoS One*, 11(11): e0165 694.
- Weber, S. (2005).** Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase. *Biochim Biophys Acta*, 1707(1): 1–23.
- Weiner, B. E., Huang, H., Dattilo, B. M., Nilges, M. J., Fanning, E. und Chazin, W. J. (2007).** An iron-sulfur cluster in the C-terminal domain of the p58 subunit of human DNA primase. *J Biol Chem*, 282(46): 33 444–51.
- Weiner, M. P., Costa, G. L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E. und Bauer, J. C. (1994).** Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene*, 151(1-2): 119–23.
- Welch, W. J. (1993).** Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 339(1289): 327–33.
- White, M. F. und Dillingham, M. S. (2012).** Iron-sulphur clusters in nucleic acid processing enzymes. *Curr Opin Struct Biol*, 22(1): 94–100.
- Wickstrand, C., Dods, R., Royant, A. und Neutze, R. (2015).** Bacteriorhodopsin: Would the real structural intermediate please stand up? *Biochim Biophys Acta*, 1850(3): 536–53.

- Williams, D. C., Van Frank, R. M., Muth, W. L. und Burnett, J. P. (1982).** Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. *Science*, 215(4533): 687–9.
- Winkler, A., Heintz, U., Lindner, R., Reinstein, J., Shoeman, R. L. und Schlichting, I. (2013).** A ternary AppA-PpsR-DNA complex mediates light regulation of photosynthesis-related gene expression. *Nat Struct Mol Biol*, 20(7): 859–67.
- Winkler, J., Seybert, A., König, L., Pruggnaller, S., Haselmann, U., Sourjik, V., Weiss, M., Frangakis, A. S., Mogk, A. und Bukau, B. (2010).** Quantitative and spatio-temporal features of protein aggregation in *Escherichia coli* and consequences on protein quality control and cellular ageing. *EMBO J*, 29(5): 910–23.
- Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J. und Lindahl, T. (2001).** Human DNA repair genes. *Science*, 291(5507): 1284–9.
- Worthington, E. N., Kavakli, I. H., Berrocal-Tito, G., Bondo, B. E. und Sancar, A. (2003).** Purification and characterization of three members of the photolyase/cryptochrome family blue-light photoreceptors from *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem*, 278(40): 39 143–54.
- Wu, Y. und Brosh, J., R. M. (2012).** DNA helicase and helicase-nuclease enzymes with a conserved iron-sulfur cluster. *Nucleic Acids Res*, 40(10): 4247–60.
- Xu, F., Vlak, J. M., Eker, A. P. und van Oers, M. M. (2010).** DNA photolyases of *Chrysoideixis chalcites* nucleopolyhedrovirus are targeted to the nucleus and interact with chromosomes and mitotic spindle structures. *J Gen Virol*, 91(Pt 4): 907–14.
- Yamamoto, J., Martin, R., Iwai, S., Plaza, P. und Brettel, K. (2013).** Repair of the (6-4) photoproduct by DNA photolyase requires two photons. *Angew Chem Int Ed Engl*, 52(29): 7432–6.
- Yamamoto, J., Plaza, P. und Brettel, K. (2017).** Repair of (6-4) lesions in DNA by (6-4) photolyase: 20 years of quest for the photoreaction mechanism. *Photochem Photobiol*, 93(1): 51–66.
- Yang, H. Q., Wu, Y. J., Tang, R. H., Liu, D., Liu, Y. und Cashmore, A. R. (2000).** The C termini of *Arabidopsis* cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell*, 103(5): 815–27.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33(1): 103–19.
- Yasui, A., Eker, A. P., Yasuhira, S., Yajima, H., Kobayashi, T., Takao, M. und Oikawa, A. (1994).** A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals. *EMBO J*, 13(24): 6143–51.
- Yeeles, J. T., Cammack, R. und Dillingham, M. S. (2009).** An iron-sulfur cluster is essential for the binding of broken DNA by AddAB-type helicase-nucleases. *J Biol Chem*, 284(12): 7746–55.
- Yeo, W. S., Lee, J. H., Lee, K. C. und Roe, J. H. (2006).** IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the *suf* operon encoding Fe-S assembly proteins. *Mol Microbiol*, 61(1): 206–18.
- Yin, L., Dragnea, V. und Bauer, C. E. (2012).** PpsR, a regulator of heme and bacteriochlorophyll biosynthesis, is a heme-sensing protein. *J Biol Chem*, 287(17): 13 850–8.
- Yin, L., Dragnea, V., Feldman, G., Hammad, L. A., Karty, J. A., Dann, r., C. E. und Bauer, C. E. (2013).** Redox and light control the heme-sensing activity of AppA. *MBio*, 4(5): e00 563–13.
- Yu, X., Liu, H., Klejnot, J. und Lin, C. (2010).** The cryptochrome blue light receptors. *Arabidopsis Book*, 8: e0135.
- Zdzienicka, M. Z., Venema, J., Mitchell, D. L., van Hoffen, A., van Zeeland, A. A., Vrieling, H., Mullenders, L. H., Lohman, P. H. und Simons, J. W. (1992).** (6-4) photoproducts and not cyclobutane pyrimidine dimers are the main UV-induced mutagenic lesions in Chinese hamster cells. *Mutat Res*, 273(1): 73–83.
- Zeilstra-Ryalls, J. H. und Kaplan, S. (1995).** Aerobic and anaerobic regulation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: the role of the *fnrL* gene. *J Bacteriol*, 177(22): 6422–31.
- Zeilstra-Ryalls, J. H. und Kaplan, S. (1998).** Role of the *fnrL* gene in photosystem gene expression and photosynthetic growth of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol*, 180(6): 1496–503.

