
Blaulichabhängige Genregulation in
Rhodobacter sphaeroides

Untersuchungen zur physiologischen Funktion der
Blaulichphotorezeptoren AppA, CryB und LOV

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung
des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

Dipl. Biol. Sebastian Metz

aus Hohenroda

angefertigt am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Fachbereich Biologie und Chemie
Justus - Liebig - Universität Gießen

Die vorliegende Arbeit wurde angefertigt am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie des Fachbereiches 08 der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von Oktober 2006 bis April 2010 unter der Leitung von Prof. Dr. Gabriele Klug.

1. Gutachterin: Prof. Dr. Gabriele Klug

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachterin: Prof. Dr. Annegret Wilde

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Justus - Liebig - Universität Gießen

Erklärung

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig 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. 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, den 10.6.2010

Sebastian Metz

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Das Problem Sauerstoff und seine Wahrnehmung in Bakterien	2
1.1.1	Schäden durch reaktive Sauerstoff - Spezies	4
1.1.2	Entgiftung von reaktiven Sauerstoff - Spezies	4
1.1.3	Thiol - Redox - Sensoren	5
1.1.4	Eisen - Schwefel - Redox - Sensoren	6
1.1.5	Häm- Redox - Sensoren	7
1.1.6	Flavin- Redox - Sensoren	8
1.2	Die Photosynthese und die Wahrnehmung von Licht in Bakterien	8
1.2.1	Bakterielle Photorezeptoren	9
1.2.2	Flavine und ihre Rolle als Cofaktoren und Chromophore	10
1.2.3	Cryptochrome	11
1.2.4	LOV - Domänen - Proteine	13
1.2.5	BLUF - Domänen - Proteine	14
1.3	Das Proteobakterium <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	16
1.3.1	Phylogenie und Stoffwechselvielfalt	16
1.3.2	Aufbau des Photosyntheseapparates	16
1.3.3	Regulation der Photosyntheseexpression	17
1.3.4	Regulation der Antwort auf photooxidativen Stress in <i>R. sphaeroides</i> durch den Sigmafaktor σ^E	21
1.4	Zielsetzung der Arbeit	22
2.	MATERIAL & METHODEN	23
2.1	Material	23
2.1.1	Stämme	23
2.1.2	Plasmide	24
2.1.3	Oligonukleotide	26
2.1.4	Antibiotika und Selektionszusätze	30
2.1.5	Größenstandards für die Gelelektrophorese	30
2.1.6	Molekularbiologische <i>Kits</i>	31
2.1.7	Enzyme	31
2.1.8	Chemikalien	32
2.1.9	Kulturmedien	33
2.1.10	Allgemeine Puffer und Lösungen	34
2.1.11	Geräte und Materialien	35
2.1.12	Auftragspuffer	36
2.1.13	Elektrophoresepuffer	36
2.1.14	Antikörper für <i>Western blot</i>	37
2.1.15	Radioaktive Nukleotide	37

2.2	Mikrobiologische Methoden	37
2.2.1	Flüssigkulturen von <i>E. coli</i>	37
2.2.2	Plattenkulturen von <i>E. coli</i>	37
2.2.3	Flüssigkulturen von <i>Rhodobacter</i>	38
2.2.4	Plattenkulturen von <i>Rhodobacter</i>	39
2.2.5	Flüssigkulturen von <i>S. cerevisiae</i>	40
2.2.6	Plattenkulturen von <i>S. cerevisiae</i>	40
2.2.7	Bestimmung der Zelldichte einer Flüssigkultur	40
2.2.8	Bakteriendauerkulturen	40
2.2.9	Aufnahme von Gesamtzellspektren	40
2.2.10	Transformation von Plasmid - DNA nach <i>E. coli</i>	41
2.2.11	Herstellung kompetenten Zellen von <i>S. cerevisiae</i>	42
2.2.12	Hitzeschocktransformation von <i>S. cerevisiae</i>	43
2.2.13	Plasmidkonjugation nach <i>Rhodobacter</i>	43
2.2.14	Wachstum von Kulturen für Proteinüberexpressionen	44
2.2.15	Gewinnung von Zelllysaten von <i>E. coli</i>	45
2.2.16	Gewinnung von Zelllysaten von <i>R. sphaeroides</i>	45
2.2.17	Bestimmung der Resistenz von <i>R. sphaeroides</i> gegenüber oxidativem Stress (Hemhohftest)	46
2.2.18	β - Galaktosidaseaktivitäts - assays in <i>R. sphaeroides</i>	46
2.2.19	β - Galaktosidaseaktivitäts - assays in <i>S. cerevisiae</i>	47
2.2.20	Techniken zur Visualisierung der Polysaccharid - Kapsel von Bakterien	47
2.2.21	Sedimentationsanalyse von <i>R. sphaeroides</i>	48
2.2.22	<i>Mating</i> von <i>S. cerevisiae</i>	48
2.3	Elektrophoresetechniken	49
2.3.1	Agarose - Gel - Elektrophoresen	49
2.3.2	Polyacrylamid - Gel - Elektrophoresen	49
2.4	Molekularbiologische Methoden	51
2.4.1	Isolierung, Aufreinigung und Aufarbeitung von DNA / RNA	51
2.4.2	Fällung von Nukleinsäuren	54
2.4.3	Isolieren von DNA aus Gelfragmenten	54
2.4.4	Quantifizieren von Nukleinsäuren	55
2.4.5	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	55
2.4.6	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	56
2.4.7	Amplifikation von DNA durch <i>PCR</i>	57
2.4.8	Sequenzierung von DNA	58
2.4.9	<i>Northern</i> - Analyse von RNA (<i>Northern blot</i>)	59
2.4.10	<i>Southern</i> - Analyse von DNA (<i>Southern blot</i>)	60
2.4.11	Prähybridisierung / Hybridisierung der radioaktiven Sonden	60
2.4.12	<i>Phosphoimaging</i>	61
2.4.13	Berechnung der prozentualen Veränderung der Genexpression	61
2.4.14	<i>Strippen</i> der Membranen	62
2.4.15	DMS - Methylierung von DNA	62
2.5	Proteinbiochemische Methoden	63
2.5.1	Isolierung von überexprimierten Proteinen	63
2.5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)	65
2.5.3	Dialyse von Proteinlösungen	65
2.5.4	Ultrazentrifugation von Proteinlösungen	65

2.5.5	Western Analyse von Proteinen (<i>Western blot</i>)	66
2.5.6	GST - <i>pull-down</i> - assay	67
2.5.7	MBP - <i>pull-down</i> - assay	67
2.5.8	Farbnachweis von Proteinen auf SDS - Polyacrylamid - Gelen	68
2.5.9	Gel - Retardations - assays	69
2.5.10	Trichloressigsäurefällung von Proteinen	70
2.6	Transkriptomanalysen von <i>R. sphaeroides</i>	70
2.6.1	Erstellung des <i>R. sphaeroides</i> <i>microarrays</i>	70
2.6.2	Durchführung der Experimente für die Transkriptomanalysen	72
2.6.3	Prozessieren der RNA für die Transkriptomanalysen	72
2.6.4	Cy3 / Cy5 - Markierung der RNA	73
2.6.5	Bestimmung der <i>label</i> - Effizienz der RNA	74
2.6.6	Hybridisieren und Waschen des <i>microarrays</i>	74
2.6.7	Auswertung der Fluoreszenzsignale auf den <i>microarrays</i>	75
3.	ERGEBNISSE	76
3.1	Analyse der Blaulichtsensitivität des AppA / PpsR und des PrrB / PrrA - Systems in <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	76
3.1.1	Blaulichtsensitivität der Photosyntheseexpression in <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	76
3.1.2	Blaulichtsensitivität der Photosyntheseexpression in <i>R. sphaeroides</i> JZ1678 (Δ FnrL)	81
3.1.3	Blaulichtsensitivität der Photosyntheseexpression in <i>R. sphaeroides</i> PrrB1 (Δ PrrB)	83
3.2	Analyse der <i>in vivo</i> DNA - Bindung durch PpsR und PrrA	85
3.3	<i>random</i> Mutagenese der BLUF - Domäne von AppA	87
3.4	<i>In vivo</i> - Effekte von BLUF - Mutanten auf die Expression der Photosynthesegene	90
3.4.1	Konstruktion der BLUF - Aminosäureaustauschmutanten von AppA	90
3.4.2	Auswirkungen der BLUF - Mutanten auf die Photosyntheseexpression	93
3.4.3	Blaulichtsensitivität der Photosyntheseexpression in der BLUF - Mutante <i>R. sphaeroides</i> App11::appAW104F	95
3.4.4	Blaulichtsensitivität der Photosyntheseexpression in der BLUF - Mutante <i>R. sphaeroides</i> App11 pRKappAY21F bzw. Y21C	97
3.4.5	Blaulichtsensitivität der Photosyntheseexpression in der BLUF - Mutante <i>R. sphaeroides</i> App11 pRKappAW104F/Y21F	99
3.5	<i>Yeast - Two - Hybrid</i> - Interaktionsstudien mit dem LOV - und dem CryB - Protein von <i>R. sphaeroides</i>	101
3.5.1	Untersuchungen zur direkten Interaktion von CryB mit bekannten Regulatorproteinen	103
3.5.2	MBP - und GST - <i>tag pull-down</i> Analysen zur Interaktion von AppA und CryB	103
3.5.3	Gel Retardations - assay zur Analyse der Interaktion von AppA und CryB	105
3.5.4	Auswirkungen der Überexpression des CryB - Proteins auf das Wachstum und die Pigmentbildung	107
3.5.5	Auswirkungen der CryB - Überexpression auf die blaulicht- und sauerstoffabhängige Expression der Photosynthesegene	110
3.5.6	Analyse einer möglichen Interaktion von LOV und CryB mit Proteinen der Kapselbiosynthese	112
3.5.7	Identifikation möglicher Interaktionspartner aus der Kapselbiosynthese	112
3.5.8	Nachweis der Kapselsynthese durch verschiedene Kapselfärbungen	113

3.5.9	Nachweis der Kapselsynthese durch Sedimentationsversuche	114
3.6	Vergleich der Transkriptome von <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 und Δlov nach mikroaerobem Wachstum	115
3.6.1	Aufbereitung der Rohdaten	116
3.6.2	Allgemeine Übersicht über die Transkriptomanalyse	118
3.6.3	Einfluss von LOV auf die Expression der Photosynthesegene	120
3.6.4	Einfluss von LOV auf die Expression der Gene des σ^E / ChrR Regulons	122
3.6.5	Weitere durch die LOV - Deletion beeinflusste Gene	126
3.6.6	Einfluss von LOV auf die Expression von sRNAs	129
3.7	Vergleich der Transkriptome von <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 und Δlov nach Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress	132
3.7.1	Aufbereitung der Rohdaten	134
3.7.2	Allgemeine Übersicht über die Transkriptomanalyse	135
3.7.3	Unter allen Versuchsbedingungen beeinflusste Gene	137
3.7.4	Durch Blaulichtbestrahlung und photooxidativen Stress beeinflusste Gene	138
3.7.5	Nur durch Blaulichtbestrahlung beeinflusste Gene	141
3.7.6	Nur durch photooxidativem Stress beeinflusste Gene	141
3.7.7	Nur durch mikroaerobes Wachstum beeinflusste Gene	142
3.7.8	Einfluss von Blaulicht und photooxidativem Stress auf die sRNA Expression	144
4.	DISKUSSION	148
4.1	Analyse der Blaulichtsensitivität des AppA / PpsR und des PrrB / PrrA - Systems in <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	148
4.1.1	Blaulichtsensitivität der Photosynthesegenexpression in <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	148
4.1.2	Blaulichtsensitivität der Photosynthesegenexpression in der <i>R. sphaeroides</i> FnrL - und PrrB - Mutante	151
4.2	<i>In vivo</i> - Effekte von BLUF - Mutanten auf die Expression der Photosynthesegene	153
4.2.1	Blaulichtsensitivität der Photosynthesegenexpression in der BLUF - Mutante <i>R. sphaeroides</i> App11::appAW104F	153
4.2.2	Blaulichtsensitivität der Photosynthesegenexpression in der BLUF - Mutante <i>R. sphaeroides</i> App11 pRKappAY21F bzw. Y21C	155
4.2.3	Blaulichtsensitivität der Photosynthesegenexpression in der BLUF - Mutante <i>R. sphaeroides</i> App11 pRKappAW104F/Y21F	157
4.3	<i>Yeast - Two - Hybrid</i> - Interaktionsstudien mit dem LOV - und dem CryB - Protein von <i>R. sphaeroides</i>	158
4.3.1	Untersuchungen zur direkten Interaktion von CryB mit bekannten Regulatorproteinen	159
4.3.2	Weiterführende Analysen zur Interaktion von CryB mit AppA und der mögliche Rolle dieser Interaktion für die Photosynthesegenregulation	160
4.3.3	Analyse einer möglichen Interaktion von LOV und CryB mit Proteinen der Kapselbiosynthese	163
4.6	Vergleich der Transkriptome von <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 und Δlov nach mikroaerobem Wachstum	164
4.6.1	Allgemeine Übersicht über die Transkriptomanalyse	164
4.6.2	Einfluss von LOV auf die Expression der Photosynthesegene	165
4.6.3	Einfluss von LOV auf die Expression der Gene des σ^E / ChrR Regulons	166

4.6.4	Weitere durch die LOV - Deletion beeinflusste Gene	166
4.6.5	Einfluss von LOV auf die Expression von sRNAs	168
4.7	Vergleich der Transkriptome von <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 und Δlov nach Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress	169
4.7.1	Allgemeine Übersicht über die Transkriptomanalyse	169
4.7.2	Unter allen Versuchsbedingungen beeinflusste Gene	170
4.7.3	Durch Blaulichtbestrahlung und photooxidativen Stress beeinflusste Gene	171
4.7.4	Nur durch Blaulichtbestrahlung beeinflusste Gene	173
4.7.5	Nur durch photooxidativem Stress beeinflusste Gene	174
4.7.6	Nur durch mikroaerobes Wachstum beeinflusste Gene	175
4.7.7	Einfluss von Blaulicht und photooxidativem Stress auf die sRNA Expression	176
4.7.8	Abschließende Aussagen über eine mögliche physiologische Rolle des LOV - Proteins in <i>R. sphaeroides</i>	177
5.	ZUSAMMENFASSUNG	179
6.	REFERENZEN	181
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	196
8.	ANHANG	198
8.1	Datenträger mit den Rohdaten der <i>microarray</i> - Analyse	200

1. Einleitung

In allen Reichen des Lebens müssen Organismen Mechanismen entwickeln, um sich an die oft schnell wechselnden Bedingungen ihres Biotops anzupassen. Neben den biotischen Faktoren, wie Konkurrenz und Prädatoren - aber auch Symbiose und Kommensalismus - haben die abiotischen Faktoren oft eine größere Bedeutung für Lebewesen. So können Änderungen der Temperatur, des pH - Wertes, der Osmolarität und der Verfügbarkeit von Sauerstoff und Licht den Lebensraum binnen kürzester Zeit auf - oder abwerten. Dies gilt im besonderen Maße für Mikroorganismen. Durch ihr verhältnismäßig geringes Volumen / Oberfläche - Verhältnis nehmen sie Veränderungen ihrer Umwelt besonders drastisch wahr. Um auf diese Veränderungen reagieren zu können, haben sich eine Vielzahl von sensorischen Signaltransduktionswegen entwickelt, die es den Organismen ermöglichen, mit ihrer Umwelt zu interagieren. Die kleinste Einheit dieser Systeme stellt das Rezeptor (Sensor) - Protein dar. Diese Rezeptoren können durch Cofaktoren, Strukturveränderungen oder Interaktion mit anderen Proteinen Veränderungen der Umwelt wahrnehmen und so eine Reaktion der Zelle auf diese auslösen.

Die häufigsten Reaktionen auf molekularer Ebene erfolgen durch Beeinflussung der Genexpression und der Proteinsynthese. Veränderungen in der Genexpression (Transkription) werden oft direkt durch Interaktion mit einem DNA - bindenden Transkriptionsfaktor ausgelöst. In manchen Fällen ist das Rezeptor - Protein selbst in der Lage, die Transkription zu beeinflussen. Durch die Bindung der DNA kann die Promotoraktivität des Gens beeinflusst werden und so zu einer Erhöhung der Genexpression oder einer Repression führen (Lloyd *et al.*, 2001; Xu und Hoover, 2001). Ein Einfluss auf die Proteinsynthese (Translation) kann auf mehreren Wegen geschehen. So kann zum Einen die durch die Transkription gebildete mRNA mittels Bindung von Proteinen (Condon, 2007), Strukturänderung (Condon, 2007), aber auch von kleinen regulatorischen RNAs (Repoila und Darfeuille, 2009), in ihrer Stabilität beeinflusst werden. Zum Anderen kann die Translation direkt am Ribosom verhindert bzw. gefördert werden (Deana und Belasco, 2005; Wilson und Nierhaus, 2007). Die, im Vergleich zu tRNA und rRNA, sehr geringe Stabilität von mRNA, ermöglicht es einem Organismus, binnen kürzester Zeit seine Proteinausstattung zu verändern und sich gezielt an Umweltreize anzupassen.

Diese schnelle Regulation ist von besonderer Notwendigkeit bei der Ausstattung der Zelle mit Proteinen des Energiestoffwechsels. Die große Stoffwechselvielfalt von Mikroorganismen stellt diese vor eine große Herausforderung, denn es muss stets sichergestellt werden, dass die richtigen Enzyme, Proteine und Cofaktoren zur richtigen Zeit vorhanden sind. Dabei spielt das Vorhandensein von Sauerstoff die größte Rolle. Kein Element ist gleichzeitig für so viele Organismen zum Überleben notwendig und toxisch für so viele andere (Halliwell, 2006). Selbst obligat aerobe Lebewesen müssen Mittel und Wege finden, die toxischen Nebenprodukte des Sauerstoffs zu beseitigen, die bei der aeroben Atmung unweigerlich gebildet werden. Die Wahrnehmung von Sauerstoff erfolgt über viele Mechanismen, doch die häufigste ist die direkte Wahrnehmung des Redox - Potentials der Umgebung durch Redox - Sensor - Proteine.

Einen weiteren besonderen Umweltfaktor stellt die Verfügbarkeit von Licht dar. Als Triebkraft der Photosynthese bildet Licht den wohl bedeutendsten Wachstumsfaktor für alle Pflanzen und photosynthetischen Bakterien. Gleichzeitig ist seine Verfügbarkeit durch den Tag- und Nachtzyklus und die geringe Eindringtiefe in Gewässer oft ein begrenzender Faktor für viele Organismen. Sichtbares Licht (380 - 780 nm) beeinflusst nicht nur die direkt von ihm abhängigen, photosynthetisch aktiven Organismen. So werden die circadiane Uhr von Tieren und die Photomorphogenese von Pflanzen maßgeblich durch die Verfügbarkeit von Licht beeinflusst. Die Wahrnehmung von Licht erfolgt durch eine besondere Gruppe von Rezeptor - Proteinen den sogenannten Photorezeptoren.

Für photosynthetisch aktive Organismen müssen Sauerstoff und Licht oft im Zusammenhang betrachtet werden, denn Licht kann sich in hohen Intensitäten auch schädlich auf die Zellkomponenten auswirken. Diese Schäden werden durch die Bildung reaktiven Sauerstoffspezies hervorgerufen, welche durch lichtinduzierte Energieübertragung auf molekularen Sauerstoff im Photosyntheseapparat gebildet werden. Hier ist das Zusammenspiel von Licht - und Sauerstoff - Sensor - Proteinen nötig.

1.1 Das Problem Sauerstoff und seine Wahrnehmung in Bakterien

Das extrem positive Redoxpotential von Sauerstoff macht ihn zu einem hervorragenden Elektronenakzeptor für die aerobe Atmung inklusive vieler chemolithotropher Stoffwechselwege. Molekularer Sauerstoff (O_2) ist reaktionsträge, weil er als Diradikal die π -Orbitale durch zwei ungepaarte Valenzelektronen mit parallelen *spin* besetzt (Triplett-Sauerstoff). Da Sauerstoff aber ein so positives Elektronenpotential hat, kann es bei nahezu allen Elektronenübertragungsvorgängen in der Zelle zu Fehltransfers von Elektronen kommen (Abbildung 1A) (Dempsey, 1999). Dabei können Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Superoxidradikale ($O_2^{\bullet-}$) entstehen, die dann wiederum zur Bildung des hochgradig toxischen und reaktiven Hydroxylradikals ($\bullet OH$) führen können (Seaver und Imlay, 2004). So konnte gezeigt werden, dass etwa 0,2 % allen konsumierten Sauerstoffs die Atmungskette als Superoxidradikale und 0,4 % als Wasserstoffperoxid verlassen (Imlay, 2003).

Eine Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff ist auch während des zellulären Eisenstoffwechsels durch die Fenton - Reaktion möglich (Fenton, 1894). Bei der Fenton - Reaktion werden organische Substrate durch die Reaktion von Eisensalzen und Wasserstoffperoxid oxidiert und es kommt zur Freisetzung von Hydroxylradikalen. Diese Reaktion stellt in biologischen Systemen, nach der Atmungskette, die Hauptquelle für die Bildung von toxischen Sauerstoff - Spezies dar (Abbildung 1B). Die Fenton - Reaktion ist nicht auf Eisen beschränkt und spielt im geringeren Maße auch eine Rolle im Stoffwechsel anderer Metall - Ionen (Zn, Cu, Mo, Ni).

Durch die Bildung von reaktiven Zwischenprodukten (z.B. NO^{\bullet}) kann Stickstoff ebenfalls dazu beitragen, dass toxische Sauerstoff - Stickstoff - Spezies (z.B. Peroxynitrit ($ONOO^-$) und Nitrosoperoxycarbonat ($ONOOCO_2^-$)) gebildet werden (Storz und Imlay, 1999; Fang, 2004). Diese wiederum reagieren mit stabilen Stickstoffverbindungen und sorgen für die Entstehung von nitrosativem Stress, der, nach oxidativem Stress, die größte Quelle für zellschädigende Radikale

in der Zelle darstellt und in seiner Bildung mit diesem in Wechselwirkung steht (Beckman und Koppenol, 1996) (Abbildung 1C).

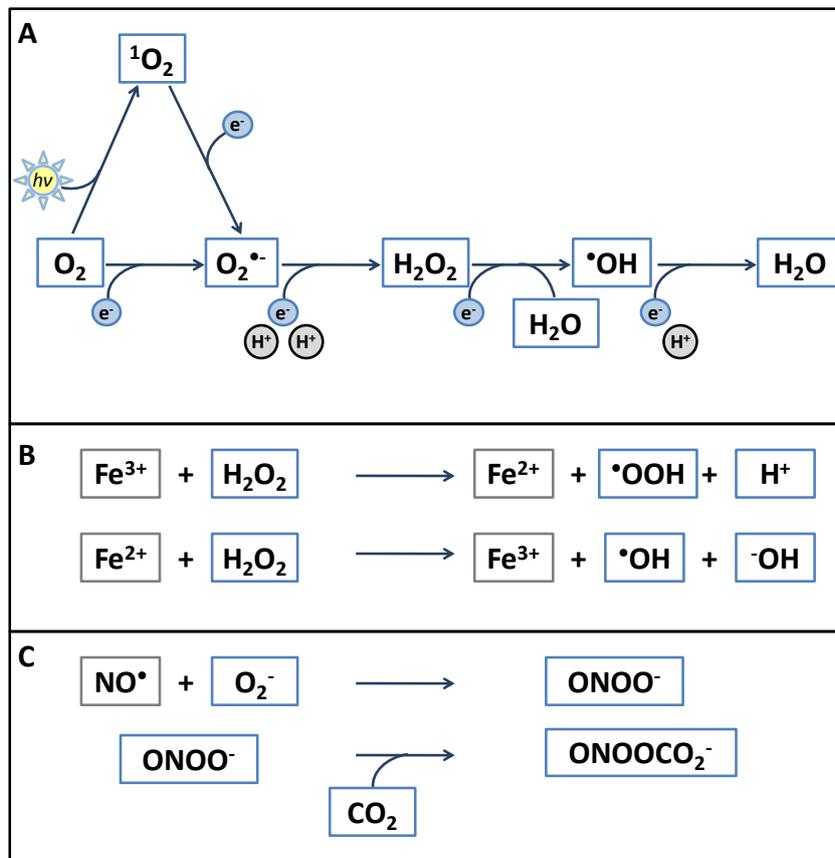


Abbildung 1 : Entstehung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) durch Übertragung von Energie und Elektronen (A), durch die Fenton - Reaktion (B) und die Reaktion mit reaktiven Stickstoffverbindungen (C). Abk.:

O_2 = molekularer Sauerstoff,
 1O_2 = Singulett-Sauerstoff,
 $O_2^{\bullet -}$ = Superoxid - Radikal,
 H_2O_2 = Wasserstoffperoxid,
 $\bullet OH$, = Hydroxylradikal,
 $h\nu$ = Lichtenergie,
 $Fe^{2+/3+}$ = Eisen (II/III)- Ionen,
 $ONOO^-$ = Peroxynitrit,
 $ONOOCO_2^-$ = Nitrosoperoxy-carbonat
 (verändert nach Beckman und Koppenol, 1996; Scandalios, 2002)

Eine besondere Rolle unter den schädlichen Sauerstoffspezies nimmt der Singulett-Sauerstoff (1O_2) ein. Dieser wird nicht durch Übertragung eines Elektrons gebildet, sondern tritt vor allem in photosynthetisch aktiven Organismen auf, wenn deren photosynthetische Pigmente gleichzeitig Sauerstoff und Licht ausgesetzt sind (Abbildung 1A). Die durch z.B. Chlorophylle absorbierte Lichtenergie in den Lichtsammelkomplexen und dem Reaktionszentrum wird nicht zur Entstehung einer protonenmotorischen Kraft genutzt, sondern auf molekularen Sauerstoff übertragen. Es kommt zu einer *Spinumkehr* der Valenzelektronen im π - Orbital und der reaktionsträge Triplett-Sauerstoff wird zum kurzlebigen, reaktiven Singulett-Sauerstoff. Singulett-Sauerstoffstress wird daher oft als photooxidativer Stress bezeichnet. Gleichzeitig kann es auch während des lichtgetriebenen Elektronentransports zur Übertragung von Elektronen der NAD(P)H - Oxidase auf Sauerstoff (statt NAD(P)⁺) kommen. Dabei wird in mehreren Schritten ebenfalls Singulett-Sauerstoff gebildet (Pomposiello und Demple, 2002).

Neben der Bildung von toxischen Sauerstoffspezies durch endogene Faktoren, kann dieser auch durch externe Faktoren wie UV - Strahlung, ionisierende Strahlung aber auch normale Lichtbestrahlung, gebildet werden (Moradas-Ferreira *et al.*, 1996).

Alle diese toxischen Sauerstoffprodukte werden unter dem Überbegriff reaktive Sauerstoff - Spezies (*reactive oxygen species*, ROS) zusammengefasst. Kann deren Entgiftung nicht mehr im ausreichenden Maße stattfinden, spricht man von oxidativem Stress.

1.1.1 Schäden durch reaktive Sauerstoff - Spezies

Die größten Schäden in lebenden Organismen entstehen durch Wasserstoffperoxid und Superoxidradikale, da diese die Proteine des Organismus direkt oxidieren, während Hydroxylradikale vor allem mit der DNA reagieren und so Läsionen verursachen, die mutagen oder letal wirken können (Imlay, 2003). Schäden an Proteinen lassen sich meist auf Schädigungen des Peptidrückgrats, die Oxidation von Eisen - Schwefel - *clustern* und die Oxidation von Seitenkettenresten zurückführen, wobei aromatische Aminosäuren am stärksten betroffen sind (Davies, 2005). Schäden an Membranen werden durch die Bildung von Lipidperoxiden hervorgerufen, die die Integrität und Fluidität der Membran zerstören (Wu *et al.*, 2002).

Für Singulett-Sauerstoff konnte *in vitro* gezeigt werden, dass dieser mit Proteinen, DNA und Membranlipiden reagieren kann (Sies und Menck, 1992; Epe *et al.*, 1993; Briviba *et al.*, 1997). Da die Bildung von Singulett-Sauerstoff vor allem an den photosynthetischen Pigmenten geschieht, treten Schädigungen des Chlorophylls und so eine Hemmung der Photosynthese auf (Storz und Imlay, 1999).

1.1.2 Entgiftung von reaktiven Sauerstoff - Spezies

Mit dem ersten Auftreten von Sauerstoff in der Atmosphäre mussten Organismen Mittel und Wege finden, die unweigerlich auftretenden reaktiven Sauerstoff - Spezies zu entgiften. Diese Entgiftung kann durch die Beseitigung der gebildeten Moleküle und / oder durch die Reparatur der angerichteten Schäden geschehen. Man unterscheidet dabei die enzymatische Abwehr von der nicht enzymatischen Abwehr.

Unter den enzymatischen Abwehrmechanismen sind die bekanntesten die Katalasen, Peroxidasen und Superoxid - Dismutasen (Abbildung 2). Katalasen katalysieren die Umwandlung von Wasserstoffperoxid in Wasser und molekularem Sauerstoff, während Peroxidasen Wasserstoffperoxid über einen intrazellulären Reduktanten (z.B. NADH₂) entgiften. Superoxid-Dismutasen katalysieren die Dismutation von Superoxiden, wobei Wasserstoffperoxid und molekularer Sauerstoff gebildet werden. Das durch diese Reaktion gebildete Wasserstoffperoxid wird anschließend durch die Aktivität der oben erwähnten Peroxidasen abgebaut. Zumindest eines dieser Enzyme scheint in allen aerotoleranten und, wie mittlerweile bekannt ist, auch in vielen anaeroben Organismen vorhanden zu sein (Pomposiello und Demple, 2002; Brioukhanov und Netrusov, 2004). Zu den enzymatischen Bestandteilen können auch die DNA - Reparaturmechanismen der Zelle gezählt werden. So werden Exonukleasen, Endonukleasen, DNA - Polymerase I und das Rekombinationssystem auch für eine effiziente Abwehr benötigt (Morimyo, 1982; Imlay und Linn, 1986; Jiang *et al.*, 1997). Um die beschädigten Proteine zu beseitigen oder sie wieder zu falten, müssen zudem auch Chaperone und proteolytische Enzyme vorhanden sein. Darüber hinaus spielen Glyoxylasen eine bedeutende Rolle bei der Entgiftung des, durch oxidativen Stress aus dem Kohlenstoffwechsel gebildeten, toxischen Methylglyoxals (Vander Jagt, 1993). Dieses Molekül ist selber äußerst reaktiv und in den letzten Jahren konnte es als bedeutender Radikalbildner in der Zelle identifiziert werden (Kalapos, 2008; Yadav *et al.*, 2008).

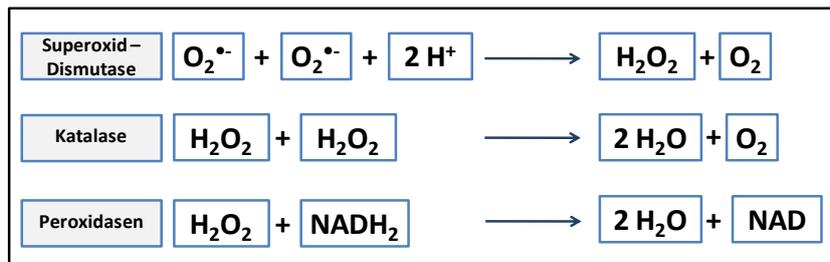


Abbildung 2 : Enzymatische Entgiftung durch Superoxid-Dismutasen, Katalasen und Peroxidasen. Statt $NADH_2$ kann auch Glutathion als Substrat für Peroxidasen dienen.

Die nicht-enzymatischen Mechanismen schließen eine große Anzahl an kleinen Molekülen wie Glutathion (GSH) und Vitamine mit ein. Diese fungieren als Radikalfänger in den Zellen und reduzieren so die Menge an freien, reaktiven Sauerstoffspezies. Zur Vermeidung der Fenton-Reaktion wird die zelluläre Eisenkonzentration durch die Bindung an die Häm-Proteine Bacterioferritin und Ferritin niedrig gehalten (Frolow *et al.*, 1994; Imlay, 2008). Thioredoxine und Glutaredoxine erhalten die reduzierenden Bedingungen im Zellinneren und sind als Oxidoreduktasen in der Lage, oxidierte Proteine wieder zu reduzieren (Aslund und Beckwith, 1999). Sie fungieren ebenfalls als Radikalfänger (Das und Das, 2000). Bei der Abwehr von Singulett-Sauerstoffstress spielen in photosynthetischen Organismen die Carotinoide eine bedeutende Rolle, da sie überschüssige Lichtenergie an den Lichtsammelkomplexen *quenchen* und so die Energieübertragung an Sauerstoff verhindern (Borland *et al.*, 1988). Zudem können sie auch bereits gebildeten Singulett-Sauerstoff direkt *quenchen* (Foote *et al.*, 1970).

Neben den enzymatischen und nicht-enzymatischen Mechanismen wird Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies auch maßgeblich durch Transkriptionsfaktoren beeinflusst, die für die Synthese der oben genannten Faktoren verantwortlich sind. Viele der Schutzmechanismen gegen Sauerstoffstress sind konstitutiv in der Zelle exprimiert, während andere erst bei Bedarf gebildet werden. Diese Proteine, wie der Peroxidsensor OxyR oder der Superoxidsensor SoxR sind als redox-sensitive Transkriptionsregulatoren in der Lage, den Sauerstoffstress wahrzunehmen und darauf zu reagieren (Green und Paget, 2004). Dies ist die direkte Reaktion auf reaktive Sauerstoffspezies. Viele Redox-Sensor-Proteine greifen aber früher ein und verhindern so die Entstehung von reaktivem Sauerstoffstress bevor dieser auftritt. So sorgt z.B. das Protein Fnr dafür, dass viele sauerstoffempfindliche Proteine des anaeroben Stoffwechsels nur gebildet werden, wenn kein Sauerstoff vorhanden ist (Salmon *et al.*, 2003), während die Expression der Photosynthesegene in *Rhodobacter capsulatus* durch das CrtJ-Protein unter aeroben Bedingungen zur Vermeidung von photooxidativem Stress unterdrückt wird (Ponnampalam und Bauer, 1997).

Zur Wahrnehmung der Redoxbedingungen der Umgebung hat sich eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, die zum Teil über Cofaktoren und zum Teil über Cystein-Seitenketten der Proteine erfolgen. Im folgenden Abschnitt schließt sich eine genauere Übersicht der bekannten Sauerstoff- und Redox-Sensoren in Bakterien an.

1.1.3 Thiol-Redox-Sensoren

Die direkte Wahrnehmung des Redoxpotentials über die Thiol-Gruppen an Cystein-Seitenketten von Proteinen ist der am besten charakterisierte Mechanismus zur Messung des Sauerstoffgehalts der Umwelt (Green *et al.*, 2009). Der bekannteste Faktor in dieser Gruppe ist

das OxyR - Protein von *E.coli*, welches über ein Cystein direkt von Wasserstoffperoxid oxidiert werden kann, was anschließend durch Bildung einer Disulfidbrücke eine Strukturänderung des Proteins auslöst. Der Transkriptionsfaktor wird auf diese Weise in seinen aktiven Zustand überführt und bindet die DNA als Tetramer. So wird die Expression eines 20 Gene umfassenden Regulons zur Abwehr von Wasserstoffperoxid - Stress eingeleitet (Imlay, 2008; Knapp *et al.*, 2009). Zu den Thiol - Redox - Sensoren gehört auch das CrtJ - Protein von *Rhodobacter capsulatus*, welches die Synthese der Photosynthesegene bei aeroben Bedingungen reprimiert (Abbildung 3). Das tetramere CrtJ formt unter aeroben Bedingungen eine stabile Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen. Das Protein wirkt in dieser Form als starker Repressor und verhindert die Transkription der gebundenen Gene. Fällt der Sauerstoffpartialdruck, wird die Disulfidbrücke durch Glutathion reduziert und das Protein löst sich von der DNA (Masuda *et al.*, 2002).

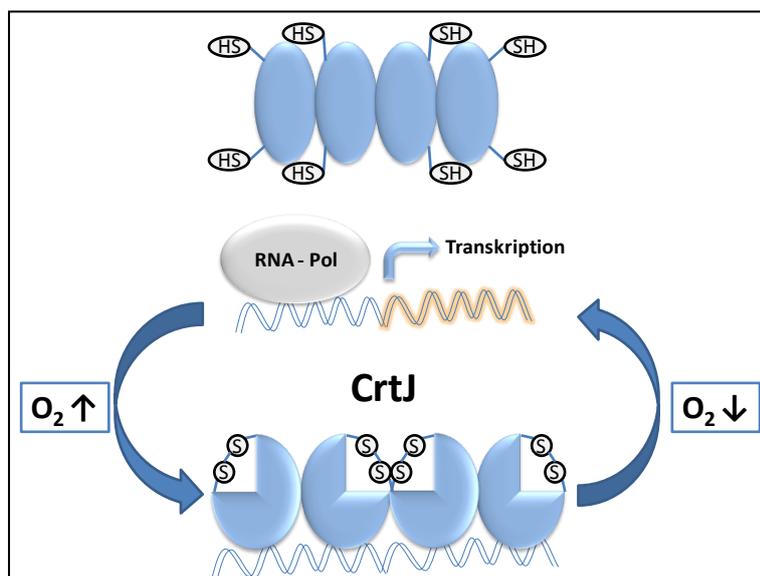


Abbildung 3 : Modell der Redox - abhängigen Regulation der Genexpression durch den Repressor CrtJ. Bei hohem Sauerstoffpartialdruck sind die Cysteine des tetrameren Proteins reduziert (SH). Die Transkription der Gene findet statt. Steigt der Sauerstoffpartialdruck, oxidiert dies die Cysteine und, durch die Bildung von Disulfidbrücken, kann der Repressor die DNA binden. Dies verhindert die Bindung der RNA - Polymerase und so die Transkription (verändert nach Masuda *et al.*, 2002).

1.1.4 Eisen - Schwefel - Redox - Sensoren

Die nächste große Gruppe stellen die Eisen - Schwefel (FeS) - Redox - Sensoren dar. Diese enthalten ein oder mehrere FeS - cluster, die, abhängig vom Redoxzustand der Umgebung, oxidiert oder reduziert vorliegen können (Outten und Theil, 2009). Ein gut untersuchtes Beispiel ist hier das Protein Fnr von *E.coli*, welches 4 FeS - cluster besitzt und abhängig vom Sauerstoffzustand entweder Homodimere (anaerob, aktiver Transkriptionsfaktor) oder ein Monomer (aerob, inaktiver Transkriptionsfaktor) bildet (Becker *et al.*, 1996). Im anaeroben Zustand besitzt das Protein einen $[4\text{Fe} - 4\text{S}]^{2+}$ - cluster, welcher an vier konservierte Cysteine gebunden vorliegt. Wird das Protein Sauerstoff ausgesetzt, wird der Eisen - Schwefel - cluster zu einem $[2\text{Fe} - 2\text{S}]^{2+}$ cluster oxidiert und das Protein verändert seine Konformation, was zur Bildung eines DNA - bindenden Dimers führt (Crack *et al.*, 2004; Crack *et al.*, 2008). Der genaue Mechanismus dieser Oxidation ist noch immer unbekannt (Green *et al.*, 2009). Das aktive Fnr - Protein leitet unter anaeroben Bedingungen die Transkription der für die Nitratatmung benötigten Gene ein und ermöglicht *E.coli*, so eine anaerobe Atmung durchzuführen (Lazazzera *et al.*, 1996).

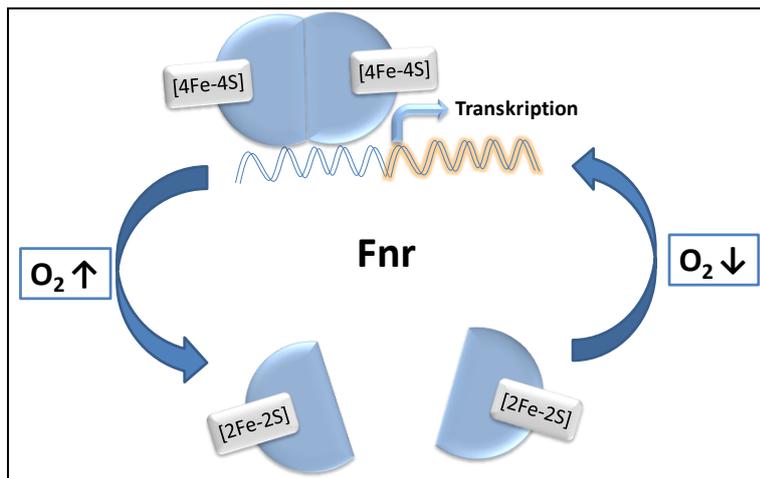


Abbildung 4 : Modell der Redox-abhängigen Regulation der Genexpression durch das Protein Fnr. Unter anaeroben Bedingungen liegt das Protein als Dimer vor und bindet einen $[4\text{Fe} - 4\text{S}]^{2+}$ -cluster. Das dimere Protein leitet die Transkription ein. Bei steigendem Sauerstoffpartialdruck wird schrittweise der Eisen-Schwefel-cluster zu einem $[2\text{Fe} - 2\text{S}]^{2+}$ -cluster oxidiert und führt so zur Dissoziation des Proteins.

1.1.5 Häm- Redox - Sensoren

Häm - Cofaktoren sind durch das gebundene, redoxsensitive Eisenmolekül ebenfalls sehr gut als Sensoren für den Redoxzustand der Umgebung geeignet (Outten und Theil, 2009). Hier können mittlerweile sechs Untergruppen unterschieden werden. Die größte Gruppe besitzt ein oder mehrere an eine PAS (PER ARNT SIM) - Domäne gebundenen Häm - Cofaktoren. Ein gut untersuchtes Beispiel in dieser Gruppe ist FixL von *Sinorhizobium meliloti* (Fischer, 1994). Diese Sensor - Kinase besitzt eine N - terminale PAS - Domäne mit insgesamt fünf gebundenen Häm - Molekülen. Unter aeroben Bedingungen bindet diese Domäne ein Sauerstoffmolekül und verhindert so dessen Autophosphorylierung. Fällt der Sauerstoffpartialdruck, löst sich der Sauerstoff und, nach der eigenen Autophosphorylierung, überträgt das Protein einen Phosphatrest auf den *response regulator* FixJ. Dieser leitet daraufhin die Expression der äußerst sauerstoffempfindlichen Gene der Stickstofffixierung ein.

Eine andere Gruppe von Häm - Redox - Sensoren wurde erst vor wenigen Jahren im AppA - Protein von *Rhodobacter sphaeroides* identifiziert (Han *et al.*, 2007; Moskvina *et al.*, 2007). Dieses Protein besitzt eine C - terminale 120 Aminosäuren lange SCHIC (Sensor Containing Heme Instead of Cobalamin) - Domäne, welche ebenfalls ein Häm binden kann. AppA wirkt als Antirepressor zu dem PpsR Repressor - Protein. PpsR ist das homologe Protein von *R. sphaeroides* zu CrtJ von *R. capsulatus* und verhindert dort auch die Expression der Photosynthesegene unter aeroben Bedingungen. Es konnte bisher nicht nachgewiesen werden, dass PpsR, ebenso wie CrtJ (Abbildung 3), über seine Thiol - Reste direkt den Redox - Zustand der Umgebung wahrnehmen kann (Masuda und Bauer, 2002). Daher wird angenommen, dass dieses Signal vom AppA - Protein an PpsR weitergegeben wird. Unter anaeroben Bedingungen liegt das Häm des AppA - Proteins im reduzierten Zustand vor und AppA bindet das PpsR - Protein. Wird das Häm oxidiert, verändert AppA die Struktur und das wieder freie PpsR kann an die DNA binden und die Photosynthesegene reprimieren (Han *et al.*, 2007; Moskvina *et al.*, 2007).

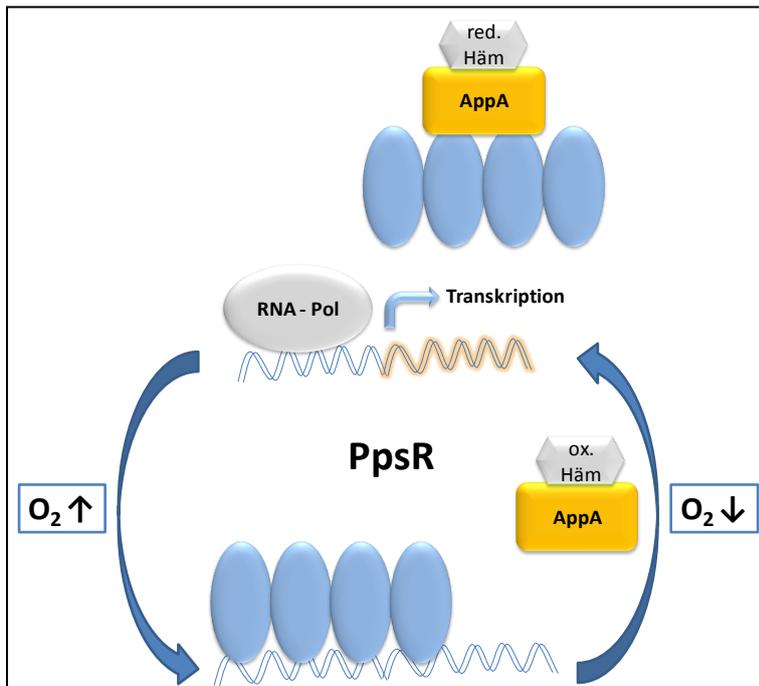


Abbildung 5 : Modell der Redox-abhängigen Regulation der Genexpression durch den Repressor PpsR und den Antirepressor AppA. Bei geringem Sauerstoffpartialdruck liegt das Häm des AppA-Proteins im reduzierten Zustand vor und der Antirepressor kann das PpsR-Protein binden. Die Transkription wird nicht länger reprimiert. Steigt der Sauerstoffpartialdruck wird das Häm oxidiert und AppA kann nicht länger an PpsR binden. Der Repressor liegt wieder frei vor (verändert nach Braatsch *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2007).

1.1.6 Flavin- Redox - Sensoren

Flavine (FAD, FMN) erfüllen eine Vielzahl von Funktionen in der Zelle. Sie können in drei Redoxzuständen (oxidiert (FAD), teiloxidiert (FADH^{*}), reduziert (FADH₂)) vorliegen und sind somit gute Sensoren für die Redoxbedingungen der Umgebung. Das Flavin liegt an eine PAS - Domäne gebunden vor. Der bestuntersuchte Flavin - abhängige Redox - Sensor ist dabei das NifL - Protein von *Azotobacter vinelandi* (Hill *et al.*, 1996). Diese Sensor - Kinase reguliert die Stickstofffixierung. Das Flavin wird extrem schnell vollständig oxidiert, wenn es hohen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt wird. Dies verhindert die Expression der sauerstoffempfindlichen Nitrogenase (Macheroux *et al.*, 1998; Grabbe und Schmitz, 2003). Der genaue Mechanismus der Signaltransduktion zum *response regulator* NifA ist nicht bekannt.

1.2 Die Photosynthese und die Wahrnehmung von Licht in Bakterien

Photosynthetische Organismen müssen sich nicht nur mit dem Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies in der Atmungskette auseinandersetzen, sondern auch die Entstehung von Singulett-Sauerstoff durch die photosynthetischen Pigmente verhindern. Schon vor über 50 Jahren konnte gezeigt werden, dass Carotinoid - Mutanten von *Rhodobacter sphaeroides* binnen kürzester Zeit sterben, wenn sie gleichzeitig Sauerstoff und Licht ausgesetzt werden (Griffiths *et al.*, 1955). Erst deutlich später konnte nachgewiesen werden, dass angeregtes Triplett - Bacteriochlorophyll a, durch Energieübertragung auf Sauerstoff, zur Entstehung des kurzlebigen Singulett-Sauerstoff und so zu irreversiblen Schäden in den Zellen führt (Borland *et al.*, 1987). In den folgenden Jahren konnte auch die Rolle von Carotinoiden als *quencher* des angeregten Bacteriochlorophylls und des entstehenden Singulett-Sauerstoffs gezeigt werden (Cogdell und

Frank, 1987; Cogdell *et al.*, 2000). Obligat photosynthetische Organismen sind auf die schützenden Eigenschaften dieser Pigmente angewiesen, um unter aeroben Bedingungen Photosynthese betreiben zu können. In Pflanzen hat sich eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um die Entstehung von photooxidativem Stress, auch bei einem Überschuss an Licht und atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen, gering zu halten (Li *et al.*, 2009). Viele Bakterien sind fakultativ photosynthetisch und können in Habitaten leben, in denen nur minimale Sauerstoffkonzentrationen auftreten. Der bereits erwähnte *Rhodobacter sphaeroides* ist ein solches fakultativ photosynthetische Bakterium und wird in Abschnitt 1.3 genauer beschrieben.

Fakultativ photosynthetische Organismen exprimieren ihre Photosynthesepigmente nur, wenn wenig oder kein Sauerstoff vorhanden ist. Da durch die von ihnen durchgeführte anoxygene Photosynthese kein Sauerstoff gebildet wird, können sie das Problem der Entstehung von Singulett-Sauerstoff gänzlich umgehen. Dies stellt sie jedoch vor die Herausforderung, neben der bereits beschriebenen Wahrnehmung der Redoxbedingungen (Abschnitt 1.1) das Vorhandensein von Licht messen zu können. Weil sie oft in den tieferen, anoxischen Bereichen von Gewässern leben, stellt das energiereiche Blaulicht (380 - 490 nm) die einzige Möglichkeit der Lichtwahrnehmung für sie dar. Im Folgenden werden kurz die bisher bekannten bakteriellen Photorezeptoren beschrieben und anschließend wird eine Übersicht über die wichtigsten Blaulichtrezeptoren gegeben.

1.2.1 Bakterielle Photorezeptoren

Allen Photorezeptoren ist die Bindung eines lichtempfindlichen Cofaktors gemein, des sogenannten Chromophors (griech. *Farbträger*). Dieser besitzt oft konjugierte Doppelbindungssysteme (z.B. Carotin) oder große aromatische Ringsysteme (z.B. Flavin). Die Aufnahme von Lichtquanten sorgt bei diesen Molekülen für den Übergang in einen angeregten Zustand, der durch die Emission von Licht einer anderen Wellenlänge wieder in den Urzustand zurückversetzt wird. Wird das Chromophor in diesen angeregten Zustand versetzt, führt dies meist zu einer Konformationsänderung des gebundenen Proteins. Das Photorezeptor - Protein gelangt so in seinen aktiven Zustand und kann das Signal weitergeben.

Die heute bekannten Photorezeptoren lassen sich in sechs Übergruppen (Phytochrome, Cryptochrome, LOV- Domänen - Proteine, BLUF - Domänen - Proteine, PYP - verwandte Proteine und Rhodopsine) einordnen, die sich zum Teil deutlich in den von ihnen absorbierten Wellenlängenbereichen voneinander unterscheiden. Die am besten beschriebene Gruppe stellen die Phytochrome dar. Die Rotlichtrezeptoren (650 - 750 nm) stellten sich als die hauptverantwortlichen Faktoren für die seit über 50 Jahren beschriebenen Rotlichteffekte auf das Wachstum von Pflanzen heraus. In Bakterien gelang erst sehr viel später der Nachweis eines echten Phytochroms (Yeh *et al.*, 1997). Heute kann in 10,9 % aller sequenzierten Bakterien ein Vertreter der Phytochrome nachgewiesen werden (Losi und Gärtner, 2008) und diese unterscheiden sich oft deutlich von den aus Pflanzen bekannten Proteinen. Die Gruppe der Rhodopsine absorbiert im blauen bis grünen Bereich (380 - 575 nm) und ist in Pflanzen und Tieren weit verbreitet. In Prokaryoten ist vor allem das Bacteriorhodopsin des Archaeon *Halobacterium salinarum* ein bekannter Vertreter (Schobert und Lanyi, 1982). Dieser Gruppe dient Retinal als Chromophor. Die in Bakterien dominanten Blaulichtrezeptoren (380 - 490 nm)

können in vier große Untergruppen unterteilt werden : Die ersten in Pflanzen beschriebenen Blaulichtrezeptoren waren die Cryptochrome (Ahmad und Cashmore, 1993), die mit den an der Reparatur von Thymindimeren beteiligten Photolyasen eine Superfamilie bilden (Essen, 2006). Der Entdeckung der Cryptochrome folgte wenige Jahre später die Entdeckung der Phototropine, (Huala *et al.*, 1997), die das Blaulicht über eine LOV (*Light Oxygen Voltage*)-Domäne wahrnehmen. LOV - Domänen - Proteine lassen sich in 13,4 % aller sequenzierten Bakterien - Genome nachweisen und sie sind die einzigen bisher nachgewiesenen reinen Blaulichtrezeptoren in Archaea (Losi und Gärtner, 2008). Die jüngste entdeckte Gruppe von Blaulichtrezeptoren stellen die BLUF (*Blue Light Sensing Using FAD*) - Domäne - Proteine dar (Gomelsky und Klug, 2002). Diese wurden zur gleichen Zeit im Protisten *Euglena gracilis* (Iseki *et al.*, 2002) und im Proteobakterium *Rhodobacter sphaeroides* (Braatsch *et al.*, 2002) beschrieben. Vergleiche von Sequenzdaten zeigen, dass die BLUF - Domänen - Proteine in 11,4 % aller bakteriellen Genome nachweisbar sind (Losi und Gärtner, 2008). Den drei bisher genannten Blaulichtrezeptorgruppen ist die Bindung von mindestens einem Flavin (Flavin - Adenin - Dinukleotid (FAD), Flavin - Mono - Nukleotid (FMN)) als Chromophor gemeinsam. Die letzte Gruppe von Blaulichtrezeptoren ist zugleich auch die kleinste. Das PYP (*Photoactive Yellow Protein*) von *Halorhodospira halophila* wurde schon früh als Photorezeptor beschrieben (Meyer *et al.*, 1987) und kristallisiert (McRee *et al.*, 1989). Gleichzeitig ist die genaue Funktion des Proteins in der Zelle aber bis heute noch unbekannt und mit 4-Hydroxycimtsäure (Kumarinsäure) besitzt es einen einzigartigen Chromophor.

Während die physiologischen Funktionen von Photorezeptoren in vielen Eukaryoten bereits bekannt sind, trifft dies nur für die wenigsten prokaryotischen Vertreter zu.

1.2.2 Flavine und ihre Rolle als Cofaktoren und Chromophore

Flavine (FMN, FAD) spielen nicht nur bei der Wahrnehmung von Redox - Signalen eine Rolle (vgl. Abschnitt 1.1.6), sondern auch als Chromophor bei fast allen Blaulichtrezeptoren (LOV - Domänen - Proteine, Cryptochrome, BLUF - Domänen - Proteine). Sie sind zudem bedeutende Cofaktoren für den Stoffwechsel und die Atmungskette. Proteine mit einem gebundenen Flavin werden auch als Flavoproteine bezeichnet. Die wasserlöslichen Flavine besitzen einen Isoalloxazin - Ringsystem und werden über die Pteridin - Biosynthese gebildet. In Lösung sind sie stark gelbfarben und zeigen eine starke Absorption im blauen Bereich. Die Synthese von FMN und FAD erfolgt über Riboflavin (Vitamin B₁₂). Riboflavin besteht aus dem Isoalloxazin und dem Zuckeralkohol Ribitol (Abbildung 6A). Durch das Anhängen einer zusätzlichen Phosphatgruppe erhält man FMN (Abbildung 6B), welches durch die Reaktion mit Adenosinmonophosphat (AMP) wiederum zu FAD wird (Abbildung 6D). Zur Lichtwahrnehmung nutzen Flavoproteine die verschiedenen Redoxzustände, die das Flavin einnehmen kann (Losi, 2007). Dabei können ein oder zwei Elektronen und Protonen auf die Stickstoffatome des Isoalloxazin - Ringsystems übertragen werden. Das vollständig oxidierte, gelbfarbene Flavin kann zuerst ein Elektron/Proton aufnehmen und so in den Semichinonzustand (Radikalzustand) übergehen. Wird ein weiteres Elektron/Proton aufgenommen, erhält man das farblose vollständig reduzierte Flavin (Abbildung 6D). Die Art der Veränderung des Redoxzustands ist

zwischen den Photorezeptoren unterschiedlich und geht oft mit Konformationsänderungen des Flavoproteins einher.

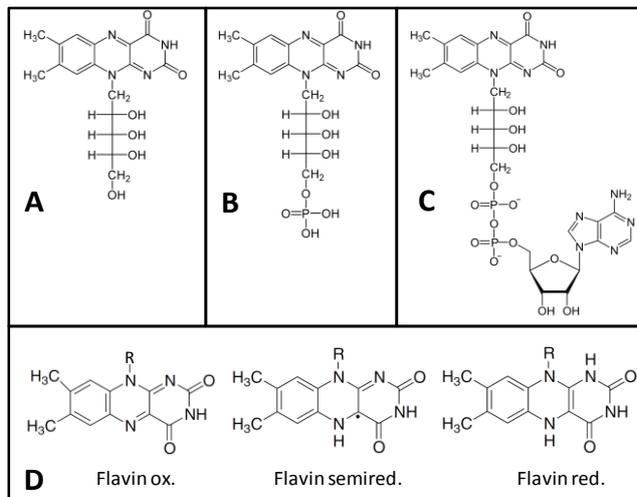


Abbildung 6 : Strukturformeln der unterschiedlichen Flavine und die möglichen Redoxzustände. Dargestellt sind Riboflavin (A), das Flavin - Mono - Nucleotid (FMN) (B) und das Flavin - Adenin - Dinucleotid (FAD) (C). Des Weiteren sind die möglichen Redoxzustände des Flavin dargestellt (D), wobei das vollständig oxidierte Flavin (Flavin ox.) vom semireduzierten (oder Semichinon - Flavin (Flavin semired.) und vom vollständig reduzierten Flavin (Flavin red.) unterschieden werden kann (verändert nach Song *et al.*, 2006).

1.2.3 Cryptochrome

Die Cryptochrome bilden zusammen mit den Photolyasen eine gemeinsame Gruppe von Blaulichtrezeptoren (Sancar, 2003). Die relativ großen Proteine (55 - 75 kDa) haben alle die PHR (**Photolyase Related**) - Domäne gemeinsam (Abbildung 7). Diese bindet ein FAD - Molekül und ein Antennenpigment, welches in den meisten Fällen ein Pterin (Methylentetrahydrofolat (MTHF), 8 - Hydroxy - 7,8 - didemethyl - 5 - deazariboflavin (8-HDF)) und in wenigen Fällen ein Flavin (FAD, FMN) ist (Partch und Sancar, 2005; Klar *et al.*, 2006; Fujihashi *et al.*, 2007). Anders als Photolyasen, welche für die blaulichtabhängige Reparatur von UV - Schäden an Doppelstrang - DNA (dsDNA) zuständig sind, besitzen Cryptochrome sehr unterschiedliche Aufgabengebiete. So regulieren sie die circadiane Uhr in Insekten (Tomioka und Matsumoto, 2010) und Wirbeltieren (Maywood *et al.*, 2007; Tamanini *et al.*, 2007) und spielen eine entscheidende Rolle bei der Blütenbildung, dem Wurzelwachstum und der Stängelverlängerung von Pflanzen (Hegemann, 2008; Liu *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2010). Strukturell unterscheiden sie sich von den Photolyasen durch eine C - terminale Verlängerung, die sich an die PHR - Domäne anschließt und von variabler Länge ist (Sancar, 2003). Diese könnte in einigen Fällen eine Rolle in der Signaltransduktion des Proteins spielen, wobei dies bisher noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte (Losi, 2007).

Nicht alle Cryptochrome besitzen die C - terminale Verlängerung. Die bedeutendste Ausnahme bildet dabei die CRY - DASH (**Drosophila Arabidopsis Synechocystis Human**) - Familie (Brudler *et al.*, 2003). Alle neueren Studien deuten allerdings daraufhin, dass es sich bei den Proteinen der CRY - DASH - Familie um Einzelstrang (ss)- DNA spezifische Photolyasen handelt (Selby und Sancar, 2006; Brolich *et al.*, 2010; Sokolowsky *et al.*, 2010).

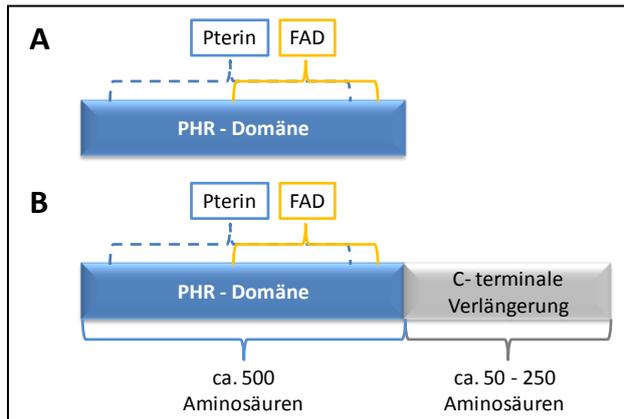


Abbildung 7 : Allgemeine Übersicht über die Struktur von Cryptochromen. Alle Cryptochrome besitzen eine etwa 500 Aminosäuren lange PHR - Domäne, die ein FAD und ein Antennenpigment (Pterin oder FAD / FMN) bindet. Proteine aus der CRY - DASH Familie oder das *R. sphaeroides* CryB - Protein bestehen nur aus dieser Domäne (**A**), während andere Cryptochrome noch eine C - terminale Verlängerung, von variabler Länge besitzen (**B**).

Die aktive Form des FAD im Photozyklus der Cryptochrome (Abbildung 8) ist das mit zwei Elektronen und einem Proton reduzierte FADH^- (Selby und Sancar, 2006). Dabei dient die oxidierte Form (FAD) als Grundzustand (Bouly *et al.*, 2007; Losi, 2007). Der weitere Verlauf des Photozyklus ist umstritten und die Beteiligung einer konservierten Tryptophan - Triade in den Cryptochromen wird vermutet (Zeugner *et al.*, 2005).

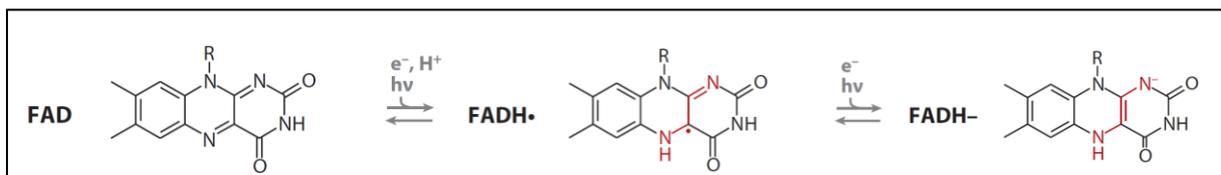


Abbildung 8 : Vereinfachte Darstellung der Photochemie des FAD im Photozyklus der Cryptochrome. Das vollständig oxidierte FAD wird unter Lichteinwirkung ($h\nu$), sowie der Aufnahme je eines Elektrons (e^-) und Protons (H^+) zum Semichinon (FADH^\bullet) reduziert. Bei weiterer Belichtung wird dieses unter Aufnahme eines weiteren Elektrons zum FADH^- weiter reduziert (verändert nach Möglich *et al.*, 2010).

Ein ungewöhnliches Cryptochrom (CryB) konnte in *R. sphaeroides* identifiziert werden (Hendrischk *et al.*, 2009a). Dieses besitzt keine C - terminale Verlängerung, zeigt aber nur geringe Sequenzidentität zu CRY - DASH - Proteinen. Zudem konnte das zweite Antennenpigment neben dem Chromophor FAD bisher noch nicht identifiziert werden. Obwohl dem CryB - Protein die konservierte Tryptophan - Triade fehlt, führt es einen Photozyklus durch und zeigt eine hohe RNA und ssDNA - Bindefähigkeit, die jedoch nicht mit der blaulichtabhängigen Reparatur von Thymin - Dimeren einher geht (Hendrischk *et al.*, 2009a). Darüber hinaus scheint der Photozyklus von oxidiertem FAD, zum mit zwei Elektronen und einem Proton reduzierten, FADH^- zu verlaufen und somit anderen Cryptochromen zu ähneln (Hendrischk *et al.*, 2009a). Es ist das einzige bakterielle Cryptochrom, für das bisher eine Funktion (Beteiligung an der Regulation des Photosyntheseapparates) nachgewiesen werden konnte. Seine Expression wird σ^{Hll} - abhängig (vgl. Abschnitt 1.3.4) reguliert (Hendrischk *et al.*, 2009a).

1.2.4 LOV - Domänen - Proteine

Die LOV - Domäne wurde zuerst als Blaulichtrezeptor der pflanzlichen Phototropine identifiziert (Christie *et al.*, 1998). Diese enthalten zwei besondere *tandem* PAS - Domänen, die als Rezeptoren für Licht - (*Light*), Sauerstoff - (*Oxygen*) und Spannungs - (*Voltage*) Signale dienen können, woraus sich der Name „LOV“ ableitet (Taylor und Zhulin, 1999). Die LOV - PAS - Domänen enthalten dabei immer die konservierte Aminosäurefolge GXNCRFLQ, die ein hochkonserviertes und für den Photozyklus benötigtes Cystein enthält (Briggs, 2007). Die LOV - Domäne selbst ist eine relativ kurze Domäne (100 - 110 Aminosäuren) und nimmt, bis auf wenige Ausnahmen, Blaulicht über einen FMN - Cofaktor wahr (Möglich *et al.*, 2010). Die Signalweiterleitung erfolgt in den meisten Fällen über eine, durch eine α - Helix (α) angeschlossene Ausgangsdomäne, welche ein weites Funktionspektrum umfassen kann (Abbildung 9). Die LOV - Domänen - Proteine steuern in Pflanzen Phototropismus, Chloroplasten - und Blattbewegung und die Stomataöffnung (Christie *et al.*, 1998; Christie, 2007). In Prokaryoten ist die physiologische Rolle von LOV - Photorezeptoren bisher kaum untersucht. In dieser Gruppe befinden sich zudem Proteine ohne Ausgangsdomäne (Losi und Gärtner, 2008). Das erste beschriebene bakterielle, nur aus einer N - terminalen LOV - Domäne und einer kurzen C - terminalen α - Helix bestehende Protein ist dabei das PpSB1 - Protein von *Pseudomonas putida*, dessen physiologische Rolle allerdings noch unbekannt ist (Krauss *et al.*, 2005; Jentsch *et al.*, 2009). Eine bekannte Funktion hat z.B das YtvA - Protein aus *Bacillus subtilis*, welches nach Bestrahlung mit Blaulicht als Antagonist zu einem Anti - σ - Faktor wirkt (siehe Abschnitt 1.3.4). Zudem konnte eine Wirkung als positiver Regulator des σ^B - Faktors der generellen Stressantwort gezeigt werden (Losi *et al.*, 2002; Avila-Perez *et al.*, 2006). Dieses besitzt jedoch eine C - terminale STAS (Sulfattransport / Anti - Sigma)- Ausgangsdomäne.

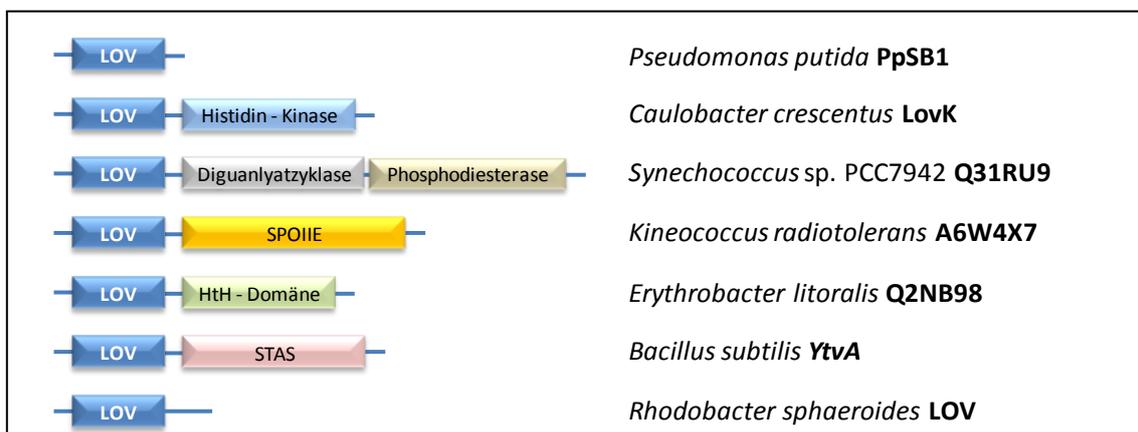


Abbildung 9 : Übersicht über die Domänenstruktur bekannter bakterieller LOV - Domänen - Proteine. Für *Synechococcus* sp. PCC7942, *Kineococcus radiotolerans* und *Erythrobacter litoralis* sind die NCBI - Akzessions - Nummern angegeben. SPOIIE ist ein an der Sporulation beteiligter Faktor. Die Helix - turn - Helix - Domäne (Hth) wirkt als Transkriptionsfaktor. Die STAS - Domäne wirkt als Sulfattransporter / Anti - Sigma - Faktor - Antagonist (verändert nach Losi und Gärtner, 2008).

Der Photozyklus von LOV - Proteinen (Abbildung 10) ist einzigartig und beginnt mit der dunkeladaptierten D₄₅₀ - Form, wobei ein vollständig oxidiertes FMN - Molekül als Cofaktor vorliegt. Bei Bestrahlung mit Blaulicht wird ein kurzlebiger Tripletzustand gebildet (L₆₆₀), der eine Thioether - Bindung mit dem konservierten Cystein der LOV - Domäne eingeht. Die Bildung

eines Semichinon - Radikals während dieser Reaktion wird vermutet. Die so gebildete S_{390} - Form stellt die physiologisch aktive Form des Proteins dar und führt zur Signaltransduktion des Blaulichtreizes. Durch Oxidation des FMN wird daraufhin die D_{450} - Form wiederhergestellt (Salomon *et al.*, 2000; Salomon *et al.*, 2001; Schleicher *et al.*, 2004; Matsuoka *et al.*, 2007).

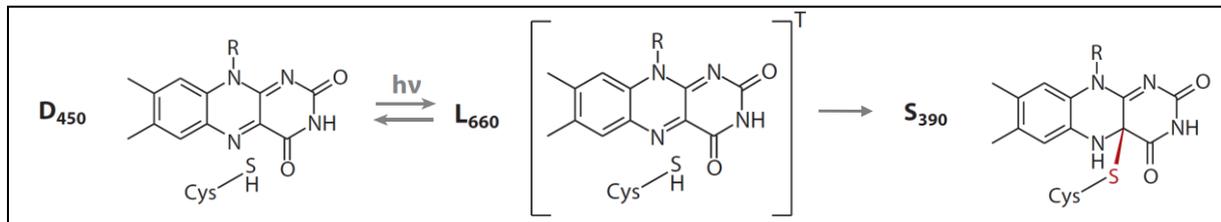


Abbildung 10 : Vereinfachte Darstellung der Photochemie des FMN im Photozyklus von LOV - Domänen - Proteinen. D_{450} ist die dunkeladaptierte Form, die durch Blaulicht in einen angeregten Triplettzustand (L_{660}) übergeht. Dies führt zur Bildung einer Thioether - Bindung mit dem konservierten Cystein (verändert nach Möglich *et al.*, 2010).

Ein LOV - Protein ohne Ausgangsdomäne konnte auch in *R. sphaeroides* identifiziert werden (Hendrischk *et al.*, 2009b). Dieses bindet ebenfalls ein FMN als Chromophor und zeigt den für LOV - Proteine typischen Photozyklus. Gleichzeitig weist es aber einige strukturelle Besonderheiten auf. So besitzt das Protein eine ungewöhnlich lange α - Helix ($J\alpha$) am C - Terminus, die aber nicht in eine Ausgangsdomäne mündet. Eine physiologische Funktion des Proteins konnte bisher noch nicht beschrieben werden (Hendrischk, 2009; Hendrischk *et al.*, 2009b).

1.2.5 BLUF - Domänen - Proteine

Blaulichtrezeptoren mit der BLUF - Domäne wurden etwa zur gleichen Zeit in Prokaryoten (Braatsch *et al.*, 2002; Gomelsky und Klug, 2002) und Eukaryoten (Iseki *et al.*, 2002) beschrieben. Diese Gruppe scheint jedoch deutlich verbreiteter in Prokaryoten zu sein und es konnte bis heute kein einziger Vertreter unter den höheren Pflanzen identifiziert werden (Möglich *et al.*, 2010). Die relativ kurzen BLUF - Domänen (100 - 110 Aminosäuren, (Losi, 2007)) binden FAD als Cofaktor und sind, wie die LOV - Domänen, oft an eine Ausgangsdomäne gekoppelt (Abbildung 11). Das bestuntersuchte BLUF - Domänen - Protein ist das, in Abschnitt 1.1.5 bereits als Redox - Sensor beschriebene, AppA - Protein von *R. sphaeroides*. Dieses besitzt eine N - terminale BLUF - Domäne, die bei Blaulichtbestrahlung die Interaktion des redoxsensitiven C - Terminus mit dem PpsR - Repressor hemmt (Braatsch *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2004). PpsR bindet so an die DNA und verhindert die Transkription der Photosynthesegene. Die Rolle des AppA - Proteins bei der Genregulation in *Rhodobacter sphaeroides* wird in Abschnitt 1.3.3 genauer beschrieben. Das *E. coli* - Protein YcgF hat eine C - terminale Phosphodiesterase - Domäne, die eine Rolle beim Abbau des *second messengers* zyklischem di - GMP und der Abwehr von oxidativem Stress beteiligt spielt (Rajagopal *et al.*, 2004).

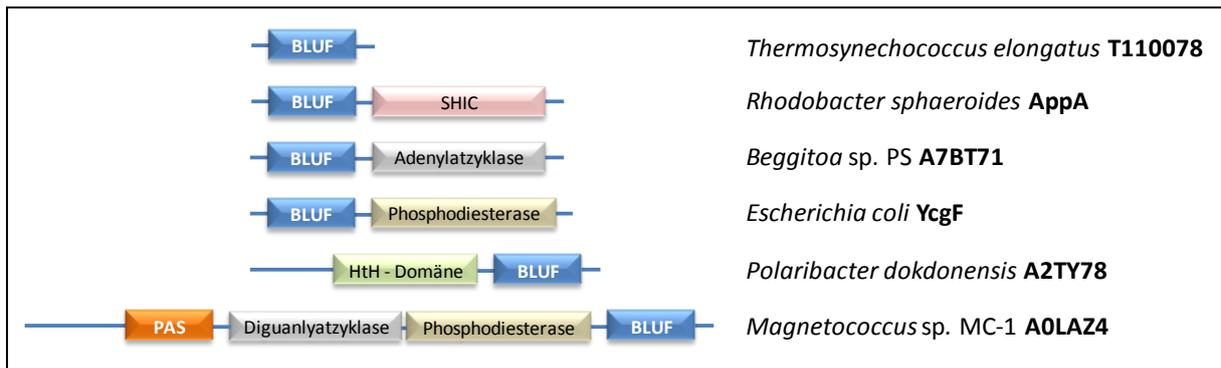


Abbildung 11 : Übersicht über die Domänenstruktur bekannter bakterieller BLUF - Domänen - Proteine. Für *Thermosynechococcus elongatus*, *Beggiatoa* sp. PS, *Polaribacter dokdonensis* und *Magnetococcus* sp. MC-1 sind die NCBI - Akzessions - Nummern angegeben. SHIC ist die in Abschnitt 1.1.5 beschriebene Häm - bindende Redox - Sensor - Domäne. Die Helix - turn - Helix - Domäne (HtH) ermöglicht die DNA - Bindung als Transkriptionsfaktor (verändert nach Losi und Gärtner, 2008).

Der Photozyklus von BLUF - Domäne - Proteinen (Abbildung 12) wurde in den letzten Jahren sehr intensiv untersucht und ist einzigartig unter den Photorezeptoren (Masuda *et al.*, 2004; Gauden *et al.*, 2005; Laan *et al.*, 2006). Das gebundene FAD durchläuft nur minimale strukturelle Veränderungen nach der Belichtung. Das nicht - kovalent an ein konserviertes Glutamin gebundene FAD wird dabei aus seinem Grundzustand (P) durch Lichtabsorption in seine extrem kurzlebige (ps - Bereich) Semichinon - Form ($FADH^{\bullet}$) überführt. Die Elektronenübertragung erfolgt durch ein konserviertes Tyrosin in der Bindetasche. Dies führt zur Rotation der Seitenkette des Glutamins, welches daraufhin das Elektron vom Semichinon $FADH^{\bullet}$ zurück an das Tyrosin überträgt. Der so entstehende P_{red} - Zustand, besitzt ein leicht in den roten Bereich verschobenes Absorptionsspektrum und ist die physiologisch aktive Form, welche die Signaltransduktion einleitet. Die Beteiligung eines ebenfalls in der Bindetasche gelegenen Tryptophans am Photozyklus ist strittig und vor allem am Beispiel von AppA mehrfach gezeigt und widerlegt worden (Masuda *et al.*, 2007; Dragnea *et al.*, 2009; Unno *et al.*, 2010). Das Tryptophan scheint keinen Einfluss auf den Photozyklus des FAD zu haben, sondern nur an der für die Signaltransduktion benötigten Strukturänderung des Apoproteins beteiligt zu sein.

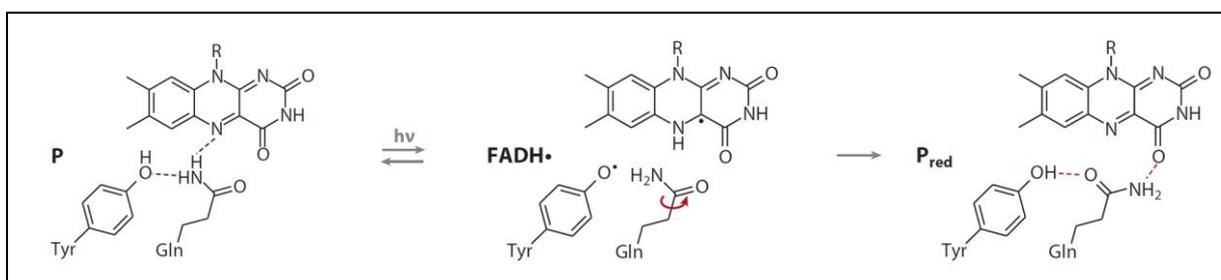


Abbildung 12 : Vereinfachte Darstellung der Photochemie des FAD im Photozyklus von BLUF - Domänen Proteinen. Das konservierte Tyrosin überträgt, nach der Bestrahlung mit Blaulicht, Elektronen auf FAD, was zur Bildung des Semichinons ($FADH^{\bullet}$) aus dem Grundzustand (P) führt. Dies führt zur Rotation des konservierten Glutamins, welches das Elektron des Semichinons zurück an Tyrosin überträgt. Es entsteht der aktive Zustand des Proteins (P_{red}) (verändert nach Möglich *et al.*, 2010).

1.3 Das Proteobakterium *Rhodobacter sphaeroides*

1.3.1 Phylogenie und Stoffwechselfalt

Das Bakterium *Rhodobacter sphaeroides* gehört zur $\alpha 3$ -Untergruppe der Proteobakterien. *R. sphaeroides* ist ein verbreitetes Studienobjekt für die Untersuchung licht- und sauerstoffabhängiger Genregulation, sowie Photorezeption in Prokaryoten. Es kann aus vielen lichten, feuchten Habitaten, wie z.B. fließenden und stehenden Oberflächengewässern, aber auch aus dem Kapillarwasser von oberflächennahen Bodenproben isoliert werden. *R. sphaeroides* ist ein 0,2 - 0,5 μm langes, lateral begeißeltes Stäbchen (Imhoff, 2001). Es besitzt zwei Chromosomen, die zusammen eine Größe von $4,2 \times 10^6$ bp (Choudhary *et al.*, 2004) haben und fällt durch seinen hohen GC - Gehalt von 65 - 69 % auf (Imhoff, 2001). Zudem tragen noch fünf Plasmide die Erbinformationen des Bakteriums (Suwanto und Kaplan, 1989).

R. sphaeroides besitzt eine bemerkenswerte Vielzahl an Wegen der Energiegewinnung: so lange der Sauerstoffpartialdruck hoch genug ist, deckt das Bakterium seinen Energiebedarf durch aerobe Atmung. Fällt der Sauerstoffpartialdruck und ist Licht vorhanden, kann es eine anoxygene Photosynthese durchführen und atmosphärisches CO_2 / N_2 fixieren (Madigan, 1995; Tabita, 1995). Ist weder Licht noch O_2 vorhanden, können Kohlenstoffquellen durch anaerobe Atmung verwertet werden, wenn ein passender terminaler Elektronenakzeptor vorhanden ist (Imhoff, 2001). Fehlt auch dieser, können Kohlenstoffquellen durch verschiedene Gärungen für den Stoffwechsel genutzt werden (Imhoff, 2001).

Die Regulation dieser Stoffwechselwege ist komplex und erfolgt unter Verwendung einer großen Anzahl von Redox - und Licht - Rezeptor - Proteinen. Vor allem die Regulation der Genexpression der für die anoxygene Photosynthese benötigten Gene ist interessant, da diese sowohl durch Licht als auch durch Sauerstoff maßgeblich beeinflusst wird.

1.3.2 Aufbau des Photosyntheseapparates

Die anoxygene Photosynthese von *R. sphaeroides* findet in intracytoplasmatischen Membran (Intracytoplasmic Membrane, ICM) - Vesikeln statt, welche von der Zellmembran in das Cytoplasma reichen. Dabei sind die Vesikel zwar physikalisch mit der Zellmembran verbunden, aber funktionell getrennt (Kiley und Kaplan, 1988). Die häufigsten Proteine in diesen Vesikeln sind bacteriochlorophyll - und carotinoidbindende Komplexe, die nach ihren Absorptionsmaxima B875 (Lichtsammelkomplex I bzw. LHCI) und B800 - 850 (Lichtsammelkomplex II bzw. LHCI) benannt wurden (Cogdell *et al.*, 2003). Diese sammeln das Licht und leiten es an das Reaktionszentrum (RC) weiter, welches ein Absorptionsmaximum bei 870 nm hat.

Insgesamt 14 LHC I umgeben dabei ein RC und diese sind wiederum von LHC II umringt (Cogdell *et al.*, 2003; Roszak *et al.*, 2003). Die große Anzahl an gebundenen Carotinoidmolekülen dieser Komplexe verleiht den Zellen die charakteristische rote Färbung. In *R. sphaeroides* sind die häufigsten Carotinoide dabei Spheroiden und das Spheroidenon, mit einer deutlichen Absorption bei 450 - 550 nm (Imhoff, 2001).

Die Energiegewinnung bei dieser Art der Photosynthese wird durch die Kopplung der lichtgetriebenen Oxidation eines Bacteriochlorophyll - Paars (sog. *special pair*) im RC an den Elektronentransport durch eine Reihe von Cytochromen und Chinonen erzielt. Das durch die Lichtbestrahlung oxidierte RC wird durch Elektronen aus dem Chinonpool wieder reduziert, was für die Bildung eines Protonengradienten genutzt wird, der wiederum die ATP - Synthese antreibt (Meyer und Donohue, 1995; Daldal *et al.*, 2003).

Die für die Bildung des Photosyntheseapparates benötigten Gene in *R. sphaeroides* befinden sich in einem großen polycistronischen Genlocus, welcher auch als photosynthetischer Gencluster bekannt ist (Abbildung 13). Dieser enthält die Gene für die Bacteriochlorophyllsynthese (*bch*), die Carotinoidsynthese (*crt*) und die Gene der Strukturproteine des LHC I (*pufBA*), sowie des RC (*pufLM*, *pufH*) (Bauer *et al.*, 1991). Des Weiteren werden einige regulatorische Proteine im Gencluster codiert (*ppaA*, *tspO*, *ppsR*). Darunter auch der bereits in Abschnitt 1.1.5 beschriebene Repressor PpsR. Die Gene, welche die Strukturproteine des LHC II (*pucBA*) codieren, befinden sich außerhalb des photosynthetischen Genclusters. Für diese existiert noch ein zweiter Genlocus (*puc2BA*) der funktionell mit dem ersten nahe verwandt ist und die gleiche Rolle in der Zelle übernimmt (Zeng *et al.*, 2003; Cogdell *et al.*, 2004).

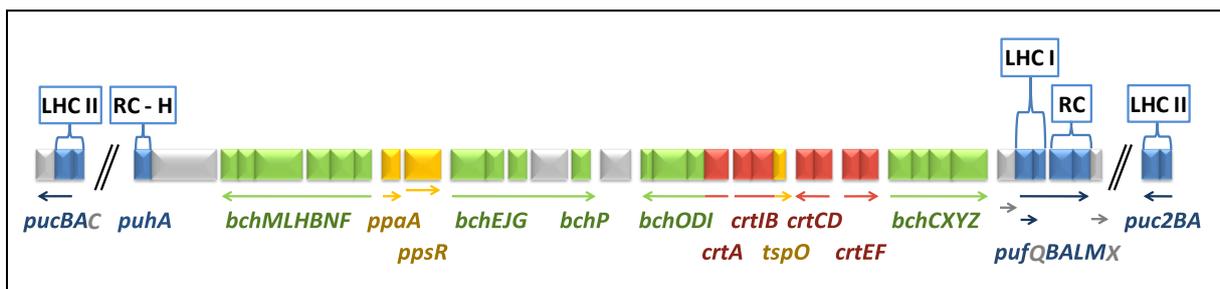


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Anordnung der Gene im photosynthetischen Gencluster von *R. sphaeroides*. Die einzelnen Gene sind als farbige Kästchen dargestellt, wobei Gene gleicher Farbe zu einer funktionellen Gruppe gehören. Dabei gilt: Blau = Strukturproteine der Photosynthesekomplexe (LHC I & II, RC), Grün = Bacteriochlorophyllsynthese (*bch*), Gelb = Regulatorproteine der Photosynthese (*ppaA* = *photopigment and puc activation*, *ppsR* = *photopigment suppression*, *tspO* = *tryptophan rich sensory protein*), Rot = Carotinoidsynthese (*crt*). Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an (verändert nach Choudhary und Kaplan, 2000; Roh *et al.*, 2004).

1.3.3 Regulation der Photosyntheseexpression

Unter aeroben Bedingungen (8 mg l^{-1} gelöster O_2) zeigen Kulturen von *R. sphaeroides* eine sehr leichte rosa Färbung. Die Zellen besitzen nur wenige ICM - Vesikel, mit wenigen pigmentbindenden Photosynthesekomplexen (Frese *et al.*, 2004; Hunter *et al.*, 2005). Sinkt der Sauerstoffpartialdruck im Medium auf semiaerobe Bedingungen ab ($3,2 - 4 \text{ mg l}^{-1}$ gelöster O_2), kann eine deutliche Färbung ins Dunkelrote beobachtet werden, da die Zellen verstärkt Pigmente bilden. Dieser Effekt ist seit langem bekannt (Cohen-Bazire *et al.*, 1957) und dabei ist bemerkenswert, dass diese Pigmentbildung auch bei Dunkelheit geschieht. Werden die Zellen unter diesen Bedingungen Blaulicht ausgesetzt, führt das zur Einstellung der Synthese der

pigmentbindenden Komplexe (Shimada *et al.*, 1992). Fällt der Sauerstoffpartialdruck weiter ($1 - 0 \text{ mg l}^{-1}$ gelöster O_2), steigt die Expression dieser Komplexe noch einmal leicht an (Cohen-Bazire *et al.*, 1957). Belichtung der Zellen mit Blau- oder Rotlicht bei diesen niedrigen Sauerstoffkonzentrationen führt zu einer Verstärkung der Pigment-Protein-Komplex-Synthese (Cohen-Bazire *et al.*, 1957), wobei vor allem zusätzliche LHC II gebildet werden (Hunter *et al.*, 2005).

Den größten Einfluss auf die Expression der Photosynthesegene hat das PrrB / PrrA-Zweikomponentensystem (Eraso & Kaplan, 1994). Durch Kombination von Transkriptom- und Proteom-Analysen konnte ein großes Regulon identifiziert werden, welches 43 % der Gene des Organismus umfasst (Eraso *et al.*, 2008). PrrB stellt dabei eine membranständige Sensor kinase dar, während PrrA als *response regulator* an die DNA bindet. Phosphoryliert PrrB das PrrA-Protein, dimerisiert dieses und erhöht die Expression der Gene für den Photosyntheseapparat stark (Karls *et al.*, 1999; Laguri *et al.*, 2006). Neben den Photosynthesegenen fallen ebenfalls Gene der N_2 -Fixierung, CO_2 -Fixierung und H_2 -Oxidation mit in dieses Regulon (Joshi und Tabita, 1996; Qian und Tabita, 1996; Elsen *et al.*, 2004). Die Bindung von PrrA an die DNA findet als Homodimer statt (Laguri *et al.*, 2003), weshalb die Bindesequenz (C / T) - (G / C) - C - G - G - (C / G) - N - G - (T / A) - C - (G / A) - (C / A) eine Lücke (N) von 1 - 10 bp Länge aufweist (Mao *et al.*, 2005). Die Bindung erfolgt über ein *helix-turn-helix*-Motiv (FIS-Familie), welches in allen verwandten Arten mit einer Sequenzidentität von 100 % hochkonserviert ist (Masuda *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2005).

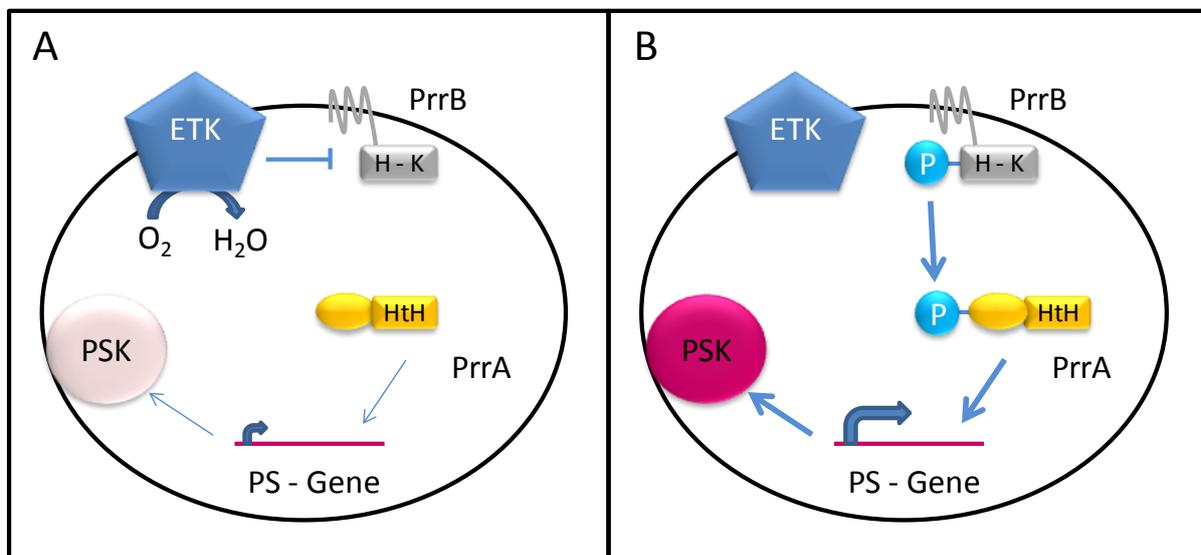


Abbildung 14 : Modell der Regulation der Photosynthesegenexpression durch PrrB / PrrA bei hohen (A) und niedrigen (B) Sauerstoffkonzentrationen. Ist der Sauerstoffpartialdruck hoch, hemmt die Elektronentransportkette (ETK) der aeroben Atmung die Autophosphorylierung durch die Histidin Kinase - Domäne (H - K) von PrrB. Die PrrA - abhängige Expression findet nur im geringen Maße statt. Bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck bleibt das inhibitorische Signal aus und die Autophosphorylierung von PrrB führt zur Phosphorylierung von PrrA, welches die Expression der Photosynthese - Gene (PS - Gene) verstärkt und somit eine vermehrte Synthese der Photosynthesekomplexe (PSK) einleitet (verändert nach Tavano und Donohue, 2006).

Die Genregulation ist in erster Linie sauerstoffabhängig (Abbildung 14). Die Autophosphorylierungsrate der Sensor kinase PrrB wird durch den Oxidationsstatus der

Elektronentransportkette (ETK) der aeroben Atmung bestimmt. Dabei wird vermutet, dass Elektronen von der oxidierten terminalen Cytochrom *cbb₃* - Oxidase nicht nur auf Sauerstoff, sondern, in direkter Interaktion, auch auf das PrrB - Protein übertragen werden können (Oh und Kaplan, 2000). Diese Elektronenübertragung hemmt die Autophosphorylierung von PrrB. Unter aeroben Bedingungen kommt es somit nicht zur Phosphorylierung der Sensorkinase, so dass nur eine schwache Expression der PrrA - abhängigen Gene stattfindet (Potter *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2004). Liegt die Cytochrom *cbb₃* - Oxidase dagegen bei geringem Sauerstoffpartialdruck reduziert in der Zellmembran vor, fehlt die inhibitorische Elektronenübertragung auf PrrB und dieses kann sich selbst und PrrA phosphorylieren. Der *response regulator* dimerisiert und steigert die Expression der von ihm regulierten Gene (Oh *et al.*, 2001). Bestrahlt man die Zellen bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck mit photosynthetisch aktivem Licht (Blau - oder Rotlicht) verstärkt dies den Anstieg der Expression noch einmal (Happ *et al.*, 2005). Dabei wird vermutet, dass die Bestrahlung mit Licht zu einer Verschiebung des Elektronentransports der Atmungskette zum photosynthetischen Elektronentransport führt, was eine weitere Abschwächung des inhibitorischen Signals der Cytochrom *cbb₃* - Oxidase erzeugt (Happ *et al.*, 2005). Wird der photosynthetische Elektronentransport gestört, bleibt dieser lichtabhängige Anstieg aus (Happ *et al.*, 2005).

Die sauerstoffabhängige Regulation der Photosynthesegene in *R. sphaeroides* erfolgt zusätzlich durch das FnrL - Protein (Zeilstra-Ryalls und Kaplan, 1995). Dieses Protein zeigt eine starke Homologie zum, in Abschnitt 1.1.4 beschriebenen, *E. coli* - Protein Fnr. Die Redoxwahrnehmung scheint nach dem gleichem Mechanismus (Abbildung 4) zu verlaufen (Zeilstra-Ryalls *et al.*, 1997). Die gebundene Consensus-Sequenz entspricht dabei mit T - T - G - A - (T / C) - N₄ - A - T - C - A - A ebenfalls der des Fnr - Protein aus *E. coli* (Zeilstra-Ryalls und Kaplan, 1998). Das FnrL - Protein wirkt als globaler Transkriptionsregulator unter anaeroben Bedingungen und kontrolliert neben dem *puc* - Operon die Transkription der für die Bacteriochlorophyllsynthese notwendigen Tetrapyrolsynthesegene *hemA*, *hemF* und *hemZ* (Ranson-Olson und Zeilstra-Ryalls, 2008).

Die komplexe Regulation der Photosynthesegene wird vervollständigt durch den Einfluss des AppA / PpsR - Systems. Wie bereits in den Abschnitten 1.1.5 und 1.2.5 beschrieben, vereint der AppA - Antirepressor durch seine C - terminale Häm - bindende Domäne die Eigenschaften eines Redox - Sensor - Proteins mit denen eines Photorezeptors, durch seine N - terminale BLUF - Domäne. AppA wirkt dabei als Modulator der Aktivität des Repressors PpsR. Das tetramere PpsR - Protein bindet zwei palindromische Wiederholungen der Sequenz T - G - T - N₁₂ - A - C - A (Moskvin *et al.*, 2005). Gebunden überdeckt das Protein den - 35 und - 10 Bereich des σ^{70} - Faktors und interferiert so mit der RNA - Polymerase. Bei hohem Sauerstoffpartialdruck kann der redoxensitive C - Terminus von AppA nicht mit PpsR interagieren und die Photosynthesegene werden reprimiert (Gomelsky und Kaplan, 1997; Han *et al.*, 2007). Fällt der Sauerstoffpartialdruck auf semiaerobes Niveau kann AppA PpsR binden und die Photosynthesegene werden exprimiert (Cohen-Bazire *et al.*, 1957). Die Bestrahlung des AppA - Proteins mit Blaulicht sorgt unter semiaeroben Bedingungen für eine Konformationsänderung der N - terminalen BLUF - Domäne, die daraufhin mit dem C - Terminus interagiert und PpsR wieder freisetzt (Braatsch *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007). Durch diese duale Regulation wird zum Einen die Expression bei hohem Sauerstoffpartialdruck vermieden. Zum

Anderen werden die Photosynthesegene bei gleichzeitigem Vorhandensein von Sauerstoff und Blaulicht ebenfalls reprimiert. Bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck verliert das AppA / PpsR - System seinen Einfluss und die expressionssteigernde Wirkung des PrrB / PrrA - Systems tritt in den Vordergrund (Braatsch *et al.*, 2002).

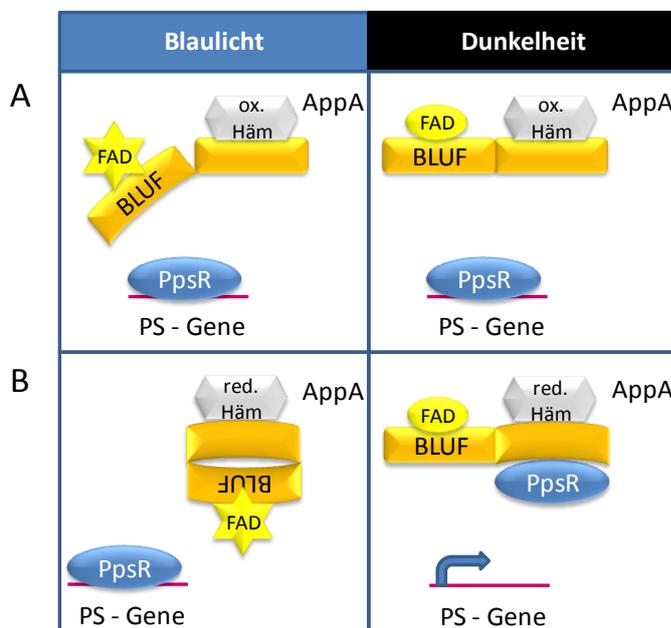


Abbildung 15 : Modell der dualen Regulation der Photosynthesegene durch Licht und Sauerstoff unter aeroben (A) und semiaeroben (B) Bedingungen. Unter aeroben Bedingungen (A) liegt das Häm der C-terminalen Domäne oxidiert vor. Damit ist der Antirepressor sowohl im Blaulicht als auch bei Dunkelheit unfähig das PpsR zu binden. Unter semiaeroben Bedingungen (B) wird das Häm reduziert und die C-terminale Domäne interagiert mit PpsR. Dies erlaubt die Expression der Photosynthesegene. Die Blaulichtbestrahlung sorgt für die Anregung des FAD und für eine Konformationsänderung der BLUF-Domäne. Diese interagiert mit dem C-Terminus und PpsR ist wieder frei (verändert nach Han *et al.*, 2007).

Jüngere Studien legen zudem eine starke Verknüpfung des PrrB / PrrA - Systems mit dem AppA / PpsR - System nahe. So findet auch unter semiaeroben Bedingungen keine Expression der Photosynthese statt, wenn kein PrrA vorhanden ist (Metz, 2006; Jäger *et al.*, 2007). Gleichzeitig vermittelt das AppA / PpsR - System auch unter anaeroben Bedingungen eine Regulation, wenn das PrrB - Protein fehlt (Happ *et al.*, 2005). Da zudem PrrA die Expression von AppA beeinflusst (Gomelsky *et al.*, 2008), kann davon ausgegangen werden, dass das PrrB / PrrA - System sich dominant verhält. Dabei ist nicht klar, ob beide Proteine gleichzeitig an die DNA binden und die Stärke des aktivierenden oder reprimierenden Effekts ausschlaggebend ist oder ob jeweils nur eines der beiden Systeme Einfluss auf die Expression hat. Die Bindestellen von PrrA und PpsR liegen nur wenige Basen voneinander entfernt (siehe Anhang Abbildung 72), was beide Möglichkeiten offen hält.

Das erst kürzlich in *R. sphaeroides* identifizierte Cryptochrom CryB scheint ebenfalls einen Einfluss auf die Expression des Photosyntheseapparates zu haben. So zeigt die CryB - Mutante eine hellere Farbe nach mikroaerobem Wachstum und deutlich reduzierte Absorptionsspektren. Eine Komplementation des Proteins von Plasmid führt, nicht zur Wiederherstellung des Wildtyp - Phänotyps, sondern zu einer Verstärkung der hellen Pigmentierung (Hendrischk *et al.*, 2009a). Da die Kopienzahl des *cryB* - Gens in der Zelle vom Plasmid höher ist als vom Chromosom, scheint die Menge an gebildeten CryB - Protein einen Einfluss auf die Expression der Photosynthesegene zu haben (Hendrischk *et al.*, 2009a).

1.3.4 Regulation der Antwort auf photooxidativen Stress in *R. sphaeroides* durch den Sigmafaktor σ^E

Neben Transkriptionsfaktoren sind Sigmafaktoren (σ -Faktoren) die bedeutendsten Proteine zur Modulation der Expression von Genen (Helmann und Chamberlin, 1988). Eine wichtige Untergruppe der Sigmafaktoren stellen die ECF (*extracytoplasmic function*)-Sigmafaktoren dar (Wosten, 1998; Brooks und Buchanan, 2008). Sie regulieren die Transkription von Genen, deren Produkte außerhalb des Cytoplasmas der Zelle wirken, wie z.B. periplasmatische, membranständige und extrazelluläre Proteine (Brooks und Buchanan, 2008). Sigmafaktoren werden abhängig von bestimmten Umweltbedingungen synthetisiert und unterstützen die Bindung des RNA - Polymerase - Komplexes an Promotorregionen von Genen. Dabei besitzen verschiedene Sigmafaktoren unterschiedliche Spezifitäten, die oft nur ein kleines Regulon von Genen umfassen (Brooks und Buchanan, 2008). Die Aktivität von ECF - Sigmafaktoren ist oft durch einen Anti - Sigmafaktor begrenzt (Brown und Hughes, 1995; Helmann, 2002). Dieser wird mit dem jeweiligen Sigmafaktor cotranskribiert und verhindert dessen Bindung an die RNA - Polymerase. Die Dissoziation des Sigmafaktors von seinem Anti - Sigmafaktor stellt daher einen bedeutenden Beitrag zur Transkriptionsregulation dar (Brown und Hughes, 1995).

In *Rhodobacter sphaeroides* ist der ECF - Sigmafaktor σ^E ein gut untersuchtes Beispiel. Dieser wird mit dem Anti - Sigmafaktor ChrR coexpressiert und ein noch unbekanntes Stresssignal führt zur Dissoziation der beiden Faktoren voneinander (Newman *et al.*, 1999). σ^E reguliert seine eigene Transkription und wird vermehrt gebildet, wenn die Zellen Blaulicht, Singulett-Sauerstoff- und Peroxidstress ausgesetzt sind (Braatsch *et al.*, 2004; Anthony *et al.*, 2005; Zeller *et al.*, 2005). Die σ^E - Antwort ist in erster Linie singulett-Sauerstoffabhängig und umfasst eine kleine Zahl von Genen, zu denen z.B. der Sigmafaktor σ^{HII} gehört. (Anthony *et al.*, 2005; Glaeser *et al.*, 2007). σ^{HII} leitet anschließend die Hauptantwort auf Singulett-Sauerstoff ein und spielt zudem eine Rolle in der Methylglyoxalstressantwort (Nuss *et al.*, 2009).

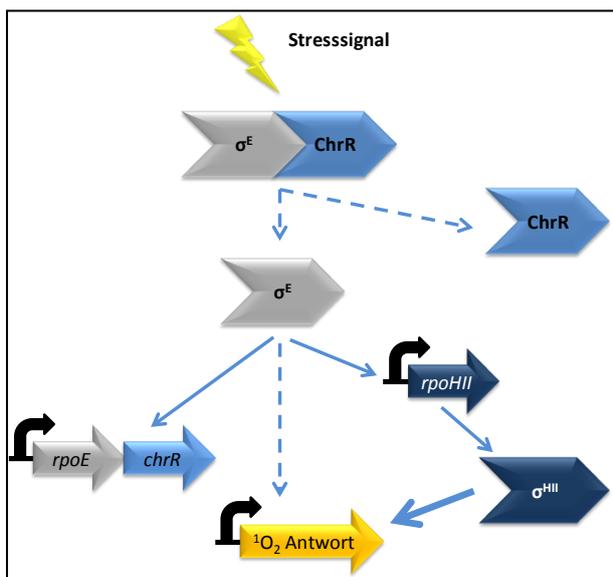


Abbildung 16: Modell der σ^E -abhängigen Antwort auf Singulett-Sauerstoffstress in *R. sphaeroides*. Ein noch unbekanntes Stresssignal führt zur Dissoziation des Sigmafaktors σ^E vom Anti - Sigmafaktor ChrR. σ^E leitet die eigene Expression und die Expression des Sigmafaktors σ^{HII} ein. σ^{HII} ist anschließend für die Hauptantwort auf Singulett-Sauerstoff in der Zelle verantwortlich (verändert nach Hendrischk, 2009; Nuss *et al.*, 2009).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Photosynthesegenregulation von *Rhodobacter sphaeroides* durch Licht und Sauerstoff ist komplex und es konnte gezeigt werden, dass das Zusammenspiel aller daran beteiligter Faktoren nötig ist, um kontrolliert auf Umweltreize zu reagieren. Vor allem die Regulation durch Blaulicht ist interessant, da dieses, unter den richtigen Bedingungen, sowohl als mögliche Energiequelle, als auch als Erzeuger von oxidativem Stress dienen kann. Neben dem lichtabhängigen Zusammenspiel des AppA/PpsR-Systems mit dem PrrB/PrrA-System, konnten mit dem CryB- und dem LOV-Protein zwei weitere Blaulichtrezeptoren identifiziert werden, über deren physiologische Wirkung *in vivo* fast nichts bekannt ist.

Als Fortführung meiner Diplomarbeit (Metz, 2006) war ein Ziel dieser Arbeit das Verständnis der blaulichtabhängigen Regulation durch AppA/PpsR und PrrB/PrrA zu verbessern. Dazu sollte zum einen die *in vivo*-Blaulichtsensitivität der BLUF-vermittelten AppA-Antwort und der Elektronentransport-vermittelten PrrB-Antwort bestimmt werden. Gleichzeitig wurde durch Mutation der BLUF-Domäne versucht, Einfluss auf die Blaulichtsensitivität des Proteins und seine Interaktion mit PpsR zu nehmen. Zum anderen sollen *in vivo*-*footprint*-assays durchgeführt werden, um die exakten Bindezustände von PrrA und PpsR unter verschiedenen Bedingungen in der lebenden Zelle nachzuweisen.

Für das erst kürzlich beschriebene Cryptochromhomlog CryB konnte bisher eine Beteiligung an der Regulation der Photosynthesegene nachgewiesen werden. Ob diese eigenständig oder im Zusammenspiel mit bereits bekannten Faktoren geschieht ist jedoch unbekannt. Daher sollte das CryB-Protein über ein *Yeast-Two-Hybrid-System* zum Einen gegen eine Genomdatenbank und zum Anderen gegen bekannte Regulatorproteine, wie PpsR und AppA auf eine mögliche Interaktion getestet werden. Da die Komplementation des CryB-Proteins einen stärkeren Phänotyp zeigt als die Mutante, soll zudem mit einem *R. sphaeroides* Überexpressionstamm die Auswirkung einer noch höheren Proteinexpression untersucht werden.

Die physiologische Rolle des LOV-Proteins ist noch völlig unbekannt. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, dieses Protein über das *Yeast-Two-Hybrid-System* gegen die Genomdatenbank von *R. sphaeroides* zu testen. Um die mögliche Funktion des Proteins weiter einzugrenzen, sollte zudem eine umfassende Transkriptomanalyse der Δlov -Mutante mit der des Wildtyps unter verschiedenen Bedingungen, wie z.B. mikroaerobem Wachstum und Blaulichtbestrahlung, verglichen werden. Da kein kommerziell erhältlicher Transkriptomchip für *R. sphaeroides* existierte, war dessen *design* ebenfalls ein Teil dieser Arbeit. Abschließend sollten, die in der Mutante stark differenziell regulierten Gengruppen unter physiologischen Bedingungen näher untersucht und die Ergebnisse der Transkriptomanalysen *in vivo* bestätigt werden.

2. Material & Methoden

2.1 Material

Dieser Abschnitt enthält die Auflistung aller in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Plasmide, Oligonukleotide, Chemikalien, Enzyme und Geräte. Zusätzlich sind allgemeine und häufig verwendete Puffer und Medien aufgeführt. Weitere Puffer und Lösungen sind in Abschnitt 2.2 bei den jeweiligen Methoden zu finden.

2.1.1 Stämme

Stamm	Beschreibung
<i>E. coli</i>	
JM109	<i>endA1, glnV44, thi⁻¹, relA1, gyrA96, recA1, mcrB⁺, Δ(lac-proAB), e14⁻, [F⁺, traD36, proAB⁺, lacIq, lacZΔM15], hsdR17, (r_K⁻ m_K⁺)</i> (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
S17-1	<i>recA, pro, hsdR, RP4⁻²-(Tc::Mu)(Km::Tn7); Tp^r, Str^r, Sp^r</i> (Simon <i>et al.</i> , 1983)
M15	<i>thi⁻, lac⁻, ara⁺, gal⁺, mtl⁻, F⁻, recA⁺, uvr⁺, lon⁺; Nal^r, Str^r, Rif^r, Km^r</i> (QIAGEN, Hilden)
DH5α	<i>F⁻, endA1, glnV44, thi⁻¹, recA1, relA1, gyrA96, deoR, nupG, Φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ⁻</i> (Meselson, 1968)
MC1061	<i>hsdR2, hsdM⁺, hsdS⁺, araD139, Δ(ara-leu)7697, Δ(lac)X74, galE15, galK16, rpsL, mcrA, mcrB1; Km^r, Sm^r</i> (Casadaban und Cohen, 1980)
<i>R. sphaeroides</i>	
2.4.1	Wildtyp (van Neil, 1944)
Δlov	<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 mit chromosomaler Deletion des <i>lov</i> Gens (RSP_2228) und Insertion einer ΩSp ^r -Kassette, Sp ^r (Hendrischk <i>et al.</i> , 2009b)
ΔcryB	<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 mit chromosomaler Deletion des <i>cryB</i> Gens (RSP_3077) und Insertion einer Km ^r -Kassette, Km ^r (Hendrischk <i>et al.</i> , 2009a)
App11	<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 mit chromosomaler Deletion des <i>appA</i> Gens (RSP_1565) und Insertion einer Tp ^r -Kassette, Tp ^r (Gomelsky und Kaplan, 1995)
JZ1678	<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 mit chromosomaler Deletion des <i>fnrL</i> Gens (RSP_0698) und Insertion einer Km ^r -Kassette, Km ^r (Zeilstra-Ryalls und Kaplan, 1995)
PrrB1	<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 mit chromosomaler Deletion des <i>prrB</i> Gens (RSP_1520) und Insertion einer Sp ^r -Kassette, Sp ^r (Eraso und Kaplan, 1995)
PrrA2	<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 mit chromosomaler Deletion des <i>prrA</i> Gens (RSP_1518) und Insertion einer Sp ^r -Kassette, Sp ^r (Eraso und Kaplan, 1995)
TF18	<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 mit chromosomaler Deletion der <i>rpoE/ chrR</i> Gene (RSP_1092-1093) und Insertion einer Tp ^r -Kassette, Tp ^r (Schilke und Donohue, 1995)
ΔchrR	<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 mit chromosomaler Deletion des <i>chrR</i> Gens (RSP_1093) und Insertion einer Tp ^r -Kassette, Tp ^r (Newman <i>et al.</i> , 1999)
PUHA1	<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 mit chromosomaler Deletion des <i>puhA</i> Gens (RSP_0291) und Insertion einer Km ^r -Kassette, Km ^r (Socketk <i>et al.</i> , 1989)

App11::appAW104F	<i>R. sphaeroides</i> App11 mit chromosomal integriertem Vektor pPHU::appAW104F; T _p ^r , T _c ^r (Metz <i>et al.</i> , 2010)
<i>R. capsulatus</i>	
37b4	Wildtyp von <i>Rhodobacter capsulatus</i> (Molisch, 1907)
B10	Wildtyp von <i>Rhodobacter capsulatus</i> (Molisch, 1907)
<i>Azotobacter</i>	
<i>Azotobacter sp.</i>	Wildtyp von <i>Azotobacter</i> (Lipman, 1904)
<i>S. cerevisiae</i>	
AH109	ADE2, HIS3, <i>lacZ</i> , MAT a, <i>trp1</i> , <i>leu2</i> (CLONTECH, Mountain View, USA)
Y187	<i>lacZ</i> , MAT α, <i>trp1</i> , <i>leu2</i> (CLONTECH, Mountain View, USA)

2.1.2 Plasmide

Plasmid	Beschreibung / Herkunft
pPHU281	<i>suicide</i> - Vektor zur Herstellung von Deletionsmutanten, kann in <i>Rhodobacter</i> nicht repliziert werden, T _c ^r , 6,9 kb (Hübner <i>et al.</i> , 1993)
pRK415	<i>broad host range</i> - Vektor, repliziert in <i>E. coli</i> und <i>Rhodobacter</i> , T _c ^r , 10,4 kb (Keen <i>et al.</i> , 1988)
pRK2013	<i>tra</i> ⁺ , Hilfsvektor für Konjugationen von <i>E. coli</i> nach <i>Rhodobacter</i> , Km ^r , 4,8 kb (Ditta <i>et al.</i> , 1985)
pDrive	T - Vektor zur Klonierung von PCR - Produkten, Ap ^r , Km ^r (QIAGEN, Hilden)
pQE30	Überexpressionsplasmid mit Sequenz für N - terminalen 6x His-tag Expression von Proteinen in <i>E. coli</i> 3,4 kb, Ap ^r (QIAGEN, Hilden)
p484-Nco5	pRK415 - Derivat mit dem vollständigem AppA - Protein (1354 bp), 366 bp <i>upstream</i> des Transkriptionsstart und 46 bp <i>downstream</i> des Stopp - Codons, T _c ^r , 12,1 kb (Gomelsky und Kaplan, 1995)
p484-Nco5ΔN	pRK415 - Derivat mit dem C - terminalen AppA - Protein (968 bp), 366 bp <i>upstream</i> des Transkriptionsstarts und 46 bp <i>downstream</i> des Stopp - Codons, T _c ^r , 12,1 kb (Gomelsky und Kaplan, 1995)
pRKAppA	pRK - Vektor mit dem SphI / NcoI AppA - Fragment (1404 bp) aus p484 - Nco5, T _c ^r , 12,1 kb (Han, 2006)
pRKappAY21F	pRK - Vektor mit dem SphI / NcoI AppA - Fragment (1404 bp) aus p484 - Nco5, Basenaustausch A zu T 63 bp und C zu T 64 bp nach Transkriptionsstarts, T _c ^r , 12,1 kb (Metz <i>et al.</i> , 2010)
pRKappAY21C	pRK - Vektor mit dem SphI / NcoI AppA - Fragment (1404 bp) aus p484 - Nco5, Basenaustausch A zu G 63 bp nach Transkriptionsstarts, T _c ^r , 12,1 kb (Metz <i>et al.</i> , 2010)

pRKappAW104F	pRK - Vektor mit dem SphI / NcoI AppA - Fragment (1404 bp) aus p484 - Nco5, Basenaustausch G zu T 311 / 312 bp nach Transkriptionsstarts, Tc ^r , 12,1 kb (Metz <i>et al.</i> , 2010)
pRKappAW104F/Y21F	pRK - Vektor mit dem SphI / NcoI AppA - Fragment aus p484 - Nco5 (1404 bp), Basenaustausch A zu T 63 bp, C zu T 64 bp und G zu T 311 / 312 bp nach Transkriptionsstarts, Tc ^r , 12,1 kb (Metz <i>et al.</i> , 2010)
pPHU::appAW104F	<i>suicide</i> - Vector, enthält XbaI / HindIII AppA - Fragment amplifiziert aus pRKappAW104F mit Basenaustausch G zu T 311 / 312 bp nach Transkriptionsstart für Reinsertion in <i>R. sphaeroides</i> App11, Tc ^r , 8,7 kb (Metz <i>et al.</i> , 2010)
pRKCryB	pRK415 mit 1724 bp HindIII / XbaI <i>cryB</i> Fragment aus <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1, für die Komplementation von <i>R. sphaeroides</i> Δ <i>cryB</i> , Tc ^r , 12,2 kb (Hendrischk <i>et al.</i> , 2009a)
pRKpufcryB	pRKpuf mit 1527 bp XbaI / EcoRI <i>cryB</i> Fragment aus <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1, N-terminale Fusion mit 6xHis-tag, Tc ^r , 12,5 kb (Konzer, 2008)
pMAppA(ER2058)	basiert auf pMAL-c2x Vektor (NEB), translationale Fusion des AppA - Proteins mit dem Maltose - Binde - Protein, Ap ^r , 7,9 kb (Braatsch, 2002)
pGppS	Überexpressionsvektor für PpsR mit dem GST - tag in pGEX-2T, Ap ^r , 6,1 kb (Gomelsky <i>et al.</i> , 2000)
pGEXAppAΔN	Überexpressionsvektor für AppAΔN mit dem GST - tag in pGEX-2T, Ap ^r , 6,4 kb (Han <i>et al.</i> , 2007)
pQECryB	pQE32 mit 1527 bp SphI / HindIII <i>cryB</i> Fragment aus <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1, N-terminale Fusion mit 6xHis-tag, Ap ^r , 4,9 kb (Hendrischk <i>et al.</i> , 2009a)
pQEPrrA	pQE30 mit 521 bp BamHI / HindIII <i>prpA</i> Fragment aus <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1, N-terminale Fusion mit 6xHis-tag, Ap ^r , 3,9 kb (diese Arbeit)
pPHU234	Vektor für Promotoraktivitätsbestimmung, enthält <i>lacZ</i> - Gen ohne Promotor und Start - Codon, Tc ^r , 21,6 kb (Hübner <i>et al.</i> , 1993)
pPHUphrAlacZ	pPHU234 mit 238 bp EcoRI / BamHI <i>phrA</i> Fragment aus <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1, beinhaltet 108 bp <i>upstream</i> Region von <i>phrA</i> , Tc ^r , 21,8 kb (Hendrischk <i>et al.</i> , 2007)
pGAD - T7	Klonierungsvektor für das Yeast - Two - Hybrid - System, Ap ^r , Leu ⁺ (CLONTECH, Mountain View, USA)
pGAD-T7-T	Kontrollvektor für das Yeast - Two - Hybrid - System; enthält Sequenz des SV40 T-Antigen fusioniert an GAL4-AD; Amp ^r ; Leu ⁺ (CLONTECH, Mountain View, USA)
pGBK-T7	Klonierungsvektor für das Yeast - Two - Hybrid - System; Km ^r , Trp ⁺ (CLONTECH, Mountain View, USA)
pGBK-T7-53	Kontrollvektor für das Hefe 2-Hybridsystem; enthält p53 Gen; Km ^r , Trp ⁺ (CLONTECH, Mountain View, USA)
pCL1	Kontrollvektor für das Hefe 2-Hybridsystem; enthält die Sequenz für das komplette GAL4-Protein; Amp ^r , Leu ⁺ (CLONTECH, Mountain View, USA)
pDkatEUp	pDrive <i>cloning vector</i> mit PCR Fragment, welches 352 bp der <i>katE</i> <i>upstream</i> - Region sowie Schnittstellen für BamHI und PstI enthält, Ap ^r , Km ^r (Zeller, 2005)

pDpucUp	pDrive <i>cloning vector</i> mit PCR Fragment, welches 314 bp der <i>pucB upstream</i> - Region sowie Schnittstellen für Sall und EcoRV enthält, Ap ^r , Km ^r (diese Arbeit)
----------------	---

2.1.3 Oligonukleotide

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurde von Carl Roth (Karlsruhe), Eurofins / MWG / Operon (Ebersberg) oder Biomers (Ulm) bezogen. Zur besseren Veranschaulichung von Klonierungsstrategien ist für einige der *primer* die Abbildung mit dem Klonierungsschema angegeben.

Oligonukleotide für Klonierungen

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
appAY21C-FM	GTT TCC TGC TGC <u>TGC</u> CGC AGC CTG GC <i>overlap extension PCR forward, Mutation F (siehe Abbildung 32), Basenaustausch A zu G an Position 63 downstream des Transkriptionsstarts von appA, 26 nt</i>
appAY21C-RM	GCC AGG CTC GCG <u>CA</u> GCA GCA GGA AAC <i>overlap extension PCR reverse, Mutation R (siehe Abbildung 32), Basenaustausch A zu G an Position 63 downstream des Transkriptionsstarts von appA, 26 nt</i>
appAY21F-FM	GTT TCC TGC TGC <u>TTT</u> CGC AGC CTG GC <i>overlap extension PCR forward, Mutation F (siehe Abbildung 32), Basenaustausch A zu T an Position 63 und C zu T an Position 64 downstream des Transkriptionsstarts von appA, 26 nt</i>
appAY21F-RM	GCC AGG CTG CGA <u>AAG</u> CAG CAG GAA AC <i>overlap extension PCR reverse, Mutation R (siehe Abbildung 32), Basenaustausch A zu T an Position 63 und C zu T an Position 64 downstream des Transkriptionsstarts von appA, 26 nt</i>
appAW104F-FM	CTT TGC GGG <u>ATT</u> TCA CAT GCA <i>overlap extension PCR forward, Mutation F (siehe Abbildung 32), Basenaustausch G zu T an Position 311 / 312 downstream des Transkriptionsstarts von appA, 21 nt</i>
appAW104F-RM	CTG CAT GTG <u>AAA</u> TCC CGC AAA <i>overlap extension PCR reverse, Mutation R (siehe Abbildung 32), Basenaustausch G zu T an Position 311 / 312 downstream des Transkriptionsstarts von appA, 21 nt</i>
appA upHindIII	CGG CGG <u>AAG</u> <u>CTT</u> AAT CCG AGG TC <i>overlap extension PCR reverse, appA F (siehe Abbildung 32), für Amplifikation des vollständigen, mutierten AppA - Proteins (bindet an Position 19 upstream des Transkriptionsstarts), HindIII Schnittstelle, 23 nt</i>
appA downKpnI	CGG <u>GGT</u> <u>ACC</u> GAC GCT GCA AGA ATC <i>overlap extension PCR reverse, appA R (siehe Abbildung 32), für Amplifikation des vollständigen, mutierten AppA - Proteins (bindet an Position 1354 downstream des Transkriptionsstarts), KpnI Schnittstelle, 24 nt</i>

<i>appAW104F</i> <i>upXba1</i>	CTC TAG ACG AGG TGG AAG GCC AGC GTG C für Amplifikation des <i>appAW104F</i> - Gens und anschließende Klonierung in pPHU281 (siehe Abbildung 34), XbaI Schnittstelle, 28 nt
<i>appAW104F</i> <i>downHindIII</i>	CCA AGC TTC GGC GGC GGC TTA ATC CGA GG für Amplifikation des <i>appAW104F</i> - Gens und anschließende Klonierung in pPHU281 (siehe Abbildung 34), HindIII Schnittstelle, 29 nt
<i>appABLUF-RM</i> <i>upSphI</i>	GGC GCA TGC ATG CAA CAC GAC CTC GAG <i>error prone PCR forward</i> (siehe Abbildung 30) für Amplifikation der BLUF - Domäne (bindet an Position 8 <i>upstream</i> des Transkriptionsstarts), SphI Schnittstelle, 27 nt
<i>appABLUF-RM</i> <i>downKpnI</i>	GCT GGT ACC CAC GGT CAC GAT CTG CCG <i>error prone PCR reverse</i> (siehe Abbildung 30) für Amplifikation der BLUF - Domäne (bindet an Position 414 <i>downstream</i> des Transkriptionsstarts) , KpnI Schnittstelle, 27 nt
<i>appAΔN</i> <i>upKpnI</i>	GTG GTA CCC AGC CTG GTG GCC GAC AAC A für Amplifikation der C - terminalen AppA - Domäne (siehe Abbildung 30), KpnI Schnittstelle, 27 nt
<i>appAΔN</i> <i>downXbaI</i>	G TCT AGA ACC GAC GCT GCA AGA ATC für Amplifikation der C - terminalen AppA - Domäne (siehe Abbildung 30), XbaI Schnittstelle, 27 nt
<i>appAfullNdeI</i>	GGG CAT ATG ATG CAA CAC GAC C für Klonierung von AppA in Yeast - Two - Hybrid - Vektoren pGAD - T7 und pGBK - T7 (siehe Abschnitt 3.5) , NdeI Schnittstelle, 22 nt
<i>appAfullSacI</i>	C GAG CTC TCA GGC GCT GCG GCG für Klonierung von AppA in Yeast - Two - Hybrid - Vektoren pGAD-T7 und pGBK-T7 (siehe Abschnitt 3.5), SacI, Schnittstelle, 22 nt
<i>ppsRfullNdeI</i>	GGA CAT ATG ATG CTG GCC GGC G für Klonierung von PpsR in Yeast - Two - Hybrid - Vektoren pGAD - T7 und pGBK - T7 (siehe Abschnitt 3.5) , NdeI Schnittstelle, 22 nt
<i>ppsRfullSacI</i>	GCG GAG CTC TCA CTC GTC CTT GTT C für Klonierung von PpsR in Yeast - Two - Hybrid - Vektoren pGAD-T7 und pGBK-T7 (siehe Abschnitt 3.5), SacI, Schnittstelle, 25 nt
<i>prrABamHI</i>	GCA ACA GGA TCC GCT GAG GAT CTG für Klonierung von PrrA in den pQE30 - Vektor (siehe Abschnitt 3.2), BamHI Schnittstelle, 24 nt
<i>prrAHindIII</i>	GGT GCA AAG CTT TCA GCG CGG GCT für Klonierung von PrrA in den pQE30 - Vektor (siehe Abschnitt 3.2), HindIII Schnittstelle, 24 nt

Oligonukleotide für *real time RT - PCR / Northern blot*

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
<i>rpoZ</i> F	ATC GCG GAA GAG ACC CAG AG komplementär ab Position 157 innerhalb der <i>rpoZ</i> - Sequenz (RSP_1669), <i>sense</i> , 20 nt
<i>rpoZ</i> R	GAG CAG CGC CAT CTG ATC CT komplementär ab Position 264 innerhalb der <i>rpoZ</i> - Sequenz (RSP_1669), <i>antisense</i> , 20 nt
<i>puc2AB</i> F	GGC AAA ATC TGG CTC GTG GT komplementär ab Position 10 innerhalb der <i>puc2B</i> - Sequenz (RSP_6158), <i>sense</i> , 20 nt
<i>puc2AB</i> R	GGT GGT GGT CGT CAG CAC AG komplementär ab Position 98 innerhalb der <i>puc2A</i> - Sequenz (RSP_6158), <i>antisense</i> , 20 nt
<i>pucB</i> F	ATC GAC GGT TTG CGT GTA GG komplementär ab Position 262 innerhalb der <i>pucB</i> - Sequenz (RSP_0314), <i>sense</i> , 20 nt
<i>pucB</i> R	GGA CGA GCA GCG TCA ATT TC komplementär ab Position 23 innerhalb der <i>pucB</i> - Sequenz (RSP_0314), <i>antisense</i> , 20 nt
<i>bchL</i> F	CAG ACG GTG AAA CTG CTG AA komplementär ab Position 397 innerhalb der <i>bchL</i> - Sequenz (RSP_0288), <i>sense</i> , 20 nt
<i>bchL</i> R	AGT TCT TCG ACT TGG CCT GA komplementär ab Position 601 innerhalb der <i>bchL</i> - Sequenz (RSP_0288), <i>antisense</i> , 20 nt
<i>lov</i> F	GAT GAC CGG CTA TAC CGA AG komplementär ab Position 123 innerhalb der <i>lov</i> - Sequenz (RSP_2228), <i>sense</i> , 20 nt
<i>lov</i> R	GCA GGA AGA GGA GAT TGT CG komplementär ab Position 304 innerhalb der <i>lov</i> - Sequenz (RSP_2228), <i>antisense</i> , 20 nt
<i>rpoE</i> F	TGA CGG ACA AGA GTG ACA GG komplementär ab Position 2 innerhalb der <i>rpoE</i> - Sequenz (RSP_1092), <i>sense</i> , 20 nt
<i>rpoE</i> R	CGA GGG ATC GAA GAG ATG AG komplementär ab Position 216 innerhalb der <i>rpoE</i> - Sequenz (RSP_1092), <i>antisense</i> , 20 nt
<i>feoA2</i> F	AGA TGC AGA AGC GTC TTT CC komplementär ab Position 83 innerhalb der <i>feoA2</i> - Sequenz (RSP_6020), <i>sense</i> , 20 nt
<i>feoA2</i> R	GAT CTT GCG CGA CAT CTC CT komplementär ab Position 222 innerhalb der <i>feoA2</i> - Sequenz (RSP_6020), <i>antisense</i> , 20 nt
RSP_3539 F	ACC TCC TCT TTG GTG ACG TG komplementär ab Position 827 innerhalb der RSP_3539 - Sequenz, <i>sense</i> , 20 nt
RSP_3539 R	GTC TGG AAC TCG ACG GTG TC komplementär ab Position 967 innerhalb der RSP_3539 - Sequenz, <i>antisense</i> , 20 nt

RSP_1574 F	GGC CTG CTC TAT CTG CTC AC komplementär ab Position 277 innerhalb der RSP_1574 - Sequenz, <i>sense</i> , 20 nt
RSP_1574 R	AGA AG CAG CCT GTC CTT CAG komplementär ab Position 455 innerhalb der RSP_1574 - Sequenz, <i>antisense</i> , 20 nt
RSP_4038 F	ATG ACA AGA CGG GTT TCG AC komplementär ab Position 410 innerhalb der RSP_4038 - Sequenz, <i>sense</i> , 20 nt
RSP_4038 R	CGA GGC TCT GGT CAT ATT CC komplementär ab Position 586 innerhalb der RSP_4038 - Sequenz, <i>antisense</i> , 20 nt
RSP_2965 F	GGT CTT CAA CCT CTC CAA GC komplementär ab Position 483 innerhalb der RSP_2965 - Sequenz, <i>sense</i> , 20 nt
RSP_2965 R	GAG CCC AGT GAG GTA ATC CA komplementär ab Position 618 innerhalb der RSP_2965 - Sequenz, <i>antisense</i> , 20 nt
RSP_0069 F	CAA CAT GAC CAA GGT GAA CG komplementär ab Position 45 innerhalb der RSP_0069 - Sequenz, <i>sense</i> , 20 nt
RSP_0069 R	GTC GTG TCC ACG AGG TTC TT komplementär ab Position 230 innerhalb der RSP_0069 - Sequenz, <i>antisense</i> , 20 nt
rRNA - Northern	CTT AGA TGT TTC AGT TCC C komplementär ab Position 187 innerhalb der 23S rRNA - Sequenz, für Ladenkontrolle <i>Northern blot</i> , <i>sense</i> , 19 nt
pucAB - Northern F	GCC GAA GAA GTT CAT AAG CAA komplementär ab Position 52 innerhalb der <i>pucB</i> - Sequenz (RSP_0314), für Amplifikation <i>puc</i> - Sonde <i>Northern blot</i> , <i>sense</i> , 21 nt
pucAB - Northern R	CAG CCG AGC CTT GGT AGT AG komplementär ab Position 34 innerhalb der <i>pucA</i> - Sequenz (RSP_6256), für Amplifikation <i>puc</i> - Sonde <i>Northern blot</i> , <i>antisense</i> , 20 nt

Oligonukleotide für Sequenzierungen

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
M13 reverse	AAC AGC TAT GAC CAT G Sequenzierung <i>MCS pDrive</i> , <i>sense</i> , 16 nt
M13 forward	GTA AAA CGA CGG CCA GT Sequenzierung <i>MCS pDrive</i> , <i>antisense</i> , 17 nt
M7	GCG GAT AAC AAT TTC AC Sequenzierung <i>MCS pRK415</i> , <i>sense</i> , 17 nt
MP6	GTT GGG TAA CGC CAG GG Sequenzierung <i>MCS pRK415</i> , <i>antisense</i> , 17 nt

5'-AD	GAA GAT ACC CCA CCA AAC CC Sequenzierung pGAD - T7 ab Position 1870, <i>sense</i> , 20 nt
3'-AD	AGA TGG TGC ACG ATG CAC AG Sequenzierung pGAD - T7 ab Position 2102, <i>antisense</i> , 20 nt
5'-BD	TCA TCG GAA GAG AGT AG Sequenzierung pGBK - T7 ab Position 1155, <i>sense</i> , 17 nt
3'-BD	TAA GAG TCA CTT TAA AAT Sequenzierung pGBK - T7 ab Position 1495, <i>antisense</i> , 18 nt
appASeq1	GCT CTC CTG CTC GGA GGC CGA C Sequenzierung <i>appA</i> ab Position 342 <i>downstream</i> des Transkriptionsstarts, <i>sense</i> , 22 nt
appASeq2	AGG CCT GCG CCG AGC GCC TGA C Sequenzierung <i>appA</i> ab Position 685 <i>downstream</i> des Transkriptionsstarts, <i>sense</i> , 22 nt
appASeq3	CAA CTT CCC CCC TCG AAG CTG A Sequenzierung <i>appA</i> ab Position 1118 <i>downstream</i> des Transkriptionsstarts, <i>sense</i> , 22 nt
appABLUFseq	GCC CGG CAG TAA GGG GCG AAG G Sequenzierung BLUF - Domäne AppA ab Position 1 <i>upstream</i> des Transkriptionsstarts, <i>sense</i> , 22 nt

2.1.4 Antibiotika und Selektionszusätze

Antibiotikum	Abk.	Stammlösung [mg ml ⁻¹]	Endkonzentration <i>E. coli</i> [µg ml ⁻¹]	Endkonzentration <i>Rhodobacter</i> [µg ml ⁻¹]
Ampicillin (Roth)	Ap	100 in ddH ₂ O	200	-
Kanamycin (Roth)	Km	10 in ddH ₂ O	25	25
Spectinomycin (Roth)	Sp	10 in ddH ₂ O	20	15
Trimethoprim (Roth)	Tp	10 in DMF	20	20
Tetrazyklin (Sigma-Aldrich)	Tc	10 in 75 % EtOH	20	2

Selektionszusatz	Stammlösung [mg ml ⁻¹]	Endkonzentration <i>E. coli</i> [µg ml ⁻¹]	Endkonzentration <i>Rhodobacter</i> [µg ml ⁻¹]
IPTG	50 in ddH ₂ O	100	100
X-Gal	50 in ddH ₂ O	100	100

2.1.5 Größenstandards für die Gelelektrophorese

DNA - Standards	Bezugsquelle	Protein - Standards	Bezugsquelle
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)	SDS-PAGE Standards, Low Range	Biorad (München)

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)	Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range	Biorad (München)
1 Kb DNA Ladder	Invitrogen (Darmstadt)	Prestained Protein Marker, Broad Range	NEB (Frankfurt a. M.)
PCR Marker	NEB (Frankfurt a. M.)	Full-Range Rainbow Marker	GE Healthcare (München)

2.1.6 Molekularbiologische Kits

Name	Bezugsquelle	Name	Bezugsquelle
OneStep RT - PCR Kit	QIAGEN (Hilden)	QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAGEN PCR Cloning Kit	QIAGEN (Hilden)	Nick Translation Kit, dCTP	GE Healthcare (München)
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN (Hilden)	ULS™ Labeling Kit for Agilent arrays (Cy5)	Kreatech (Amsterdam)
Taq - Polymerase Kit	QIAGEN (Hilden)	ULS™ Labeling Kit for Agilent arrays (Cy3)	Kreatech (Amsterdam)
RNeasy MinElute Cleanup Kit	QIAGEN (Hilden)	Gene Expression Wash Buffer Kit	Agilent (Böblingen)
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN (Hilden)	Gene Expression Hybridization Kit	Agilent (Böblingen)
BIO-X-ACT™ Long DNA Polymerase Kit	BIOLINE (Luckenwalde)	Deep Vent_R™ DNA Polymerase Kit	NEB (Frankfurt a. M.)
Lumi-LightPLUS Western Blotting Kit	Roche (Grenzach)	QiaEx Gel-extraction Kit	QIAGEN (Hilden)

2.1.7 Enzyme

Die nicht aufgeführten Restriktionsendonucleasen wurden von NEB (Frankfurt a. M.) und Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

Name	Bezugsquelle	Name	Bezugsquelle
Antarctic Phosphatase (5 U / µl)	NEB (Frankfurt a. M.)	T4 - DNA - Ligase (5 U / µl)	NEB (Frankfurt a. M.)
DNase I (1 U / µl)	Fermentas (St. Leon-Rot)	T4 - DNA - Ligase (5 U / µl)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Klenow - Fragment (5 U / µl)	NEB (Frankfurt a. M.)	T4 - Polynukleotidkinase (10 U / µl)	NEB (Frankfurt a. M.)
Lysozym (Feststoff)	Boehringer (Ingelheim)	RNasin (40 U / µl)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Proteinase K (Feststoff)	Sigma Aldrich (St. Louis)	DNase I (140 - 180 U / µl)	Invitrogen (Darmstadt)
RNaseA (7 U / µl)	QIAGEN (Hilden)	DNase I (1 U / µl)	Promega (Mannheim)

2.1.8 Chemikalien

Alle nicht in dieser Liste aufgeführten Chemikalien wurden von Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

A	Bezugsquelle	N	Bezugsquelle
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich (St. Louis)	Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Agarose	Cambrex IEP (Wiesbaden)	Natriumthiosulfat x 5 H₂O	Merck(Darmstadt)
Acrylamid (40%)	Applichem (Gattersleben)	4-Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Roche (Grenzach)
B	Bezugsquelle	Nonidet P40 (NP-40)	Sigma Aldrich (St. Louis)
Bacto Agar	Difco (Lawrence)	O	Bezugsquelle
Bovines Serum Albumin (BSA)	NEB (Frankfurt a. M.), Sigma Aldrich (St. Louis)	Ortho-Nitro-Phenol-β-Galactopyranosid (ONPG)	Serva (Heidelberg)
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)	Roche (Grenzach)	P	Bezugsquelle
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)	Phenol (wassergesättigt)	Applichem (Gattersleben)
F	Bezugsquelle	PEG8000	Sigma Aldrich (St. Louis)
Fe(III)chlorid Hexahydrat	Sigma Aldrich (St. Louis)	Phenol / Chloroform	Applichem (Gattersleben)
Fe(II) - Citrat	Sigma Aldrich (St. Louis)	Polyvinylpyrrolidon	Sigma Aldrich (St. Louis)
Ficoll 400	Serva (Heidelberg)	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma Aldrich (St. Louis)
Formaldehyd	Sigma Aldrich (St. Louis)	T	Bezugsquelle
Formamid	Sigma Aldrich (St. Louis)	Trypton	Difco (Lawrence)
G	Bezugsquelle	S	Bezugsquelle
Glucose	Merck(Darmstadt)	Spurenelemente (RÄ - Medium)	Sigma Aldrich (St. Louis)
Glykogen	Roche (Grenzach)	Standard I-Nährbouillon (StI-Medium)	Merck(Darmstadt)
I	Bezugsquelle	SYBR Green I	Sigma Aldrich (St. Louis)
Imidazol	Sigma Aldrich (St. Louis)	V	Bezugsquelle
M	Bezugsquelle	Vitamine (RÄ-Medium)	Sigma Aldrich (St. Louis)
Mineralöl	Merck (Darmstadt)	X	Bezugsquelle
Methylenblau	Sigma Aldrich (St. Louis)	Xylencyanol	Sigma Aldrich (St. Louis)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)		

2.1.9 Kulturmedien

Allgemeine Kulturmedien / *E. coli* Kulturmedien

PY - Medium			Standard I - Medium (Std - I - Medium)		
Trypton	10	g	Standard I Nährmedium	25	g
Hefextrakt	0,5	g	ad ddH ₂ O	1	l
CaCl ₂ (1M)	2	ml	Standard I - Platten (Std - I - Platten)		
MgCl ₂ (1M)	2	ml	Bacto Agar (1,6 %)	8	g
FeSO ₄ (0,5 %)	2,4	ml	ad Standard I - Medium	500	ml
ad ddH ₂ O	1	l			
	7	pH			
PY - Platten					
Bacto Agar (1,6 %)	8	g			
ad PY - Medium	500	ml			

Kulturmedien *Rhodobacter*

RÄ - Medium (Drews, 1983)			Phosphatlösung		
Malat	30	g	K ₂ HPO ₄	45	g
MgSO ₄ x 2 H ₂ O	0,2	g	KH ₂ PO ₄	30	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,2	g	ad ddH ₂ O	1	l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,07	g	Spurenelementlösung		
Spurenelementlösung	1,5	ml	Fe(II)-Citrat	500	mg
ad ddH ₂ O	1	l	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	20	mg
	6,9	pH	ZnCl ₂	5	mg
nach dem Autoklavieren hinzufügen :			LiCl	5	mg
Phosphatlösung	20	ml	KJ	2,5	mg
Vitaminlösung	8	ml	KBr	2,5	mg
RÄ - Agarplatten			CuSO ₄	0,15	mg
Bacto Agar (1,6 %)	8	g	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	1	mg
ad RÄ - Medium	500	ml	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	5	mg
Vitaminlösung			SnCl ₂ x 2 H ₂ O	0,5	mg
Niacin	200	mg	BaCl ₂	0,5	mg
Thiamin-HCl	400	mg	AlCl ₃	1	mg
Nicotinamid	200	mg	H ₃ BO ₄	10	mg
Biotin	8	mg	EDTA	20	mg
ad ddH ₂ O	1	l	ad ddH ₂ O	1	l

Hefekulturmedien

YPDA - Medium (Vollmedium)			Dropout-Lösung (10 x) (Aminosäure - Zusatz für Mangelmedium)		
Pepton	20	g	L - Adenin Hemisulfat	200	mg / l
Hefextrakt	10	g	L - Arginin HCl	200	mg / l
Adenin - SO ₄	0,004	g	L - Histidin HCl	200	mg / l
ad ddH ₂ O	500	ml	L - Isoleucin	300	mg / l
	5,8	pH	L - Leucin	1000	mg / l
40 %ige Glucoselösung	50	ml	L - Lysin HCl	300	mg / l
SD - Medium (Mangelmedium)			L - Phenylalanin	500	mg / l
SD - Mangelmedium	6,7	g	L - Threonin	2000	mg / l
D - Sorbitol	182,2	g	L - Tryptophan	200	mg / l
ad ddH ₂ O	500	g	L - Valin	1500	mg / l
	5,8	pH	in ddH ₂ O lösen		
40 %ige Glucoselösung	50	ml			

Für die herkömmliche Anzucht werden die Zellen in YPAD - Medium inkubiert. Dem SD - Mangelmedium wird die Dropout - Lösung, mit der entsprechenden Aminosäurezusammensetzung zugesetzt, um unterschiedliche Selektionsbedingungen zu erzeugen.

2.1.10 Allgemeine Puffer und Lösungen

PBS (10x)			SSPE (20x)		
NaCl	4	g	NaCl	3	M
KCl	0,1	g	EDTA	0,02	M
Na ₂ HPO ₄	0,72	g	NaH ₂ PO ₄	0,2	M
KH ₂ PO ₄	0,12	g		7	pH
ad ddH ₂ O	500	ml	SSC (20x)		
	7,4	pH	NaCl	3	M
Denhardt's Reagenz (50x)			Natriumcitrat	0,3	M
Polyvinylpyrrolidon	1	%	TBS		
Ficoll 400	1	%	NaCl	0,15	M
BSA	1	%	Tris / HCl	0,015	M
				7,4	pH

2.1.11 Geräte und Materialien

Name	Bezugsquelle	Name	Bezugsquelle
310 Genetic Analyzer	ABI - Prism (Darmstadt)	Eclipse 80i (Mikroskop)	Nikon (Düsseldorf)
Agilent DNA microarray scanner	Agilent (Böblingen)	Ni - NTA Agarose	QIAGEN (Hilden)
Amylose - Agarose	NEB (Frankfurt a. M.)	Nitrocellulosemembran (Protran)	GE Healthcare (München)
Blaulichtfilter BG12 (450 nm_{max})	Schott (Mainz)	Nylonmembran (Biodyne)	Pall (Dreieich)
BIO - RAD PCR - Cycler S1000 (PCR)	Li - Cor (Bad Homburg)	OxyScan Micro-Sauerstoffsensoren 501	UMS (München)
CFX Real-Time PCR Detection System	BIO - RAD (München)	Optima TLX Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (Krefeld)
Diaprojektor	Braun (Kronberg)	PerfectBlue Semi-Dry (Elektroblotter)	Peqlab (Erlangen)
Genepix 3100	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)	Photometer Specord 50	Analytic Jena (Jena)
Grünlichtfilter VG9 (540 nm_{max})	Schott (Mainz)	pH - Meter	Schott (Mainz)
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare (München)	Primus 25 / 96 Thermocycler (PCR)	MWG (Ebersberg)
Halogenlampe (500 W)	Conrad (Hirschau)	ProbeQuant G-25 Micro Columns	GE Healthcare (München)
Hitzefilter KG1	Schott (Mainz)	ProbeQuant G-50 Micro Columns	GE Healthcare (München)
Hybridisierungskammer / - ofen	Agilent (Böblingen)	Rotor GS3	Thermo Scientific (Langenselbold)
Imaging screen - K (Kodak)	BIO - RAD (München)	Rotor SS34	Thermo Scientific (Langenselbold)
Imaging screen	Fuji (Düsseldorf)	Rotor-Gene 3000 (real time PCR)	QIAGEN (Hilden)
Leuchtstoffröhren (TLD 58W/25)	Philips (Hamburg)	Sauerstoffelektrode GMH 3610	Greisinger (Regenstauf)
LI - 189 Lichtmeter	Li - Cor (Bad Homburg)	Sonopuls GM 70	Bandlin (Berlin)
LI - 190SA Quantum-sensor ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Li - Cor (Bad Homburg)	Sorvall RC 5C Plus Zentrifuge	Thermo Scientific (Langenselbold)
LI - 200SA Pyranometer Sensor (W m^{-2})	Li - Cor (Bad Homburg)	SpeedVac SC 110	Thermo Scientific (Langenselbold)
LI - 250 Lichtmeter	Li - Cor (Bad Homburg)	Stratalinker UV Crosslinker 1800	Agilent (Böblingen)
Membran Filter (0.45μm, ϕ25mm)	Schleicher & Schuell (Dassel)	Szintillationszähler	Beckman Coulter (Krefeld)
MicroPulser (Electroporator)	BIO - RAD (München)	Tischzentrifugen Biofuge fresco, pico	Heraeus (Buckinghamshire, UK)
Molecular Imager FX (Phosphoimager)	BIO - RAD (München)	Trio-Thermoblock (PCR)	Biometra (Goettingen)
Nanodrop	Peqlab (Erlangen)	Vakuumblotter	Appligene (Heidelberg)

2.1.12 Auftragspuffer

DNA - Ladepuffer			RNA - Auftragspuffer		
Harnstoff	4	M	Glycerin	60	%
Saccharose	50	%	Bromophenolblau	0,1	%
EDTA	0,05	M	EDTA	0,01	M
Bromophenolblau	0,1	%		7	pH
Xylencyanol	0,1	%	RNA - Probenpuffer		
	7	pH	MOPS - Puffer (10 x)	10	%
SDS - Auftragspuffer (5 x)			Formamid	50	%
Tris / HCl	0,225	M	Formaldehyd	18	%
Glycerin	50	%	Formaldehyd /Harnstoffpuffer		
SDS	50	%	Harnstoff	6	M
Bromophenolblau	0,05	%	deionisiertes Formamid	80	%
DTT	0,25	M	TBE (10x)	10	%
			Bromophenolblau	0,1	%
			Xylencyanol	0,1	%

2.1.13 Elektrophoresepuffer

Laemmli (10 x)			TAE (10 x)		
Tris / HCl	30	g	Tris / HCl	0,4	M
Glycin	144	g	Essigsäure	0,4	M
SDS	10	g	EDTA	0,04	M
ad ddH ₂ O	1	l	MOPS - Puffer (10 x)		
Laemmli - Trenngelpuffer			MOPS	0,05	M
Tris / HCl	1,5	M	Natriumacetat	0,05	M
	8,8	pH	EDTA	0,01	M
Laemmli - Sammelgelpuffer			NaOH	0,1	M
Tris / HCl	1,0	M	TBE (10 x)		
	6,8	pH	Tris / HCl	0,89	M
			Borat	0,89	M
			EDTA	0,025	M
				8,3	pH

2.1.14 Antikörper für *Western blot*

Name	gegen	Bezugsquelle
Anti - AppAΔN rabbit	C - Terminus AppA (Aminosäuren 135-387)	BioGenes (Berlin)
Anti - CryB rabbit	CryB (Aminosäuren 1-508)	BioGenes (Berlin)
Anti - LOV rabbit	LOV (Aminosäuren 1-176)	BioGenes (Berlin)
Anti-Rabbit IgG [Alkaline Phosphatase]	Kaninchen IgG	Sigma Aldrich (St. Louis)
Anti-Rabbit IgG [Peroxidase]	Kaninchen IgG	Sigma Aldrich (St. Louis)
Anti-Glutathione-S-Transferase (GST) [Peroxidase]	GST - tag an Proteinen	Sigma Aldrich (St. Louis)

2.1.15 Radioaktive Nukleotide

Name	Konzentration (Ci / mmol)	Bezugsquelle
[γ ³² P]dATP	3000	Hartmann Analytic (Braunschweig)
[α ³² P]dCTP	3000	Hartmann Analytic (Braunschweig)

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Flüssigkulturen von *E. coli*

Flüssigkulturen von *E. coli* werden in Standard I - Medium bei 37°C und 180 U / min aerob auf dem Schüttler im Dunkeln herangezogen. Für die Selektion benötigte Antibiotika werden, entsprechend den in Abschnitt 2.1.4 angegebenen Konzentrationen, zu den Kulturmedien hinzugegeben. Dabei wird mit dem Hinzugeben gewartet, bis das Medium handwarm ist. Die Beimpfung der Kulturen erfolgt steril über eine Impföse oder abgeflamte Glaswaren.

2.2.2 Plattenkulturen von *E. coli*

Plattenkulturen von *E. coli* werden auf Standard I - Platten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Für die Selektion benötigte Antibiotika werden, entsprechend den in Abschnitt 2.1.4 angegebenen Konzentrationen, zu der handwarmen Standard I - Agarose hinzugegeben und schnellstmöglich gegossen. Der Ausstrich der Kulturen erfolgt steril mit einer Impföse.

2.2.3 Flüssigkulturen von *Rhodobacter*

Kulturen von *Rhodobacter* werden bei 32°C in RÄ - Medium und Dunkelheit inkubiert. Das Kulturmedium wird dabei stets steril mit abgeflammter Glasware oder einer Impföse beimpft. Antibiotika werden, wie in Abschnitt 2.1.4 beschrieben, in den angegebenen Konzentrationen zu den Kulturmedien hinzu gegeben. Da Kulturen von *Rhodobacter* unter stark abweichenden Sauerstoffkonzentrationen kultiviert werden können, wurde diese innerhalb der Kultur, mittels der in Abschnitt 2.1.15 angegebene Sauerstoffmessgeräte, überprüft.

2.2.3.1 Aerobes Wachstum von *Rhodobacter*

Für aerobe Kulturen werden zu 20 % mit RÄ - Medium gefüllte Schikanekolben bei 32°C und 140 U / min im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Der Sauerstoffgehalt einer aeroben Kultur bei 32°C beträgt 7 - 8 mg l⁻¹ O₂.

Die mit Raumluft begasten aeroben Kulturen werden aus mikroaeroben Vorkulturen auf eine OD₆₆₀ von 0,25 in Meplat - Flaschen verdünnt. Bei 32°C werden diese mittels einer Aquariumspumpe über einen wattierten Schlauch begast. Dabei wird ein Sauerstoffgehalt von 7 - 8 mg l⁻¹ O₂ erreicht.

2.2.3.2 Semiaerobes Wachstum von *Rhodobacter*

Für das Wachstum unter semiaeroben Bedingungen (50 % Sauerstoffsättigung im Medium) werden die Kulturen, in einem zu 40 % mit RÄ befülltem Schikanekolben, durch Variieren der Schüttlergeschwindigkeit und ständiger Messung der O₂ - Konzentration, auf 3,2 - 4 mg l⁻¹ eingestellt. Die Kulturen verbleiben dabei für eine Verdopplungszeit (2,5 h) unter diesen Bedingungen, bevor ein Experiment gestartet wird.

2.2.3.3 Mikroaerobes Wachstum von *Rhodobacter*

Für mikroaerobe Kulturen werden zu 75 % mit RÄ - Medium gefüllte Erlenmeyerkolben bei 32°C und 140 U / min im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Der Sauerstoffgehalt einer mikroaeroben Kultur beträgt etwa 0,5 mg l⁻¹ O₂, da ein Großteil des eingebrachten Sauerstoffs direkt veratmet wird.

2.2.3.4 Anaerobes Wachstum von *Rhodobacter*

Für anaerobe Kulturen (kein O₂ - Eintrag in die Kultur und keine Belichtung) werden zu 100 % mit RÄ gefüllte luftdicht verschlossene Meplat - Flaschen mit 60 mM DMSO als terminalen Elektronenakzeptor versetzt. Anschließend werden die Kulturen bei 32°C im Dunkeln inkubiert. Die Inkubation erfolgt dabei über mehrere Tage, da das Wachstum unter anaeroben Bedingungen stark verlangsamt ist und nur eine geringe maximale OD₆₆₀ (0,4 - 0,5) erreicht wird.

2.2.3.5 Phototropes Wachstum von *Rhodobacter*

Phototrophe *Rhodobacter* - Kulturen werden in zu 100 % mit RÄ gefüllten, luftdicht verschlossenen Meplat - Flaschen bei 32°C inkubiert. Damit die Kulturen die anoxygene Photosynthese durchführen können, werden die Kulturen mit 60 W m⁻² Weißlicht bestrahlt. Die Inkubation erfolgt dabei über mehrere Tage, da das Wachstum unter phototropen Bedingungen stark verlangsamt ist.

2.2.3.6 Belichtung von *Rhodobacter* - Kulturen während Experimenten

Für die Messung der Lichtintensitäten werden zwei Lichtsensoren verwendet. Zum einen der LI - 190SA Quantumsensor, der den Photonenflux in $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angibt. Zum anderen wird der LI-200SA Pyranometersensor verwendet, der die Lichtenergie in W m⁻² angibt.

Zur Belichtung von *R. sphaeroides* - Kulturen werden verschiedene Lichtquellen eingesetzt. Für die semiaeroben Blaulichtexperimente wird ein Diaprojektor verwendet, dessen Strahl zuerst durch einen Hitzefilter und anschließend durch einen 450 nm Blaulichtfilter (Transmissionsspektrum des Filters siehe Anhang Abbildung 73) bzw. 540 nm Grünlichtfilter (Transmissionsspektrum des Filters siehe Anhang Abbildung 74) geleitet wird. Die Kultur auf dem Schüttler erhält so etwa 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bzw. 8 W m⁻² Blaulicht. Durch Vergrößern der Entfernung des Projektors vom Filter und unter Verwendung des Dimmers kann die Blaulichtintensität weiter reduziert werden. Für besonders niedrige Lichtintensitäten ($> 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) wird zudem halbtransparentes Wägepapier in den Strahlengang geführt.

Für die Erzeugung von photooxidativem Stress werden die Zellen mit hohen Intensitäten an Weißlicht bestrahlt. Die Kulturen werden dazu in Meplat - Flaschen gefüllt und mit einer starken Halogenlampe (500 W) bestrahlt (800 W m⁻² bzw. 750 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

2.2.4 Plattenkulturen von *Rhodobacter*

Plattenkulturen von *Rhodobacter* werden auf RÄ - Platten bei 32°C im Dunkeln inkubiert. Für die Selektion benötigte Antibiotika werden, entsprechend den in Abschnitt 2.1.4 angegebenen Konzentrationen, zu der handwarmen RÄ - Agarose hinzugegeben und schnellstmöglich gegossen. Der Ausstrich der Kulturen erfolgt steril mit einer Impföse.

2.2.5 Flüssigkulturen von *S. cerevisiae*

Die Hefezellen werden mit einer Impföse unter sterilen Bedingungen von der Platte abgenommen und in 1 ml des entsprechenden Mediums (YPDA oder SD) resuspendiert. Anschließend wird die Zellsuspension in einen mit Medium gefüllten Erlenmeyerkolben überführt und bei 32°C und 140 U / min auf einem Schüttler inkubiert.

2.2.6 Plattenkulturen von *S. cerevisiae*

Die Hefezellen werden mit einer Impföse oder einer Pipette unter sterilen Bedingungen auf einer YPDA - bzw. SD - Platte ausgestrichen. Anschließend werden die Platten bei 32°C für mehrere Tage inkubiert. Durch die Auswahl der Aminosäuren im SD - Agar kann auf plasmidtragende Stämme selektiert werden.

2.2.7 Bestimmung der Zelldichte einer Flüssigkultur

Die Gesamtzellzahl in einer Flüssigkultur kann photometrisch über die optische Dichte (OD) errechnet werden. Es wird die optische Dichte für *E. coli* bei 600nm und für *Rhodobacter* bei 660nm gemessen, da in diesem Bereich keine störenden Inhibitionen durch Photosynthesepigmente vorliegen. Dabei gilt folgende Beziehung zwischen der gemessenen OD und der Gesamtzellzahl:

<i>E. coli</i> :	1	$OD_{600} = 5 \times 10^8$ Zellen
<i>Rhodobacter</i> :	1	$OD_{660} = 2 \times 10^9$ Zellen
<i>S. cerevisiae</i> :	0,1	$OD_{660} = 1 \times 10^6$ Zellen

2.2.8 Bakteriendauerkulturen

Für die Lagerung bei -80°C werden Glycerindauerkulturen erstellt. Diese werden aus 4 ml (*Rhodobacter*) bzw. 2 ml (*E. coli*) einer Übernachtskultur bei 6.000 U / min (Rotor SS34) für 5 min sedimentiert und anschließend mit 1 ml RÄ bzw. Standard I gewaschen, um Antibiotikareste zu beseitigen. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 6.000 U / min (Biofuge *pico*) für 5 min, resuspendiert man die Zellen erneut in 1 ml des entsprechenden Mediums und fügt der Kultur 0,5 ml 80 %iges Glycerin hinzu. Die mit Glycerin versetzte Kultur wird anschließend in ein Kryogefäß überführt und nach kurzem Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

2.2.9 Aufnahme von Gesamtspektren

Zur Ermittlung der Menge und Zusammensetzung der Pigment - Protein - Komplexe von Zellen einer Flüssigkultur kann 1 ml direkt in eine Plastikzuvette überführt und die Absorption im

Photometer bei 500 - 900 nm bestimmt werden. Die gesammelten Daten mehrerer Spektren werden untereinander gegen die OD₆₆₀ normalisiert.

2.2.10 Transformation von Plasmid - DNA nach *E. coli*

Die Transformation (nicht - virale Aufnahme von freier DNA in Bakterienzellen) von Plasmid - DNA in *E. coli* kann über Elektro - oder Hitzeschocktransformation erfolgen. Dabei wird die Aufnahmefähigkeit der Zellen vor der Transformation erhöht und, in mehreren Schritten, sogenannte kompetente Zellen hergestellt.

2.2.10.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen von *E. coli*

Durch das Anlegen eines starken elektrischen Feldes wird bei der Elektroporation kurzzeitig die Integrität der Zellmembran so gestört, dass größere Moleküle wie Plasmid - DNA in die Zelle eindringen können. Da jedoch schon geringe Mengen an Salzionen im Elektroporationsansatz zu einem, für die Zellen tödlichen, explosiven Kurzschluss führen können, werden die *E. coli* Zellen vor der Verwendung durch mehrfaches Waschen mit ddH₂O von Salzen im Medium befreit. Eine frische Übernachtskultur von *E. coli* wird dazu 1 : 1000 verdünnt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die OD₆₀₀ sollte etwa 0,5 - 0,6 betragen. Jetzt inkubiert man die Zellen für 20 min auf Eis in einem Zentrifugenbecher und zentrifugiert anschließend für 5 min bei 6000 U / min (4°C, Rotor GS3). Das Sediment nimmt man in 50 ml ddH₂O auf und gibt weitere 350 ml ddH₂O hinzu. Nach erneuter Zentrifugation für 4 min bei 8.000 U / min (4°C, Rotor SS34) resuspendiert man die Zellen in 200 ml ddH₂O und sedimentiert sie durch Zentrifugation für 5 min bei 6.000 U / min (4°C, Rotor SS34). Der nächste Waschschrift erfolgt mit 50 ml einer 10%igen Glycerinlösung und erneuter Zentrifugation für 5 min bei 6.000 U / min (4°C, Rotor SS34). Für die Aufbewahrung bei - 80°C werden die Zellen jetzt in 6 ml einer 10 %igen Glycerinlösung aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend können die Zellen bei - 80°C gelagert werden.

2.2.10.2 Elektrottransformation von *E. coli*

Für die Transformation von Plasmid - DNA in elektrokompetente *E. coli* - Zellen vermischt man 50 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen mit 2 - 5 µl (50 - 100 ng) der Vektor - DNA. Das Gemisch wird nun in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und in den *MicroPulser* eingespannt. Durch das Anlegen einer Spannung von 2,1 kV für 5 ms gelangt die Plasmid - DNA in die Zellen. Diese werden schnellstmöglich in 500 µl Standard I - Medium aufgenommen, resuspendiert und in ein Wassermann - Röhrchen überführt, welches anschließend 1 h bei 37°C inkubiert. Die transformierten Zellen werden auf Platten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen.

2.2.10.3 Herstellung hitzekompetenter Zellen von *E. coli*

Neben der Elektroporation kann Plasmid - DNA auch mittels eines Hitzeschocks in die Zellen eingebracht werden. Die Bakterienzellmembran wird durch zweiwertige Ionen (Ca^{2+}) angegriffen und so durchlässiger für Plasmid - DNA. Man impft 10 ml Standard I - Medium mit 0,2 ml einer Übernachtskultur an und kultiviert sie für 60 bis 90 min bei 37°C. Jeweils 1,5 ml Kultur werden anschließend in Eppendorfgefäße überführt und für 5 - 10 min auf Eis abgekühlt. Alle nachfolgenden Schritte finden ab jetzt auf Eis bzw. bei 4°C statt. Nach dem Abzentrifugieren bei 5.000 U / min für 5 min werden die Pellets in 0,5 ml kaltem 0,1 M CaCl_2 aufgenommen. Nach weiteren 30 min auf Eis werden die Zellen erneut sedimentiert. Nun nimmt man die Zellen in 50 μl 0,1 M CaCl_2 auf und inkubiert sie bis zu ihrer Verwendung mindestens eine Stunde, maximal jedoch über Nacht, auf Eis. Eine längere Aufbewahrung ist nur bei - 80°C möglich.

2.2.10.4 Hitzeschocktransformation von *E. coli*

Nach Zugabe der Fremd - DNA (etwa 50 - 100 ng) zu 100 μl CaCl_2 - kompetenten *E. coli* Zellen wird das Gemisch für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt die Hitzeschock-Transformation bei 42°C für genau 90 sec im Heizblock. Nach weiteren 2 min Inkubation auf Eis wird der Ansatz 500 μl Standard I - Medium aufgenommen, resuspendiert und in ein Wassermann-Röhrchen überführt, welches anschließend 1 h bei 37°C inkubiert. Die transformierten Zellen werden daraufhin auf Platten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen.

2.2.11 Herstellung kompetenter Zellen von *S. cerevisiae*

Für die Herstellung von kompetenten *S. cerevisiae* für die Hitzeschock - Transformation werden mehrere Einzelkolonien der Hefe in 1 ml YPDA - Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wird dann in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml YPDA überführt und über Nacht bei 32°C und 140 U / min inkubiert. Am nächsten Tag sollte die OD_{600} 1,5 entsprechen. 1 l frisches YPDA - Medium wird mit genügender Menge Übernachtskultur beimpft, um eine OD_{600} von 0,2 - 0,3 zu erreichen. Die Zellen werden dann für etwa 3 h bei 30°C mit 140 U / min geschüttelt. Danach werden die Zellen für 5 min mit 1000 U / min (4°C, Rotor SS34) bei Raumtemperatur zentrifugiert, und das resultierende Zellsediment wird in 50 ml ddH_2O gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation werden die Zellen in 1 ml ddH_2O aufgenommen und erneut zentrifugiert. Anschließend wird das Sediment in 1,5 ml frisch hergestelltem steriler TE / LiAc - Lösung resuspendiert und für 15 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Nach diesem Schritt sind die Hefen für die Transformation vorbereitet und können für einige Stunden gelagert werden.

TE / LiAc - Lösung		
TE - Lösung (siehe 2.4.1.2)	1	ml
LiAc (1 M, pH = 7,5)	1	ml
ddH ₂ O	8	ml

2.2.12 Hitzeschocktransformation von *S. cerevisiae*

Mit Hilfe der LiAc-Transformation kann externe Plasmid-DNA in *S. cerevisiae* transformiert werden. Bei der hier beschriebenen Methode werden zwei verschiedene Plasmide in einem Schritt in die Hefe transformiert. Auf Eis werden jeweils 0,1 µg bis 0,5 µg Plasmid-DNA mit 0,1 - 0,2 mg Lachssperma-DNA gemischt, welche als sogenannte *Carrier*-DNA vorher für 20 min bei 95°C gekocht und auf Eis abgekühlt wird. Man gibt anschließend 100 µl der frisch hergestellten kompetenten Zellen zum DNA-Gemisch. Nach Hinzufügen von 600 µl einer frischen PEG / LiAc-Lösung vortext man kurz und inkubiert den Ansatz dann für 30 min bei 30°C im Wasserbad. Der Hitzeschock erfolgt bei 42°C für 20 min ebenfalls im Wasserbad. Nach einer einminütigen Inkubation auf Eis werden die Ansätze 2 min bei 1000 U / min (4°C, Biofuge *fresco*) zentrifugiert, und der Überstand wird abgenommen. Das Zellsediment wird in 500 µl TE - Puffer resuspendiert.

Die Zellen werden dann auf SD-Agarplatten mit entsprechenden Aminosäuren ausgestrichen und für 3 bis 7 Tage bei 30°C inkubiert. Für die Transformation einer Genbank in *S. cerevisiae* werden entsprechend größere Mengen der einzelnen Bestandteile eingesetzt. Hierfür verwendet man 1 mg DNA des entsprechenden GAL4-Bindedomänen-Konstrukts und etwa 0,5 mg des Aktivatoromänen-Konstrukts. Zusätzlich werden 20 mg LSD benötigt. Nach Zugabe von 8 ml kompetenten Zellen und 60 ml PEG / LiAc-Lösung wird der Ansatz für 30 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt für 15 min bei 42°C im Wasserbad. Auch hier sollte der Ansatz gelegentlich geschüttelt werden. Nach dem Hitzeschock werden die Zellen auf Eis abgekühlt und anschließend in der Zentrifuge bei 1000 U / min (4°C, Biofuge *fresco*) für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wird in 10 ml TE aufgenommen und jeweils 200 µl auf die entsprechenden SD-Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgt wie oben beschrieben bei 30°C für 3 bis 7 Tage.

PEG / LiAc - Lösung		
TE - Lösung (siehe 2.4.1.2)	1	ml
LiAc (1M, pH = 7,5)	1	ml
50 % PEG	8	ml

2.2.13 Plasmidkonjugation nach *Rhodobacter*

Eine direkte Transformation von Plasmid-DNA nach *Rhodobacter* ist nicht möglich, weshalb man sich die di- bzw. triparentale Konjugation zu Nutze macht. Bei der diparentalen Konjugation wird ein *E. coli*-Stamm mit der gewünschten Plasmid-DNA als Donor verwendet.

Der Donor enthält das zu konjugierende Plasmid mit den *mob*-Genen (*mobilization*), deren Genprodukte einen Einzelstrangbruch des Plasmids auslösen. Als Donor bei der diparentalen Konjugation dient *E. coli* S17 - 1, welcher chromosomal die *tra*-Gene besitzt, die die Bildung des F-Pilus ermöglichen und so den Kontakt zwischen Donor und Rezipienten herstellen. Bei der triparentalen Konjugation liegen die *tra*- und *mob*-Gene nicht im gleichen Stamm vor und ein dritter Stamm, der sogenannte Helferstamm (*E. coli* HB101 pRK2013), wird zur Konjugation hinzu gegeben. Dieser Stamm besitzt auf seinem Plasmid die *tra*-Gene und ermöglicht so deren Übertragung vom Donor mit den *mob*-Genen an den Rezipienten.

Für die diparentale Konjugation von Plasmiden werden zunächst etwa 1000 µl einer Übernachtskultur von *Rhodobacter* mit 100 µl einer Übernachtskultur des *E. coli* S17 - 1 - Donors vermischt (bei der triparentalen Konjugation werden bei diesem Schritt zusätzlich 50 µl einer Übernachtskultur des *E. coli* HB101 pRK2013 hinzugegeben) und für 5 min bei 5.000 U / min (Biofuge *pico*) abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden in 100 µl RÄ aufgenommen und zur Beseitigung von evtl. vorhandenen Restantibiotika gründlich in antibiotikafreiem Medium resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 min bei 5.000 U / min (Biofuge *pico*) werden die Zellen wieder in 100 µl RÄ aufgenommen und auf sterile Membran Filter, welche sich auf PY-Platten befinden, getropft. PY-Platten (*peptone yeast*) ermöglichen sowohl *Rhodobacter* als auch *E. coli* das Wachstum, da es sich bei PY um ein komplexes Vollmedium handelt. Die eigentliche Konjugation erfolgt jetzt für 4 - 5 h bei 32°C. Anschließend werden die Filter in Eppendorfgefäße, welche mit 1 ml RÄ gefüllt sind, überführt und die Zellen unter gründlichem Resuspendieren gelöst. Von den Zellen in Kultur wird jetzt eine Verdünnungsreihe (10^0 - 10^{-4}) hergestellt und auf Platten mit den entsprechenden Antibiotikaresistenzen ausplattiert.

2.2.14 Wachstum von Kulturen für Proteinüberexpressionen

Die Überexpression von Proteinen in *E. coli*-Zellen wird durch einen induzierbaren Promotor reguliert, da die permanente Überexpression eines Proteins einen zu starken Stress für die Zellen darstellt und im schlimmsten Fall letal für diese ist. Es sind verschiedene Plasmide für die Überexpression in *E. coli* verwendet wurden, die jedoch alle die Verwendung des *lac*-Operons zur Regulation der Genexpression gemeinsam haben. Durch Zugabe des künstlichen Induktors IPTG, welcher den *lac*-Repressor bindet und so die Expression der nachfolgenden Gene ermöglicht, beginnen die Zellen das Protein zu exprimieren. Das Protein ist mit einem *tag* versehen, das hochspezifisch an verschiedene Matrizes binden kann und für die Aufreinigung aus dem Zelllysat genutzt werden kann.

Für die Überexpression von *E. coli*-Proteinen wird eine Einzelkolonie einer frisch aus der Stammsammlung ausgestrichene Std I - Platte in 20 ml Std I - Medium (mit dem entsprechenden Antibiotika) überführt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird die gesamte Kultur in einen 2l Erlenmeyerkolben mit 1l Std I - Medium (mit dem entsprechenden Antibiotika) vereint. Die Zellen werden bis zu einer OD_{600} von 0,4 bei 37°C inkubiert und anschließend mit der angegebenen Menge IPTG induziert (Tabelle 1). Die Zellen werden unter den jeweiligen Überexpressionsbedingungen weiter inkubiert. Nach Ablauf der Zeit kann man die Zellen bei 5.000 U / min für 15 min (4°C, Rotor GS3) pelletieren und bei - 20°C aufbewahren.

Die Überexpression des *R. sphaeroides* CryB - Proteins erfolgt sauerstoffabhängig unter Kontrolle des *puf* - Promotors. Daher ist keine Induktion durch Zugabe von IPTG nötig, sondern es reicht das Wachstum unter semiaeroben Bedingungen. Die Kultur wird ebenfalls frisch aus der Stammsammlung ausgestrichen und eine Einzelkolonie in 40 ml RÄ - Medium angeimpft. Nachdem die Kultur eine OD₆₆₀ von 0,8 erreicht haben, werden sie in einen 1 l Erlenmeyerkolben mit 700 ml RÄ - Medium vereint. Die Zellen inkubieren anschließend über Nacht bei 32°C und können bei 5.000 U / min für 15 min (4°C, Rotor GS3) pelletiert werden. Die Aufbewahrung erfolgt bei - 20°C

Tabelle 1 : Überexpressionsbedingungen für die verwendeten *E. coli* und *R. sphaeroides* - Überexpressionsstämme.

Protein	Vektor	tag	IPTG für Induktion (mM)	Überexpressionsbedingungen
AppAΔN	pGEX-2T	GST	0,5	21°C, 6 h
PpsR	pGEX-2T	GST	0,5	21°C, 6 h
AppA	pMAL-2cx	MBP	1	21°C, 6 h
CryB (<i>E. coli</i>)	pQE32	6 x His	0,1	17°C, 24 h
CryB (<i>R. sphaeroides</i>)	pRK <puf< td=""> <td>6 x His</td> <td>-</td> <td>32°C, 12°h</td> </puf<>	6 x His	-	32°C, 12°h
PrrA	pQE30	6 x His	0,1	17°C, 24 h

2.2.15 Gewinnung von Zelllysaten von *E. coli*

Um das überexprimierte Protein (Abschnitt 2.2.10) aus *E. coli* aufzureinigen, müssen zuerst die induzierten Zellen lysiert werden. Da eine Degradation des Proteins vermieden werden soll, erfolgen alle Schritte auf Eis. Das Pellet wird zunächst in dem, für die weitere Aufreinigung benötigten, Lysepuffer resuspendiert und anschließend mit 1 mg ml⁻¹ Lysozym versetzt. Nach einer Inkubation für 30 min werden die Zellen mit Hilfe des Sonopuls GM70 sieben Mal für jeweils 30 sec sonifiziert. Die Entfernung von Zellwandbestandteilen, Zelltrümmern und unlöslichen Proteinen kann anschließend durch eine Zentrifugation von 30 min bei 13.000 U / min (4°C, Rotor SS34) erfolgen.

2.2.16 Gewinnung von Zelllysaten von *R. sphaeroides*

Für die Aufreinigung des überexprimiertem Proteins (Abschnitt 2.2.10) aus *R. sphaeroides*, müssen zuerst die geernteten Zellen lysiert werden. Da eine Degradation des Proteins vermieden werden soll, erfolgen alle Schritte auf Eis. Das Pellet wird in 1 x PBS (Abschnitt 2.1.12) resuspendiert. Nach einer Inkubation für 30 min werden die Zellen mit Hilfe des Sonopuls GM70 sieben Mal für jeweils 30 sec sonifiziert. Die Entfernung von Zellwandbestandteilen, Zelltrümmern und unlöslichen Proteinen kann anschließend durch eine Zentrifugation von 30 min bei 13.000 U / min (4°C, Rotor SS34) erfolgen.

2.2.17 Bestimmung der Resistenz von *R. sphaeroides* gegenüber oxidativem Stress (Hemmhoftest)

Mit Hilfe des Hemmhoftests kann die Widerstandsfähigkeit einer Bakterienkultur gegenüber Wasserstoffperoxid (H_2O_2)- bzw. Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$)-Stress untersucht werden. Dazu wird H_2O_2 bzw. Methylenblau einer definierten Konzentration auf ein Filterplättchen getropft, welches auf eine mit *R. sphaeroides* inokulierte RÄ - Agar - Platte aufgelegt wurde. Die Chemikalien diffundieren in den Agar und es wird ein Hemmhof erzeugt, in dem die Zellen aufgrund der letalen Konzentration nicht wachsen können.

200 μl einer semiaeroben *R. sphaeroides* - Kultur der exponentiellen Phase ($\text{OD}_{660} = 0,4 - 0,5$) werden mit 2 ml vorgewärmten RÄ - Topagar vermischt und auf die Oberfläche einer frischen RÄ - Agarplatte gegossen. Nach dem Erstarren des Topagars werden Filterblättchen auf der Oberfläche platziert. Je 5 μl der entsprechenden Chemikalienkonzentration werden auf die Filterblättchen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 32°C werden die Hemmhofzonen sichtbar und deren Radius kann gemessen werden.

Findet der Hemmhoftest bei Lichtbestrahlung statt, geschieht dies mit Weißlicht einer Stärke von $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Leuchtstoffröhren TLD 58W/25).

2.2.18 β - Galaktosidaseaktivitäts - assays in *R. sphaeroides*

Das β - Galaktosidaseaktivitäts - assay (Miller, 1972) ist eine einfache Methode um die Aktivität eines Promotors zu bestimmen. Das die β - Galaktosidase kodierende *lacZ* - Gen wird unter die direkte Kontrolle des zu untersuchenden Promotors kloniert. Ist der Promotor aktiv, wird die β - Galaktosidase exprimiert. Dieses Enzym kann das chromogene Substrat ONPG (ortho - Nitrophenol - β - Galaktosid) in Galaktose und ortho-Nitrophenol spalten. Das ortho-Nitrophenol besitzt eine starke gelbe Färbung, die im Photometer bei 420 nm gemessen werden kann. Die Gelbfärbung gibt somit eine direkte Auskunft über die Aktivität des Promotors.

Die *R. sphaeroides* - Kultur wird zunächst bei 32°C inkubiert. Nach Erreichen des gewünschten OD_{660} - Wertes wird 1 ml der Kultur entnommen und bei 13.000 U / min für 3 min (Biofuge *pico*) sedimentiert und die OD_{660} gemessen. Das Zellsediment wird in 750 ml Z - Puffer resuspendiert, und mit zwei Tropfen Chloroform und einem Tropfen 0,1 % SDS versetzt. Anschließend wird der Ansatz für genau 30 sec gevortext. Die Proben werden für 5 min auf 28°C vorgewärmt. Die Farbreaktion wird gestartet, indem 200 μl einer ONPG-Lösung (4 mg / ml) hinzugefügt werden. Nach genau 5 min wird die Reaktion durch Zugabe von 500 μl Na_2CO_3 (1 M) gestoppt und die Proben werden bei 13.000 U / min für 3 min zentrifugiert (Biofuge *pico*). Abschließend wird die Absorption des Überstandes sowohl bei 420 nm als auch bei 550 nm photometrisch gemessen. Die Enzymaktivität wird nach folgender Formel berechnet und gibt die β - Galaktosidase - Aktivität in Miller Einheiten wieder:

Formel 1 : Miller Einheiten =

V = eingesetztes Kulturvolumen (1 ml)
t = Reaktionszeit (5 min)

Z - Puffer		
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,06	M
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,04	M
KCl	0,01	M
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,001	M
β - Mercaptoethanol	0,05	M
	7,4	pH

2.2.19 β - Galaktosidaseaktivitäts - assays in *S. cerevisiae*

Die zu untersuchenden *S. cerevisiae* - Kulturen werden über Nacht in 2 - 5 ml SD - Medium ohne Leucin und Tryptophan angezogen. Am darauffolgenden Tag werden 2 ml der Kultur in 8 ml YPAD-Medium überführt und für 3 - 5 h bei 32°C weitergeschüttelt. Während dieser Zeit werden 4 mg ml⁻¹ ONPG durch Rühren für 1 - 2 Stunden bei 4°C in Z - Puffer gelöst. Sobald die Kulturen eine OD₆₀₀ von 0,5 - 0,7 erreicht haben, werden sie durch Vortexen für 1 min durchmischt und es wird noch einmal die genaue OD₆₀₀ bestimmt. 1,5 ml der Kultur werden mit 13.000 U / min (Biofuge *pico*) für 1 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wird mit 1,5 ml Z - Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen werden anschließend in 300 µl Z - Puffer aufgenommen. 100 µl der Zellsuspension werden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und für 1 min in flüssigem N₂ tiefgefroren. Das Auftauen der Zellen erfolgt bei 37°C im Wasserbad. Als Leerwerte für die anschließende photometrische Messung werden zwei zusätzliche Reaktionsgefäße mit je 100 µl Z - Puffer bereitgestellt. In den Ansatz mit Zellsuspension und in die beiden Leerkontrollen werden jeweils 700 µl Z - Puffer gegeben. Durch Zugabe von 0,16 ml ONPG - Lösung wird die Reaktion gestartet. Die Reaktionsgefäße werden bei 30°C inkubiert, bis sich eine Gelbfärbung entwickelt. Als Positivkontrolle dient ein Hefestamm, der die beiden Proteine p53 und das SV40 T-Antigen koexprimiert. Diese Probe färbt sich innerhalb von etwa ein bis zwei Stunden. Bei schwächeren Interaktionen kann die Reaktion bis zu 24 h dauern. Um die Enzymaktivität zu beenden, werden den Ansätzen je 0,4 ml 1 M Na₂CO₃ zugesetzt. Danach erfolgt eine Zentrifugation mit 13.000 U / min (Biofuge *pico*) für 10 min, um Zellbruchstücke abzutrennen. Der Überstand wird in Photometer-Küvetten überführt und die Absorption bei 420 nm bestimmt. Die Berechnung der β - Galaktosidaseaktivität erfolgt wie unter 2.2.17 angegeben.