- Zeilstra-Ryalls, J. H. und Kaplan, S. (2004).** Oxygen intervention in the regulation of gene expression: the photo-synthetic bacterial paradigm. *Cell Mol Life Sci*, 61(4): 417–36.
- Zeller, T. und Klug, G. (2006).** Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *Naturwissenschaften*, 93(6): 259–66.
- Zeller, T., Mraheil, M. A., Moskvina, O. V., Li, K., Gomelsky, M. und Klug, G. (2007).** Regulation of hydrogen peroxide-dependent gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*: regulatory functions of OxyR. *J Bacteriol*, 189(10): 3784–92.
- Zeng, X., Choudhary, M. und Kaplan, S. (2003).** A second and unusual *pucBA* operon of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: genetics and function of the encoded polypeptides. *J Bacteriol*, 185(20): 6171–84.
- Zhang, F., Ma, H., Bowatte, K., Kwiatkowski, D., Mittmann, E., Qasem, H., Krauß, N., Zeng, X., Ren, Z., Scheerer, P., Yang, X. und Lamparter, T. (2017).** Crystal structures of bacterial (6-4) photolyase mutants with impaired DNA repair activity. *Photochem Photobiol*, 93(1): 304–314.
- Zhang, F., Scheerer, P., Oberpichler, I., Lamparter, T. und Krauß, N. (2013).** Crystal structure of a prokaryotic (6-4) photolyase with an Fe-S cluster and a 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine antenna chromophore. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(18): 7217–22.
- Zhao, R. K., Lukacs, A., Haigney, A., Brust, R., Greetham, G. M., Towrie, M., Tonge, P. J. und Meech, S. R. (2011).** Ultrafast transient mid IR to visible spectroscopy of fully reduced flavins. *Phys Chem Chem Phys*, 13(39): 17 642–8.
- Zhao, X. und Drlica, K. (2014).** Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. *Curr Opin Microbiol*, 21: 1–6.
- Zhao, X., Liu, J., Hsu, D. S., Zhao, S., Taylor, J. S. und Sancar, A. (1997).** Reaction mechanism of (6-4) photolyase. *J Biol Chem*, 272(51): 32 580–90.
- Zheng, L., Baumann, U. und Reymond, J. L. (2004).** An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res*, 32(14): e115.
- Zhong, D. (2015).** Electron transfer mechanisms of DNA repair by photolyase. *Annu Rev Phys Chem*, 66: 691–715.
- Ziegelhoffer, E. C. und Donohue, T. J. (2009).** Bacterial responses to photo-oxidative stress. *Nat Rev Microbiol*, 7(12): 856–63.
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J. und Vitzthum, F. (2004).** Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*, 32(12): e103.
- Zoltowski, B. D., Vaidya, A. T., Top, D., Widom, J., Young, M. W. und Crane, B. R. (2011).** Structure of full-length *Drosophila* cryptochrome. *Nature*, 480(7377): 396–9.

8 Abkürzungsverzeichnis

8-HDF	(7,8-Didemethyl-)8-Hydroxy-5-deazariboflavin	kDa	Kilodalton
AB	Antibiotikum	Km	Kanamycin
ad	lat.: auf, bis zu	Konz.	Konzentration
AK	Antikörper	kV	Kilovolt
Ap	Ampicillin	m	Minuten
APS	Ammoniumpersulfat	mAU	<i>milli Absorbance Units</i>
AS	Aminosäure	MCS	<i>multiple cloning site</i>
ATP	Adenosintriphosphat	Mg	Magnesium
a. u.	<i>arbitrary unit</i> (willkürliche Einheit)	Mn	Mangan
bp	Basenpaare	NaD	Natriumdithionit
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	nck	<i>nicked</i> (<i>nicked</i> -Plasmid-Methode)
Ca	Calcium	NK	Negativkontrolle
Cam	Chloramphenicol	Nt	Nukleotid(e)
CDS	<i>coding sequence</i> (kodierende Sequenz)	ORF	<i>open reading frame</i>
CFU	<i>colony-forming units</i>	PAA	Polyacrylamid
Ci	Curie	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CPD	Cyclobutan-Pyrimidindimer	PHR	<i>Photolyase Homology Region</i>
CPF	Cryptochrom/Photolyase-Familie	PK	Positivkontrolle
cpm	<i>counts per minute</i>	PL	Photolyase
cv	<i>column volume</i> (Säulenvolumen)	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
d	<i>days</i> (Tage)	PP	Photoprodukt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	ps	Pikosekunde(n)
dCTP	Desoxycytosintriphosphat	PY	<i>peptone yeast</i>
DLZ	6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin	r, rev	<i>reverse</i>
ds	<i>double-stranded</i> (doppelsträngig)	RÄ	<i>Rhodobacter</i> Äpfelsäure
DTT	Dithiothreitol	ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
dw	<i>downstream</i>	rpm	<i>revolutions per minute</i>
EtOH	Ethanol	RT	Raumtemperatur
EVC	<i>empty vector control</i> (Leervektorkontrolle)	S	Schwefel
f, fw, fwd	<i>forward</i>	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid	Sm	Streptomycin
Fe	Eisen	Sp	Spectinomycin
FeS-BCP	Eisen-Schwefel bakterielle Cryptochrome und Photolyasen	sRNA	<i>small RNA</i>
F_o	(7,8-Didemethyl-)8-Hydroxy-5-deazariboflavin	ss	<i>single-stranded</i> (einzelsträngig)
g, g	Gramm; <i>g</i> -Kraft	St-I	Standard-Nährmedium I
GST	Glutathion-S-Transferase	Tc	Tetracyclin
h	<i>hours</i> (Stunden)	TEMED	Tetramethylethylendiamin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	u	<i>unit(s)</i>
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid	ü. N.	über Nacht
J	Joule	up	<i>upstream</i>
kb	Kilobasen(paare)	V	Volt
		VE-H₂O	vollentsalztes Wasser
		WT	Wildtyp