2.2.20 Techniken zur Visualisierung der Polysaccharid - Kapsel von Bakterien

Die Kapsel ist eine aus Proteinen und Polysacchariden zusammengesetzte Schleimhülle auf der Außenseite der Zellwand von Bakterien. Sie spielt eine große Rolle bei dem Schutz vor Umwelteinflüssen wie Austrocknung oder der Anheftung an Oberflächen. Die Kapsel kann mikroskopisch nur indirekt sichtbar gemacht werden, da sie keine Farbstoffe direkt absorbiert. Durch ihre stark wasserabweisenden Eigenschaften, bildet sich ein deutlicher, ungefärbter Hof um die Zellen, wenn diese eine Kapsel besitzen.

Die einfachste Möglichkeit zur Visualisierung unter dem Mikroskop liegt darin, einen Tropfen mit H₂O verdünnter Tusche (1 : 3) auf einen Objektträger zu tropfen und die Zellen darin mit einer Impföse zu verstreichen. Jetzt kann man die Zellen entweder mit einem Deckglas direkt unter dem Ölimmersionsobjektiv mikroskopieren oder die Tusche zunächst trocknen lassen und die Zellen ohne Deckglas betrachten. Die lichtbrechenden Kapseln sollten im Durchlicht jetzt gut sichtbar sein.

Da durch die Tuschefärbung oft nur schwache Kontraste sichtbar sind, kann man diese durch verschiedene Färbungen verstärken. Bei der Maneval'schen Färbung werden 10 µl der zu untersuchenden Bakterienkultur in 10 µl 2 %iger Kongorotlösung gefärbt. Die gefärbten Zellen werden anschließend auf einem Objektträger verstrichen und an der Luft für mindestens 15 min getrocknet. Nun überschichtet man die getrockneten Zellen für 3 - 4 min mit 15 µl Maneval'scher Lösung. Diese wird zuerst mit 3 %iger HCl - Lösung und anschließend mit H₂O abgespült. Nach dem Trocknen können die Zellen unter dem Ölimmersionsobjektiv mikroskopiert werden. Das Kongorot, welches nicht in die Zellen eindringt, färbt sich durch HCl blau, während die Zellen durch das Fuchsin in Maneval'scher Lösung rot gefärbt sind. Die Kapsel sollte als deutlicher, farbloser Vorhof gut zwischen dem Hintergrund und den Zellen sichtbar sein.

Maneval'sche Lösung		
Phenol	5	%
Essigsäure	20	%
FeCl ₂	30	%
Fuchsin	1	%

2.2.21 Sedimentationsanalyse von *R. sphaeroides*

Zellen mit einer Polysaccharidkapsel nutzen diese, um sich an Oberflächen anzuheften oder Biofilme zu bilden. Dabei machen sie sich zum einen die klebrige Natur der Kapsel zu Nutze und zum anderen die veränderte Sedimentationsrate. Zellen mit einer Kapsel sedimentieren schneller aber weniger kompakt als Zellen ohne Kapsel, was erste Hinweise auf Unterschiede in der Kapselbildung durch einfache Zentrifugationsexperimente liefern kann. Dazu werden die zu vergleichenden Kulturen bei einer identischen OD in Glaszentrifugenröhrchen überführt und für jeweils 30 min bei niedrigen *g* - Zahlen (100 - 2000 *g*) zentrifugiert. Sollten die Zellen eine Kapsel besitzen, müssten sie deutlich schneller sedimentieren als Zellen ohne eine Kapsel.

2.2.22 Mating von *S. cerevisiae*

Bei diesem Test macht man sich die Tatsache zunutze, dass haploide Hefezellen (*n*) als zwei verschiedene Paarungstypen vorliegen können (*a* und *α*). Diese beiden Paarungstypen können unter entsprechenden Bedingungen zu einer diploiden Zygote (2*n*) verschmelzen, die ihrerseits wieder diploide Tochterzellen produziert. Wenn die beiden Paarungstypen Träger

unterschiedlicher Plasmide sind, enthält die diploide Zygote nach der Verschmelzung auch beide Plasmide der Ausgangszellen. Mit dieser Methode kann man prüfen, ob ein im *Yeast - Two - Hybrid* - System gefundener Klon eine spezifische Interaktion mit dem getesteten Protein aufweist, oder ob das gefundene Protein bereits alleine in der Lage ist, die Reportergene (Leucin-, Tryptophan- und Histidinsynthese) im Hefegenom zu aktivieren. Nach dem Transformieren werden 200 µl YPDA - Medium mit den beiden Hefestämmen beimpft und für 24 h unter leichtem Schütteln bei 32°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag werden die Hefen auf zwei verschiedene SD - Platten ausgestrichen. Zum einen verwendet man SD ohne Leucin und ohne Tryptophan; hier können Hefen wachsen, die beide Ausgangsplasmide enthalten. Zum anderen werden die Hefen auf SD-Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin plattiert. Auf diesen Platten sind nur Hefen zum Wachstum befähigt, die eine Interaktion der beiden exprimierten Hybridproteine zeigen. Nach drei bis sieben Tagen Inkubation bei 30°C sind die Hefen gewachsen.

2.3 Elektrophoresetechniken

2.3.1 Agarose - Gel - Elektrophorese

Für größere DNA - Fragmente (0,5 - 20 kb) werden 0,7 - 2 %ige TAE - Agarose-Gele verwendet. Die Agarose wird kurz in TAE aufgekocht und in einen abgeklebten Gelschlitten mit Kamm gegossen. Nach dem Polymerisieren überführt man das Gel in die Kammer und überschichtet es mit TAE. Die Proben werden mit je 2 µl DNA-Auftragspuffer vermengt und auf das Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgt für 30 - 60 min bei 150 mA.

2.3.2 Polyacrylamid - Gel - Elektrophoresen

2.3.2.1 Polyacrylamid - Gel zur Auftrennung von DNA - Fragmenten

Die genaue Auftrennung von sehr kleinen DNA-Fragmenten (< 500 bp) lässt sich nur schwer mit Agarosegelen durchführen. Daher werden 6 - 8 %ige TBE - Polyacrylamid - Gele verwendet. Der Lauf erfolgt für 30 min in einem Minigelsystem bei 150 V. Das Färben erfolgt im Ethidiumbromidbad.

TBE - Polyacrylamid - Gel		
TBE (10 X)	10	%
40 % Acrylamid	1,5 - 0,9	ml
APS (10 %)	0,06	ml
TEMED	0,015	ml
ad ddH ₂ O	6	ml

2.3.2.2 SDS - Polyacrylamid - Gel zur Auftrennung von Proteinen (Laemmli, 1970)

Die denaturierende Auftrennung von Proteinen erfolgt unter Verwendung von Natriumdodecylsulfat (SDS). Dieses bindet mit seinem hydrophoben Bereich die hydrophoben Domänen von Proteinen und entfaltet diese so. Darüber hinaus bringt es eine starke negative Ladung ein. Dies führt dazu, dass die Proteine unabhängig von ihrer Sekundärstruktur und ihrer Ladung aufgetrennt werden können. Dabei werden 6 - 12 %ige Polyacrylamid - Gele verwendet.

Nach dem Gießen wird das Trenngel mit 70 %igem EtOH überschichtet, da die Polymerisation unter Sauerstoffausschluss deutlich schneller stattfindet. Ist das Gel polymerisiert, beseitigt man den EtOH und gießt das Sammelgel auf das Trenngel. Dieses 5 %ige-Gel sorgt dafür, dass die Proteine als scharfe Bande ins Gel einlaufen. Als Laufpuffer dient der ebenfalls SDS - haltige Laemmli-Puffer.

Vor dem Auftragen auf das Gel werden die Proben im Verhältnis 1 : 5 mit dem 5 x SDS - Auftragspuffer vermischt und für 5 min bei 100°C gekocht. Nach kurzem Zentrifugieren werden die Proben anschließend auf das Gel aufgetragen und für 3 h bei 150 - 200 V laufen gelassen.

SDS - Polyacrylamid - Trenngel			SDS - Polyacrylamid - Sammelgel		
Trenngelpuffer	25	%	Sammelgelpuffer	25	%
40 % Acrylamid	9 - 4,5	ml	40 % Acrylamid	9 - 4,5	ml
SDS (10 %)	0,3	ml	SDS (10 %)	0,3	ml
APS (10 %)	0,3	ml	APS (10 %)	0,3	ml
TEMED	0,015	ml	TEMED	0,015	ml
ad ddH₂O	30	ml	ad ddH₂O	30	ml

2.3.2.3 Polyacrylamid / Harnstoff - Gel zur Auftrennung von RNA

Für die Qualitätskontrolle von RNA ist es erforderlich, diese unter stark denaturierenden Bedingungen aufzutragen, da viele RNAs doppelsträngige, stark strukturierte Bereiche besitzen und eventuell vorhandene RNasen inaktiviert werden. Für die Auftrennung von RNA werden daher 10 %ige Polyacrylamid / Harnstoff - Gele verwendet.

Polyacrylamid / Harnstoff - Gel		
TBE (10 X)	10	%
40 % Acrylamid	1,5 - 0,9	ml
Harnstoff	2,52	g
APS (10 %)	0,06	ml
TEMED	0,015	ml
ad ddH₂O	6	ml

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung, Aufreinigung und Aufarbeitung von DNA / RNA

2.4.1.1 Isolierung von Plasmid - DNA (Birnboim und Doly, 1979)

Für die Isolierung von Plasmid - DNA nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aus kleinen Kulturvolumen führt man eine Minipräp durch. Etwa 1,5 ml der Kultur werden in ein Eppendorfggefäß überführt und für 3 min bei 8.000 U / min (Biofuge *pico*) zentrifugiert. Der Überstand kann verworfen werden. Anschließend löst man durch gründliches Vortexen das Sediment in 100 µl kalter Lösung I mit 1 µl RNase A (7 U / µl). Durch Zugabe von 200 µl Lösung II und mehrmaligem Invertieren werden die Zellen jetzt lysiert. Die Lösung wird deutlich viskoser. Die Inkubationszeit mit Lösung II sollte 5 min nicht überschreiten. Nun kann die chromosomale DNA durch Zugabe von 150 µl kalter Lösung III gefällt werden. Sie wird als weißes, fädiges Präzipitat sichtbar. Die chromosomale DNA wird jetzt durch 20 min Zentrifugation bei 13.000 U / min (4°C, Biofuge *fresco*) sedimentiert, während die Plasmid - DNA im Überstand verbleibt. Dieser wird in ein neues Eppendorfggefäß überführt und die Plasmid - DNA durch Zugabe von 60 µl 3 M NaOAc (pH = 5,2) und 900 µl kalten 96 %igem EtOH gefällt. Die Effizienz kann durch ein 30 sec Gefrieren der Probe in flüssigem N₂ erhöht werden. Durch 15 min Zentrifugation bei 13.000 U / min (4°C, Biofuge *fresco*) wird die DNA jetzt sedimentiert und anschließend mit 100 µl 75 %igem EtOH gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 13.000 U / min (Biofuge *pico*), nimmt man das Präzipitat in 10 µl ddH₂O auf.

Lösung I			Lösung II		
Glucose	0,05	M	NaOH	0,2	M
Tris / HCl	0,025	M	SDS	1	%
EDTA	0,01	M	Lösung III		
	7,4	pH	Kaliumacetat	3	M
			Essigsäure	2	M

2.4.1.2 Isolierung von chromosomaler DNA

10 ml einer Übernachtskultur von *R. sphaeroides* werden zunächst bei 8.000 U / min (4°C, Rotor SS34) für 10 min sedimentiert und das Pellet in 15 ml 1 x PBS gewaschen. Durch erneute Zentrifugation bei 8.000 U / min für 10 min (4°C, Rotor SS34) sedimentiert man die Zellen und nimmt sie anschließend in 567 µl TE-Puffer und 1 mg / ml Lysozym (Endkonzentration) auf. Die Lyse der Zellen erfolgt bei 37°C für 1 h. Die Proteolyse der zellulären Proteine erfolgt durch Zusatz von 1 % SDS und 1 mg / ml Proteinase K (Endkonzentration). Nach 2 h Inkubation bei 37°C im Wasserbad (gelegentlich Schütteln), gibt man 0,1 ml 5 M NaCl und 80 µl CTAB / NaCl hinzu. Die Inkubation erfolgt für 10 min bei 65°C. Zur Ausfällung von Proteinen und Zelltrümmern wird ein Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) zugegeben und sanft gemischt. Jetzt wird für

15 min bei 13.000 U / min (Biofuge *pico*) zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erzeugen. In der oberen, wässrigen Phase befindet sich die chromosomale DNA. Diese kann jetzt mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden. Durch Zugabe von einer Volumeneinheit Isopropanol wird die DNA präzipitiert. Hier kann die Ausbeute durch eine kurze (< 5min) Inkubation auf dem Taumelrollenmischer erhöht werden. Die präzipitierte DNA wird jetzt für 3 min bei 3.000 U / min (Biofuge *pico*) zentrifugiert und anschließend, nach dem Verwerfen des Überstandes, noch in 100 µl 75 % EtOH gewaschen und wie oben zentrifugiert. Erneut verwirft man den Überstand und trocknet das Präzipitat für 20 - 30 min an der Luft. Das vollständig getrocknete Präzipitat kann jetzt in 1 ml TE - Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert werden.

CTAB / NaCl			TE - Puffer		
NaCl	0,7	M	Tris / HCl	0,01	M
CTAB	10	%	EDTA	0,001	M

2.4.1.3 Isolierung von Plasmid - DNA mit Silikasäulchen

Um besonderes reine DNA (QIAprep *Spin Miniprep Kit*) oder besonders hohe Mengen (QIAGEN *Plasmid Midi Kit*) zu erhalten, wurden in einigen Fällen Minipräparations *Kits* verwendet. Die Plasmid - DNA wird dabei mittels alkalischer Lyse aufgereinigt und anschließend reversibel an eine Silikamembran gebunden, wo sie nach mehrfachem Waschen eluiert werden kann.

Die Durchführung der Aufreinigung entsprach den Angaben des Herstellers, wobei bei Verwendung des QIAGEN *Plasmid Midi Kit* stets die Angaben für Plasmide mit hoher Kopienzahl verwendet wurden.

2.4.1.4 Phenol / Chloroform - Proteinextraktion aus Nukleinsäurelösungen

Plasmid - DNA wird in vielen Fällen mit mehreren konsekutiven enzymatischen Reaktionen behandelt. Dabei ist es oft erforderlich, das eine Enzym zu entfernen, bevor das nächste zu Reaktion hinzugefügt wird. Eine einfache Methode um Proteine aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen, ist die Phenol / Chloroform - Proteinextraktion.

Die aufzureinigende Nukleinsäurelösung wird dabei mit dem gleichen Volumen Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) versetzt und gründlich gevortext. Die Proteine werden so denaturiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 13.000 U / min (Biofuge *pico*), lagern sich die denaturierten Proteine in der Interphase an, während die Nukleinsäuren sich im Überstand befinden. Um für weitere enzymatische Reaktionen störende Phenol - Reste aus der Lösung zu entfernen, kann anschließend noch ein Chloroform / Isoamylalkohol (24 : 1) - Schritt nachgezogen werden. Der Überstand wird mit einem Volumenanteil Chloroform / Isoamylalkohol versetzt und wieder für 5 min Zentrifugation bei 13.000 U / min (Biofuge *pico*) zentrifugiert. Der Überstand sollte nun die phenol - und proteinfreie DNA / RNA enthalten.

2.4.1.5 Isolierung von Gesamt - RNA aus *R. sphaeroides* (Scherrer und Darnell, 1962)

Eine einfache und effektive Methode um große Mengen qualitativ hochwertiger RNA aus gramnegativen Zellen zu isolieren ist die heiße Phenolextraktion. Die so isolierte RNA kann für alle weiteren Methoden, wie z.B. *Northern blot* oder *real time RT - PCR* genutzt werden.

Für die Isolierung der gesamten zellulären RNA mit der heißen Phenolextraktion zentrifugiert man zunächst 25 ml der Kultur für 10 min bei 10.000 U / min (4°C, Rotor SS34). Der Überstand wird verworfen und das Sediment direkt in 125 µl kalter RNA - Lösung I resuspendiert. Zusammen mit den gelösten Zellen wird diese jetzt in ein Eppendorfgefäß mit 250 µl RNA - Lösung II überführt und kräftig gevortext. Das Aufschließen der Zellen erfolgt durch eine 1,5 min Inkubation bei 65°C im Wasserbad. Die nun folgenden Phenolisierungsschritte werden alle je 3 x wiederholt: Zu der Lösung mit den aufgeschlossenen Zellen werden jetzt 500 µl Phenol / H₂O (65°C) hinzu gegeben und es wird erneut für 3 min bei 65°C inkubiert. Anschließend werden die Proben direkt in flüssigen N₂ überführt und kräftig gevortext. Die Phasentrennung wird jetzt durch 15 min Zentrifugation bei 13.000 U / min (Biofuge *pico*) erzeugt. Die wässrige, obere Phase, in der sich die Nukleinsäuren befinden, wird jetzt in ein neues Eppendorfgefäß überführt, zu welchem dann erneut 500 µl Phenol / H₂O gegeben werden (s.o.). Nach dem dritten Phenolisieren fällt man die Nukleinsäuren durch Zugabe von 60 µl 3 M Natriumacetat (pH = 4,5) und 1000 µl kaltem 96 %igen EtOH für 1 h bei - 80°C. Die gefällte DNA / RNA wird jetzt für 20 min bei 13.000 U / min (Biofuge *pico*) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wird in 500 µl 75 % EtOH gewaschen und erneut für 5 min bei 13.000 U / min (Biofuge *pico*) zentrifugiert. Der Überstand kann abgenommen werden und das Präzipitat wird für 10 min in der *Speed Vac* getrocknet. Das getrocknete Präzipitat nimmt man in 180 µl ddH₂O auf und fügt 20 µl Dnase I - Puffer und 1 µl Dnase I (Fermentas) hinzu. Der Verdau erfolgt bei 37°C für 1 h. Die Dnase I - Enzyme werden jetzt durch Zugabe von 400 µl Phenol / Chloroform und anschließendes kräftiges Vortexen inaktiviert. Durch 5 min Zentrifugation bei 13.000 U / min (Biofuge *pico*) erzeugt man eine Phasentrennung und überführt den Überstand in ein neues Eppendorfgefäß. Die Phenol / Chloroform - Extraktion wird ein weiteres Mal wiederholt. Jetzt gibt man 400 µl Chloroform / Isoamylalkohol zu dem Überstand und zentrifugiert erneut für 5 min bei 13.000 U / min (Biofuge *pico*) um Phenol - Reste zu beseitigen. Im Überstand sollte sich jetzt nur noch die aufgereinigte RNA befinden. Diese wird jetzt für 1 h bei - 80°C durch Zugabe von 25 µl Natriumacetat (pH = 7) und 900 µl kaltem 96 %igem EtOH gefällt. Die gefällte RNA wird jetzt für 20 min bei 13.000 U / min (Biofuge *pico*) zentrifugiert und anschließend, nach dem Verwerfen des Überstandes, mit 500 µl EtOH gewaschen. Das Präzipitat wird getrocknet und daraufhin in 50 µl ddH₂O aufgenommen. Es sollte sich jetzt nur noch die saubere RNA in Lösung befinden.

RNA - Lösung I		RNA - Lösung II	
Saccharose	0,3 M	SDS	2 %
Natriumacetat (pH = 4,5)	0,01 M	Natriumacetat (pH = 4,5)	0,001 M

2.4.2 Fällung von Nukleinsäuren

2.4.2.1 Ethanolfällung

In Gegenwart hoher Konzentrationen monovalenter Kationen fallen in Ethanol gelöste Nukleinsäuren durch Aggregation aus. Diese Kationen binden an die negativ geladenen Phosphatgruppen und senken so die Löslichkeit der DNA / RNA. Die Kationenkonzentration wird dabei durch die Zugabe von 1 / 10 des Volumens an 3 M Natriumacetat (pH = 5,2) erhöht und anschließend werden die Nukleinsäuren mit 2,5 Volumeneinheiten kaltem 96 %igen EtOH gefällt. Hier kann zur Erhöhung der Effizienz zusätzlich noch für 30 sec in flüssigem N₂ inkubiert werden. Die gefällte DNA / RNA wird jetzt für 20 min bei 13.000 U / min (4°C, Biofuge *pico*) sedimentiert, der Überstand verworfen und anschließend mit 75 % EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen in der *Speed Vac* für 5 min kann das Pellet in ddH₂O aufgenommen und bei - 20°C gelagert werden.

2.4.2.2 N - Butanolfällung

Die N-Butanolfällung wird zum Aufkonzentrieren von Ligationsansätzen und zu deren Reinigung von Salzkontaminationen genutzt. Dem Ligationsansatz werden dabei zuerst 80 µl ddH₂O und anschließend 1100 µl N - Butanol zugesetzt. Jetzt wird geschüttelt bis die Phasengrenze vollständig verschwunden ist und anschließend für 20 min bei 13.000 U / min (4°C, Biofuge *pico*) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Präzipitat in 75 %igem EtOH gewaschen. Nach 5 min Trocknen in der *Speed Vac* kann der gefällte Ligationsansatz in ddH₂O resuspendiert werden.

2.4.2.3 Isopropanolfällung

Oft sind die Volumen der zu fällenden Nukleinsäurelösungen zu hoch, um sie für die Ethanolfällung zu nutzen. Eine Möglichkeit Nukleinsäuren aus großvolumigen Lösungen zu fällen, ist die Isopropanolfällung. Durch Hinzugeben von 0,6 Volumenanteilen Isopropanol wird die Fällung eingeleitet und anschließend für 20 min bei 13.000 U / min (4°C, Biofuge *pico*) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Präzipitat in 75 %igem EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen in der *Speed Vac* für 5 min kann das Pellet in ddH₂O aufgenommen und bei - 20°C gelagert werden.

2.4.3 Isolieren von DNA aus Gelfragmenten

Die Klonierung von DNA - Fragmenten macht es oft erforderlich, dass einzelne Banden aus dem Gel isoliert und die DNA aufgereinigt wird. Dies geschieht unter Verwendung des *QIAEXII Gel - Extraktion - Kits*. Ein kleiner Teil des Gels wird mit Ethidiumbromid gefärbt und auf den UV-Tisch überführt. Mit Hilfe eines UV - Lineals wird die genaue Position der gesuchten Bande ermittelt. Diese wird anschließend mit einem sterilen Skalpell aus dem nicht gefärbten Teil des Gel geschnitten, gewogen und (entsprechend den Angaben des Herstellers) aufgereinigt.

Die Agarose wird dabei irreversibel verflüssigt und von der, wieder in Lösung vorliegenden DNA, durch deren Bindung an eine Silikatmatrix, getrennt.

2.4.4 Quantifizieren von Nukleinsäuren

Für die Bestimmung der Konzentration gelöster Nukleinsäuren wird stets die photometrische Messung der Absorption (A_{260}) herangezogen. Dabei wird auch gleichzeitig noch die A_{280} gemessen, die über eventuelle Proteinkontaminationen Auskunft gibt. Das Verhältnis von A_{260}/A_{280} wird dabei als Ratio angegeben und dient als ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren.

$$1 A_{260} = \begin{array}{l} 50 \mu\text{g ds DNA} \quad (\text{Ratio} = 1,8 \text{ für saubere DNA}) \\ 40 \mu\text{g ss RNA} \quad (\text{Ratio} = 2 \text{ für saubere RNA}) \end{array}$$

2.4.5 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.4.5.1 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktion von palindromischen Sequenzen durch Restriktionsendonukleasen wird stets nach den Spezifikationen des Herstellers (Fermentas oder New England Biolabs) durchgeführt. Dient die Restriktion nur der Kontrolle vorhandener Restriktionsstellen schneidet man in der Regel etwa 1 h. Präparative Restriktionen für Klonierungszwecke werden mindestens 2 h durchgeführt. Der Zusatz von BSA erfolgt nur bei Restriktionsenzymen, die nach Herstellerangaben durch dieses eine höhere Aktivität zeigen.

2.4.5.2 Dephosphorylieren von DNA

Um die Religation der Vektor-DNA bei Klonierungsschritten mit nur einem Restriktionsenzym zu vermeiden oder das *end-labeling* mit [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP zu ermöglichen, werden die 5'-Phosphatgruppen eines geschnittenen Plasmids durch einen Phosphataseverdau entfernt. Dadurch kann der Vektor nur noch mit dem *insert* ligieren, welches seine 5'-Phosphatgruppen noch besitzt. Für alle Phosphatase-Reaktionen wird das Enzym *Antarctic Phosphatase* nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.4.5.3 Ligation von DNA

Für die Ligation von restriktionsbehandelten DNA-Fragmenten wird die T4-Ligase verwendet. Diese katalysiert die ATP-abhängige Reaktion zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe zweier DNA-Enden. Das Verhältnis von *insert*- zu Vektor-DNA bestimmt man dabei durch Vergleich der Bandenstärke in einem 1%igem TAE-Agarosegel. Das *insert* gibt man in einem 3:1 Überschuss zum Ligationsansatz. Die Ligation erfolgt 2-4 h bei

15°C. Vor der Transformation wird zudem stets eine N - Butanolfällung durchgeführt. Bei *insert* - Fragmenten mit einer Größe von weniger als 500 bp wird zudem 5 % PEG - 8000 zur Lösung geben, um deren Viskosität zu erhöhen. Die Ligation wird dann über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Ligation in den *pDrive*-Vektor von QIAGEN erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers. Vor der Transformation wird eine N-Butanolfällung durchgeführt.

2.4.6 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

2.4.6.1 Radioaktive Markierung durch *nick* - translation

Die Markierung durch *nick* - translation wird für die *Northern blot puc* - Sonde und die *Southern blot* - Sonden verwendet. Hierbei werden enzymatisch DNase I - Schnittstellen in das PCR - Produkt eingefügt und anschließend durch die DNA - Polymerase wieder aufgefüllt. Im Nukleotid - Mix sind ausschließlich radioaktiv markierte [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP vorhanden, welche die Sonde markieren. Alle verwendeten Lösungen entstammen dem *nick* - Translation - Kit der Firma GE Healthcare. Für die *Label*reaktion werden 100 - 400 ng des PCR - Produktes und 30 μCi [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP eingesetzt. Die weiteren Angaben entsprechen den Angaben des Herstellers, wobei die Inkubationszeit auf 45 min bei Raumtemperatur verlängert wird.

2.4.6.2 Radioaktive Markierung durch *end* - labeling

Die Markierung von Oligonukleotiden durch Endmarkierung wird für die *Northern blot rRNA* - Sonde genutzt, sowie das *pucUp* - Fragment für die Gel - Retardations - assays. Dabei fügt das Enzym Polynukleotidkinase (PNK) [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP an die dephosphorylierten 5' - Enden des Oligos an. Für die *Label*reaktion werden 1 μl des PCR - Produktes und 15 μCi [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP eingesetzt. Die Inkubation erfolgt für 1 h bei 37°C.

2.4.6.3 Aufreinigung markierter Sonden

Sowohl für die *nick* - translation, als auch für das *end* - labeling wird die Reaktion nach Ablauf der Inkubationszeit durch Zugabe von 1 x STE - Puffer gestoppt. Dabei werden beide Reaktionsansätze zu einem Endvolumen von 50 μl aufgefüllt. Die eigentliche Aufreinigung der markierten Nukleotide erfolgt durch die *ProbeQuantTMG - 50* bzw. *25 Micro Columns* der Firma GE Healthcare. Dazu wird das Säulenmaterial zuerst durch Vortexen homogenisiert und für 1 min bei 2.600 U / min (Biofuge *pico*) zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und das Säulchen in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Jetzt gibt man den 50 μl Ansatz der *gelabelten* DNA auf das Säulchen und zentrifugiert 2 min bei 2.000 U / min (Biofuge *pico*). Die aufgereinigten, markierten Nukleotide befinden sich im Durchfluss und die Aktivität kann im Szintillationszähler bestimmt werden.

STE - Puffer		
NaCl	0,1	M
Tris - HCl	0,02	M
EDTA	0,01	M
	7,5	pH

2.4.7 Amplifikation von DNA durch PCR

2.4.7.1 Amplifikation von Sequenzabschnitten mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) erlaubt es, auf einfache und effiziente Weise einzelne Sequenzabschnitte sauber und reproduzierbar zu amplifizieren. Dabei macht man sich die Aktivität der aus *Thermus aquaticus* stammenden, hitzestabilen *Taq*-Polymerase zunutze. Das Prinzip der *PCR* lässt sich wie folgt zusammenfassen: Das DNA-*template* wird in einem ersten Schritt bei 94°C in Einzelstränge aufgetrennt. Im zweiten *annealing*-Schritt binden ein *sense*- und ein *antisense*-*primer* an die DNA und im folgenden *extension*-Schritt bei 72°C füllt die *Taq*-Polymerase den komplementären Strang auf. Nun folgt wieder ein erneuter Denaturierungsschritt und der Zyklus beginnt von vorne. Der zwischen den *primern* gelegene Bereich wird dabei exponentiell amplifiziert. Neben der *Taq*-Polymerase wurden außerdem die *Deep Vent*-Polymerase und die *Bio-X-Act-Long* eingesetzt. Diese unterscheiden sich in den *extension*-Temperaturen (*Deep Vent*-Polymerase = 68°C bzw. *Bio-X-Act-Long* = 75°C) und besitzen eine 3'-5' *proofreading*-Aktivität, um die Anzahl der Replikationsfehler zu senken. Ein Standard-PCR-Ansatz setzt sich aus dNTPs, dem DNA-*template*, den beiden *primern*, der *Taq*-Polymerase und deren Puffer zusammen. Um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen, kann zudem *Q*-Solution (5 x) hinzugefügt werden.

2.4.7.2 Quantitative *real time* RT - PCR

Die *real time* RT-PCR macht sich die Sensibilität und Genauigkeit der *PCR* für die Amplifikation von mRNA-Sequenzen zunutze. Dabei wird mittels der reversen Transkriptase (RT) zunächst ein cDNA-Transkript der mRNA erzeugt, welches anschließend in einer normalen *PCR* amplifiziert werden kann. Durch den Farbstoff *SYBR Green I*, der in die gebildete DNA interkalieren kann, wird dabei die Zunahme der *PCR* Produkte in Echtzeit verfolgt. *SYBR Green I* kann durch Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 494 nm zur Emission von grünem Licht von 524 nm angeregt werden. Diese Fluoreszenz lässt sich wiederum messen und anhand eines internen Standards können Aussagen über relative mRNA-*level* in der Reaktion gemacht werden.

Bevor die isolierte RNA für die *real time* RT-PCR verwendet werden kann, muss sie zuerst von DNA-Kontaminationen befreit werden, da diese die Ergebnisse der *PCR* verfälschen würden. Dazu wird die hochkonzentrierte DNase I der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet. Die Spaltung erfolgt über 60 min bei Raumtemperatur. Anschließend wird die RNA einer Test-*PCR* ohne RT-Schritt gegen das *housekeeping*-Gen *rpoZ* unterzogen. Die Proben

werden, zusammen mit einer Positiv - (*PCR* mit chromosomaler DNA) und Negativkontrolle (*PCR* mit ddH₂O) auf ein Polyacrylamid - Gel geladen. Da die DNA in den RNA - Proben verdaut sein sollte, darf nur in der Positivkontrolle eine Bande sichtbar sein. Die Entfernung der DNase I erfolgt über Phenol / Chloroform - Extraktion (Abschnitt 2.4.1.4). Für die *real time RT - PCR* werden 40 ng der zu untersuchenden mRNA eingesetzt und mittels des *OneStep RT-PCR Kit* von QIAGEN amplifiziert. Dabei wurden der *PCR* - Ansatz und das *Thermocycler (Rotor-Gene 3000 oder BIO - RAD - Cycler S1000 mit CFX - Aufsatz)* nach den Herstellerangaben zusammengesetzt /bedient. Die relative Expression der einzelnen Gene kann dabei nach folgender Formel berechnet werden (Pfaffl, 2001) :

Formel 2 : Ratio =

Der ΔCP - Wert gibt den Zyklenunterschied zwischen der behandelten Probe und der Kontrollprobe an, bei der diese den Fluoreszenzthreshold des Gerätes überschreiten.

E entspricht der Effizienz der jeweiligen *Primer*. Die Effizienz eines Gens gibt an, wie gut dieses in der *PCR* amplifiziert werden kann. Besonders effektive *primer* haben eine Effizienz von 2, da es bei jedem *PCR* - Zyklus zu einer vollständigen Verdopplung der gebildeten DNA kommt. Für die Bestimmung der Effizienz der *real-time PCR* werden verschiedene Endkonzentrationen der Gesamt-RNA (8 ng / 4 ng / 0,4 ng / 0,04 ng) einem *real-time RT-PCR* Lauf unterzogen. Die Effizienzen für die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 2 zu finden.

Tabelle 2 : Ermittelte Effizienzen für die *real time RT - PCR primer*

Primer	E	<i>annealing</i> g (°C)	Primer	E	<i>annealing</i> (°C)	Primer	E	<i>annealing</i> (°C)
<i>rpoZ</i>	2,02	59°C	<i>pucB</i>	2,02	59°C	RSP_353 9	1,87	56°C
<i>bchL</i>	2,16	57°C	<i>feoA2</i>	2,19	57°C	RSP_157 4	1,78	56°C
<i>puc2AB</i>	2,05	62°C	<i>rpoE</i>	2,04	56°C	<i>lov</i>	1,88	56°C
RSP_4038	1,95	59°C	RSP_296 5	1,86	59°C	<i>fliC</i>	1,92	59°C

2.4.8 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung wird ein Kapillarsequenziergerät genutzt. In einer *PCR* - Reaktion bindet ein Sequenzierprimer an die zu sequenzierende DNA und die Verlängerung erfolgt durch den Einbau von Deoxynukleotiden. Gleichzeitig befinden sich noch fluoreszenzmarkierte Di - Desoxynukleotide in der *PCR* - Reaktion, welche zu einem Abbruch der Reaktion führen können.

Die vier verschiedenen Arten (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) weisen dabei jeweils eine unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung auf. Sie besitzen keine 3' - OH - Gruppe, daher führt ihr Einbau zu einem Kettenabbruch. Während der Kapillarelektrophorese kann das nun endständige Nukleotid durch einen *laser* detektiert werden. Die Sequenzfolge der DNA wird anschließend aus der Abfolge der Fluoreszenzsignale, die den *laser* passieren, ermittelt. Die Sequenzierungen wurden am Institut von Susanne Barth - Weber und Sabine Mutz durchgeführt.

2.4.9 Northern - Analyse von RNA (*Northern blot*)

Durch den *Northern blot* können gezielt bestimmte RNAs, die zuvor auf eine Nylonmembran fixiert wurden, durch radioaktive Markierung sichtbar gemacht werden.

Die Auftrennung der Ribonukleinsäuren erfolgt über ein denaturierendes Formaldehyd / Agarose - Gel, welches durch eine Durchflussspumpe konstant mit Elektrodenpuffer umspült wird. Dazu werden zuerst die Gelkammer und die Schläuche der Pumpe gründlich mit 1 N NaOH und anschließend mit DEPC - H₂O durchgespült, um eventuell vorhandene RNasen zu inaktivieren. Das Gel wird in die RNase - freie Gelkammer überführt und mit Elektrodenpuffer überschichtet. Währenddessen wird die am Vortag eingedampfte RNA (10 µg pro Probe) in 9 µl Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Vor dem Auftragen auf das Gel fügt man jetzt je 1 µl RNA - Blaumarker zu jeder Probe hinzu und zentrifugiert kurz an. Nachdem die Proben auf das Gel aufgetragen sind, lässt man es für 3 h bei 110 V laufen.

Das Formaldehyd / Agarose - Gel wird nach beendetem Lauf in die Denaturierungslösung 1 überführt und dort für 45 min schüttelnd inkubiert. Anschließend verfährt man mit Neutralisierungslösung 1 ebenso. Während des Waschens bereitet man den *Vakuumblotter* vor, indem man mehrere *Whatman*papiere auf den *Blotter* überführt und mit 10 x SSC befeuchtet. Auf diese kann jetzt die Nylonmembran gelegt und anschließend mit Hilfe der *Blotter* - Maske fixiert werden. Das Gel wird jetzt auf die Membran überführt und für 45 min bei 50 - 65 mbar *geblottet*. Dabei muss das Gel stets mit 10 x SSC überschichtet sein. Nach dem *Blotten* werden die auf die Membran transferierten, Nukleinsäuren mit Hilfe des *UV - Cross - Linker* (*Stratalinker*) fixiert.

Formaldehyd / Agarose - Gel			Elektrodenpuffer		
Agarose	1,43	g	DEPC - H ₂ O	800	ml
MOPS (10x)	14,3	ml	MOPS (10x)	92	ml
DEPC - H ₂ O	104	ml	Neutralisierungslösung 1		
Formaldehyd	26	ml	Tris / HCl	0,1	M
Denaturierungslösung 1			NaCl	0,1	M
NaOH	0,15	M		7,4	pH
NaCl	0,05	M			

2.4.10 Southern - Analyse von DNA (Southern blot)

Mit Hilfe eines *Southern Blots* können bestimmte Abschnitte der chromosomalen DNA durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden spezifisch nachgewiesen werden.

Die verwendete chromosomale DNA (20 µg) ist in ihrer ungeschnittenen Form zu groß, um auf einem Gel aufgetrennt zu werden und wird zunächst über Nacht mit einer Restriktionsendonuclease gespalten. Die geschnittene DNA kann auf einem 1 %igem Agarose - Gel elektrophoretisch aufgetrennt werden (ca. 2,5 h bei 200 V). Das fertige Gel kann anschließend für 10 min mit Ethidiumbromid gefärbt werden. Durch Anlegen eines UV - Lineals kann man die Position der Banden des geladenen Markers mit einem Skalpell festhalten. Das Gel wird anschließend auf den *Vakuumblotter* überführt.

Auf dem *Vakuumblotter* wurden zuvor ein *Whatmanpapier* (größer als das Gel) und die DNA - bindende Nylonmembran (gleiche Größe wie das Gel) gelegt. Beide werden mit ddH₂O befeuchtet und das Gel wird aufgelegt. Das Vakuum wird angelegt und auf 60 mbar eingestellt. Zuerst wird das Gel nun für 15 min mit Depurinierungslösung 2 und anschließend für 45 min mit Denaturierungslösung überschichtet, was zur Bildung einzelsträngiger DNA führt, die auf die Membran transferiert werden kann. Das Gel wird jetzt für 45 min mit der Neutralisierungslösung 2 überschichtet. Nach diesem Zeitraum sollte die negativ geladene DNA vollständig auf die positiv geladene Nylonmembran übertragen sein. Die zuvor mit dem Skalpell markierten Banden des Markers, werden auf die Membran übertragen und das Gel entsorgt. Die DNA wird als letzter Schritt durch UV - Bestrahlung kovalent mit der Membran *verlinkt*.

Depurinierungslösung			Neutralisierungslösung 2		
HCl	0,25	M	Tris / HCl	1,5	M
Denaturierungslösung 2			NaCl	1,5	M
NaOH	0,5	M			
NaCl	1,5	M			

2.4.11 Prähybridisierung / Hybridisierung der radioaktiven Sonden

Um die Bindung unspezifischer RNA an die Membran zu verhindern, wird diese zunächst in der Prähybridisierungslösung für 4 h bei 42°C (*nick - translation*) / 50°C (*end - labeling*) drehend im Hybridisierungsofen inkubiert. Durch die zugesetzte Lachs-Sperma-DNA (LSD) werden alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Nylonmembran vor der Hybridisierung blockiert. Die eigentliche Hybridisierung mit der markierten Sonde (2×10^6 counts per minute für *nick - translation - PCR* - Produkte; 6×10^5 counts per minute für *end - labeling*) erfolgt über Nacht bei 42°C (*nick - translation*) / 50°C (*end - labeling*) drehend im Hybridisierungsofen. Anschließend wird die Membran 2 x 5 min in Membranwaschlösung I und anschließend so oft 5 min mit Membranwaschlösung II gewaschen, bis mit dem Geiger - Müller - Zähler kein Hintergrund mehr an den Rändern der Membran messbar ist. Die gewaschene Membran wird in Folie eingeschweißt und auf einen *Imaging screen* für den *Molecular Imager FX* exponiert.

Prähybridisierungslösung (<i>nick - translation</i>)			Prähybridisierungslösung (<i>end - labeling</i>)		
DEPC - H ₂ O	11,6	ml	DEPC - H ₂ O	11,6	ml
SSPE (20 x)	5,5	ml	SSC (20 x)	6	ml
SDS (10 %)	0,22	ml	SDS (10 %)	1	ml
Denhardt's Reagenz (50 x)	1,65	ml	Denhardt's Reagenz (50 x)	1	ml
Formamid	11	ml	LSD (5 min aufkochen)	0,4	ml
Glycin	0,22	g	Hybridisierungslösung (<i>end - labeling</i>)		
LSD (5 min aufkochen)	1,1	ml	DEPC - H ₂ O	12,6	ml
Hybridisierungslösung (<i>nick - translation</i>)			SSC (20 x)	6	ml
DEPC - H ₂ O	1,8	ml	SDS (10 %)	1	ml
SSPE (20 x)	6,1	ml	LSD (5 min aufkochen)	0,4	ml
SDS (10 %)	0,24	ml	Membranwaschlösung I		
Denhardt's Reagenz (50 x)	0,48	ml	SSC (20 x)	20	ml
Formamid	12,2	ml	SDS (10 %)	2	ml
Dextransulfat	2,4	g	ad DEPC H ₂ O	200	ml
NaPP _i (0,2 M)	0,48	ml	Membranwaschlösung II		
LSD (5 min aufkochen)	0,48	ml	SSC (20 x)	1	ml
			SDS (10 %)	1	ml
			ad DEPC H ₂ O	200	ml

2.4.12 Phosphoimaging

Die Auswertung des *Imaging screens* erfolgt unter dem *Phosphoimager*, dem *Molecular Imager FX*. Dieser kann über das BaFBrEu - Kristallgitter des *Imaging screen* freigesetzte radioaktive Strahlung quantifizieren, da diese die Elektronen des Gitters in einen angeregten Zustand versetzt. Dieser Zustand kann dann wiederum von einem HeNe - Laser (600 nm) des *Phosphoimagers* zur Bildung einer photochemischen Reaktion ausgenutzt werden, welche dann von der *software* in ein auswertbares Bild umgewandelt wird. Vor einer erneuten Exposition wird der *Imaging screen* für 15 min mit Gelblicht gelöscht.

2.4.13 Berechnung der prozentualen Veränderung der Genexpression

Aus den durch *Phosphoimaging* quantifizierten Daten für die Expression des zu untersuchenden Gens kann anschließend die prozentuale Veränderung der Genexpression berechnet werden. Die prozentuale *puc* - Repression in *R. sphaeroides* in Abhängigkeit von der Lichtintensität errechnet sich aus den Ratios der mRNA - *levels* der bestrahlten Kulturen im Verhältnis zu den Dunkelkulturen, nachdem diese auf die *rRNA* - Ladekontrolle normalisiert wurden. Dabei wird nach folgender Formel vorgegangen:

Formel 3 :

2.4.14 Strippen der Membranen

Einmal gebunden, kann die RNA auf der Membran mehrfach mit verschiedenen Sonden hybridisiert werden. Dazu werden die alten Sonden im heißen Wasserbad durch eine detergenzhaltige Lösung entfernt und eine Prähybridisierung / Hybridisierung mit neuen Sonden kann erfolgen. Die Membran wird dazu 2 x 20 min in der *Stripping* - Lösung bei 95°C inkubiert. Anschließend lässt man die Membran trocknen und testet mit dem Geiger-Müller-Zähler die noch vorhandene Radioaktivität. Sollte diese noch deutlich messbar sein, muss erneut für 20 min bei 95°C in der *Stripping* - Lösung inkubiert werden.

Stripping - Lösung		
SDS (10 %)	10	ml
ad DEPC H₂O	1000	ml

2.4.15 DMS - Methylierung von DNA

Die Kulturen werden unter den gewünschten Bedingungen auf dem Schüttler inkubiert. Für die Methylierung versetzt man die Kultur mit 10 µl der 900 mM DMS - Lösung für je 10 ml des Kulturvolumens. Die Inkubation erfolgt weiter unter den gewünschten Bedingungen für 5 min. Durch Zugabe von kaltem DMS - *quench* - Puffer (1/5 des Gesamtvolumens) stoppt man die Reaktion anschließend ab und kann die Zellen ernten. Die Isolierung der DNA erfolgt wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben.

DMS - Lösung (900mM)			DMS - <i>quench</i> - Puffer		
Stammlösung (10,8 M)	41	ml	NH₄Acetat	3	M
ad 96 igen EtOH	500	ml	β - Mercaptoethanol	1	M
			EDTA	0,02	M

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Isolierung von überexprimierten Proteinen

2.5.1.1 Proteinisolierung mittels Ni - NTA - Affinitätschromatographie

Bei diesem Verfahren werden die überexprimierten Proteine mit einem 6 x His - tag versehen und mit Hilfe von Ni - NTA - Agarose aufgereinigt, wobei der 6 x His-tag spezifisch an eine Ni - NTA Matrix bindet. Zugabe eines Überschusses an Imidazol führt zur Verdrängung des 6 x His - tags und zur Elution des 6 x His - tag Proteins, da Imidazol mit den Histidinen um die Ni - NTA Bindestellen konkurriert. (siehe auch: *The QIAexpressionist - a handbook for high - level expression and purification of 6 x His - tagged proteins*, QIAGEN).

Für die Aufreinigung werden Zellpellets der zuvor induzierten und geernteten Kulturen (Abschnitt 2.2.10) in 5 ml Lysepuffer resuspendiert und es wird, wie in Abschnitt 2.2.11 beschrieben, Zellysate hergestellt. Gleichzeitig werden 0,75 g der Ni - NTA - Agarose durch fünfmaliges Waschen mit 4 ml Lysepuffer ebenfalls äquilibriert. Nach dem Entfernen der Zelltrümmer wird der Überstand des Zellpellets mit der äquilibrierten Ni - NTA - Agarose vereint und für 2 h auf dem Taumelrollenmischer bei 4°C inkubiert. Das 6 x His - markierte Protein liegt jetzt an die Agarose gebunden vor. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wäscht man diese jetzt 15 x mit 4 ml Waschpuffer. Die Elution erfolgt 10 x durch Zugabe von 0,5 ml Elutionspuffer - His, wobei der Puffer jeweils 5 min mit der Agarose auf dem Taumelrollenmischer inkubiert. Der Imidazol - Überschuss verdrängt das 6 x His - markierte Protein und das Protein kann aus den Elutionsfraktionen in den storage - Puffer dialysiert werden (Abschnitt 2.5.3). Von den Waschschrritten sowie den Eluatien wird ein Teil auf ein SDS - Polyacrylamid - Gel geladen (Abschnitt 2.3.2.2) und gefärbt (Abschnitt 2.5.8).

Lysepuffer			Waschpuffer		
NaCl	0,3	M	NaCl	0,3	M
NaH ₂ PO ₄	0,05	M	NaH ₂ PO ₄	0,05	M
Imidazol	0,01	M	Imidazol	0,02	M
	8	pH		8	pH
Elutionspuffer - His					
NaCl	0,3	M			
NaH ₂ PO ₄	0,05	M			
Imidazol	0,25	M			
	8	pH			

2.5.1.2 Proteinisolierung mittels Amylose - Affinitätschromatographie

Bei der Aufreinigung eines überexprimierten Proteins über Amylose - Agarose wird das überexprimierte Protein mit einem Maltose - Binde - Bindeprotein (MBP) - tag versehen. Dieses tag erhöht die Löslichkeit des Proteins deutlich und die Aufreinigung kann unter nativen

Bedingungen erfolgen. Das überexprimierte Proteine kann über das MBP - tag an die Amylose gebunden werden und, nach mehrmaligen Waschen, durch die Zugabe von Maltose von der Amylose - Agarose eluiert werden (siehe auch : *pMAL - Protein Fusion and Purification System*, NEB).

Für die Aufreinigung werden Zellpellets der zuvor induzierten und geernteten Kulturen (Abschnitt 2.2.10) in 5 ml 1 x PBS resuspendiert und es wird, wie in Abschnitt 2.2.11 beschrieben, Zelllysate hergestellt. Gleichzeitig werden 0,75 g der Amylose - Agarose durch fünfmaliges Waschen mit 4 ml 1 x PBS ebenfalls äquilibriert. Nach dem Entfernen der Zelltrümmer wird der Überstand des Zellpellets mit der äquilibrierten Amylose - Agarose vereint und für 2 h auf dem Taumelrollenmischer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Agarose 15 x mit 4 ml 1 x PBS gewaschen, um alle, nicht an die Amylose gebundenen, Proteine zu entfernen. Die Elution erfolgt mit 10 x 0,5 ml Elutionspuffer - MBP, welcher steigende Maltose - Konzentrationen (5, 10, 25, 50 und 100 mM) besitzt. Von den Waschschritten sowie den Eluaten wird anschließend ein Teil auf ein SDS - Polyacrylamid - Gel geladen (Abschnitt 2.3.2.2) und durch Färbung sichtbar gemacht (Abschnitt 2.5.8). Der Rest der Eluate kann direkt in den *storage* - Puffer dialysiert werden (Abschnitt 2.5.3).

Elutionspuffer - MBP			<i>storage</i> - Puffer		
PBS (10x)	10	%	PBS (10x)	10	%
Maltose	100 - 5	mM	Glycerin	20	%

2.5.1.3 Proteinisolierung mittels Glutathion - Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung über Glutathion - Sepharose macht sich die starke Bindung der Glutathione S - Transferase (GST) von *Schistosoma japonicum* an Glutathion zu nutze. Dieses tag erhöht die Löslichkeit des Proteins deutlich und die Aufreinigung kann unter nativen Bedingungen erfolgen. Das überexprimierte Proteine kann über den GST - tag an die Glutathione - Sepharose gebunden werden und, nach mehrmaligen Waschen, durch die Zugabe von reduziertem Glutathione von der Sepharose eluiert werden (siehe auch : *GST gene fusion system*, GE Healthcare).

Die Aufreinigung von GST - markiertem Proteinen aus Überexpressionsstämmen erfolgt über Glutathion - Sepharose. Die Sepharose liegt dabei als 75 %ige Suspension in 96 %igem EtOH vor. 1 ml dieser Suspension wird 5 x mit 4 ml kaltem 1 x PBS - GST und anschließend 5 x mit 4 ml kaltem 1 x PBS gewaschen. Das so in PBS äquilibrierte Material kann jetzt für die Aufreinigung genutzt werden. Nach der Induktion und Ernte der Überexpressionskulturen (Abschnitt 2.2.10) resuspendiert man deren Pellet für die GST - Aufreinigung in 5 ml kaltem 1 x PBS - GST und fährt mit der Erstellung des Zelllysates, wie in Abschnitt 2.2.11 beschrieben, fort. Der Überstand wird nach der Zentrifugation mit der äquilibrierten Glutathion-Sepharose vereint und für 2 h auf dem Taumelrollenmischer bei 4°C inkubiert. Das GST - markierte Protein liegt jetzt an die Sepharose gebunden vor. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wäscht man diese jetzt 15 x mit 4 ml 1 x PBS - GST. Die Elution erfolgt 10 x durch Zugabe von 0,5 ml Elutionspuffer - GST und für jeweils 5 min auf dem Taumelrollenmischer. Dabei verdrängt das Glutathion im Puffer das

GST - markierte Protein von der Sepharose. Im Durchfluss befindet sich das GST - markierte Protein und die so aufgereinigten Proteine können jetzt in den *storage* - Puffer dialysiert werden (Abschnitt 2.5.3). Von den Waschsritten, sowie den Eluat, wird ein Teil auf ein SDS - Polyacrylamid - Gel geladen (Abschnitt 2.3.2.2) und durch Färbung sichtbar gemacht (Abschnitt 2.5.8).

Neben der Aufreinigung des GST - markierten Proteins ist es auch möglich, diesen *tag* über einen Thrombinverdau zu entfernen. Dazu inkubiert man 1 ml Gluthation - Sepharose nach der Inkubation mit dem Zelllysats für 16 h mit 80 U Thrombin in 900 µl 1 x PBS. Der Überstand wird am nächsten Tag nach 5 min Zentrifugation bei 500 g (4°C, Rotor SS34) in ein neues Eppendorfggefäß überführt. Jetzt wird 2-3 x mit 1 ml PBSS das geschnittene Protein eluiert. Die Ausbeute ist meist sehr viel niedriger, da das Protein ohne den GST - *tag* deutlich schlechter löslich ist und auch unter den Hochsalzbedingungen oft nicht wieder in Lösung zu bringen ist.

Elutionspuffer - GST			PBSS		
Tris / HCl (pH = 8)	0,05	M	PBS (10x)	10	%
red. Glutathione	0,01	M	NaCl	0,5	M

2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Das Bradford - *assay* stellt eine schnelle Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration eines Zelllysats / eines aufgereinigten Proteins dar. Dabei interagiert der Farbstoff mit Proteinen in Lösung, was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 595 nm führt. Diese Verschiebung kann photometrisch bestimmt und anhand einer zusätzlich gemessenen Standardreihe (0,625; 1,25; 2,5; 5 mg / ml BSA) quantifiziert werden. Für die Reaktion werden 900 µl ddH₂O mit 250 µl des Farbstoffes vermischt und nach Zugabe von 5 µl Protein für 10 min inkubiert. Die Messung der Absorption im Photometer erfolgt bei 595 nm.

2.5.3 Dialyse von Proteinlösungen

In vielen Fällen schadet der verwendete Elutionspuffer der Aktivität des aufgereinigten Proteins. Eine schonende Methode, den Puffer zu wechseln, stellt die Dialyse dar. Dabei wird die Proteinprobe in einen Dialyseschlauch mit geringem Ausschlussvolumen (10 kDa bzw. 25 kDa) überführt. Der abgeklammerte Schlauch wird dann in den neuen Puffer überführt und über Nacht bei 4°C unter Rühren belassen. Am nächsten Morgen wird der Puffer durch frischen erneuert und für 4 h bei 4°C rührend inkubiert. Anschließend können die dialysierten Proteine in ein sauberes Eppi überführt werden. Nach der Dialyse ist ein zweiter Bradford - *Assay* nötig.

2.5.4 Ultrazentrifugation von Proteinlösungen

Für sensible Methoden wie den *Western blot* ist eine große Anzahl an störenden Membranbestandteilen und den darin enthaltenen Membranproteinen im Zelllysats (Abschnitt

2.2.11) oft störend. Daher kann zur Beseitigung der Membranproteine eine Ultrazentrifugation des Zelllysates durchgeführt werden. Es werden 0,45 ml des Zelllysats in ein Ultrazentrifugationsröhrchen gegeben und für eine Stunde bei 58.000 U / min und 4°C in einer Ultrazentrifuge (Beckmann Optima TLX) zentrifugiert. Im Überstand, welcher vorsichtig abgenommen wird, befinden sich die cytoplasmatischen Proteine, während das Pellet die Membranproteine enthält.

2.5.5 Western Analyse von Proteinen (*Western blot*)

Der *Western blot* stellt eine hocheffiziente Methode zum Nachweis von Proteinen dar. Dabei macht man sich die hohe Sensibilität und Spezifität von Antikörpern bei der Bindung von Proteinen zu nutze. Die Proteine werden in einem SDS - Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran *geblottet*. Diese wird zuerst mit einem primären Antikörper behandelt, der spezifisch gegen das gesuchte Protein gerichtet ist. Anschließend wird die Membran mit einem sekundären Antikörper behandelt, der mit einem Protein gekoppelt ist, welches durch eine chemische Reaktion, die genaue Bindestelle des primären Antikörpers sichtbar macht.

Für den *Western blot* wird ein herkömmliches SDS - Polyacrylamid - Gel gefahren (siehe Abschnitt 2.3.2.2). Dieses wird jedoch mit einem *Prestained*-Puffer beladen, welcher eine Größenbestimmung der Proteine auf der Membran ermöglicht. Das Gel wird nach dem Lauf in 200 ml Transferpuffer überführt. 6 *Whatman*papiere der gleichen Größe und eine Nitrocellulosemembran werden ebenfalls in Transferpuffer eingeweicht und auf den *Electroblotter* überführt. Die Reihenfolge ist dabei - von unten nach oben - 3 *Whatman*papiere, die Membran, das Gel und dann die restlichen 3 *Whatman*papiere. Mit einer Pipette streicht man vorsichtig alle Luftblasen aus und überträgt die Proteine anschließend für 55 min bei 0,8 mA cm⁻² des Gels. Nach dem *Blotting* überführt man das Gel zunächst in Ponceau - Rot (Abschnitt 2.5.8.3) um die Proteine zu fixieren. Nach der Ponceau - Färbung inkubiert man die Membran in Milchpulverlösung, um noch ungesättigte Proteinbindestellen auf der Membran zu blockieren, da der Antikörper sonst dort binden würde. Das Blockieren kann über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt werden.

Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgt durch Zugabe einer Konzentration von 1 : 750 im Bezug auf das Volumen des zum Blocken eingesetzten Milchpulvers. Die Inkubation erfolgt für 2,5 h bei Raumtemperatur auf dem Taumelrollenmischer. Anschließend entfernt man ungebundene Antikörper durch 3 x 5 minütiges Waschen mit 1 x TBS. Der zweite Antikörper, welcher Peroxidase - konjugiert ist, wird im Verhältnis 1 : 10.000 zur Milchpulverlösung gegeben. Die Inkubation erfolgt für 2,5 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Es wird wie oben gewaschen und die Membran in eine saubere Schale überführt. Als Substrat für die Reaktion dient ein frisches 1 : 1 - Gemisch aus der weißen und schwarzen Luminollösung (GE Healthcare). Je 500 µl der beiden Lösungen werden vermischt und die Membran damit 10 x überspült. Anschließend wird die Membran in einen Folienbeutel überführt und in eine Expositionsbox überführt. Alle nachfolgenden Schritte finden in der Dunkelkammer statt. Ein Röntgenfilm wird auf die Größe der Membran zurechtgeschnitten und für 1 min auf dieser exponiert. Anschließend überführt man den Film in die Entwicklerlösung und wartet bis deutliche Banden sichtbar sind. Der Röntgenfilm wird kurz in H₂O gewaschen und für 1 min in der Fixierlösung

fixiert. Sollte die Stärke der Banden nicht den Erwartungen entsprechen oder sollten keine Banden zu sehen sein, kann die Expositionsdauer des Films auf der Membran verändert werden. Der Film wird anschließend erneut mit H₂O gewaschen und getrocknet.

2.5.6 GST - pulldown - assay

Der GST - *pulldown* stellt eine Methode zur Identifizierung von möglichen Interaktionspartnern für Proteine dar. Dabei koppelt man ein GST - markiertes Protein an Gluthation - Sepharose und inkubiert dieses dann mit *R. sphaeroides* - Zelllysate. Mögliche Interaktionspartner sollten jetzt das Protein binden und sich, nach mehrfachem Waschen zur Beseitigung unspezifischer Proteine, identifizieren lassen.

Die Bindung erfolgt wie die Aufreinigung des GST - markierten Proteins (siehe 2.5.1.3) - ohne dass jedoch eluiert wird. Die Sepharose mit dem gebundenen Protein wird mit 5 ml Zelllysate von *R. sphaeroides* (siehe Abschnitt 2.2.12) vereint und für 2,5 h bei 4°C auf dem Taumelrollenmischer inkubiert. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wäscht man diese jetzt 15 x mit 4 ml 1 x PBS - GST. Die Elution erfolgt 5 - 10 mal mit je 0,5 ml des Elutionspuffers - GST. Von den Waschschritten sowie den Eluaten wird ein Teil auf ein SDS - Polyacrylamid - Gel geladen (Abschnitt 2.3.2.2), welches für einen *Western blot* (Abschnitt 2.5.6) verwendet bzw. gefärbt wird (Abschnitt 2.5.8).

2.5.7 MBP - pulldown - assay

Mittels des MBP - *pulldowns* können interagierende Proteine durch Bindung des möglichen Interaktionspartners an ein MBP - markiertes Protein identifiziert werden. Dabei koppelt man ein MBP - markiertes Protein an Amylose - Agarose und inkubiert dieses dann mit *R. sphaeroides* - Zelllysate. Mögliche Interaktionspartner sollten jetzt das MBP - markierte Protein binden und sich, nach mehrfachem Waschen zur Beseitigung unspezifischer Proteine, identifizieren lassen.

Das zu untersuchende Protein wird wie in Abschnitt 2.5.1.2 beschrieben an die Amylose - Agarose gekoppelt. Statt des Elutionspuffers vereint man die Agarose mit 5 ml Zelllysate von *R. sphaeroides* (siehe Abschnitt 2.2.12) und inkubiert für 2,5 h bei Raumtemperatur. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wäscht man diese jetzt 15 x mit 4 ml 1 x PBS. Die Elution erfolgt 5 - 10 mal mit je 0,5 ml des Elutionspuffers - MBP. Von den Waschschritten sowie den Eluaten wird ein Teil auf einem SDS - Polyacrylamid - Gel geladen (Abschnitt 2.3.2.2), welches für einen *Western blot* (Abschnitt 2.5.6) verwendet bzw. gefärbt wird (Abschnitt 2.5.8).

2.5.8 Farbnachweis von Proteinen auf SDS - Polyacrylamid - Gelen

2.5.8.1 Coomassiefärbung von Proteinen

Die Coomassie - Blau - Färbung stellt eine schnelle aber unsensitive Methode zur Sichtbarmachung von Proteinen dar. Das Gel wird dabei 45 min in Coomassie-Blau-Lösung auf dem Schüttler gefärbt, mit entmineralisiertem Wasser abgespült und entfärbt. Zum Entfärben wird das Gel einige Male (3 - 5x) für je 10 min in der Entfärbelösung geschüttelt, bis der Hintergrund klar und frei von blauer Farbe ist. Das fertige Gel wird daraufhin in einer Folientüte eingeschweißt und kann aufbewahrt werden. Nach jedem Gebrauch sollte die Coomassie - Blau - Lösung durch einen Papierfilter filtriert werden, um Verunreinigungen der zu färbenden Gele vorzubeugen.

Coomassie - Blau - Lösung (R - 250)			Entfärbelösung I		
Coomassie - Blue R - 250	0,1	%	Essigsäure	10	%
Essigsäure	10	%	Methanol	50	%
Methanol	50	%			

2.5.8.2 Ponceaufärbung von Proteinen

Diese reversible Färbemethode dient gleichzeitig der Fixierung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen und wird daher vor jedem *Western blot* (Abschnitt 2.5.5) angewendet, um die Proteine zu fixieren. Ponceau S bindet dabei an positiv geladene Aminogruppen der Proteine. Die Membran wird bis zur Sichtbarkeit der Proteine mit 0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure inkubiert und anschließend mit Wasser und 0,1 M NaOH entfärbt.

2.5.8.3 Silberfärbung von Proteinen

Die Silberfärbung stellt eine sensible Methode dar, um Proteine in Polyacrylamid - Gelen anzufärben. Dabei macht man sich zu Nutze, dass Ag^+ von basischen und schwefelhaltigen Aminosäureresten zu Ag^0 reduziert wird. Diese Reaktion führt zur Entstehung von bräunlichen Banden auf dem Gel. Die Proteine werden zunächst mittels herkömmlicher SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese (siehe 2.3.2.2) aufgetrennt und für mind. 1 h in Fixierlösung geschüttelt. Anschließend wäscht man das Gel 3 x 20 min in 50 % Ethanol und schüttelt das Gel daraufhin 1 min in Lösung I. Das Gel wird 3 x 30 sec in H_2O gereinigt und 20 min mit Lösung II geschüttelt. Es wird wie oben mit H_2O gewaschen und mit Lösung III die Visualisierung der Banden eingeleitet. Die Banden werden plötzlich sichtbar, weshalb konzentrierte Essigsäure zum Abstoppen bereitstehen sollte. Liegen die Banden in der richtigen Stärke vor, gibt man einige ml von dieser hinzu, wäscht das Gel in 5 % Essigsäure und schweißt es in einer Folientüte ein.

Fixierlösung			Lösung II		
Methanol	50	%	AgNO ₃	0,4	g
Essigsäure	12	%	Formaldehyd	185	µl
Formaldehyd	500	µl	ad ddH ₂ O	0,25	l
ad ddH ₂ O	1	l	Lösung III		
Lösung I			NaCO ₃	15	g
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	0,1	g	Formaldehyd	185	µl
ad ddH ₂ O	0,5	l	Lösung I	5	ml
			ad ddH ₂ O	0,25	l

2.5.9 Gel - Retardations - assays

Das Prinzip von Gel - Retardations - assays beruht auf der Tatsache, dass DNA in nativen Elektrophoresegeleln schneller wandert als Protein - DNA - Komplexe. Die Bande der DNA ist nach Zugabe von Protein in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit verlangsamt und läuft daher retardiert in das Gel ein. Man spricht deshalb auch von einem „shift“.

Für die assays wird ein *upstream* - Fragment der *puc* - RNA verwendet, welches zuvor durch *end* - labeling (Abschnitt 2.4.6.2) mit ³²P markiert wurde. Dabei werden pro Reaktion zwischen 30 und 100 fmol (700 - 2500 cpm) der DNA eingesetzt und für 30 min bei 4°C mit den Versuchsproteinen bzw. der sRNA im Bindepuffer inkubiert. Anschließend werden pro Probe 0,2 µl DNA - Blaumarker zugesetzt und die Proben auf einem nativen Polyacrylamid - Gel aufgetrennt. Zudem wird ein spezieller Laufpuffer für das Gel verwendet. Der Gellauf erfolgt bei 100 V für 30 min, danach wird die Spannung auf 200 V erhöht und die Elektrophorese für weitere 2 h fortgesetzt. Das Gel wird auf ein zugeschnittenes *Whatman*papier übertragen und für 90 min bei 80°C getrocknet. Zur Detektion der Banden wird über Nacht ein *Imaging screen* aufgelegt.

Bindepuffer (10 x)			Reaktionsansatz		
Tris / HCl (pH = 7,5)	0,2	M	Bindepuffer (10 x)	10	%
MgCl ₂	0,05	M	LSD (50 µg µ ⁻¹)	1	µl
EDTA	0,001	M	<i>pucUp</i> - DNA	300	fmol
Glycerin	50	%	Protein - Lösung	variabel	
Laufpuffer (5 x) (Masuda und Bauer, 2002)			sRNA - Lösung	variabel	
Tris / HCl	0,25	M	ad ddH ₂ O	20	µl
Glycin	1,9	M			
EDTA	0,01	M			

2.5.10 Trichloressigsäurefällung von Proteinen

In einigen Fällen kann es vorkommen, dass die Konzentration eines Proteins zu niedrig ist, um es auf einem gefärbten Gel oder im *Western blot* nachzuweisen. Um eine größere Menge des Proteins in einem kleineren Volumen zu lösen, kann eine Trichloressigsäurefällung durchgeführt werden.

Dazu wird die Proteinlösung mit dem gleichen Volumen an 10 %iger Trichloressigsäure vereint und für 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wird für 15 min bei 13.000 U / min (Biofuge *pico*) zentrifugiert und das Pellet noch zweimal mit 1 ml Trichloressigsäure gewaschen. Der letzte Waschschritt erfolgt mit eiskaltem Aceton und die Probe wird noch einmal für 10 min bei 13.000 U / min (Biofuge *pico*) zentrifugiert. Das Pellet kann anschließend für 5 min in der *Speed Vac* getrocknet und in einem kleinerem Volumen resuspendiert werden.

2.6 Transkriptomanalysen von *R. sphaeroides*

Transkriptom - *chips* erlauben eine globale Analyse der mRNAs eines Organismus. Auf einem *microarray* (oder *chip*) befinden sich mehrere tausend bekannte Sonden gegen die einzelnen Transkripte eines bestimmten Organismus. Um die Genom - umfassende Analyse der Genexpression unter bestimmten Bedingungen (z.B. vor und nach Bestrahlung mit Blaulicht oder Mutante zu Wildtyp) zu untersuchen, muss zunächst die Gesamt - RNA isoliert werden. Dies geschieht mittels heißer Phenolaufreinigung (Abschnitt 2.4.1.5). Die RNA wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und auf den *chip* hybridisiert.

Der Fluoreszenzfarbstoff kann anschließend mittels eines *lasers* angeregt werden und das emittierte Signal gibt Aufschluss über die Expression der jeweiligen RNA.

Für *R. sphaeroides* ist kein kommerziell erwerblicher *microarray* verfügbar, weshalb ein neuer *chip* erst erstellt werden musste. Die einzelnen Schritte werden im Folgenden beschrieben.

2.6.1 Erstellung des *R. sphaeroides microarrays*

Die vollständige Genomsequenz von *R. sphaeroides* ist seit einigen Jahren durch das *Joint Genome Institute* (Walnut Creek, USA) und die *The University of Texas - Houston* (Houston, USA) verfügbar (Choudhary *et al.*, 1999; Mackenzie *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2003). Die - auf zwei Chromosomen und fünf Plasmide verteilte - Sequenz umfasst 4,6 Mb, von denen etwa 88,5 % bisher als kodierend identifiziert werden konnten. Die mRNA - Sequenzen der 4372 kodierenden Gene können dabei über die Homepage des *Joint Genome Institutes* ([Quelle: Integrated Microbial Genomes, NCBI Project ID : 56](#)) heruntergeladen werden und im FASTA - Format direkt als Gegenstrang für die Erstellung der DNA - *microarray* - Sonden verwendet werden. Die Sequenzen der Gene und der erstellten Sonden sind auf dem Datenträger im Anhang Abschnitt 8.1 zu finden.

Die Rahmen einer Kooperation mit dem Max - Planck - Institut für Infektionsbiologie in Berlin (AG Vogel) wurde 2007 von *R. sphaeroides* - Kulturen vor und nach der Behandlung mit den oxidativen Stress erzeugenden Agenzien Methylenblau ($^1\text{O}_2$) und Paraquat (O_2^-), die RNA isoliert. Diese wurden mittels *454 pyrosequencing* sequenziert (Berghoff *et al.*, 2009) und aus den erhaltenen Sequenzen konnten, neben Hinweisen auf die Transkriptionsstarts vieler Gene, auch eine große Anzahl abundanter kleiner regulatorischer RNAs identifiziert werden (insgesamt 122). Deren Sequenzen werden gegen die Genomsequenz von *R. sphaeroides* abgeglichen und im FASTA - Format ebenfalls für die Erstellung der DNA - *microarray* - Sonden verwendet. Ein von Bork Berghoff durchgeführter *pulldown* mit dem Hfq - Protein von *R. sphaeroides* gegen Zelllysate (unveröffentlicht) führte zur Identifikation von 22 weiteren sRNAs. Diese coeluierten mit dem Hfq - Protein nachdem sie durch das RNA - Chaperon gebunden wurden. Die eluierten RNAs wurden dann mittels *454 pyrosequencing* sequenziert, die erhaltenen Sequenzen gegen die Genomsequenz von *R. sphaeroides* abgeglichen und können im FASTA - Format weiterverwendet werden. Die Sequenzen der sRNAs und der erstellten Sonden sind auf dem Datenträger im Anhang Abschnitt 8.1 zu finden.

Die erhaltenen FASTA - Sequenzen können jetzt in die *eArray - software* der Firma *Agilent* (<https://earray.chem.Agilent.com/earray/>) hochgeladen werden. Hier werden mittels des „*GE Probe Design*“ - Reiters die genauen Spezifikationen der Sonden festgelegt. Es werden jeweils drei 60 bp lange *antisense* - Sonden pro Gen erstellt. Sollten die hochgeladenen FASTA - Sequenzen dabei kürzer als 60 bp sein (bei drei sRNAs), werden die Sequenzen zu gleichen Teilen nach 3' und 5' mit angrenzenden genomischen Sequenzen erweitert. Die Sonden sind in *antisense* - Orientierung, da später, ohne Erstellung eines cDNA - Zwischenschritts, direkt die isolierte RNA markiert wird. Als weitere Einstellung wird *Best Distribution Methodology* gewählt. Die *software* wählt die Sonden in diesem Fall so, falls dies möglich ist, dass ihre Bindestellen auf dem Gen sich nicht überlappen. Weitere Einstellungen werden nicht gewählt. Die so erstellten Sonden werden in einer *probe group* zusammengefasst und mit Hilfe des „*Create Microarray*“ - Reiters aus den neuen Gruppen ein *microarray* erstellt.

Bei der Erstellung des *microarrays* wird zunächst der Organismus als „*not available (na)*“ angegeben, da von *R. sphaeroides* keine kommerziell erwerblichen Sondensequenzen vorliegen. Das Format des Transkriptom - *chips* wird auf „8 x 15 k“ gesetzt. Das bedeutet, dass sich auf dem Glasobjektträger (*slide*) insgesamt 8 Einzel*chips* mit je 15.744 Sonden befinden. Es wird zudem ein 3' - *linker* an die Sonden angefügt, um sie von der Oberfläche des *slides* abzuheben. Dieser *linker* ist immer 60 bp lang und es wird die Sequenz des *Agilent - linkers* verwendet (TAT CCT ACT ATA CGT ATC ACA TAG CGT TCC GTA ATG TGG CCG GGA TAG ACC TAG CTT AAG). Anschließend können die einzelnen *probe groups* dem *microarray* hinzugefügt werden. Die *Agilent* - Kontrollen (insgesamt 536) werden ebenfalls auf dem *chip* belassen und, da die Gene von *R. sphaeroides* den *microarray* nur zu 90 % füllen, der leere Anteil mit zufälligen Sonden gefüllt („*Fill Microarray*“). Das so erstellte „*Microarray Design*“ kann noch einmal überprüft und an *Agilent* weitergeleitet werden. Die eigentliche Herstellung nimmt dann 3 - 4 Wochen in Anspruch.

2.6.2 Durchführung der Experimente für die Transkriptomanalysen

Für alle getesteten Bedingungen werden insgesamt sechs biologische Replika durchgeführt. Dazu werden jeweils sechs Einzelkolonien von Platte, die frisch aus der Stammsammlung ausgestrichen wurden, verwendet.

2.6.2.1 Mikroaerobes Wachstum

Für den Vergleich der *R. sphaeroides* Δ lov - Mutante mit dem Wildtyp unter mikroaeroben Bedingungen, werden die aus Einzelkolonien angeimpften Vorkulturen zunächst in einen 50 ml Erlenmeyerkolben auf eine OD₆₆₀ von 0,4 in 40 ml Gesamtvolumen mit RÄ verdünnt. Anschließend werden die Zellen für eine Verdopplung (bis zu einer OD₆₆₀ von 0,8) bei 32°C und 140 U / min auf dem Schüttler inkubiert. Nach dem Erreichen der OD zentrifugiert man die Zellen ab und isoliert die RNA (Abschnitt 2.4.1.5).

2.6.2.2 Blaulichtbestrahlung

Für den Vergleich der *R. sphaeroides* Δ lov - Mutante mit dem Wildtyp unter Blaulichtbestrahlung, werden die aus Einzelkolonien angeimpften Vorkulturen zunächst in einen 500 ml Schikanekolben auf eine OD₆₆₀ von 0,2 in 200 ml Gesamtvolumen mit RÄ verdünnt. Die weitere Behandlung erfolgte wie in Abschnitt 2.2.3.2 und 2.2.3.6 beschrieben. Die Bestrahlung mit Blaulicht erfolgte für 60 min. Nach dem Erreichen der OD zentrifugiert man die Zellen ab und isoliert die RNA (Abschnitt 2.4.1.5).

2.6.2.3 Photooxidativer Stress

Für den Vergleich der *R. sphaeroides* Δ lov - Mutante mit dem Wildtyp unter photooxidativen Stress, werden die aus Einzelkolonien angeimpften Vorkulturen wie in Abschnitt 2.2.3.1 und 2.2.3.6 beschrieben inkubiert. Die Kulturen werden für 7 min belichtet.

2.6.3 Prozessieren der RNA für die Transkriptomanalysen

An 30 µg der RNA, die durch heiße Phenolextraktion erhalten wurde, wird zunächst eine DNase I Spaltung durchgeführt. Dabei wird die hochkonzentrierte DNase I der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet. Die Spaltung erfolgt über 60 min bei Raumtemperatur. Anschließend wird die RNA einer Test - PCR ohne RT - Schritt gegen das *housekeeping* - Gen *rpoZ* unterzogen. Die Proben werden, zusammen mit einer Positiv - (PCR mit chromosomaler DNA) und Negativkontrolle (PCR mit ddH₂O) auf ein Polyacrylamid - Gel geladen. Da die DNA in den RNA - Proben verdaut sein sollte, darf nur in der Positivkontrolle eine Bande sichtbar sein. Die Aufreinigung der RNA von dem DNase I - Enzym erfolgt unter Verwendung des RNeasy *MinElute Cleanup Kit*, wobei das Protokoll nach Herstellerangaben verändert wird, um RNAs mit einer

Größe von weniger als 100 bp aufzureinigen. Dazu wird der gesamte Ansatz, der für den DNase I - Verdau verwendet wurde, zunächst auf 100 µl mit RNase - freiem dd₂O aufgefüllt und anschließend gründlich in 350 µl Puffer RLT (im RNeasy *MinElute Cleanup Kit* enthalten) resuspendiert. Statt die Proben nun - wie im Protokoll vermerkt - mit dem 0,7 fachen Volumen 96 %igen EtOH (315 µl) aufzufüllen, wird das 1,5 fache (675 µl) verwendet. Durch die veränderte Konzentration binden auch die kleinen RNAs an die Silikamatrix. Der weitere Verlauf des Protokolls entspricht den Herstellerangaben. Nach der Aufreinigung wird die RNA - Konzentration gemessen.

Eine letzte Qualitätskontrolle der aufgereinigten RNA erfolgt durch ein Polyacrylamid / Harnstoff - Gel (2.3.2.3). Hier wird je 1 µg der aufgereinigten RNA aufgetragen und auf Degradationen untersucht. Die RNA kann jetzt für den *microarray* verwendet werden.

2.6.4 *Cy3 / Cy5* - Markierung der RNA

Für die *microarrays* wird die isolierte RNA direkt mit den fluoreszierenden Farbstoffen *Cy3* und *Cy5* markiert. Beide gehören zur Gruppe der Cyanine und geben bereits bei schwachen Anregungsenergien eine starke Emission ab. *Cy3* ist dabei rot und absorbiert Licht einer Wellenlänge von 550 nm, während die Emission bei 570 nm erfolgt und so als grünes Signal auf dem *microarray* erscheint. *Cy5* ist ein orangefarbener Farbstoff und absorbiert Licht einer Wellenlänge von 650 nm. Die Emission erfolgt bei 670 nm, was zu roten Signalen auf dem *microarray* führt. Das direkte Markieren (oder *labeln*) der RNA wird mit dem ULS™ *Labeling Kits for Agilent arrays* der Firma Kreatech durchgeführt. Der Farbstoff ist über einen *linker* mit einem Platin - Ion verbunden. Dieses bindet die N₇ - Position von Guanin - Basen der RNA und *labelt* die RNA ohne einen enzymatischen Schritt. Für die *label* - Reaktion werden von je drei Experimenten einer Bedingung (z.B. Wildtyp 2.4.1 Blaulichtbestrahlung 1 - 3) 2 µg RNA in einem frischen Eppendorfgefäß vereint, so dass aus den sechs RNAs des Wildtyps und der Δlov - Mutante jeweils zwei Ansätze werden. Aus dem vereinten Ansatz werden anschließend 2 µg entnommen und für die *label* - Reaktion verwendet. Diese findet für 15 min bei 85°C statt. Das *labeln* der Kontroll - RNA des Wildtyps geschieht dabei mit *Cy5*, während die RNA der Δlov - Mutante mit *Cy3* markiert wird. Die anschließende Aufreinigung der RNA von nichtgebundenen Fluoreszenzfarbstoff erfolgt nach Herstellerangaben.

<i>label</i> - Reaktion		
RNA	2	µg
<i>Cy3 / Cy5</i>	2	µl
<i>Labeling buffer (10 x)</i>	2	µl
ad ddH ₂ O	20	µl

2.6.5 Bestimmung der *label* - Effizienz der RNA

Der Grad an in die RNA inkorporierten Cy3 / Cy5 lässt sich photometrisch bestimmen. Zuerst wird nach dem *labeln* die Konzentration der RNA ($\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$) und des Farbstoffes ($\text{pmol } \mu\text{l}^{-1}$) am *Nanodrop* bestimmt. Anschließend wird die *label* - Effizienz nach folgender Formel berechnet:

Formel 4 : *label* - Effizienz =

Die Effizienz sollte für RNA dabei zwischen 1 und 3,6 % liegen.

2.6.6 Hybridisieren und Waschen des *microarrays*

Vor der Hybridisierung mit dem *Gene Expression Hybridization Kit* (siehe auch : *Two - Color Microarray - Based Gene Expression Analysis, Agilent*) wird der *gelabelte* RNA - Ansatz der Kontrolle (Wildtyp 2.4.1, Cy5) jetzt mit dem *gelabelten* RNA - Ansatz der Mutante (Δlov , Cy3) vereint. Da von beiden Stämmen je zwei *pools* vereinter Experimente (Abschnitt 2.6.4) existieren, erhält man so zwei Replika mit dem Wildtyp und der Mutante. Dabei werden je 500 ng (entspricht 5 μl) der gelabelten RNA für die Hybridisierung eingesetzt. Den ersten Schritt stellt dabei die Fragmentierung der RNA dar, damit Sekundärstrukturen gelöst werden und die kurzen Sonden auf dem Objektträger besser gebunden werden. Die Fragmentierung erfolgt für 30 min bei 65°C und sollte unter keinen Umständen länger durchgeführt werden.

Fragmentierung		
Cy3 - RNA	5	μl
Cy4 - RNA	5	μl
<i>Blocking - Agent (10 x)</i>	5	μl
<i>Fragmentation - Buffer (25 x)</i>	1	μl
ddH ₂ O	9	μl

Zu den 25 μl des Fragmentierungs - Ansatzes gibt man jetzt 25 μl des *Hybridization - Buffers*. Der gesamte Ansatz wird vorsichtig, luftblasenfrei resuspendiert und 40 μl des Ansatzes auf den *casket - slide* überführt. Dieser *slide* besitzt acht durch kleine Kunststoffwälle abgetrennte Kompartimente, die der späteren Position der *microarrays* auf dem Glasobjektträger entsprechen. Es ist zu beachten, dass die 40 μl unter keinen Umständen den Kunststoffwall berühren dürfen. Anschließend kann der Glasobjektträger mit der aktiven Seite nach unten (trägt die *Agilent* - Beschriftung) auf das *casket - slide* gelegt werden. Dies sollte so vorsichtig wie möglich passieren, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden. Der Glasobjektträger mit den

microarrays und das *casket - slide* werden jetzt gemeinsam in den Hybridisierungsschlitten eingespannt und bei 65°C für 17 h im Hybridisierungssofen inkubiert.

Nach der Inkubation wäscht man den *microarray* mit den Lösungen aus dem *Gene Expression Wash Buffer Kit*. Dazu wird zuerst die Waschlösung II auf 37°C vorgewärmt. In einem Gefäß werden 400 ml der Waschlösung I mit einem Magnetrührer vorbereitet. Der Hybridisierungsschlitten wird mit dem Glasobjektträger und dem *casket - slide* in die Lösung überführt und dort auseinander gebaut. Jetzt schaltet man den Magnetrührer an und wäscht den Glasobjektträger mit den *microarrays* für 1 min. Währenddessen überführt man die bereits erwärmte Waschlösung II in ein weiteres Gefäß mit Magnetrührer. Der Glasobjektträger mit den *microarrays* wird nach Ablauf der Zeit möglichst schnell in das zweite Gefäß überführt und dort ebenfalls für 1 min gewaschen. Das Herausnehmen aus der Waschlösung sollte anschließend langsam und über eine der vier Kanten erfolgen, damit keine Flüssigkeit auf dem Objektträger verbleibt. Die gewaschenen *microarrays* können jetzt *eingescannt* werden.

2.6.7 Auswertung der Fluoreszenzsignale auf den *microarrays*

Die gewaschenen *microarrays* sollten nach dem Verlassen des zweiten Puffers nur kurze Zeit Sauerstoff und Licht ausgesetzt sein, da beide die Signale der Fluoreszenzfarbstoffe abschwächen. Das *Einscannen* erfolgte anschließend durch zwei unterschiedliche *scanner*: Der *Genepix 3100* wurde für die beiden *microarrays* unter semiaeroben Bedingungen verwendet, während für die - jeweils zwei - *microarrays* unter Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress der *Agilent DNA microarray scanner* genutzt wurde. Die *Scanauflösung* für den *Genepix 3100* betrug 5 µm, während der *Agilent DNA microarray scanner* mit einer Auflösung von 3 µm arbeitete. Die erhaltenen TIF - Dateien können jetzt mit der *Agilent Feature Extraction Software* ausgewertet werden, welche aus den Bilddateien die Fluoreszenzwerte der einzelnen Sonden in Zahlenwerte umrechnet und als Tabstopp - getrennte Txt - Datei ausgibt. Mit dieser Datei können anschließend die in Abschnitt 3.6 beschriebenen, weiteren Auswertungen der Daten durchgeführt werden.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der Blaulichtsensitivität des AppA / PpsR und des PrrB / PrrA - Systems in *Rhodobacter sphaeroides*

Die Bildung des Photosyntheseapparates in *R. sphaeroides* erfolgt licht- und redoxabhängig. Die Lichtwahrnehmung erfolgt dabei zum einen direkt über die FAD - bindende BLUF - Domäne des AppA - Proteins (Braatsch *et al.*, 2002; Masuda und Bauer, 2002) und zum anderen indirekt über die Absorption von Lichtenergie an den Photosynthesekomplexen, welche den Elektronenfluss durch die Atmungskette hemmen und so Einfluss auf das PrrB / PrrA - Zweikomponenten - System nehmen (Oh *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2004; Happ *et al.*, 2005). Wurde zunächst eine alleinige Rolle von AppA / PpsR in der Lichtregulation der Photosynthesegene unter semiaeroben Bedingungen vermutet (Braatsch *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2004), konnten neuere Studien zeigen, dass das Ausbleiben der Blaulichtrepression von AppA unter diesen Bedingungen nicht ausreicht, um die Synthese der Photosynthesegene zu gewährleisten (Jager *et al.*, 2007). Gleichzeitig konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass auch unter anaeroben Bedingungen, unter welchen die Genexpression der Photosynthesegene von PrrB / PrrA abhängt, die AppA / PpsR - Regulation wiederhergestellt werden kann, wenn die Sensorik PrrB deletiert ist (Happ *et al.*, 2005). Um die physiologische Bedeutung dieser dualen Regulation der Photosynthesegene durch die beiden Proteinsysteme genauer zu untersuchen, wurde die für die Genregulation benötigte Lichtmenge unter verschiedenen Bedingungen ermittelt.

3.1.1 Blaulichtsensitivität der Photosynthesegenexpression in *R. sphaeroides* 2.4.1

Das AppA / PpsR - System spielt unter semiaeroben Bedingungen und gleichzeitiger Bestrahlung mit Blaulicht eine bedeutende Rolle in der Repression der Photosynthesegene, da das gleichzeitige Vorhandensein von Sauerstoff, Licht und photosynthetischen Pigmenten zur Entstehung von oxidativem Stress führen kann. Daher ist unter diesen Bedingungen eine hohe Sensitivität des Proteins für Licht wichtig, um eine dauerhafte Schädigung der Zellen zu umgehen. Dabei bindet der Repressor PpsR an die DNA und verhindert die Expression der Photosynthesegene so lange Sauerstoff vorhanden ist. Fällt der Sauerstoffpartialdruck, bindet der Antirepressor AppA das PpsR - Protein und hebt so die Repression auf. Die Bindung von AppA an PpsR kann unter semiaeroben Bedingungen jedoch durch die Bestrahlung mit Blaulicht unterbunden und so die Expression der Photosynthesegene wieder aufgehoben werden. Im Folgenden wurde daher die minimale Blaulichtintensität ermittelt, bei der die Repression der Photosynthesegene *in vivo* noch nachweisbar ist.

Für die Titration der Blaulichtsensitivität des AppA - Proteins wurden die Kolben daher auf einem Schüttler auf semiaerobe Bedingungen (3,2 mg - 4 mg / l O₂) eingestellt und mit abnehmenden Intensitäten von Blaulicht durch einen Schmalbandfilter bestrahlt (Transmissionsspektrum des Filters, siehe Anhang Abbildung 73). Die Probenentnahme erfolgte

vor dem Start der Bestrahlung und nach einer Stunde bei der gewählten Intensität. Die geernteten Zellen wurden anschließend pelletiert, die Gesamt-RNA isoliert und die Expression des *puc*-Operons, welches die Strukturproteine des LHC II kodiert und eine putative (Mao *et al.*, 2005) PpsR- und eine PrrA-Bindestellen *upstream* des Startcodons besitzt (siehe Anhang Abbildung 72), per *Northern blot* bestimmt.