9 Anhang

9.1 Chromatogramme

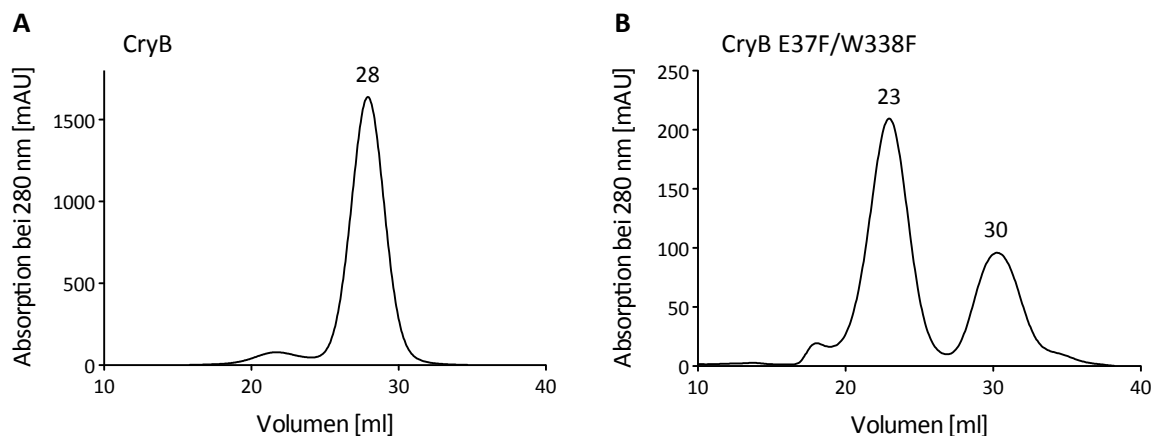


Abbildung 9.1: Chromatogramme von Heparin-Affinitätschromatographien (Säule HiTrap Heparin HP, cv 5 ml) von **A)** CryB und **B)** CryB E37F/W338F (Abschnitt 3.4.4) nach vorheriger Aufreinigung durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus jeweils 1 Liter Expressionskultur.

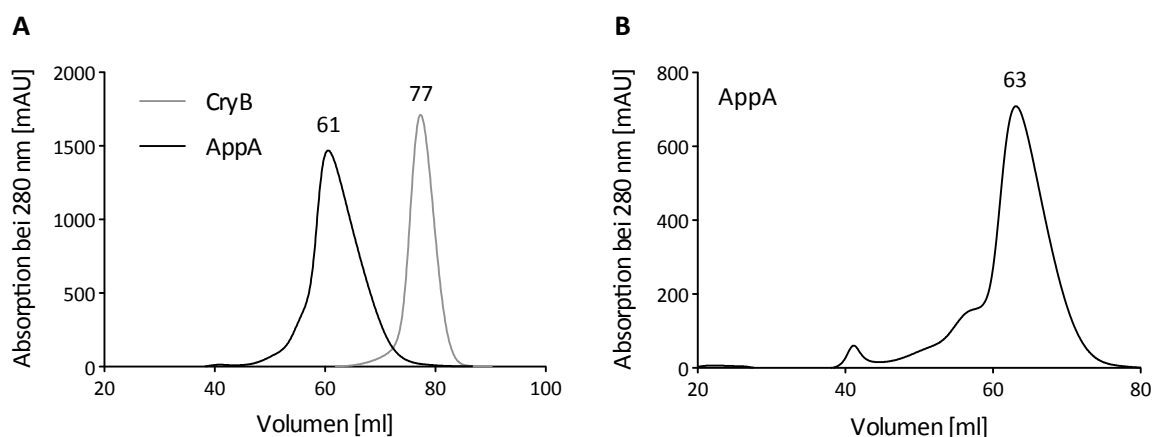


Abbildung 9.2: Chromatogramme von Gelfiltrationen (Säule HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade, cv 120 ml) von CryB (nach vorheriger Aufreinigung durch Ni-NTA- und Heparin-Affinitätschromatographie) und AppA (nach vorheriger Aufreinigung durch Glutathion-Affinitätschromatographie), Flussrate 1 ml/min. **A)** CryB: ca. 9,7 mg Protein aus 2 Liter Expressionskultur geladen; Ausbeute nach dem Lauf ca. 4,7 mg; Peakfraktion bei 77 ml (1,8 mg/ml); Lauf in SEC_T-Puffer. AppA: ca. 54 mg Protein aus 2 Liter Expressionskultur geladen; Ausbeute nach dem Lauf ca. 37 mg; Peakfraktion bei 61 ml (3,81 mg/ml); Lauf in SEC_H-Puffer. **B)** AppA: ca. 18 mg Protein aus 0,75 Liter Expressionskultur geladen; Ausbeute nach dem Lauf ca. 10 mg; Peakfraktion bei 63 ml; Lauf in SEC_H-Puffer. Zur Verdeutlichung des kleinen Peaks und der Schulter bei geringerer Proteinmenge im Vergleich zu A).