Die in Abbildung 17 bestimmte *puc*-Expression zeigte im *Northern blot* nach 60 min Blaulichtbestrahlung eine sehr deutliche Abnahme mit nahezu allen Intensitäten (A). Bestrahlung mit 20, 10, 5, 2,5 und 0,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ führte zu einer deutlichen Inhibition der *puc* Signale auf der Membran. Erst bei einer Blaulichtintensität von 0,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ war das Signal wieder deutlich sichtbar und erreichte bei 0,1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nahezu das Niveau der Dunkelkontrolle.

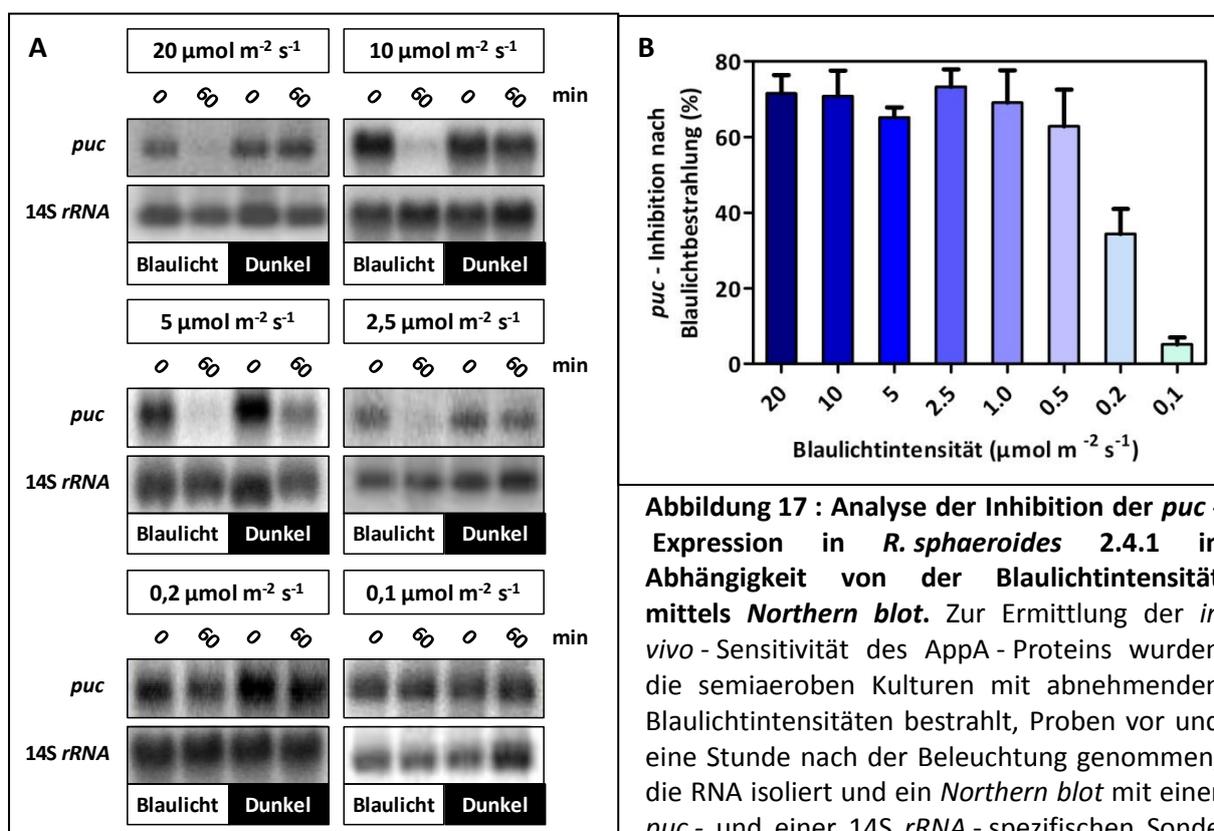


Abbildung 17 : Analyse der Inhibition der *puc*-Expression in *R. sphaeroides* 2.4.1 in Abhängigkeit von der Blaulichtintensität mittels *Northern blot*. Zur Ermittlung der *in vivo*-Sensitivität des AppA-Proteins wurden die semiaeroben Kulturen mit abnehmenden Blaulichtintensitäten bestrahlt, Proben vor und eine Stunde nach der Beleuchtung genommen, die RNA isoliert und ein *Northern blot* mit einer *puc*- und einer 14S *rRNA*-spezifischen Sonde durchgeführt (A). Die *phosphoimaging* Signale wurden anschließend quantifiziert. Die prozentuale *puc*-Repression in *R. sphaeroides* in Abhängigkeit von der Lichtintensität (B) errechnet sich aus den Ratios der mRNA-levels der bestrahlten Kulturen im Verhältnis zu den Dunkelkulturen, nachdem diese auf die *rRNA*-Ladekontrolle normalisiert wurden. Die prozentuale Inhibition wurde anhand von Formel 3 (siehe Abschnitt 2.4.13) errechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und maximalen Abweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

durchgeführt (A). Die *phosphoimaging* Signale wurden anschließend quantifiziert. Die prozentuale *puc*-Repression in *R. sphaeroides* in Abhängigkeit von der Lichtintensität (B) errechnet sich aus den Ratios der mRNA-levels der bestrahlten Kulturen im Verhältnis zu den Dunkelkulturen, nachdem diese auf die *rRNA*-Ladekontrolle normalisiert wurden. Die prozentuale Inhibition wurde anhand von Formel 3 (siehe Abschnitt 2.4.13) errechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und maximalen Abweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

Um sicherzugehen, dass die sichtbare Abnahme in der Repression der *puc*-Expression bei den gemessenen niedrigen Lichtintensitäten auch für andere Photosynthesegene zutrifft, wurde zudem die Expression von *bchL* (RSP_0288), welches eine Protochlorophyllid-Reduktase kodiert, nach Bestrahlung mit verschiedenen Lichtintensitäten mittels *real time RT-PCR* quantifiziert. Um eine Vergleichbarkeit zu den Daten des *puc*-Operons zu gewährleisten, wurde die *real time RT-PCR* auch für *pucB* durchgeführt (Abbildung 18).

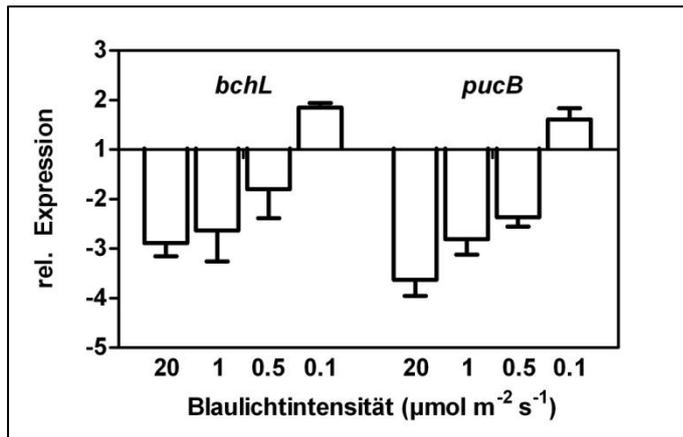


Abbildung 18 : Bestimmung der Expressionslevel von *pucB* (RSP_0314) und *bchL* (RSP_0288) in semiaeroben *R. sphaeroides* 2.4.1 - Kulturen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Blaulichtintensitäten mittels *real time RT - PCR*. Die Kulturen wurden semiaerob herangezogen und mit Blaulicht (450 nm) der angegebenen Intensität bestrahlt. Die Probenentnahme erfolgte nach 60 min Blaulichtbestrahlung. Mittelwerte mit Standardabweichung von drei Experimenten sind dargestellt.

Es konnte in der *real time RT - PCR* eine vergleichbare Sensitivität gegen Blaulicht wie im *Northern blot* festgestellt werden. Bei einer Blaulichtintensität von 20, 1 und 0,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ konnte erneut eine deutliche Abnahme der Expression nachgewiesen werden, während eine Bestrahlung mit 0,1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sogar einen leichten Anstieg hervorrief. Dabei unterschied sich das Expressionsverhalten von *bchL* und *pucB* nur minimal.

Für die Photosynthesegene von *R. sphaeroides* konnte schon früh gezeigt werden, dass neben der direkten Regulation der Synthese, auch noch eine posttranskriptionale Regulation stattfindet. Durch eine unterschiedlich schnelle Degradation der mRNAs der einzelnen Gene des Operons wird dabei Einfluss auf die finale Menge des Proteins genommen (Klug *et al.*, 1987; Klug und Cohen, 1991). Daher wurde zusätzlich die Menge an synthetisiertem Bacteriochlorophyll in den Zellen gemessen, da diese einen direkten Rückschluss auf die gebildete Menge an photosynthetischen Komplexen gewährleistet. Dabei wurden die Zellen über einen Zeitraum von 8 Stunden mit Blaulicht bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten der relative Bacteriochlorophyllanteil in den Zellen gemessen.

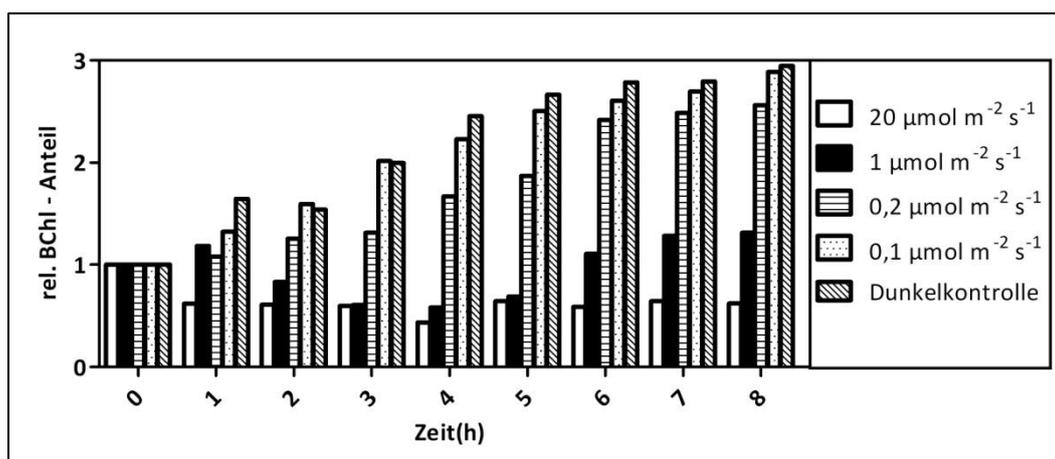


Abbildung 19 : Relativer Bacteriochlorophyllanteil von semiaerob herangezogenen *R. sphaeroides* 2.4.1 - Kulturen nach Bestrahlung mit verschiedenen Blaulichtintensitäten. Die Kulturen wurden zunächst für 2,5 h auf semiaerobe Bedingungen eingestellt und anschließend, während der gesamten Versuchsdauer, mit der jeweiligen Blaulichtintensität bestrahlt. Gezeigt ist jeweils ein Datensatz von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen. Die Einzelmesswerte wurden gegen die Dunkelkontrolle normalisiert und der t_0 Wert gleich 1 gesetzt.

Betrachtete man bei den Bacteriochlorophyllmessungen zuerst die Dunkelkontrolle unter semiaeroben Bedingungen, zeigte sich ein deutlicher Anstieg über die 8 Stunden, auf das dreifache des Ausgangswertes. Ein solcher Anstieg konnte ebenfalls für eine Bestrahlung mit $0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ beobachtet werden; bei dieser Intensität war nur ein minimaler Unterschied zur Dunkelkontrolle sichtbar. Die Bestrahlung mit $0,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erreichte zwar zum Versuchsende ebenfalls fast das Niveau der Dunkelkontrolle, verblieb aber bei den Zeitpunkten 1 - 5 h deutlich unter dieser. Eine deutliche Inhibition der Bacteriochlorophyllsynthese war nach der Bestrahlung mit 1 und $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sichtbar. Hier fielen die gemessenen Werte zunächst auf ca. ein Sechstel der Werte der Dunkelkontrolle ab und verblieben bis zum Zeitpunkt 5 h auf diesem Niveau. Bei den mit $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestrahlten Kulturen kam es danach wieder zu einem leichten Anstieg des Bacteriochlorophyllanteils.

Unter anaeroben Bedingungen hat das AppA/PpsR - System im Wildtyp 2.4.1 keinen direkten Einfluss mehr auf die Expression der Photosynthesegene. Hohe Blaulichtintensitäten führen nicht mehr zur Dissoziation des Antirepressors AppA von PpsR. Unter diesen Bedingungen tritt die Regulation durch das vom Elektronenfluss der Atmungskette abhängige Zwei-Komponentensystem PrrB / PrrA in den Vordergrund. Unter anaeroben Bedingungen reprimiert die aerobe Atmung nicht mehr die Autophosphorylierung von PrrB (Happ *et al.*, 2005) und es kommt zur Expression der Photosynthesegene (Abbildung 20).

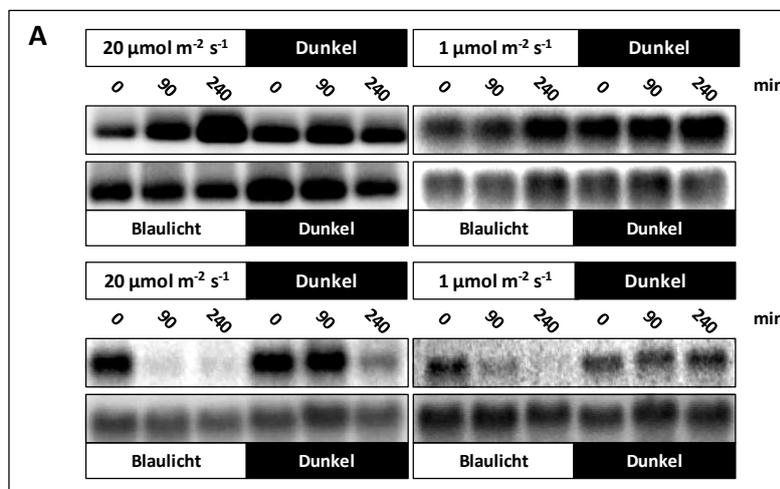
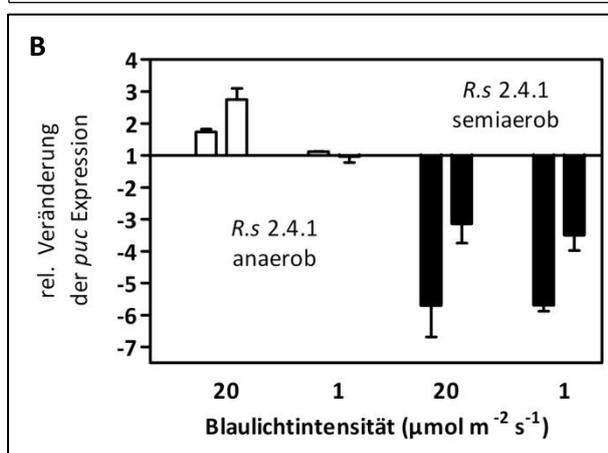


Abbildung 20: Analyse der *puc* - Expression in *R. sphaeroides* 2.4.1 unter semi- und anaeroben Bedingungen in Abhängigkeit von der Blaulichtintensität mittels *Northern blot*. Zur Ermittlung der *in vivo* - Sensitivität des AppA - Proteins wurden die Kulturen mit den angegebenen Blaulichtintensitäten bestrahlt, Proben vor Versuchsbeginn, sowie 90 und 240 min nach der



Beleuchtung genommen, die RNA isoliert und ein *Northern blot* mit einer *puc* - und einer 14S *rRNA* - spezifischen Sonde durchgeführt (A). Die *phosphoimaging* Signale wurden anschließend quantifiziert. Die relative *puc* - Expression in *R. sphaeroides* 2.4.1 in Abhängigkeit von der Lichtintensität nach 90 min (linker Balken) und 240 min (rechter Balken) (B), errechnet sich aus den Ratios der mRNA - levels der bestrahlten Kulturen im Verhältnis zu den Dunkelkulturen, nachdem diese auf die *rRNA* - Ladekontrolle normalisiert wurden.

Betrachtete man die in Abbildung 20 dargestellte Veränderung der *puc*-Expression unter semi- und anaeroben Bedingungen und der Bestrahlung mit 20 und 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht, zeigte sich eine AppA / PpsR - abhängige Repression der Gene nur unter semiaeroben Bedingungen. Diese war nach 90 min bei beiden Lichtintensitäten stärker als nach 240 min. Unter anaeroben Bedingungen konnte dagegen keine Veränderung der *puc*-Expression nach Bestrahlung mit 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ beobachtet werden, während 90 min Bestrahlung mit 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zu einem leichten Anstieg um etwa das Zweifache des Ausgangslevels der *puc*-Expression führte. Dieser Anstieg war noch stärker nach 240 min und erreichte fast das Dreifache der Ausgangsexpression.

Als zusätzliche Kontrolle der Ergebnisse wurde erneut eine *real time* RT - PCR gegen *bchL* und *pucB*, mit der RNA aus den anaerob herangezogenen Kulturen, durchgeführt (Abbildung 21). Dabei konnten erneut die Ergebnisse des *Northern blots* bestätigt werden, wobei durch die Bestrahlung mit 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in der sensitiveren *real time* RT - PCR ein Anstieg der Transkriptmenge beider Gene um das Dreifache nach bereits 60 min zu beobachten war. Im Vergleich dazu konnte kein Effekt nach der Bestrahlung mit 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ beobachtet werden.

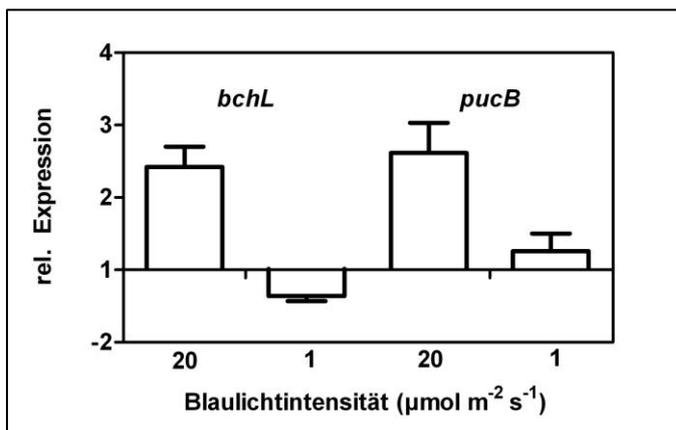


Abbildung 21: Bestimmung der Expressionslevel von *pucB* (RSP_0314) und *bchL* (RSP_0288) in anaeroben *R. sphaeroides* 2.4.1 - Kulturen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Blaulichtintensitäten mittels *real time* RT - PCR. Die Kulturen wurden anaerob herangezogen und mit Blaulicht (450 nm) der angegebenen Intensität bestrahlt. Die Probenentnahme erfolgte nach 60 min Blaulichtbestrahlung. Mittelwerte mit Standardabweichung von drei Experimenten sind dargestellt.

Von den anaeroben *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 - Kulturen wurde anschließend, wie bereits für die semiaeroben Kulturen, der relative Bacteriochlorophyllanteil der Zellen über einen Zeitraum von 8 Stunden quantifiziert (Abbildung 22). Dabei zeigte sich erneut, dass nur nach der Bestrahlung der Kulturen mit 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ein Anstieg des Bacteriochlorophylls sichtbar war, welcher erst nach 4 h Blaulichtbestrahlung einsetzte. Selbst nach 8 h erreichte der relative Bacteriochlorophyllanteil dabei nur das Zweifache des Ausgangswertes, während unter semiaeroben Bedingungen das Dreifache erreicht wurde (Abbildung 19). Die Dunkelkontrolle zeigte gleichbleibende Werte für alle Zeitpunkte. Das Gleiche konnte für die mit einer Intensität von 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestrahlten Kulturen beobachtet werden.

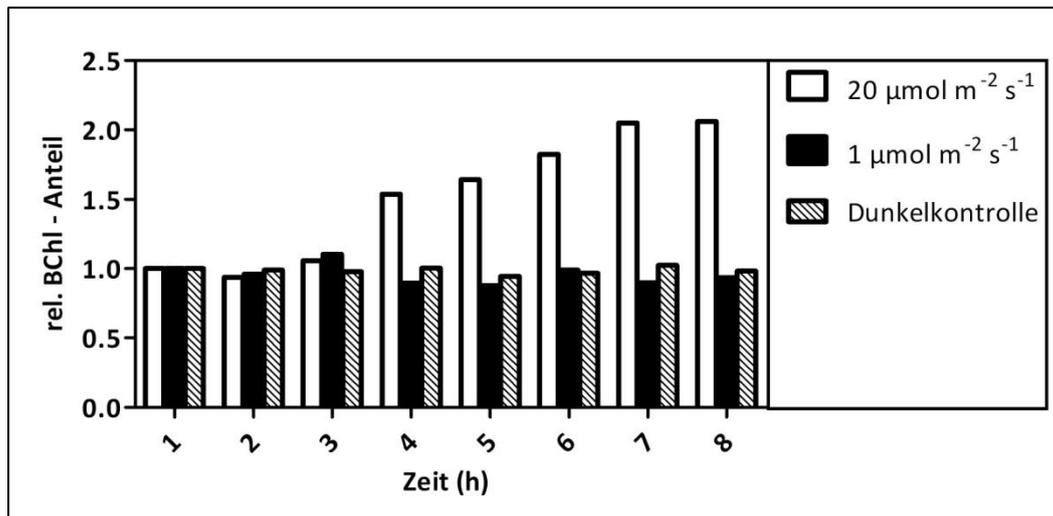


Abbildung 22 : Relativer Bacteriochlorophyllanteil von anaerob herangezogen *R. sphaeroides* 2.4.1 - Kulturen nach Bestrahlung mit verschiedenen Blaulichtintensitäten. Die Kulturen wurden zunächst über Nacht unter anaeroben Bedingungen bis zu einer OD_{660} von 0,2 herangezogen und anschließend, während der gesamten Versuchsdauer, mit der jeweiligen Blaulichtintensität bestrahlt. Gezeigt ist jeweils ein Datensatz von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen. Die Einzelmesswerte wurden gegen die Dunkelkontrolle normalisiert und der t_0 Wert gleich 1 gesetzt.

3.1.2 Blaulichtsensitivität der Photosyntheseexpression in *R. sphaeroides* JZ1678 (ΔFnrL)

Neben dem AppA / PpsR und dem PrrB / PrrA System spielt noch ein drittes System eine große Rolle bei der Expression der Photosynthesegene in *Rhodobacter sphaeroides*. Der Regulator FnrL konnte schon früh als essentieller Faktor für das phototrophe Wachstum von *Rhodobacter sphaeroides* identifiziert werden (Zeilstra-Ryalls und Kaplan, 1998). Die Expression der photosynthetischen Komplexe ist ebenfalls betroffen und Kulturen der Mutante JZ1678 (Zeilstra-Ryalls und Kaplan, 1998) fallen durch eine deutlich hellere Farbe auf. Das auffälligste Merkmal ist jedoch, dass anaerobes und phototrophes Wachstum nur sehr langsam möglich ist. Weil das *puc*- und das *bchL*-Operon ebenfalls eine FnrL-Bindestelle *upstream* ihres Transkriptionsstart besitzen und da ein lateraler Effekt des FnrL-Proteins auf die blaulichtabhängige Regulation der Photosynthesegene nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde im Folgenden untersucht, ob es einen Unterschied in der Lichtsensitivität zwischen der FnrL-Mutante JZ1678 und dem Wildtyp gibt.

Die Expression der photosynthetischen Komplexe ist in der FnrL-Mutante deutlich schwächer als im Wildtyp, daher konnte für die Quantifizierung der *puc*-Expression kein *Northern blot* verwendet werden. Um dennoch die Expressionslevel bestimmen zu können, wurden Kulturen der FnrL-Mutante daher mit den gleichen Lichtintensitäten wie der Wildtyp bestrahlt (Abbildung 18) und anschließend die *puc*- und *bchL*-Expression per *real time RT-PCR* quantifiziert (Abbildung 23).

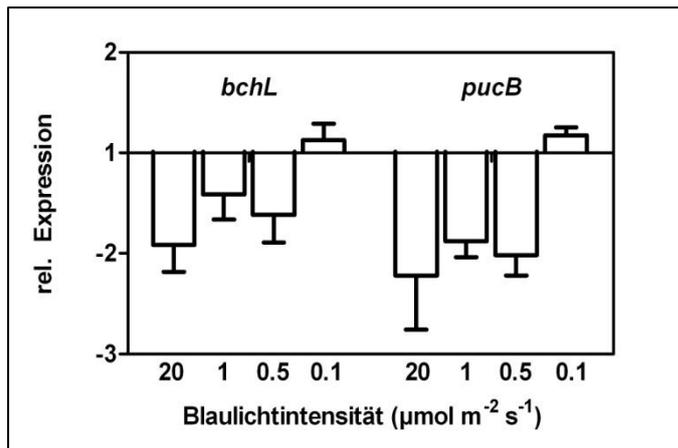


Abbildung 23 : Bestimmung der Expressionslevel von *pucB* (RSP_0314) und *bchL* (RSP_0288) in semiaeroben *R. sphaeroides* JZ1678 - Kulturen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Blaulichintensitäten mittels *real time RT - PCR*. Die Kulturen wurden semiaerob herangezogen und mit Blaulich (450 nm) der angegebenen Intensität bestrahlt. Die Probenentnahme erfolgte nach 60 min Blaulichbestrahlung. Mittelwerte mit Standardabweichung von drei Experimenten sind dargestellt.

In der *real time RT - PCR* konnte eine vergleichbare Sensitivität der *puc* und *bchL* Expression gegen Blaulich wie im Wildtyp festgestellt werden. Erneut zeigte sich bei Bestrahlung mit 20, 1 und 0,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ eine Abnahme der Genexpression, während die Bestrahlung der Kulturen mit 0,1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ keinen Effekt auf die Genexpression beider Gene hatte. Auffällig war zudem, dass die auftretenden Ab- und Zunahmen der Genexpression etwas schwächer waren als die Vergleichbaren im Wildtyp.

Die Quantifizierung der *puc* - und *bchL* - Expression wurde ebenfalls unter anaeroben Bedingungen durchgeführt (Abbildung 24). Da die FnrL - Mutante hier nur sehr langsam und ungleichmäßig wuchs, wurden die Zellen hier schon bei einer OD_{660} von 0,15 geerntet.

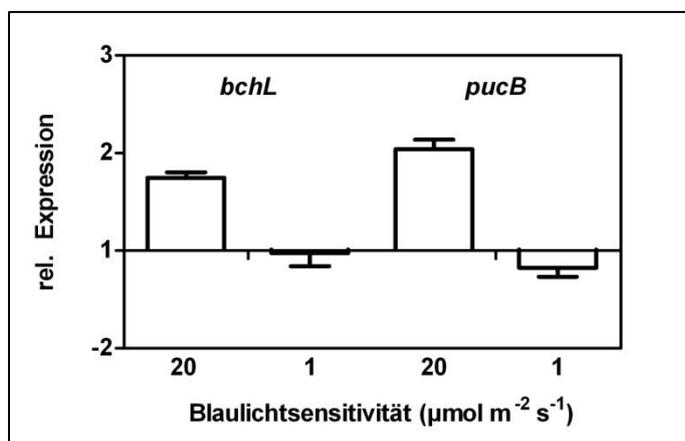


Abbildung 24 : Bestimmung der Expressionslevel von *pucB* (RSP_0314) und *bchL* (RSP_0288) in anaeroben *R. sphaeroides* JZ1678 - Kulturen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Blaulichintensitäten mittels *real time RT - PCR*. Die Kulturen wurden anaerob herangezogen und mit Blaulich (450 nm) der angegebenen Intensität bestrahlt. Die Probenentnahme erfolgte nach 60 min Blaulichbestrahlung. Mittelwerte mit Standardabweichung von drei Experimenten sind dargestellt.

Betrachtete man die Quantifizierung der *puc* - und *bchL* - Expression in der FnrL - Mutante unter anaeroben Bedingungen, zeigte sich dort ebenfalls ein ähnliches Bild wie im Wildtyp. Nur nach Bestrahlung mit 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ war ein Anstieg der Transkript/level sichtbar, während 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ keinen Effekt zeigte. Dabei waren die messbaren Effekte erneut etwas schwächer als im Wildtyp. Der Anstieg der Transkript/level lag hier nur bei knapp dem Zweifachen Expressions/level, während im Wildtyp die Zweieinhalbfache Expression erreicht wurde.

Da eine zum Wildtyp 2.4.1 vergleichbare Sensitivität gegen Blaulich in der FnrL - Mutante, sowohl unter semiaeroben als auch anaeroben Bedingungen festgestellt werden konnte, ist ein lateraler Effekt des Verlustes von FnrL auf die Blaulichantwort auszuschließen.

3.1.3 Blaulichtsensitivität der Photosyntheseexpression in *R. sphaeroides* PrrB1 (Δ PrrB)

In früheren Expressionsanalysen an der PrrA - Mutante konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des *response regulators* PrrA auch unter semiaeroben Bedingungen nötig ist, um eine Expression des Photosyntheseapparates zu gewährleisten (Jäger *et al.*, 2007). Fehlt das PrrA Protein, fällt auch die Repression durch das AppA / PpsR - System weg und nur minimale Expressionlevel der Photosynthesegene können nachgewiesen werden. Fehlt die Sensor kinase PrrB1, geht die regulatorische Verbindung zum Elektronenfluss der aeroben Atmung verloren und die PrrA - Aktivität wird nicht mehr reguliert. Unter diesen Bedingungen kann selbst unter anaeroben Bedingungen, wo sonst die Antwort von PrrB / PrrA die reprimierende Wirkung von AppA / PpsR überdeckt, der Einfluss des Antirepressor / Repressor - Systems wiederhergestellt werden (Happ *et al.*, 2005).

Um zu untersuchen, ob die hohe Sensitivität von AppA gegenüber Blaulicht auch unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen werden kann, wurden Kulturen der PrrB - Mutante PrrB1 ebenfalls mit verschiedenen Lichtintensitäten bestrahlt und anschließend die *puc* - und *bchL* - Expression bestimmt.

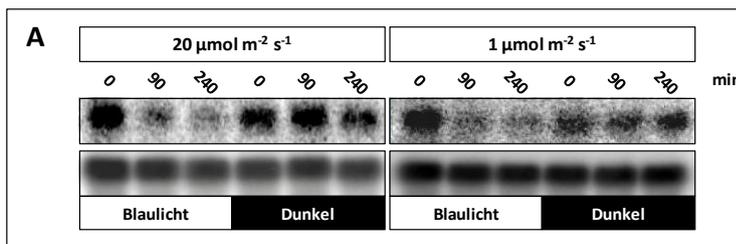
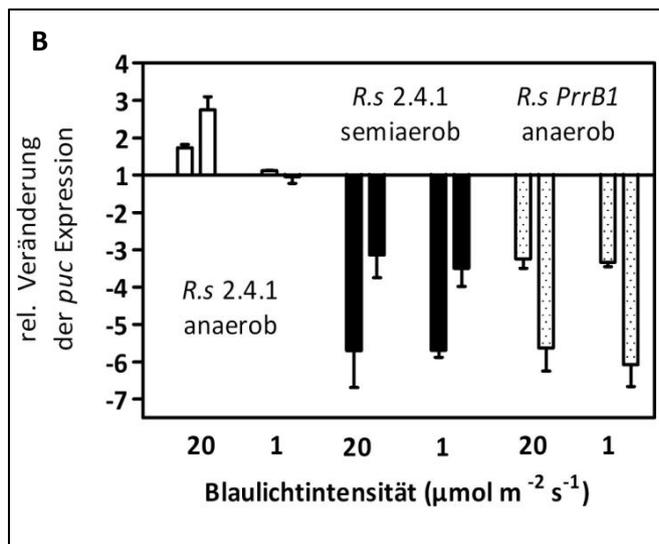


Abbildung 25 : Analyse der *puc*-Expression in *R. sphaeroides* 2.4.1 und PrrB1 unter semi- und anaeroben Bedingungen in Abhängigkeit von der Blaulichtintensität mittels Northern blot. Die Kulturen wurden mit den angegebenen Blaulichtintensitäten bestrahlt, Proben vor Versuchsbeginn, sowie 90 und 240 min nach der Beleuchtung, genommen, die RNA isoliert und ein Northern blot mit einer *puc* - und einer 14S *rRNA* - spezifischen Sonde durchgeführt (A). Die *phosphoimaging* Signale wurden anschließend quantifiziert.



Die Kulturen wurden mit den angegebenen Blaulichtintensitäten bestrahlt, Proben vor Versuchsbeginn, sowie 90 und 240 min nach der Beleuchtung, genommen, die RNA isoliert und ein Northern blot mit einer *puc* - und einer 14S *rRNA* - spezifischen Sonde durchgeführt (A). Die *phosphoimaging* Signale wurden anschließend quantifiziert. Die relative *puc* - Expression in *R. sphaeroides* 2.4.1 (siehe Abbildung 20) und PrrB1 in Abhängigkeit von der Lichtintensität nach 90 min (linker Balken) und 240 min (rechter Balken) (B) errechnet sich aus den Ratios der mRNA - levels der bestrahlten Kulturen im Verhältnis zu den Dunkelkulturen, nachdem diese auf die *rRNA* - Ladekontrolle normalisiert wurden.

In der Auswertung des in Abbildung 25 dargestellten Northern blots zeigte sich unter anaeroben Bedingungen in der PrrB - Mutante eine zum Wildtyp unter semiaeroben Bedingungen (Abbildung 20) vergleichbare Repression der *puc* - Expression. Dabei ist jedoch auffällig, dass die maximale Repression im Wildtyp bereits nach 90 min erreicht ist und nach

240 min wieder abnimmt, während die PrrB1 - Mutante ihr Maximum erst nach 240 min erreichte.

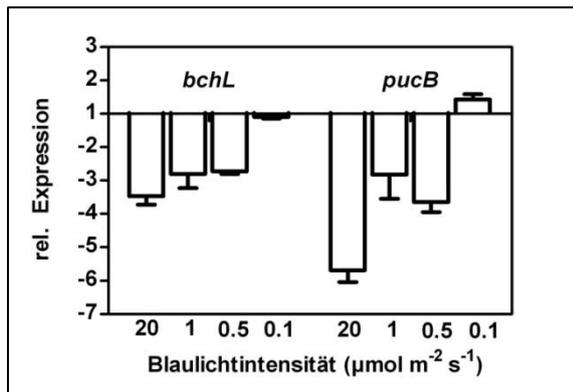


Abbildung 26 : Bestimmung der Expressionslevel von *pucB* (RSP_0314) und *bchL* (RSP_0288) in anaeroben *R. sphaeroides* PrrB1 - Kulturen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Blaulichtintensitäten mittels *real time RT - PCR*. Die Kulturen wurden anaerob angezogen und mit Blaulicht (450 nm) der angegebenen Intensität bestrahlt. Die Probenentnahme erfolgte nach 60 min Blaulichtbestrahlung. Mittelwerte mit Standardabweichung von drei Experimenten sind dargestellt.

In den anschließend durchgeführten *real time RT - PCRs* (Abbildung 26) konnte erneut eine, zum unter semiaeroben Bedingungen angezogenen Wildtyp (Abbildung 18) vergleichbare Sensitivität in den unter anaeroben Bedingungen herangezogenen PrrB1 - Kulturen festgestellt werden. Es wurde eine starke Abnahme in der Expression beider Gene nach Bestrahlung mit 20, 5 und $0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ festgestellt, während die Bestrahlung mit $0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auch unter anaeroben Bedingungen, keinen Effekt auf die Expression hatte.

Zuletzt wurde die PrrB - Mutante anaerob angezogen und über 8 h mit Blaulicht bestrahlt. Anschließend wurde das Bacteriochlorophyll extrahiert und quantifiziert (Abbildung 27). Dabei wurden die gleichen Lichtintensitäten wie in Abbildung 19 verwendet. Im direkten Vergleich zeigte sich in der anaeroben PrrB - Mutante ein sehr ähnliches Bild wie im semiaeroben Wildtyp, wobei die Maximalwerte deutlich niedriger waren. Die Bestrahlung mit $0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, zeigte keinen Unterschied zur Dunkelkontrolle, während bereits bei $0,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ eine sehr starke Repression sichtbar war. Für die Bestrahlung mit 20 und $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zeigte sich ebenfalls eine dem Wildtyp vergleichbare Repression.

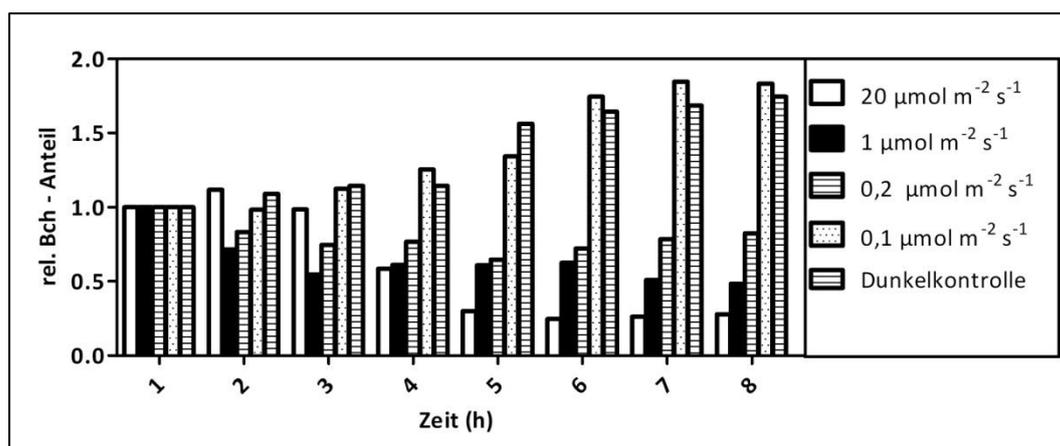


Abbildung 27 : Relativer Bacteriochlorophyllanteil von anaerob herangezogenen *R. sphaeroides* PrrB1 - Kulturen nach Bestrahlung mit verschiedenen Blaulichtintensitäten. Die Kulturen wurden zunächst über Nacht unter anaeroben Bedingungen bis zu einer OD_{660} von etwa 0,2 herangezogen und anschließend während der gesamten Versuchsdauer mit der jeweiligen Blaulichtintensität bestrahlt. Gezeigt ist jeweils ein Datensatz von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

Sowohl auf Transkript/*level*, als auch bei den gebildeten Photosynthesekomplexen konnte für die unter anaeroben Bedingungen angezogene PrrB1 - Mutante eine zum unter semiaeroben Bedingungen angezogenen Wildtyp 2.4.1 vergleichbare Sensitivität gegen Blaulicht ermittelt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass auch unter anaeroben Bedingungen eine vergleichbar niedrige Lichtintensität nötig ist, um die reprimierende AppA - Antwort einzuleiten.

3.2 Analyse der *in vivo* DNA - Bindung durch PpsR und PrrA

Das Zusammenspiel von PrrA und PpsR bei der Bindung des Promotors ist licht - und sauerstoffabhängig. Während die Ergebnisse der Regulation auf Ebene der Transkription gut untersucht sind, ist wenig über die Bindeverhältnisse der beiden Proteine *in vivo* bekannt. So ist nicht klar, ob beide Proteine gleichzeitig die DNA binden und der regulatorische Einfluss des einen Systems nur den des anderen überwiegt oder ob die Bindung des einen Proteins die Bindung des jeweils anderen verhindert. Am Beispiel des *pucB* - Gens ist gut sichtbar, dass die regulatorischen Proteine der Photosynthesegene alle innerhalb weniger Basenpaare vor dem Promotor des Gens binden (siehe Anhang Abbildung 72). Um die genauen Bindeverhältnisse *in vivo* zu untersuchen, wurde daher mittels DMS - *footprint* Analyse die *upstream* Region des *pucB* - Gens untersucht (Hornstra und Yang, 1993). Die Durchführung dieser Methode ist in Abbildung 28 schematisch dargestellt.

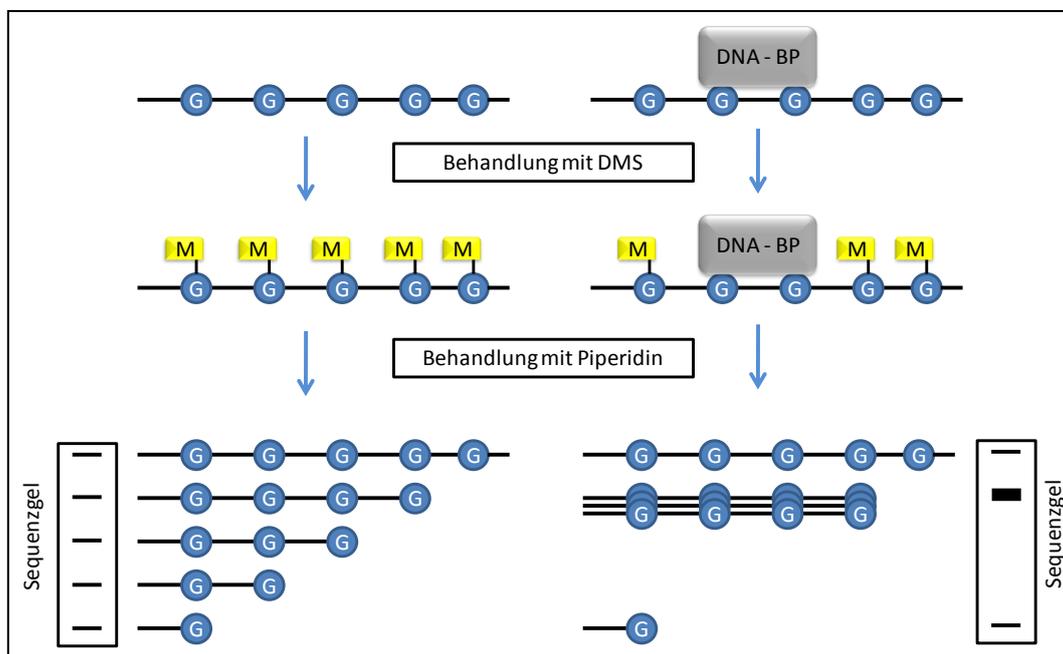


Abbildung 28 : Durchführung der *in vivo* DMS - *footprint*. Die Guaninbasen (G) der DNA von lebenden Zellen werden mit DMS methyliert (M). Anschließend wird die DNA chemisch mittels Piperidin an den methylierten Basen gespalten. Hat ein DNA - Bindeprotein (DNA - BP) an die DNA gebunden, verhindert dies die Methylierung und die DNA kann an diesen Stellen nicht gespalten werden. Die Spaltung bzw. das Ausbleiben der selbigen kann auf einem Sequenzgel durch radioaktive Markierung der DNA sichtbar gemacht werden.

In vivo konnte mit dieser Methode jedoch kein Nachweis der Bindestellen in *R. sphaeroides* erfolgen. Die Behandlung der Zellen mit DMS führte stets zu einer vollständigen Degradation der chromosomalen DNA der Zellen, die somit auch nicht mehr für weitere Methoden nutzbar war (Daten nicht gezeigt). Eine Expression des *pucB* - *upstream* - Bereichs von Plasmid führte zum gleichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde dieses Teilprojekt nicht mehr weiter verfolgt.

Als Kontrolle der *in vivo* Ergebnisse des DMS - *footprints* muss das gleiche Experiment zusätzlich *in vitro* mit aufgereinigten Proteinen und radioaktiv markierter DNA in einem DNase I - *footprint* durchgeführt werden. Da zu diesem Zeitpunkt kein Überexpressionsplasmid für das PrrA - Protein vorhanden war, wurde dieses zunächst hergestellt. Dazu wurde das *prpA* - Gen mittels PCR amplifiziert und in den pQE30 - Vektor kloniert. Das so erhaltene überexprimierte Protein wurde anschließend mittels SDS - Polyacrylamid - Gel auf seine Reinheit und per Gel - Retardations - *assay* auf seine DNA - Bindefähigkeit untersucht (Abbildung 29).

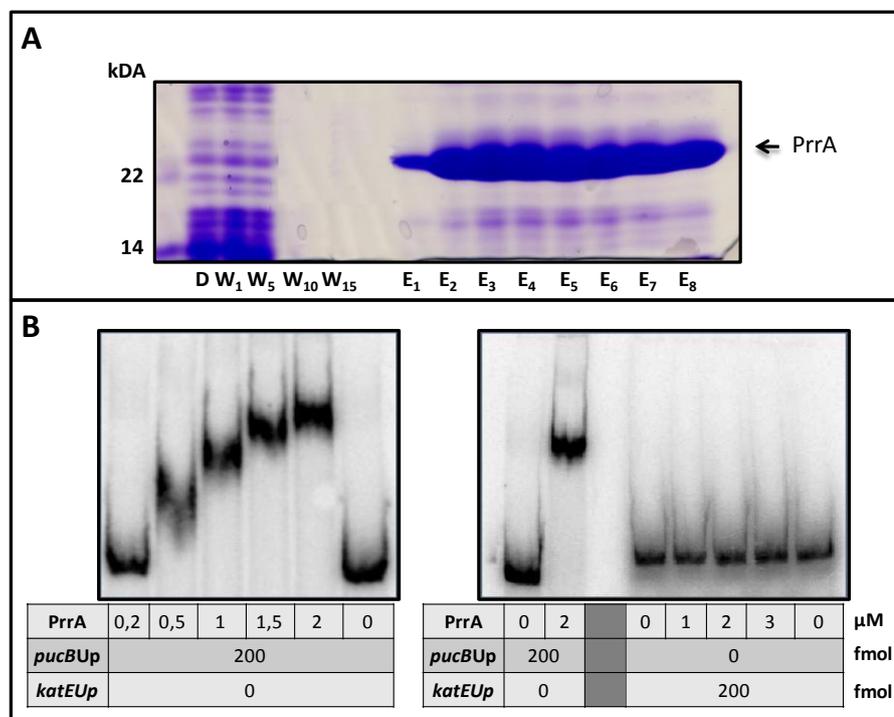


Abbildung 29 : Qualitätskontrolle des überexprimierten PrrA - His - Proteins aus dem pQEPrrA - Überexpressionstamm durch Überprüfen der Reinheit auf einem coomassiegefärbtem SDS - PAA - Gel (A) und Gel Retardations - assays (B). Für das Comassie - Gel wurde ein 10 %iges SDS - Gel mit je 2 μl des Durchflusses (D), 35 μl der Waschschrte (W_{1-15}), sowie 35 μl der Elutionsschritte (E_{1-8}) beladen, gefahren und gefärbt. Die Elutionsfraktionen (E_{1-8}) wurden in den *storage buffer* dialysiert und für die Gel Retardations - assays verwendet. Das verwendete 300 bp DNA - Fragment *upstream* des Transkriptionsstart von *pucB* (RSP_0314) enthält eine *tandem* - Bindestelle für das PrrA - Protein, während das 250 bp *katE* (RSP_2779) *upstream* Fragment keine enthält.

Das aufgereinigte PrrA - Protein zeigte eine deutliche Bindung an die *pucB upstream* - Region, während die *upstream* - Region von *katE* nicht erkannt wurde. Diese Bindung ist als deutliche Retardation der markierten DNA im Gellauf sichtbar. Daher wurde dieses Protein, zusammen mit PpsR, von dem ein Überexpressionstamm bereits vorhanden war und die Bindung in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte (Masuda und Bauer, 2002), für *in vitro* -

footprints verwendet (Daten nicht gezeigt). Da die gleichzeitig durchgeführten *in vivo* Experimente jedoch zu keinem Ergebnis führten, erbrachten diese *in vitro* Experimente nur die Bestätigung der beiden bereits bekannten Bindestellen (Mao *et al.*, 2005) und wurden nicht mehr weiter verfolgt.

3.3 random Mutagenese der BLUF - Domäne von AppA

random - Mutagenese-Experimente mit der C-terminalen Domäne von AppA führten zur Identifikation einer Häm-Bindestelle und lieferten zudem konkrete Hinweise auf Interaktionen zwischen der N-terminalen BLUF - Domäne und der C-terminalen Domäne (Han *et al.*, 2007). Um weitere Hinweise für die Interaktion der beiden Domänen zu finden, wurde ebenfalls eine Mutagenese durch *error prone PCR* (Spee *et al.*, 1993) an der BLUF - Domäne durchgeführt. Bei dieser Methode nutzt man aus, dass die ohnehin relativ hohe Fehlerrate der *Taq* - Polymerase (ca. 4×10^{-3} Mutationen pro Basenpaar (Quelle: QIAGEN *PCR cloning handbook*) noch erhöht werden kann, wenn man einen Überschuss des Nucleosidanalogs dITP hinzugibt und gleichzeitig die Konzentration eines der vier Standardnukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) der *PCR* leicht reduziert. Die so mutierte BLUF - Domäne wurde anschließend über mehrere Klonierungsschritte in den pRK - Vektor überführt (Abbildung 30) und in die AppA - Mutante App11 (Gomelsky und Kaplan, 1995) konjugiert .

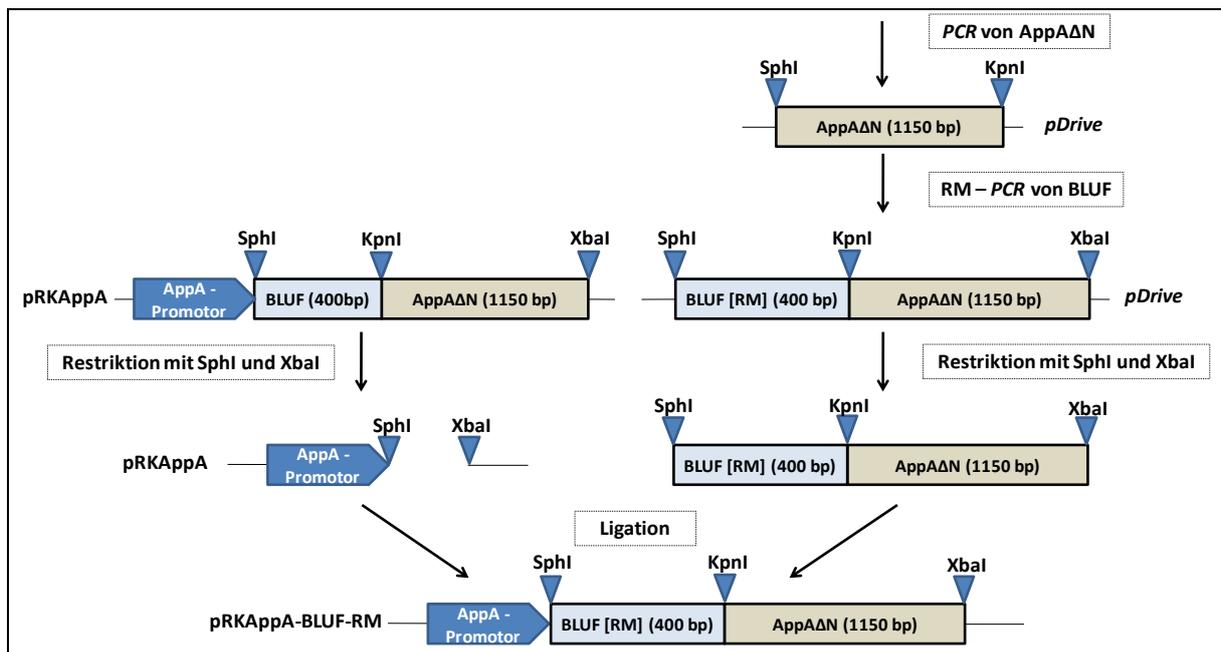


Abbildung 30: Klonierung des pRKAppA-BLUF-RM Vektors zur Transformation in die AppA - Mutante App11. Um das vollständige *appA* - Gen mit der mutierten BLUF - Domäne unter Kontrolle des *appA* - Promotors zu erhalten, wurde aus dem pRKAppA Plasmid (Han, 2006) das komplette AppA-Gen mit SphI und XbaI herausgeschnitten. Gleichzeitig wurde zunächst per *PCR* der C - Terminus von AppA (AppAΔN) amplifiziert und in den *pDrive cloning vector* kloniert. Die BLUF - Domäne wurde per *error prone PCR* amplifiziert und vor den C - Terminus (AppAΔN) ebenfalls in den *pDrive cloning vector* ligiert. Das vollständige AppA - Protein mit der mutierten BLUF - Domäne wurde anschließend aus dem *pDrive* mit SphI und XbaI ausgeschnitten und in den pRK Vektor mit dem AppA - Promotor ligiert. Der erhaltene Vektor pRKAppA-BLUF-RM verfügte das vollständige AppA - Protein mit der mutierten BLUF - Domäne unter Kontrolle des eigenen Promotors.

Daraufhin wurde nach Mutanten gesucht, welche eine vom Wildtyp abweichende Pigmentierung der Kolonien zeigten. Mutanten, welche eine permanente Interaktion der beiden Domänen aufweisen, sollten auch im Dunkeln nur wenige Photosynthesekomplexe und somit eine schwache Pigmentierung zeigen, da hier PpsR immer frei vorliegt und die Gene dauerhaft reprimiert werden. Verhindert eine Mutation die Interaktion der beiden Domänen, bindet PpsR dauerhaft an AppA und die Gene werden auch bei Blaulicht unter semiaeroben Bedingungen abgelesen.

Bei der Durchführung der *error prone PCR* wurde zunächst die Konzentration ermittelt, bei der nur ein bis zwei Mutationen in der etwa 400 bp langen BLUF - Domäne auftreten. Dabei wurden verschiedenen Mengen an dTTP und dATP/dTTP/dGTP/dCTP getestet (Tabelle 3).

Tabelle 3 : Vergleich der eingesetzten Konzentrationen an Nukleotiden im Verhältnis zu den im PCR - Produkt entstandenen Mutationen. Dabei waren die eingesetzten absoluten Volumina der Nukleotide gleich und es wurden unterschiedlich konzentrierte Stammlösungen verwendet. Die Anzahl der Mutationen wurde durch Sequenzierung von bis zu drei *pDrive* - Klonen ermittelt. Dabei sind nicht nur Basenaustausche, sondern auch Deletionen und Insertionen berücksichtigt.

dTTP (mM)	dATP (mM)	dTTP (mM)	dGTP (mM)	dCTP (mM)	Anzahl Mutationen in BLUF - Domäne
10	1	1	1	1	kein eindeutiges Produkt
10	1	1	1	0,5	kein eindeutiges Produkt
5	1	1	1	0,5	20 - 25 Mutationen
2,5	1	1	1	0,5	5 - 10 Mutationen
1	1	1	1	0,5	1 - 3 Mutationen
1	1	1	0,5	1	1 - 2 Mutationen
1	1	0,5	1	1	1 - 3 Mutationen

Die Versuchsreihe für die unterschiedlichen Nukleotidkonzentrationen ergab, bei Verwendung eines hohen Überschusses an dTTP, eine sehr hohe Akkumulation von Mutationen in dem 400 bp - Fragment. Bei einem zehnfachen Überschuss an dTTPs war kein sauberes PCR-Produkt mehr sichtbar und ein fünf - oder zweieinhalbfacher Überschuss führte zu einer sehr hohen Anzahl an Mutationen, von denen zudem eine Vielzahl Deletionen / Insertionen von Basenpaaren waren. Nur bei Zugabe von äquimolaren Mengen an dTTP und der Reduktion eines der anderen Nukleotide auf die Hälfte, konnte die für die *random* Mutagenese gewünschte Menge an Basenaustauschen erzielt werden. Unter diesen Bedingungen konnten in den sequenzierten Klonen außerdem nur wenige Deletionen oder Insertionen festgestellt werden.

Nachdem die optimalen PCR - Bedingungen identifiziert worden waren, wurde im Anschluss die in Abbildung 30 beschriebene Klonierung durchgeführt und der so erzeugte Vektor in die AppA - Mutante App11 überführt. Die Zellen wurden anschließend über die Tetracyclinresistenz des pRKAppA - BLUF - RM - Vektors selektiert und auf eine auffällige Pigmentierung untersucht. In mehreren Läufen wurden dabei von insgesamt ca. 6000 rötlich pigmentierten Kolonien auf den RÄ - Agar - Platten, zehn zufällig gewählte sequenziert. Außerdem wurde die Sequenz von insgesamt fünf schwach pigmentierten Klonen ebenfalls untersucht (Abbildung 31).



Abbildung 31: Verteilung der durch die Sequenzierung der BLUF-Domäne identifizierten Mutationen. Beginnend mit dem Start-Codon ist die Sequenz der BLUF-Domäne des AppA-Proteins dargestellt. Basenaustausche sind durch ein rotes Dreieck gekennzeichnet, wobei die in der Sequenz stehende Base gegen die über dem Dreieck stehende ausgetauscht wurde. Die mit einem schwarzen Dreieck gekennzeichneten Basen waren deletiert und fehlten in den jeweiligen Sequenzen.

Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen der zehn zufällig gewählten Klone ergab ein gleichmäßiges Auftreten von einer Mutation (in drei Klonen) oder zwei Mutationen (in sieben Klonen). Diese waren gleichmäßig über die BLUF-Domäne verteilt. Es konnte keine spezifische Präferenz für den Austausch gegen eine bestimmte Base festgestellt werden, wobei ein Austausch gegen Cytidin viermal, gegen Thymidin dreimal, gegen Adenosin zweimal und gegen Guanosin dreimal vorkam.

Die sequenzierten farblosen Klone stellten sich alle als Deletionsmutanten heraus. In diesen war jeweils eine Base deletiert, was zu einem *missense*-AppA-Protein führte. Da kein intaktes AppA-Protein vorlag, wurde die Photosyntheseexpression vollständig durch PpsR reprimiert und die Klone hatten alle eine der AppA-Mutante entsprechende helle Färbung. Es konnten somit keine Klone identifiziert werden, bei denen die BLUF-Domäne eine permanente Interaktion mit dem C-Terminus zeigte.

Die Suche nach Mutanten, welche keinerlei Interaktion zwischen BLUF-Domäne und dem C-Terminus zeigten, erwies sich als schwierig, da Mutanten mit einer veränderten Interaktion der beiden Domänen nicht von Mutanten mit einem generell inaktiven oder gestörten Photozyklus in der BLUF-Domäne (beides verhindert die Interaktion mit dem C-Terminus) unterschieden werden können. Zudem sind die Kolonien auf RÄ-Agar-Platten nicht von jenen ohne Mutation zu unterscheiden (beide zeigen eine rote Färbung).

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hellingwerf (Universität Amsterdam), welche umfangreiche *in vitro*-Studien am Photozyklus der BLUF-Domäne und dem daran gebundenen FAD durchgeführt hat (Laan *et al.*, 2003; Gauden *et al.*, 2005; Laan, 2005; Grinstead *et al.*, 2006; Laan *et al.*, 2006; Gauden *et al.*, 2007), wurde das Hauptaugenmerk auf bereits bekannte und am Photozyklus beteiligte Aminosäuren gerichtet. Die bereits vorliegenden *in vitro*-Daten dienten als Grundlage für die durchgeführten und im nächsten Abschnitt beschriebenen *in vivo*-Experimente.

3.4 *In vivo* - Effekte von BLUF - Mutanten auf die Expression der Photosynthesegene

Verschiedene Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren umfangreiche *in vitro* Studien zum Photozyklus der isolierten BLUF - Domäne durchgeführt (Gauden *et al.*, 2005; Laan, 2005; Laan *et al.*, 2006) und einen sich stark von bisher bekannten Photorezeptoren unterscheidenden Photozyklus identifiziert. Dabei konnten entscheidende Rollen der Aminosäuren Tryptophan 104 und Tyrosin 21 festgestellt werden. Mutationen in Tyrosin 21 führten immer zu einem vollständigen Verlust des charakteristischen rot - *shifts* des UV / VIS - Proteinspektrums bei Bestrahlung mit Blaulicht. Eine Mutation im Tryptophan 104 hatte dagegen keinen Einfluss auf den rot - *shift*, führt aber zum Verlust von Strukturänderungen innerhalb des Proteins nach Bestrahlung. Um zu untersuchen, ob diese *in vitro* beobachteten Effekte auch *in vivo* einen Einfluss auf die Photosynthesegenexpression haben, wurden von Tyrosin 21 und Tryptophan 104 Aminosäureaustauschmutanten des vollständigen AppA - Proteins unter Kontrolle des eigenen Promotors in den pRK Vektor kloniert und anschließend deren Einfluss auf die Photosynthesegene in der AppA - Mutante untersucht.

3.4.1 Konstruktion der BLUF - Aminosäureaustauschmutanten von AppA

Die Konstruktion der Aminosäureaustauschmutanten erfolgte über *overlap extension PCR* (Higuchi *et al.*, 1988; Ho *et al.*, 1989). Die Durchführung der Methode ist in Abbildung 32 dargestellt. Die Klonierung wurde vom technischen Assistenten Andreas Jäger durchgeführt.

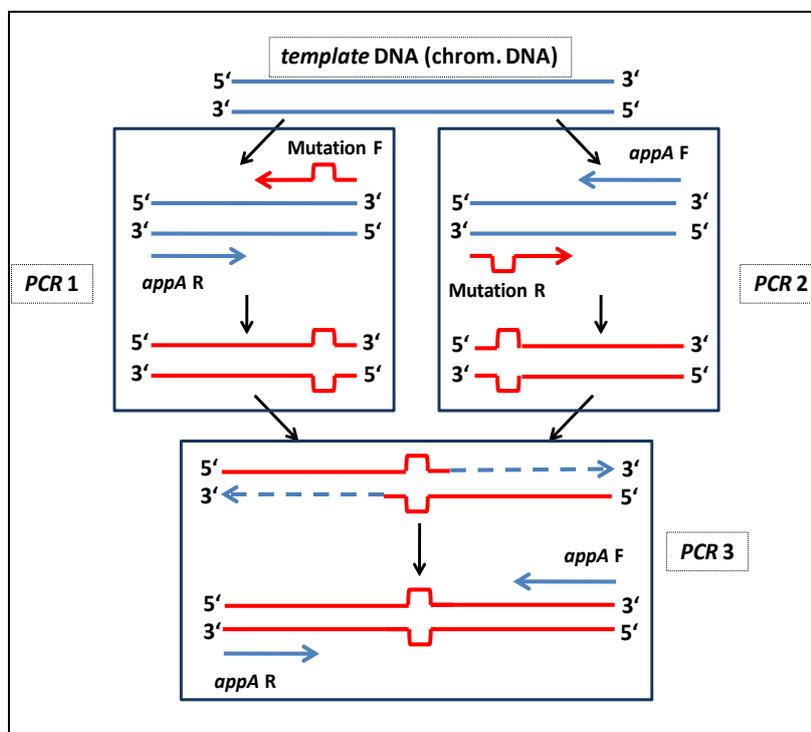


Abbildung 32 : Schematische Darstellung der *overlap extension PCR*. Ausgehend von der *template* - DNA werden zunächst zwei überlappende Fragmente der zu mutierenden Sequenz erstellt. Die Mutation wird dabei über die *primer* Mutation F und R eingebracht und befindet sich im überlappenden Bereich. Aus den PCRs 1 und 2 erhält man zwei überlappende, mutierte Fragmente, welche in PCR 3 aneinander binden können und so die Amplifikation des gesamten *templates* mit der mutierten Sequenz über die *primer* *appA R* und *appA F* ermöglichen.

Es wurden insgesamt vier Mutanten erstellt und anschließend in die AppA - Mutante App11 kloniert. Zwei der Mutanten betrafen einzig die Aminosäure Tyrosin 21. Dabei lag zum einen ein Austausch gegen die ebenfalls aromatische Aminosäure Phenylalanin (App11 pRKappAY21F) und zum anderen ein Austausch gegen Cystein (App11 pRKappAY21C) vor. Die Aminosäure Tryptophan 104 wurde gegen Phenylalanin ersetzt (App11 pRKappAW104F). Zuletzt wurde eine Doppelmutante von beiden Aminosäuren erstellt (App11 pRKappAW104F/Y21F).

Die App11 - Mutante exprimiert kein funktionsfähiges AppA und der Repressor PpsR bindet ständig an die Promotorregionen der Photosynthesegene. Kolonien der App11 - Mutante sind nur sehr schwach pigmentiert und nehmen auch in Flüssigkultur nur eine schwachrosa Farbe an. Nach der Konjugation der pRK - Plasmide mit den BLUF-Mutanten von AppA zeigten diese alle wieder die charakteristische Rotfärbung der Wildtyp *R. sphaeroides* Kolonien auf RÄ - Agar - Platten. Die einzige Ausnahme bildete die W104F - Mutante. Diese war auf RÄ - Agar - Platten zunächst ebenfalls schwach rot gefärbt, verlor diese Färbung aber schon nach einem Transfer in Flüssigkultur oder auf eine andere RÄ - Agar - Platte. Da die Sequenz des AppA - Gens auf dem Plasmid jedoch mehrfach überprüft worden war, wurde anschließend ein *Western blot* gegen den C - Terminus des AppA - Protein in den unterschiedlichen Mutanten durchgeführt (Abbildung 33). Es konnte gezeigt werden, dass alle erzeugten Mutanten, außer der W104F, die charakteristische Bande, welche auch im Wildtyp sichtbar war, besaßen. Die W104F Mutante entspricht dem in der App11 - Mutante sichtbaren Bild und es kann keine Reaktion zwischen dem Anti - AppA Δ N Antikörper und dem Protein festgestellt werden. Da in einer anderen Arbeit eine erfolgreiche Expression einer ähnlichen AppA - Mutante (W104F) von chromosomaler DNA erfolgreich war (Masuda *et al.*, 2007), wurde als nächster Schritt eine Reinsertion des *appAW104F* - Gens in das Chromosom der App11 - Mutante vorgenommen.

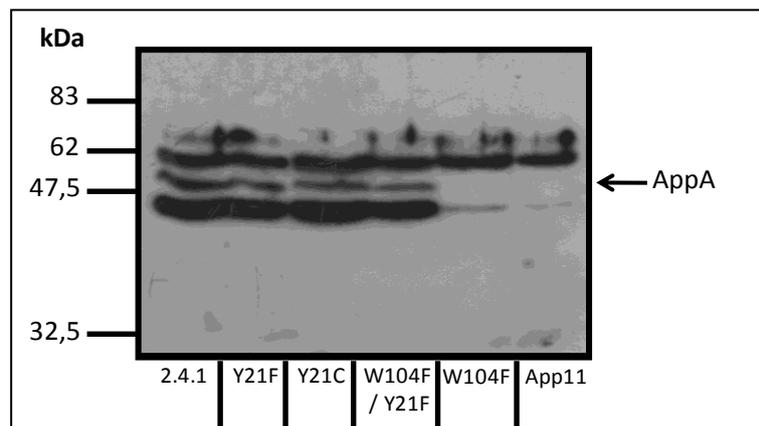


Abbildung 33 : Western blot von Zelllysaten der Aminosäureaustauschmutanten von AppA. Für den *Western blot* wurde ein 10 %iges SDS-Gel mit je 50 μ g Zelllysate der jeweiligen Stämme beladen. Der Wildtyp in der ersten Spur entspricht dabei der Positivkontrolle und die AppA - Mutante App11 in der letzten Spur der Negativkontrolle. Ein polyklonaler Antikörper gegen AppA Δ N (*anti AppA rabbit*) diente als primärer Antikörper. Der Chemolumineszenznachweis erfolgte über den mit der Meerrettich Peroxidase konjugierten sekundären Antikörper (30 sec Exposition).

Es wurde das bereits im pR*appAW104F* vorhandene Genfragment, unter Kontrolle des eigenen Promotors, zunächst über eine XbaI und HindIII Schnittstelle in den pPHU281 *suicide vector* kloniert und so das Plasmid pPHU::*appAW104F* (Abbildung 34) erhalten. Bei der Erstellung der App11 - Mutante (Gomelsky und Kaplan, 1995) wurde eine Trimetroprin Kasette in das AppA - Gen inseriert. Es ging der gesamte N - terminale Teil des Proteins (die BLUF - Domäne und etwa 200 bp des C - Terminus), sowie die Promotorregion verloren. Da die im pPHU281 enthaltene *upstream* Region von AppA homolog zur verbliebenen *upstream* Region im App11 - Vektor war, konnte durch homologe Rekombination das *appAW104F* - Gen in das Chromosom inseriert werden. Anschließend wurde gezielt auf *single crossover* Klone selektioniert (d.h. Klone mit nur einem flankierenden Bereich, welcher zur Rekombination beigetragen hat). Diese waren sowohl tetracyclinresistent (durch den ins Genom inserierten pPHU281), als auch rötlich pigmentiert (durch die wiederhergestellte Aktivität des C - Terminus von AppA). Die erhaltenen Klone behielten ihre rötliche Farbe auf Platte und in Flüssigkultur auch nach mehreren Transfers. Um sicherzustellen, dass das AppA - Gen tatsächlich in das Genom reintegriert wurde und es sich um eine *single crossover* Ereignis gehandelt hat, wurde über PCR und *Southern blot* die Richtigkeit der genomischen DNA der Klone überprüft.

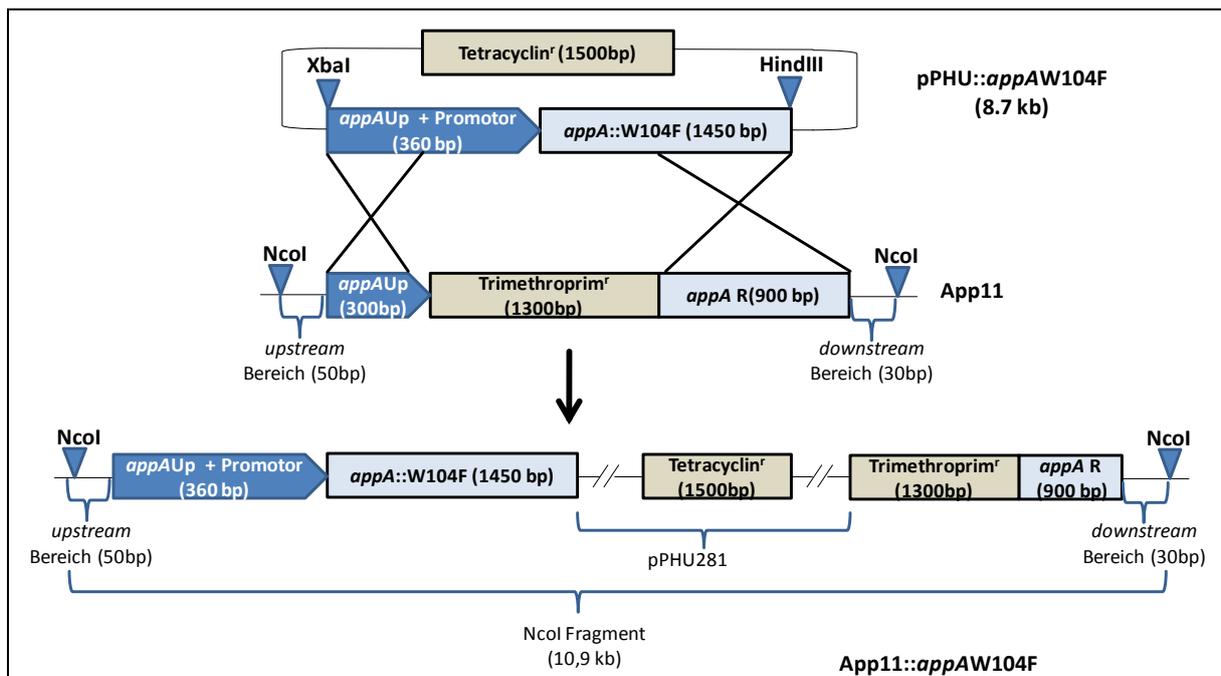


Abbildung 34 : Konstruktion der *R. sphaeroides* App11::*appAW104F* - Mutante durch *single crossover* - Reinsertion des *appAW104F* - Gens in die AppA - Mutante App11. Das AppA - Gen mit dem W104F - Basenaustausch in der BLUF - Domäne unter Kontrolle des eigenen Promotors wird durch homologe Rekombination in den *R. sphaeroides* App11 - Stamm integriert. Durch *single crossover* - Ereignisse kann das gesamte pPHU::*appAW104F* - Plasmid in das Genom integriert werden. Der App11 - Stamm hat durch die Insertion einer Trimethoprim - Kasette die ersten 600 bp des AppA - Gens und die Promotor - Region verloren und es verbleibt der *upstream* - Teil der Sequenz (*appAUp*) und der hintere Teil des C - Terminus (*appA R*). Die resultierenden Klone wurden auf die Tetracyclinresistenz des inserierten Vektors und die wiederhergestellte Pigmentierung der farblosen App11 - Mutante selektiert.

Von den nach der Klonierung entstandenen roten Kolonien (ca. 200), wurden anschließend 10 per PCR auf das Vorhandensein der BLUF - Domäne getestet und, da alle Klone positiv getestet wurden, eine *Southern blot* - Analyse von einem der Klone durchgeführt (Abbildung 35). Es wurde untersucht, ob die BLUF - Domäne und das Plasmid pPHU281 in das Chromosom inseriert hat und damit wirklich ein *single crossover* stattgefunden hat.

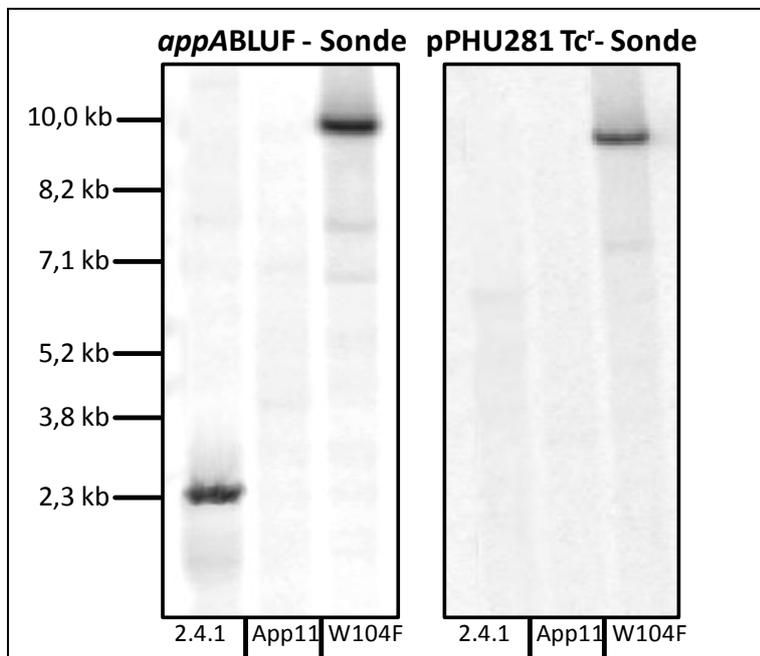


Abbildung 35 : *Southern blot* von genomischer DNA einer der potentiellen App11::appAW104F (W104F) - Kandidaten.

Die genomische DNA wurde mit *NcoI* geschnitten und je 20 µg wurden auf einem Agarose - Gel aufgetrennt. Als Kontrolle dienen der Wildtyp 2.4.1 und die AppA - Mutante App11. Die Membranen wurden mit einer Sonde gegen die BLUF - Domäne von AppA (**appABLUF**) und einer Sonde gegen die Tetracyclin Resistenz - Kasette des pPHU281 Vektors (**pPHU281 Tc^r**) hybridisiert.

Im *Southern blot* konnte das 10,9 kb große *NcoI* - Fragment, mit der *appABLUF* - Sonde im potentiellen App11::appAW104F - Klon nachgewiesen werden, während im Wildtyp nur das 2,5 kb Wildtyp - Fragment, ohne den integrierten pPHU281 vorlag. Da die BLUF - Domäne in der App11 - Mutante durch die Trimethoprim - Kasette deletiert wurde, konnte diese nicht nachgewiesen werden. Für die Sonde gegen die Tetracyclin - Kasette des pPHU281 - Vektors konnte nur im App11::appAW104F - Klon ein Signal nachgewiesen werden, da nur hier der Vektor in das Chromosom integriert wurde.

Der erhaltene Stamm enthält das AppA - Gen mit der W104F - Mutation und der rote Phänotyp bleibt auch nach mehreren Passagen bestehen. Aus diesem Grund wurde der Stamm App11::appAW104F für die weitere Untersuchung der Auswirkungen der Mutation auf die Blaulichtwahrnehmung des AppA - Proteins verwendet.

3.4.2 Auswirkungen der BLUF - Mutanten auf die Photosyntheseexpression

Die erstellten BLUF - Mutanten zeigten alle *in vitro* einen stark veränderten Photozyklus. Im Folgenden wurde untersucht, wie sich diese Mutationen *in vivo* auf die Wirkung von AppA als Antirepressor von PpsR auswirken. Dazu wurde erneut quantifiziert wie sich die Bestrahlung von semiaerob heranwachsenden Mutanten mit unterschiedlich starken Intensitäten von Blaulicht *in vivo* auf die Expression des *puc* - Operons auswirkt.

Eine Titration der Lichtsensitivität der BLUF-Domäne wurde im Wildtyp bereits durchgeführt (Abschnitt 3.1.1). Da bei allen Mutanten - mit Ausnahme der W104F-Mutante - das AppA-Protein plasmidexprimiert war, wurde im Folgenden zunächst untersucht, ob die veränderte Kopienzahl des AppA-Gens (pRK Plasmide sind *low copy* Plasmide mit einer bis zehn Kopien pro Zelle) einen Einfluss auf die Lichtsensitivität hat. Es wurden Kulturen der AppA-Mutante mit plasmidexprimiertem Wildtypprotein (*R. sphaeroides* App11 p484-Nco5, (Gomelsky und Kaplan, 1995) mit identischen Lichtintensitäten, wie in Abbildung 17, bestrahlt und anschließend die Repression des *puc*-Operons bestimmt (Abbildung 36).

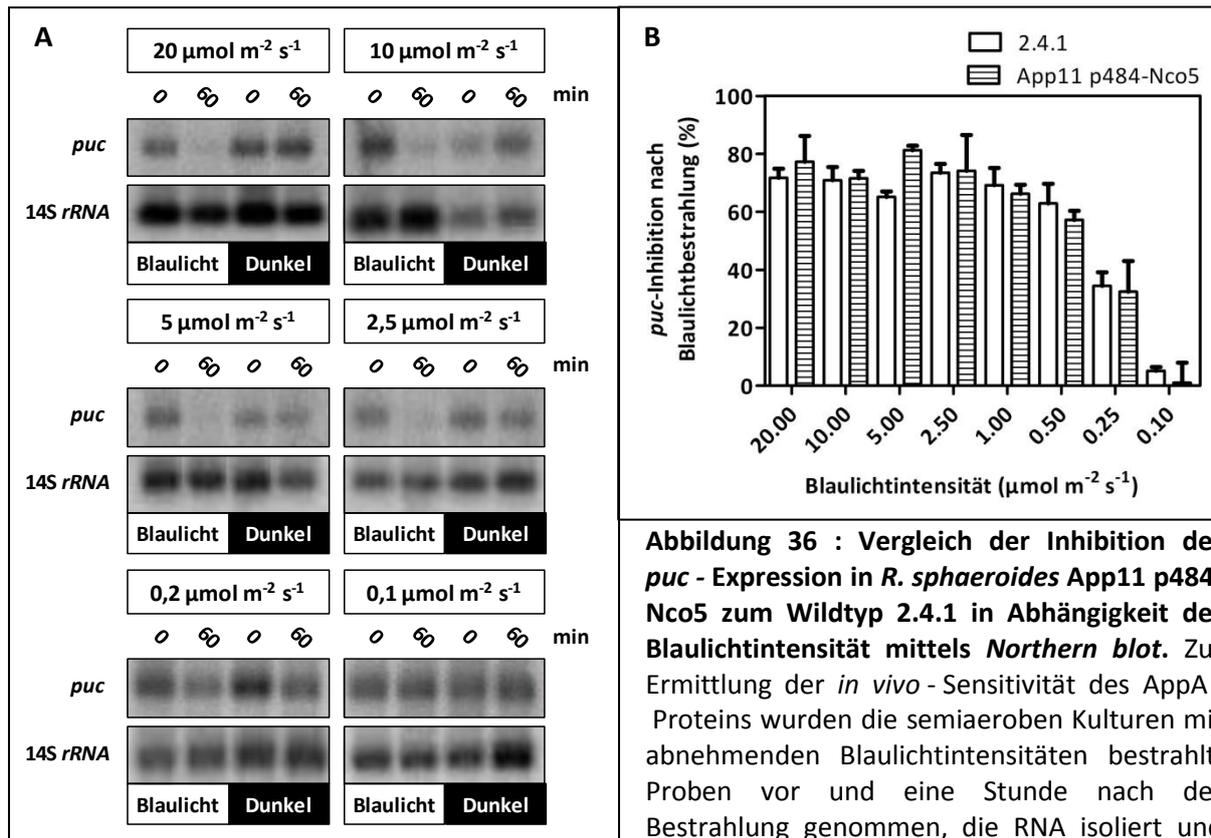


Abbildung 36 : Vergleich der Inhibition der *puc*-Expression in *R. sphaeroides* App11 p484-Nco5 zum Wildtyp 2.4.1 in Abhängigkeit der Blaulichtintensität mittels Northern blot. Zur Ermittlung der *in vivo*-Sensitivität des AppA-Proteins wurden die semiaeroben Kulturen mit abnehmenden Blaulichtintensitäten bestrahlt, Proben vor und eine Stunde nach der Bestrahlung genommen, die RNA isoliert und ein Northern blot mit einer *puc*- und einer 14S

rRNA-spezifischen Sonde durchgeführt (**A**). Die *phosphoimaging* Signale wurden anschließend quantifiziert. Die prozentuale *puc*-Repression in *R. sphaeroides* App11 p484-Nco5 in Abhängigkeit von der Lichtintensität (**B**), errechnet sich aus den Ratios der mRNA-levels der bestrahlten Kulturen im Verhältnis zu den Dunkelkulturen, nachdem diese auf die *rRNA*-Ladekontrolle normalisiert wurden. Die prozentuale Inhibition wurde anhand von Formel 3 (siehe Abschnitt 2.4.13) errechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und maximalen Abweichungen von zwei unabhängigen Experimenten. Zum Vergleich sind außerdem die Inhibitionswerte des Wildtyps 2.4.1 mit aufgeführt (Abbildung 17).

Es konnte gezeigt werden, dass es keinen Unterschied macht, ob das AppA-Protein plasmid- oder chromosomenexprimiert ist. Wie im Wildtyp 2.4.1 war ein Abfall der *puc*-Repression erst nach einer Bestrahlung mit weniger als $0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht sichtbar. Bei einer Bestrahlung mit $0,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ war nur noch eine geringe Inhibition sichtbar, während $0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - wie auch im Wildtyp - keinen Effekt mehr besaßen.

3.4.3 Blaulichtsensitivität der Photosyntheseexpression in der BLUF - Mutante *R. sphaeroides* App11::appAW104F

Führte man die für den Wildtyp durchgeführte Blaulichttitration (Abschnitt 3.1.1) mit dem *R. sphaeroides* App11::appAW104F - Stamm durch und verglich sie mit den Daten des Wildtyps 2.4.1, fiel dieser durch die deutlich geringere Sensitivität gegen Blaulicht auf und es konnte schon bei deutlich höheren Blaulichtintensitäten keine Repression der *puc* - Expression mehr beobachtet werden (Abbildung 37). Die Aminosäure Tryptophan 104 konnte *in vitro* nicht als direkt am Photozyklus involviert identifiziert werden (Masuda *et al.*, 2007) und neuere Studien zweifeln eine direkte Rolle im Photozyklus an (Dragnea *et al.*, 2009). Gleichzeitig konnte allerdings gezeigt werden, dass die durch Blaulichtbestrahlung verursachte Strukturänderung des AppA - Proteins in einer Tryptophan 104 - Mutante verkürzt war und die im Wildtyp zu beobachtende Veränderung des an die Chromophore angelagerten β - sheets nicht mehr bei gleichstarker Bestrahlung stattfand. *In vitro* konnte eine deutlich schnellere Wiederherstellung des AppA - Proteins nach Bestrahlung mit Blaulicht aus der inaktiven Form zurück in die aktive, PpsR - bindende beobachtet werden.

Im App11::appAW104F - Stamm war ein leichter Abfall der *puc* - Repression bereits nach einer Bestrahlung mit $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht sichtbar. Bei einer Bestrahlung mit 5 und $2,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ war bereits ein geringeres Inhibitionslevel als im Wildtyp nach einer $0,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nachweisbar. Bestrahlung mit $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ führte zu keiner Veränderung der *puc* - Expression, während der Wildtyp unter diesen Bedingungen noch die volle Inhibition zeigte.

Die isolierte BLUF - Domäne zeigte *in vitro* nach der Bestrahlung mit Blaulicht eine schnellere (um das 3 - 7 fache) Rückkehr der Konformation des Proteins in den unbelichteten Ausgangszustand (Laan *et al.*, 2006). Daher ist, aufgrund der veränderten Quanteneffizienz, eine größere Lichtintensität nötig, um die gleiche Menge Protein in den belichteten Zustand zu bringen. Im Rahmen der Kooperation mit der Universität Amsterdam wurde daher von Dr. Johnny Hendriks berechnet, inwiefern die geringere *in vivo* - Lichtsensitivität des Proteins mit den vorhandenen *in vitro* - Daten übereinstimmt. Die durchgeführte Berechnung der Wiederherstellungsrate des Ursprungszustands des Proteins, zeigte in der App11::appAW104F - Mutante *in vivo* vergleichbare Werte, wie sie für die isolierte BLUF - Domäne bereits *in vitro* berechnet werden konnten (siehe Supplementary Material Metz *et al.*, 2010)

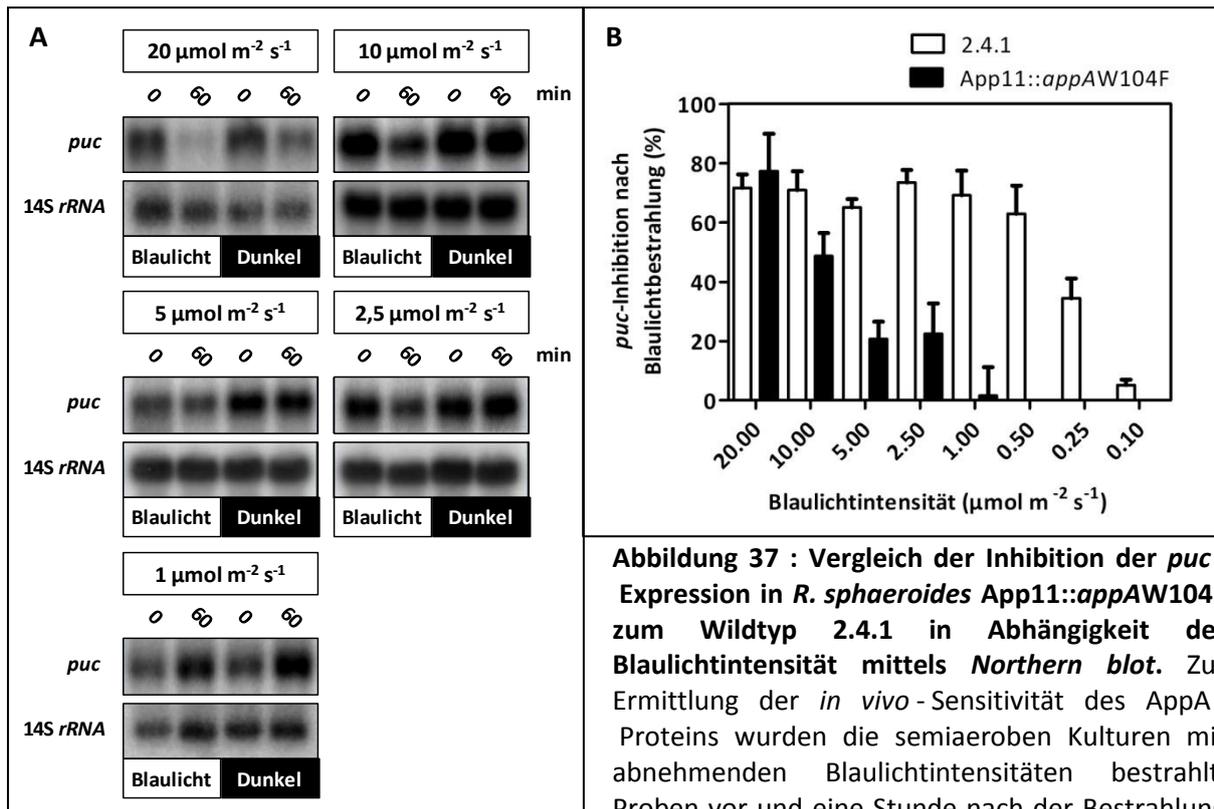


Abbildung 37 : Vergleich der Inhibition der *puc*-Expression in *R. sphaeroides* App11::*appAW104F* zum Wildtyp 2.4.1 in Abhängigkeit der Blaulichtintensität mittels Northern blot. Zur Ermittlung der *in vivo*-Sensitivität des AppA-Proteins wurden die semiaeroben Kulturen mit abnehmenden Blaulichtintensitäten bestrahlt, Proben vor und eine Stunde nach der Bestrahlung

genommen, die RNA isoliert und ein Northern blot mit einer *puc*- und einer 14S *rRNA*-spezifischen Sonde durchgeführt (A). Die *phosphoimaging* Signale wurden anschließend quantifiziert. Die prozentuale *puc*-Repression in *R. sphaeroides* App11::*appAW104F*, in Abhängigkeit von der Lichtintensität, (B) errechnet sich aus den Ratios der mRNA-levels der bestrahlten Kulturen im Verhältnis zu den Dunkelkulturen, nachdem diese auf die *rRNA*-Ladekontrolle normalisiert wurden. Die prozentuale Inhibition wurde anhand von Formel 3 (siehe Abschnitt 2.4.13) errechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und maximale Abweichungen von zwei unabhängigen Experimenten. Zum Vergleich sind außerdem die Inhibitionswerte des Wildtyps 2.4.1 mit aufgeführt (Abbildung 17).