9.2 UV-Assays Kontrollen

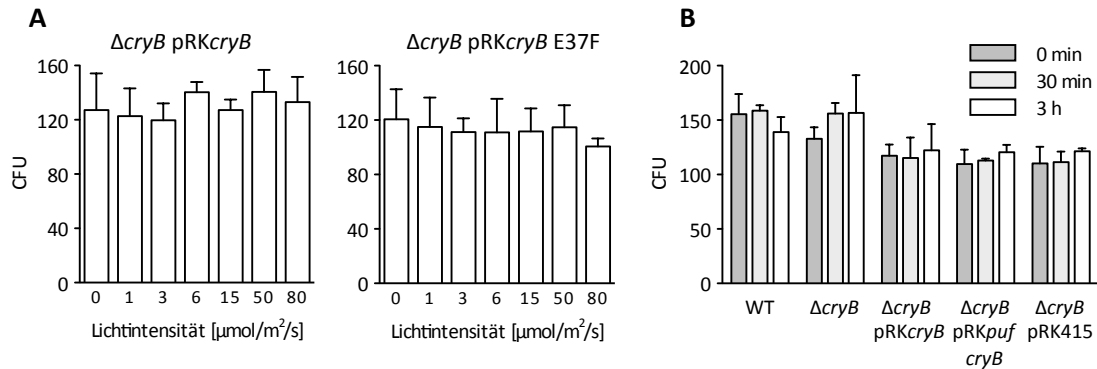


Abbildung 9.3: A) Colony-forming units (CFU) der Stämme $\Delta cryB$ pRKcryB und $\Delta cryB$ pRKcryB E37F von nicht UV-behandelten Kontrollplatten des Photoreaktivierungsexperiments aus Abbildung 3.14. bei verschiedenen Lichtintensitäten. **B)** CFU von nicht UV-behandelten Kontrollplatten des Photoreaktivierungsexperiments nach verschiedenen Zeitdauern im Licht (50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Beispielhaft sind die Werte der Stämme aus Abbildung 3.16 A gezeigt. Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen biologischen Experimenten.

9.3 Plasmiderhalt

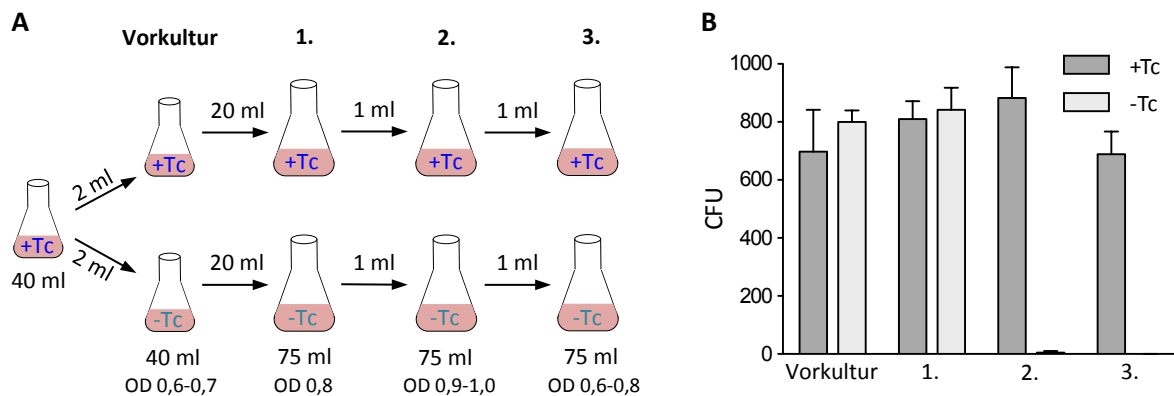


Abbildung 9.4: Plasmiderhalt (Resistenzehalt) mit und ohne Tetracyclin (Tc) in den Stämmen $\Delta cryB$ pRKcryB und $\Delta cryB$ pRKcryB C434A/C437A. **A)** Schematische Darstellung der Überimpfungen. 2 ml einer Tc-haltigen Kultur wurden in 40 ml frisches Medium mit oder ohne Tc überimpft und diese beiden Kulturen ü.N. bis zu einer OD₆₆₀ von 0,6–0,7 angezogen (Vorkulturen). Von diesen wurde jeweils eine frische 75-ml-Kultur auf eine OD₆₆₀ von 0,2 angeimpft (Überimpfungsvolumen ca. 20 ml). Diese Kulturen (erste Überimpfung) wurden bis zu einer OD₆₆₀ von 0,8 angezogen und davon jeweils 1 ml in frisches Medium mit oder ohne Tc überimpft (zweite Überimpfung). Diese Kulturen wurden bis zu einer OD₆₆₀ von 0,9–1 angezogen, wieder jeweils 1 ml überimpft (dritte Überimpfung) und bis zu einer OD₆₆₀ von 0,6–0,8 angezogen. Proben der Kulturen wurden immer direkt vor dem Überimpfen bzw. am Ende der Wachstumsphase auf Tc-haltigen RÄ-Agarplatten ausplattiert und die Kolonien nach einigen Tagen gezählt. Bei einer OD₆₆₀ von 0,8 wurden 100 μl einer 10^{-5} -Verdünnung ausplattiert. Bei höheren oder niedrigeren ODs wurden die Ausplattierungsvolumen entsprechend angepasst. **B)** CFU aus den Kulturen mit und ohne Tc am Ende der Wachstumsphasen. Ergebnis aus drei biologischen Replikaten mit Standardabweichung.

9.4 Nachweis von Punktmutationen durch PCR

A

Wildtyp *cryB*-Sequenz

Primer **A+C** -> Kein Produkt

Primer **B+C** -> Produkt

```

5'...GCCGCCCTGCCGCGCTCTACTGGGCAAGCCCA[...]ACGATCGGGATGAGCCAGTTCGCCGATCACGG...3'
                                     3'-CCTACTCGGTCAAGCGGC-5' (C)
(A) 5'-CTGCCGCGCTCTACTTC-3'
(B) 5'-CTGCCGCGCTCTACTGG-3'
3'...CGGCGGGACGGCGGCAGATGAGCCCGTTCGGGT[...]TGCTAGCCCTACTCGGTCAAGCGGCTAGTGCC...5'
    
```

Mutierte *cryB*-Sequenz für AS Austausch W338F

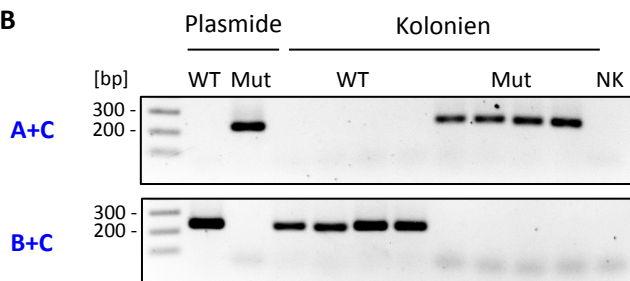
Primer **A+C** -> Produkt

Primer **B+C** -> Kein Produkt

```

5'...GCCGCCCTGCCGCGCTCTACTTCGGCAAGCCCA[...]ACGATCGGGATGAGCCAGTTCGCCGATCACGG...3'
                                     3'-CCTACTCGGTCAAGCGGC-5' (C)
(A) 5'-CTGCCGCGCTCTACTTC-3'
(B) 5'-CTGCCGCGCTCTACTGG-3'
3'...CGGCGGGACGGCGGCAGATGAGCCCGTTCGGGT[...]TGCTAGCCCTACTCGGTCAAGCGGCTAGTGCC...5'
    
```

B



C

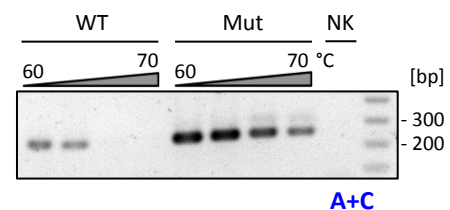


Abbildung 9.5: Nachweis von Punktmutationen durch PCR durch unterschiedliche Kombination von drei Primern nach Newton et al. (1989). **A)** Schematische Darstellung der Primerbindung. Primer A bindet mit seinem 3'-Ende genau an der Stelle der Mutation. Primer B bindet im gleichen Bereich, enthält jedoch am 3'-Ende die Wildtyp-Sequenz. Primer C bindet ca. 200 bp entfernt und stellt den Gegenprimer zu sowohl A als auch B dar. So entsteht bei Verwendung der Primer A+C ein Produkt, wenn die Mutation vorhanden ist und kein Produkt bei der Wildtyp-Sequenz. Bei Verwendung von B+C entsteht ein Produkt bei der Wildtyp-Sequenz, jedoch keines bei der mutierten Sequenz. **B)** 1,5%iges TAE-Agarosegel mit Proben (je 5 µl) einer PCR mit Kolonien von *R. sphaeroides* $\Delta cryB$ pRK*cryB* und $\Delta cryB$ pRK*cryB* W338F sowie den entsprechenden Plasmiden. WT = pRK*cryB* (Wildtyp-Sequenz); Mut = pRK*cryB* W338F (Sequenz mit Basenaustauschen). **C)** 1,5%iges TAE-Agarosegel mit Proben (je 5 µl) einer PCR mit den Plasmiden pRK*cryB* (WT) und pRK*cryB* Q302A (Mut) und einem Temperaturgradienten zur Ermittlung einer geeigneten *annealing*-Temperatur. NK = H₂O-Kontrolle. Größenstandard: 100 bp Ladder Plus (3 µl).

Bei der Überprüfung von Mutationen in einer plasmidkodierten Gensequenz bei Komplementationsstämmen in einem Knockout-Hintergrund muss darauf geachtet werden, dass mindestens einer der Primer (A/B oder C) im Bereich der Resistenzkassette liegt, sodass keine Amplifikation aufgrund der noch vorhandenen Gensequenzen *up-* und *downstream* der Resistenzkassette im Chromosom möglich ist. Die Position der Primer A und B definiert sich durch die Lage der Mutation. Sofern diese außerhalb des Bereichs der chromosomalen Resistenzkassette liegt, muss Primer C im Bereich der Kassette liegen.

9.5 Sequenzen

DNA-Sequenz der (6-4)-Photolyase aus *Drosophila melanogaster*

CDS aus pET-28a-His6-Dm(6-4) (Kiontke, 2012). Das Konstrukt ist in Maul et al. (2008) und in Abschnitt 3.3.2 (diese Arbeit) beschrieben.