Neben der reduzierten Lichtempfindlichkeit der App11::*appAW104F*-Mutante, fiel ebenfalls auf, dass diese nach längerem Wachstum und beim Erreichen höherer OD₆₆₀-Werte deutlich schwächer pigmentiert war, als die anderen Mutanten. Die in Abbildung 38 dargestellten Gesamtzellabsorptionsspektren der BLUF-Mutanten, im Vergleich zum Stamm mit dem plasmidexprimierten Wildtypprotein, zeigten den Unterschied deutlich. Alle Pigmente in der App11::*appAW104F*-Mutante waren deutlich schwächer als in den anderen Mutanten exprimiert und die Hauptabsorptionspeaks für den LHC I und LHC II erreichten noch keine 50% des Wertes der anderen Stämme.

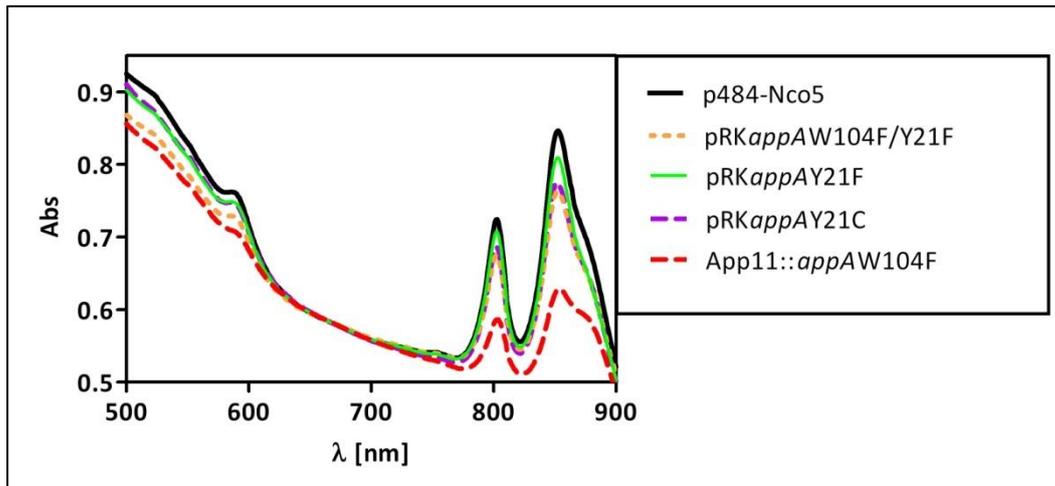


Abbildung 38: Gesamtzellabsorptionsspektren von *R. sphaeroides* App11 p484-Nco5, pRKappAW104F/Y21F, pRKappAY21F, pRKappAY21C und *R. sphaeroides* App11::appAW104F nach Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen. Proben wurden bei einer OD_{660} von 0,8 aus mikroaerob wachsenden Kulturen entnommen.

3.4.4 Blaulichtsensitivität der Photosyntheseexpression in der BLUF - Mutante *R. sphaeroides* App11 pRKappAY21F bzw. Y21C

Ein vollständiger Verlust der Blaulichtsensitivität konnte in den Austauschmutanten für das hochkonservierte Tyrosin 21 beobachtet werden. Diese Aminosäure ist, zusammen mit dem ebenfalls hochkonservierten Glutamin 63, hauptverantwortlich für den fast 30 min andauernden rot - *shift* im UV / VIS - Spektrum des AppA - Proteins nach Bestrahlung mit Blaulicht. Beide Aminosäuren sind zusammen für die Wasserstoffbrückenbindung mit dem N_5 des FAD und somit für die Weiterleitung des Signals der Chromophore an das Protein verantwortlich. So konnte *in vitro* keinerlei Photozyklus nach Bestrahlung des Proteins mit Blaulicht festgestellt werden.

Kulturen der klonierten *R.s.* App11 pRKappAY21F - und App11 pRKappAY21C - Mutanten wurden zunächst ebenfalls mit $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht bestrahlt und die auftretende Repression des *puc* - Operons untersucht (Abbildung 39). Es konnte dabei keinerlei Repression beobachtet werden. Stattdessen war nur ein etwa 50 %iger Anstieg der *puc* - Expression sichtbar, welcher jedoch bei der anschließenden Bestrahlung mit $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nicht mehr zu beobachten war. Damit zeigte das Protein nur bei $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ das erwartete Ausbleiben des Photozyklus und die stärkere Bestrahlung mit $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zeigte, statt der im Wildtyp messbaren Repression der Photosynthesegene, einen leichten Anstieg der Genexpression. Ob der Aminosäureaustausch des Tyrosins zu Phenylalanin oder Cystein erfolgte, machte keinen Unterschied.

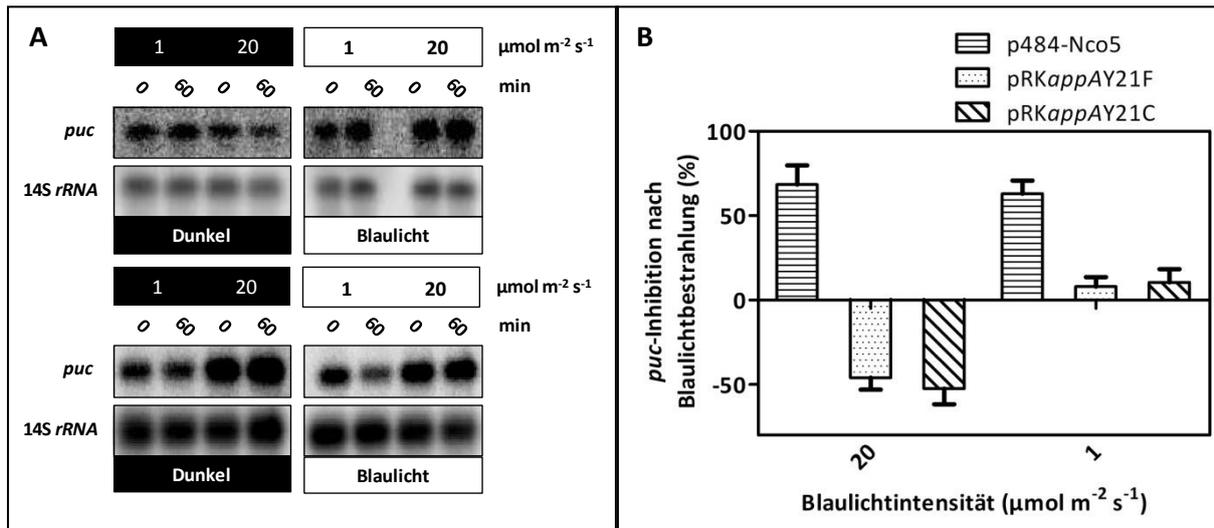


Abbildung 39 : Vergleich der Inhibition der *puc* - Expression in *R. sphaeroides* App11 pRKappAY21F und pRKappAY21C zu *R. sphaeroides* App11 p484-Nco5 in Abhängigkeit von der Blaulichtintensität mittels Northern blot. Zur Ermittlung der *in vivo* - Sensitivität des AppA - Proteins wurden die semiaeroben Kulturen mit abnehmenden Blaulichtintensitäten bestrahlt, Proben vor und eine Stunde nach der Bestrahlung genommen, die RNA isoliert und ein Northern blot mit einer *puc* - und einer 14S *rRNA* - spezifischen Sonde durchgeführt (A). Die *phosphoimaging* - Signale wurden anschließend quantifiziert. Die prozentuale *puc* Repression in *R. sphaeroides* App11 pRKappAY21F bzw. pRKappAY21C, in Abhängigkeit von der Lichtintensität (B), errechnet sich aus den Ratios der mRNA - levels der bestrahlten Kulturen im Verhältnis zu den Dunkelkulturen, nachdem diese auf die *rRNA* - Ladekontrolle normalisiert wurden. Die prozentuale Inhibition wurde anhand von Formel 3 (siehe Abschnitt 2.4.13) errechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und maximalen Abweichungen von zwei unabhängigen Experimenten. Zum Vergleich sind außerdem die Inhibitionswerte des plasmidexprimierten Wildtypproteins von p484-Nco5 mit aufgeführt (Abbildung 36).

Ein vergleichbarer Anstieg der *puc* - Expression konnte unter anaeroben Bedingungen beobachten werden (Abschnitt 3.1.1). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob ein ähnlicher Effekt wie im Wildtyp ebenfalls nachweisbar ist, wenn die gesamte BLUF - Domäne am Protein nicht mehr vorhanden ist (App11 p484 - Nco5 Δ N (Gomelsky und Kaplan, 1995)). Damit geht die Lichtregulation durch das AppA - Protein vollständig verloren, während die Expression der Photosynthesegene gleichzeitig noch durch die Bindung von PpsR an den C - Terminus ermöglicht ist. Dieser Anstieg wird unter anaeroben Bedingungen durch PrrA / PrrB verursacht. Dieser ebenfalls lichtabhängige Effekt ist normalerweise unter semiaeroben Bedingungen nicht sichtbar, da die Bestrahlung mit Blaulicht AppA von PpsR löst und so die Expression der Photosynthesegene vollständig zum Erliegen kommt. Die Expression des *puc* - Operons wurde nach Bestrahlung mit $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Wildtyp 2.4.1 und der BLUF - Domänen - Mutante App11 p484 - Nco5 Δ N verglichen und es wurde untersucht, ob und für wie lange ein vergleichbarer Anstieg der Expression auch unter semiaeroben Bedingungen in dieser Mutante sichtbar war (Abbildung 40).

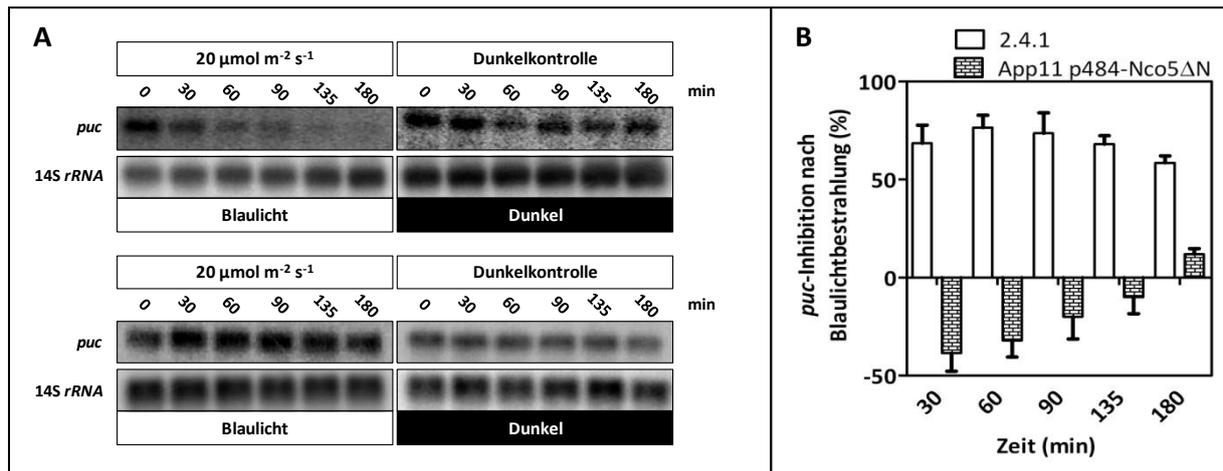


Abbildung 40 : Vergleich der Inhibition der *puc*-Expression in *R. sphaeroides* 2.4.1 und App11 p484-Nco5ΔN in Abhängigkeit von der Zeit mittels Northern blot. Zur Ermittlung der *puc* Repression wurden die semiaeroben Kulturen ab dem Zeitpunkt t_0 mit $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht bestrahlt, Proben zu den angegebenen Zeitpunkten genommen, die RNA isoliert und ein Northern blot mit einer *puc*- und einer 14S *rRNA*-spezifischen Sonde durchgeführt (**A**). Die *phosphoimaging* Signale wurden anschließend quantifiziert. Die prozentuale *puc* Repression in *R. sphaeroides* 2.4.1 und App11 p484-Nco5ΔN, in Abhängigkeit von der Zeit (**B**), errechnet sich aus den Ratios der mRNA-levels der bestrahlten Kulturen im Verhältnis zu den Dunkelkulturen, nachdem diese auf die *rRNA*-Ladekontrolle normalisiert wurden. Die prozentuale Inhibition wurde anhand von Formel 3 (siehe Abschnitt 2.4.13) errechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und maximalen Abweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Bestrahlung des plasmidexprimierten AppA-Proteins ohne BLUF-Domäne mit $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zeigte einen Anstieg der *puc*-Expression auf etwa 40 % nach 30 min. Danach kam es zu einem stetigen Abnehmen der Expression bis nach 135 min fast keine Repression (>10 %) mehr nachweisbar war. Damit konnte in der Mutante mit vollständig fehlender BLUF-Domäne ein nahezu identisch starker Anstieg der Expression bei Bestrahlung mit $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wie in den beiden Tyrosin 21-Mutanten beobachtet werden. Im Vergleich dazu zeigt der Wildtyp eine gleichbleibend starke Repression des *puc*-Operons mit einer leichten Abnahme der *puc*-Repression zum Ende des Versuchszeitraums.

Da der gleiche Anstieg der *puc*-Expression nach Bestrahlung mit $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, der in den beiden Tyrosin 21-Mutanten beobachtet wurde, auch in der AppA-Mutante mit dem plasmidexprimierten C-Terminus sichtbar war, kann davon ausgegangen werden, dass eine Mutation des Tyrosins 21 *in vivo* ebenfalls zu einem vollständigem Verlust der Blaulichtsensitivität des Proteins führt.

3.4.5 Blaulichtsensitivität der Photosyntheseexpression in der BLUF-Mutante *R. sphaeroides* App11 pRKappAW104F/Y21F

Bei den Genexpressionsanalysen der W104F/Y21F-Doppelmutation wurde aufgrund der Ergebnisse der Tyrosin-Mutanten (Abschnitt 3.4.4) erwartet, dass diese *in vivo* keinerlei Einfluss auf die Photosyntheseexpression hat, da ohne die maßgebliche Rolle des Tyrosin 21 bei der Wasserstoffbrückenbildung mit dem FAD auch die Mutation im Tryptophan 104 keine Rolle hätte spielen sollen. Um den Effekt der Doppelmutation zu untersuchen, wurde die

Mutante, wie auch die anderen Mutanten, zunächst mit einer starken Dosis Blaulicht bestrahlt ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Abbildung 41). Es konnte eine zum Wildtyp vergleichbare, starke Repression der *puc*-Expression beobachtet werden. Da die Tryosin 21-Mutationen keinen direkten AppA / PpsR-abhängigen Einfluss auf die Photosynthesegene nach der Bestrahlung mit Blaulicht zeigten, wäre dies auch für die Doppelmutante zu erwarten gewesen. Dass dieser Effekt auch nach Bestrahlung mit $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht sichtbar war, zeigt außerdem, dass die Doppelmutante nicht die geringere Blaulichtsensitivität besitzt, die in der W104F-Mutante beobachtet werden konnte.

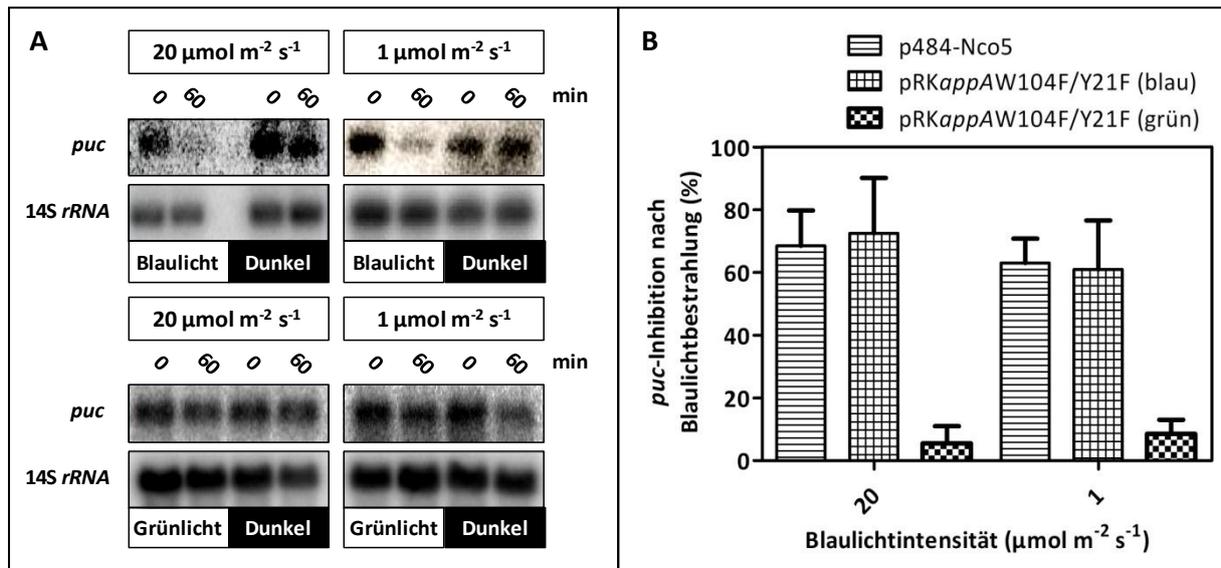


Abbildung 41: Vergleich der Inhibition der *puc*-Expression in *R. sphaeroides* App11 prKappAW104F/Y21F zu *R. sphaeroides* App11 p484-Nco5 in Abhängigkeit von der Blau- bzw. Grünlichtintensität mittels Northern blot. Zur Ermittlung der *in vivo*-Sensitivität des AppA-Proteins wurden die semiaeroben Kulturen mit abnehmenden Blau- und Grünlichtintensitäten bestrahlt, Proben vor und eine Stunde nach der Bestrahlung genommen, die RNA isoliert und ein Northern blot mit einer *puc*- und einer 14S *rRNA*-spezifischen Sonde durchgeführt (**A**). Die phosphoimaging Signale wurden anschließend quantifiziert. Die prozentuale *puc*-Repression in *R. sphaeroides* prKappAW104F/Y21F, in Abhängigkeit von der Lichtintensität (**B**), errechnet sich aus den Ratios der mRNA-Level der bestrahlten Kulturen im Verhältnis zu den Dunkelkulturen, nachdem diese auf die *rRNA*-Ladkontrolle normalisiert wurden. Die prozentuale Inhibition wurde anhand von Formel 3 (siehe Abschnitt 2.4.13) errechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und maximale Abweichungen von zwei unabhängigen Experimenten. Zum Vergleich sind außerdem die Inhibitionswerte des plasmidexprimierten Wildtypproteins von p484-Nco5 mit aufgeführt (Abbildung 36.)

Da in der Doppelmutante *in vitro* eine Anhäufung von Semichinon-FAD nachgewiesen werden konnte (Gauden *et al.*, 2005; Gauden *et al.*, 2007) und dieses ein Absorptionsmaximum bei 540 nm Grünlicht besitzen, wurde im Folgenden untersucht, ob die starke *puc*-Repression nicht über die Anregung dieser Nebenprodukte des Photozyklus stattgefunden haben könnte. Die Zellen wurden mit der gleichen Intensität an Grünlicht (Transmissionsspektrum des Filters, siehe Anhang Abbildung 74) bestrahlt, die auch für die Blaulichtanregung verwendet wurde. Es konnte jedoch keinerlei Effekt auf die Expression der Photosynthesegene beobachtet werden.

Um die im Northern blot gesammelten Daten zu bestätigen, wurden anschließend die Experimente wiederholt und mittels der sensitiveren *real time* RT-PCR die Expression des *pucB*-Gens quantifiziert (Abbildung 42). Es konnten alle im Northern blot ermittelten Daten bestätigt

werden. So zeigen das plasmidexprimierte Wildtypprotein und die Doppelmutante nach Bestrahlung mit 20 und 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ eine vergleichbare Abnahme der Genexpression, während die Bestrahlung mit 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in den beiden Tyrosin 21 Mutanten erneut zu einem Anstieg der *puc*-Expression führte. Mittels *real time RT-PCR* konnte zudem die *puc*-Expression in der AppA-Mutante App11 mitbestimmt werden. Da in der AppA-Mutante das PpsR-Protein immer frei vorliegt, ist es nicht möglich, im *Northern blot* ein Signal für die Photosynthesegene nachzuweisen. In der App11-Mutante war keine Veränderung in der Genexpression nach Bestrahlung mit Blaulicht sichtbar, wobei zu beobachten war, dass der *ct*-Wert, bei dem die Fluoreszenz in der Mutante den *threshold* in der *real time RT-PCR* überschreitet, um fast acht Zyklen höher ist (ca. 512x weniger Transkripte in der Mutante)

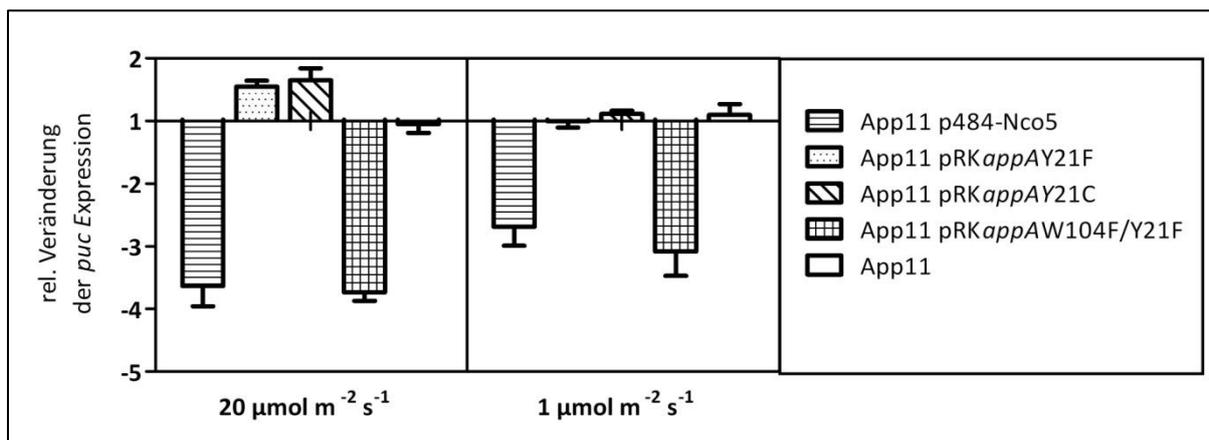


Abbildung 42: Bestimmung der Expressionslevel von *pucB* (RSP_0314) in semiaeroben *R. sphaeroides* App11⁻, p484-Nco5⁻, pRKappAY21F⁻, pRKappAY21C⁻, pRKappAW104F/Y21F⁻-Kulturen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Blaulichtintensitäten mittels *real time RT-PCR*. Die Kulturen wurden semiaerob herangezogen und mit Blaulicht (450 nm) der angegebenen Intensität bestrahlt. Die Probenentnahme erfolgte 60 min nach Induktion der Kulturen mit dem Blaulicht. Mittelwerte mit Standardabweichung von drei Experimenten sind dargestellt.

Anhand der durchgeführten Blaulichtexperimente an den BLUF-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die *in vivo*-Eigenschaften der Mutationen in den meisten Fällen mit den *in vitro* beobachteten Eigenschaften übereinstimmen. So konnte für die W104F-Mutation eine geringere Blaulichtsensitivität beobachtet werden, während die beiden Y21-Mutationen keine AppA-abhängige Blaulichtregulation zeigten. Die einzige Ausnahme bildete die W104F/Y21F-Mutation, die *in vivo* eine hohe Blaulichtsensitivität zeigte, während *in vitro* ein, der Y21F/C vergleichbarer, Verlust des Photozyklus auftrat.

3.5 Yeast - Two - Hybrid - Interaktionsstudien mit dem LOV - und dem CryB - Protein von *R. sphaeroides*

Neben dem AppA-Protein sind in den letzten Jahren zwei interessante Blaulichtrezeptoren in *R. sphaeroides* identifiziert worden. Zum einen das LOV-Protein

(Hendrischk *et al.*, 2009b) und zum anderen das CryB - Protein (Hendrischk *et al.*, 2009a). Sowohl das LOV - Protein als auch das CryB - Protein besitzen keine der üblicherweise zu findenden, C - terminalen Ausgangsdomänen was bedeutet, dass sie zwar das Lichtsignal aufnehmen können, aber gleichzeitig keine Möglichkeit haben es weiterzuleiten. Eine Alternative stellt dabei die direkte Interaktion mit einem anderen Protein dar, welches dann die Signaltransduktion übernimmt. Daher wurden über ein *Yeast - Two - Hybrid* - System Interaktionsstudien gegen beide Proteine durchgeführt.

Zur genaueren Eingrenzung der möglichen Funktionen des LOV - und CryB - Proteins wurde daher eine Genombibliothek mit chromosomaler DNA von *R. sphaeroides* 2.4.1 erstellt und anschließend mittels des *Matchmaker*TM (*Clontech*) *Yeast - Two - Hybrid* - Systems gegen beide Proteine *gescreent*. Dabei macht man sich zu Nutze, dass sich der eukaryotische GAL4 Transkriptionsregulator von *S. cerevisiae* aus einer DNA-Bindedomäne (DNA - BD) und einer Aktivatorodomäne (AD) zusammensetzt, welche nur bei physikalischer Nähe der beiden Untereinheiten einen transkriptionssteigernden Einfluss auf die Genexpression haben. Werden beide Domänen von zwei Vektoren in der Zelle coexprimiert, kommt es zu keiner Aktivierung der Genexpression. Es kann ein deutlicher Anstieg der Expression beobachtet werden, wenn beide Domänen nahe aneinander gebracht werden und somit die ursprüngliche Funktion des Proteins wiederhergestellt wird (Abbildung 43). Dies macht man sich im *screening* nach Interaktionspartnern mit dem *Yeast - Two - Hybrid* - System zu Nutze, indem das zu testende Protein (in unserem Fall LOV bzw. CryB), mit der DNA - Bindedomäne des GAL4 - Proteins fusioniert, exprimiert wird. Die Expression der Fragmente der Genombibliothek findet mit der Aktivatorodomäne fusioniert statt. Nach einer Cotransformation beider Vektoren in eine Zelle kann die Interaktion des zu testenden Proteins mit dem Genprodukt des Fragmentes aus der Genombibliothek zu Aktivierung der Transkription des Reportergens führen, was wiederum ein Hinweis auf eine mögliche Interaktion ist.

Im Falle des *Matchmaker*TM *Yeast - Two - Hybrid* - Systems handelt es sich dabei um das *lacZ* - Protein, so dass die β - Galaktosidase Aktivität als Maß der Stärke der Interaktion verwendet werden kann. Zudem stehen Gene für die Histidin-, Tryptophan und Adeninsynthese ebenfalls unter Kontrolle des GAL4 Promotors, so dass nur Zellen mit einer positiven Interaktion auf Selektionsplatten ohne diese Aminosäuren wachsen können. Die so positiv getesteten Genomfragmente in den Hefeklonen können anschließend sequenziert und die möglichen Interaktionspartner genau identifiziert werden.

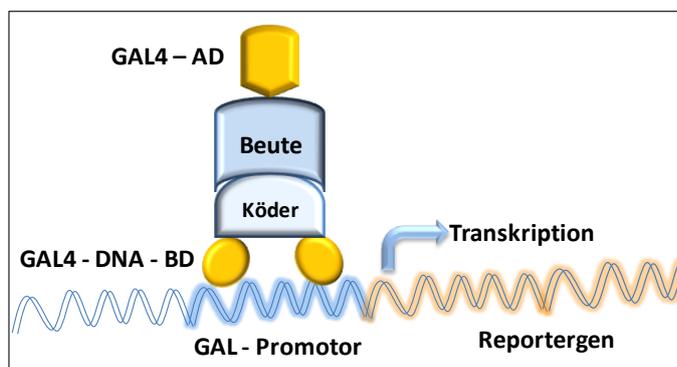


Abbildung 43 : Schematische Darstellung der Funktionsweise des *Yeast - Two - Hybrid* - Systems. Die Interaktion des Köderproteins (in diesem Fall LOV bzw. CryB) mit dem Beuteprotein (verschiedene Genprodukte aus der Genombibliothek) bringt die GAL4 - DNA - Bindedomäne (DNA - BD) in räumliche Nähe der GAL4 - Aktivatorodomäne (AD) und aktiviert so die Expression des Reportergens.

Während die Planung der Klonierungstrategie und die Betreuung eigenständig erfolgte, wurden Interaktionsassays und Klonierungen von der technische Assistentin Kerstin Haberzettl durchgeführt.

3.5.1 Untersuchungen zur direkten Interaktion von CryB mit bekannten Regulatorproteinen

Für das CryB - Protein konnte eine direkte Wirkung auf die Expression der Photosynthesegene identifiziert werden (Hendrischk *et al.*, 2009a). Daher wurde neben dem *screening* mit der Genombibliothek auch eine Interaktion mit bekannten Regulatorproteinen der Photosynthese untersucht. Dazu wurde direkt das gesamte Protein mit der Aktivator-domäne fusioniert und auf eine mögliche Bindung getestet. Während die durchgeführten Tests für eine Interaktion des PpsR - Proteins mit CryB keine Ergebnisse lieferten, wuchsen die Klone mit einer AppA fusionierten Aktivator-domäne auf allen Selektionsmedien und es konnte im β - Galaktosidase - *assay* eine Aktivität von etwa 40 % der Positivkontrolle (SV40 gegen p53) erzielt werden (Abbildung 44).

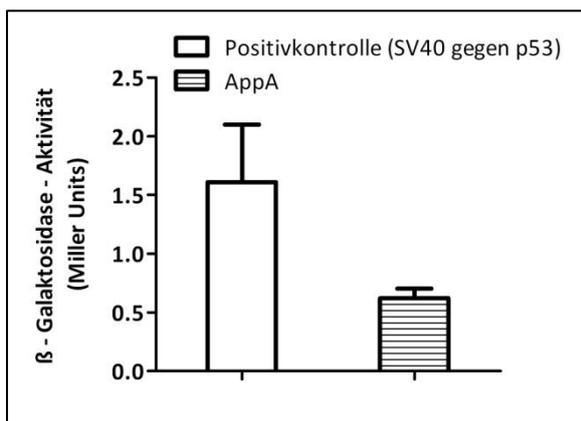


Abbildung 44 : β - Galaktosidase - Aktivität der im Yeast - Two - Hybrid *screening* getesteten AppA - Klone. Die angegebenen β - Galaktosidase Werte in Miller Units für die einzelnen Messungen errechnen sich aus den Mittelwerten der Aktivität aller getesteten Klone (6) und der maximalen Abweichung vom Mittelwert. Im Vergleich ist die Positivkontrolle (SV40 gegen p53) dargestellt (durchgeführt von Kerstin Haberzettl).

3.5.2 MBP - und GST - tag pulldown Analysen zur Interaktion von AppA und CryB

Das *Yeast - Two - Hybrid* - System kann nur als erster Hinweis auf die Interaktion zweier Proteine interpretiert werden. Als nächster Schritt wurde über *pulldown* Analysen versucht, die Interaktion der beiden Proteine erneut zu zeigen. Dabei wird eines der Proteine an eine feste Matrix gebunden und mit Zelllysat inkubiert, welches den möglichen Interaktionspartner enthält. Nach mehreren Waschschritten wird das an die Matrix gebundene Protein eluiert und im Idealfall wird der Interaktionspartner ebenfalls in den Elutionsfraktionen zu finden sein.

Im Folgenden wurde das vollständige AppA - Protein, welches an das Maltose - Binde - Protein (MBP) fusioniert vorliegt (Braatsch, 2002), an Amylose - Agarose gebunden. Das Maltose - Binde - Protein erhöht zum einen die Löslichkeit des ansonsten unlöslichen AppA und wird zum anderen spezifisch durch die an die Agarose konjugierte Amylose angelagert. Anschließend wurde das gebundene AppA - Protein mit Zelllysat des *R. sphaeroides* CryB - Überexpressionsstamm (2.4.1 pRKpuf - Promotors (Konzer, 2008). Nach

mehreren Waschschritten wurde das AppA-MBP zusammen mit allen möglichen Interaktionspartnern von der Amylose - Agarose durch Zugabe eines Überschusses an Maltose verdrängt. Die Eluate wurden gesammelt und per *Western blot* auf das Vorhandensein von CryB untersucht (Abbildung 45). Neben der Interaktion mit dem MBP konjugierten AppA - Protein, wurde auch die Interaktion von CryB mit dem überexprimierten C - Terminus von AppA (AppA Δ N (Han, 2006)) untersucht, da dieser auch für die Interaktion mit PpsR ausreicht. Das Prinzip des *pulldowns* ist vergleichbar, wobei die Bindung des AppA - Proteins über Glutathion - Sepharose erfolgte. Zusätzlich wurden die Eluate auch per *Western blot* auf das Vorhandensein von LOV getestet, um eine mögliche unspezifische Bindung von Proteinen an die Amylose - Agarose auszuschließen.

Die durchgeführten *Western blots* konnten die im *Yeast - Two - Hybrid - System* gezeigte Interaktion von AppA und CryB bestätigen. So wurde, zusammen mit dem an die Amylose - Agarose gebundenen AppA - MBP, eine große Menge an CryB eluiert. Ein *Western blot* gegen das LOV Protein zeigte keine Coelution der beiden Proteine, weshalb keine unspezifische Interaktion des AppA - MBP- Proteins mit anderen Proteinen stattfindet. War kein AppA-MBP an die Agarose gebunden, konnte auch kein CryB coeluiert werden, was eine unspezifische Bindung des Proteins an die Agarose ausschließt. Der *pulldown* mit an Glutathion - Sepharose gebundenen AppA Δ N führte ebenfalls zum Nachweis von CryB in den Eluat, was einen Hinweis darauf gibt, dass der C - Terminus des Proteins für die Interaktion ausreicht. LOV wurde nicht gebunden und eine Interaktion zwischen AppA und dem LOV - Protein kann daher ausgeschlossen werden.

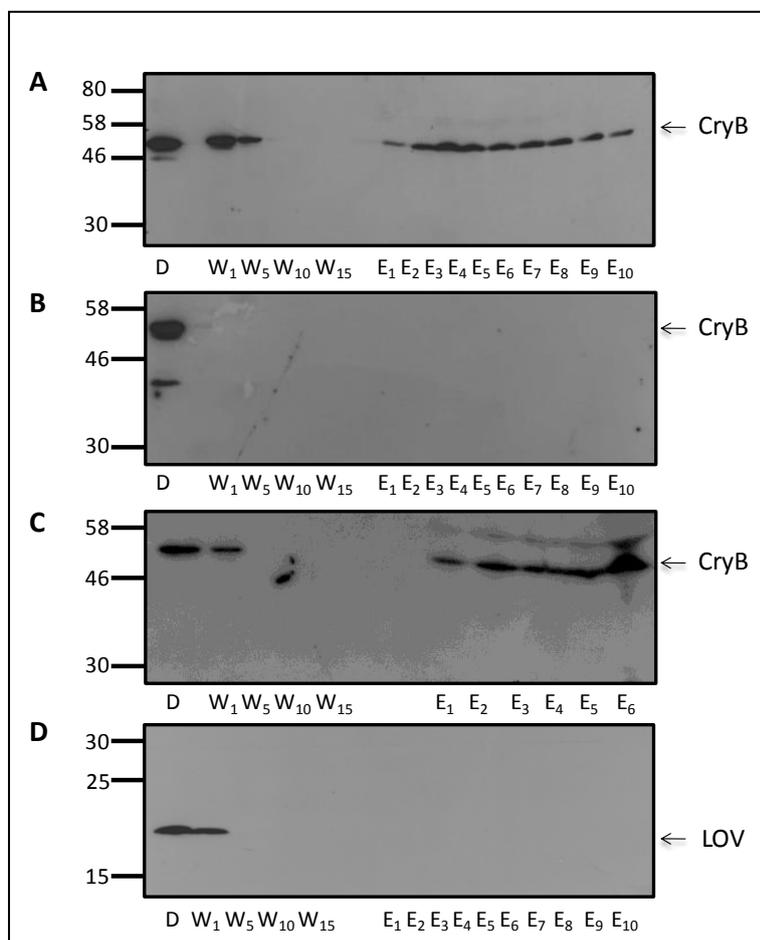


Abbildung 45 : Western blot Analysen der mit AppA und CryB durchgeführten pulldown Experimente. Für die *Western blots* wurden 12 %ige SDS-Gele mit je 2 μ l des Durchflusses (D), 35 μ l der Waschschriffe (W₁₋₁₅), sowie 35 μ l der Elutionsschritte (E₁₋₁₀) beladen. In den *pulldown* - Experimenten wurde an die Amylose - Agarose gebundenes AppA-MBP mit Zelllysate der CryB - Überexpressionsmutante (A und D) inkubiert. Als Negativkontrolle diente die Inkubation des CryB Zelllysates ohne vorheriges Beladen der Agarose mit AppA - MBP (B). Desweiteren wurde der C - Terminus von AppA (AppA Δ N) ebenfalls mit dem Zelllysate der CryB - Überexpressionsmutante inkubiert (C). Ein polyklonaler Antikörper gegen CryB (*anti CryB rabbit*, A-C) bzw. LOV (*anti LOV rabbit*, D) diente als primärer Antikörper. Der Nachweis erfolgte über die Meerrettich Peroxidase.

3.5.3 Gel Retardations - assay zur Analyse der Interaktion von AppA und CryB

Eine Interaktion von AppA und CryB konnte sowohl mittels *pulldown* als auch im *Yeast - Two - Hybrid - System* nachgewiesen werden. Daher wurde als nächstes eine mögliche Wirkung des CryB - Proteins auf die Interaktion von AppA und PpsR bei der Regulation der Genaktivität untersucht. Es wurden Gel Retardations - assays mit der *upstream* Region des *pucB* Gens (siehe Anhang Abbildung 72) durchgeführt, da dieses durch AppA / PpsR reguliert wird und eine starke PpsR - Bindung beobachtet werden kann. Man macht sich zu Nutze, dass die Zugabe von PpsR und somit dessen Bindung an die DNA zu einer verlangsamten Wanderung der DNA im Gel führt. Gibt man dann steigende Mengen AppA hinzu, bindet dieses das PpsR - Protein und die DNA liegt wieder frei vor und wandert wieder schneller im Gel (Abbildung 46).

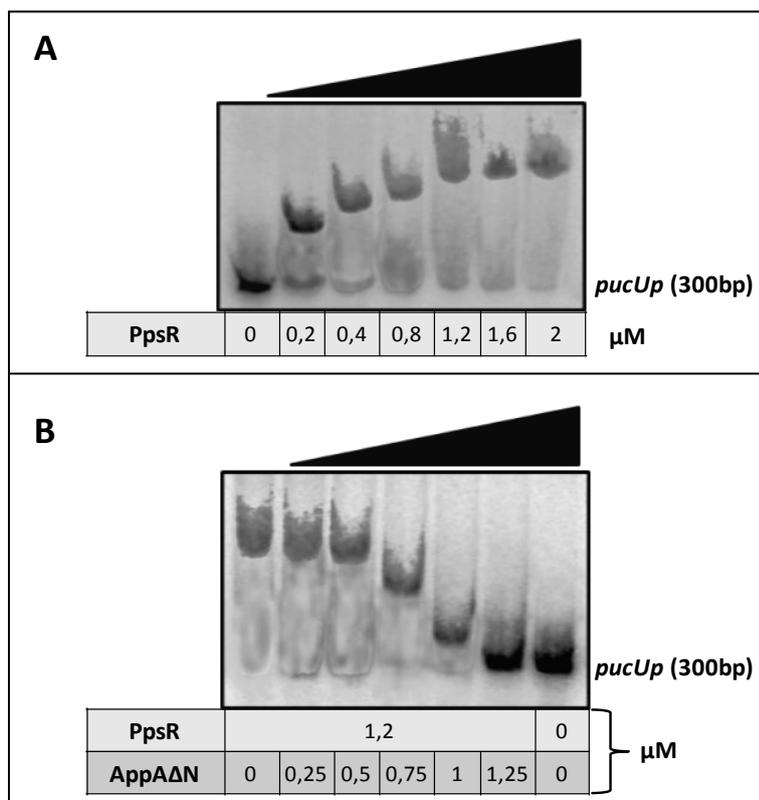


Abbildung 46 : Gel Retardations - assay zur Überprüfung der für einen Gelshift der *upstream* Region von *puc* benötigten Proteinmenge von PpsR und AppAΔN. Das verwendete 300bp DNA - Fragment *upstream* des Transkriptionsstart von *pucB* (RSP_0314) enthält eine *tandem* - Bindestelle für das PpsR - Protein. Es wurden 100 fmol des DNA Fragments pro Spur geladen. Anschließend wurden steigende Mengen PpsR **(A)** bzw. gleichbleibende Mengen PpsR und ansteigende Mengen AppAΔN **(B)** hinzu gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei erfolgten die Inkubation und der Gellauf in vollständiger Dunkelheit.

Die durchgeführten Gel Retardations - assays zeigen, dass der maximale *shift* der *pucUp* - Bande durch eine Konzentration von 1,2 µM erzielt werden konnte. Daher wurde diese Konzentration für die weiteren assays als Referenzmenge verwendet. In den *pulldown* - Analysen konnte gezeigt werden, dass der C - Terminus von AppA ausreicht, um die Interaktion zu gewährleisten, weshalb dieser in steigenden Mengen zu 1,2 µM PpsR gegeben wurde. Es konnte eine reversible Wirkung von AppAΔN auf den *shift* der DNA beobachtet werden, die jedoch erst ab einer Konzentration von 0,75 µM einsetzte und bei der etwa gleichen Konzentration wie der des eingesetzten PpsR (1,25 µM) vollständig war.

Die Bindung von PpsR an die *upstream* Region von *pucB*, sowie die Interaktion mit AppA *in vitro*, konnte nachgewiesen werden und es wurde anschließend ein Überschuss an überexprimiertem CryB (Hendrischk *et al.*, 2009a) hinzugegeben und der Gel Retardations -

assay wiederholt. Die Inkubation der überexprimierten Proteine, sowie der Gellauf erfolgten dabei zum einen im Dunkeln und zum anderen bei $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht (Abbildung 47).

Vergleicht man den Verlauf der Retardation der *pucB upstream* Region mit und ohne CryB, konnte weder bei Licht noch im Dunkeln ein deutlicher Unterschied durch die Zugabe des Cryptochroms festgestellt werden. Die Konzentrationen bei der, der durch PpsR induzierte *shift* im Gel vollständig durch AppA Δ N aufgehoben wird, lag erneut bei einem leichten Überschusses und es wurde ein zur Negativkontrolle vergleichbarer Lauf der DNA im Gel erzeugt.

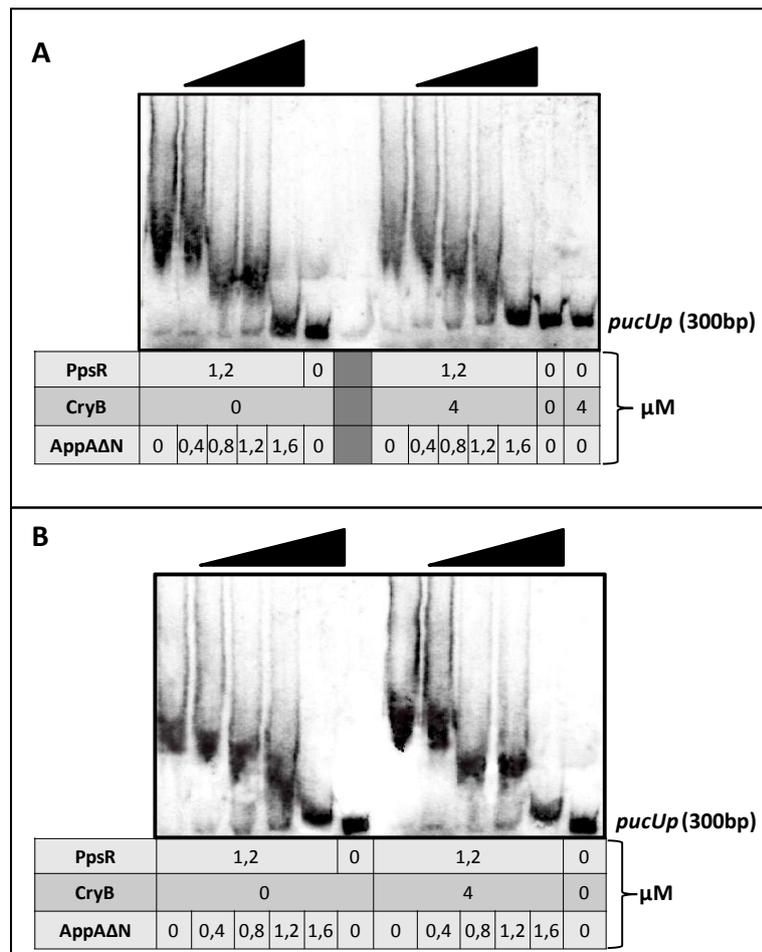


Abbildung 47 : Gel Retardations - assay zur Analyse einer möglichen Wirkung von CryB auf den Gelshift der upstream Region von *puc* durch AppA Δ N und PpsR. Das verwendete 300bp DNA - Fragment *upstream* des Transkriptionsstart von *pucB* (RSP_0314) enthält eine *tandem* - Bindestelle für das PpsR - Protein. Es wurden 100 fmol des DNA Fragments pro Spur geladen. Anschließend wurden die in Abbildung 46 B ermittelten AppA Δ N - und PpsR - Konzentrationen für einen Gelshift hinzugegeben und für 30 min mit (rechts) und ohne (links) die angegebene Menge CryB inkubiert. Dabei erfolgten die Inkubation und der Gellauf bei $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht (**A**) oder in vollständiger Dunkelheit (**B**).

Jüngste Ergebnisse (Mank, 2009) konnten eine Beteiligung der kleinen regulatorischen RNA 2430 (RSs_2430) an der Expression der Photosyntheseexpression nachweisen. Da ein genauer Mechanismus aber immer noch unbekannt ist, gleichzeitig für CryB jedoch eine hohe Affinität für die Bindung von RNA und einzelsträngiger DNA nachgewiesen werden konnte (Hendrichsk *et al.*, 2009a), wurde anschließend untersucht, ob die Zugabe von *in vitro* - Transkript der kleinen RNA dazu führt, dass das CryB - Protein einen Einfluss auf die Interaktion von AppA Δ N und PpsR hat. Die Inkubation und der Gellauf erfolgten dabei bei Dunkelheit, da im Licht gezeigt werden konnte, dass CryB zwar unspezifisch RNA bindet, jedoch keine stark strukturierte, wie z.B. die RSs_2430. Dabei wurden mehrere mögliche Kombinationen der Zugabe der einzelnen Komponenten des Gel - Retardations - assays getestet. Bei dem in Abbildung 48 dargestellten *assay* wurde zuerst RSs_2430, dann das CryB - Protein, dann AppA

und zuletzt PpsR hinzugegeben. Es wurde ebenfalls untersucht, ob es eine Auswirkung hat, wenn zuerst PpsR und AppA zur markierten DNA gegeben wurden und anschließend das CryB - Protein und die kleine RNA. Dabei konnte jedoch kein Unterschied festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

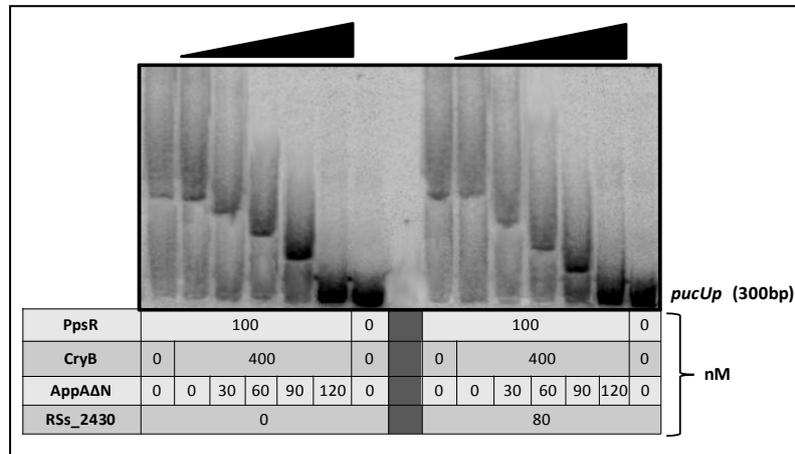


Abbildung 48 : Gel Retardations - assay zur Analyse einer möglichen Wirkung von RSs_2430 und CryB auf den Gelshift der upstream Region von puc durch AppAΔN und PpsR. Das verwendete 300bp DNA - Fragment *upstream* des Transkriptionsstart von *pucB* (RSP_0314) enthält eine *tandem* - Bindestelle für das PpsR - Protein. Es wurden 30 fmol des DNA Fragments pro Spur geladen. Die zugegebenen Proteinmengen wurden leicht reduziert (vgl. Abbildung 47), um das Verhältnis von CryB zu RSs_2430 anzugleichen, und für 30 min mit (rechts) und ohne (links) die angegebene Menge RSs_2430 inkubiert. Dabei erfolgten die Inkubation und der Gellauf bei vollständiger Dunkelheit.

Die durchgeführten Gel Retardations - assays mit RSs_2430 konnten ebenfalls keinen Effekt von CryB auf die Interaktion von AppAΔN und PpsR nachweisen. Die Zugabe von AppAΔN führte zu einem identischen Rückgang des durch PpsR verursachten *shift* der *pucB - upstream* - DNA mit und ohne die kleine RNA.

Da unter keinen Bedingungen ein Einfluss des CryB - Proteins auf die Interaktion von AppA / PpsR mit der *pucB - upstream* - DNA beobachtet werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass das CryB - Protein entweder keine direkte Wirkung auf das Zusammenspiel der beiden Proteine hat oder die gewählten *in vitro* - Bedingungen nicht die richtigen waren, um diese Wirkung sichtbar zu machen.

3.5.4 Auswirkungen der Überexpression des CryB - Proteins auf das Wachstum und die Pigmentbildung

Die Interaktionsstudien mit dem AppA - Protein zeigten zwar eine direkte Interaktion, führten aber zu keinen neuen Erkenntnissen zur genauen Regulation der Photosynthesegene durch das CryB - Protein. Daher wurden ebenfalls die bereits beschriebenen Auswirkungen des CryB - Proteins auf die Expression dieser Gene weiter untersucht. So war eine interessante Beobachtung, dass eine deutliche Verringerung der Gesamtzellspektren in einer CryB - Mutante ($\Delta cryB$) im Vergleich zum Wildtyp 2.4.1 festgestellt werden konnte. Eine Komplementation

(pRKcryB) des Proteins vom *low copy*-Plasmid pRK415 führte dabei nicht zu einer Wiederherstellung des Wildtypspektrums, sondern zu einer noch stärkeren Reduktion.

Da die höhere Kopienzahl von CryB scheinbar einen negativen Einfluss auf die Expression der Photosynthesegene hat, wurde daher untersucht, welchen Einfluss das Einbringen eines CryB - Überexpressionsvektors (pRKpufcryB) in die CryB - Mutante hat. Dieser Überexpressionsvektor exprimiert das *cryB* - Gen unter Kontrolle des sauerstoffabhängigen *puf* - Promotors (Konzer, 2008). Dieser sehr starke Promotor kann durch einen *shift* der Zellen von aeroben zu mikroaeroben Bedingungen aktiviert werden und zu einer, im Kontrast zur Komplementation, noch einmal deutlich höheren Expression führen.

Nach der Konjugation des Überexpressionsvektors in die CryB - Mutante fiel diese durch eine deutlich hellere Farbe auf. Verglich man anschließend die Gesamtzellspektren von Wildtyp, Mutante, Komplementation und Überexpression, zeigte sich in der Überexpression eine noch stärkere Reduktion der Photosynthesekomplexe als in der Komplementation (Abbildung 49).

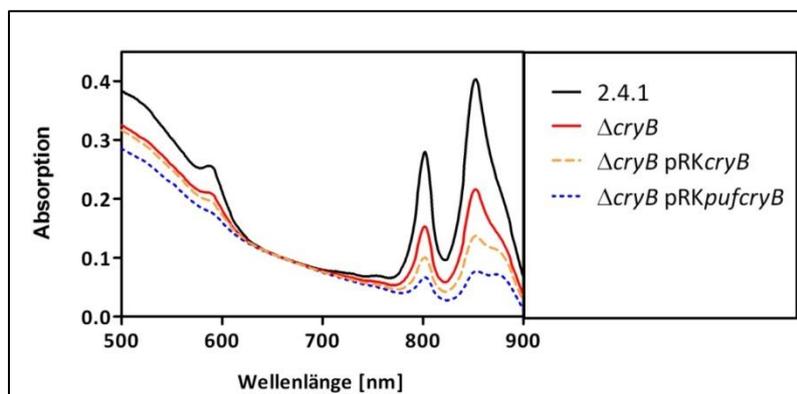


Abbildung 49 : Gesamtzellabsorptionsspektren von *R. sphaeroides* 2.4.1, $\Delta cryB$, $\Delta cryB$ pRKcryB, $\Delta cryB$ pRKpufcryB nach Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen. Proben wurden bei einer OD_{660} von 0,8 aus mikroaerob wachsenden Kulturen entnommen.

Gleichzeitig konnte, bei Betrachtung der Wachstumskurven der Kulturen beobachtet werden, dass der Überexpressionsstamm, bei Induktion des *puf* - Promotors, durch Heranziehen der Kulturen unter mikroaeroben Bedingungen, ein leicht verlangsamtetes Wachstum aufwies. Rein aerob herangezogene Zellen wachsen schneller und erreichen eine höhere maximale OD_{660} (Abbildung 50). Unterzog man die aeroben Kulturen nach der Hälfte des Versuchszeitraums einem *shift* zu mikroaeroben Bedingungen, stellten diese binnen einer Stunde nahezu das Wachstum ein und es kam sogar zu einem kleinen Abfall der OD_{660} .

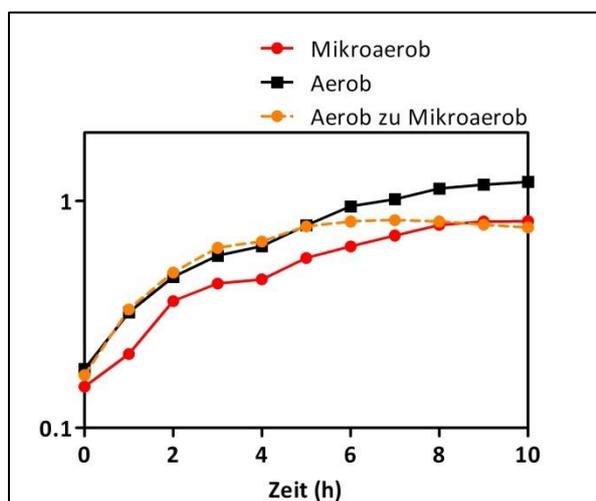


Abbildung 50 : Vergleich des Wachstums der $\Delta cryB$ pRKpufcryB Mutante unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen. Die Kulturen wurden zu Versuchsbeginn auf eine OD_{660} von 0,2 verdünnt und die OD_{660} über zehn Stunden gemessen. Dabei wurden aus der gleichen Ausgangskultur zwei aerobe Kulturen und eine mikroaerobe Kultur angeimpft. Eine der beiden aeroben Kulturen wurde im Versuchsverlauf nach der Hälfte der Versuchszeit (t_5) auf aerobes Wachstum umgestellt. Beispielhafte Einzelwerte von insgesamt zwei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen sind dargestellt.

Neben dem aeroben und mikroaeroben Wachstum wurden auch das anaerobe und phototrophe Wachstum untersucht. Unter diesen Bedingungen kam es jedoch zu keinem Wachstum der Kulturen.

Um nachzuweisen, inwiefern sich die Grundlevel an CryB in den Zellen unterscheiden, wurde anschließend ein *Western blot* gegen das Protein in Zelllysaten aller verwendeten Stämme durchgeführt (Abbildung 51). Dabei waren extrem hohe Mengen an Zelllysate nötig, um den Nachweis im Wildtyp bzw. der Komplementation zu ermöglichen. Daher wurden die Proteine vor dem Auftragen auf das Gel mit Trichloressigsäure gefällt.

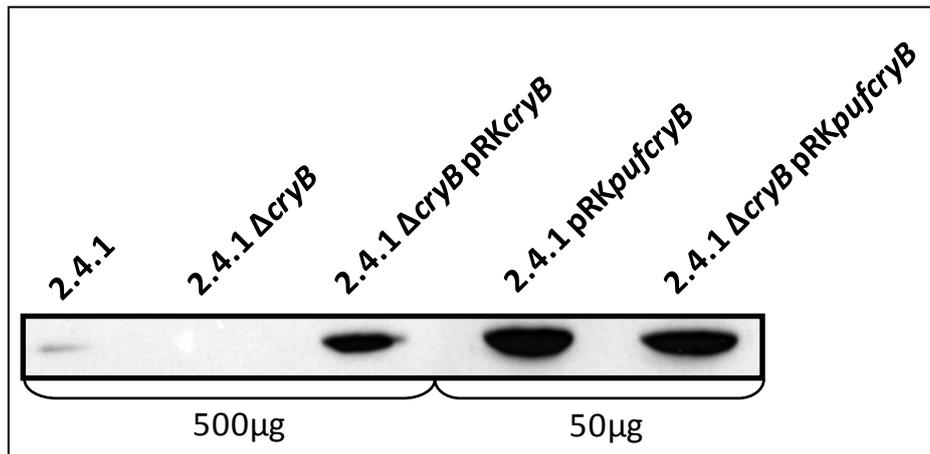


Abbildung 51 : *Western blot* von Zelllysaten verschiedener CryB exprimierender Stämme. Für den *Western blot* wurde ein 10%iges SDS-Gel mit je 50 bzw. 500 µg Zelllysate von mikroaerob herangezogenen Kulturen beladen. Der Wildtyp in der ersten Spur entspricht dabei der Positivkontrolle und die CryB - Mutante $\Delta cryB$ in der zweiten Spur der Negativkontrolle. Ein polyklonaler Antikörper gegen CryB (anti CryB *rabbit*) diente als primärer Antikörper. Der Chemolumineszenznachweis erfolgte über den mit der Meerrettich Peroxidase konjugierten sekundären Antikörper (45 min Exposition).

Die Ergebnisse des *Western blot* zeigten deutlich, dass sich die Menge an CryB sehr stark zwischen den Stämmen unterscheidet. Im Wildtyp 2.4.1 konnte so gut wie kein Protein im Zelllysate nachgewiesen werden, selbst wenn man fast 500 µg Protein auf das Gel lud. In der Mutante konnte wie erwartet kein Protein nachgewiesen werden, während das level in der Komplementation deutlich höher lag. Das Überexpressionsplasmid im Wildtyp 2.4.1 und der CryB - Mutante sorgte für noch einmal deutlich größere Mengen an CryB. Hier ist das Signal sogar bei nur einem Zehntel des Ausgangszelllysats noch einmal deutlich stärker.

3.5.5 Auswirkungen der CryB - Überexpression auf die blaulicht- und sauerstoffabhängige Expression der Photosynthesegene

Da eine Interaktion zwischen AppA und CryB sowohl durch die *pull-down* - Analyse als auch im *Yeast - Two - Hybrid* - System in Abschnitt 3.5 nachgewiesen werden konnte, liegt ein Einfluss des CryB - Proteins auf die blaulichtabhängige Repression nahe. Aus diesem Grund wurde in der Mutante mit dem Überexpressionsplasmid anschließend die *puc* - Repression, in Abhängigkeit von der Zeit, nach Bestrahlung mit $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht bestimmt (Abbildung 52).

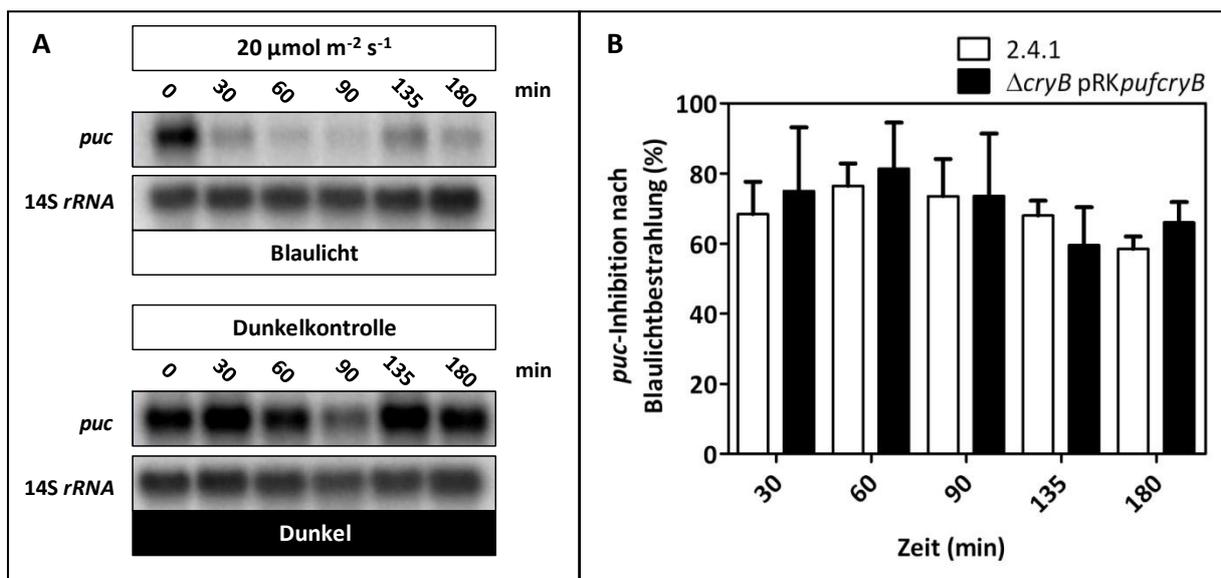


Abbildung 52 : Vergleich der *puc* - Expression in *R. sphaeroides* $\Delta\text{cryB pRKpufcryB}$ zum Wildtyp 2.4.1 mittels Northern blot. Zur Ermittlung der *puc* - Expression wurden die semiaeroben Kulturen mit $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestrahlt (A), Proben zu den angegebenen Zeitpunkten genommen, die RNA isoliert und ein Northern blot mit einer *puc* - und einer *14S rRNA* - spezifischen Sonde durchgeführt. Die *phosphoimaging* Signale wurden anschließend quantifiziert. Die prozentuale *puc* Repression in *R. sphaeroides* $\Delta\text{cryB pRKpufcryB}$ bzw. dem Wildtyp 2.4.1 (B) errechnet sich aus den Ratios der mRNA - levels der bestrahlten Kulturen im Verhältnis zu den Dunkelkulturen, nachdem diese auf die *rRNA* - Ladekontrolle normalisiert wurden. Die prozentuale Inhibition wurde anhand von Formel 3 (siehe Abschnitt 2.4.13) errechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und maximalen Abweichungen von zwei unabhängigen Experimenten. Zum Vergleich sind außerdem die Inhibitionswerte des Wildtyps 2.4.1 mit aufgeführt (Abbildung 40).

In den Blaulichtbestrahlungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Kinetik der *puc* - Inhibition im Stamm $\Delta\text{cryB pRKpufcryB}$ ähnlich zum Wildtyp 2.4.1 verläuft, so dass hier nicht von einer direkten Wirkung des stark im Überschuss vorhandenen CryB auf die AppA / PpsR abhängige Repression ausgegangen werden kann.

Da ein Absinken der Sauerstoffkonzentration auf mikroaerobe Bedingungen scheinbar einen deutlichen Effekt auf das Wachstum der Zellen hat (vgl. Abbildung 50), wurde zudem der sauerstoffabhängige Anstieg der *puc*-Expression nach einem *shift* von aeroben zu mikroaeroben Bedingungen im Wildtyp 2.4.1 und im $\Delta cryB$ pRK*pufcryB*-Überexpressionsstamm untersucht (Abbildung 53).

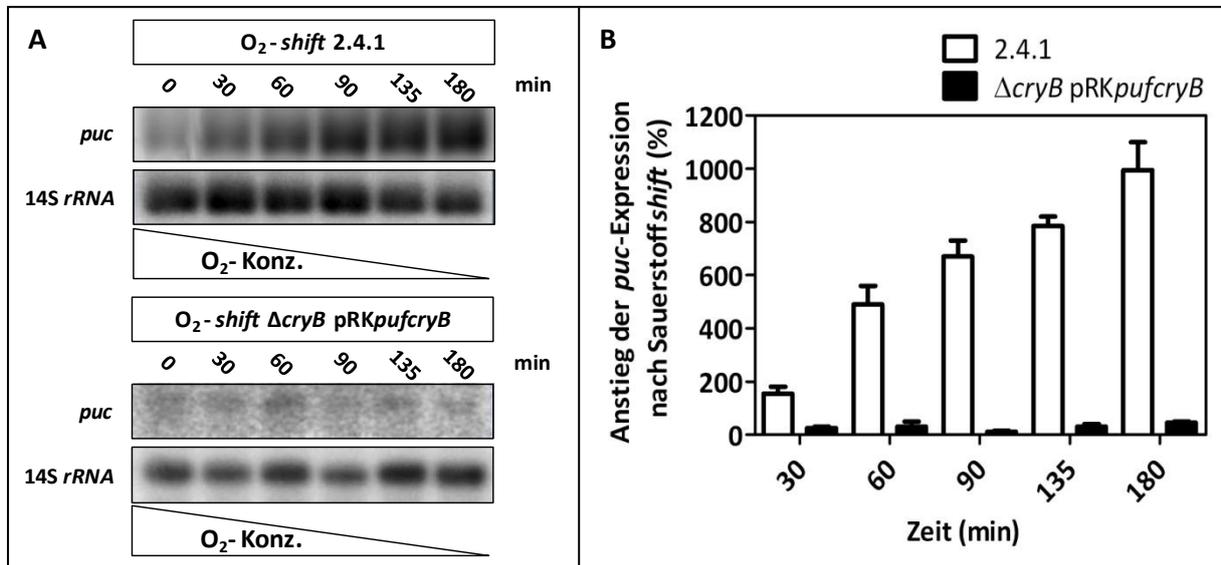


Abbildung 53 : Vergleich der *puc*-Expression in *R. sphaeroides* $\Delta cryB$ pRK*pufcryB* zum Wildtyp 2.4.1 mittels *Northern blot*. Zur Ermittlung der *puc*-Expression wurden die Kulturen bei einer OD_{660} von 0,4 von aeroben zu mikroaeroben Bedingungen *geshiftet* (**A**), Proben zu den angegebenen Zeitpunkten genommen, die RNA isoliert und ein *Northern blot* mit einer *puc*- und einer 14S *rRNA*-spezifischen Sonde durchgeführt. Die *phosphoimaging* Signale wurden anschließend quantifiziert. Die prozentuale *puc*-Expression in *R. sphaeroides* $\Delta cryB$ pRK*pufcryB* bzw. dem Wildtyp 2.4.1 (**B**) errechnet sich aus den Ratios der mRNA - *levels* der Einzelzeitpunkte im Verhältnis zum Zeitpunkt t0, nachdem diese auf die *rRNA*-Ladkontrolle normalisiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und maximalen Abweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

Während im Wildtyp ein deutlicher, starker Anstieg der *puc*-Expression von zweifach nach 30 min auf über zehnfach nach 180 min sichtbar war, konnte im *CryB*-Überexpressionsstamm kein Anstieg nachgewiesen werden.

Es konnte beobachtet werden, dass die Menge an gebildeten *CryB*-Protein eine deutliche Auswirkung auf die synthetisierten Photosynthesekomplexe hat. In der Überexpressionsmutante konnte eine, im Vergleich zur Komplementation, nochmals stärkere Reduktion der Gesamtzellabsorptionsspektren beobachtet werden. Gleichzeitig war das mikroaerobe Wachstum gehemmt, während phototrophes und anaerobes Wachstum nicht möglich war und ein sauerstoffabhängiger Anstieg der Photosyntheseexpression nicht mehr sichtbar war.

3.5.6 Analyse einer möglichen Interaktion von LOV und CryB mit Proteinen der Kapselbiosynthese

Wie in Abschnitt 3.5.1 bereits beschrieben, wurde mit Hilfe einer Genombibliothek von *R. sphaeroides* in einem *Yeast - Two - Hybrid - screening* nach möglichen Interaktionspartnern für das LOV - und CryB - Protein gesucht. Bei dem *screening* gegen die genomischen Sequenzen konnte für beide Proteine eine große Anzahl von Klonen mit Sequenzabschnitten identifiziert werden, die ebenfalls am Kohlenhydrat - Transport beteiligt sind. Vor dem Hintergrund der bemerkenswert großen Anzahl an Kohlenhydrat - Transporten und - Syntheseproteinen, welche in den Transkriptomanalysen (siehe Abschnitt 3.6 und 3.7) identifiziert worden waren, wurden diese Interaktionspartner im Folgenden genauer untersucht.

Die Erstellung der Genombibliothek sowie das *screening* nach möglichen Interaktionspartnern erfolgten durch die technische Assistentin Kerstin Haberzettl.

3.5.7 Identifikation möglicher Interaktionspartner aus der Kapselbiosynthese

Die Auswertung der Sequenzen ergab ein sehr häufiges Auftreten von Genombibliotheksklonen, die Sequenzfragmente von Proteinen enthalten, welche wiederum homolog zu Kapselbiosynthese - Proteinen aus anderen Organismen sind.

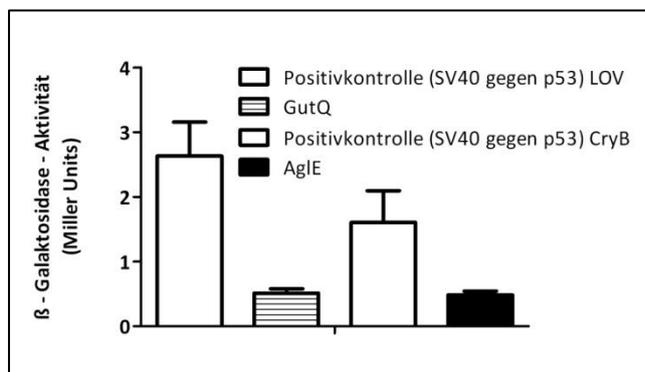


Abbildung 54 : β - Galaktosidase - Aktivität der im Yeast - Two - Hybrid *screening* ermittelten GutQ und AgIE Hefeklone. Die angegebenen β - Galaktosidase Werte in Miller Units für die einzelnen Messungen errechnen sich aus den Mittelwerten der Aktivität aller getesteten Klone (GutQ 8; AgIE 12) und der maximalen Abweichung vom Mittelwert. Im Vergleich sind die jeweiligen Positivkontrollen (SV40 gegen p53) dargestellt (durchgeführt von Kerstin Haberzettl).

Ein möglicher Interaktionspartner fiel dadurch auf, dass er sowohl für LOV, als auch für CryB eine sehr hohe Anzahl an positiven Klonen ergab. Diese besaßen zudem auch eine relativ hohe β - Galaktosidase - Aktivität. Dieses Protein, GutQ (RSP_1153), kodiert eine Zucker - Phosphat - Isomerase und besitzt konservierte Domänen zur Umwandlung des Pentose D - Ribulose 5 - Phosphat in A5P, einem Vorläufer des 3 - Desoxy - D - Manno - Octulosonat (Quelle: [NCBI - conserved domains](#)). Dieser Zucker ist integraler Bestandteil verschiedener Glycolipide, welche die Oberfläche der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien bedecken, wie z.B. Lipopolysaccharide und viele 2 K - Antigen Kapseln (Simpson *et al.*, 1996; Bateman, 1997). Die Auswertung der β - Galaktosidase *assays* von insgesamt acht nicht identischer Klonen ergab dabei eine Aktivität von etwa 14 % der gleichzeitig durchgeführten Positivkontrolle (SV40 gegen p53) (Abbildung 54).

Der häufigste nachzuweisende Interaktionspartner für das CryB - Protein war das AgIE - Protein (RSP_2873), welches die periplasmatische Komponente eines ABC-Zuckertransporters kodiert (Quelle: [NCBI - conserved domains](#)) und zudem eine LysR - Bindedomäne (Quelle: [NCBI - conserved domains](#)). Beide Domänen spielen eine große Rolle im Transport und der Bindung von verschiedenen Zuckerverbindungen (z.B. dem Kapselzucker Maltodextran (Overduin *et al.*, 1988)) außerhalb der Zelle. Für 12 nicht identische Hefeklone, die im *screening* für dieses Protein identifiziert wurden, konnte eine β -Galaktosidase - Aktivität von 29 % der gleichzeitig durchgeführten Positivkontrolle (SV40 gegen p53) (Abbildung 54) gemessen werden.

3.5.8 Nachweis der Kapselsynthese durch verschiedene Kapselfärbungen

Die Interaktionsstudien im *Yeast - Two - Hybrid - screening* und die große Anzahl an Zuckertransportern, welche in den Transkriptomanalysen identifiziert werden konnten, legten eine mögliche Rolle der Blaulichtrezeptoren bei der Kapselsynthese nahe. Es wurde aus diesem Grund zunächst die Kapsel von verschiedenen *R. sphaeroides* Stämmen nach Kapselfärbungen untersucht. Dabei wurden die Zellen in einer Tuschelösung aufgenommen, getrocknet und anschließend mikroskopiert. Zudem wurden die Zellen auch in flüssiger Tuschelösung mikroskopiert und eine spezielle Kapselfärbung nach Maneval durchgeführt (Abbildung 55). Es wurden der *R. sphaeroides* Wildtyp 2.4.1, Δcry - Mutante und die Δlov - Mutante mit zwei *R. capsulatus* Stämmen verglichen, von denen der Stamm 37b4 keine Kapsel bildet, während der Stamm B10 eine deutliche Kapselbildung besitzt. Als zusätzliche Positivkontrolle wurden die Kapselfärbungen ebenfalls mit dem γ - Proteobakterium *Azotobacter sp.* durchgeführt, welches ebenfalls als starker Kapselbildner bekannt ist (Murray *et al.*, 1984).

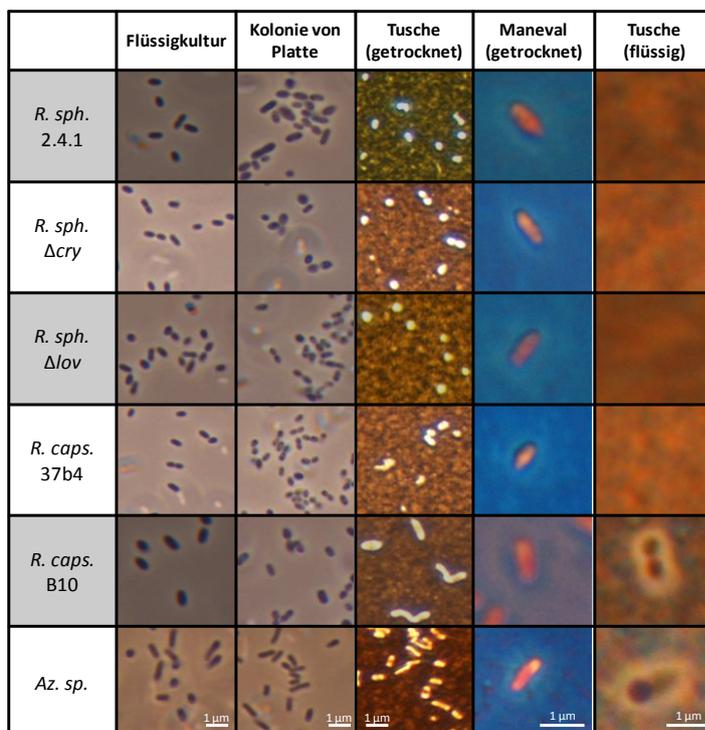


Abbildung 55 : Mikroskopische Aufnahmen (1000x; Ölimmersion) von Flüssigkulturen bzw. Kolonien von Platte, sowie Kapselfärbungen mit Tusche bzw. nach Maneval von *Rhodobacter* - Stämmen bzw. von *Azotobacter sp.* Dargestellt sind Aufnahmen von Zellen aus stationären Flüssigkulturen (Spalte 1), Einzelkolonien von Platte (Spalte 2) und getrockneter Tuschepräparate aus Einzelkolonien von Platte (Spalte 3). Zudem wurden Aufnahmen von nach Maneval gefärbten Zellen aus Einzelkolonien angefertigt (Spalte 4) und zuletzt wurden die Zellen von Platte in flüssiger, verdünnter Tusche direkt mikroskopiert (Spalte 5). Für Spalte 5 und 6 wurden die Aufnahmen digital vergrößert um mögliche Kapseln besser sichtbar zu machen.

Die Auswertung der Tuschefärbung an getrockneten Zellen führte zunächst zu keinem klaren Ergebnis. Bei keinem der Stämme konnte eine deutlich sichtbare Kapsel nachgewiesen werden, obwohl diese bei *R. capsulatus* B10 und *Azotobacter sp.* deutlich auffindbar hätte sein müssen. Die durchgeführte Maneval'sche Färbung, bei der die mit Fuchsin gefärbten, roten Zellen vor dem mit Kongorot blau gefärbten Hintergrund eine deutliche, lichtbrechende Umrandung besitzen müssten, führte zu dem gleichen Ergebnis. Eine Sichtbarmachung des Kapselmaterials war nur möglich, wenn die Zellen in einer Lösung aus drei Teilen Wasser und einem Teil Tusche aufgenommen wurden. Hier konnte für *R. capsulatus* B10 und *Azotobacter sp.* eine abgegrenzte, stark lichtbrechende Hülle gezeigt werden. Für die Stämme *R. sphaeroides* 2.4.1, Δlov und $\Delta cryB$, sowie für *R. capsulatus* 37b4 konnte mit dieser Methode aber keine Kapsel nachgewiesen werden. Die Zellen sind nicht sichtbar in der Tuschelösung. *R. sphaeroides* 2.4.1 neigt dazu dichte Aggregate bei niedrigen OD_{660} (0,1 - 0,4) zu bilden. Diese wurden ebenfalls mikroskopiert (Daten nicht gezeigt), was ebenfalls mit keiner der Färbemethoden zum Nachweis einer Kapsel führte.

3.5.9 Nachweis der Kapselsynthese durch Sedimentationsversuche

Als zusätzlicher Nachweis für mögliche Unterschiede in der Kapselbildung wurden Sedimentationsversuche mit den Zellen durchgeführt, bei denen *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 und Δlov - Kulturen, sowie *R. capsulatus* B10 mit einer OD_{660} von 0,4 und 1 bei niedrigen g - Zahlen zentrifugiert wurden. Dem liegt die Beobachtung zu Grunde, dass Zellen mit einer dicken Kapselschicht schneller, aber nicht so kompakt sedimentieren wie Zellen ohne eine solche. Es ist bei stark kapselbildenden Zellen möglich die Sedimentation, nur durch Inkubation der stationären Zellen, ohne Schütteln sichtbar zu machen, da die schweren Zellen sich nach kurzer Zeit abzusetzen beginnen. Dies wurde ebenfalls für die verwendeten Stämme von *R. sphaeroides* durchgeführt, zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede nach 8, 16, 24 & 32 h Inkubation bei 32°C. Die Zellen wurden aus diesem Grund in den nun folgenden Experimenten bei niedrigen g - Zahlen zentrifugiert.

Betrachtete man die Größe der Pellets nach der Zentrifugation (Abbildung 56), zeigte sich, dass nach 30 min bei 200 g noch keine deutlichen, sedimentierten Zellen sichtbar waren. Erst nachdem die Zellen bei 500 g sedimentiert wurden, erkannte man deutliche Pellets. Dabei konnte bei dem Kapselbildner *R. capsulatus* B10 bereits ein etwa doppelt so großes Pellet wie in den beiden anderen *R. sphaeroides* Stämmen nachgewiesen werden. Zudem war ein starker, undeutlicher rötlicher Zellschmier an der Innenwand des Glasröhrchens sichtbar, während dieser in 2.4.1 und Δlov deutlich schwächer auftrat. Betrachtete man die sedimentierten Zellen nach 1000 g , fiel das Pellet von *R. capsulatus* B10 zudem durch die sehr ungleichmäßige Oberflächenstruktur auf, während die *R. sphaeroides* - Stämme eine klar abgezeichnete Grenze besaßen. Erhöhte man die Zentrifugalkraft auf 2000 g , führte dies zum vollständigen Pelletieren der Zellen und es waren keine Unterschiede mehr sichtbar. Abschließend konnte zwischen den getesteten *R. sphaeroides* Stämmen kein deutlicher Unterschied in der Sedimentationsrate gezeigt werden.

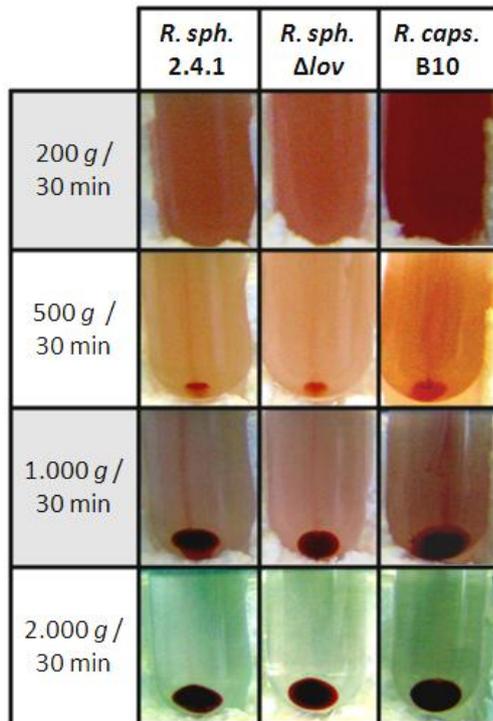


Abbildung 56 : Untersuchung der Sedimentationsrate von verschiedenen *R. sphaeroides* Stämmen nach Erreichen der stationären Phase ($OD_{660} > 1,0$). Die Zellen wurden nach Erreichen der OD_{660} in ein 10 ml Zentrifugenglasröhrchen überführt und zunächst für je 30 min bei den angegebenen Erdschweren (g) zentrifugiert. Für die jeweiligen Zentrifugationen wurden jeweils frische Zellen verwendet und die Alten verworfen.

3.6 Vergleich der Transkriptome von *R. sphaeroides* 2.4.1 und Δlov nach mikroaerobem Wachstum

Neben den Experimenten zur genaueren Funktion des CryB - Proteins wurde ebenfalls die Regulation durch das LOV - Protein weiter untersucht. Eine genaue Rolle des Blaulichtrezeptors in der Zelle war noch nicht bekannt und es bestanden nur wenige Anhaltspunkte für seine Funktion. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe von *microarray* - Genchips von *Agilent* eine Transkriptomanalyse durchgeführt, um einen Überblick über die Änderungen der RNA - level zwischen 2.4.1 und Δlov zu bekommen. Die beiden Stämme wurden unter identischen Bedingungen herangezogen. Die erhaltenen *microarray* - Daten sollten einen ersten Aufschluss über die durch LOV regulierten Gene liefern. Es könnte zum einen eine direkte Rolle von LOV auf die Transkription, zum anderen aber auch eine indirekte Einflussnahme auf das Transkriptom über bereits bekannte Signaltransduktionswege, sichtbar werden.

Es war kein kommerziell verfügbarer *R. sphaeroides* Transkriptom - chip erhältlich, weshalb der *chip*, mit Hilfe der frei verfügbaren Genomsequenz von *R. sphaeroides* und der *eArray* - software der Firma *Agilent*, erstellt wurde. Für das von der *software* durchgeführte *alignment* wurden insgesamt die Sequenzen von 4372 kodierenden ORFs, sowie die Sequenzen von 122 mittels *pyrosequencing* identifizierten sRNAs (Berghoff *et al.*, 2009) hochgeladen. Die *software* erstellte daraufhin je drei Sonden mit 60 bp Länge gegen jede der hochgeladenen Sequenzen. Für einige zu kurze Sequenzen war die Erstellung von drei Sonden nicht möglich und es wurden nur eine bzw. zwei Sonden erstellt.

Die für die *microarray* - Analyse verwendeten Kulturen wurden jeweils unter semiaeroben Bedingungen im Dunkeln inkubiert und anschließend bei einer festgelegten OD_{660} geerntet. Diese wurde dabei so gewählt, dass die einzelnen Kulturen beider Stämme bereits eine

deutliche Färbung zeigen, um Änderungen an den Genen des Photosyntheseapparats deutlich nachvollziehen zu können. Die Zellen wurden zu Versuchsbeginn auf eine OD_{660} von 0,4 verdünnt und anschließend bis zu einer OD_{660} von 0,8 inkubiert. Unter diesen Bedingungen sollten zunächst grundsätzliche Unterschiede in den Transkriptleveln zwischen den beiden *Rhodobacter*-Stämmen sichtbar werden. Diese sollten als Grundlage für mögliche weitere Transkriptomanalysen dienen, welche z.B. mit blaulichtbestrahlten Kulturen durchgeführt werden könnten. Es wurden insgesamt sechs Experimente (biologische Replika) durchgeführt und von diesen anschließend je drei vereint, so dass für die Hybridisierung mit zwei *microarray-chips* zwei *pools* (technische Replika) verwendet wurden.

Nach dem Ernten der Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und auf DNA-Kontaminationen untersucht. Anschließend erfolgten Qualitätsprüfungen auf einem PAA-Harnstoffgel (Daten nicht gezeigt), um Degradierungen der RNA auszuschließen. Per *real time RT-PCR* (Abbildung 57) wurde ein gleichmäßiges Expressionslevel für zwei Transkripte sichergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Expressionslevel von *rpoZ* und *bchL* zwischen den Replika nur geringfügig unterschieden. Die maximale Abweichung in der Zyklenzahl bei *rpoZ* betrug 0,21 Zyklen in der 2.4.1 RNA und 0,19 Zyklen in der Δlov RNA. Für *bchL* wurde eine maximale Abweichung von 0,56 Zyklen in der 2.4.1 RNA festgestellt, während in der Δlov RNA 0,37 Zyklen berechnet wurde.

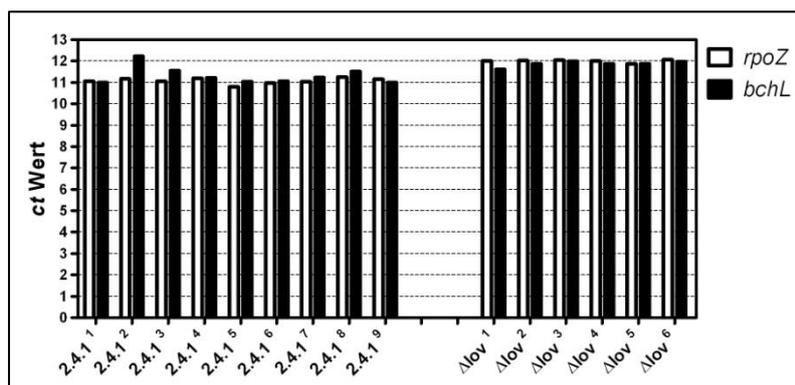


Abbildung 57: Quantifizierung des mRNA-levels der Gene *rpoZ* und *bchL* mittels *real time RT-PCR* für *R.s. 2.4.1* und Δlov . Der Graph zeigt die Zyklenzahl (ct Wert), bei der die relative Fluoreszenz der sechs 2.4.1 (2.4.1₁₋₆) und der sechs Δlov (Δlov ₁₋₆) - Kulturen den definierten Schwellenwert überschritt.

Die genaue Behandlung der *microarray*-Proben, das Labeln mit Cy3 und Cy5 und das Hybridisieren werden in Abschnitt 2.6 beschrieben.

3.6.1 Aufbereitung der Rohdaten

Die Auswertung der erhaltenen *microarray*-Rohdaten wurde mit Hilfe des *bioconductor* Pakets *limma* (Smyth, 2005) für die Statistiksoftware R durchgeführt. Als erstes Qualitätsmerkmal wurde ein MA-Plot der erhaltenen Daten durchgeführt. Dabei befindet sich auf der Ordinate der M-Wert, welcher die logarithmierte Ratio der Intensitäten von Cy3 und Cy5 für den jeweiligen *spot* auf dem *array* darstellt.

$$\text{Formel 5: } M = [\log_2(\text{---})]$$

Der A-Wert befindet sich auf der Abszisse und errechnet sich aus dem Mittelwert der logarithmierten Rohfluoreszenzwerte der beiden Kanäle.

$$\text{Formel 6: } A = \left[- \left(\log_2 \text{Cy3} + \log_2 \text{Cy5} \right) \right]$$

Durch den MA-Plot erhielt man einen groben Überblick über die Verteilung der hoch und herunter regulierten Gene und konnte eine erste Aussage über die Zuverlässigkeitsgrenze der erhaltenen Fluoreszenzwerte machen. Bei dem größten Teil der Gene veränderte sich die Expression zwischen 2.4.1 und Δlov nicht und es war zu erwarten, dass diese einen M - Wert von nahe 0 haben, da $\log_2(1) = 0$ ist. Gene deren Expression stark verändert war, wichen nach unten und oben ab. Der A -Wert ließ einen Rückschluss auf die relative Stärke der Fluoreszenz an einem bestimmten Datenpunkt zu. Da die Zuverlässigkeit des errechneten M - Wertes stark von der Stärke der Fluoreszenz abhing, war es erforderlich, beide im Zusammenhang zu betrachten, um eine Qualitätsaussage über die Daten des Arrays treffen zu können (Abbildung 58).

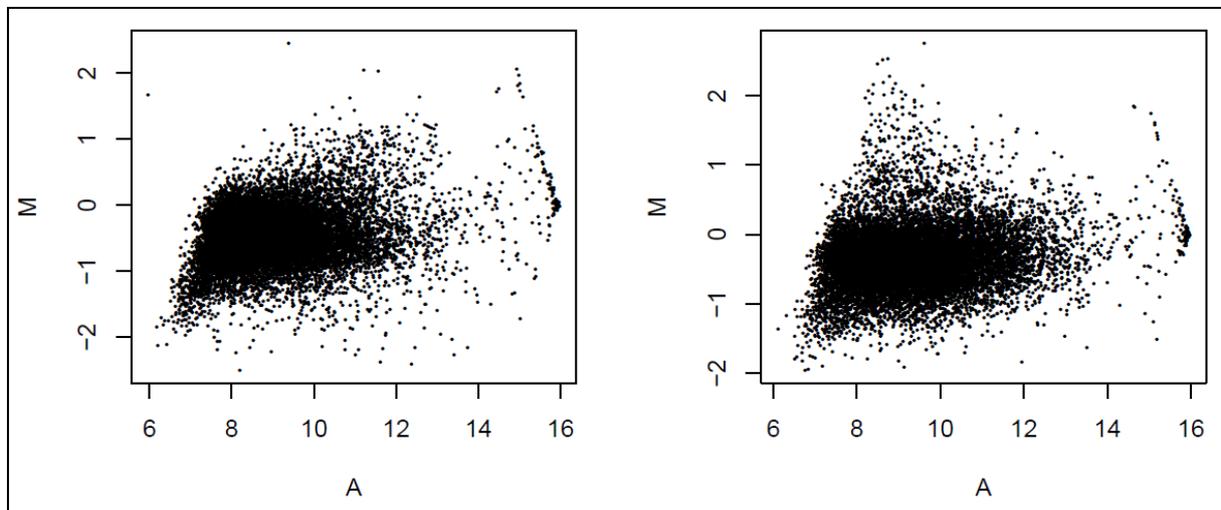


Abbildung 58 : MA - Plot der Rohdaten für *microarray 1* (links) und *microarray 2* (rechts) von 2.4.1 gegen Δlov . Die einzelnen Datenpunkte der beiden *arrays* sind jeweils anhand ihres M - (Berechnung siehe Formel 5) und ihres A - Wertes (Berechnung siehe Formel 6) aufgetragen.