Länge: 1563 bp (520 AS)

```
ATGGATTACAAAGGTCCACGTTGGTCCACTGGTTCGGTAAAGGACTCCGGTTGCACGACAATCCGGCATTATCGCACATTTTACC
GCCGCTAACGCTGCTCCAGGAAGATACTTTGTTCCGCCGATTTTCATTTTGGATCCAGGAATCCTCGATTGGATGCAAGTGGGTGCC
AATCGATGGCGATTCTGCAGCAAACGCTGGAGGACTTGGATAACCAGCTTCGAAACTTAATCCCGTCTGTTTGGTGGCGCGG
AAGCCCGCAGAGGTTTTTCCCGTATTTTAAAGAGTTGGCGCTGGAAATGCTAATTTTGGACAGATATCGAGCCGTAATCCGTG
ACCCGGGATGCTGCCGTGCAGAAGTTGGCCAAGGCAGAGGGTGTGAGAGTGGAAACTCATTGCTCCACACGATTATAATCCGGAA
TTAGTAATAGCGAAGAATCTTGGCAAGGCTCCAATTACCTATCAAAAGTTCCTGGGCATTGTGGAGCAACTAAAGGTACCTAAAGT
CTAGGGGTTCTGAAAAGCTTAAAAACATGCCTACACCACCCAAAGATGAGGTGGAGCAAAAGGATTCGGCGGCCATGATTGTCT
ACGATGAAGCAATTAGTAAAACGCCCGGAGGAAGTGGCCCTAATAAGTTTCCGGGAGGCAGAACAGAGGCACTGCGCCGATGGAG
GAATCCCTAAAGGATGAAATTTGGGTGCCCGCTTGGAGAAGCCCAACACGGCACCCAACTCGCTGGAGCCTAGCACTACCGTACTA
AGCCCTTACCTCAAATTTGGATGCCTTAGTGCCCGACTGTTCAATCAAAAGCTCAAGGAAATATCAAACGCCAGCCGAAGCACTCG
CAGCCGCCGTTTTCGCTCATTGGACAACCTCATGTGGAGGGAATTTTACTACACAGTGGCGGCTGCGGAACCCAATTTTCGATCGAATG
TTGGGCAATGTACTGCATGCAATTCCTGGCAGGAGCATCCAGATCACTTGGAGGCTGGACACACGGACGACAGGATATCCT
TTCATCGACGCCATCATGCGTCAGCTGCGCCAGGAGGTTGGATCCATCATCTGGCCCGCATGCAGTGGCATGTTTCTTAACGCGC
GGAGACCTCTGGATCAGTTGGGAGGAGGACAGCGGGTTCGAGCAGCTGCTGCTGGATCAGGACTGGGCACTAAACGCTGGCAAC
TGGATGTGGCTATCTGCGTCCGCTTTCTTTACCAGTATTTTCGCGTCTACAGTCCGGTGGCGTTTGGCAAGAAAACGGATCCCA
AGGGCACTATATCAGGAAGTATGTGCCGGAACCTCAAAATATCTGCTGGCTGTATTTATGAGCCCTGGAAGGCGTCTGCTGGTGG
ATCAGCGGGCATAACGGCTGCGTCTCGGCACGATTATCCACCAGGATTGTTAAACACGAAGTGGTGCACAAGGAGAACATTAAG
AGAATGGGCGCCGCTACAAAGTAAATCGGGAGGTGCGCACTGGCAAGGAGGAGTGTCTTTTCGAGGAGAAATCAGAAACCTG
A
```

Aminosäuresequenzen CryB

Aminosäuresequenz von CryB (UniProt Nr. Q3IXP1) in pET28a (Geisselbrecht, 2013).

529 AS (mit His-tag), 508 AS (ohne His-tag)

kursiv = Teil des Vektors

Rot = in dieser Arbeit untersuchte Aminosäuren

```
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHM LTRLILVLGD QLSDDL PALR AADPAADLVV MAEVMEEGTY VPHHPQKIAL
ILAAMRKFAR RLQERGFVRA YSRLLDDPDTG PSIGAELLRR AAETGAREAV ATRPGDWRLI EALEAMPLPV
RFLPDDRFLC PADEFARWTE GRKQLRMEWF YREMRRTGL LMEGDEPAGG KWNFDTENRK PAAPDLLRPR
PLRFEPDAEV RAVLDLVEAR FPRHFGRLRP FHWATDRAEA LRALDHFIRE SLPRFGDEQD AMLADDPFLS
HALLSSSMNL GLLGPMVEVCR RAETEWREGR APLNAVEGFI RQILGWREYV RGIWTLSPGD YIRSNGLGHS
AALPPLYWPK PTRMACLSAA VAQTRDLAYA HHIQRLMVTG NFALLAGVDP AEVHEWYLSV YIDALEWVEA
PNTIGMSQFA DHGLLGSKPY VSSGAYIDRM SDYCRGCAYA VKDRTGPRAC PFNLLYWHFL NRHRARFERN
PRMVQMYRTW DRMEETHRAR VLTEAEAF LG RLHAGEPV-
```

Aminosäuresequenz von CryB $\Delta_{D432-V508}$ in pET28a.

452 AS (mit His-tag), 431 AS (ohne His-tag).

In CryB $\Delta_{S431-P507}$ ist die letzte AS (S) durch V ersetzt.

kursiv = Teil des Vektors

```
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHM LTRLILVLGD QLSDDL PALR AADPAADLVV MAEVMEEGTY VPHHPQKIAL
ILAAMRKFAR RLQERGFVRA YSRLLDDPDTG PSIGAELLRR AAETGAREAV ATRPGDWRLI EALEAMPLPV
RFLPDDRFLC PADEFARWTE GRKQLRMEWF YREMRRTGL LMEGDEPAGG KWNFDTENRK PAAPDLLRPR
PLRFEPDAEV RAVLDLVEAR FPRHFGRLRP FHWATDRAEA LRALDHFIRE SLPRFGDEQD AMLADDPFLS
HALLSSSMNL GLLGPMVEVCR RAETEWREGR APLNAVEGFI RQILGWREYV RGIWTLSPGD YIRSNGLGHS
AALPPLYWPK PTRMACLSAA VAQTRDLAYA HHIQRLMVTG NFALLAGVDP AEVHEWYLSV YIDALEWVEA
PNTIGMSQFA DHGLLGSKPY VSSGAYIDRM S-
```

Tabelle 9.1: Beispiele der Cry-DASH sowie bisher bekannte *dual-function*-Mitglieder der CPF

Name	Organismus	Photolyase-(PL-)Aktivität	Cryptochrom-Aktivität	Klasse	Antenne	weitere CPF	Quellen
Cry-DASH	<i>Synechocystis</i> sp. (Cyanobacteria)	schwache <i>in vivo</i> Photoreaktivierung von CPD in <i>E. coli</i>	Transkriptionelle Regulation von 8 Genen	DASH	keine	CPD I	Hitomi et al. (2000) Brudler et al. (2003)
X/Cry-DASH	<i>X. laevis</i> (Vertebraten)	schwache CPD-PL-Aktivität <i>in vivo</i> (<i>E. coli</i>) u. für dsDNA <i>in vitro</i> ; CPD-Reparatur in ssDNA		DASH		(6-4), CPD II, Cry1, Cry2	Daiyasu et al. (2004) Selby und Sanchar (2006)
AtCry3	<i>A. thaliana</i> (Pflanze)	CPD-Reparatur in ssDNA		DASH	MTHF	(6-4)PHR, CPD II, Cry1, Cry2	Kleine et al. (2003) Selby und Sanchar (2006) Pokorny et al. (2008)
VcCry1	<i>V. cholerae</i> (Bakterium)	CPD-Reparatur ssDNA. Beitrag zur <i>in vivo</i> Photoreaktivierung		DASH	MTHF	VcPhr (CPD), VcCry2	Worthington et al. (2003) Selby und Sanchar (2006)
CRY	<i>N. crassa</i> (Fungus)	keine Reparaturaktivität	Steuerung des <i>CRY-dependent oscillator</i>	DASH	MTHF	CPD-PL	Froehlich et al. (2010) Nsa et al. (2015)
PHR1	<i>T. atroviride</i> (Fungus)	<i>in vivo</i> Photoreaktivierung	Autoregulation der eigenen Expression u. die der <i>blu</i> -Gene	CPD I	MTHF	Cry-DASH, Cry/(6-4)PL	Berrocal-Tito et al. (2007) Schmoll et al. (2010)
CryA	<i>A. nidulans</i> (Fungus)	<i>in vivo</i> Photoreaktivierung in <i>A. nidulans</i> Δ <i>cryA</i> u. <i>E. coli phr</i>	Regulation der Gene zur sexuellen Differenzierung	CPD I		kein weiteres	Bayram et al. (2008)
PHL1	<i>C. zeae-maydis</i> (Fungus)	<i>in vivo</i> Photoreaktivierung	Regulation der Gene <i>cpd1</i> , <i>rad2</i> , <i>rvb2</i>	(6-4)-PL		CPD1	Bluhm und Dunkle (2008)
PtCPF1	<i>P. tricornutum</i> (Kieselalge)	<i>in vitro</i> Reparatur von T(6-4)T <i>in vivo</i> Photoreaktivierung	Blaulichtabhängige Genexpression, Regulation d. circadianen Uhr	(6-4)-PL	keine	CPF2 (DASH), CPF4 (DASH), CRYp	Coesel et al. (2009) De Riso et al. (2009) Juhas et al. (2014)
OtCPF1	<i>O. tauri</i> (Grünalge)	<i>in vitro</i> Reparatur von T(6-4)T	Regulation der circadianen Uhr	(6-4)-PL	keine	CPF2 (DASH), 3 CPD-Gene	Heijde et al. (2010)
R _s CryB	<i>R. sphaerooides</i> (Proteobakterium)	<i>in vivo</i> Photoreaktivierung <i>in vitro</i> Reparatur von T(6-4)T	Regulation der Genexpression	FeS-BCP	DLZ	PhrA (CPD III), RSP_1981	Hendrischk et al. (2009a) Frühwirth et al. (2012) von Zadow et al. (2016)
Cry1	<i>T. reesei / atroviride</i> (Fungus)	<i>in vitro</i> Reparatur von T(6-4)T <i>in vivo</i> Photoreaktivierung	Regulation der Genexpression durch Rot- und Blaulicht	Cry / (6-4)-PL		PHR1, Cry-DASH	Guzmán-Moreno et al. (2014) García-Esquivel et al. (2016)

Veröffentlichung

von Zadow, A., Ignatz, E., Pokorny, R., Essen, L. O. und Klug, G. (2016). *Rhodobacter sphaeroides* CryB is a bacterial cryptochrome with (6-4) photolyase activity. *FEBS J*, 283(23): 4291–4309.

Konferenzbeiträge

von Zadow, A., Klug, G. (2016). The photolyase/cryptochrome member CryB of *Rhodobacter sphaeroides* shows photorepair activity *in vivo*. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Jena. Posterpräsentation.

von Zadow, A., Klug, G. (2015). The photoreceptor CryB is involved in the survival of UV light stress in *Rhodobacter sphaeroides*. 8th Annual GGL Conference, Gießen. Vortrag.

von Zadow, A., Klug, G. (2015). The photolyase/cryptochrome member CryB of *Rhodobacter sphaeroides* shows photorepair activity *in vivo*. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Marburg. Posterpräsentation.

von Zadow, A., Kawen, N., Klug, G. (2014). Characterisation of the photolyase/cryptochrome family protein CryB in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. 7th Annual GGL Conference, Gießen. Posterpräsentation.

von Zadow, A., Klug, G. (2014). Characterisation of the photolyase/cryptochrome family protein CryB in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. 4. Gemeinsame Konferenz der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. (DGHM) und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Dresden. Posterpräsentation.

von Zadow, A., Frühwirth, S., Klug, G. (2013). Characterisation of a cryptochrome blue-light receptor in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. 6th Annual GGL Conference, Gießen. Posterpräsentation.