Betrachtete man die Rohdaten auf den MA - Plots für die von uns durchgeführten *microarrays*, so fiel auf, dass diese zum Teil genau entlang eines M-Wertes von 0 verliefen. Dies war ein technisches Problem, welches durch die unterschiedlich starke Fluoreszenz der beiden Farbstoffe, den unterschiedlich starken Einbau in die DNA und Verunreinigungen auf dem *slide* entstehen kann. Da diese technischen Störfaktoren keinen Einfluss auf die tatsächliche statistische Auswertung der Daten nehmen sollte, wurden die Daten zunächst bereinigt. Die beiden gängigsten Verfahren zur Datenbereinigung sind eine Hintergrundkorrektur der Einzelwerte (Ritchie *et al.*, 2007) und die LOWESS (*locally weighted scatterplot smoothing*) Normalisierung (Smyth und Speed, 2003) (Abbildung 59).

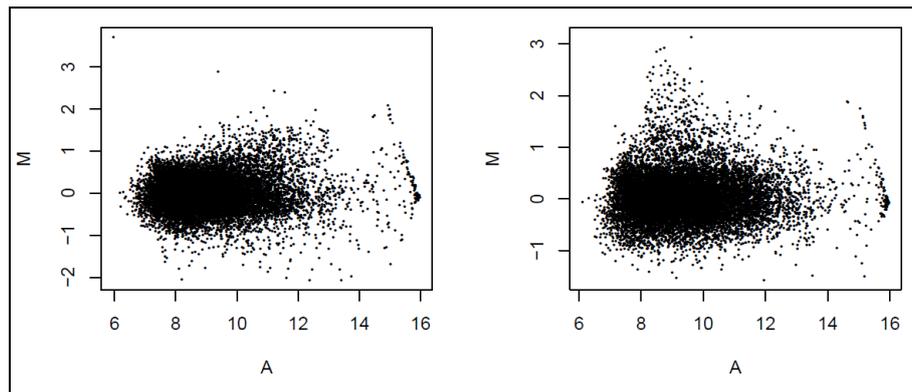


Abbildung 59 : MA - Plot der korrigierten Daten für *microarray 1* (links) und *microarray 2* (rechts) von 2.4.1 gegen Δ/ov . Die Einzelwerte sind zuerst einer Hintergrundkorrektur und anschließend einer LOWESS Normalisierung unterzogen worden. Die einzelnen Datenpunkte der beiden *microarrays* sind jeweils anhand ihres M - (Berechnung siehe Formel 5) und ihres A - Wertes (Berechnung siehe Formel 6) aufgetragen.

Nach der Bereinigung der Rohwerte zeigten die Daten den erwarteten *cluster* um die Nulllinie. Auffallend war die diffuse Verteilung von Datenpunkten im MA-Plot von *microarray 2*. Hier lagen eine große Menge Datenpunkte im Bereich von $M = 1,5 - 3$ und $A = 6 - 9,5$ vor, die im *microarray 1* nicht sichtbar waren. Diese ungleiche Verteilung der M - Werte ist durch den hohen Messfehler der Fluoreszenzwerte bei niedrigen Intensitäten begründet. In diesem Bereich sind die absoluten Fluoreszenzwerte so niedrig, so selbst kleine Fluoreszenzunterschiede, durch z.B. Verunreinigungen auf dem *microarray* oder ungleichmäßiges Hybridisieren bzw. Waschen, zu großen Veränderungen in der Ratio führen können. Für die statistische Auswertung wurden aus diesem Grund nur Messdaten mit einem A - Wert von $> 9,5$ einbezogen. Die Rohdaten der *microarray* - Analyse sind im Anhang Abschnitt 8.1 zu finden.

3.6.2 Allgemeine Übersicht über die Transkriptomanalyse

Die Analyse der bereinigten Transkriptomdaten ergab, dass in der Δ/ov - Mutante, im Vergleich zum Wildtyp 2.4.1 insgesamt 227 (5,19 %) der 4372 Transkripte eine stark veränderte Expression zeigten (Abbildung 60). Von diesen wiesen 210 (4,80 %) eine erhöhte (Ratio ≥ 2 ; $A \geq 9,5$) und nur 17 (0,38 %) eine erniedrigte Expression (Ratio $\leq 0,5$; $A \geq 9,5$) auf. Gene mit einer solch starken Änderung der Expression wurden für die nun folgenden Auswertungen in die Kategorie I eingeteilt. Bezog man weiterhin die weniger stark, aber dennoch signifikant verändert exprimierten Gene mit ein, vergrößerte sich die Zahl der Transkripte auf 643 (14,70 %) der gesamten Zielsequenzen. Von diesen wurden 381 (8,71 %) stärker (Ratio 2 - 1,75; $A \geq 9,5$) und 35 (0,80 %) schwächer exprimierte Gene (Ratio 0,57 - 0,5; $A \geq 9,5$) mit einbezogen. Diese Gene wurden in den folgenden Schritten der Analyse als Kategorie II vermerkt, während Gene die keine signifikante Änderung zeigten in Kategorie III eingeteilt wurden.

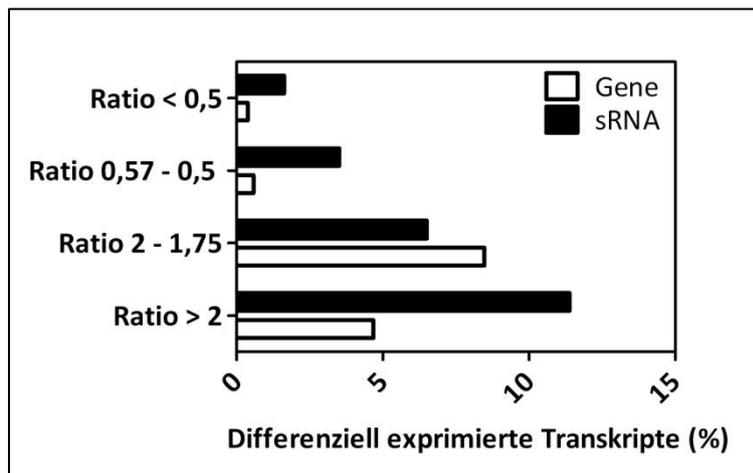


Abbildung 60 : Überblick über den Anteil von Transkripten, welche im Vergleich von Δlov zu 2.4.1 differenziell exprimiert werden. Angegeben sind die prozentualen Anteile (%) der signifikant veränderten Transkripte an der Gesamtzahl der getesteten Gene und sRNAs. Dabei ist die Gesamtzahl für die Gene $n = 4372$ und für die sRNAs $n = 122$.

Betrachtet man die allgemeine Verteilung für die Ratios der sRNAs auf dem *microarray* (Abbildung 60), zeigte sich, dass insgesamt 16 (12,58 %) der gesamten 122 sRNAs eine stark veränderte Expression (Kategorie I) besitzen (Abbildung 60). Davon stiegen 14 (11,29 %) in ihrer Expression in der Mutante an und 2 (1,61 %) zeigten verringerte Expressionslevel (Ratio $\leq 0,5$; $A \geq 9,5$). Durch Einbeziehen der weniger stark differenziell exprimierten Transkripte konnte die Anzahl der differenziell regulierten sRNAs auf 28 (22,95 %) erhöht werden (Kategorie II). Dies erweiterte die Zahl um weitere 8 (6,50 %) stärker und 4 (3,51 %) schwächer exprimierte sRNAs.

Um die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Daten sicherzustellen, wurde von ausgewählten Genen die Expression per *real time RT - PCR* quantifiziert (Abbildung 61). Es wurden das in der Δlov -Mutante am stärksten höher exprimierte Gen RSP_1574, das am stärksten schwächer exprimierte Gen RSP_3539 und zuletzt ein unverändert exprimiertes Gen RSP_0288 (*bchL*) mit den erhaltenen Ratios der *microarrays* verglichen. Zusätzlich wurden einige höher - und schwächer exprimierte Gene stichprobenartig quantifiziert. Hierbei wurden die Gene RSP_1092 (*rpoE*), RSP_6158 / RSP_1556 (*puc2AB*) und RSP_6020 (*feoA2*) getestet.

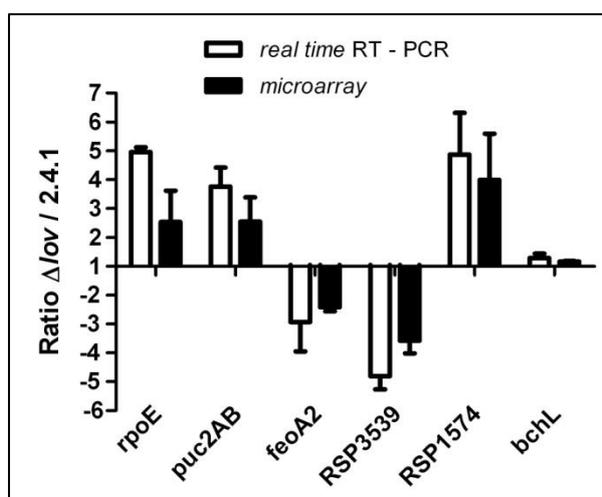


Abbildung 61 : Verifizierung der *microarray*-Daten mittels *real time RT - PCR* für die Gene RSP_1574, RSP_3539, *bchL*, *rpoE*, *puc2AB* und *feoA2*. Vergleichend wird die errechnete Ratio (Δlov zu 2.4.1) zwischen den *microarrays* und der *real time RT - PCR* für die einzelnen Gene dargestellt.

Die erhaltenen Ergebnisse der *real time RT - PCRs* für die getesteten Gene konnten die Änderungen der Genexpression, der *microarrays* zwischen der Δlov -Mutante und dem Wildtyp nach mikroaerobem Wachstum bestätigen. Für die Gene, die eine deutlich schwächere

Expression in der Δlov - Mutante auf den *microarrays* zeigten (RSP_3539 und *feoA2*), konnte diese ebenfalls mittels *real time RT - PCR* nachgewiesen werden. Die errechneten Ratios aus der *RT - PCR* waren dabei etwas höher als jene der *chips*. Ein ähnliches Verhältnis konnte bei den Genen mit einer deutlich höheren Expression auf den *microarrays* (*rpoE*, *puc2AB* und RSP_1574) gezeigt werden. Diese Gene stiegen in der *real time RT - PCR* ebenfalls stark an, wenngleich auch mit einer höheren Ratio. Betrachtete man zuletzt die erhaltenen Ratios des auf den *microarrays* unveränderten *bchL*, konnte auch hier kein Unterschied zwischen den beiden Methoden nachgewiesen werden. Beide zeigten keinen Anstieg und keine Abnahme in den Ratios zwischen Δlov und dem Wildtyp 2.4.1.

3.6.3 Einfluss von LOV auf die Expression der Photosynthesegene

Mit dem BLUF - Domänen - Protein AppA (Braatsch *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2004) ist bereits seit einigen Jahren ein Blaulichtrezeptor bekannt, welcher einen großen Einfluss auf die Expression der Gene des Photosyntheseapparates nimmt. Kürzlich wurde ein Einfluss von CryB, welches als Cryptochrom Blaulicht wahrnimmt, auf die Pigmentbildung von *Rhodobacter sphaeroides* nachgewiesen (Hendrischk *et al.*, 2009a). Für das LOV Protein konnte ein Photozyklus *in vitro* nachgewiesen werden (Hendrischk *et al.*, 2009b), wobei die Funktion des Proteins *in vivo* immer noch unklar ist.

Bei der Auswertung der *microarray*-Daten zeigte sich ein deutlicher Einfluss auf die Photosynthesegene durch das LOV - Protein. Es war bei einem Teil der Gene eine deutliche Zunahme der Transkriptmenge zu beobachten (Tabelle 4). Mit *pucBAC* (RSP_6256 und RSP_0314 - RSP_0315) und *puc2BA* (RSP_6158 und RSP_1556) waren alle Transkripte der Proteine des LHC II deutlich stärker exprimiert (Kategorie I). Gleichzeitig konnte bei einem Teil der Transkripte, welche für die Bacteriochlorophyll - und Carotinoidbiosynthese nötig sind, ebenfalls ein höheres Expressionslevel beobachtet werden. Bei den stärker exprimierten Transkripten (Kategorie I & II) fand man das *bchODI* - Operon (RSP_0275 - 0273) für die Bacteriochlorophyllbiosynthese, sowie mit *crtA* (RSP_0272) Gene der Carotinoidbiosynthese. Die hinter *crtA* im *crtAIB* - Operon befindlichen *crtI* (RSP_0270) - und *crtB* (RSP_0270) - Gene zeigten mit einer Ratio zwischen 1 und 1,5 (Kategorie III) keine Änderung. Die Genprodukte des *pufQBALMX* - Operons (RSP_0259 - 0255 und RSP_6108 - 6109), welches die Proteinbestandteile des RC und des LHC I kodiert, waren mit der Ausnahme von *pufQ*, *pufL* und *pufX*, kaum stärker exprimiert (Kategorie II & III).

Verglich man die Ratios der anderen Operons des photosynthetischen Genclusters von *R. sphaeroides*, zeigten diese keine Änderungen in ihren Transkriptleveln (Kategorie III). So war eine Ratio von circa eins für die Transkripte des *bchMLHBNF* - Operons (RSP_0289 - 0284), des *bchCXYZ* - Operons (RSP_0263 - 0263), des *bchEJG* - Operons (RSP_0281 - 0279) und des *crtCDEF* - Operons (RSP_0267 - 0264) nachweisbar. Die einzige Ausnahme bildete hier *bchI* und *bchJ*, welche ebenfalls eine deutlich höhere Expression in der Mutante zeigte (Kategorie I).

Es waren keine signifikanten Änderungen der Transkriptmenge für die Photosynthesegegeneratoren AppA (RSP_1565), PpsR (RSP_0282), CryB (RSP_3077) und PrrA (RSP_1518) messbar.

Tabelle 4 : Relative Expressionslevel der Photosynthesegene in Δlov im Vergleich zu 2.4.1. Vergleichend sind alle Gene angeführt, die an der Synthese und Regulation des Photosyntheseapparates beteiligt sind. Die Gene wurden dabei nach ihrer Funktion und ihrer Kategorie unterteilt. Für die errechneten Ratios wurden die Einzelratios aller vorhandenen (eins bis drei) Sonden der jeweiligen Gensequenz verwendet und ihre Mittelwerte berechnet (Rohdaten: siehe Anhang Abschnitt 8.1).

Gennummer (RSP)	Relative Veränderung in Δlov zu 2.4.1 (Ratio)	Annotation / funktionelle Beschreibung
Pigmentbindende Proteine des Lichtsammelkomplexes II		
Kategorie I		
RSP_6256	+ 3,0	<i>pucA</i> , LHCII <i>alpha</i> - Untereinheit
RSP_0314	+ 2,4	<i>pucB</i> , LHC II <i>beta</i> - Untereinheit
RSP_0315	+ 2,0	<i>pucC</i>
RSP_6158	+ 2,2	<i>puc2A</i> , LHCII <i>alpha</i> - Untereinheit
RSP_1556	+ 2,6	<i>puc2B</i> , LHCII <i>beta</i> - Untereinheit
Pigmentbindende Proteine des Lichtsammelkomplexes I / des Reaktionszentrums		
Kategorie II		
RSP_0255	+ 1,9	<i>pufX</i> , Intrinsischer Faktor
RSP_0257	+ 1,8	<i>pufL</i> , Untereinheit RC L
RSP_0259	+ 1,8	<i>pufQ</i>
Kategorie III		
RSP_0258	+ 1,1	<i>pufA</i> , LHCI <i>alpha</i> - Untereinheit
RSP_6108	+ 1,1	<i>pufB</i> , LHCI <i>beta</i> - Untereinheit
RSP_6109	+ 1,4	<i>pufK</i> , Transkriptionsregulator K
RSP_0256	+ 1,5	<i>pufM</i> , Untereinheit RC M
RSP_0291	+ 1,6	<i>puhA</i> , RC H
Bacteriochlorophyllbiosynthese		
Kategorie I		
RSP_0274	+ 2,1	<i>bchD</i> , Magnesium Chelatase D
RSP_0273	+ 2,0	<i>bchI</i> , Magnesium Chelatase ChII
RSP_1885	+ 2,1	<i>bchJ</i> , BChl. Synthase J
Kategorie II		
RSP_0275	+ 1,8	<i>bchO</i> , Magnesium Chelatase O
Kategorie III		
RSP_0289-0284	+ 1 - 1,2	<i>bchMLHBNF</i> - Operon
RSP_0281	- 1,2	<i>bchE</i> , Protoporphyrin - Synthese
RSP_0279	+ 1,2	<i>bchG</i> , BChl.Synthase G
RSP_0263-0260	+ 1,0 - 1,2	<i>bchCXYZ</i> - Operon
Carotinoidbiosynthese		
Kategorie I		
RSP_0272	+ 2,1	<i>crtA</i> , Sphaeroiden Monooxygenase
Kategorie III		
RSP_0271	+/- 1,0	<i>crtI</i> , Phytoen Dehydrogenase
RSP_0270	+ 1,4	<i>crtB</i> , Squalen / Phytoen Synthase
RSP_0267-0264	+ 1,0 - 1,4	<i>crtCDEF</i> - Operon

Proteine der Photosyntheseegenregulation

Kategorie III		
RSP_1565	+/- 1,0	<i>appA</i> , Antirepressor von PpsR
RSP_0282	+ 1,2	<i>ppsR</i> , Photosyntheseegenrepressor
RSP_1518	- 1,1	<i>prpA</i> , <i>response</i> - Regulator
RSP_3077	+ 1,2	<i>cryB</i> , Cryptochrom

Um den Anstieg der pigmentbindenden Proteine des Photosyntheseapparates zu überprüfen, wurden Gesamtzellabsorptionsspektren von mikroaerob wachsenden Kulturen von 2.4.1 und Δlov bei verschiedenen OD_{660} aufgenommen und verglichen (Abbildung 62).

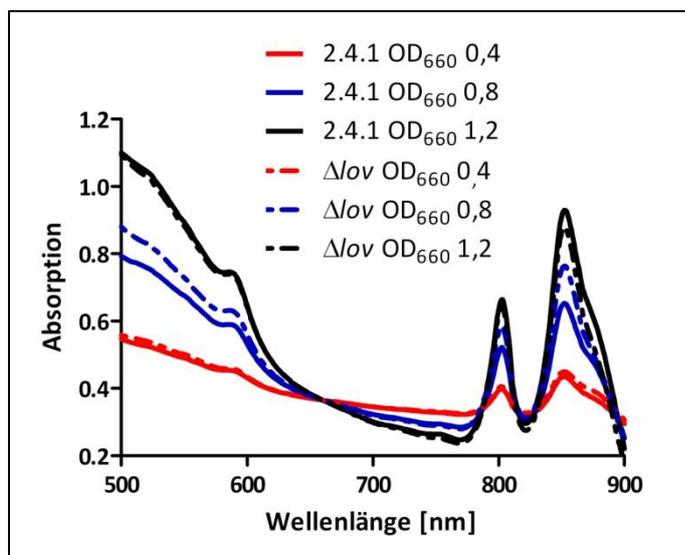


Abbildung 62 : Gesamtzellabsorptionsspektren von *R. sphaeroides* 2.4.1 und Δlov nach Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen. Proben wurden jeweils bei einer OD_{660} von 0,4, 0,8 und 1,2 aus mikroaerob wachsenden Kulturen entnommen.

Bei den unter mikroaeroben Bedingungen erhaltenen Spektren war bei einer OD_{660} von 0,4 kein Unterschied zwischen *R. sphaeroides* 2.4.1 und Δlov sichtbar. Bei einer OD_{660} von 0,8 konnte dagegen ein leichter Anstieg in der Δlov -Mutante bei den relevanten *peaks* bei 800 / 803, 850 und 870 nm festgestellt werden. Dieser war jedoch nach Erreichen der stationären Phase ($OD_{660} = 1,2$) nicht mehr sichtbar - hier wies 2.4.1 ein minimal höheres Spektrum auf.

3.6.4 Einfluss von LOV auf die Expression der Gene des σ^E / ChrR Regulons

Die Expression der Photosynthesegene in *R. sphaeroides* wird eingeleitet, wenn der Sauerstoffpartialdruck der Umgebung niedrig ist. Dies dient vermutlich vor allem der Vermeidung von photooxidativem Stress in der Zelle, welcher durch das gleichzeitige Vorhandensein von Sauerstoff, Licht und photosynthetischen Pigmenten hervorgerufen wird. Eine besondere Rolle spielt dabei Singulett-Sauerstoff (1O_2), welcher durch Energietransfer von angeregten photosynthetischen Pigmenten auf Sauerstoff entsteht (Rinalducci *et al.*, 2004). Die transkriptionelle Antwort auf diese toxische Sauerstoffspezies wird durch den alternativen σ -Faktor σ^E reguliert (Braatsch *et al.*, 2004; Anthony *et al.*, 2005; Glaeser und Klug, 2005). Das σ^E -

Regulon wurde in den letzten Jahren ausführlich beschrieben (Dufour *et al.*, 2008) und es konnten weitere σ -Faktoren, wie σ^{HI} und σ^{HII} (Nuss *et al.*, 2009) beschrieben werden, welche *downstream* von σ^{E} eine Rolle in der Stressantwort spielen.

Bei der Auswertung der *microarray* Daten zeigte sich, dass sich unter den stärker exprimierten Genen in der Δlov -Mutante viele Gene befinden, welche bereits in früheren Studien als σ^{E} -abhängig beschrieben wurden (Tabelle 5). So war ein deutlich erhöhtes Expressionslevel (Kategorie I) für die mRNAs von σ^{E} und seinem Anti- σ -Faktor ChrR (RSP_1092 und 1093) sichtbar. Der an der Singulett-Sauerstoffantwort beteiligte σ -Faktor σ^{HII} zeigte eine deutlich höhere Expression (Kategorie I), während der Hitzeschock σ -Faktor σ^{HI} lediglich einen schwachen Anstieg zeigte (Kategorie III).

Für die σ^{E} -abhängigen Gene *phrA* (RSP_2143), sowie RSP_1091-1090, RSP_3336 und RSP_1852 konnte ein deutlich erhöhtes Expressionslevel (Kategorie I) nachgewiesen werden, während RSP_6222, RSP_1089 und RSP_3424 in der Mutante in geringerem Maße stärker exprimiert waren (Kategorie II). Für einen Teil der Gene des σ^{E} -Regulons (*cryB*, RSP_2144, RSP_1409 und RSP_2389) wurde kein signifikanter Anstieg der Expression festgestellt (Kategorie III).

Tabelle 5 : Relative Expressionslevel der Gene des σ^{E} -Regulons in Δlov im Vergleich zu 2.4.1. Vergleichend ist ein Teil der bisher beschriebenen σ^{E} -abhängigen Gene angeführt. Die Gene wurden dabei nach ihrer Funktion und ihrer Kategorie unterteilt. Für die errechneten Ratios wurden die Einzelratios aller vorhandenen (eins bis drei) Sonden der jeweiligen Gensequenz verwendet und ihr Mittelwert berechnet (Rohdaten: siehe Anhang Abschnitt 8.1).

Gennummer (RSP)	Relative Veränderung in Δlov zu 2.4.1 (Ratio)	Annotation / funktionelle Beschreibung
σ - bzw. Anti - σ - Faktoren in Abhängigkeit von σ^{E}		
Kategorie I		
RSP_1092	+ 2,4	<i>rpoE</i> , alternativer σ -Faktor σ^{E}
RSP_1093	+ 2,6	<i>chrR</i> , Anti - σ - Faktor von σ^{E}
RSP_0601	+ 2,2	<i>rpoH2</i> , alternativer σ -Faktor HII
Kategorie III		
RSP_2410	+ 1,6	<i>rpoHI</i> , alternativer σ -Faktor HI
σ^{E}-abhängige Gene		
Kategorie I		
RSP_2143	+ 2,2	<i>phrA</i> , DNA - Photolyase
RSP_1090	+ 2,3	Hypothetisches konserviertes Protein
RSP_1091	+ 2,7	Cyclobutan / Cyclopropan Synthase
RSP_3336	+ 2,3	ABC - Spermidin - Transporter
RSP_1852	+ 2,4	Hypothetisches Protein
Kategorie II		
RSP_6222	+ 1,8	Hypothetisches Protein
RSP_1089	+ 1,9	Zucker / Kationen - Symporter
RSP_3424	+ 1,9	Hypothetisches Protein
Kategorie III		
RSP_2144	+ 1,5	<i>cfaS</i> , Cyclopropan Synthase
RSP_1409	+ 1,7	Beta-Ig-H3 / Fasciclin
RSP_2389	+ 1,5	Glutathion - Peroxidase
RSP_3077	+ 1,2	<i>cryB</i> , Cryptochrom

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression von LOV und σ^E zu zeigen, wurde mittels *real time RT - PCR* untersucht, ob die Expression von RSP_2228 (*lov*) abhängig von Singulett-Sauerstoff ist. Dazu wurde *R. sphaeroides* mit Starklicht (800 W m^{-2}) bzw. Methylenblau und Starklicht behandelt, was zu einer starken Induktion von σ^E -abhängigen Genen führen sollte. Wie aus Abbildung 63 ersichtlich, zeigte RSP_2228 keinerlei signifikante Veränderung in seiner Expression durch Induktion von photooxidativem Stress, da das relative Expressionslevel bei etwa eins liegt.

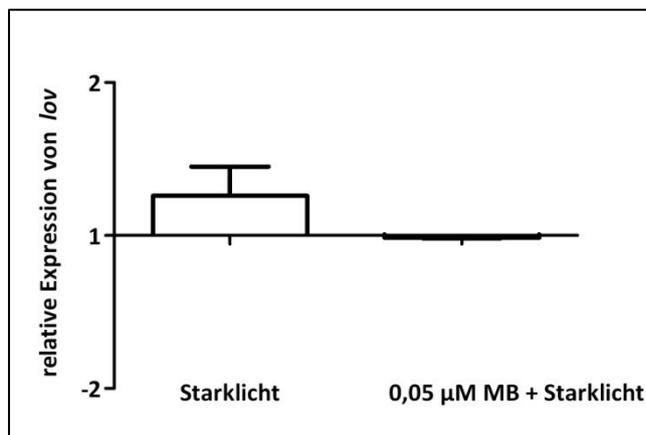


Abbildung 63 : Bestimmung der Expressionslevel von *lov* (RSP_2228) in *R. sphaeroides* 2.4.1 - Kulturen nach Behandlung mit Starklicht und $0,05 \mu\text{M}$ Methylenblau (MB) mittels *real time RT - PCR*. Die Kulturen wurden aerob herangezogen und mit 800 W m^{-2} Weißlicht bzw. mit $0,05 \mu\text{M}$ Methylenblau und 800 W m^{-2} Weißlicht bestrahlt. Die Probenentnahme erfolgte 30 min nach Induktion der Kulturen mit Methylenblau bzw. Starklicht. Die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei Experimenten sind dargestellt.

Um eine mögliche höhere Sensitivität der Δlov -Mutante gegen photooxidativen Stress zu untersuchen, wurden anschließend Hemmhoftests durchgeführt, um die Überlebensraten von 2.4.1 und Δlov zu vergleichen. Die Filterpapiere wurden mit Methylenblau (10 mM und 5 mM) zur Induktion von Singulett-Sauerstoffstress, und H_2O_2 (500 mM, 250 mM und 100 mM) zur Induktion Peroxidstress, behandelt. Für die Methylenblaubehandlung mit 10 mM wurde zudem ein Hemmhoftest im Dunkeln durchgeführt, um die toxische Wirkungen der Chemikalie mit einzubeziehen.

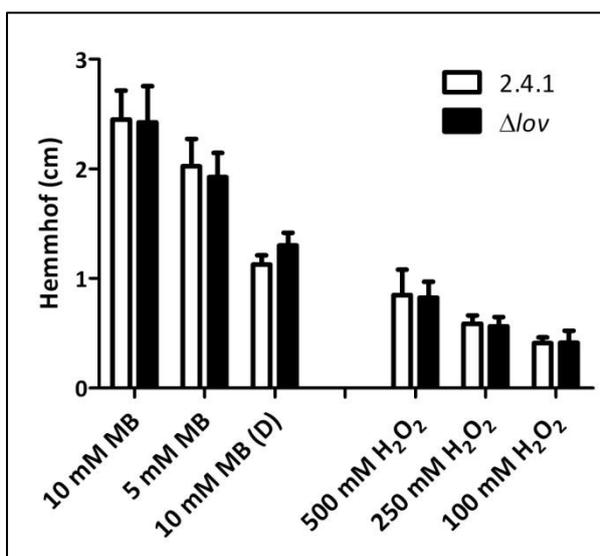


Abbildung 64 : Auswertung der Hemmhoftests zur Bestimmung der Singulett-Sauerstoff- / Wasserstoffperoxidresistenz in *R. sphaeroides* 2.4.1 und Δlov . Angegeben ist die Größe der Hemmhöfe von beiden Stämmen nach Behandlung mit 10 und 5 mM Methylenblau (MB) bei gleichzeitiger Bestrahlung mit $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Die Dunkelkontrolle (D) wurde nicht mit Licht bestrahlt. Die Behandlung mit H_2O_2 erfolgte mit 500, 250 und 100 mM. Der Hemmhofradius von je drei unabhängigen Experimenten wurde gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen und die maximalen Abweichungen von diesen.

Die durchgeführten Hemmhoftests für *R. sphaeroides* 2.4.1 und Δlov zeigten weder nach Behandlung mit Methylenblau, noch nach Behandlung mit H_2O_2 signifikante Unterschiede in der Größe ihrer Hemmhöfe. Es fiel auf, dass selbst hohe Konzentrationen von H_2O_2 nur zu sehr kleinen Hemmhöfen führen (unter 1 cm).

Eine direkte Regulation von RSP_2228 durch σ^E konnte unter den getesteten Bedingungen ausgeschlossen werden. Die große Zahl an beeinflussten Genen auf dem *microarray* ließ aber dennoch auf einen Zusammenhang zwischen dem LOV Protein und der Singulett-Sauerstoffantwort schließen. Aus diesem Grund wurde in den nun folgenden Versuchen Bedingungen ermittelt, unter welchen der Blaulichtrezeptor die größte Auswirkung auf die σ^E -Regulation hat. Dazu wurde ein bereits vorhandenes *phrA::lacZ*-Reporterkonstrukt (in pPHU234) verwendet, welches das *lacZ*-Gen unter Kontrolle des σ^E -abhängigen *phrA*-Promotors (RSP_2143) enthält (Hendrichsk *et al.*, 2007). Werden die Kulturen photooxidativem Stress ausgesetzt, führt dies zu einer messbaren Erhöhung der β -Galaktosidase-Aktivität in den Zellen. Für die Versuche wurden Kulturen des Wildtyps 2.4.1 und der Δlov -Mutante mit dem Reporterkonstrukt unter aeroben und mikroaeroben Bedingungen angezogen und anschließend auf eine OD_{660} von 0,2 verdünnt. Die Kulturen wurden mit und ohne Licht bzw. Methylenblau inkubiert und bei einer OD_{660} von 0,4 und 0,8 Proben entnommen. Zusätzlich wurden als Kontrolle die mit dem Reporterkonstrukt versehenen Stämme TF18, der als σ^E /ChrR-Mutante keine Induktion zeigen sollte, und $\Delta chrR$, welcher durch das Fehlen des Anti- σ -Faktors eine dauerhafte Induktion zeigen sollte, verwendet. Da auch ein Teil der Photosynthesegene durch die Deletion von *lov* betroffen war, wurde zudem die PUHA1-Mutante, ein Stamm ohne intaktes photosynthetisches RC verwendet.

Die durchgeführten β -Galaktosidase-*assays* (Abbildung 65) zeigten bei aerobem Wachstum (A) und aerobem Wachstum mit Weißlicht (B) vergleichbare β -Galaktosidaselevel. Der Wildtyp 2.4.1, die Δlov -Mutante und die Reaktionszentrumsmutante PUHA1 zeigten eine ähnliche β -Galaktosidaseaktivität über den Versuchszeitraum. Vor Versuchbeginn war die Aktivität stets am höchsten und nach dem Verdünnen kam es zu einem leichten Absinken. Eine Ausnahme war der $OD_{660} = 0,4$ Wert der PUHA1 Mutante unter aeroben Bedingungen mit Bestrahlung (B), wo ein leichter Anstieg erfolgte. Die Aktivitätslevel in allen Stämmen waren jedoch ähnlich. Setzte man die Zellen unter mikroaeroben Bedingungen photooxidativem Stress aus (C), zeigte sich, dass der $OD_{660} = 0,4$ -Wert stets höher war als der $OD_{660} = 0,2$ -Wert, aber der letzte Messwert wieder abfiel. Unter diesen Bedingungen war kein signifikanter Unterschied sichtbar, mit Ausnahme des $OD_{660} = 0,4$ Wertes der PUHA1-Mutante, welcher deutlich höher lag als in den anderen beiden Stämmen. Betrachtete man zuletzt die Kulturen bei aerobem Wachstum und Stressinduktion durch Weißlicht und Methylenblau (D), war eine deutliche Induktion in allen drei Stämmen sichtbar. Es zeigte sich, dass diese in 2.4.1 und der PUHA1-Mutante stärker vorlag (Anstieg um ca. 40 %) als in der Δlov -Mutante (Anstieg um ca. 15 %). Vor allem die Induktion des $OD_{660} = 0,4$ -Wertes, war signifikant niedriger als in den anderen Stämmen. Die Kontrollen TF18 und $\Delta chrR$ verhielten sich unter allen Bedingungen ähnlich. Die Messungen in der σ^E /ChrR-Mutante TF18 zeigten keine Induktion und, mit Ausnahme von aeroben Bedingungen mit Licht (B), eine stetige Abnahme der β -Galaktosidaseaktivität. Die Messungen in der Anti- σ -Faktors-Mutante $\Delta chrR$ ergaben durch die konstitutive Aktivierung des Promotors extrem hohe Werte.

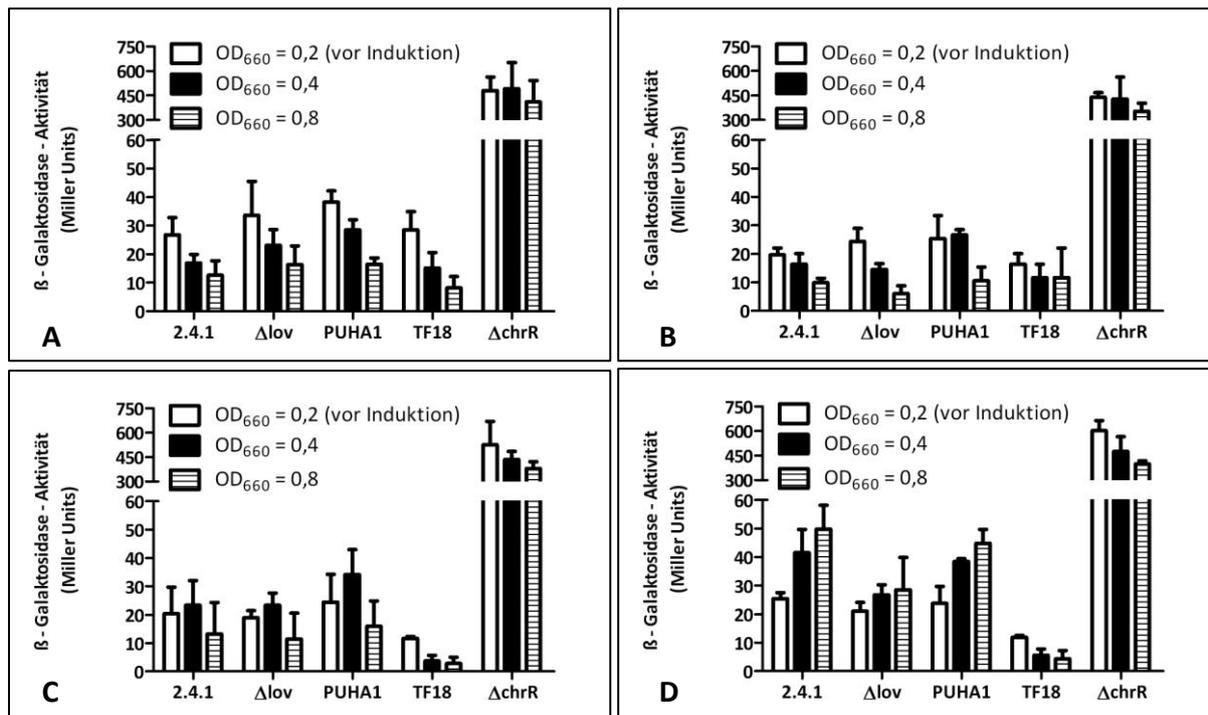


Abbildung 65 : Bestimmung der Aktivität des σ^E -abhängigen *phrA* Promotors unter verschiedenen Wachstumsbedingungen in den Stämmen *R. sphaeroides* 2.4.1, Δlov , PUHA1, TF18 und $\Delta chrR$ mittels eines β -Galaktosidase-Reportkonstruktes. Für den Versuch wurden Zellen unter aeroben Bedingungen über Nacht herangezogen und anschließend auf eine $OD_{660} = 0,2$ verdünnt. Die Inkubation erfolgte weiter unter aeroben Bedingungen (A), unter aeroben Bedingungen mit $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht (B), unter mikroaeroben Bedingungen mit $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht und $0,05 \mu\text{M}$ Methylenblau (C) und unter aeroben Bedingungen mit $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht und $0,05 \mu\text{M}$ Methylenblau (D). Die Probenentnahmen erfolgten bei einer OD_{660} von 0,4 und 0,8. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der höchsten Abweichung aus zwei Experimenten.

3.6.5 Weitere durch die LOV - Deletion beeinflusste Gene

Eine weitere Betrachtung der in der Δlov -Mutante regulierten Gene zeigte eine Reihe weiterer differenziell exprimierter Gene. Da diese keinem bekannten Regulon zugeordnet werden konnten, wurden sie nach ihrer Funktion unterteilt. Es wurden nur die Gene berücksichtigt, deren Ratios in Kategorie I (Ratio ≥ 2 oder Ratio $\leq 0,5$; $A \geq 9,5$) fielen. Weiterhin wurden von den in Kategorie I befindlichen 227 stark durch die *lov*-Deletion beeinflussten Genen, 76 (33,5 %) aus der Auswertung ausgeschlossen werden, da es sich um hypothetische Proteine handelte.

Bei den verbleibenden Transkripten fiel die verhältnismäßig hohe Anzahl an Transporter-Proteinen auf, welche mit 21 Genen (9,25 %) fast ein Zehntel der stark unterschiedlich exprimierten Transkripte ausmachten (Tabelle 6). Die genaue Betrachtung ergab, dass ein Teil am Transport von Kohlenhydratverbindungen (RSP_2701, RSP_3948, RSP_3943, RSP_3501) und ein großer Teil an der Entgiftung der Zelle von Antibiotika bzw. antimikrobiellen Peptiden beteiligt ist (RSP_0229, RSP_0460, RSP_0461, RSP_1479, RSP_2700, RSP_3131, RSP_3250, RSP_3603, RSP_3318). Desweiteren waren drei Häm-Transporter unter den Proteinen der

Kategorie I zu finden (*hmuS*, *ccmA*, *ccmC*). Dies war vor allem vor dem Hintergrund der in der Δlov - Mutante niedriger exprimierten Gene RSP_3539, RSP_3540 und RSP_1114, welche RTX - (*repeats in toxin*) hämolysinhomologe Proteine kodieren, interessant.

Nur ein in der Δlov - Mutante schwächer exprimierter Transporter befand sich in Kategorie I - der Eisentransporter *feoA2*.

Tabelle 6 : Relative Expressionslevel der differenziell exprimierten Transportproteine in Δlov im Vergleich zu 2.4.1. Vergleichend sind alle annotierten Transportproteine der Kategorie I aufgeführt. Die Gene wurden dabei nach ihrer Funktion und ihrer Kategorie unterteilt. Für die errechneten Ratios wurden die Einzelratios aller vorhandenen (eins bis drei) Sonden der jeweiligen Gensequenz verwendet und ihre Mittelwerte berechnet. Bei einer Ratio kleiner 1 wurde der negative Kehrwert berechnet um die Abnahme des Transkriptlevels besser zu veranschaulichen. (Rohdaten: siehe Anhang Abschnitt 8.1).

Gennummer (RSP)	Relative Veränderung in Δlov zu 2.4.1 (Ratio)	Annotation / funktionelle Beschreibung
Transportproteine		
Kategorie I		
RSP_0008	+ 2,9	DME Familie - Transp.
RSP_0228	+ 2,2	<i>hmuS</i> , putativer Häm - Transp.
RSP_0229	+ 2,4	<i>multidrug efflux</i> - Transp.
RSP_0460	+ 2,0	AcrB/AcrD/AcrF Kationen - Transp.
RSP_0461	+ 2,2	<i>multidrug</i> /Kationen - Transp.
RSP_1479	+ 2,0	<i>Oppc</i> , ABC Oligopeptid - Transp.
RSP_1665	+ 2,2	putativer RhtB Familie - Transp.
RSP_1801	+ 2,0	<i>ccmA</i> , ABC Häm - Transp. ATPase
RSP_1803	+ 2,1	<i>ccmC</i> , ABC Häm - Transp.
RSP_1853	+ 2,5	<i>TrkH2</i> , Kalium - Transp. H2
RSP_1854	+ 2,0	<i>trkH3</i> , Kalium - Transp. H3
RSP_2602	+ 2,0	<i>pstA</i> , ABC Phosphat - Transp.
RSP_2700	+ 2,1	ABC Oligopeptid - Transp.
RSP_2701	+ 2,3	ABC Oligo/Disaccharid - Transp.
RSP_3057	+ 2,3	ABC Prolin/Glycin - Transp.
RSP_3131	+ 2,2	ABC Peptid - Transp.
RSP_3159	+ 2,2	ABC - Transp. ATPase
RSP_3250	+ 2,2	ABC Peptid - Transp.
RSP_3318	+ 2,0	<i>acrB</i> , Kationen/ <i>multidrug</i> - Transp.
RSP_3603	+ 2,1	ABC <i>efflux</i> - Transp.
RSP_3948	+ 2,0	ABC Zucker - Transp.
RSP_3943	+ 2,2	ABC Zucker - Transp.
RSP_3501	+ 2,0	<i>yurM</i> , ABC Zucker - Transp.
RSP_7385	+ 2,5	Threonin <i>efflux</i> - Transp.
RSP_6020	- 2,1	<i>feoA2</i> , Fe ²⁺ - Transp.

Das mehrfache Auftreten von stärker exprimierten Genen in der Δlov - Mutante, welche am Molybdän - Transport bzw. der - Cofaktor Synthese beteiligt sind (Tabelle 7), konnte beobachtet werden. Dies war im Zusammenhang mit den sehr deutlich in Δlov höher exprimierten *nif* - Genen interessant, welche die Nitrogenase von *R. sphaeroides* kodieren.

Von den *nif*-Genen wären die ersten Gene des Operons *nifA* (RSP_0547), *nifB*, RSP_0545, *nifZ* (RSP_0544), *fixU* (RSP_0543), RSP_0542 in Kategorie I einzuordnen, während die im *nif*-Operon folgenden Gene *nifHDKEXQUSVWN* in Kategorie II und III fallen würden. Die Gene waren jedoch nur schwach exprimiert und wurden daher durch ihren niedrigen A - Wert für die weitere Auswertung nicht beachtet. Die vom *nif*-Operon synthetisierten Proteine besitzen eine Verbindung zum Molybdänstoffwechsel, da dieses Übergangsmetall einen essentiellen Cofaktor für die durch die Gene synthetisierte Nitrogenase darstellt. Die in Tabelle 7 beschriebenen Gene liegen nur geringfügig über dem gesetzten *threshold* für den A - Wert von 9,5.

Tabelle 7 : Relative Expressionslevel der am Molybdänstoffwechsel beteiligten und differenziell exprimierten Gene in Δlov im Vergleich zu 2.4.1. Vergleichend sind alle annotierten, am Molybdänstoffwechsel beteiligten Transkripte der Kategorie I angeführt. Die Gene wurden dabei nach ihrer Funktion und ihrer Kategorie unterteilt. Für die errechneten Ratios wurden die Einzelratios aller vorhandenen (eins bis drei) Sonden der jeweiligen Gensequenz verwendet und ihre Mittelwerte berechnet (Rohdaten: siehe Anhang Abschnitt 8.1).

Gennummer (RSP)	Relative Veränderung in Δlov zu 2.4.1 (Ratio)	Annotation / funktionelle Beschreibung
Molybdänstoffwechsel		
Kategorie I		
RSP_3872	+ 2,4	Molybdän - Pterin - Bindeprotein
RSP_3049	+ 2,3	<i>moeA</i> , Molybdän Cofaktor - Synthase
RSP_3050	+ 2,1	Molybdän Cofaktor - Synthase
RSP_0738	+ 2,0	<i>mobA</i> , Molybdopterin - Synthase
RSP_3869	+ 3,3	<i>modC</i> , ABC Molybdän - Transporter
RSP_0537	+ 2,4	<i>nifN</i> , Molybdän - Eisen - Protein
RSP_3868	+ 2,2	ABC Molybdän - Transporter

Wenn man die in der Δlov - Mutante deutlich schwächer exprimierten Gene betrachtete, fiel auf, dass hier eine große Anzahl von rRNA Genen (RSP_4294, RSP_4347, RSP_4395 und RSP_4355) in Kategorie I (Ratio $\leq 0,5$, A $\geq 9,5$) fällt. Gleichzeitig war eine große Anzahl der Gene von ribosomalen Proteinen (RSP_1720-1723, RSP_0141, RSP_1730, RSP_1719, RSP_1701, RSP_1708) deutlich schwächer exprimiert, was darauf hinwies, dass die Translation durch das Fehlen von LOV gehemmt wurde (Tabelle 8). Würde man noch die in Δlov schwächer exprimierten Gene der Kategorie II mit einbeziehen, hätte sich die Zahl der Gene für ribosomale Proteine noch deutlich erhöht (RSP_1700, RSP_1728, RSP_1717, RSP_3590, RSP_1733, RSP_1716, RSP_1729, RSP_0139, RSP_0140, RSP_1731, RSP_1709 und RSP_3820) und um mehrere Translations - Elongationsfaktoren (RSP_1714, RSP_1707 und RSP_2861) erweitert. In Kategorie II wären zwei schwächer exprimierte tRNA Gene aufgetaucht (RSP_4336 und RSP_4346).

Tabelle 8 : Relative Expressionslevel der an der Translation beteiligten und differenziell exprimierten Gene in Δlov im Vergleich zu 2.4.1. Vergleichend sind an der Translation beteiligte Gene der Kategorie I aufgeführt. Die Gene werden dabei nach ihrer Funktion und ihrer Kategorie unterteilt. Für die errechneten Ratios wurden die Einzelratios aller vorhandenen (eins bis drei) Sonden der jeweiligen Gensequenz verwendet und ihre Mittelwerte berechnet. Bei einer Ratio kleiner 1 wurde der negative Kehrwert berechnet um die Abnahme des Transkriptlevels besser zu veranschaulichen (Rohdaten: siehe Anhang Abschnitt 8.1).

Gennummer (RSP)	Relative Veränderung in Δlov zu 2.4.1 (Ratio)	Annotation / funktionelle Beschreibung
Translation		
Kategorie I		
RSP_4294	- 3,2	16S rRNA
RSP_4347	- 3,2	16S rRNA
RSP_4295	- 3,1	23S rRNA
RSP_4355	- 2,5	23s rRNA
RSP_1720	- 2,1	<i>rpsS</i> , ribosomales Protein S19
RSP_1723	- 2,0	<i>rpIP</i> , 50S ribosomales Protein L16
RSP_1722	- 2,0	<i>rpsC</i> , 30S ribosomales Protein S3
RSP_1721	- 2,0	<i>rpIV</i> , 50S ribosomales Protein L22
RSP_0141	- 2,1	ribosomales Protein L9
RSP_1730	- 2,0	<i>rpIF</i> , 50S ribosomales Protein L6
RSP_1719	- 2,0	<i>rpIB</i> , 50S ribosomales protein L2
RSP_1701	- 2,0	<i>rpIJ</i> , Ribosomales Protein L2
RSP_1708	- 2,0	<i>rpsU</i> , 30S ribosomales Protein S21

3.6.6 Einfluss von LOV auf die Expression von sRNAs

Die Rolle von kleinen, regulatorischen RNAs (sRNAs) in der Genregulation ist in den letzten Jahren immer mehr in den Vordergrund getreten (Gottesman, 2005; Romby *et al.*, 2006; Waters und Storz, 2009). Im Rahmen einer Kooperation mit der Gruppe von Jörg Vogel am Max - Planck - Institut für Infektionsbiologie (Berlin) wurden daher mittels 454 - *pyrosequencing* sRNAs in *R. sphaeroides* identifiziert, die nach (photo)oxidativem Stress besonders abundant in den Zellen sind (Berghoff *et al.*, 2009). Um herauszufinden, ob diese in der Δlov -Mutante differenziell exprimiert sind, wurden gegen diese sRNA Sequenzen ebenfalls Sonden auf den *microarrays* erstellt. Es zeigte sich, dass eine große Zahl von sRNAs in der Δlov -Mutante differenziell im Vergleich zu 2.4.1 exprimiert wurden (Tabelle 9).

Insgesamt konnten 16 stark regulierten sRNAs (Kategorie I) und sechs schwächer regulierte sRNAs (Kategorie II) identifiziert werden. Es fiel auf, dass nur zwei sRNAs in Kategorie I in Δlov schwächer und 14 stärker exprimiert waren, während in Kategorie II vier eine Ratio von kleiner 0,57 und sechs eine von größer als 1,75 hatten.

Betrachtete man nur die bereits in ihrer Funktion beschriebenen sRNAs, zeigte sich bei RSs_0019 eine deutlich höhere Expression und bei RSs_0682 eine schwächere Expression (beide Kategorie I) der Mutante im Vergleich zu 2.4.1. Für RSs_0680a konnte eine höhere Expression beobachtet werden (Kategorie II), während die Expression von RSs_2461 und RSs_1543 etwas weniger stark war (Kategorie III). Die an der Photosyntheseregulation beteiligte sRNA RSs_2430

(Mank, 2009) war in der Δlov - Mutante mit einer Ratio von 2,9 eine der am stärksten höher exprimierten sRNAs.

Tabelle 9 : Relative Expressionslevel der sRNAs in Δlov im Vergleich zu 2.4.1. Vergleichend sind die sRNAs der Kategorie I und II mit unbekannter Funktion aufgeführt, sowie alle mit bereits identifizierten Merkmalen. Die sRNAs wurden nach ihrer Kategorie und ihrer möglichen Funktion unterteilt. Für die errechneten Ratios wurden die Einzelratios aller vorhandenen (eins bis drei) Sonden der jeweiligen sRNA Sequenz verwendet und ihre Mittelwerte berechnet. Bei einer Ratio kleiner 1 wurde der negative Kehrwert berechnet, um die Abnahme des Transkript/levels besser zu veranschaulichen (Rohdaten: siehe Anhang Abschnitt 8.1).

sRNA Nummer (RSs)	Relative Veränderung in Δlov zu 2.4.1 (Ratio)	funktionelle Beschreibung
sRNAs mit Hinweisen auf eine mögliche Funktion		
Kategorie I		
RSs_0019	+ 2,8	σ^E - abhängig exprimierte sRNA
RSs_0682	- 2,0	1O_2 - abhängig prozessierte sRNA
RSs_2430	+ 2,9	Photosyntheseregulation
Kategorie II		
RSs_0680a	+ 1,8	1O_2 - und O_2^- - abhängige sRNA
Kategorie III		
RSs_2461	+ 1,7	Cotranskript mit OmpR
RSs_1543	+ 1,7	$\sigma^{HI} / \sigma^{HII}$ - abhängige sRNA
sRNAs ohne beschriebene Funktion		
Kategorie I		
RSs_2863	+ 2,3	Nach photooxidativem Stress angereichert
RSs_0770	+ 2,3	
RSs_0182	+ 2,0	
RSs_0299	+ 2,1	
RSs_0512	+ 2,1	
RSs_0230	+ 2,1	
RSs_1263	+ 2,1	
RSs_1368	+ 2,0	
RSs_1624	+ 2,3	
RSs_0148	+ 2,5	
RSs_1018	+ 2,6	
RSs_0979	+ 2,7	
RSs_2710	+ 3,2	
RSs_0552	- 2,5	
Kategorie II		
RSs_1508	+ 1,8	Nach photooxidativem Stress angereichert
RSs_0245	+ 1,8	
RSs_2378	+ 1,8	
RSs_0827	+ 1,9	
RSs_0136	+ 1,9	
RSs_0703	+ 1,9	
RSs_2249	- 2,0	
RSs_0390	- 2,0	

Eine genauere Betrachtung der erhaltenen Fluoreszenzrohdaten ermöglichte eine Aussage über die relative Abundanz der getesteten sRNAs. Da für die *microarrays* direkt die aus den Zellen isolierte RNA mit *Cy3/Cy5* markiert wurde, erhielt man durch die gemessene Fluoreszenz eine zuverlässige Aussage über die relative Häufigkeit der Ziele der einzelnen Sonden. Besaßen diese ein sehr hohes Fluoreszenzlevel, deutete dies auf eine sehr hohe Abundanz in der Zelle hin und man konnte vergleichend zu Bekannten, sehr stark exprimierten mRNAs (z.B. dem *puf*- oder *puc*- Operon), einen Überblick über die Abundanz der sRNA in den Zellen erhalten (Tabelle 10).

Tabelle 10 : Zusammenfassung der relativen Fluoreszenzwerte (absolute Fluoreszenz minus dem Fluoreszenzhintergrund) für Cy3 / Cy5 für besonders abundante sRNAs aus dem pyrosequencing im Vergleich zu besonders stark exprimierten mRNAs. Vergleichend sind die Rohdaten der Fluoreszenzmittelwerte aus den einzelnen Sonden angegeben. Lagen dabei mehrere Sonden pro sRNA vor, wurde zunächst der Mittelwert aus den vorhandenen Einzelwerten gebildet. Zudem musste beachtet werden, dass die maximal messbare relative Fluoreszenz des Gerätes bei 65.000 lag, d.h. höhere Werte konnten nicht vorliegen. Es wurden jeweils die Mittelwerte aus den Fluoreszenzwerten der Einzelsonden berechnet (Rohdaten: siehe Anhang Abschnitt 8.1).

Gennummer (RSP) bzw. sRNA - (RSs) Nummer	Relative Fluoreszenz Cy3 ($\Delta lo v$)	Relative Fluoreszenz Cy5 (2.4.1)
Abundante mRNAs		
Kategorie I		
RSP_6256 (<i>pucA</i>)	29.000	16.000
Kategorie II		
RSP_0257 (<i>pufL</i>)	12.000	6.500
Kategorie III		
RSP_0258 (<i>pufA</i>)	25.500	23.000
Abundante sRNAs (pyrosequencing)		
Kategorie I		
RSs_2430	65.000	23.000
RSs_0770	20.000	8.500
RSs_0680a	26.000	48.000
RSs_0552	31.000	63.000
Kategorie II		
RSs_0682	44.000	25.000
RSs_0635	38.000	56.000
RSs_2363	48.500	64.500
RSs_0775	34.000	58.000
RSs_2249	26.000	47.000
Kategorie III		
RSs_2978	21.000	20.000
RSs_2461	51.500	32.000
RSs_1740	40.000	23.000
RSs_1543	58.500	34.000
RSs_1386	48.000	26.500
RSs_0940	25.000	30.000
RSs_0510	42.000	62.000

RSs_0504	57.000	52.500
RSs_0442	59.500	58.000
RSs_0422 (sense)	13.500	15.000
RSs_0351	54.000	60.000
RSs_0293	20.000	16.000
RSs_0252	47.000	61.000
RSs_0243	40.000	49.500
RSs_0140	13.000	14.500
<i>antisense</i> zu RSP_3837 (Hyp. Protein)	29.500	40.000
<i>antisense</i> zu RSP_2351 (Hyp. Protein)	31.500	26.500
<i>antisense</i> zu RSP_1198 (Hyp. Protein)	12.000	13.500

Verglich man zunächst nur die höchsten Fluoreszenzlevel für die mRNAs mit den höchsten der sRNAs, zeigte sich, dass einige der sRNAs deutlich höhere Fluoreszenzwerte besaßen und mit Werten nahe 65.000 sogar die Detektionsgrenze des Gerätes erreichten (RSs_2430, RSs_0552, RSs_2363, RSs_0351 und RSs_0510). Neben diesen Werten existierten noch eine große Anzahl, deren relative Fluoreszenz die der pigmentbindenden Proteine des Photosyntheseapparates um ungefähr das Doppelte überschritt (RSs_0635, RSs_0775, RSs_1543, RSs_0504 und RSs_0442). Die restlichen in Tabelle 10 erwähnten sRNAs zeigten vergleichbar hohe Fluoreszenzwerte wie die am stärksten exprimierten mRNAs in *R. sphaeroides*.

Neben den in intergenischen Regionen befindlichen kleinen RNAs fielen bei Betrachtung der Rohdaten auch einige sRNAs durch hohe Fluoreszenz auf, welche *antisense* zu bereits bekannten Genen lagen. Es handelte sich um *antisense* RNA zu RSP_3837, RSP_2351 und RSP_1198, welche alle hypothetische Proteine kodieren.

Von den sRNAs mit einer bereits beschriebenen Funktion fielen vor allem die $^1\text{O}_2$ -abhängig prozessierte RSs_0682 und die an der Photosyntheseegenregulation beteiligte RSs_2430 aus Kategorie I durch hohe Fluoreszenzwerte auf. In Kategorie II tauchte erneut die $^1\text{O}_2$ und O_2^- -abhängige sRNA RSs_0680a unter den besonders stark exprimierten sRNAs auf. Die $\sigma^{\text{HI}} / \sigma^{\text{HII}}$ -abhängige sRNA RSs_1543 und die mit OmpR cotranskribierte RSs_2461 waren unter den besonders stark exprimierten sRNAs aus Kategorie III zu finden.

3.7 Vergleich der Transkriptome von *R. sphaeroides* 2.4.1 und Δlov nach Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress

Der erste Test des selbst erstellten *microarrays* (Abschnitt 3.4) hatte auswertbare Ergebnisse geliefert und durch den Vergleich der Transkriptome unter mikroaerobem Wachstum konnten grundsätzliche Abweichungen in der Genexpression von der Δlov -Mutante und dem Wildtyp gezeigt werden. Es wurden daher weitere Transkriptomanalysen unter spezifischeren Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden zum einen mit Blaulicht bestrahlt, da bis zu diesem Zeitpunkt kein direkter lichtabhängiger Effekt des LOV Proteins beobachtet werden konnte, obwohl dieses *in vitro* einen blaulichtabhängigen Photozyklus zeigt (Hendrischk *et al.*, 2009b). Zum anderen wurde die Genexpression nach photooxidativem Stress untersucht, da die Auswertung der Transkriptome unter mikroaeroben Bedingungen eine stärkere Expression des σ^{E} -Regulons in der Δlov -Mutante nachwies (Abschnitt 3.4.4).

Die Kulturen des Wildtyps und der Δlov -Mutante wurden zu Versuchsbeginn auf eine OD_{660} von 0,2 verdünnt und für die Blaulichtversuche anschließend unter semiaeroben Bedingungen ($3,2 - 4 \text{ mg l}^{-1} \text{ O}_2$) bei 32°C bis zu einer OD_{660} von 0,4 wachsen gelassen. Die Zellen wurden daraufhin für eine Stunde mit $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Blaulicht bestrahlt und anschließend geerntet. Um die Zellen photooxidativem Stress auszusetzen wurden die Kulturen auf eine OD_{660} von 0,2 verdünnt, mit $0,2 \mu\text{M}$ des Photosensibilisierers Methylenblau versetzt und anschließend unter Begasung mit Raumluft ($< 8 \text{ mg l}^{-1} \text{ O}_2$), bis zu einer OD_{660} von 0,4 wachsen gelassen. Die Zellen wurden für 7 min mit 800 W m^{-1} weißem Starklicht bestrahlt, um photooxidativen Stress in der Kultur zu erzeugen.

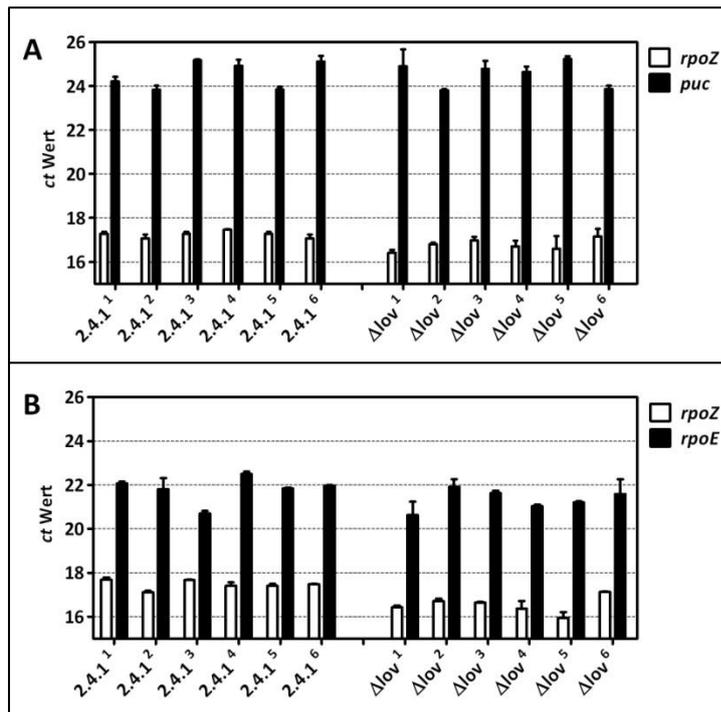


Abbildung 66 : Quantifizierung des mRNA - levels der Gene *rpoZ* und *puc2AB / rpoE* mittels real time RT - PCR für 2.4.1 und Δlov nach Blaulichtbestrahlung (A) und photooxidativem Stress (B). Der Graph zeigt die Zyklenzahl (ct Wert), bei der die relative Fluoreszenz der sechs 2.4.1 (2.4.1₁₋₆) - und der sechs Δlov (Δlov_{1-6}) - Kulturen den definierten Schwellenwert überschritt.

Im Weiteren wurde mit der RNA genau wie für ersten *microarray* verfahren (Abschnitt 3.2.1). Für alle durchgeführten Experimente wurde wieder eine *real time RT - PCR* durchgeführt (Abbildung 66), um ein gleichmäßiges Expressionslevel für je ein Transkript sicherzustellen, welches unter den gewählten Bedingungen einen starken Effekt zeigte. Für die mit blaulichtbestrahlten Kulturen wurde das Expressionslevel von *puc* quantifiziert, da dieses durch die Bestrahlung deutlich reduziert sein müsste. Als Kontrolle für das Expressionslevel in den mit Singulettstauerstoffstress behandelten Kulturen wurde *rpoE* (Gen von σ^E) verwendet, da dieser nach 7 min Stress stark induziert sein sollte. Es konnten nur geringfügige Abweichungen in den Expressionsleveln von *rpoZ* (0,53 Zyklen für Blaulichtbestrahlung bzw. 0,83 Zyklen für photooxidativen Stress), *puc2AB* (1,58 Zyklen) und *rpoE* (1,97 Zyklen) gemessen werden.

Da durch einen von Bork Berghoff durchgeführten *pulldown* mit dem *Hfq* Protein von *R. sphaeroides* weitere sRNAs identifiziert werden konnten, wurde das *design* des *microarray* für die nun folgenden Analysen um weitere 22 sRNAs zu einer Gesamtzahl von 144 sRNAs erweitert. Zudem wurde der *microarray* vollständig mit Sonden gefüllt, so dass keine leeren *spots* mehr auf der Oberfläche des *slides* vorlagen, was zu einer Erhöhung der Gesamtsondenanzahl (mehr als

drei) für zufällige Gene führte. Es wurden keine neuen Sonden generiert, sondern nur Duplikate von bereits vorhandenen Sonden erstellt.

3.7.1 Aufbereitung der Rohdaten

Für die erste Qualitätsabschätzung der eingescannten *microarrays* wurden wie bereits für den ersten *chip* zunächst ein MA-Plot (Abbildung 67) durchgeführt und anschließend die Werte gegen den Hintergrund korrigiert und nach LOWESS normalisiert (siehe Abschnitt : 3.4.1).

Nach der Normalisierung der Daten zeigten diese erneut den erwarteten *cluster* um die Nulllinie. Betrachtete man die MA-Plots fiel zuerst auf, dass vor allem nach Blaulichtbestrahlung mehr Gene einen negativen M-Wert, d.h. einen Wert < 0 , besitzen. Dieser Effekt war auch unter photooxidativem Stress sichtbar, jedoch weniger stark. Auffällig war zudem die, im Vergleich zum ersten *chip*, stark nach rechts verschobene Verteilung der A - Werte, weshalb der *threshold* von 9,5 nicht mehr verwendet werden konnte. Dieser Unterschied lag in der Verwendung eines anderen *scanners* (Agilent DNA *microarray scanner*) begründet, was zu einer Verschiebung der gemessenen Rohfluoreszenzwerte führte. Da sich dadurch auch der Bereich in dem die Rohwerte noch zuverlässig sind, verschoben hat, wurden für die weitere Auswertung nur Sonden mit einem A - Wert von mindestens 12 mit einbezogen (Rohdaten: siehe Anhang Abschnitt 8.1).

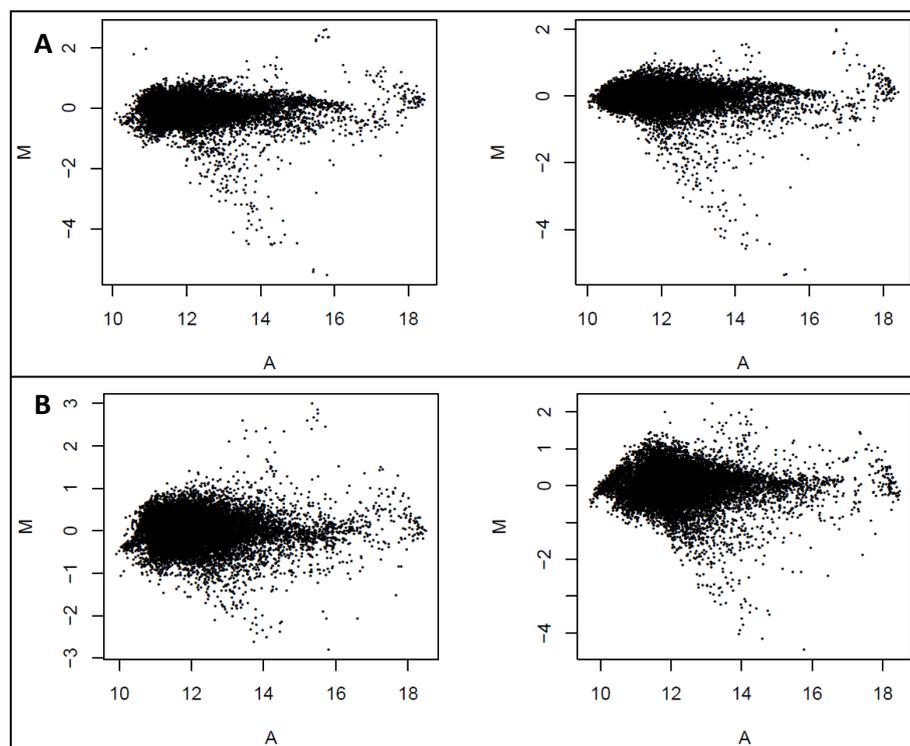


Abbildung 67 : MA - Plot der korrigierten Daten für *microarray 1* (links) und *microarray 2* (rechts) von 2.4.1 gegen Δlox nach Blaulichtbestrahlung (A) und photooxidativem Stress (B). Die Einzelwerte sind zuerst einer Hintergrundkorrektur und anschließend einer LOWESS Normalisierung unterzogen worden. Die einzelnen Datenpunkte der beiden *microarrays* sind jeweils anhand ihres M - (Berechnung siehe Formel 5, Abschnitt 3.6.1) und ihres A - Wertes (Berechnung siehe Formel 6, Abschnitt 3.6.1) aufgetragen.

3.7.2 Allgemeine Übersicht über die Transkriptomanalyse

Die Analyse der bereinigten Transkriptomdaten (Abbildung 68) ergab, dass nach Blaulichtbestrahlung in der Δ/ov -Mutante im Vergleich zum Wildtyp 2.4.1 insgesamt 305 (6,98 %) der 4372 Gentranskripte eine stark veränderte Expression zeigten (Kategorie I). Von diesen besaßen 225 (5,15 %) eine erhöhte (Ratio ≥ 2 ; $A \geq 12$) und 80 (1,83 %) eine erniedrigte Expression (Ratio $\leq 0,5$; $A \geq 12$). Bezog man weiterhin die weniger stark, aber dennoch signifikant differenziell exprimierten Gene mit ein, vergrößerte sich die Zahl auf 451 (10,32 %) der gesamten Zielsequenzen. Es wurden 103 (2,36 %) stärker exprimierte (Ratio 2 - 1,75; $A \geq 12$) und 43 (0,98 %) schwächer exprimierte Gene (Ratio 0,57 - 0,5; $A \geq 12$) mit einbezogen (Kategorie II).

Vergleichend dazu ergab die Analyse der Transkriptomdaten unter photooxidativem Stress, dass hier mit 446 deutlich verändert exprimierten Transkripten (10,20 %) mehr betroffen waren als unter Blaulichtbestrahlung (Kategorie I). Es besaßen 347 (7,94 %) eine erhöhte und 99 (2,26 %) eine erniedrigte Expression. Durch das Einbeziehen der Gene der Kategorie II in die Auswertung konnte die Zahl der differenziell exprimierten Zielsequenzen um 193 (4,41 %) stärker exprimierte und 85 (1,94 %) schwächer exprimierte Transkripte, auf eine Gesamtzahl von 724 (16,56 %) erhöht werden.

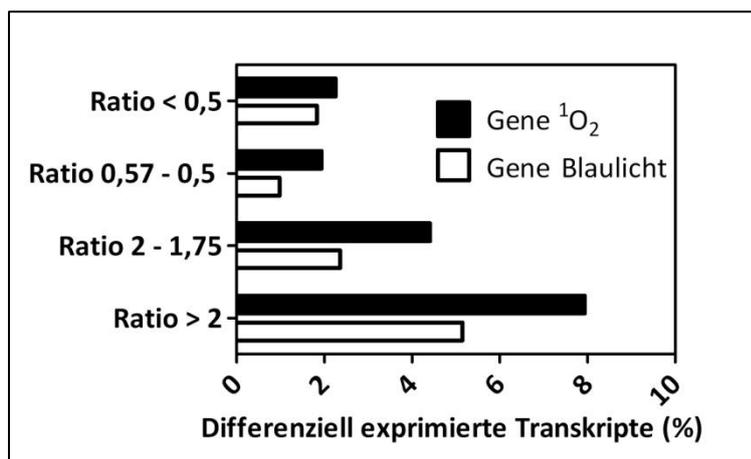


Abbildung 68 : Überblick über den Anteil von Transkripten, welche im Vergleich von Δ/ov zu 2.4.1 unter Blaulichtbestrahlung und photooxidativen (1O_2) Stress differenziell exprimiert werden. Angegeben sind die prozentualen Anteile (%) der signifikant veränderten sRNAs an der Gesamtzahl der Transkripte der getesteten Gene. Dabei ist die Gesamtzahl für die Gene $n = 4372$.

Betrachtete man die allgemeine Verteilung der Ratios der sRNAs (Abbildung 69) auf dem *microarray* nach Blaulichtbestrahlung, zeigte sich, dass insgesamt 20 (13,88 %) der 144 sRNAs eine stark veränderte Expression (Kategorie I) besaßen. Davon stiegen 9 (6,25 %) in ihrer Expression in der Mutante an und 11 (2,78 %) zeigten verringerte *level*. Durch Einbeziehen der weniger stark regulierten sRNAs konnte die Anzahl der differenziell exprimierten Transkripte auf 26 (18,05 %) erhöht werden (Kategorie II). Dies erweiterte die Zahl um weitere 4 (2,78 %) stärker exprimierte und 2 (1,39 %) schwächer exprimierte sRNAs.

Unter Singulettstauerstoffstress zeigten 32 (22,22 %) der sRNAs eine stark veränderte Expression. In der Kategorie I stiegen 14 (9,72 %) der Transkripte stark an und 18 (12,50 %) zeigten eine deutlich schwächere Expression in der Mutante. Durch Einbeziehen der sRNAs der Kategorie II erhöhte sich diese Zahl geringfügig um 2 (1,39 %) stärker exprimierte und 9 (6,25 %) schwächer exprimierte Transkripte.

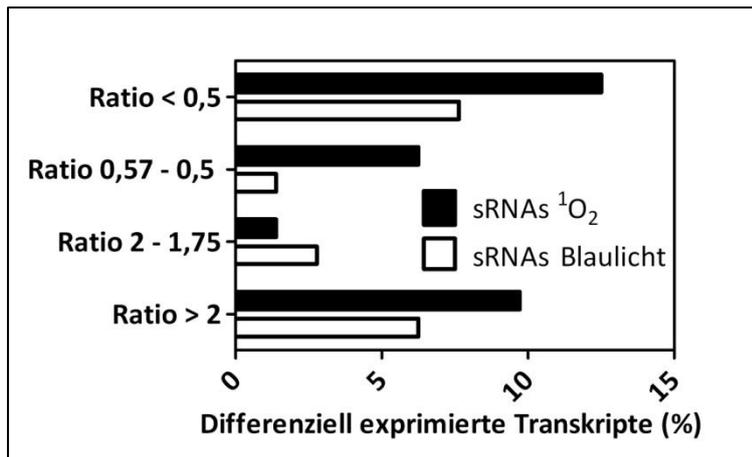


Abbildung 69 : Überblick über den Anteil von sRNAs, welche im Vergleich von Δlov zu 2.4.1 unter Blaulichtbestrahlung und photooxidativen (1O_2) Stress differenziell exprimiert werden. Angegeben sind die prozentualen Anteile (%) der signifikant veränderten sRNAs an der Gesamtzahl der Transkripte der getesteten Gene. Dabei ist die Gesamtzahl für die sRNAs $n = 144$.

Um die erhaltenen Daten zu verifizieren, wurden erneut einige Gene per *real time* RT - PCR quantifiziert (Abbildung 70). Es wurde zum einen das Gen RSP_4038 (*glpR*) verwendet, welches sowohl unter Blaulichtbestrahlung als auch unter photooxidativem Stress deutlich stärker in der Mutante exprimiert war. Zum anderen wurde das Gen RSP_2965 (*luxR*) getestet, da dieses zwar ebenfalls sehr stark unter beiden Bedingungen hochreguliert war, jedoch große Schwankungen in den errechneten Ratios für die einzelnen Sonden zeigte. Als auf den *microarrays* herunter reguliertes Gen wurde RSP_0069 (*fliC*) getestet, da dieses unter beiden Bedingungen deutlich schwächer in der Mutante exprimiert wurde. Zuletzt wurde für Blaulichtbestrahlung noch RSP_6158 / RSP_1556 (*puc2AB*) und für photooxidativen Stress RSP_1092 (*rpoE*) getestet. Beide zeigten auf dem *microarray* keine Änderung ihrer Transkription.

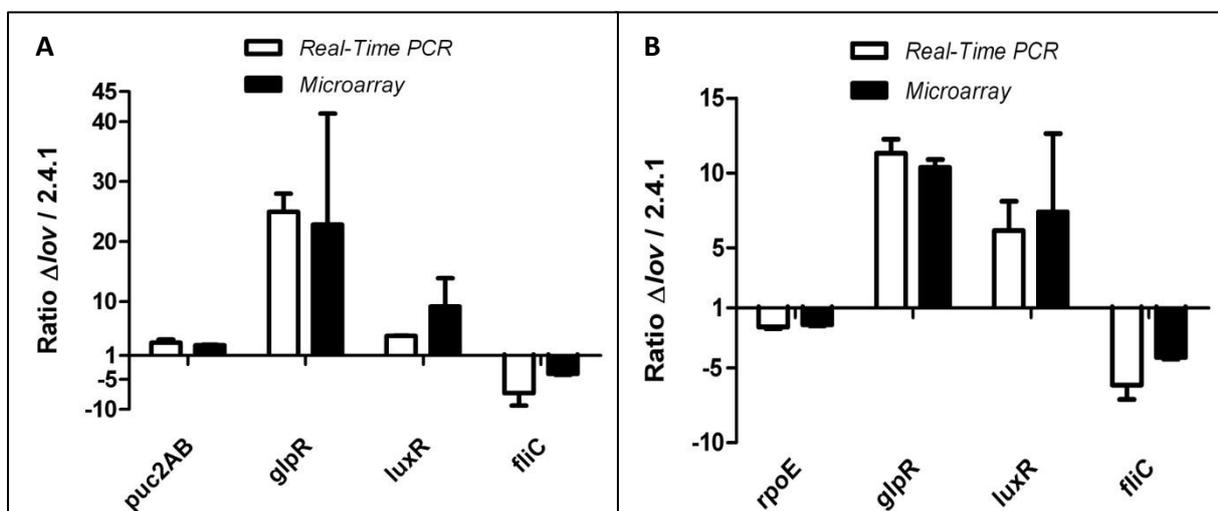


Abbildung 70 : Verifizierung der *microarray* Daten für Blaulichtbestrahlung (A) und photooxidativen Stress (B) mittels *real time* RT - PCR für die Gene *puc2AB* (RSP_6158 / RSP_1556), *glpR* (RSP_4038), *rpoE* (RSP_1092), *luxR* (RSP_2965) und *fliC* (RSP_0069). Vergleichend wird die errechnete Ratio (Δlov zu 2.4.1) zwischen den *microarrays* und der *real time* RT - PCR für die einzelnen Gene dargestellt.

Die erhaltenen Ergebnisse der *real time* RT - PCRs für die getesteten Gene konnten die Daten der *microarrays* bestätigen. Für das Gen RSP_0069 (*fliC*), welches eine deutliche Abnahme auf den *microarrays* zeigte, konnte diese mittels *real time* RT - PCR nachgewiesen werden. Die errechneten Ratios aus der RT - PCR waren dabei etwas höher, als jene von den *chips*. Für die

jeweiligen unveränderten Gene RSP_6158 / RSP_1556 (*puc2AB*) und RSP_1092 (*rpoE*) konnten in den *real time* RT - PCR's ebenfalls keine Unterschiede im Transkriptlevel nachgewiesen werden. Für das unter beiden Bedingungen deutlich stärker exprimierte Gen RSP_4038 (*glpR*) konnte der Anstieg ebenfalls bestätigt werden, wobei die errechneten Ratios der PCR denen des *microarrays* entsprachen. Für das letzte getestete Gen RSP_2965 (*luxR*) konnte ein Anstieg des Transkriptlevels zwar nachgewiesen werden, dieser lag jedoch unter den Werten, welche auf der *chip* messbar waren.

3.7.3 Unter allen Versuchsbedingungen beeinflusste Gene

Ein erster Vergleich der Transkriptomdaten zeigte, dass ein Großteil der Gene, welche in der Δ/ov - Mutante differenziell zum Wildtyp 2.4.1 exprimiert sind, sowohl nach Bestrahlung mit Blaulicht, als auch nach Singulettstauerstoffstress ähnliche Veränderungen in ihrer Transkription zeigten. Dabei konnten auch einige Gene beobachtet werden, welche sowohl auf dem ersten *microarray* (Wachstum bis $OD_{660} = 0,8$), als auch nach Blaulicht und photooxidativen Stress vergleichbare Anstiege bzw. Abnahmen der Expression zeigten (d.h. die Gene fielen alle in die gleiche Kategorie und die einzelnen Sonden zeigten nur eine geringe Abweichung). Dies traf auf etwa 10 % der in die Auswertung einbezogenen (A-Wert > 12) Gene in Kategorie I zu und auf fast 15 % der Gene, wenn Gene der Kategorie II mit einbezogen wurden, wobei sich in beiden Kategorien ein großer Anteil an hypothetischen Proteinen wiederfand (ca. 25 %).

Diese Gene wurden in der Δ/ov - Mutante unabhängig von den Versuchsbedingungen differenziell exprimiert (Tabelle 11). Auffällig war vor allem das häufige Auftreten von Transkripten, die Proteine kodieren, welche in Transport und Synthese von Kohlenhydrat - und Aminosäureverbindungen involviert sind (RSP_0941, RSP_2701, RSP_3267, RSP_3501, RSP_3533, RSP_3535, RSP_3043, RSP_3948, RSP_4049, RSP_4050). Zusätzlich waren die Gene *pucABC* (RSP_6256 und RSP_0314 - RSP_0315) und *puc2AB* (RSP_6158 und RSP_1556) des LHC II unter allen Bedingungen in der Mutante stärker exprimiert. Neben diesen Gruppen trat zudem eine große Zahl an Genprodukten der Translation auf (RSP_4294, RSP_4347, RSP_4395, RSP_4355, RSP_1720-1723, RSP_0141, RSP_1730, RSP_1719, RSP_1701, RSP_1708), welche wieder alle deutlich schwächer in Δ/ov exprimiert waren. Dabei ist auch unter Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress auffällig, dass nahezu alle rRNA - Gene und alle ribosomale Proteine zumindest etwas schwächer exprimiert waren.

Tabelle 11 : Relative Expressionslevel der differenziell exprimierten Gene in Δlov im Vergleich zu 2.4.1 nach mikroaerobem Wachstum bis zu einer OD_{660} von 0,8, Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress. Vergleichend sind die drei Ratios der unter allen Bedingungen vergleichbar regulierten Gene der Kategorie I aufgeführt. Die Gene werden dabei nach ihrer Funktion unterteilt. Für die errechneten Ratios wurden die Einzelratios aller vorhandenen (zwei bis drei) Sonden der jeweiligen Gensequenz verwendet und ihr Mittelwert berechnet. Bei einer Ratio kleiner 1 wurde der negative Kehrwert berechnet um die Abnahme des Transkriptlevels besser zu veranschaulichen (Rohdaten: siehe Anhang Abschnitt 8.1).

Gennummer (RSP)	Ratio (1O_2 Stress)	Ratio (Blaulicht)	Ratio ($OD_{660} = 0,8$)	Annotation / funktionelle Beschreibung
Unter allen Bedingungen differenziell exprimiert				
Kohlenhydrat - und Aminosäuresynthese / - transport				
RSP_3501	+ 2,7	+ 2,8	+ 2,0	<i>yurM</i> , ABC Zucker - Transporter
RSP_0941	+ 2,0	+ 2,4	+ 2,0	ABC - Transporter
RSP_3533	+ 4,3	+ 3,1	+ 2,2	Aldehyd - Dehydrogenase
RSP_3535	+ 6,1	+ 7,0	+ 2,8	Enoyl - CoA Hydratase
RSP_3267	+ 3,9	+ 4,8	+ 2,7	Phosphoribulokinase
RSP_2701	+ 2,9	+ 3,0	+ 2,3	ABC Oligo/Disaccharid - Transporter
RSP_3948	+ 2,6	+ 2,1	+ 2,0	ABC Zucker - Transporter
RSP_3943	+ 2,9	+ 3,0	+ 2,2	ABC Zucker - Transporter
RSP_4047	- 2,5	- 2,0	- 2,1	Untereinheit der Pyruvat - Dehydrog.
RSP_4049	- 2,4	- 2,0	- 2,0	Untereinheit der Pyruvat - Dehydrog.
RSP_4050	- 2,5	- 2,1	- 2,0	Untereinheit der Pyruvat - Dehydrog.
Photosynthesegene				
RSP_1556	+ 3,5	+ 2,9	+ 2,6	<i>puc2B</i> , LHCII <i>alpha</i> - Untereinheit
RSP_6158	+ 1,9	+ 2,0	+ 2,2	<i>puc2A</i> , LHCII <i>beta</i> - Untereinheit
RSP_0314	+ 2,1	+ 2,0	+ 2,4	<i>pucB</i> , LHC II <i>beta</i> - Untereinheit
RSP_6256	+ 2,8	+ 2,8	+ 2,4	<i>pucA</i> , LHC II <i>alpha</i> - Untereinheit
RSP_0315	+ 2,2	+ 2,2	+ 2,0	<i>pucC</i>
Translation				
RSP_4294	-5,0	-5,0	- 3,2	16S rRNA
RSP_4347	-5,0	-5,0	- 3,2	16S rRNA
RSP_4295	-5,0	-5,0	- 3,1	23S rRNA
RSP_4355	-5,0	-5,0	- 2,5	23s rRNA
RSP_1720	- 2,0	- 2,0	- 2,1	<i>rpsS</i> , ribosomales Protein S19
RSP_1723	- 2,0	- 2,0	- 2,0	<i>rpIP</i> , 50S ribosomales Protein L16
RSP_1722	- 2,0	- 2,0	- 2,0	<i>rpsC</i> , 30S ribosomales Protein S3
RSP_1721	- 2,0	- 2,0	- 2,0	<i>rpIV</i> , 50S ribosomales Protein L22
RSP_0141	- 2,0	- 2,0	- 2,1	ribosomales Protein L9
RSP_1730	- 2,0	- 2,0	- 2,0	<i>rpIF</i> , 50S ribosomales Protein L6
RSP_1719	- 2,0	- 2,0	- 2,0	<i>rpIB</i> , 50S ribosomales protein L2
RSP_1701	- 2,0	- 1,9	- 2,0	<i>rpIJ</i> , ribosomales Protein L2
RSP_1708	- 2,0	- 2,0	- 2,0	<i>rpsU</i> , 30S ribosomales Protein S21

3.7.4 Durch Blaulichtbestrahlung und photooxidativen Stress beeinflusste Gene

Verglich man nur die Blaulicht- und Singulettstauerstoffstress abhängig differenziell exprimierten Gene, zeigte sich eine sehr große Übereinstimmung zwischen diesen. Während nur etwa 15 % der Gene der Kategorie I und II ähnliche Transkriptlevel unter allen Bedingungen

zeigten, war diese Zahl zwischen den Blaulichtbedingungen und photooxidativem Stress noch einmal deutlich höher (etwa 60 - 70 %). Generell fiel auf, dass in fast allen Fällen die sichtbaren Effekte nach Blaulichtbestrahlung stärker waren, als nach photooxidativem Stress.

Die größte Gruppe nach den hypothetischen Proteinen (ca. 20 %) stellen die 49 tRNA - Gene (RSP_4297 - RSP_4346) dar, welche in der Δ/ov - Mutante unter Blaulicht und Singulett-Sauerstoffstress, mit nur einer Ausnahme (RSP_4300), deutlich schwächer exprimiert wurden (alle Kategorie I), während sie nach mikroaerobem Wachstum keinen Unterschied zum Wildtyp zeigten.

Die nächstkleinere funktionell verwandte Gruppe stellte die an der Chemotaxis beteiligten Proteine dar. Hier war vor allem auffällig, dass ein Teil der Proteine unter den Versuchsbedingungen schwächer exprimiert (RSP_0069, RSP_0083, RSP_0037, RSP_0080, RSP_1585 und RSP_1586) und ein Teil stärker exprimiert (RSP_1307, RSP_1311, RSP_1321 und RSP_1322) vorlag.

Interessanterweise tauchten unter den vergleichbar regulierten Transportern fast ausschließlich solche auf, die am Metallionentransport beteiligt sind (RSP_0904-0906, RSP_3568, RSP_3571, RSP_1818 und RSP_2282). Diese waren alle nach Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress in der Δ/ov - Mutante deutlich stärker exprimiert als nach mikroaerobem Wachstum. Unter den Transportern fand sich zudem auch ein putativer Cobalttransporter (RSP_2608) und mit ihm einige Proteine (RSP_2827, RSP_3185, RSP_2608, RSP_2427, RSP_2823) welche an der Vitamin B12 (Cobalamin) Synthese beteiligt sind. Vitamin B12 spielt eine bedeutende Rolle bei der Häm- und Bacteriochlorophyllsynthese.

Die letzte Gruppe von sowohl unter Blaulicht als auch unter photooxidativem Stress differenziell regulierten Genen, die Transkriptionsfaktoren, enthielt gleichzeitig die Proteine mit den höchsten Ratios. Dabei zeigten alle Proteine eine höhere Expression der Transkripte in der Mutante (RSP_1441, RSP_1925, RSP_4038, RSP_0457, RSP_2965, RSP_4257, RSP_3188).

Auffällig war in der Gruppe der sowohl nach Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress vergleichbar regulierten Transkripte zudem das sehr häufige Auftreten weiterer (vgl. Abschnitt 3.7.3) am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligter Gene, die knapp unter dem gesetzten *A - threshold* lagen. Dabei betrafen die Veränderungen in vielen Fällen das gesamte Operon. So waren z.B. die Gene der RuBisCO (RSP_1278 - 1286), eine Vielzahl von Zucker - und Aminosäuretransportern (RSP_1444 - 1446, RSP_2208, RSP_2365 - 2368, RSP_4034, RSP_3949 - 3950, RSP_3890 - 3892, RSP_3744 - 3745, RSP_3701 - 3705, RSP_3688 - 3689, RSP_1450 - 1455) und eine große Zahl von Proteinen der Zucker - und Aminosäuresynthese (RSP_0480 - 0482, RSP_0518, RSP_1370 - 1372 RSP_1461, RSP_1470, RSP_1510, RSP_1533, RSP_2181 - RSP_2184, RSP_2448 - 2452) deutlich stärker in der Mutante exprimiert (alle Kategorie I). Wären diese Gene mit in die Auswertung einbezogen worden, hätten sie die bei weitem größte Gruppe gebildet.