Danksagung

Als Erstes danke ich Prof. Dr. Gabriele Klug für die Betreuung während der letzten Jahre. Vor allem für die Erreichbarkeit bei allen Fragen, die Motivierung und ein sehr gut ausgewogenes Verhältnis aus Unterstützung und Freiraum für Selbstbestimmung.

Prof. Dr. Alfred Batschauer für die unkomplizierte Übernahme der Zweitkorrektur und dafür, dass ich immer wieder das Labor und das Fachwissen der gesamten Photobiologie-AG nutzen durfte.

Den „anderen Chefs“ des Instituts, PD Dr. Elena Evguenieva-Hackenberg und Prof. Dr. Kai Thormann für gute Gespräche in Pausen, im Flur und in Seminaren.

Prof. Dr. Lars-Oliver Essen für die vielen kompetenten Ideen und den Input zu meinen strukturellen Ideen sowie die Möglichkeit, in Marburg Experimente machen zu können.

Yann Geisselbrecht für die ausgiebige Einarbeitung in Proteinmethoden, ohne die ich wohl ziemlich verloren gewesen wäre.

Ankan Banejee as a worthy successor to Yann, for passing samples through huge machines in Grenoble, which I don't understand.

Elisabeth Ignatz für das gemeinsame Durchhalten in der Revision, den Austausch von Ideen und die tolle Zusammenarbeit.

Richard Pokorny für die immer wiederkehrende Hilfe bei komplizierten Fragen und Experimenten und vor allem für die Unterstützung bei der Revision.

Allen anderen Mitgliedern der AG Essen und der AG Batschauer für die Hilfsbereitschaft – ich habe mich immer sehr wohl gefühlt bei euch in Marburg, konnte stets jeden fragen und wurde immer herzlich aufgenommen wenn ich zu Besuch war.

Den Klugs:

Katrin für die tägliche Versorgung mit Kaffee. Was wären wir ohne dich gewesen. Wobei, ich hab jetzt hier beim schreiben und Kaffeetrinken gelesen, dass Koffein ein Inhibitor von Photolyasen ist (Selby und Sancar, 1990). Was ein Glück haben Menschen sowieso keine Photolyase. Und für viel mehr noch als den Kaffee.

Lennart, der bei jeder Frage und jedem Problem eines anderen seine Pipette hinlegt, um zu helfen. Und danke für deine megawarme Winterjacke wenn ich im Kühlraum Protein laden musste.

Bernhard für die Verbreitung von Entspantheit und Gelassenheit.

Julia für die mit Abstand meisten Beiträge zu meiner Zitatesammlung aus der Laborzeit und die ansteckende Lache.

Carina, die als der sogenannte „neue Lennart“ alle Aufgaben des *connecten* übernommen hat.

Susann, meine einzige „Proteinkollegin“, für gemeinsame *troubleshootings* wenn die Äkta mal nicht das gemacht hat, was sie sollte.

Tom für all das Fachwissen sowie *troubleshootings* per Telefon, wenn die Äkta immer noch nicht das gemacht hat, was sie sollte. Nachdem du weg warst habe ich übrigens heimlich wieder „GeFi“ statt „SEC“ gesagt.

Angelika, Carmen, Kerstin und Andrea für RÄ-Medium, Backup-Kolben zu Hochdurchsatzzeiten, Puffer, Primer und vieles vieles mehr.

Andreas für den Blue-Curacou-Ladepuffer für RNA-Gele von der Firma ANDI GmbH.

Susanne für superschnelle Sequenzierungen.

Ulrike Lenz, der besten Sekretärin der Uni, für ihre Empathie und die schnelle Bearbeitung von allen Anliegen.

Zhiping for collaboration on the project and for teaching me chinese.

Meinen Bachelors und Praktikanten Jana, Sreenath, Nils und Helena, von denen ich auch viel gelernt habe.

Sebastian F. für die Unterstützung aus der Ferne bei Proteinfragen und für Anekdoten aus vergangenen CryB-Zeiten.

Allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Klug, mit denen ich viel oder wenig zu tun hatte, Tao, Adnan, Yannick, Fabian, Katrin/neu, Sebastian, Kristin, Bork, Jens, Quinfeng, Xin, Chamindri, Linlin und bestimmt noch mehr, die dafür gesorgt haben, dass die letzten Jahre eine gute Zeit waren.

Und natürlich allen „Thormanns“, ohne die es im Institut viel weniger unterhaltsam gewesen wäre.

Lisa, Matze, Nico, Elisabeth und Philipp für das Korrekturlesen kleiner und großer Teile der Arbeit. Gelegentlich hält man das alles für das normalste der Welt, bis man darauf aufmerksam gemacht wird, „was für krasses Zeug du da gemacht hast!“. Punkt und neuer Satz.

Meiner Familie für die kontinuierliche Unterstützung und Motivierung während der Doktorarbeit.

```
\begin{thank}[∞]
  \incluename[bruder]{\emph\textbf{Felix}}
  TotalSkypeHours{data not shown}
  Niemand wird mir glauben, dass das \emph{Formatieren} Spaß gemacht hat!
  Unendlichen Dank für deine Hilfe.
\noend{thank}
```

```
\end{document}[Straaach]
```