Tabelle 12 : Relative Expressionslevel der differenziell exprimierten Gene in Δlov im Vergleich zu 2.4.1 nach mikroaerobem Wachstum bis zu einer OD_{660} von 0,8, Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress. Vergleichend sind die drei Ratios der am stärksten unter Blaulichtbestrahlung und Singulettstauerstoffstress vergleichbar regulierten Gene der Kategorie I und II aufgeführt. Die Gene werden dabei nach ihrer Funktion unterteilt. Für die errechneten Ratios wurden die Einzelratios aller vorhandenen (zwei bis drei) Sonden der jeweiligen Gensequenz verwendet und ihre Mittelwerte berechnet. Bei einer Ratio kleiner 1 wurde der negative Kehrwert berechnet um die Abnahme des Transkriptlevels besser zu veranschaulichen (Rohdaten: siehe Anhang Abschnitt 8.1).

Gennummer (RSP)	Ratio (1O_2 Stress)	Ratio (Blaulicht)	Ratio ($OD_{660} = 0,8$)	Annotation / funktionelle Beschreibung
Unter Blaulichtbestrahlung und photooxidativen Stress differenziell exprimiert				
tRNA				
RSP_4297	-	-	-	tRNA - Gene
	- 1,9 - 3,0	- 2,0 - 3,0	- 1,0 - 1,2	
RSP_4346				
Chemotaxis				
RSP_0069	-3,2	-3,5	- 1,2	<i>fliC</i> , Flagellen Filament - Protein
RSP_0083	- 2,0	- 2,0	+ 1,4	<i>flgB</i> , Flagellen <i>rod</i> - Protein
RSP_0037	- 1,8	- 2,1	+ 1,0	<i>flgM</i> , Negativer Flagellenregulator
RSP_0080	- 1,8	- 2,0	+ 1,4	<i>flgE</i> , Flagellen <i>hook</i> - Protein
RSP_1307	+ 2,0	+ 2,2	+ 1,4	<i>flgI</i> , Flagellen P-Ring - Protein
RSP_1321	+ 2,5	+ 3,6	+ 1,5	<i>fliR</i> , Flagellen Biosynthese
RSP_1311	+ 2,0	+ 1,8	+ 1,3	<i>fliH</i> , sekretorisches - Protein
RSP_1322	+ 2,6	+ 3,2	+ 1,7	<i>fhbB</i> , Flagellen Biosynthese
RSP_1585	- 1,9	- 2,0	+ 1,2	<i>cheW2</i> , Chemotaxis - Protein
RSP_1586	- 1,8	- 2,0	+ 1,3	<i>cheW3</i> , Chemotaxis - Protein
Transporter				
RSP_0904	-	-	-	<i>sitABC</i> , ABC Mn^{+2} / Fe^{+2} - Transporter
	+ 1,8 - 1,9	+ 1,9 - 2,0	+ 1,1 - 1,2	
RSP_0906				
RSP_3568	+ 3,7	+ 3,4	+ 1,4	<i>znuC</i> , ABC Zink - Transporter
RSP_3571	+ 2,5	+ 6,8	- 1,6	<i>znuA</i> , ABC Zink - Transporter
RSP_1818	+ 2,5	+ 2,3	-1,4	<i>feoB</i> , Fe^{2+} Transport - System
RSP_2282	+ 3,7	+ 4,7	+ 1,5	<i>chrA</i> , Chromat Efflux - Pumpe
Vitamin B12 Synthese				
RSP_2827	+ 1,8	+ 2,2	+1,4	<i>cobN</i> , Cobaltochelatase
RSP_3185	+ 2,9	+ 3,5	+ 1,6	<i>cobB</i> , Corbyrinsäuresynthese
RSP_2608	+ 2,3	+ 2,3	+ 1,6	<i>corA</i> , Cobalttransporter
RSP_2427	+ 2,4	+ 2,8	+ 1,6	<i>cobV</i> , Cobalaminsynthese
RSP_2823	+ 2,6	+ 7,0	+ 1,6	<i>cobL</i> , Cobalamin Methyltransferase
Transkriptionsregulation				
RSP_1441	+ 4,0	+ 3,3	+ 1,5	GntR - Transkriptionsregulator
RSP_1925	+ 7,2	+ 20,6	+ 1,5	GntR - Transkriptionsregulator
RSP_4038	+ 9,0	+ 28,0	+ 1,6	<i>glpR</i> , DeoR - Transkriptionsregulator
RSP_0457	+ 2,2	+ 2,7	+ 1,3	<i>glpR</i> , DeoR - Transkriptionsregulator
RSP_2965	+ 11,6	+ 22,7	+ 1,7	LysR - Transkriptionsregulator
RSP_1486	+ 2,1	+ 1,9	+ 1,3	TetR - Transkriptionsregulator
RSP_4257	+ 2,3	+ 2,2	+ 1,4	Antisigma-Faktor - Antagonist STAS
RSP_3188	+ 6,1	+ 5,7	+ 1,9	ApbE Familie - Protein (σ^E Regulator)

3.7.5 Nur durch Blaulichtbestrahlung beeinflusste Gene

Im Vergleich zu den unter Blaulicht und photooxidativem Stress differenziell exprimierten Genen (Abschnitt 3.5.4), stellte sich die Gruppe der nur durch Blaulicht beeinflussten Gene als sehr klein dar (Tabelle 13). Von den wenigen Genen, welche nur unter Blaulicht eine signifikante Änderung ihrer Transkript $level$ zeigten, konnte ein Großteil erneut dem Kohlenhydratstoffwechsel zugeordnet werden (RSP_080, RSP_1415, RSP_2243, RSP_2255, RSP_2734).

Neben diesen Proteinen konnten zudem zwei Gene der Cytochrom *c* - Synthese (RSP_1826, RSP_2785) identifiziert werden. Ein einzelnes, ebenfalls stärker exprimiertes Gen, RSP_4233, entstammte der für die Konjugation benötigten Pilus - Synthese.

Zuletzt zeigte auch eine Sensor Histidine Kinase (RSP_2129) eine höhere Expression in der Mutante, wobei das Transkript $level$ nur leicht höher war als unter den anderen Bedingungen.

Tabelle 13 : Relative Expressions $level$ der differenziell exprimierten Gene in Δlov im Vergleich zu 2.4.1 nach mikroaerobem Wachstum bis zu einer OD_{660} von 0,8, Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress. Vergleichend sind die drei Ratios der nur nach Blaulichtbestrahlung differenziell regulierten Gene der Kategorie I und II aufgeführt. Für die errechneten Ratios wurden die Einzelratios aller vorhandenen (eins bis drei) Sonden der jeweiligen Gensequenz verwendet und ihre Mittelwerte berechnet. Bei einer Ratio kleiner 1 wurde der negative Kehrwert berechnet um die Abnahme des Transkript $levels$ besser zu veranschaulichen (Rohdaten: siehe Anhang Abschnitt 8.1).

Gennummer (RSP)	Ratio (1O_2 Stress)	Ratio (Blaulicht)	Ratio ($OD_{660} = 0,8$)	Annotation / funktionelle Beschreibung
Nach Blaulichtbestrahlung differenziell exprimiert				
RSP_2243	+ 1,6	+ 3,2	+ 1,8	<i>hisA</i> , Phosphoribosyl - Isomerase
RSP_2734	- 1,1	+ 2,1	+ 1,2	<i>zwf</i> , Glucose 6 Phosphat-Dehydrogen.
RSP_3572	+ 1,6	+ 2,4	- 1,1	<i>galM</i> , Aldose 1 - Epimerase
RSP_1415	+ 1,2	+ 2,0	+ 1,5	Polysaccharid - Deacetylase
RSP_0801	+ 1,6	+ 2,1	+ 1,7	Deacetylase / Polyamin - Hydrolase
RSP_2255	+ 1,4	+ 1,9	+ 1,2	Acyl - CoA - Synthase
RSP_1826	+ 1,5	+ 2,5	+ 1,5	<i>coxII</i> , Cytochrom <i>c</i> Oxidase Vorläufer
RSP_2785	+ 1,6	+ 4,3	+ 1,4	<i>cycF</i> , Cytochrom <i>c</i> -554
RSP_4233	+ 1,5	+ 2,9	+ 1,6	<i>traN</i> , Pilus <i>assembly</i>
RSP_2129	+ 1,5	+ 2,0	+ 1,6	Sensor Histidin - Kinase

3.7.6 Nur durch photooxidativem Stress beeinflusste Gene

Für die Gene, welche nur durch photooxidativen Stress veränderte Transkript $level$ in der Δlov - Mutante zeigten, konnten relativ klar definierte funktionelle Gruppen identifiziert werden (Tabelle 14). Die größte Gruppe stellten dabei die TRAP (*tripartite* ATP - *independent periplasmic*) - Transporter dar (RSP_0912 - 0910, RSP_0097, RSP_1613, RSP_1418 und RSP_1420). Diese sehr heterogene Gruppe spielt eine große Rolle beim Transport von

Metaboliten durch das Periplasma. Sie werden alle unter Singulett-Sauerstoff in der Mutante schwächer exprimiert.

Auffällig deutlich schwächer exprimiert war zudem das *cox*-Operon, welches eine Kohlenstoffmonooxid Dehydrogenase kodiert (RSP_2876 - 2878).

Die letzte ebenfalls sehr homogen durch photooxidativen Stress schwächer exprimierte Gruppe setzte sich aus verschiedenen Kälteschockproteinen zusammen (RSP_2024, RSP_1925, RSP_0386, RSP_3620 - 3621, RSP_0591).

Tabelle 14 : Relative Expressionslevel/ der differenziell exprimierten Gene in Δlov im Vergleich zu 2.4.1 nach mikroaerobem Wachstum bis zu einer OD_{660} von 0,8, Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress. Vergleichend sind die drei Ratios der nur nach photooxidativem Stress differenziell regulierten Gene der Kategorie I und II aufgeführt. Die Gene werden nach ihrer Funktion unterteilt. Für die errechneten Ratios wurden die Einzelratios aller vorhandenen (eins bis drei) Sonden der jeweiligen Gensequenz verwendet und ihre Mittelwerte berechnet. Bei einer Ratio kleiner 1 wurde der negative Kehrwert berechnet um die Abnahme des Transkriptlevels besser zu veranschaulichen (Rohdaten: siehe Anhang Abschnitt 8.1).

Gennummer (RSP)	Ratio (1O_2 Stress)	Ratio (Blaulicht)	Ratio ($OD_{660} = 0,8$)	Annotation / funktionelle Beschreibung
Nach photooxidativem Stress differenziell exprimiert				
TRAP Transporter				
RSP_0912	- 2,3	- 1,2	- 1,4	<i>dctM</i> , TRAP C4-Dicarboxylat - Transp.
RSP_0911	- 2,4	- 1,2	- 1,2	<i>dctQ</i> , TRAP C4-Dicarboxylat - Transp.
RSP_0910	- 3,0	- 1,4	- 1,2	<i>dctP</i> , TRAP C4-Dicarboxylat - Transp.
RSP_0097	- 2,3	- 1,2	- 1,4	<i>smoM</i> , TRAP Sorbitol/Mannitol -Transp.
RSP_1613	- 1,9	+/- 1,0	+ 1,1	TRAP - Transp.
RSP_1418	- 2,2	+/- 1,0	+ 1,4	TRAP - Tricarboxylate Transp.
RSP_1420	- 2,0	+/- 1,0	+ 1,3	TRAP - Transp.
Kohlenstoffmonooxid Dehydrogenase				
RSP_2876	- 2,5	+ 1,4	+ 1,4	CO Dehyd. , Untereinheit 1
RSP_2877	- 5,9	+ 1,1	+ 1,4	<i>coxS</i> , CO Dehyd., Untereinheit 2
RSP_2878	- 5,0	+ 1,5	+ 1,6	<i>coxL</i> , CO Dehyd., Untereinheit 3
Kälteschockproteine				
RSP_2024	- 2,4	- 1,1	+ 1,2	<i>cspA</i> , Kälteschockprotein
RSP_1952	- 2,5	- 1,2	+/- 1,0	Kälteschockprotein
RSP_0386	- 1,8	- 1,2	+/- 1,0	Kälteschockprotein
RSP_3620	- 2,6	- 1,2	+/- 1,0	Kälteschockprotein
RSP_3621	- 2,2	- 1,2	+/- 1,0	Kälteschockprotein
RSP_0591	- 2,1	- 1,1	+ 1,2	Kälteschockprotein

3.7.7 Nur durch mikroaerobes Wachstum beeinflusste Gene

Im direkten Vergleich der erhaltenen Ergebnisse der Transkriptomanalyse nach mikroaerobem Wachstum und dem Wachstum nach Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress fiel auf, dass die viel höhere Expression der σ^E -abhängigen Gene unter beiden Bedingungen in der Mutante nicht mehr sichtbar war. So zeigt weder σ^E (RSP_1092), der Anti- σ -Faktor ChrR (RSP_1093), noch der abhängige σ -Faktor σ^{HII} (RSP_0601) eine deutlich höhere Expression unter Blaulicht oder photooxidativen Stress in der Mutante. Das Gleiche konnte für

andere σ^E -abhängige Gene ebenfalls gezeigt werden (RSP_2143, RSP_1090, RSP_1091, RSP_3336, RSP_1852). Diese zeigten alle nur minimale Anstiege in ihrem Transkript $level$ oder lagen mit einem A-Wert von unter neun (RSP_3336) an der Grenze der Nachweisbarkeit.

Die ebenfalls unter mikroaerobem Wachstum höher exprimierten Gene des Molybdänstoffwechsels (RSP_3872, RSP_0738, RSP_3869), besaßen nur ein etwas höheres Expression $level$ auf den beiden späteren *microarrays*. Hier lagen deutlich mehr Gene an der Grenze der Nachweisbarkeit des *scanners* (RSP_3049, RSP_3050, RSP_0537).

So konnte auch kein deutlicher Effekt für die unter mikroaeroben Bedingungen am stärksten höher und schwächer exprimierten Gene gezeigt werden. Es konnte weder der starke Anstieg für RSP_1574 (Cytochrom *b562*), noch die starke Abnahme für RSP_3539 (Hämolsin homologes RTX Toxin) bei allen Sonden beobachtet werden. Ebenso war es nicht möglich, den Anstieg der Expression der Hämtransporter RSP_1801 und RSP_1803 in der Mutante erneut zu zeigen.

Tabelle 15 : Relative Expressions $level$ der differenziell exprimierten Gene in Δ/ov im Vergleich zu 2.4.1 nach mikroaerobem Wachstum bis zu einer OD_{660} von 0,8, Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress. Vergleichend sind die drei Ratios der nur nach mikroaerobem Wachstum differenziell regulierten Gene der Kategorie I aufgeführt. Die Gene werden dabei nach ihrer Funktion unterteilt. Für die errechneten Ratios wurden die Einzelratios aller vorhandenen (eins bis drei) Sonden der jeweiligen Gensequenz verwendet und ihre Mittelwerte berechnet. Bei einer Ratio kleiner 1 wurde der negative Kehrwert berechnet, um die Abnahme des Transkript $levels$ besser zu veranschaulichen. Die Bemerkung „Transkript $level$ zu niedrig“ bedeutet, dass der A - Wert bei keiner der Sonden hoch genug war, um eine verlässliche Aussage über die Signalratio zu machen (Rohdaten: siehe Anhang Abschnitt 8.1).

Gennummer (RSP)	Ratio (1O_2 Stress)	Ratio (Blaulicht)	Ratio ($OD_{660} = 0,8$)	Annotation / funktionelle Beschreibung
Nach mikroaerobem Wachstum differenziell exprimiert				
σ - bzw. Anti - σ - Faktoren in Abhängigkeit von σ^E				
RSP_1092	- 1,1	+ 1,2	+ 2,4	<i>rpoE</i> , alternativer σ - Faktor σ^E
RSP_1093	+ 1,1	+ 1,4	+ 2,6	<i>chrR</i> , Anti - σ - Faktor von σ^E
RSP_0601	+/- 1,0	+ 1,4	+ 2,2	<i>rpoH2</i> , alternativer σ - Faktor HII
σ^E - abhängige Gene				
RSP_2143	- 1,1	+ 1,3	+ 2,2	<i>phrA</i> , DNA - Photolyase
RSP_1090	- 1,3	+ 1,3	+ 2,3	Hyp. konserviertes - Protein
RSP_1091	- 1,3	+ 1,4	+ 2,7	Cyclobutan / Cyclopropan - Synthase
RSP_3336	Transkript $level$ zu niedrig		+ 2,3	ABC - Spermidin - Transporter
RSP_1852	- 1,1	+ 1,5	+ 2,4	Hypothetisches Protein
Molybdänstoffwechsel				
RSP_3872	+ 1,7	+ 1,6	+ 2,4	Molybdän Pterin - Bindeprotein
RSP_3049	Transkript $level$ zu niedrig		+ 2,3	<i>moeA</i> , Molybdän Cofaktor - Synthase
RSP_3050	Transkript $level$ zu niedrig		+ 2,1	Molybdän Cofaktor - Synthase
RSP_0738	+ 1,4	+ 1,7	+ 2,0	<i>mobA</i> , Molybdopterin - Synthase
RSP_3869	+ 1,5	+ 1,6	+ 3,3	<i>modC</i> , ABC Molybdän - Transporter
RSP_0537	Transkript $level$ zu niedrig		+ 2,4	<i>nifN</i> , Molybdän - Eisen - Protein
RSP_3868	Transkript $level$ zu niedrig		+ 2,2	ABC Molybdän - Transporter

hämbezogene Gene				
RSP_1801	+ 1,6	+ 1,4	+ 2,0	<i>ccmA</i> , ABC Häm - Transp. ATPase
RSP_1803	+ 1,4	+ 1,3	+ 2,1	<i>ccmC</i> , ABC Häm - Transp.
RSP_1574	+ 1,4	+ 1,6	+ 3,1	Cytochrome <i>b</i> ₅₆₂
RSP_3539	- 1,7	- 1,7	- 3,2	Hämolysinhomologes RTX Toxin

3.7.8 Einfluss von Blaulicht und photooxidativem Stress auf die sRNA Expression

Ein Vergleich der Expressionslevel aller auf dem *microarray* befindlichen sRNAs erlaubte deren Einteilung in verschiedene Gruppen. Es wurde wie bei den Genen nach den Bedingungen unterschieden, unter denen die sRNA eine Regulation zeigte (Tabelle 16).

Insgesamt sieben sRNAs waren unter allen Bedingungen differenziell in der Δlov -Mutante im Vergleich zum Wildtyp reguliert. Betrachtete man zuerst die sRNAs mit bekannter Regulation, zeigte sich, dass die 1O_2 -abhängig prozessierte sRNA RSs_0682 unter allen Bedingungen deutlich schwächer in der Δlov -Mutante exprimiert wurde (Kategorie I). Interessant war auch das Expressionsverhalten der an der Photosynthesegenregulation beteiligten RSs_2430: Während diese unter mikroaerobem Wachstum eine deutlich höhere Expression in der Mutante zeigte, kam es sowohl nach Blaulicht als auch nach photooxidativem Stress zu einer Abnahme der Expression (Kategorie I). Neben diesen konnten noch fünf weitere sRNAs identifiziert werden, von denen drei höher (RSs_0182; *antisense* zu RSP_0247 und *antisense* zu RSP_0136) und zwei schwächer (RSs_0635, RSs_0552) exprimiert wurden (alle Kategorie I).

Die größte vergleichbar regulierte Gruppe von sRNAs war, wie schon bei den Genen, sowohl durch Blaulicht als auch nach photooxidativem Stress vergleichbar reguliert. Dabei fand sich wieder eine große Anzahl von im *pyrosequencing* identifizierten sRNAs. Von diesen wurden RSs_0939, RSs_0590, RSs_0492, RSs_0234, RSs_1943, *antisense* zu RSP_3316 und *antisense* zu RSP_1928 höher und RSs_2363, RSs_0510, RSs_0504, RSs_0442 und RSs_0252 in der Δlov -Mutante schwächer exprimiert (Kategorie I und Kategorie II). In dieser Gruppe tauchen wenige der durch den Hfq-*pulldown* identifizierten sRNAs auf. Diese (3' von RSP_3796, 3' von RSP_3773, *antisense* zu RSP_3018 1 + 2 und *antisense* zu RSP_1670) wurden alle höher exprimiert (Kategorie I).

Wie auch schon bei den Genen, gab es nur eine kleine Gruppe von sRNAs, die ausschließlich unter Blaulicht differenziell exprimiert wurde. Dabei wurden RSs0099 und die im Hfq *pulldown* identifizierte sRNA RSs_6221 hoch und *antisense* zu RSP_3837 schwächer exprimiert (Kategorie I).

Deutlich mehr sRNAs reagierten spezifisch auf photooxidativen Stress. Es ist interessant, dass die 1O_2 -spezifisch regulierten sRNAs RSs_0680a-c alle deutlich höher in der Mutante exprimiert waren (Kategorie I), während mit der Ausnahme von der hochregulierten RSs_0124 (Kategorie II) alle anderen sRNAs (RSs_2198, RSs_0607, RSs_0536, RSs_0491, RSs_0423, RSs_0422 und RSs_0243) deutlich schwächer exprimiert waren.

Betrachtete man zuletzt die nur unter mikroaeroben Bedingungen differenziell regulierten Gene, fiel auf, dass diese (RSs_2863, RSs_2710, RSs_1624, RSs_1386, RSs_1263,

RSs_1018, RSs_0979, RSs_0770 und RSs_0299) alle höher exprimiert waren (Kategorie I und II). In dieser Gruppe fand sich auch die σ^E abhängige sRNA RSs_0019.

Tabelle 16 : Relative Expressionslevel der differenziell exprimierten sRNAs in Δlov im Vergleich zu 2.4.1 nach mikroaerobem Wachstum bis zu einer OD_{660} von 0,8, Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress. Vergleichend sind die drei Ratios der differenziell exprimierten sRNAs der Kategorie I und II aufgeführt. Die sRNAs werden dabei, soweit möglich, nach ihrer Funktion unterteilt. Für die errechneten Ratios wurden die Einzelratios aller vorhandenen (eins bis drei) Sonden der jeweiligen Gensequenz verwendet und ihre Mittelwerte berechnet. Bei einer Ratio kleiner 1 wurde der negative Kehrwert berechnet, um die Abnahme des Transkriptlevels besser zu veranschaulichen. Der Wert „n.v.“ in der Spalte für die $OD_{660} = 0,8$ Ratios bedeutet „nicht vorhanden“, da eine Sonde gegen diese sRNA zu diesem Zeitpunkt noch nicht auf den *microarray* war (Rohdaten: siehe Anhang Abschnitt 8.1).

Gennummer (RSP)	Ratio (1O_2 Stress)	Ratio (Blaulicht)	Ratio ($OD_{660} = 0,8$)	Annotation / funktionelle Beschreibung
Unter allen Bedingungen differenziell exprimiert				
RSs_0682	- 2,5	- 2,4	- 2,0	1O_2 - abhängig prozessiert
RSs_2430	- 2,6	- 2,0	+ 2,9	Photosyntheseregulation
RSs_0635	- 2,2	- 2,2	- 1,8	
RSs_0552	- 4,4	- 4,0	- 2,5	
RSs_0182	+ 2,5	+ 5,4	+ 2,1	
<i>antisense</i> zu RSP_0247 (Aminomethyltransf.)	+ 4,9	+ 4,7	+ 1,9	Nach photooxidativem Stress angereichert
<i>antisense</i> zu RSP_0136 (Integrase für Prophage)	+ 4,0	+ 2,8	+ 1,9	
Unter Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress differenziell exprimiert				
RSs_2363	- 2,5	- 2,4	- 1,3	
RSs_0939	+ 2,0	+ 6,2	+ 1,6	
RSs_0590	+ 2,1	+ 1,8	+ 1,5	
RSs_0510	- 2,1	- 2,4	- 1,2	
RSs_0504	- 2,1	- 2,1	+ 1,1	
RSs_0492	+ 2,0	+ 2,3	+ 1,1	
RSs_0442	- 2,5	- 2,4	+/- 1,0	Nach photooxidativem Stress angereichert
RSs_0252	- 2,0	- 2,0	- 1,3	
RSs_0234	+ 2,9	+ 3,2	+ 1,6	
RSs_1943	+ 1,9	+ 2,7	+ 1,4	
<i>antisense</i> zu RSP_3316 (Hyp. Protein)	+ 2,2	+ 2,2	+ 1,5	
<i>antisense</i> zu RSP_1928 (DNA Helikase)	+ 2,4	+ 2,7	- 1,2	
3' von RSP3796 (Hyp. Protein)	+ 2,7	+ 2,6	n.v.	Hfq - <i>pulldown</i>
3' von RSP3773 (Hyp. Protein)	+ 2,8	+ 3,0	n.v.	Hfq - <i>pulldown</i>
<i>antisense</i> zu RSP_3018 1 (Acyl-CoA Dehydrogen.)	+ 2,0	+ 2,7	n.v.	Hfq - <i>pulldown</i>
<i>antisense</i> zu RSP_3018 2 (Acyl-CoA Dehydrogen.)	+ 2,4	+ 2,7	n.v.	Hfq - <i>pulldown</i>
<i>antisense</i> zu RSP_1670 (RelA/SpoT Protein)	+ 2,6	+ 2,4	n.v.	Hfq - <i>pulldown</i>

Nach Blaulichtbestrahlung differenziell exprimiert				
RSs_0099	+ 1,4	+ 2,1	+ 1,2	Nach photooxidativem Stress angereichert
<i>antisense</i> zu RSP_3837 (Hyp. Protein)	- 1,4	- 2,2	-1,4	
RSs_6221	+ 1,1	+ 2,4	n.v.	
Nach photooxidativem Stress differenziell exprimiert				
RSs_0680c	+ 3,5	+ 1,5	+ 1,7	¹ O ₂ -und O ₂ ⁻ - abhängige sRNA
RSs_0680b	+ 3,5	+ 1,3	+ 1,6	
RSs_0680a	+ 3,1	+ 1,4	+ 1,8	
RSs_2198	- 2,2	- 1,1	- 1,1	
RSs_0607	- 2,3	- 1,2	+ 1,2	
RSs_0536	- 2,1	- 1,3	+ 1,1	
RSs_0491	- 2,0	- 1,3	- 1,2	Nach photooxidativem Stress angereichert
RSs_0423	- 2,0	- 1,2	+/- 1,0	
RSs_0422	- 2,3	- 1,3	+/- 1,0	
RSs_0243	- 3,1	- 1,4	- 1,2	
RSs_0124	+ 1,9	+ 1,2	- 1,7	
Nach mikroaerobem Wachstum differenziell exprimiert				
RSs_2863	- 1,3	+ 1,2	+ 1,9	Nach photooxidativem Stress angereichert
RSs_2710	- 1,1	+/- 1,0	+ 2,6	
RSs_1624	- 1,0	+ 1,2	+ 2,3	
RSs_1386	- 1,6	- 1,4	+ 1,8	
RSs_1263	+ 1,2	+ 1,2	+ 2,1	
RSs_1018	- 1,1	+ 1,3	+ 2,6	
RSs_0979	+ 1,2	+ 1,6	+ 2,7	
RSs_0770	- 1,3	+ 1,3	+ 2,3	
RSs_0299	+/- 1,0	+ 1,5	+ 2,1	
RSs_0019	- 1,3	+ 1,2	+ 2,6	
σ ^E -abhängig induzierbare sRNA				

Durch genauere Betrachtung der Rohfluoreszenzwerte der durch den Hfq - *pulldown* identifizierten sRNAs, konnte auch für diese festgestellt werden, welche besonders stark exprimiert waren. Da sich die absoluten Werte nur wenig unterschieden, sind in Tabelle 17 nur die Fluoreszenzmittelwerte des Singulett-Sauerstoffstress *microarrays* angegeben. Im Vergleich zu den in Tabelle 10 genannten abundanten sRNAs, tauchten keine neuen von den im *pyrosequencing* identifizierten sRNAs in den Blaulicht- und Singulett-Sauerstoffstress - Daten als besonders abundant auf. Zudem ist zu beachten, dass durch die Verwendung eines anderen *scanners* die maximal messbare Fluoreszenz des Gerätes höher lag. Unter den neuen, besonders abundanten sRNAs befanden sich keine, welche zu den differenziell regulierten gehörten (Kategorie I oder II). Besonders bei denen der Kategorie III stach dabei die sRNA *antisense* zu RSP_3793 (Hypothetisches Protein) ins Auge, welche einen der höchsten Fluoreszenzwerte auf dem gesamten *microarray* besaß.

Tabelle 17 : Zusammenfassung der relativen Fluoreszenzwerte (absolute Fluoreszenz minus dem Fluoreszenzhintergrund) für Cy3 / Cy5 für besonders abundante sRNAs aus dem Hfq - pulldown im Vergleich zu besonders stark exprimierten mRNAs. Vergleichend sind die Rohdaten der Fluoreszenzmittelwerte aus den einzelnen Sonden angegeben. Lagen dabei mehrere Sonden pro sRNA vor, wurde zunächst der Mittelwert aus den vorhandenen Einzelwerten gebildet. Zudem muss beachtet werden, dass die maximal messbare relative Fluoreszenz des Gerätes bei 300.000 liegt, d.h. höhere Werte können nicht vorliegen. Es wurden jeweils die Mittelwerte aus den Fluoreszenzwerten der Einzelsonden berechnet (Rohdaten: siehe Anhang Abschnitt 8.1)..

Gennummer (RSP) bzw. sRNA - (RSs)	Relative Fluoreszenz Cy3 (¹ O ₂ - Stress)	Relative Fluoreszenz Cy5 (¹ O ₂ - Stress)
Abundante mRNAs		
Kategorie I		
RSP_1720(Ribosomales Protein S19)	45.000	90.000
Kategorie II		
RSP_0037 (<i>flgM</i>)	15.000	30.000
Kategorie III		
RSP_1092 (<i>rpoE</i>)	59.500	63.000
Abundante sRNAs (Hfq - pulldown)		
Kategorie III		
3' von RSP3584 (Hyp. Prot.)	85.000	72.500
3' von RSP3594 (<i>Antifreeze</i> - Protein)	14.500	19.300
3' von RSP6196 (Hyp. Prot.)	12.000	15.000
3' von RSP0019 (Hyp. Prot.)	45.000	45.000
3' von RSP2548 (<i>exoF</i> , Polysaccharid - Transmembran - Transporter)	18.000	16.000
5' von RSP2003 (<i>yibQ</i> , Polysaccharid - Deacetylase)	29.000	21.000
<i>antisense</i> zu RSP_3619 (Hyp. Prot.)	18.000	26.000
<i>antisense</i> zu RSP_3793 (Hyp. Prot.)	140.000	150.000

4. Diskussion

4.1 Analyse der Blaulichtsensitivität des AppA / PpsR und des PrrB / PrrA - Systems in *Rhodobacter sphaeroides*

4.1.1 Blaulichtsensitivität der Photosyntheseexpression in *R. sphaeroides* 2.4.1

Die Synthese der Photosynthesekomplexe in *R. sphaeroides* wird licht- und sauerstoffabhängig durch das AppA / PpsR und das PrrB / PrrA - System reguliert (siehe Abschnitt 1.3.3). Das AppA - Protein ist dabei in der Lage, direkt über seine BLUF - Domäne Blaulicht wahrzunehmen (Braatsch *et al.*, 2002), während die Aktivität von PrrB / PrrA indirekt über das Gleichgewicht zwischen photosynthetischer und aerober Atmungskette auf Lichtreize reagiert (Happ *et al.*, 2005). Um die physiologische Bedeutung dieser dualen, lichtabhängigen Regulation der Photosynthesegene durch die beiden Proteinsysteme genauer zu untersuchen, wurde die für die Genregulation benötigte Blaulichtintensität unter verschiedenen Bedingungen ermittelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass deutlich geringere Mengen an Blaulicht ausreichen, um die AppA - abhängige Repression der Photosynthesegene einzuleiten, als für den PrrB / PrrA - abhängigen Anstieg nötig war.

Um zunächst die minimal nötige Blaulichtintensität, die für die Repression der Photosynthesegene durch AppA / PpsR im Wildtyp 2.4.1 nötig ist, zu bestimmen, wurden Kulturen unter semiaeroben Bedingungen ($3,2 - 4 \text{ mg l}^{-1}$) herangezogen und mit abnehmenden Blaulichtintensitäten bestrahlt. Unter semiaeroben Bedingungen befindet sich das Häm der C - terminalen SCHIC - Domäne im reduzierten Zustand und AppA bindet PpsR. Die Bestrahlung mit Blaulicht löst die Interaktion der BLUF - Domäne mit dem C - Terminus aus und setzt so PpsR wieder frei, was zur Repression der Photosynthesegene führt.

Es konnte sowohl im *Northern blot* (Abbildung 17) als auch in der *real time RT - PCR* (Abbildung 18) eine starke Repression selbst nach Bestrahlung mit sehr niedrigen Blaulichtintensitäten gezeigt werden. So führte die Bestrahlung mit $0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ immer noch zu einer fast vollständigen Repression der Photosynthesegene und erst bei $0,1 - 0,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ war eine deutliche Abnahme der *pucB* - und *bchL* - Genrepression nachweisbar. Dass diese Effekte nicht nur auf der Ebene der gebildeten mRNA sichtbar waren, konnte in den Messungen des relativen Bacteriochlorophyll - Anteils nachgewiesen werden (Abbildung 19). Somit sind die gemessenen Veränderungen der Transkriptlevel auch auf die Menge an gebildeten Pigmentproteinkomplexen übertragbar und physiologisch relevant.

Ein Vergleich der ermittelten Blaulichtsensitivität mit anderen bakteriellen BLUF - Domänen Proteinen ist schwierig, da wenige *in vivo* - Studien für diese Proteine existieren. Daher werden im Folgenden eukaryotische Lichtrezeptoren für den Vergleich herangezogen. Eine deutlich niedrigere Blaulichtsensitivität besitzt das ebenfalls mit einer BLUF - Domäne ausgestattete PAC - Protein des Eukaryoten *Euglena gracilis*. Hier konnte die durch das Protein erzeugte Lichtvermeidungs - Reaktion, d.h. das gerichtete Entfernen von der Lichtquelle, erst nach einer Bestrahlung mit $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Blaulicht ausgelöst werden und, um die volle Aktivität zu erzeugen, waren $40 - 60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Blaulicht nötig (Yoshikawa *et al.*, 2005). Diese Antwort

dient dem Schutz vor zu hohen Lichtintensitäten, welchem die direkt unter der Wasseroberfläche lebenden photosynthetischen Protisten oft ausgesetzt sind (Iseki *et al.*, 2002). Die niedrige Sensitivität ist daher physiologisch sinnvoll. Für das CRY2 - Protein in *Arabidopsis* wurde *in vivo* gezeigt, dass bereits $0,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht ausreichen, um die Verkürzung des Hypokotylwachstums und eine verfrühte Öffnung der Kotyledonenblätter zu erzeugen (Lin *et al.*, 1998). Eine vergleichbare Blaulichtsensitivität wie das AppA - Protein besitzen auch die LOV - Domänen - Proteine NphI und NphII in *Arabidopsis*. Diese Phototropine sind für den Phototropismus des Hypokotyls und die Verlagerung der Chloroplasten verantwortlich. Der Phototropismus des Hypokotyls setzt dabei schon nach Bestrahlung mit nur $0,01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und die Chloroplastenverlagerung mit nur $0,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht ein (Sakai *et al.*, 2001). Für die phytochromabhängige Lichtantwort in Pflanzen konnte die bisher niedrigste physiologisch aktive Lichtintensität mit $0,001 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gemessen werden. Diese Lichtantwort wird jedoch durch Rotlicht (660 nm) hervorgerufen (Smith, 1982; Feldman und Briggs, 1987).

Vergleicht man die erhaltenen Daten mit gemessenen Blaulichtintensitäten in verschiedenen Habitaten (siehe Anhang Tabelle 18), zeigt sich, dass eine Intensität von $0,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf Bodenhöhe bereits bei Sonnenaufgang deutlich überschritten wird ($\approx 1,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und es über den Tag zu einem weiteren Anstieg um ein Vielfaches kommt ($\approx 90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Smith, 1982). Selbst in 5 mm Tiefe kann in trockenem Boden noch immer eine höhere Blaulichtintensität gemessen werden, als sie für die *in vivo* - Repressor - Aktivität des AppA - Proteins benötigt zu sein scheint ($\approx 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Feuchter Boden ist dagegen kaum blaulichtdurchlässig ($\approx 0,01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Smith, 1982; Kasperbauer und Hunt, 1987; Tester und Morris, 1987). In klaren Gewässern dringt das energiereiche Blaulicht ebenfalls in große Tiefe vor und in 1 m Tiefe kann bei Tageslicht noch immer eine hohe Intensität gemessen werden ($\approx 90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Selbst in 10 m Tiefe reicht die Lichtintensität immer noch aus, um eine volle Repression der Photosynthesegene durch AppA / PpsR einzuleiten ($\approx 6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Brooker, 1927; Smith, 1982; Townsend *et al.*, 1993). Dabei ist zu bedenken, dass die semiaerobe Zone in marinen Habitaten nach 20 - 50 m Tiefe einsetzt, während in vielen limnischen Gewässern im Sommer bereits nach 2 - 5 m die Sauerstoffsättigung nur noch bei 50 % liegt (Townsend *et al.*, 1993).

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die in Abschnitt 3.1.1 ermittelten niedrigen Blaulichtintensitäten in semiaeroben Zonen der Natur praktisch immer überschritten werden und die Expression der Photosynthesegene nicht stattfindet. Da das gleichzeitige Vorhandensein von Sauerstoff und Licht unter diesen Bedingungen zur Entstehung von photooxidativem Stress führen würde, ist es nicht verwunderlich, dass sich eine so strikte Regulation entwickelt hat. *R. sphaeroides* kann unter semiaeroben Bedingungen seinen Energiehaushalt noch vollständig über die aerobe Atmung decken und die Expression der Photosynthesegene wird nicht eingeleitet, solange auch nur minimale Blaulichtintensitäten das AppA - Protein erreichen.

Erreicht der Sauerstoffpartialdruck mikroaerobe Bedingungen, wird die AppA / PpsR - abhängige Regulation der Photosynthesegene von der PrrB / PrrA - abhängigen überlagert. Der Verlust des inhibitorischen Signals der terminalen *cbb₃* - Oxidase der Atmungskette erlaubt der Sensor - Kinase PrrB die Autophosphorylierung. PrrB phosphoryliert daraufhin den *response*

regulator PrrA, was dessen Dimerisierung und anschließende DNA - Bindung auslöst. Die Bestrahlung mit Blaulicht führt unter diesen Bedingungen zu einer Erhöhung des sauerstoffabhängigen Anstiegs der Photosynthesegenexpression. Dieser lichtabhängige Effekt ist indirekt und verläuft über die Absorption von Licht an den Bacteriochlorophyllen der LHCs und des RC (Happ *et al.*, 2005). Es konnte eine Verbindung des photosynthetischen Elektronenflusses mit dem der Atmungskette nachgewiesen werden, da Mutationen in gemeinsam genutzten Komponenten (Cytochrom bc_1 und c_2) zum Einen zum Ausbleiben der Inhibition durch die cbb_3 - Oxidase und zum Anderen zum Verlust des lichtabhängigen Anstiegs der Genexpression führen (Happ *et al.*, 2005).

Die durchgeführten Bestrahlungsexperimente unter anaeroben Bedingungen führten nur nach Bestrahlung mit $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht zu einem starken Anstieg der Genexpression von *puc* im *Northern blot* (Abbildung 20) sowie von *pucB* und *bchL* in der *real time RT-PCR* (Abbildung 21). Dabei konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der Genexpression nach 240 min deutlich stärker ist als nach 60 min, während die AppA / PpsR - abhängige Repression nach 240 min wieder deutlich abnimmt. Diese Zeitabhängigkeit wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Braatsch *et al.*, 2002; Happ *et al.*, 2005). Die geringe Blaulichtsensitivität spiegelt sich auch in den Messungen des Bacteriochlorophyll - Anteils wider, wo ebenfalls nur die Bestrahlung mit $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ einen Anstieg hervorrief (Abbildung 22). Die ebenfalls durchgeführte Blaulichtbestrahlung mit $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hatte keinen Effekt. Weitere Intensitäten wurden nicht getestet, da das Hauptaugenmerk auf der Blaulichtsensitivität des AppA / PpsR - Systems lag. Trotzdem konnte eine deutlich geringere Sensitivität gegen Blaulicht für das PrrB / PrrA - System nachgewiesen werden, als sie für das AppA / PpsR - System der Fall war.

Der zusätzliche Anstieg der gebildeten Photosynthesekomplexe scheint nur sekundärer Natur zu sein und als Antwort auf eine Bestrahlung der Photosynthesekomplexe mit weiterem Licht stattzufinden. Es ist daher nicht verwunderlich, dass dieser zusätzliche Anstieg höhere Lichtintensitäten benötigt. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Absorption von Licht an den Photosynthesekomplexen von *R. sphaeroides* nur zu kleinen Teilen im blauen Bereich und zum größten Anteil im roten Bereich (800 - 875 nm) verläuft, da dort die LHCs und das RC am stärksten absorbieren. In früheren Arbeiten (Happ *et al.*, 2005) konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung mit der gleichen Intensität Rotlicht ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 800 nm) ebenfalls zu einem Anstieg der Photosynthesegenexpression unter anaeroben Bedingungen führt, während oranges Licht der gleichen Intensität ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 630 nm) diesen Effekt nicht hat. Es wurde zwar eine niedrigere Sensitivität des PrrB / PrrA - Systems gegen Blaulicht im direkten Vergleich zum AppA / PpsR - System festgestellt, jedoch muss bedacht werden, dass geringere *in vivo* Tageslichtintensitäten nötig wären, um den gleichen Anstieg der Photosynthesegenexpression zu erzielen, da der Rotlichtanteil des Sonnenlichts (800 - 875 nm) mit etwa 14 % höher ist als der Blaulichtanteil (380 - 490 nm) mit nur etwa 5 % (Townsend *et al.*, 1993).

4.1.2 Blaulichtsensitivität der Photosyntheseexpression in der *R. sphaeroides* FnrL - und PrrB - Mutante

Das Eisen - Schwefel - Protein FnrL (Zeilstra-Ryalls und Kaplan, 1995) ist zwar selber nicht in der Lage, auf Licht zu reagieren, nimmt aber gleichzeitig eine bedeutende Rolle bei der Expression der für die Tetrapyrrolsynthese nötigen Gene ein und reguliert einen Teil der Photosynthesegene direkt (Zeilstra-Ryalls und Kaplan, 1998). Das Protein besitzt einen Eisen - Schwefel - *cluster*, welcher durch Sauerstoff oxidiert und reduziert werden kann. Unter anaeroben Bedingungen bindet FnrL als Dimer an die DNA und leitet die Expression einer Vielzahl von Genen des anaeroben Stoffwechsels ein. Zudem überlappt seine Bindestelle bei einigen Genen mit der von PpsR (z.B. *pucB*, siehe Anhang Abbildung 72) und es ist daher wichtig, eine mögliche Beeinflussung der Regulatoren untereinander zu berücksichtigen (Mao *et al.*, 2005).

Aus diesem Grund wurde in der FnrL - Mutante die blaulichtabhängige Repression durch AppA / PpsR von *pucB* und *bchL* in der *real time* RT - PCR unter semiaeroben Bedingungen (Abbildung 23) bestimmt (siehe Abschnitt 3.1.2). Für die blaulichtabhängige Repression war eine Bestrahlung von $0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nötig, während $0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ keinen Effekt zeigte. Damit entspricht die FnrL - Mutante in ihrer AppA - abhängigen Blaulichtsensitivität genau dem Wildtyp 2.4.1. Für die blaulichtabhängige Antwort unter anaeroben Bedingungen wurde ebenfalls die *pucB* und *bchL* - Expression per *real time* RT - PCR bestimmt (Abbildung 24), wobei der blaulichtabhängige Anstieg wie beim Wildtyp nur nach Bestrahlung mit $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erfolgte. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass zumindest für *pucBA* keine Beeinflussung der blaulichtabhängigen Repression durch das FnrL - Protein stattfindet. Betrachtet man die Bindestellen des FnrL - Proteins sollte eine gleichzeitige Bindung des PpsR - Proteins auch nicht möglich sein, da die Bindestellen beider Proteine nahezu vollständig überlappen (siehe Anhang Abbildung 72). Diese Überlappung kann auch für das *bchMLHBNF* - Operon und das *bchODI* - Operon festgestellt werden (Mao *et al.*, 2005). So sollte unter aeroben Bedingungen und im Dunkeln unter semiaeroben Bedingungen ($8 - 3,2 \text{ mg l}^{-1}$) das PpsR - Protein die Bindestelle belegen, da die SCHIC - Domäne von AppA unter diesen Bedingungen oxidiert vorliegt und das Protein daher nicht mit PpsR interagieren kann. FnrL besitzt unter diesen Bedingungen nur den oxidierten $[2\text{Fe} - 2\text{S}]^{2+}$ - *cluster* und liegt als inaktives Monomer vor. Erst wenn der Sauerstoffpartialdruck (mikroaerobe Bedingungen, $\approx 0 \text{ mg l}^{-1}$) weiter fällt, wird der Eisen - Schwefel - *cluster* reduziert und der $[4\text{Fe} - 4\text{S}]^{2+}$ - *cluster* entsteht. Das Protein dimerisiert und bindet an die DNA. Da die Bindestellen von PpsR und FnrL fast vollständig überlappen, ist wahrscheinlich, dass PpsR unter diesen Bedingungen nicht mehr bindet. Fehlt die Bindung von FnrL bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck, ist anaerobes und phototrophes Wachstum nur noch sehr langsam möglich und die Pigmentsynthese ist schwerwiegend gestört, da durch die ausbleibende Regulation der Tetrapyrrolsynthese wichtige Vorläufer des Bacteriochlorophylls fehlen (Zeilstra-Ryalls und Kaplan, 1995; Zeilstra-Ryalls und Kaplan, 1998).

Die PrrB - Mutante wurde untersucht, da ohne PrrB die Regulation der Photosyntheseexpression unabhängig vom photosynthetischen bzw. aeroben Elektronentransport verläuft (Happ *et al.*, 2005). So kann die AppA / PpsR - abhängige Regulation auch bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck sichtbar gemacht werden, wo sonst die transkriptionssteigernde Wirkung von PrrB / PrrA diese überlagert. In der PrrB - Mutante ist es

also möglich die Blaulichtsensitivität von AppA auch unter anaeroben Bedingungen zu untersuchen. Dazu wurden anaerobe Kulturen der PrrB - Mutante mit den gleichen Blaulichtintensitäten bestrahlt (siehe Abschnitt 3.1.3) und per *Northern blot* (Abbildung 25) und *real time RT - PCR* (Abbildung 26) die *puc* - bzw. *bchL* - Expression ermittelt. Dabei konnte im *Northern blot* eine dem Wildtyp 2.4.1 vergleichbare Abnahme der *puc* - Expression, nach Bestrahlung mit 20 und $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht beobachtet werden, wobei gegenläufig zum Wildtyp, nach 60 min ein niedrigerer Repressionswert nachweisbar ist und die stärkste Repression nach 240 min Bestrahlung erfolgt. Die Bestrahlung mit niedrigen Blaulichtintensitäten zeigte in der *real time RT - PCR* bis zu einer Bestrahlung mit $0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht eine deutliche Repression und die Bestrahlung mit $0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht führte erneut zu keiner Veränderung der Genexpression. Diese Ergebnisse konnten auch bei der Bestimmung des Bacteriochlorophyll - Anteils in der PrrB - Mutante unter anaeroben Bedingungen bestätigt werden (Abbildung 27).

Es konnte auch unter anaeroben Bedingungen die hohe Blaulichtsensitivität des AppA - Proteins nachgewiesen werden. Eine Bestrahlung der Kulturen mit $0,5 - 0,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht reicht unter allen getesteten Bedingungen aus, um die blaulichtabhängige Repression zu vermitteln. Für die, durch den photosynthetischen Elektronentransport verursachte Expressionssteigerung der Genantwort durch PrrB / PrrA, reichen dagegen $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht nicht aus um einen Effekt zu erzielen, während $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ diesen Anstieg deutlich hervorriefen. Gleichzeitig ist unklar, wie die Bindung von AppA / PpsR an die DNA unter anaeroben Bedingungen erfolgen kann, wenn zur gleichen Zeit FnrL an die Bindestelle gebunden ist. Da Wachstum und Pigmentierung der PrrB - Mutante weitaus weniger schwerwiegend gestört sind als in der FnrL - Mutante, kann davon ausgegangen werden, dass eine Bindung von FnrL stattfinden muss. Die PpsR - Bindung muss jedoch ebenfalls stattfinden, da die AppA - abhängige Blaulichtrepression vermittelt wird. Zudem ist unklar inwiefern die Bindung des *response - regulators* PrrA einen Einfluss auf die Bindung der beiden Proteine hat und warum die expressionssteigernde Wirkung von PrrA bei geringem Sauerstoffpartialdruck die Regulation durch AppA / PpsR überlagert.

Hier zeigt sich deutlich, dass eine weitere Untersuchung der *in vivo* - Bindung dieser Proteine erforderlich ist, um ein besseres Verständnis der Regulation unter den verschiedenen Licht - und Sauerstoffbedingungen zu erhalten. Die Bindestellen von PrrA und PpsR in *R. sphaeroides* sind bekannt (siehe Abschnitt 1.3.3) und es liegen umfangreiche Transkriptom - und Proteomstudien für beide Proteine unter verschiedenen Bedingungen vor (Moskvin *et al.*, 2005; Eraso *et al.*, 2008). Experimente, die an der *upstream* Region des Tetrapyrrolsynthese - Gens *hemA* durchgeführt wurden, lassen eine Wirkung von PrrA als Gyrase vermuten (Ranson-Olson und Zeilstra-Ryalls, 2008), die durch Topologieveränderung der DNA wiederum die eigene Bindung und die des FnrL - Proteins auf unbekannte Art und Weise beeinflusst (Eraso und Kaplan, 2009). Da das *hemA* - Gen keine PpsR - Bindestelle hat, sind diese Daten nur bedingt auf die Photosynthesegene übertragbar. Die durchgeführten *in vivo* - *footprint* - Experimente mit DMS (Abbildung 28) führten leider zu keinem Ergebnis (siehe Abschnitt 3.2). Es war mit dieser Methode nicht möglich eine genaue Aussage über die Bindeverhältnisse von AppA und PpsR zu machen und dieser Teil der Arbeit wurde daher eingestellt.

4.2 *In vivo* - Effekte von BLUF - Mutanten auf die Expression der Photosynthesegene

Die N - terminale Domäne des AppA - Proteins trägt zum Einen die für die Lichtwahrnehmung benötigte BLUF - Domäne (Gomelsky und Klug, 2002) und ist zum Anderen auch unter semiaeroben Bedingungen für die Störung der Interaktion der C - terminale Domäne mit dem PpsR - Protein nach Blaulichtbestrahlung verantwortlich (Han *et al.*, 2007). Dies scheint durch eine direkte Interaktion der BLUF - Domäne mit dem C - Terminus zu geschehen und die Interaktion ist vergleichbar stark wie die des C - Terminus mit dem PpsR - Protein (Han *et al.*, 2007). Welcher Teil der BLUF - Domäne mit dem C - Terminus interagiert und welcher Mechanismus dieser Interaktion zu Grunde liegt, ist jedoch noch unklar. Aus diesem Grund wurde mit einer *random* Mutagenese der BLUF - Domäne (Abbildung 30) versucht, die für die Interaktion verantwortlichen Aminosäuren zu identifizieren (siehe Abschnitt 3.3). Diese lieferte nur den Hinweis, dass entweder keine permanente Interaktion mit dem C - Terminus durch Mutation der BLUF - Domäne hervorgerufen werden kann oder dass diese Interaktion mit der gewählten Methode nicht nachweisbar ist.

Es wurde in den letzten Jahren eine große Zahl von *in vitro* - Studien zum Photozyklus des AppA - Proteins durchgeführt, welche wiederum in der Identifikation der daran beteiligten Aminosäuren mündeten. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hellingwerf (Universität Amsterdam), welche in den letzten Jahren umfangreiche *in vitro* - Studien am Photozyklus der BLUF - Domäne durchgeführt hatte und zudem an der Erstellung einer der ersten Kristallstrukturen beteiligt war (Laan *et al.*, 2003; Gauden *et al.*, 2005; van der Horst *et al.*, 2005; Grinstead *et al.*, 2006), wurden mehrere BLUF - Mutanten durch *overlap extension PCR* erzeugt. Die Basenaustausche wurden so gewählt, dass bereits bekannte und am Photozyklus beteiligte Aminosäuren betroffen sind.

4.2.1 Blaulichts sensitivität der Photosynthesegenexpression in der BLUF - Mutante *R. sphaeroides* App11::appAW104F

Die Aminosäure Tryptophan 104 spielt eine umstrittene Rolle im Photozyklus des AppA - Proteins (siehe Abschnitt 1.2.5). Einige *in vitro* - Studien gestehen dem aromatischen Ring der Aminosäure eine bedeutende Rolle im Photozyklus zu und vermuten eine entscheidende Rolle als Elektronendonator für das ebenfalls am Photozyklus beteiligte Tyrosin 21 (Gauden *et al.*, 2005; Gauden *et al.*, 2007). Tryptophan - Mutanten der BLUF - Domäne verlieren jedoch nicht den charakteristischen Rot - *shift* im Absorptionsspektrum des Flavins und die direkte Beteiligung am Photozyklus wird angezweifelt. Andere *in vitro* - Experimente stellen vor allem die Beteiligung des Tryptophans an der Umsetzung der Lichtsignalwahrnehmung durch eine Konformationsänderung der BLUF - Domäne in den Vordergrund (Masuda *et al.*, 2005; Masuda *et al.*, 2007). Dieses Modell schreibt dem Tryptophan nur eine geringe Rolle im Photozyklus als Stabilisator des Dunkelzustands der BLUF - Domäne, durch Bildung einer Wasserstoffbrücke zum direkt an das FAD gebundenen Glutamin 63 zu. Dieser Zustand wird auch als „Trp - in“ bezeichnet, da das Tryptophan in der FAD - Bindetasche verborgen ist. Nach Belichtung führt das

Protein den Photozyklus durch, indem es zur Konformationsänderung der Seitenkette des Glutamins kommt (vgl. Abschnitt 1.2.5), und das Tryptophan löst die Wasserstoffbrücke. Dieser Zustand wird als „Trp - out“ bezeichnet und exponiert die Aminosäure in Richtung des Lösungsmittels. Jüngste Studien zweifeln eine entscheidende Beteiligung des Tryptophan 104 am Photozyklus an (Dragnea *et al.*, 2009) und halten die veränderten Zustände des Tryptophans („Trp - in, Trp - out“) für Artefakte des Kristallisationsprozesses, die dadurch hervorgerufen wurden, dass stets nur die unvollständige BLUF - Domäne (Aminosäuren 5 - 125 (Grinstead *et al.*, 2006), 17 - 133 (Anderson *et al.*, 2005)) für die Kristallisationen verwendet wurde. Untermauert wird diese These dadurch, dass in der Kristallstruktur der vollständigen BLUF - Domäne (Aminosäuren 1 - 126 (Jung *et al.*, 2006)) nach Belichtung nur eine schwache Zustandsänderung des Tryptophans sichtbar ist. Trotz der Kontroversen um die Rolle des Tryptophan 104 im Photozyklus konnte *in vitro* stets eine deutliche Beschleunigung der Rückkehr der belichteten BLUF - Domäne in ihren Ausgangszustand gezeigt werden, wenn die Aminosäure gegen eine andere ausgetauscht wurde. Der Photozyklus beschleunigte sich nach einem Austausch gegen Phenylalanin (W104F) um das 3 - 7 fache und nach einem Austausch gegen Alanin (W104A) um das 150 fache (Laan, 2005). Es waren also *in vitro*, im Vergleich zur unmutierten BLUF - Domäne, deutlich höhere Mengen an Licht nötig um das mutierte Protein im belichteten Zustand zu halten.

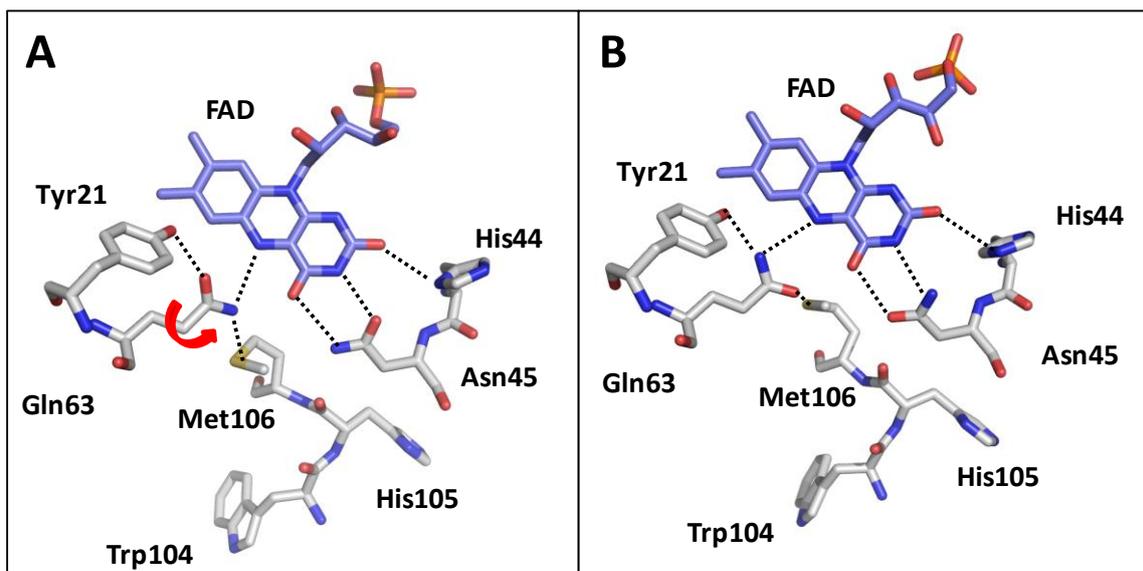


Abbildung 71 : Anordnung der Aminosäuren in der FAD - Bindetasche der vollständigen BLUF - Domäne (Aminosäuren 1 - 126) in Dunkelheit (A) und nach Belichtung (B) (Jung *et al.*, 2006). Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien gekennzeichnet. Der rote Pfeil kennzeichnet die Konformationsänderung des Glutamins. Diese Abbildung wurde mit dem Programm Pymol erstellt (Strukturen: PDB - Eintrag 2IYG (A) bzw. 2IYI(B)).

Um die Rolle des Tryptophans 104 *in vivo* zu untersuchen, wurde per *overlap extension PCR* ein W104F - Austausch im vollständigem AppA - Protein konstruiert (Abbildung 32) und, unter Kontrolle des eigenen Promotors, in den Vektor pRK kloniert. Nach der Konjugation in die AppA - Mutante sollte der C - Terminus des AppA - Proteins das PpsR - Protein wieder binden und den Zellen ihre rötliche Färbung zurück geben. Diese Färbung verloren die Zellen jedoch nach bereits einem Transfer wieder und es konnte kein AppA - Protein mehr in den Zellen

nachgewiesen werden (Abbildung 33). Es scheint, dass ein hoher Selektionsdruck gegen das mutierte Protein in den Zellen besteht. Da in einer zur gleichen Zeit veröffentlichten Arbeit die Expression des vollständigen AppA - Proteins mit der W104A - Mutation durch Insertion in das Chromosom gelang (Masuda *et al.*, 2007), wurde das *appA* - Gen mit der W104F - Mutation per *single crossover* in das Chromosom der AppA - Mutante eingefügt (Abbildung 34). Die erzeugten Klone behielten ihre rote Färbung und im *Southern blot* konnte das Vorhandensein des *appA* - Gens nachgewiesen werden (Abbildung 35). Der so erhaltene Stamm *R. sphaeroides* App11::*appAW104F* wurde im Anschluss mit den gleichen Intensitäten wie der Wildtyp 2.4.1, auf seine Blaulichts sensitivität untersucht (Abbildung 37). Es zeigte sich, dass die Blaulichts sensitivität in der Mutante stark reduziert ist, und deutlich höhere Blaulichtintensitäten notwendig sind, um eine dem Wildtyp vergleichbare Repression zu erzeugen. Die von Dr. Johnny Hendriks (Arbeitsgruppe Hellingwerf, Universität Amsterdam) durchgeführten Berechnungen der Wiederherstellungsrate des Dunkelzustandes des Proteins nach Belichtung ergaben eine *in vivo* Beschleunigung um das 8,7 - fache. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die *in vitro* beobachtete Beschleunigung des Photozyklus auch *in vivo* beobachtet werden kann (siehe Supplementary Material Metz *et al.*, 2010). Über die genaue Ursache dieser Beobachtung kann aufgrund der unklaren Rolle des Tryptophan 104 nur spekuliert werden. Da die Zellen auf Platte und in Flüssigkultur etwas heller pigmentiert sind (Abbildung 38), ist wahrscheinlich, dass mehr freies PpsR vorliegt. Die so erzeugte höhere Repression spräche für die postulierte Rolle des Tryptophans als Stabilisator des Dunkelzustandes von AppA (Masuda *et al.*, 2005). Durch die geringere Stabilität des Dunkelzustandes interferiert die BLUF - Domäne häufiger mit der Bindung des C - Terminus an PpsR und der Repressor liegt so häufiger frei vor, um die Photosynthesegene zu reprimieren. Dies passt zu der in früheren Studien gemachten Beobachtung, dass das vollständige AppA - Protein mit dem W104A - Austausch unabhängig von der Belichtung kaum an PpsR gebunden vorliegt und die Zellen eine nur minimal dunklere Pigmentierung als die AppA - Mutante zeigen, da kein stabiler Dunkelzustand eingenommen werden kann (Masuda *et al.*, 2007). Diese Beobachtung widerspricht jedoch der *in vitro* und *in vivo* festgestellten schnelleren Rückkehr des Proteins in den Dunkelzustand. Eine mögliche Erklärung ist die Kombination aus beiden Effekten: In der Mutante ist der Dunkelzustand der BLUF - Domäne leicht destabilisiert und es liegt daher mehr freies PpsR vor. Gleichzeitig ist auch der belichtete Zustand beeinflusst und das Protein zeigt eine beschleunigte Rückkehr in den Dunkelzustand, die ihm aufgrund der Destabilisierung aber nur teilweise gelingt. Wirkliche Klarheit über die Rolle des Tryptophan 104 im Photozyklus und der Übertragung des Signals an den C - Terminus könnte nur die Kristallstruktur des vollständigen AppA - Proteins im Licht - und Dunkelzustand bringen.

4.2.2 Blaulichts sensitivität der Photosynthesegensexpression in der BLUF - Mutante *R. sphaeroides* App11 pRKappAY21F bzw. Y21C

Eine deutlich klarere Rolle im Photozyklus hat das Tyrosin 21. Dieses dient nach der Belichtung der BLUF - Domäne als Elektronendonator für das FAD und bildet so das extrem kurzlebige Semichinon FADH[•]. Nach der Rotation des Glutamin 63 wird das Elektron zurück auf das Tyrosin 21 übertragen und die BLUF - Domäne befindet sich im physiologisch aktiven Zustand

(Laan *et al.*, 2006; Gauden *et al.*, 2007). Diese Aminosäure ist in allen bisher untersuchten BLUF - Domänen in ihrer Position hochkonserviert und die gleiche Funktion wie in *R. sphaeroides* konnte z.B. in der BLUF - Domäne von Slr1694 aus *Synechocystis* nachgewiesen werden (Gauden *et al.*, 2006).

Von dieser Aminosäure wurden ebenfalls per *overlap extension PCR* zwei Aminosäureaustausche erzeugt. Das Tyrosin wurde zum Einen gegen das ebenfalls aromatische Phenylalanin (Y21F) und zum Anderen gegen das strukturell entferntere Cystein (Y21C) ausgetauscht. Dem liegt die Beobachtung zu Grunde, dass es in der Y21F - Mutante *in vitro* immer noch zu einem Elektronentransfer zum FAD nach Belichtung kommen kann, der jedoch nur zum Semichinon FADH[•] führt und nicht die Konformationsänderung des Glutamins zur Folge hat. Der charakteristische Rot - *shift* des Absorptionsspektrums bleibt in diesem Fall aus (Laan *et al.*, 2006; Gauden *et al.*, 2007). In der Y21C - Mutante fehlt diese Elektronenübertragung und das Protein ist photobiochemisch inaktiv. Nach der Konjugation des Plasmids waren diese beiden Mutanten deutlich gefärbt und das Protein konnte per *Western blot* in den Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 33). Um eine Beeinflussung der Blaulichtsensitivität durch das höhere Expressionslevel von Plasmid (pRK415 ist ein *low copy* - Plasmid mit 1 - 10 Kopien pro Zelle) auszuschließen, wurde zunächst untersucht, ob ein deutlicher Unterschied zwischen chromosomal - (2.4.1) und plasmidexprimiertem Protein (App11 p484 - Nco5) besteht (Abbildung 36). Da kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden konnte, wurde die Blaulichtsensitivität der beiden Tyrosin - Mutanten gegen 20 und 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht im *Northern blot* (Abbildung 39) und in der *real time RT - PCR* (Abbildung 42) bestimmt. Es konnte keine *puc* - Repression nach der Bestrahlung mit beiden Intensitäten festgestellt werden. Stattdessen war ein leichter Anstieg der Genexpression nach der Bestrahlung mit 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht sichtbar. Das Fehlen der Repression kann durch den Verlust des Elektronendonors Tyrosin 21 begründet werden. Hier scheint es keinen Unterschied zu machen, ob die Elektronenübertragung zum FAD stattfindet und das kurzlebige Semichinon gebildet wird (Y21F) oder gar kein Elektronenübertragung stattfindet (Y21C). Die BLUF - Domäne ist nicht mehr in der Lage, auf Blaulicht zu reagieren und PpsR kann vom C - Terminus, auch bei starker Blaulichtbestrahlung, gebunden werden. Der sichtbare Anstieg der *puc* - Expression nach der Bestrahlung mit 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht kann der Regulation durch das PrrB / PrrA - System zugeschrieben werden. Durch die Anregung des photosynthetischen Elektronenflusses erreichen weniger Elektronen die terminale *cbb₃* - Oxidase der aeroben Atmung. Das inhibitorische Signal der *cbb₃* - Oxidase auf PrrB wird schwächer, es kommt zur Signaltransduktion auf PrrA. Da unter semiaeroben Bedingungen jedoch noch aerobe Atmung durchgeführt werden kann, ist der Anstieg mit nur etwa 50 % schwächer als unter mikroaeroben Bedingungen, wo sich der Ausgangslevel fast verdoppelt (vgl. Abbildung 21). Da der gleiche Anstieg bei Bestrahlung mit 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht beobachtet werden kann, wenn die BLUF - Domäne völlig fehlt (Abbildung 40), ist es wahrscheinlich, dass beide Tyrosin - Mutanten *in vivo* nicht in der Lage sind, einen Photozyklus durchzuführen. Somit konnten auch hier die *in vitro* - Daten bestätigt werden.

4.2.3 Blaulichtsensitivität der Photosyntheseexpression in der BLUF - Mutante *R. sphaeroides* App11 pRKappAW104F/Y21F

Die letzte untersuchte BLUF - Mutante war eine Tryptophan 104 / Tyrosin 21 - Doppelmutante (W104F / Y21F). Deren Erstellung liegt die Beobachtung zu Grunde, dass *in vitro*, wie bereits in der Y21F - Mutante beschrieben, nach Belichtung nur die Bildung von Semichinon FADH[•] stattfindet. Das Radikal reagiert in der Y12F - Mutante unter Elektronenabgabe mit Tryptophan 104 ab und AppA fällt in den Dunkelzustand zurück (Gauden *et al.*, 2007). Ein Austausch des Tryptophans gegen Phenylalanin verhindert dessen Elektronenaufnahme und es kommt zur Akkumulation des Semichinon FADH[•] (Gauden *et al.*, 2007). Dieses besitzt eine deutlich längere Halbwertszeit als in der Y21F - Mutante und reagiert über die Bildung eines Tripletflavins FAD^T zurück zum Dunkelzustand ab, ohne den aktiven Zustand des Proteins zu erreichen. Es entsteht ein künstlicher, über das Radikal verlaufender, verkürzter Photozyklus, der stark dem der LOV2 - Domäne von Phototropinen ähnelt (Kennis *et al.*, 2003).

Um diesen verkürzten Photozyklus *in vivo* zu untersuchen, wurde per *overlap extension PCR* eine Doppelmutante beider Aminosäuren erzeugt (W104F / Y21F). Anders als die W104F - Mutante konnte dieses Protein plasmidexprimiert werden (Abbildung 33) und die Zellen besaßen die korrekte Färbung. Dies lässt darauf schließen, dass der hohe Selektionsdruck gegen das W104F - Protein für die Doppelmutante nicht existiert. Da die Mutante zudem eine Tyrosin 21 - Mutation besitzt, ist ein zu den beiden Tyrosin 21 - Mutanten vergleichbares Fehlen des Wildtyp - Photozyklus (vgl. Abschnitt 4.2.2), bei dem es nicht zur Konformationsänderung des Glutamin 63 kommt, wahrscheinlich. Interessanterweise zeigte das Protein aber nach Bestrahlung mit Blaulicht eine starke *puc* - Repression im *Northern blot* (Abbildung 41) und der *real time RT - PCR* (Abbildung 42). Diese erreichte auch bei $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht das Niveau des Wildtyps und ist somit sensitiver als in der W104F - Mutante. Dies ist unerwartet, da der vollständige Photozyklus ohne den Elektronendonator Tyrosin 21 nicht stattfinden sollte. Die BLUF - Domäne interagiert nicht mit dem C - Terminus und PpsR wird freigesetzt, was wiederum zur Repression der Gene führen würde. Dass trotzdem eine Blaulichtrepression stattfindet, spricht für einen alternativen Weg der Elektronenübertragung. Es konnte gezeigt werden, dass auch von Phenylalanin 21 ein Elektronentransfer auf das FAD erfolgen kann (Laan *et al.*, 2006; Gauden *et al.*, 2007), der jedoch nicht zur Strukturveränderung des Glutamin 63 führt. Es kann nur gemutmaßt werden, dass der Austausch beider Aminosäure zu Phenylalanin die Signalübertragung der BLUF - Domäne zum C - Terminus auch durch das Semichinon FADH[•] ermöglicht. Um zu untersuchen, ob in dieser Mutante nicht der Semichinon FADH[•] - Zustand dem Dunkelzustand entspricht, wurde dieser gezielt durch Grünlicht (< 540nm) angeregt. Wäre hier eine Repression sichtbar, würde das Semichinon FADH[•] weiter angeregt und so die physiologisch aktive Form des AppA gebildet. Dies war jedoch nicht der Fall. Es konnte keine *puc* - Repression nach Grünlichtbestrahlung festgestellt werden. Warum das Zusammentreffen beider Mutationen *in vivo* zu einer scheinbaren Wiederherstellung der physiologischen Aktivität führt, während *in vitro* ein photobiochemisch inaktives Protein erzeugt wird, ist unklar und erfordert weitere Arbeiten an der Doppelmutante.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die an der isolierten BLUF - Domäne durchgeführten *in vitro* - Studien sich in den meisten Fällen auch *in vivo* nachvollziehen ließen. So zeigte die Tryptophan 104 - zu - Phenylalanin - Mutante *in vivo* eine deutlich verringerte Blaulichtsensitivität, die mit der schnelleren Wiederherstellung des Dunkelzustands der BLUF - Domäne in den *in vitro* - Experimenten vergleichbar ist. Gleichzeitig beweist dies aber auch, dass der Photozyklus *in vivo* noch stattfindet. Dies stützt alle jüngeren Studien, die der Aminosäure nur eine indirekte Wirkung zugestehen. Für die Tyrosin 21 - zu - Phenylalanin / Cystein - Mutante konnte *in vitro* ein unvollständiger / fehlender Photozyklus nachgewiesen werden. *In vivo* waren beide Enzyme nicht mehr in der Lage, das Blaulichtsignal an den C - Terminus zu vermitteln. Widersprüchlich zu den *in vitro* - Beobachtungen waren die Ergebnisse der Tryptophan 104 - zu - Phenylalanin / Tyrosin 21 - zu - Phenylalanin - Doppelmutante. Diese zeigt *in vitro* einen stark verkürzten Photozyklus, der über die Anhäufung von Semichinon - und Triplet - FAD verläuft, aber nicht zur Strukturänderung des Glutamin 63 führt, während *in vivo* ein dem Wildtyp vergleichbares Verhalten des AppA - Proteins nachgewiesen werden kann. Es sind weitere Arbeiten nötig, um zu untersuchen, inwiefern hier ein alternativer Photozyklus zu einer *in vivo* - Signaltransduktion innerhalb des Proteins führen kann.

4.3 Yeast - Two - Hybrid - Interaktionsstudien mit dem LOV - und dem CryB - Protein von *R. sphaeroides*

Das CryB - und das LOV - Protein von *R. sphaeroides* unterscheiden sich stark von bisher bekannten bakteriellen und pflanzlichen Photorezeptoren (vgl. Abschnitt 1.2.3 und 1.2.4). Für das CryB - Protein konnte eine Beteiligung an der Regulation der Photosynthese nachgewiesen werden, da das Fehlen des CryB - Proteins zu einer deutlichen Reduktion der photosynthetischen Komplexe führt (Hendrischk *et al.*, 2009a). Eine physiologische Funktion des LOV - Proteins konnte bisher noch nicht beschrieben werden (Hendrischk *et al.*, 2009b). Beiden Proteinen fehlt eine Ausgangsdomäne, weshalb die Interaktion mit einem anderen Protein eine Möglichkeit zur Signaltransduktion des Lichtsignals darstellen könnte. Eine Suche nach möglichen Interaktionspartnern wurde mit den 6 x His - markierten CryB - und LOV - Proteinen bereits mit mehreren Methoden (*His - pulldowns*, *Far - Western blot* und Coimmunopräzipitation) durchgeführt, was jedoch nicht zum Nachweis eines interagierenden Proteins führte (Hendrischk, 2009). Um eine genomweite Suche nach möglichen Interaktionspartnern gegen das LOV - und CryB - Protein durchzuführen, wurde eine Bibliothek mit chromosomaler DNA von *R. sphaeroides* 2.4.1 erstellt und anschließend mittels *Matchmaker*TM (*Clontech*) *Yeast - Two - Hybrid* - System (Abbildung 43) gegen beide Proteine gescreent. Da für das CryB - Protein bereits eine Funktion in der Regulation der Photosynthesegene bekannt war, wurde außerdem dessen Interaktion mit den bereits bekannten Regulatoren AppA und PpsR untersucht.

4.3.1 Untersuchungen zur direkten Interaktion von CryB mit bekannten Regulatorproteinen

In der CryB - Mutante konnte ein blaulichtabhängiger Anstieg der gebildeten Photosynthesekomplexe unter anaeroben und phototrophen Bedingungen festgestellt werden, der nicht durch Rotlicht ausgelöst werden konnte (Hendrischk *et al.*, 2009a). Somit kann eine Beteiligung des photosynthetischen Elektronenflusses, der durch Rotlicht viel stärker angeregt wird als durch Blaulicht, weitestgehend ausgeschlossen werden. Für die blaulichtabhängige Regulation unter semiaeroben Bedingungen ist mit AppA / PpsR bereits ein gut charakterisiertes System vorhanden, weshalb beide Proteine mögliche Interaktionspartner für das CryB - Protein darstellen und an der Signaltransduktion durch das Protein unter anaeroben / phototrophen Bedingungen beteiligt sein könnten. Während die durchgeführten Tests für eine Interaktion des PpsR - Proteins mit CryB keine Ergebnisse lieferten, wuchsen die Klone mit einer AppA fusionierten Aktivator-domäne auf allen Selektionsmedien und es konnte im β - Galaktosidase - *assay* eine Aktivität von etwa 40 % der Positivkontrolle erzielt werden (Abbildung 44). Das *Yeast - Two - Hybrid* - System kann nur als Hinweis auf eine mögliche Interaktion zweier Proteine gewertet werden und es wurde anschließend mittels *pull-down* - Analysen die Interaktion beider Proteine *in vitro* bestätigt (siehe Abschnitt 3.5.2). Da in vorherigen *His - pull-downs* mit markiertem CryB - Protein das AppA - Protein nicht aus dem Zelllysate gebunden werden konnte (Hendrischk, 2009) und eigene Arbeiten bereits die niedrige Konzentration des AppA - Proteins in der Zelle gezeigt hatten (Metz, 2006), wurde für die folgenden *pull-down* - assays das überexprimierte und MBP - markierte AppA - Protein an eine Amylose - Matrix gebunden. Nach der Inkubation mit Zelllysate der *R. sphaeroides* - CryB - Überexpressionsmutante und mehrmaligem Waschen konnte eine große Menge von, an das AppA - Protein gebundenem, CryB eluiert und im *Western blot* nachgewiesen werden (Abbildung 45A). Kontrollexperimente ohne vorherige Bindung der Matrix mit AppA (Abbildung 45B) oder unter Verwendung eines anderen Antikörpers (Abbildung 45D) führten zu keinem Nachweis eines Interaktionspartners. Damit wurde die im *Yeast - Two - Hybrid* - System gezeigte Interaktion bestätigt. Für die Interaktion mit PpsR reicht der C - terminale Teil des AppA - Proteins aus. Es wurde weiterhin untersucht, ob die Interaktion auch nachgewiesen werden kann, wenn nur der GST - markierte C - Terminus von AppA an eine Glutathion - Matrix gebunden vorliegt. Der durchgeführte *Western blot* wies auch hier große Mengen an CryB in den Elutionsfraktionen auf (Abbildung 45C), während die Kontrollexperimente keine Bindung zeigten (Daten nicht gezeigt). Daraus kann geschlossen werden, dass auch für die Interaktion mit CryB der C - Terminus des AppA - Proteins ausreicht. Wie diese Interaktion stattfindet, ist noch unklar. Die Interaktion von AppA und PpsR ist seit langem bekannt (Gomelsky und Kaplan, 1997) und eine direkte Bindung von AppA an PpsR konnte nachgewiesen werden (Masuda und Bauer, 2002). Es ist wahrscheinlich, dass das PpsR - Protein über seine zwei PAS - Domänen, welche häufig Protein - Protein - Interaktionen vermitteln, mit AppA interagiert (Gomelsky *et al.*, 2000). Da das Häm an der SCHIC - Domäne des C - Terminus einen positiven Effekt auf die Bindung an das PpsR - Protein hat (Han *et al.*, 2007) und PAS - Domänen eine Rolle in der Häm - Bindung spielen können (vgl. Abschnitt 1.1.5), ist eine Rolle der SCHIC - Domäne bei der Interaktion ebenfalls wahrscheinlich. Das CryB - Protein

besitzt jedoch mit Ausnahme der PHR - Domäne keine weiteren charakterisierten Domänenstrukturen, welche als Interaktionsdomänen bekannt sind.

4.3.2 Weiterführende Analysen zur Interaktion von CryB mit AppA und der mögliche Rolle dieser Interaktion für die Photosyntheseegenregulation

Um einen möglichen Einfluss von CryB auf die Bindung von PpsR und die Aufhebung dieser Bindung durch AppA zu untersuchen, wurden Gel - Retardations - assays gegen den *upstream* - Bereich des *puc* - Operons (*pucUp*) durchgeführt (siehe Abschnitt 3.5.3). Dabei wurden *in vitro* PpsR und die *pucUp* - DNA zusammen inkubiert und die Bindung des Repressors führte zu einer Retardation (*shift*) der radioaktiv markierten DNA im Gel (Abbildung 46A). Inkubiert man gleichbleibende Konzentrationen an PpsR mit steigenden Konzentrationen des C - Terminus von AppA (AppA Δ N), wird diese Retardation wieder aufgehoben, da das AppA - Protein mit dem PpsR - Protein interagiert und dieses sich so von der DNA löst (Abbildung 46B). Anschließend wurde das Experiment mit und ohne Zugabe eines Überschusses an CryB wiederholt. Die Inkubation der Proben und der Gellauf wurden in Dunkelheit (Abbildung 47B) und bei Belichtung mit Weißlicht (Abbildung 47A) durchgeführt, da nicht bekannt war, inwiefern der Photozyklus von CryB einen Einfluss auf die Interaktion hat. Die durchgeführten Gel - Retardations - assays zeigten keinen Unterschied zwischen den Proben, die mit und ohne CryB inkubiert wurden. Es spielte keine Rolle, in welcher Reihenfolge die Einzelkomponenten zur DNA hinzugefügt wurden (Daten nicht gezeigt). Es scheint als habe das CryB - Protein keine direkte Wirkung auf die Bindung von PpsR an die DNA und die Aufhebung dieser Bindung durch AppA. Wie in Abbildung 47A gezeigt, bindet CryB auch in hohen Konzentrationen nicht an die doppelsträngige *puc* - *upstream* - DNA. *In vitro* konnte allerdings eine starke Bindung an Einzelstrang - DNA und RNA festgestellt werden. Die kleine regulatorische RNA RSs_2430 konnte im Rahmen einer Diplomarbeit (Mank, 2009) als Photosyntheseregulator identifiziert werden. So findet die Expression der Photosynthesekomplexe nach einem *shift* zu niedrigen Sauerstoffkonzentrationen verlangsamt in einem Überexpressionsstamm von RSs_2430 statt und die Kulturen sind deutlich schwächer pigmentiert (Mank, 2009). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Beeinflussung der Photosyntheseegenregulation durch RSs_2430 und der RNA - Bindefähigkeit von CryB konnte nicht ausgeschlossen werden und aus diesem Grund wurde untersucht, ob CryB vielleicht zusammen mit der kleinen RNA einen Einfluss auf die Interaktion von AppA und PpsR hat. Die Wiederholung des Gel - Retardations - assays mit Zugabe der kleinen, regulatorischen RNA zeigte jedoch erneut keinen Einfluss des CryB - Proteins (Abbildung 48). Da nachgewiesen werden konnte, dass CryB bei Belichtung keine stark strukturierten Substrate bindet (Hendrischk *et al.*, 2009a), wurden die Gel - Retardations - assays in Dunkelheit durchgeführt. Es spielte dabei auch hier keine Rolle, in welcher Reihenfolge die Einzelkomponenten zur DNA hinzugefügt wurden (Daten nicht gezeigt).

Es konnte beobachtet werden, dass die Mengen an gebildeten Photosynthesekomplexen in der CryB - Mutante deutlich geringer sind als im Wildtyp (Hendrischk *et al.*, 2009a). Komplementiert man die Mutante mit plasmidexprimiertem CryB - Protein, führt dies nicht zur Wiederherstellung des Wildtyp - Phänotyps, sondern zu einer noch stärkeren Reduktion der gebildeten Photosynthesekomplexe. Da sich durch die Expression vom *low* - *copy* - Plasmid pRK

eine höhere Kopienzahl des *cryB*-Gens und somit auch mehr des CryB-Proteins in der Zelle befindet, ist ein Zusammenhang zwischen der Menge an CryB in der Zelle und der Bildung der Photosynthesekomplexe wahrscheinlich. Um dies zu überprüfen, wurde ein *R. sphaeroides* CryB-Überexpressionsstamm untersucht (siehe Abschnitt 3.5.4). Dieser Überexpressionsstamm exprimiert das *cryB*-Gen unter Kontrolle des sauerstoffabhängigen *puf*-Promotors. Dieser Promotor kann durch einen *shift* der Zellen von aeroben zu mikroaeroben Bedingungen aktiviert werden und eine sehr starke Expression des Proteins ermöglichen. Der Überexpressionsstamm zeigte eine noch stärkere Reduktion der Photosynthesekomplexe (Abbildung 49) im Vergleich zu der CryB-Mutante und der Komplementation. Gleichzeitig ist das Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen stark verlangsamt und ein Sauerstoffshift von aeroben zu mikroaeroben Bedingungen lässt die Zellen das Wachstum fast völlig einstellen (Abbildung 50). Es war darüber hinaus nicht möglich, die Zellen unter anaeroben und phototrophen Bedingungen heranzuziehen. Damit konnte bestätigt werden, dass die Menge an gebildeten CryB nicht nur einen starken Einfluss auf die Menge an gebildeten Photosynthesekomplexen hat, sondern auch das Wachstum der Zelle nachhaltig beeinflusst. Um den quantitativen Nachweis, - des in der Zelle vorhandenen - CryB zu erbringen, wurde anschließend ein *Western blot* von Zelllysaten durchgeführt (Abbildung 51). Die niedrige Expression im Wildtyp spricht entweder nicht für ein konstitutives Vorhandensein des CryB-Proteins in der Zelle oder es sind nur sehr geringe Konzentrationen des Proteins nötig, um seine Aufgaben unter mikroaeroben Bedingungen zu erfüllen. Da das Protein σ^{HII} -abhängig exprimiert wird, ist zu vermuten, dass das Protein nur nach Singulett-Sauerstoffstress in großen Mengen exprimiert wird. Dabei wirkt sich die Überproduktion des Proteins im Komplementations- und Überexpressionsstamm scheinbar drastischer auf Photosynthese und Wachstum aus als das Fehlen des CryB-Proteins in vergleichbaren Experimenten in der $\Delta cryB$ -Mutante (Hendrischk, 2009).

Eine direkte Interaktion mit dem AppA-Protein von CryB konnte nachgewiesen werden und die Expression der Photosynthesegene wird maßgeblich durch die größere Menge an CryB-Protein beeinflusst. Daher wurde ebenfalls eine Quantifizierung der Blaulichtrepression in der Überexpressionsmutante (Abbildung 52) durchgeführt (siehe Abschnitt 3.5.5). Weil keine Beeinflussung des AppA/PpsR-Systems in den *in vitro* Gel-Retardationsassays nach Zugabe eines Überschusses an CryB gezeigt werden konnte (vgl. Abschnitt 3.5.3), sollte auch *in vivo* kein Effekt des Proteins auf die blaulichtabhängige Repression sichtbar sein. Dieses Ergebnis konnte bestätigt werden und, obwohl die generelle Photosynthesegenexpression in der Mutante schwächer ist, verläuft die Kinetik der Repression genau wie im Wildtyp. Dafür spricht auch, dass der Redox-sensitive C-Terminus des AppA-Proteins für eine Interaktion ausreicht (vgl. Abschnitt 3.5.2). Der Sauerstoffpartialdruck ist offenbar hauptverantwortlich für den drastischen Phänotyp in der CryB-Mutante, weshalb untersucht wurde, ob der PrrB/PrrA-abhängige Anstieg der Photosynthesegenexpression, nach einem *shift* der Kultur von aeroben zu mikroaeroben Bedingungen dem des Wildtyps entspricht (Abbildung 53). Während im Wildtyp ein Anstieg um das fast Zehnfache beobachtet werden konnte, blieb dieser Anstieg in der Überexpressionsmutante aus. Auf Proteinebene könnte dies bedeuten, dass entweder die Bindung von PrrA verhindert wird oder PpsR weiterhin an die DNA gebunden vorliegt. Durch die Interaktion von AppA mit CryB, dürfte ein Einfluss auf das PpsR-Protein wahrscheinlicher sein. So könnte z.B. die Bindung von AppA an PpsR durch das CryB-Protein verhindert werden und

der Repressor auch unter anaeroben Bedingungen an die DNA gebunden vorliegen. Gegen diese Theorie spricht jedoch der fehlende Einfluss auf die Blaulichtrepression und die Gel-Retardations - *assays*, da hier ein großer Überschuss an CryB keinen Effekt auf die AppA / PpsR - Interaktion aufweist. Es ist jedoch unklar, ob die in den Gel - Retardations - *assays* verwendeten *in vitro* - Bedingungen wirklich den *in vivo* - Bedingungen in der Zelle entsprechen, weshalb diese Theorie nicht völlig verworfen werden sollte. Für einen Effekt auf das PrrB / PrrA - System spricht der unter anaeroben / phototrophen Bedingungen beobachtete Anstieg der Photosynthesegenexpression nach Blaulichtbestrahlung in der CryB - Mutante (Hendrischk *et al.*, 2009a). Die stärkere Expression ist jedoch auch in der CryB - Komplementation vorhanden, was diese These nicht sehr wahrscheinlich erscheinen lässt. Zudem ist die Beteiligung, eines von photooxidativem Stress abhängigen Proteins, an der anaeroben Signaltransduktion unnötig. Am wahrscheinlichsten erscheint eine posttranskriptionale Regulation der mRNA - Menge durch direkte Bindung des CryB - Proteins. Für diese Theorie spricht auch, dass die Halbwertszeiten von *puf* und *puc* in der CryB - Mutante länger sind (Frühwirth, unveröffentlicht), was für eine destabilisierende Rolle des CryB - Proteins spricht. Dies würde bedeuten, dass, nach dem *shift* von aeroben zu mikroaeroben Bedingungen, die hohe Konzentration des CryB - Proteins in der Überexpression die vorhandene *puc* - mRNA - Menge gering hält und daher keine Expression der Photosynthesegene beobachtet werden kann. AppA könnte dabei, wie auch bei PpsR, als Modulator der CryB - Antwort dienen und dessen Aktivität bei hohem Sauerstoffpartialdruck erhöhen, um die Restmenge an *puf* - und *puc* - mRNA schneller aus der Zelle zu beseitigen und die Expression weiterer Photosynthesekomplexe zu verhindern.

Abschließend kann gefolgert werden, dass zwar eine Interaktion zwischen CryB und dem AppA - Protein im *Yeast - Two - Hybrid - System* und in *pulldown - assays* nachgewiesen werden konnte - die genaue Natur dieser Interaktion aber immer noch unklar ist. Auf regulatorischer Ebene scheint der Redox - abhängige C - Terminus der ausschlaggebende Teil des AppA - Proteins für diese Interaktion zu sein. Zudem besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Menge an exprimierten CryB - Protein und seinem Einfluss auf die Photosynthesegenexpression, wobei ein Überschuss des Proteins eine schwerwiegendere Auswirkung hat, als das Fehlen. Um eine Bindung des CryB - Proteins an die mRNAs der Photosynthesegene auszuschließen bzw. zu bestätigen und somit eine Aussage über eine posttranskriptionale Regulation des CryB - Proteins zu erlauben, wären Gel - Retardations - *assays* mit *in vitro* Transkripten dieser Gene ein sinnvoller nächster Schritt. Gleichzeitig könnte die Bestimmung der Halbwertszeiten dieser Gene im Wildtyp, der Mutante und der Komplementation eine stabilisierende / destabilisierende Wirkung von CryB nachweisen bzw. widerlegen. Fortführende Arbeiten auf diesem Projekt sind bereits im Gange und werden weitere Hinweise auf die mögliche Rolle des CryB - Proteins bei der Regulation der Genexpression liefern.

4.3.3 Analyse einer möglichen Interaktion von LOV und CryB mit Proteinen der Kapselbiosynthese

Das *screening* des LOV und CryB - Proteins gegen die Fragmente der chromosomalen DNA von *R. sphaeroides* 2.4.1 führte zur Identifikation weiterer möglicher Interaktionspartner, von denen eine Gruppe durch ihre Häufigkeit besonders in den Vordergrund trat (siehe Abschnitt 3.5.7). So war der häufigste identifizierte Interaktionspartner für das LOV - Protein und der zweithäufigste identifizierte Interaktionspartner für das CryB - Protein die Zucker - Phosphat - Isomerase GutQ (RSP_1153) (Abbildung 54). Dieses Protein besitzt eine hohe Homologie zum KpsF - Protein von *E. coli*, dessen Fehlen die Kapselsynthese verhindert ist (Simpson *et al.*, 1996) und die Virulenz abschwächt (Rowe *et al.*, 2000). Da zudem als häufigster möglicher Interaktionspartner für das CryB - Protein das AglE - Protein (RSP_2873) identifiziert werden konnte (Abbildung 54), welches einen Zucker - Transporter codiert, der eine hohe Homologie zu Maltodextran - Transporten besitzt (Overduin *et al.*, 1988), wurde eine mögliche Verbindung beider Proteine zur Kapselbiosynthese untersucht. Maltodextran ist eines der bedeutendsten Kapselpolysaccharide in vielen Bakterien. Kapseln sind weitverbreitet unter frei lebenden und pathogenen Mikroorganismen und ihre Zusammensetzung variiert stark. In den meisten Fällen besteht die Kapsel aus Polysacchariden und Glykoproteinen, die eine starre Matrix um die Zelle bilden. Diese stellt eine starke Diffusionsbarriere für große Partikel dar, was man sich bei Färbetechniken zum Nachweis von Kapselproteinen zu Nutze macht. Da große Partikel, wie z.B. viele Farbstoffe, nicht in die Kapsel eindringen können, wird ein heller lichtbrechender Hof um die gefärbte Zelle sichtbar.

Um mögliche Unterschiede in der Kapselbiosynthese sichtbar zu machen (siehe Abschnitt 3.5.8), wurden mit verschiedenen Färbemethoden Zellen von Platte unter dem Mikroskop untersucht (Abbildung 55). Es konnte für *R. sphaeroides* 2.4.1, Δlov , Δcry allerdings keine Kapsel nachgewiesen werden, was keine Aussage über Unterschiede in der Kapselbiosynthese der Zellen möglich macht. Es existieren nur wenige Studien über die Kapsel von *R. sphaeroides*, während die namensgebende Kapsel von *R. capsulatus* gut charakterisiert ist. Für *R. sphaeroides* konnte nur gezeigt werden, dass die Bildung der Kapsel in direktem Zusammenhang mit einem homolog des LuxI / LuxR - *quorum sensing* - System (CerI (RSP_0123) / CerR (RSP_0122)) steht, und dass dessen Inaktivierung binnen kürzester Zeit zur Aggregation der Zellen führt (Puskas *et al.*, 1997). Dies wiederum führt dazu, dass die Zellen in geringer Zahl, durch eine verstärkte Synthese von Exopolysacchariden, Aggregate bilden, während hohe Zelldichten diese Aggregate wieder lösen. Das vor allem aerob wachsende *R. sphaeroides* - Zellen zwischen einer OD_{660} von 0,1 - 0,4 häufig zur Bildung von Aggregaten neigen, konnte auch aus eigener Beobachtung festgestellt werden. Diese aggregierten Zellen zeigten allerdings ebenfalls keine Kapsel unter dem Mikroskop nach der Färbung mit flüssiger Tuschelösung (Daten nicht gezeigt). Ein indirekter Nachweis der Bildung von Kapseln kann weiterhin durch Zentrifugation der Zellen bei niedrigen *g* - Zahlen erfolgen. Zwischen den *R. sphaeroides* - Stämmen konnte wieder kein Unterschied festgestellt werden. Dabei machte es keinen Unterschied, ob sich die Zellen in der stationären (Abbildung 56) oder der exponentiellen Phase befanden (Daten nicht gezeigt).

In keinem der in dieser Arbeit verwendeten *R. sphaeroides* - Stämme konnte eine Kapsel nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Bedingungen, unter denen die Zellen herangezogen wurden, nicht optimal waren und, dass eine Kapselbildung, anders als in *R. capsulatus* B10, nur unter sehr spezifischen Bedingungen erfolgt, welche in keinem der Experimente erzielt wurden. So löst Phosphatmangel die Kapselbildung und Virulenzfaktorsynthese von *Pseudomonas aeruginosa* aus (Pritchard und Vasil, 1986) und die vier unabhängigen Kapselsynthese - Gengruppen von *E. coli* können durch Temperatur, *quorum sensing* und Sauerstoffmangel ausgelöst werden (Whitfield und Roberts, 1999). Die für die Kapselbildung von *R. sphaeroides* spezifischen Bedingungen zu ermitteln scheint die vielversprechendste Fortführung des Projektes zu sein. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Kapselsynthese in unserem Laborstamm im Zuge der jahrelangen Kultivierung verloren ging. Dies ist allerdings sehr unwahrscheinlich, da die Zellen noch immer in der Lage sind Aggregate in Flüssigkultur zu formen. Die letzte Möglichkeit wäre, dass es zwar zur Abgabe von langkettigen Kohlenhydratverbindungen kommt, diese aber nur eine Schleimschicht bilden, welche nicht durch die von uns verwendeten Methoden sichtbar gemacht werden kann, da die Kohlenhydrat - Moleküle keine geordnete, dichte Matrix bilden.

4.6 Vergleich der Transkriptome von *R. sphaeroides* 2.4.1 und Δlov nach mikroaerobem Wachstum

Transkriptomanalysen der gesamten mRNA eines Organismus erlauben einen umfassenden Überblick über die Genexpression. Für *R. sphaeroides* wurden bereits mehrere Transkriptomanalysen durchgeführt (Braatsch *et al.*, 2004; Moskvina *et al.*, 2005; Zeller *et al.*, 2005; Eraso *et al.*, 2008), wobei die dafür verwendeten *microarray - chips* nicht frei verfügbar sind. Die Erstellung eines eigenen *R. sphaeroides* 2.4.1 *microarray - chips* ist daher Teil dieser Arbeit und in Abschnitt 2.6.1 beschrieben. Der so erstellte *microarray* wurde im Rahmen weiterer Funktionsanalysen der Δlov - Mutante getestet. Für diese Mutante konnte durch das *Yeast - Two - Hybrid* - System ein erster Hinweis auf die Interaktion mit Proteinen der Kapselbiosynthese gefunden werden - ein echter Nachweis der physiologischen Funktion blieb bisher aber aus. Es wurde zunächst ein Vergleich der Transkriptome zwischen dem Wildtyp 2.4.1 und der Δlov - Mutante durchgeführt, um zu untersuchen, welchen Einfluss das LOV - Protein auf die Genexpression in der Zelle hat. Gleichzeitig wurde damit der erstellte *R. sphaeroides* 2.4.1 *microarray - chip* getestet.

4.6.1 Allgemeine Übersicht über die Transkriptomanalyse

Die erste Auswertung der Daten (Abbildung 60) mit einem A - Wert von mehr als 9,5 zeigt, dass insgesamt 227 (5,19 %) der 4372 untersuchten Gene eine veränderte Expression (Kategorie I) zeigen. Davon sind 210 (Ratio ≥ 2) in der Mutante deutlich stärker exprimiert, während nur 17 (Ratio $\leq 0,5$) deutlich schwächer exprimiert werden. Da durch das Fehlen des LOV - Proteins deutlich mehr Gene stärker als schwächer exprimiert werden, kann aus diesen Daten bereits gefolgert werden, dass das Protein in noch unbekannter Form einen

reprimierenden Einfluss auf die Genexpression hat. Vergleicht man diese Daten mit denen von Transkriptomanalysen des PpsR - Proteins, welches als starker Repressor nahezu aller Photosynthesegene und einiger sehr eingegrenzter anderer Gengruppen wirkt, wurden hier unter ähnlichen Bedingungen (Wildtyp 2.4.1 zu PpsR - Mutante PPS2-4, wenig Sauerstoff) vergleichbare Werte festgestellt (Moskvin *et al.*, 2005). So zeigen 740 Gene (18 %) eine signifikante Regulation durch PpsR (Ratio $\geq 1,8$ und $\leq 0,6$). Davon sind nur etwa 80 Gene in der Mutante schwächer exprimiert während der gesamte Rest stärker exprimiert vorliegt (Quelle : [NCBI Gene Expression Omnibus Data, Plattform GPL: 162](#)). Bei dem eigentlich aktivierenden Transkriptionsregulator PrrA ist das Verhältnis von höher zu schwächer regulierten Genen interessanterweise relativ ausgeglichen. So konnte zwischen Wildtyp und PrrA - Mutante PrrA2, in der Mutante bei 381 Genen erhöhte Expression (9 %) und eine erniedrigte bei 677 Genen (16 %) festgestellt werden (Eraso *et al.*, 2008). Die Ergebnisse ließen sich auch per *real time* RT - PCR bestätigen (Abbildung 61) und die erhaltenen Daten lagen im vergleichbaren Rahmen anderer *R. sphaeroides* - Transkriptomanalysen. Da es sich bei PpsR und PrrA um Transkriptionsfaktoren handelt, ist die Anzahl der differenziell exprimierten Gene deutlich höher als bei dem LOV - Protein, welches keine DNA - Bindedomäne besitzt. Dass dennoch so viele Proteine durch LOV beeinflusst werden, spricht für eine indirekte Beeinflussung der Transkription.

Die Gesamtzahl der differenziell regulierten sRNAs (Kategorie I) ist mit 16 der auf dem *microarray* befindlichen 122 sRNAs hoch (12,58 %). Da keine ähnlichen Studien vorliegen, kann jedoch keine Aussage über die Vergleichbarkeit dieser Zahl getroffen werden. Auffällig ist hier wieder die größere Anzahl an in der Mutante stärker exprimierten sRNAs. So werden 22 sRNAs stärker in der Mutante exprimiert und nur 6 schwächer. Dies spricht auch hier für eine Rolle des LOV - Proteins als Repressor, wenn auch im geringeren Maße als bei den Genen.

4.6.2 Einfluss von LOV auf die Expression der Photosynthesegene

Mit AppA und CryB sind in *R. sphaeroides* bereits zwei an der Photosynthesegenregulation beteiligte Blaulichtrezeptoren bekannt. Daher ist es naheliegend auch eine Rolle des Blaulichtrezeptors LOV in der Photosynthesegenregulation zu vermuten (Tabelle 4). Einige Operons / Gene sind stark hochreguliert (Kategorie I: *puCBAC*, *puC2BA*, *bchODI*, *crtA*, Kategorie II : *pufX*, L & Q), während alle übrigen Operons des photosynthetischen *Genclusters* keinen Unterschied in der Expression zwischen Wildtyp 2.4.1 und der Δlov - Mutante zeigen. Es ist vor allem interessant, dass die Gene der Proteine des LHC II sehr spezifisch höher exprimiert sind, während die des LHC I und des RC nur etwas höher oder gleich exprimiert sind. Vergleicht man dies mit der Beeinflussung durch direkte Photosyntheseregulatorproteine wie PpsR, sind durch den Verlust des Repressors ausnahmslos alle Gene des photosynthetischen *Genclusters* stärker exprimiert (Moskvin *et al.*, 2005), während der Verlust des Aktivators PrrA alle Gene schwächer exprimiert (Eraso *et al.*, 2008). Selbst Wasserstoffperoxidstress führt zu einer schwächeren Expression aller Gene (Zeller *et al.*, 2005). Ein spezifischer Anstieg der LHC II kann jedoch in *R. sphaeroides* bei Bestrahlung der Zellen mit Blau - und Rotlicht unter mikroaeroben Bedingungen herbeigeführt werden (Hunter *et al.*, 2005). Das LOV - Protein könnte hier unter aeroben / semiaeroben Bedingungen an der Repression dieser Antwort

beteiligt sein. Da aber auch Rotlicht an dieser Antwort beteiligt ist, scheint dies unwahrscheinlich. Gemessene Absorptionsspektren unter mikroaeroben Bedingungen zeigten in der Δlov - Mutante bei einer OD_{660} von 0,8 tatsächlich eine leichte Erhöhung der Expression im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 62). Diese Erhöhung war jedoch stark von der Wachstumsphase abhängig und nur bei dieser OD wirklich ausgeprägt. Zudem waren nicht nur die *peaks* des LHC II (800 nm bzw. 850 nm) erhöht, sondern das gesamte Spektrum. Dies könnte bedeuten, dass die sichtbare Erhöhung des Transkriptionslevels nicht völlig mit der Menge an gebildeten Protein korreliert.

4.6.3 Einfluss von LOV auf die Expression der Gene des σ^E / ChrR Regulons

Der Sigmfaktor σ^E reguliert in *R. sphaeroides* die Antwort auf photooxidativen Stress (vgl. Abschnitt 1.3.4). In der Δlov - Mutante bilden die σ^E - abhängig regulierten Gene die am homogensten stärker exprimierte Gruppe (Tabelle 5). Neben dem Sigmfaktor (*rpoE*) selbst, sind auch der Antisigmfaktor ChrR (*chrR*), der σ^E - abhängige Sigmfaktor σ^{HII} (*rpoH2*) und eine große Anzahl weiterer σ^E - abhängiger Gene ebenfalls deutlich stärker in der Mutante exprimiert. Da dies eine Verbindung zwischen dem σ^E - Regulon nahelegt, wurde untersucht, ob die Expression des *lov* - Gens auch von diesem Sigmfaktor abhängig ist und Singulett-Sauerstoffstress eine Induktion auslöst (Abbildung 63). Dies war jedoch nicht der Fall, was gegen eine Abhängigkeit von LOV von der σ^E - Antwort auf photooxidativen Stress spricht. Dafür spricht, dass die Δlov - Mutante keine erhöhte Sensitivität gegen Singulett-Sauerstoffstress in Hemmhofstests besitzt (Abbildung 64). Zudem konnte in den β - Galaktosidase - assays, bei denen das *lacZ* - Gen unter Kontrolle des σ^E - abhängigen *phrA* - Promotors stand (Abbildung 65), einzig bei aerobem Wachstum mit Weißlicht und Methylenblau (Abbildung 65D) ein Unterschied in der Induktion der β - Galaktosidase - Aktivität zwischen Wildtyp 2.4.1 und der Δlov - Mutante festgestellt werden. Unter diesen Bedingungen ist die σ^E - Antwort am stärksten, da Licht und hohe Sauerstoffkonzentrationen mit dem Photosensibilisierer Methylenblau zusammentreffen. Dass auch hier nur eine schwache Antwort sichtbar ist, spricht gegen eine starke Beeinflussung der σ^E - Antwort durch das LOV - Protein.

Es scheint daher, dass LOV eine eher indirekte Rolle in der Beeinflussung der σ^E - Antwort besitzt und dass der in den *microarrays* sichtbare Effekt nicht durch die eigentliche Funktion des LOV - Proteins entsteht. Eine andere Möglichkeit ist, dass das LOV - Protein ein genereller Stressregulator ist, der oberhalb der σ^E - Antwort wirkt und der sichtbare Effekt ist das *downstream* - Ergebnis dieser Regulation.

4.6.4 Weitere durch die LOV - Deletion beeinflusste Gene

Eine weitere große Gruppe von Genen, die durch die Deletion von *lov* differenziell exprimiert werden, sind die Transport - Proteine (alle Kategorie I). Diese lassen sich grob in folgende Gruppen einteilen: Kohlenhydrattransporter, *multidrug* / Antibiotika - Transporter, Häm - Transporter und Ionentransporter. Die Kohlenhydrattransporter (RSP_2701, RSP_3948, RSP_3943, RSP_3501) bilden dabei zwar keine große Gruppe, aber in Anbetracht des häufigen

Induktion von am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligten Genen nach Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress (siehe Abschnitt 3.7), ist es wichtig sie zu erwähnen. Funktionell enger eingegrenzt sind die *multidrug* / Antibiotika - Transporter (RSP_0229, RSP_0460, RSP_0461, RSP_1479, RSP_2700, RSP_3131, RSP_3250, RSP_3603, RSP_3318). Diese Gruppe von Proteinen dient der Entgiftung von antimikrobiellen Peptiden, Antibiotika und Schwermetallen (Lomovskaya und Lewis, 1992; Tanabe *et al.*, 2009). Ihre Expression erfolgt in *E. coli* wachstumsphasen - und stressabhängig (Tanabe *et al.*, 1997; Thanassi *et al.*, 1997), was eine weitere Verbindung des LOV - Proteins zur Stressantwort der Zelle herstellt. Dies gilt ebenfalls für den Häm - Transporter *hmuS*, welcher in *Yersinia pestis* für den Transport von Hämin in das Zellinnere verantwortlich ist und zudem eine Häm - Degradationsdomäne besitzt. Proteine dieser Familie werden bei Eisenmangel exprimiert (Thompson *et al.*, 1999) und stellen somit auch einen Teil einer Stressantwort dar. Interessanterweise ist eines der wenigen schwächer exprimierten Gene in der Δlov - Mutante der Eisentransporter *feoA2*, was verwunderlich ist, da hier ebenfalls eine stärkere Expression erwartet worden wäre. Zudem waren auch zwei hämolysinhomologe Proteine (RSP_3540 und RSP_1114) deutlich schwächer in der Δlov exprimiert. Es scheint daher einen Zusammenhang mit dem Eisenstoffwechsel zu geben, dessen genauer Hintergrund aber noch unklar ist. Die anderen deutlich stärker exprimierten Ionentransporter lassen sich funktionell in keine klare Gruppe einteilen.

Die nächste relativ homogen in der Δlov - Mutante stärker exprimierte Gruppe stellen am Molybdän - und Stickstoffstoffwechsel beteiligte Proteine dar (Tabelle 7). Diese lagen zwar nur zum Teil über dem gesetzten A - Wert *threshold*, waren aber in der Mutante deutlich stärker exprimiert (alle Kategorie I). Molybdän spielt vor allem eine Rolle als Cofaktor der Nitrogenase, deren Gene zum Teil auch stärker exprimiert sind. Die Expression der Nitrogenase findet in *Rhodobacter* in erster Linie bei Stickstoffmangel statt (Masepohl *et al.*, 1988). Somit scheint auch in diesem Fall eine stressbedingte Antwort vorzuliegen. Da die RNA aus Zellen in der späten exponentiellen Phase isoliert wurde, ist eine weitere Möglichkeit, dass die Expression der Nitrogenase aufgrund der hohen Zelldichte und der schlechten Nährstoffbedingungen, unabhängig von der LOV - Mutation gebildet wird. Das Fehlen des LOV - Proteins erhöht in diesem Fall durch einen sekundären Effekt die Expression der Nitrogenase - Gene und des damit assoziierten Molybdäntransports.

Nur wenige Gene sind in der Δlov - Mutante deutlich schwächer als im Wildtyp exprimiert (alle Kategorie I). Nahezu alle dieser Gene entstammen den rRNA - Genen und den ribosomalen Proteinen (Tabelle 8). Das LOV - Protein scheint damit einen starken Einfluss auf die Translation zu haben und die Bildung von neuen Ribosomen zu beeinflussen. Ein vergleichbarer, wenn auch etwas schwächerer, Effekt konnte nach Deletion des PrrA - Proteins beobachtet werden (Eraso *et al.*, 2008). Ein zunächst vermuteter Effekt durch unterschiedlich starkes *labeln* der stark strukturierten rRNA mit den Farbstoffen Cy3 bzw. Cy5 kann ausgeschlossen werden, da für die PrrA - Transkriptomanalyse einfarbig markierte *microarrays* verwendet wurden. Die starke Beeinflussung durch das Fehlen eines Regulatorproteins ist wahrscheinlich, da die Ribosomenzahl der Zelle stark von dem Wachstums - und Stressbedingungen abhängt. Es ist daher wahrscheinlich, dass dieser Effekt nicht durch eine direkte Beeinflussung der Translation durch das LOV - Protein verursacht wird, sondern eine sekundäre Folge der Regulation durch das Protein ist.

4.6.5 Einfluss von LOV auf die Expression von sRNAs

Neben der direkten Beeinflussung der Transkription durch Transkriptionsfaktoren ist in den letzten Jahren die posttranskriptionale Beeinflussung der Genexpression durch sRNAs in den Vordergrund des Interesses getreten (Waters und Storz, 2009). Insgesamt befanden sich Sonden gegen 122 sRNAs auf dem *microarray*, die zuvor mittels 454 - *pyrosequencing* sRNAs in *R. sphaeroides* identifiziert wurden und nach (photo)oxidativem Stress besonders abundant in den Zellen sind (Berghoff *et al.*, 2009). Von diesen sind fast ein Viertel differenziell in der Δlov - Mutante stärker oder schwächer als im Wildtyp exprimiert (Tabelle 9). Zudem befinden sich unter den sRNAs die am stärksten exprimierten Transkripte überhaupt (Tabelle 10). Da für einen Großteil dieser sRNAs weder die Funktion noch die Ziel - RNA bekannt ist, beschränkt sich diese Diskussion auf die sRNAs mit einer beschriebenen Regulation. Die Ziel - mRNAs sind auch für diese sRNAs noch unbekannt.

Hier ist vor allem die am zweitstärksten höher exprimierte RSs_0019 interessant. Diese wird σ^E - abhängig exprimiert (Berghoff *et al.*, 2009) und zeigt, wie die in 3.6.4 beschriebenen Gene, eine deutlich stärkere Expression. Ein vergleichbarer Effekt konnte für die singulett-sauerstoffabhängig exprimierte RSs_0680a festgestellt werden (Berghoff *et al.*, 2009), welche auch in der Mutante höher exprimiert ist. Gleichzeitig ist die singulett-sauerstoffabhängig prozessierte sRNA RSs0682 (Berghoff *et al.*, 2009) deutlich schwächer exprimiert. Dies alles sind weitere Bestätigungen, dass das LOV - Protein und die σ^E - Antwort im Zusammenhang gesehen werden müssen. Einen Zusammenhang zwischen der stärkeren Expression eines Teils der Gene des Photosyntheseapparates lässt sich über die kleine RSs2430 herstellen. Deren Beteiligung an der Regulation des Photosyntheseapparates konnte nachgewiesen werden und eine Überexpression führte zu einer Reduktion der gebildeten Photosynthesekomplexe (Mank, 2009). Widersprüchlich ist jedoch, dass die höhere Expression der kleinen RNA mit einer höheren Expression eines Teils des Photosyntheseapparates (LHCII) zusammenfällt. Hier wäre es möglich, dass die kleine RNA die Translation der gebildeten mRNAs verhindert und so keine pigmentbindenden Proteine gebildet werden.

Zusammenfassend kann aus dem Vergleich der Transkriptomanalysen des Wildtyps 2.4.1 und der Mutante Δlov geschlossen werden, dass das LOV - Protein eher eine reprimierende Wirkung auf die Genexpression hat, und dass die Deletion des Proteins zu einer höheren Expression von einer großen Zahl von Genen führt. So sind ein Teil der Photosynthesegene und die mit deren Regulation assoziierte RSs_2430 stärker in der Mutante exprimiert. Weiterhin ist ein großer Teil der Gene des σ^E - Regulons deutlich stärker exprimiert und die damit assoziierten sRNAs RSs_0019, RSs_0680 und RSs_0682 werden ebenfalls σ^E - abhängig reguliert. Es konnte allerdings nicht gezeigt werden, dass das Fehlen des LOV - Proteins einen Einfluss auf die Resistenz gegen Singulett-sauerstoff oder die Induktion der σ^E - Antwort hat. Weitere Gene scheinen vor allem auf Eisen - und Stickstoffaufnahme bzw. -transport oder dem Kohlenhydratstoffwechsel anzugehören. Die schwächer exprimierten Gene fallen fast alle in die Gruppe der ribosomalen Proteine und Gene. Alle diese Faktoren scheinen eine Beteiligung des

LOV - Proteins an der Stressantwort der Zelle zu unterstützen, wobei der genaue auslösende Faktor noch unbekannt ist.

4.7 Vergleich der Transkriptome von *R. sphaeroides* 2.4.1 und Δlov nach Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress

Der Vergleich der Transkriptome unter mikroaeroben Bedingungen lieferte erste Daten über differenziell exprimierte Gene in der Δlov - Mutante. Um eine genauere Funktion des Blaulichtrezeptors einzugrenzen, wurde für die nächsten *microarrays* RNA aus blaulichtbestrahlten Zellen verwendet. Da die Genexpression des σ^E - Regulons scheinbar stark durch die Wirkung des LOV - Proteins beeinflusst wird, wurde zudem RNA aus Zellen nach photooxidativem Stress isoliert und für die Transkriptomanalyse verwendet.

4.7.1 Allgemeine Übersicht über die Transkriptomanalyse

Der Vergleich der differenziell exprimierten Gene nach Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress (Abbildung 68) zeigt, dass 446 (10,20 %) Transkripte nach Singulett-Sauerstoffstress und 305 (6,98 %) Transkripte nach Blaulichtbestrahlung differenziell exprimiert sind (Kategorie I). Unter beiden Bedingungen sind in der Δlov - Mutante wieder deutlich mehr Gene höher exprimiert als im Wildtyp, was eine mögliche Rolle des Proteins als Repressor stützt. Es sind größere Unterschiede sichtbar als unter einfachem, mikroaerobem Wachstum, was nicht verwunderlich ist, da eine stärkere Genantwort auf Blaulicht und photooxidativen Stress, im Vergleich zu einfachem Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen, erwartet werden kann. In einer früheren Studie wurde bereits das Transkriptom des Wildtyps 2.4.1 nach Blaulichtbestrahlung untersucht (Braatsch *et al.*, 2004). Dabei wurde nur eine relative geringe Zahl (110) an durch Blaulicht beeinflussten Transkripten nachgewiesen (Ratio ≥ 2). Unter diesen Genen befand sich ein großer Teil des σ^E - Regulons (Braatsch *et al.*, 2004), was eine Verbindung zum LOV - Protein herstellen könnte. Die Bestrahlung war dabei mit 45 min etwas kürzer und die Lichtintensität mit $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nur halb so hoch wie die in dieser Arbeit verwendete, weshalb diese Daten nicht vollständig übertragbar sind. Da für diese Arbeit Wildtyp und Δlov - Mutante nach Blaulichtbestrahlung verglichen wurden, ist es wahrscheinlich, dass die große Beeinflussung dieser Gene, durch den direkten oder indirekten Einfluss des LOV - Proteins verursacht wurde. Für photooxidativen Stress existiert bisher noch keine veröffentlichte Transkriptomanalyse im Wildtyp. Vergleicht man die Daten jedoch mit dem Transkriptom nach 7 min Peroxidstress (Zeller, 2005), sind dort 377 (8,8 %) der Gene differenziell exprimiert (Ratio ≥ 2). Für die Singulett-Sauerstoffexperimente wurde ebenfalls die Δlov - Mutante mit dem Wildtyp verglichen, weshalb alle sichtbaren Effekte durch direkten oder indirekten Einfluss des LOV - Proteins verursacht werden sollten. Die erhaltenen *microarray* - Daten wurden für einige beispielhafte Gene verifiziert (Abbildung 70) und es konnte gezeigt werden, dass in der *real time* RT - PCR vergleichbare Unterschiede in der Expression zwischen Mutante und Wildtyp feststellbar waren.

Singulett-Sauerstoffstress beeinflusst die Expression von mehr sRNAs als Blaulichtbestrahlung (Abbildung 69). So zeigen 20 (13,88 %) der auf dem *microarray* verwendeten 144 sRNAs, nach Blaulicht eine deutlich veränderte Expression, während nach Singulett-Sauerstoffstress 32 (22,22 %) in der Δlov -Mutante differenziell exprimiert sind. Damit sind nach Blaulichtbestrahlung und nach mikroaerobem Wachstum (12,58 %) eine vergleichbare Zahl an sRNAs durch die LOV-Deletion betroffen und durch Singulett-Sauerstoff fast die doppelte Menge. Dies spricht erneut für eine Beeinflussung der Singulett-Sauerstoffantwort durch das LOV-Protein. Auffällig war zudem die Verteilung von stärker und schwächer in der Δlov -Mutante exprimierten Genen. Während nach mikroaerobem Wachstum fast alle sRNAs stärker in der Mutante exprimiert sind, ist das Verhältnis nach Blaulichtbestrahlung und Singulett-Sauerstoff ausgeglichen und es werden sogar etwas mehr sRNAs schwächer exprimiert.

4.7.2 Unter allen Versuchsbedingungen beeinflusste Gene

Ein Vergleich der differenziell exprimierter Gene zeigt, dass etwa 10 % (Kategorie I) unter allen Bedingungen (mikroaerobes Wachstum, Singulett-Sauerstoffstress, Blaulichtbestrahlung) einen vergleichbaren Unterschied in der Expression ihrer Gene zeigen.

Diese Gene sind in der Δlov -Mutante unabhängig von den Versuchsbedingungen, differenziell exprimiert (Tabelle 11). In dieser Gruppe kann eine große Anzahl von Proteinen des Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsels nachgewiesen werden. Diese sind in der LOV-Mutante, mit Ausnahme eines Operons, immer deutlich stärker exprimiert. Mit RSP_3501, RSP_0941, RSP_2701, RSP_3948 und RSP_3943 ist ein großer Teil dieser Proteine wieder am Import und Export von Kohlenhydraten beteiligt, wobei RSP_0941 ebenfalls als Nitrattransporter fungieren kann und so wieder eine Verbindung zum Stickstoffwechsel herstellt. Neben den Transportern sind mit RSP_3533, RSP_3267 auch Gene der Aminosäuresynthese in dieser Gruppe zu finden. Ein unter allen Bedingungen schwächer exprimiertes Operon war das des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes von *R. sphaeroides* (RSP_4047 - 4050). Durch seine Rolle bei der Verbindung der Glykolyse mit dem Citratzyklus ist dieser Thiamin (Vitamin B₁)-abhängige Komplex einer der zentralsten im zellulären Energiestoffwechsel. Da nur dieses Protein deutlich schwächer in der Mutante exprimiert wird, kann vermutet werden, dass das LOV-Protein den Eintritt von Kohlenhydraten in den Citratzyklus fördert. Vor dem Hintergrund der schwächeren Expression der Pyruvat-Dehydrogenase ist interessant, dass, mit RSP_1392 - 1393, RSP_0647 - 0648 und RSP_6135, Gene der Thiaminbiosynthese, sowie Thiamintransporter stärker in der Mutante exprimiert werden, wobei sie aufgrund des knapp unter 12 gelegenen A-Wertes nicht in Tabelle 11 auftauchen. Einer der Hauptfaktoren der Regulation des stickstoffhaltigen Thiamins ist die Verfügbarkeit freier Stickstoffquellen (Begley *et al.*, 1999). Somit scheint auch hier eine Verbindung des LOV-Proteins zum Stickstoffwechsel zu existieren.

Die Gene des LHC II (*pucBAC*, *puc2BA*) sind ebenfalls unter allen Bedingungen deutlich stärker in der Mutante exprimiert. Weder in früheren Gesamtzellabsorptionsspektren (Hendrischk, 2009) noch in eigenen Beobachtungen (Abbildung 62) konnte diese Veränderung aber anhand eines spezifischen Anstiegs der *peaks* bei 800 bzw. 850 nm beobachtet werden. Hierbei muss vermutet werden, dass die höhere Expression auf mRNA-Ebene nicht in tatsächlich gebildete Photosynthesekomplexe umgesetzt wird.

Die größte Gruppe der schwächer exprimierten Gene bilden wieder die an der Translation beteiligten Gene der ribosomalen Proteine und rRNAs, wobei die ribosomalen Gene stärker durch Blaulicht und photooxidativen Stress betroffen sind. Hier könnte erneut ein genereller stressabhängiger Rückgang der Translation verantwortlich sein, der durch das Fehlen des LOV - Proteins noch vergrößert wird.

4.7.3 Durch Blaulichtbestrahlung und photooxidativen Stress beeinflusste Gene

Die Mehrheit der nach Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress differenziell exprimierten Gene zeigt eine große Übereinstimmung (60 - 70 %). Dabei ist vor allem interessant, dass fast alle vergleichbar exprimierten Gene unter Blaulicht eine stärkere Veränderung zeigen als unter photooxidativem Stress (Tabelle 12). Die große Übereinstimmung lässt sich wahrscheinlich auf den Blaulichtanteil des weißen Starklichts bei der Belichtung der Singulett-Sauerstoffkulturen zurückführen. Diese erhalten anteilig etwa genau die gleiche Menge an Blaulicht ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) wie die Kulturen im Blaulichtexperiment. Somit scheinen alle Effekte in dieser Kategorie in erster Linie blaulichtabhängig zu sein. Dass die Expressionsänderungen unter Blaulicht stärker sind, ist ein deutlicher Hinweis, dass die semiaeroben Bedingungen dieses Experiments den Effekt der LOV - Deletion verstärken.

Die größte Gruppe vergleichbar exprimierter Gene stellen die tRNAs. Alle Gene in der Gruppe zeigen, wie schon die ribosomalen Gene und Proteine, eine deutlich schwächer Expression in der Mutante.

Die zweitgrößte Gruppe differenziell exprimierter Gene entstammt der Chemotaxis und der Flagellensynthese. Diese Gene sind zum Teil stärker und zum Teil schwächer exprimiert. Sie liegen fast alle in direkter Folge (Flagelle Klasse III) auf dem Chromosom und werden normalerweise abhängig vom Sigmafaktor RpoN2 (RSP_0068) reguliert (*flgBCDEFGHIJKL*, *fleTQ*, *fliCD*) (Pena-Sanchez *et al.*, 2009). Dieser Sigmafaktor gehört zur Gruppe der σ^{54} - Faktoren und wird auf noch unbekannte Weise reguliert. Da die Gene eine sehr ungleichmäßige Expression zeigen, ist eine Aussage über eine mögliche Regulation durch LOV schwierig. Der stark zu RpoN2 homologe Sigmafaktor RpoN (RSP_0527) ist der Hauptregulator des Stickstoffstoffwechsels in *Rhodobacter sphaeroides* und auch in der Δlov - Mutante deutlich stärker exprimiert, wobei sein unter 12 liegender A - Wert diese Aussage wenig zuverlässig macht.

Die nächste große Gruppe stellen Metallionentransporter dar. Dabei sind Fe^{2+} , Mn^{2+} und Zn^{2+} - Transporter betroffen. Interessant sind vor allem das *sit* - und das nahe verwandte *znu* - Operon, welches in *E. coli*, neben seinen Transporteigenschaften, die Resistenz gegen oxidativen Stress und antibakterielle Substanzen erhöht (Glavinas *et al.*, 2004; Sabri *et al.*, 2006).

In der Mutante ebenfalls deutlich höher exprimiert ist ein Teil der Gene der Vitamin B12 - Synthese. Nicht alle Gene sind betroffen. Diese Gene codieren die Proteine der Porphyrinsynthese, welches als Vorläufer für Häm und Bacteriochlorophyll dient. Oxidativer Stress führt oft zur Schädigung von Eisen - Schwefel - Proteinen, Häm - Proteinen und Bacteriochlorophyllmolekülen (Imlay, 2003). Die höhere Expression könnte zum Ausgleich dieses Verlustes dienen. Gleichzeitig könnte sie aber auch für die Bereitstellung von genügend Bacteriochlorophyllmolekülen, für die ebenfalls erhöht exprimierte Gene des Lichtsammelkomplexes II sorgen.

Die Gruppe der Transkriptionsfaktoren beinhaltet zugleich die am stärksten differenziell exprimierten Gene. Zwei der stärker differenziell exprimierten Proteine (RSP_1441, RSP_1925) gehören zur Gruppe der GntR - Transkriptionsregulatoren (Haydon und Guest, 1991), wobei RSP_1441 eine NagC Domäne (Plumbridge, 1995; Plumbridge, 2001) besitzt, die sowohl als Transkriptionsregulator, als auch als Zuckerkinase fungieren kann und eine Rolle beim Kohlenhydrattransport spielt. RSP_1925 dagegen besitzt eine FCD (*FadR C-terminal domain*) - Domäne, welche eine hohe Homologie zum Galactonat Repressor NatR und dem Acetyl - CoA bindenden FadR in *E. coli* besitzt. Die FCD - Domäne bindet dabei das Kohlenhydrat und leitet das Signal an die GntR - Domäne weiter. FadR spielt ebenfalls eine Rolle beim Kohlenhydrattransport und der Fettsäuresynthese (van Aalten *et al.*, 2000). RSP_4038 und RSP_0457 lassen sich in die Gruppe der DeoR - Transkriptionsregulatoren einordnen. Beide Proteine besitzen eine GntR - DNA - Bindedomäne und eine GlpR - Domäne. Die GlpR - Domäne (Dandanell *et al.*, 1991; Boyd *et al.*, 2000) ist in *E. coli* in einer Vielzahl von Kohlenhydratstoffwechselregulatoren vorhanden. RSP_4038 und RSP_0457 besitzen zudem beide eine N-terminale Zuckerisomerase - Domäne (Peri *et al.*, 1990), welche eine hohe Homologie zum *E. coli* NagB - Protein besitzt, welches eine Rolle als Glucosamin - 6 - Phosphat - Isomerase / Deaminase spielt und somit für die Zellwandsynthese benötigt wird.

Bei dem sehr deutlich stärker exprimierten RSP_2965 handelt es sich um einen LysR - Transkriptionsregulator. Als DNA - Bindedomäne dient RSP_2965 erneut eine N - terminale GntR - Bindedomäne, während die C - terminale LysR - Domäne eine hohe Homologie zu periplasmatischen Bindeproteinen besitzt. Diese Gruppe ist vor allem am Molybdän - (Self *et al.*, 2001), Eisen - (Taboy *et al.*, 2001) und Phosphattransport (Qi *et al.*, 1997) über die Zellmembran beteiligt. Das deutlich schwächer hochregulierte TetR - Homolog RSP_1486 besitzt dagegen nur schwache Homologien zu bekannten Proteinen.

Das nur wenig stärker exprimierte RSP_4257 besitzt sowohl eine N - terminale transmembrane Permease - Domäne (Karatza und Frillingos, 2005), welche es als Transporter auszeichnet, als auch eine C - terminale STAS (*sulphate transporter and antisigma factor antagonist*) - SulP - Domäne (Aravind und Koonin, 2000), welche durch ihre Rolle als Anti - Sigma - Faktor - Antagonist, neben ihrer Transport - Funktion an der Membran, ebenfalls an der Regulation des transmembranen Flusses von negativ geladenen Molekülen beteiligt ist und eine Rolle in der Stressantwort auf osmotischen Stress spielen. Ein interessanter Zusammenhang ist zudem, dass das YtvA - Protein von *Bacillus subtilis*, welches als blaulichabhängiger Aktivator der σ^B - abhängigen generellen Stressantwort wirkt, sich aus einer LOV - und einer STAS - Domäne zusammensetzt (Avila-Perez *et al.*, 2006), die im Zuge der Signaltransduktion miteinander interagieren (Avila-Perez *et al.*, 2009).

Das letzte Protein RSP_3188, welches wieder einen stärkeren Anstieg in Relation zum Wildtyp in der Mutante zeigte, ist homolog zur Gruppe der ApbE - Proteine. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von periplasmatischen Lipoproteinen, welche in *Salmonella* an der Thiamin - Synthese beteiligt sind (Beck und Downs, 1998), was wiederum eine Verbindung zur erhöhten Expression der Thiamin - Synthese - Gene herstellt. Weiterhin ist an diesem Protein die N-terminale Domäne interessant, welche homolog zur RseC Domäne in *E. coli* ist. Dort dient das Protein als starker positiver Regulator der σ^E - Aktivität bei Membranstress (Missiakas *et al.*,

1997). In *R. capsulatus* konnte für diese Domäne außerdem ein Zusammenhang mit der Regulation der Fixierung von molekularem Stickstoff hergestellt werden (Schmehl *et al.*, 1993).

Die in der Mutante höher exprimierten Transkriptionsfaktoren stellen weitere Verbindungen des LOV-Proteins zum Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel und -transport her. Dies wird noch deutlicher, wenn man die enorm große Anzahl an Genen unterhalb eines A-Wertes von 12 betrachtet, die ebenfalls zu diesen Gruppen gehören und deutlich stärker in der Mutante exprimiert werden. Neben den Genen der RuBisCO, sind über 20 Zucker- und Aminosäuretransporter und fast genauso viele Gene der Zucker- und Aminosäuresynthese betroffen. Diese stellen damit die bei weitem größte Gruppe unter den differenziell exprimierten Genen dar und werfen die Frage auf, ob die mit der Kapselbiosynthese in Verbindung gebrachte Interaktion des Proteins mit einem Zuckertransporter nicht eher einer anderen Funktion dient. Nur ein kleiner Teil der Transporter dient dem Transport langkettiger Kapselzucker, wie z.B. Maltodextran und Alginate, während ein Großteil Einfachzucker (vor allem Ribose, Galaktose, Maltose und Arabinose) transportiert. Interessanterweise ist die im *Yeast - Two - Hybrid - System* identifizierte Zucker - Phosphat - Isomerase GutQ (RSP_1153) unter keiner der Bedingungen in der Mutante schwächer oder stärker exprimiert. Da gleichzeitig die Gene der Aminosäuresynthese und des -transports stärker exprimiert werden, scheint es, dass das LOV-Protein einen reprimierenden Effekt auf die grundlegende Aufnahme und Synthese von Zucker und Aminosäuren hat. Dies wird durch die stärkere Expression einer großen Zahl von am Zuckertransport beteiligter Transkriptionsfaktoren noch untermauert.

4.7.4 Nur durch Blaulichtbestrahlung beeinflusste Gene

Nur wenige Gene sind ausschließlich unter Blaulicht differenziell in der Mutante exprimiert (Tabelle 13). Aufgrund der starken Überlappung der Blaulichtintensität in den Experimenten mit Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress kann davon ausgegangen werden, dass in dieser Gruppe vor allem Gene zu finden sind, die spezifisch auf die semiaeroben Bedingungen reagieren. In dieser Gruppe sind erneut viele höher exprimierte Gene des Kohlenhydratstoffwechsels zu finden. Zudem ist mit einer stärker exprimierten Sensor - Kinase (RSP_2129) wieder ein Protein des Kohlenhydrattransportes vertreten. Diese Kinase zeigt eine hohe Homologie zu an der Regulation des C4 - Dicarboxylat - Transports beteiligten Kinasen aus anderen Proteobakterien (*NCBI conserved domain* : COG4191) und spielt somit ebenfalls eine Rolle beim Transport von Kohlenhydratverbindungen.

Interessant ist das Auftreten zweier an der Cytochrom - Synthese beteiligter Gene (RSP_1826, RSP_2785). Eines dieser Gene ist RSP_2785 (*cycF*), welches das Cytochrom c_{554} codiert. Dieses Cytochrom wird nach einem *shift* von niedrigem zu hohem Sauerstoffpartialdruck (ab 30 %) verstärkt exprimiert und ist unter aeroben Bedingungen eines der abundantesten Cytochrome in der Zelle (Bartsch *et al.*, 1989; Flory und Donohue, 1995). Die Regulation scheint zum Teil durch das FnrL - Protein zu erfolgen (Flory und Donohue, 1997). Dieses Cytochrom ist ein bedeutender Elektronenüberträger in der aeroben Atmung und es scheint, dass das LOV-Protein auch dessen Synthese reduziert. Warum die veränderte Expression dieses Gens unter den aeroben Bedingungen der Stressexperimente nicht erscheint, ist unklar.

4.7.5 Nur durch photooxidativen Stress beeinflusste Gene

Die ausschließlich unter photooxidativem Stress beeinflussten Gene lassen sich alle in relativ klare Gruppen einteilen, die in der Δlov - Mutante deutlich schwächer exprimiert sind (Tabelle 14). Aufgrund der starken Überlappung der Blaulichtintensität in den Experimenten von Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress kann hier davon ausgegangen werden, dass die sichtbaren Effekte durch das Fehlen des LOV - Proteins eher auf Singulett-Sauerstoffstress als auf einen lichtabhängigen Effekt zurückzuführen sind. Den größten Anteil bilden die TRAP - Transporter. Diese ATP - unabhängigen Transporter sind alle in der Δlov - Mutante deutlich schwächer exprimiert. Drei der durch die *microarrays* identifizierten Gene (RSP_0912 - 0910) gehören zu einem gut untersuchten Operon (Forward *et al.*, 1997; Rabus *et al.*, 1999), welches am ATP - unabhängigen Transport von C4 - Dicarboxylaten (Malat, Succinat und Fumarat) beteiligt ist. Das ebenfalls schwächer exprimierte RSP_0097 konnte als periplasmatischer Kohlenhydrattransporter mit einer Spezifität für Mannitol und Sorbitol identifiziert werden. Die drei verbleibenden Gene RSP_1613, RSP_1418 und RSP_1420 konnten der Gruppe der Tricarboxylat - Transporter (z.B. Citrat) zugeordnet werden. Die Zuordnung aller Proteine zum Kohlenhydrattransport bestätigt erneut eine Beteiligung des LOV - Proteins an dessen Regulation. Warum diese so spezifisch durch Singulett-Sauerstoff reguliert werden und warum, im Gegensatz zu allen anderen Zuckertransportern, die Expression scheinbar durch das Vorhandensein des LOV - Proteins gefördert wird, ist unklar.

In der LOV - Mutante deutlich schwächer ist weiterhin die Expression des Kohlenstoffmonooxid - Dehydrogenase - Operons (*cox*). Dieser molybdänabhängige Proteinkomplex ist am C1 - Stoffwechsel beteiligt und besitzt zudem eine starke Homologie zu Aldehyd - Dehydrogenasen (*NCBI conserved domain* : Ald_Xan_dh_C2). In *Roseobacter denitrificans*, der keine RuBisCO besitzt, dient dieser Komplex der Fixierung von Kohlenstoff, durch die Oxidation von CO zu CO₂ (Tang *et al.*, 2010). Das CO₂ wird anschließend direkt an Phosphoenolpyruvat angelagert und so Oxalacetat gebildet, welches in den Citrat - Zyklus eingespeist werden kann (Swingley *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2010). Inwiefern diese Reaktion in *R. sphaeroides* von Bedeutung sein könnte, ist noch unbekannt. Hier ist jedoch unklar, warum das LOV - Protein die Expression dieses Operons so spezifisch unter Singulett-Sauerstoffstress erhöht.

Die letzte große Gruppe bilden die Kälteschockproteine. Diese Proteine binden einzelsträngige RNA und DNA nach einem plötzlichen Abfall der Temperatur und erleichtern die ribosomale Bindung und die Translation und beschleunigen die mRNA Degradeation (Ermolenko und Makhatadze, 2002). Ihre Regulation ist vor allem posttranskriptional. In *Rhodobacter capsulatus* wird die Translation der *cspA* - RNA nur bei niedrigen Temperaturen (15°C) eingeleitet, während bei hohen Temperaturen eine Degradeation durch RNase E erfolgt. (Jäger *et al.*, 2004). In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass diese Proteine nicht nur bei Kälteschock exprimiert werden. So scheint die Verfügbarkeit von Glukose und die Wachstumsphase eine Rolle bei der Expression einiger Kälteschockproteine zu spielen (Yamanaka und Inouye, 1997). Die schwächere Expression in der LOV - Mutante unter Singulett-Sauerstoffstress weist wieder in Richtung einer Beteiligung des LOV - Proteins an der zellulären Stressantwort, wobei, wie bei

allen ausschließlich durch Singulett-Sauerstoff exprimierten Genen fraglich ist, warum die Expression durch den scheinbaren Repressor LOV positiv beeinflusst wird.

4.7.6 Nur durch mikroaerobes Wachstum beeinflusste Gene

Vergleicht man die Daten der Transkriptomanalysen nach Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress mit den Daten des ersten *microarrays* nach mikroaerobem Wachstum (Tabelle 15), fällt auf, dass die stärkere Expression der Gene des σ^E -Regulons unter diesen Bedingungen nicht mehr sichtbar ist. Dies gilt sowohl für den Sigmafaktor, als auch für alle von ihm abhängigen Gene. Betrachtet man die Rohfluoreszenzwerte der Gene *rpoE* / *chrR*, zeigt sich, dass es zwar zu einer drastischen Induktion der σ^E -Antwort von 5.000 - 10.000 unter mikroaerobem Wachstum / Blaulichtbestrahlung, auf über 60.000 unter photooxidativem Stress kommt, diese sich aber nicht zwischen Wildtyp 2.4.1 und Δlov -Mutante unterscheidet. Unter Blaulichtbestrahlung ist ebenfalls kein Unterschied in der Rohfluoreszenz zwischen Wildtyp 2.4.1 und der Mutante sichtbar. Hier muss vermutet werden, dass der reprimierende Effekt, den das LOV-Protein auf die σ^E -Antwort unter mikroaeroben Bedingungen besitzt, dort durch den niedrigen Sauerstoffpartialdruck und / oder das Fehlen von Licht verursacht wird. Die Bestrahlung mit Blaulicht unter semiaeroben / aeroben Bedingungen hebt diese Repression auf und so ist dort kein Unterschied mehr sichtbar. Dies bestätigt die Beobachtungen, dass das LOV-Protein nicht generell in die σ^E -Antwort involviert ist, sondern nur eine beeinflussende Wirkung auf diese hat.

Auch die Gene der Molybdäntransporter und -cofaktorsynthese sind nur unter mikroaeroben Bedingungen deutlich stärker exprimiert, während unter anderen Bedingungen fast keine Expression stattfindet. Das gleiche gilt für die Gene des *nif*-Operons, welches die Nitrogenase codiert. Durch die hohe Sauerstoffempfindlichkeit dieses Proteins ist es nicht verwunderlich, dass die generelle Expression der Gene (bzw. der A-Wert) unter semiaeroben und aeroben Bedingungen zu niedrig ist, um eine verlässliche Aussage zu machen. Lässt man den A-Wert jedoch außer Acht, fallen fast alle Gene des *nif*-Operons in Kategorie I und II, wobei sie auch hier deutlich stärker in der LOV-Mutante exprimiert sind. Dies bestärkt erneut die Rolle von LOV in der Regulation der Aminosäuresynthese bzw. Aufnahme von Stickstoff.

Die letzte Gruppe von nur unter mikroaeroben Bedingungen differenziell exprimierten Genen stellen hämbezogene Gene dar. In dieser Gruppe befinden sich das in der Mutante am stärksten höher exprimierte Cytochrom *b₅₆₂* und das am stärksten schwächer exprimierte RTX-Toxin. Die Beeinflussung der Expression findet also vor allem unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen statt. Es ist wahrscheinlich, dass die Expression unter diesen Bedingungen am stärksten ist, da Cytochrom *b₅₆₂* ein integraler Bestandteil des photosynthetischen Elektronentransports in *R. sphaeroides* ist (Iba et al., 1987). Dafür spricht auch, dass die Expression unter Blaulichtbestrahlung, wo durch die semiaeroben Bedingungen bereits die Expression des Photosyntheseapparates einsetzt, in der Mutante höhere Expressionslevel, als nach photooxidativem Stress sichtbar sind. Hier ist wieder eine Beeinflussung der Photosyntheseexpression durch das LOV-Protein nachweisbar. Die fehlende Expressionssteigerung der Häm-Transporter könnte auch durch die Wachstumsphase begründet sein, da die Zellen unter mikroaeroben Bedingungen, aufgrund ihrer hohen OD,

vielleicht bereits mit Eisenmangel zu kämpfen haben und diese Gene daher verstärkt exprimieren. Dies lässt wieder auf einen Zusammenhang zwischen der Reaktion auf Nährstoffmangel und dem LOV - Protein schließen.

4.7.7 Einfluss von Blaulicht und photooxidativem Stress auf die sRNA Expression

Die Expression der sRNAs unter den verschiedenen Bedingungen ist zum Teil sehr unterschiedlich (Tabelle 16). Auffällig ist die Expression der an der Regulation der Photosynthesegegenexpression beteiligten RSs_2430. Diese wird unter mikroaeroben Bedingungen deutlich höher exprimiert, während nach Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress eine Reduktion in der Δlov zu beobachten ist. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund interessant, dass die Gene des Lichtsammelkomplexes II unter allen Bedingungen stärker exprimiert sind. Scheinbar beeinflusst LOV die Expression der sRNA nur bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck als Repressor und ein höherer Sauerstoffpartialdruck, bzw. die Belichtung mit Blaulicht führt zu einer Wirkung als Aktivator. In der Δlov -Mutante unter allen Bedingungen schwächer exprimiert, ist die singulett-sauerstoffabhängig prozessierte sRNA RSs0682 (Berghoff *et al.*, 2009). Das LOV - Protein scheint hier unabhängig von den Bedingungen an der Regulation der Expression dieser sRNA beteiligt zu sein. Die sRNA, *antisense* zu RSP_0247, wird in der Mutante unter allen Bedingungen deutlich stärker exprimiert. Das auf dem Gegenstrang liegende Protein ist homolog zu einem Folat - Binde - Protein aus *E. coli*, welches an der Replikation des Chromosoms beteiligt zu sein scheint (Ote *et al.*, 2006). Die Homologie bezieht sich jedoch nur auf eine Domäne (*NCBI conserved domain*: TIGR03317). Eine Funktionsaussage ist daher schwierig.

Die größte Zahl an sRNAs wird nur durch Blaulicht und photooxidativen Stress differenziell exprimiert. Unter diesen befinden sich keine mit bisher bekannter Regulation. Interessant ist das hohe Auftreten von in der Mutante stärker exprimierten *antisense* - sRNAs. So liegt *antisense* zu RSP_1928 auf dem Gegenstrang einer replikativen DNA - Helikase von *R. sphaeroides* (*NCBI conserved domain*: cd00984). Weil keine anderen Gene der Replikation von der LOV - Deletion betroffen sind, ist eine Beteiligung an deren Regulation unwahrscheinlich. Die sRNAs, *antisense* zu RSP_3018 1 und *antisense* zu RSP_3018 2, liegen beide auf dem Gegenstrang des gleichen Gens, welches eine Acyl - CoA - Dehydrogenase codiert. Diese sRNA stellt einen vielversprechenden Kandidaten für weitere Untersuchungen dar, da hier wieder eine Verbindung zum Kohlenhydratmetabolismus hergestellt werden kann. Die sRNA, *antisense* zu RSP_1670, liegt auf dem Gegenstrang eines RelA - Proteins. Diese Proteine sind für die Synthese des Signalmoleküls ppGpp der *stringent response* verantwortlich. Die *stringent response* dient als Anpassung an schlechte Wachstumsbedingungen und erhöht die Stressresistenz (Wick und Egli, 2004; Traxler *et al.*, 2008). Ausgelöst wird die *stringent response* durch Kohlenhydrat - und Aminosäuremangel im Medium, was sich auffällig mit den beobachteten Effekten auf den Transport und die Synthese dieser Komponenten deckt (Wick und Egli, 2004; Traxler *et al.*, 2008). Zudem wird die Translation reduziert, was ebenfalls zu der beobachteten Veränderung passt (Wick und Egli, 2004; Traxler *et al.*, 2008). In *R. capsulatus* konnte für das RelA - Protein beobachtet werden, dass es an der Photosynthesegegenregulation beteiligt ist und die Deletion letal für das Bakterium verläuft (Masuda und Bauer, 2004). Alle diese Beobachtungen legen

nachdrücklich nahe, dass es sich bei dem LOV - Protein um einen Regulator der *stringent response* handeln könnte. Leider existierte für diese sRNA noch keine Sonde auf dem ersten *microarray*. Sollte diese dort auch deutlich stärker exprimiert in der Mutante vorliegen, sind weitere Untersuchungen dieses Zusammenhanges logisch.

Nur unter Singulett-Sauerstoff differenziell exprimiert sind die drei Kopien der sRNA RSs_0680a - c, welche singulett-Sauerstoffabhängig exprimiert wird (Berghoff *et al.*, 2009). Auffällig ist, dass die ebenfalls singulett-Sauerstoffabhängig exprimierte sRNA RSs_0019 in der Mutante nicht höher exprimiert vorliegt. Dies spricht wieder nur für eine Beeinflussung der σ^E - Antwort und für keine direkte Beteiligung des LOV - Proteins.

4.7.8 Abschließende Aussagen über eine mögliche physiologische Rolle des LOV - Proteins in *R. sphaeroides*

Nach der Durchführung der drei *microarray* - Analysen können vielversprechende Aussagen über eine mögliche Funktion des LOV - Proteins in *R. sphaeroides* gemacht werden. Das LOV - Protein hat einen reprimierenden Einfluss auf eine große Zahl von Genen des Kohlenhydratstoffwechsels und - transports. Im gleichen Maß sind Gene der Aminosäuresynthese und - des transports durch das LOV - Protein reprimiert. Die höhere Expression der Nitrogenase - Gene und des an der Regulation des Stickstoffhaushaltes beteiligten Sigmafaktors RpoN legt zudem nahe, dass die Aufnahme von Stickstoff durch die Anwesenheit des LOV - Proteins reprimiert wird. Die letzte große Gruppe von Genen, die durch das LOV - Protein reprimiert zu werden scheint, ist auf viele Arten an der Stressantwort der Zelle beteiligt. So sind unter bestimmten Bedingungen auch Gene der Singulett-Sauerstoffantwort, der Eisenmangelantwort und der generellen Antwort auf Stress durch LOV reprimiert. LOV hat des Weiteren einen positiven Einfluss auf Gene der generellen Translation. Das Fehlen des Proteins führt zu einer geringeren Transkription. Unter Blaulicht sind die sichtbaren Antworten am höchsten, was zur Funktion des Proteins als Blaulichtrezeptor passt.

All diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass das LOV - Protein als blaulichtabhängiger Repressor der *stringent response* fungiert. Die *stringent response* ist eine zelluläre Antwort auf Stickstoff - und Kohlenstoffmangel (Traxler *et al.*, 2008). Nach der vermehrten Bindung von unbeladenen tRNAs an das Ribosom (d.h. keine Aminosäure ist an die tRNA gebunden), katalysiert das Protein RelA die Umwandlung von GTP und ATP in ppGpp. Es wird vermutet, dass der *second messenger* ppGpp mit der RNA - Polymerase interagiert und so das Transkriptionsprofil mehrerer Gengruppen beeinflusst (Traxler *et al.*, 2008). Die beiden Hauptantworten sind eine Reduktion der Expression von ribosomalen Proteinen, ribosomaler RNA und der Produktion von tRNA (Traxler *et al.*, 2008). Um Energie zu sparen, wird die Translationsmaschinerie herunter gefahren. Gleichzeitig wird die Biosynthese von Aminosäuren und Kohlenhydraten stark erhöht, um eine Versorgung der Zelle wieder zu gewährleisten (Traxler *et al.*, 2008). Zudem zeigen die Zellen eine generell höhere Resistenz gegen Schwermetalle, Austrocknung und oxidativen Stress (Gentry *et al.*, 1993; Wick und Egli, 2004) und ein Teil der DNA - Reparatur wird induziert (Traxler *et al.*, 2008).

Die Übereinstimmungen der durch die LOV - Deletion betroffenen Gengruppen mit denen der *stringent response* ist enorm und, da für *R. capsulatus* bereits ein leichter Effekt auf

die Photosyntheseexpression beschrieben ist (Masuda und Bauer, 2004), was eine weitere Verbindung zu den Veränderungen der Photosyntheseexpression in der Δlov - Mutante darstellt, sind weiterführende Experimente zur Beeinflussung der *stringent response* durch LOV erforderlich. Die genauen Bedingungen, welche die vermutete Repression auslösen, sind noch unklar, doch eine Rolle von Blaulicht scheint wahrscheinlich und passt zu dem beobachteten Photozyklus des LOV - Proteins. Einfache Experimente um einen ersten Zusammenhang zwischen der *stringent response* und dem LOV - Protein zu überprüfen, wären ein Vergleich des Wachstums von Wildtyp und Δlov - Mutante in Medien, die einen künstlichen Stickstoff - bzw. Kohlenstoffmangel (z.B. D - Norvalin für Stickstoffmangel oder α - Methylglykosid für Kohlenstoffmangel) hervorrufen. Durch Bestrahlen der Kulturen mit Blaulicht könnte so auch ein möglicher Effekt durch Licht mit einbezogen werden. Sollten deutliche Wachstumsunterschiede mit und ohne das LOV - Protein festgestellt werden, könnte in weiterführenden Experimenten z.B. über Anzucht der Kulturen mit radioaktiven Phosphat und anschließender Dünnschichtchromatographie die Menge an in der Zelle gebildetem ppGpp unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Licht stellt einen bedeutenden Umweltfaktor der Photosynthesegenregulation von phototropen Organismen dar. Da es neben seiner Funktion als Energieträger auch schädlichen Einfluss haben kann, müssen phototrophe Organismen Mechanismen entwickeln, um vorhandene Lichtreize in eine Genantwort umzusetzen. Blaulichtrezeptoren stellen dabei die häufigsten Proteine zur Lichtwahrnehmung in Prokaryoten dar und erlauben es ihnen, ihre Genantwort an die Bedingungen der Außenwelt anzupassen.

In *R. sphaeroides* existieren mit dem AppA / PpsR und dem PrrB / PrrA - System bereits zwei Systeme mit einer gut charakterisierten Wirkung auf die Expression der Photosynthesegene. Kürzlich wurden mit dem Cryptochrom CryB und dem LOV - Domänen - Protein LOV zwei weitere Blaulichtrezeptoren in *R. sphaeroides* beschrieben. Während für das CryB - Protein eine Verbindung zur Regulation des Photosyntheseapparates hergestellt werden konnte, blieb die physiologische Rolle des LOV - Proteins noch unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es das Verständnis der *in vivo* - Funktion dieser Proteine in *R. sphaeroides* zu verbessern.

Durch die Analyse der Blaulichtsensitivität der BLUF - Domäne des AppA - Proteins konnte gezeigt werden, dass bereits minimale Blaulichtsintensitäten ausreichen, um die Expression der Photosynthesegene bei gleichzeitigem Vorhandensein von Licht und Sauerstoff zu verhindern. Der lichtabhängige Anstieg der Photosynthesegenexpression bei geringem Sauerstoffpartialdruck durch das PrrB / PrrA - System konnte nur durch deutlich höhere Lichtintensitäten erreicht werden. Eine durchgeführte *random* Mutagenese der BLUF - Domäne führte nicht zu neuen Erkenntnissen zur Interaktion der BLUF - Domäne von AppA mit dem C - Terminus. Dafür konnte durch zielgerichtete Mutagenese von am Photozyklus beteiligten Aminosäuren gezeigt werden, dass Tryptophan 104 trotz seiner umstrittenen Rolle im Photozyklus in *in vitro* - Experimenten, *in vivo* die Blaulichtsensitivität der BLUF - Domäne beeinflussen kann. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Basenaustausch des konservierten Tyrosin 21 immer zum Verlust der *in vivo* - Aktivität der BLUF - Domäne führt. Eine Doppelmutante führte überraschenderweise zur Wiederherstellung der *in vivo* - Aktivität der BLUF - Domäne, während *in vitro* das Protein keinen Photozyklus mehr besaß.

Zur genaueren Eingrenzung des regulatorischen Einflusses des CryB - Proteins wurde dessen Interaktion mit bereits bekannten Regulatorproteinen untersucht. Dabei konnte im *Yeast - Two - Hybrid* - System sowie in den anschließend durchgeführten *pulldown* - assays eine Interaktion von CryB mit dem redox - sensitiven C - Terminus von AppA nachgewiesen werden. Die Interaktion von AppA mit PpsR wurde jedoch in Gel - Retardations - assays nicht durch die Anwesenheit von CryB beeinflusst. Für das LOV - und das CryB - Protein konnte im *Yeast - Two - Hybrid* - System zudem eine Interaktion mit Kapselpolysaccharidtransportern nachgewiesen werden. Es konnte jedoch keine Kapselbildung in den verwendeten *R. sphaeroides* - Stämmen gezeigt werden.

Um die bisher völlig unbekanntes physiologische Rolle des LOV - Proteins zu untersuchen, wurde ein *microarray* - Transkriptomchip von *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 erstellt. Mit diesem wurde nach im Wildtyp 2.4.1 und der Δlov - Mutante differenziell exprimierten Genen, nach mikroaerobem Wachstum, Blaulichtbestrahlung und photooxidativem Stress, gesucht. In den Transkriptomanalysen konnten dabei eine große Zahl von Genen des Kohlenhydrat - und

Aminosäurestoffwechsels und - transports, sowie der generellen Stressantwort identifiziert werden, welche durch den Einfluss des LOV - Proteins reprimiert werden. Gleichzeitig führte das Fehlen des LOV - Proteins zur Verringerung der Expression von Genen der Translation. Aus diesen Beobachtungen kann eine mögliche Beteiligung von LOV an der Regulation der *stringent response* gemutmaßt werden, deren Bestätigung jedoch noch weitere Untersuchungen erfordert.

6. Referenzen

- Ahmad, M. and A. R. Cashmore (1993).** "HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor." *Nature* **366**(6451): 162-6.
- Anderson, S., V. Dragnea, S. Masuda, J. Ybe, K. Moffat and C. Bauer (2005).** "Structure of a novel photoreceptor, the BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*." *Biochemistry* **44**(22): 7998-8005.
- Anthony, J. R., K. L. Warczak and T. J. Donohue (2005).** "A transcriptional response to singlet oxygen, a toxic byproduct of photosynthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(18): 6502-7.
- Aravind, L. and E. V. Koonin (2000).** "The STAS domain - a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists." *Curr Biol* **10**(2): R53-5.
- Aslund, F. and J. Beckwith (1999).** "The thioredoxin superfamily: redundancy, specificity, and gray-area genomics." *J Bacteriol* **181**(5): 1375-9.
- Avila-Perez, M., K. J. Hellingwerf and R. Kort (2006).** "Blue light activates the sigmaB-dependent stress response of *Bacillus subtilis* via YtvA." *J Bacteriol* **188**(17): 6411-4.
- Avila-Perez, M., J. Vreede, Y. Tang, O. Bende, A. Losi, W. Gartner and K. Hellingwerf (2009).** "In vivo mutational analysis of YtvA from *Bacillus subtilis*: mechanism of light activation of the general stress response." *J Biol Chem* **284**(37): 24958-64.
- Bartsch, R. G., R. P. Ambler, T. E. Meyer and M. A. Cusanovich (1989).** "Effect of aerobic growth conditions on the soluble cytochrome content of the purple phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*: induction of cytochrome c554." *Arch Biochem Biophys* **271**(2): 433-40.
- Bateman, A. (1997).** "The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein." *Trends Biochem Sci* **22**(1): 12-3.
- Bauer, C. E., J. J. Buggy, Z. M. Yang and B. L. Marrs (1991).** "The superoperonal organization of genes for pigment biosynthesis and reaction center proteins is a conserved feature in *Rhodobacter capsulatus*: analysis of overlapping bchB and puhA transcripts." *Mol Gen Genet* **228**(3): 433-44.
- Beck, B. J. and D. M. Downs (1998).** "The apbE gene encodes a lipoprotein involved in thiamine synthesis in *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* **180**(4): 885-91.
- Becker, S., G. Holighaus, T. Gabrielczyk and G. Unden (1996).** "O₂ as the regulatory signal for FNR-dependent gene regulation in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **178**(15): 4515-21.
- Beckman, J. S. and W. H. Koppenol (1996).** "Nitric oxide, superoxide, and peroxyxynitrite: the good, the bad, and ugly." *Am J Physiol* **271**(5 Pt 1): C1424-37.
- Begley, T. P., D. M. Downs, S. E. Ealick, F. W. McLafferty, A. P. Van Loon, S. Taylor, N. Campobasso, H. J. Chiu, C. Kinsland, J. J. Reddick and J. Xi (1999).** "Thiamin biosynthesis in prokaryotes." *Arch Microbiol* **171**(5): 293-300.
- Berghoff, B. A., J. Glaeser, C. M. Sharma, J. Vogel and G. Klug (2009).** "Photooxidative stress-induced and abundant small RNAs in *Rhodobacter sphaeroides*." *Mol Microbiol* **74**(6): 1497-512.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979).** "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-23.
- Borland, C. F., D. J. McGarvey, A. R. Morgan and T. G. Truscott (1988).** "Laser flash photolysis of purpurins: novel potential photosensitizers of interest in photodynamic therapy." *J Photochem Photobiol B* **2**(4): 427-34.
- Borland, C. F., D. J. McGarvey, T. G. Truscott, R. J. Cogdell and E. J. Land (1987).** "Photophysical studies of bacteriochlorophyll *a* and bacteriopheophytin *a* - singlet oxygen generation." *J Photochem Photobiol* **1**: 93-101.

- Bouly, J. P., E. Schleicher, M. Dionisio-Sese, F. Vandenbussche, D. Van Der Straeten, N. Bakrim, S. Meier, A. Batschauer, P. Galland, R. Bittl and M. Ahmad (2007).** "Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states." *J Biol Chem* **282**(13): 9383-91.
- Boyd, D. A., T. Thevenot, M. Gumbmann, A. L. Honeyman and I. R. Hamilton (2000).** "Identification of the operon for the sorbitol (Glucitol) Phosphoenolpyruvate: Sugar phosphotransferase system in *Streptococcus mutans*." *Infect Immun* **68**(2): 925-30.
- Braatsch, S. (2002).** "Blaulichabhängige Regulation von Photosynthese Genen in *Rhodobacter*." Dissertation. Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie Justus-Liebig-Universität. Gießen.
- Braatsch, S., M. Gomelsky, S. Kuphal and G. Klug (2002).** "A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*." *Mol Microbiol* **45**(3): 827-36.
- Braatsch, S., O. V. Moskvina, G. Klug and M. Gomelsky (2004).** "Responses of the *Rhodobacter sphaeroides* transcriptome to blue light under semiaerobic conditions." *J Bacteriol* **186**(22): 7726-35.
- 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.
- Briggs, W. R. (2007).** "The LOV domain: a chromophore module servicing multiple photoreceptors." *J Biomed Sci* **14**(4): 499-504.
- Brioukhanov, A. L. and A. I. Netrusov (2004).** "Catalase and superoxide dismutase: distribution, properties, and physiological role in cells of strict anaerobes." *Biochemistry (Mosc)* **69**(9): 949-62.
- Briviba, K., L. O. Klotz and H. Sies (1997).** "Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems." *Biol Chem* **378**(11): 1259-65.
- Brollich, M. A., L. Wang and M. A. O'Neill (2010).** "Folding kinetics of recognition loop peptides from a photolyase and cryptochrome-DASH." *Biochem Biophys Res Commun* **391**(1): 874-8.
- Brooker, A. (1927).** "Light Penetration into the Bay of Fundy and into Chamcook Lake, New Brunswick." *Ecology* **8**: 90-93.
- Brooks, B. E. and S. K. Buchanan (2008).** "Signaling mechanisms for activation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors." *Biochim Biophys Acta* **1778**(9): 1930-45.
- Brown, K. L. and K. T. Hughes (1995).** "The role of anti-sigma factors in gene regulation." *Mol Microbiol* **16**(3): 397-404.
- Brudler, R., K. Hitomi, H. Daiyasu, H. Toh, K. Kucho, M. Ishiura, M. Kanehisa, V. A. Roberts, T. Todo, J. A. Tainer and E. D. Getzoff (2003).** "Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution." *Mol Cell* **11**(1): 59-67.
- Casadaban, M. J. and S. N. Cohen (1980).** "Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*." *J Mol Biol* **138**(2): 179-207.
- Choudhary, M., Y. X. Fu, C. Mackenzie and S. Kaplan (2004).** "DNA sequence duplication in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: evidence of an ancient partnership between chromosomes I and II." *J Bacteriol* **186**(7): 2019-27.
- Choudhary, M. and S. Kaplan (2000).** "DNA sequence analysis of the photosynthesis region of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1." *Nucleic Acids Res* **28**(4): 862-7.
- Choudhary, M., C. Mackenzie, N. J. Mouncey and S. Kaplan (1999).** "RsGDB, the *Rhodobacter sphaeroides* Genome Database." *Nucleic Acids Res* **27**(1): 61-2.
- Christie, J. M. (2007).** "Phototropin blue-light receptors." *Annu Rev Plant Biol* **58**: 21-45.
- Christie, J. M., P. Reymond, G. K. Powell, P. Bernasconi, A. A. Raibekas, E. Liscum and W. R. Briggs (1998).** "*Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism." *Science* **282**(5394): 1698-701.
- Cogdell, R. J. and H. A. Frank (1987).** "How Carotenoids Function in Photosynthetic Bacteria." *Biochimica Et Biophysica Acta* **895**(2): 63-79.

- Cogdell, R. J., H. Hashimoto and A. T. Gardiner (2004).** "Purple Bacterial Light-harvesting Complexes: From Dreams to Structures." *Photosynth Res* **80**(1-3): 173-9.
- Cogdell, R. J., T. D. Howard, R. Bittl, E. Schlodder, I. Geisenheimer and W. Lubitz (2000).** "How carotenoids protect bacterial photosynthesis." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **355**(1402): 1345-49.
- Cogdell, R. J., N. W. Isaacs, A. A. Freer, T. D. Howard, A. T. Gardiner, S. M. Prince and M. Z. Papiz (2003).** "The structural basis of light-harvesting in purple bacteria." *FEBS Lett* **555**(1): 35-9.
- Cohen-Bazire, G., W. R. Sistrom and R. Y. Stanier (1957).** "Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria." *J Cell Physiol* **49**(1): 25-68.
- Condon, C. (2007).** "Maturation and degradation of RNA in bacteria." *Curr Opin Microbiol* **10**(3): 271-8.
- Crack, J., J. Green and A. J. Thomson (2004).** "Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR)." *J Biol Chem* **279**(10): 9278-86.
- Crack, J. C., A. J. Jervis, A. A. Gaskell, G. F. White, J. Green, A. J. Thomson and N. E. Le Brun (2008).** "Signal perception by FNR: the role of the iron-sulfur cluster." *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 6): 1144-8.
- Daldal, F., M. Deshmukh and R. C. Prince (2003).** "Membrane-anchored cytochrome c as an electron carrier in photosynthesis and respiration: past, present and future of an unexpected discovery." *Photosynth Res* **76**(1-3): 127-34.
- Dandanell, G., K. Norris and K. Hammer (1991).** "Long-distance *deoR* regulation of gene expression in *Escherichia coli*." *Ann N Y Acad Sci* **646**: 19-30.
- Das, K. C. and C. K. Das (2000).** "Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: redox independent functions." *Biochem Biophys Res Commun* **277**(2): 443-7.
- Davies, M. J. (2005).** "The oxidative environment and protein damage." *Biochim Biophys Acta* **1703**(2): 93-109.
- Deana, A. and J. G. Belasco (2005).** "Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay." *Genes Dev* **19**(21): 2526-33.
- Demple, B. (1999).** "Radical ideas: genetic responses to oxidative stress." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**(1): 64-8.
- Ditta, G., T. Schmidhauser, E. Yakobson, P. Lu, X. W. Liang, D. R. Finlay, D. Guiney and D. R. Helinski (1985).** "Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression." *Plasmid* **13**: 149-53.
- Dragnea, V., A. I. Arunkumar, H. Yuan, D. P. Giedroc and C. E. Bauer (2009).** "Spectroscopic studies of the AppA BLUF domain from *Rhodobacter sphaeroides*: addressing movement of tryptophan 104 in the signaling state." *Biochemistry* **48**(42): 9969-79.
- Drews, G. (1983).** *Mikrobiologisches Praktikum*. Heidelberg, Springer Verlag.
- Dufour, Y. S., R. Landick and T. J. Donohue (2008).** "Organization and evolution of the biological response to singlet oxygen stress." *J Mol Biol* **383**(3): 713-30.
- Elsen, S., L. R. Swem, D. L. Swem and C. E. Bauer (2004).** "RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system." *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(2): 263-79.
- Epe, B., M. Pflaum and S. Boiteux (1993).** "DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems." *Mutat Res* **299**(3-4): 135-45.
- Eraso, J. M. and S. Kaplan (1995).** "Oxygen-insensitive synthesis of the photosynthetic membranes of *Rhodobacter sphaeroides*: a mutant histidine kinase." *J Bacteriol* **177**(10): 2695-706.
- Eraso, J. M. and S. Kaplan (2009).** "Regulation of gene expression by PrrA in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: role of polyamines and DNA topology." *J Bacteriol* **191**(13): 4341-52.

- Eraso, J. M., J. H. Roh, X. Zeng, S. J. Callister, M. S. Lipton and S. Kaplan (2008).** "Role of the global transcriptional regulator PrrA in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: combined transcriptome and proteome analysis." *J Bacteriol* **190**(14): 4831-48.
- Ermolenko, D. N. and G. I. Makhatadze (2002).** "Bacterial cold-shock proteins." *Cell Mol Life Sci* **59**(11): 1902-13.
- Essen, L. O. (2006).** "Photolyases and cryptochromes: common mechanisms of DNA repair and light-driven signaling?" *Curr Opin Struct Biol* **16**(1): 51-9.
- Fang, F. C. (2004).** "Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies." *Nat Rev Microbiol* **2**(10): 820-32.
- Feldman, L. J. and W. R. Briggs (1987).** "Light-regulated gravitropism in seedling roots of maize." *Plant Physiol* **83**: 241-3.
- Fenton, H. J. H. (1894).** "Oxidation of tartaric acid in presence of iron." *J Chem Soc Trans* **65**: 899-911.
- Fischer, H. M. (1994).** "Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia." *Microbiol Rev* **58**(3): 352-86.
- Flory, J. E. and T. J. Donohue (1995).** "Organization and expression of the *Rhodobacter sphaeroides* cycFG operon." *J Bacteriol* **177**(15): 4311-20.
- Flory, J. E. and T. J. Donohue (1997).** "Transcriptional control of several aerobically induced cytochrome structural genes in *Rhodobacter sphaeroides*." *Microbiology* **143** (Pt 10): 3101-10.
- Foote, C. S., Y. C. Chang and R. W. Denny (1970).** "Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection." *J Am Chem Soc* **92**(17): 5216-8.
- Forward, J. A., M. C. Behrendt, N. R. Wyborn, R. Cross and D. J. Kelly (1997).** "TRAP transporters: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the dctPQM genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria." *J Bacteriol* **179**(17): 5482-93.
- Frese, R. N., C. A. Siebert, R. A. Niederman, C. N. Hunter, C. Otto and R. van Grondelle (2004).** "The long-range organization of a native photosynthetic membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(52): 17994-9.
- Frolow, F., A. J. Kalb and J. Yariv (1994).** "Structure of a unique twofold symmetric haem-binding site." *Nat Struct Biol* **1**(7): 453-60.
- Fujihashi, M., N. Numoto, Y. Kobayashi, A. Mizushima, M. Tsujimura, A. Nakamura, Y. Kawarabayasi and K. Miki (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.
- Gauden, M., J. S. Grinstead, W. Laan, I. H. van Stokkum, M. Avila-Perez, K. C. Toh, R. Boelens, R. Kaptein, R. van Grondelle, K. J. Hellingwerf and J. T. Kennis (2007).** "On the role of aromatic side chains in the photoactivation of BLUF domains." *Biochemistry* **46**(25): 7405-15.
- Gauden, M., I. H. van Stokkum, J. M. Key, D. Luhrs, R. van Grondelle, P. Hegemann and J. T. Kennis (2006).** "Hydrogen-bond switching through a radical pair mechanism in a flavin-binding photoreceptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(29): 10895-900.
- Gauden, M., S. Yeremenko, W. Laan, I. H. van Stokkum, J. A. Ihalainen, R. van Grondelle, K. J. Hellingwerf and J. T. Kennis (2005).** "Photocycle of the flavin-binding photoreceptor AppA, a bacterial transcriptional antirepressor of photosynthesis genes." *Biochemistry* **44**(10): 3653-62.
- Gentry, D. R., V. J. Hernandez, L. H. Nguyen, D. B. Jensen and M. Cashel (1993).** "Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp." *J Bacteriol* **175**(24): 7982-9.
- Glaeser, J. and G. Klug (2005).** "Photo-oxidative stress in *Rhodobacter sphaeroides*: protective role of carotenoids and expression of selected genes." *Microbiology* **151**(Pt 6): 1927-38.
- Glaeser, J., M. Zobawa, F. Lottspeich and G. Klug (2007).** "Protein synthesis patterns reveal a complex regulatory response to singlet oxygen in *Rhodobacter*." *J Proteome Res* **6**(7): 2460-71.

- Glavinas, H., P. Krajcsi, J. Cserepes and B. Sarkadi (2004).** "The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity." *Curr Drug Deliv* **1**(1): 27-42.
- Gomelsky, L., O. V. Moskvina, R. A. Stenzel, D. F. Jones, T. J. Donohue and M. Gomelsky (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, M., I. M. Horne, H. J. Lee, J. M. Pemberton, A. G. McEwan and S. Kaplan (2000).** "Domain structure, oligomeric state, and mutational analysis of PpsR, the *Rhodobacter sphaeroides* repressor of photosystem gene expression." *J Bacteriol* **182**(8): 2253-61.
- Gomelsky, M. and S. Kaplan (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. and S. Kaplan (1997).** "Molecular genetic analysis suggesting interactions between AppA and PpsR in regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1." *J Bacteriol* **179**(1): 128-34.
- Gomelsky, M. and G. Klug (2002).** "BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms." *Trends Biochem Sci* **27**(10): 497-500.
- Gottesman, S. (2005).** "MicroRNAs for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria." *Trends Genet* **21**(7): 399-404.
- Grabbe, R. and R. A. Schmitz (2003).** "Oxygen control of nif gene expression in *Klebsiella pneumoniae* depends on NifL reduction at the cytoplasmic membrane by electrons derived from the reduced quinone pool." *Eur J Biochem* **270**(7): 1555-66.
- Green, J., J. C. Crack, A. J. Thomson and N. E. LeBrun (2009).** "Bacterial sensors of oxygen." *Curr Opin Microbiol* **12**(2): 145-51.
- Green, J. and M. S. Paget (2004).** "Bacterial redox sensors." *Nat Rev Microbiol* **2**(12): 954-66.
- Griffiths, M., W. R. Sistrom, G. Cohenbaze, R. Y. Stanier and M. Calvin (1955).** "Function of carotenoids in photosynthesis." *Nature* **176**(4495): 1211-5.
- Grinstead, J. S., S. T. Hsu, W. Laan, A. M. Bonvin, K. J. Hellingwerf, R. Boelens and R. Kaptein (2006).** "The solution structure of the AppA BLUF domain: insight into the mechanism of light-induced signaling." *Chembiochem* **7**(1): 187-93.
- Halliwell, B. (2006).** "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life." *Plant Physiol* **141**(2): 312-22.
- Han, Y. (2006).** "Integration of redox and light signals by the regulator protein AppA in *Rhodobacter sphaeroides*." Dissertation Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie Justus-Liebig-Universität. Gießen.
- Han, Y., S. Braatsch, L. Osterloh and G. Klug (2004).** "A eukaryotic BLUF domain mediates light-dependent gene expression in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(33): 12306-11.
- Han, Y., M. H. Meyer, M. Keusgen and G. Klug (2007).** "A haem cofactor is required for redox and light signalling by the AppA protein of *Rhodobacter sphaeroides*." *Mol Microbiol* **64**(4): 1090-104.
- Happ, H. N., S. Braatsch, V. Broschek, L. Osterloh and G. Klug (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.
- Haydon, D. J. and J. R. Guest (1991).** "A new family of bacterial regulatory proteins." *FEMS Microbiol Lett* **63**(2-3): 291-5.
- Hegemann, P. (2008).** "Algal sensory photoreceptors." *Annu Rev Plant Biol* **59**: 167-89.
- Helmann, J. D. (2002).** "The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors." *Adv Microb Physiol* **46**: 47-110.
- Helmann, J. D. and M. J. Chamberlin (1988).** "Structure and function of bacterial sigma factors." *Annu Rev Biochem* **57**: 839-72.

- Hendrischk, A. K. (2009).** "Charakterisierung möglicher Blaulichtrezeptoren in *Rhodobacter sphaeroides* - Funktion und Regulation von Photolyase/Cryptochromhomologen und eines LOV Domänen Proteins." Dissertation. Institut für Mikro- und Molekularbiologie. Justus-Liebig-Universität. Gießen.
- Hendrischk, A. K., S. Braatsch, J. Glaeser and G. Klug (2007).** "The *phrA* gene of *Rhodobacter sphaeroides* encodes a photolyase and is regulated by singlet oxygen and peroxide in a sigma(E)-dependent manner." *Microbiology* **153**(Pt 6): 1842-51.
- Hendrischk, A. K., S. W. Frühwirth, J. Moldt, R. Pokorny, S. Metz, G. Kaiser, A. Jäger, A. Batschauer and G. Klug (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., J. Moldt, S. W. Frühwirth and G. Klug (2009b).** "Characterization of an unusual LOV domain protein in the alpha-proteobacterium *Rhodobacter sphaeroides*." *Photochem Photobiol* **85**(5): 1254-9.
- Higuchi, R., B. Krummel and R. K. Saiki (1988).** "A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions." *Nucleic Acids Res* **16**(15): 7351-67.
- Hill, S., S. Austin, T. Eydmann, T. Jones and R. Dixon (1996).** "*Azotobacter vinelandii* NIFL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(5): 2143-8.
- Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen and L. R. Pease (1989).** "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction." *Gene* **77**(1): 51-9.
- Hornstra, I. K. and T. P. Yang (1993).** "In vivo footprinting and genomic sequencing by ligation-mediated PCR." *Anal Biochem* **213**(2): 179-93.
- Huala, E., P. W. Oeller, E. Liscum, I. S. Han, E. Larsen and W. R. Briggs (1997).** "*Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain." *Science* **278**(5346): 2120-3.
- Hübner, P., B. Masepohl, W. Klipp and T. A. Bickle (1993).** "nif gene expression studies in *Rhodobacter capsulatus*: ntrC-independent repression by high ammonium concentrations." *Mol Microbiol* **10**(1): 123-32.
- Hunter, C. N., J. D. Tucker and R. A. Niederman (2005).** "The assembly and organisation of photosynthetic membranes in *Rhodobacter sphaeroides*." *Photochem Photobiol Sci* **4**(12): 1023-7.
- Iba, K., K. Morohashi, T. Miyata and K. Takamiya (1987).** "Structural gene of cytochrome b-562 from the cytochrome b-c1 complex of *Rhodobacter sphaeroides*." *J Biochem* **102**(6): 1511-8.
- Imhoff, J. (2001).** The phototrophic alpha-proteobacteria. The prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community. M. Dworkins.
- Imlay, J. A. (2003).** "Pathways of oxidative damage." *Annu Rev Microbiol* **57**: 395-418.
- Imlay, J. A. (2008).** "Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide." *Annu Rev Biochem* **77**: 755-76.
- Imlay, J. A. and S. Linn (1986).** "Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide." *J Bacteriol* **166**(2): 519-27.
- Iseki, M., S. Matsunaga, A. Murakami, K. Ohno, K. Shiga, K. Yoshida, M. Sugai, T. Takahashi, T. Hori and M. Watanabe (2002).** "A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*." *Nature* **415**(6875): 1047-51.
- Jager, A., S. Braatsch, K. Habertzettl, S. Metz, L. Osterloh, Y. Han and G. Klug (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.
- Jäger, A., S. Braatsch, K. Habertzettl, S. Metz, L. Osterloh, Y. Han and G. Klug (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.
- Jäger, S., E. Evguenieva-Hackenberg and G. Klug (2004).** "Temperature-dependent processing of the *cspA* mRNA in *Rhodobacter capsulatus*." *Microbiology* **150**(Pt 3): 687-95.

- Jentzsch, K., A. Wirtz, F. Circolone, T. Drepper, A. Losi, W. Gartner, K. E. Jaeger and U. Krauss (2009).** "Mutual exchange of kinetic properties by extended mutagenesis in two short LOV domain proteins from *Pseudomonas putida*." *Biochemistry* **48**(43): 10321-33.
- Jiang, D., Z. Hatahet, J. O. Blaisdell, R. J. Melamed and S. S. Wallace (1997).** "*Escherichia coli* endonuclease VIII: cloning, sequencing, and overexpression of the nei structural gene and characterization of nei and nei nth mutants." *J Bacteriol* **179**(11): 3773-82.
- Jones, D. F., R. A. Stenzel and T. J. Donohue (2005).** "Mutational analysis of the C-terminal domain of the *Rhodobacter sphaeroides* response regulator PrrA." *Microbiology* **151**(Pt 12): 4103-10.
- Joshi, H. M. and F. R. Tabita (1996).** "A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation, and nitrogen fixation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14515-20.
- Jung, A., J. Reinstein, T. Domratcheva, R. L. Shoeman and I. Schlichting (2006).** "Crystal structures of the AppA BLUF domain photoreceptor provide insights into blue light-mediated signal transduction." *J Mol Biol* **362**(4): 717-32.
- Kalapos, M. P. (2008).** "The tandem of free radicals and methylglyoxal." *Chem Biol Interact* **171**(3): 251-71.
- Kapserbauer, M. J. and P. G. Hunt (1987).** "Soil color and surface residue effects on seedling light environment." *Plant and Soil* **97**: 295-98.
- Karatza, P. and S. Frillingos (2005).** "Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli*." *Mol Membr Biol* **22**(3): 251-61.
- Karls, R. K., J. R. Wolf and T. J. Donohue (1999).** "Activation of the *cycA* P2 promoter for the *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c2* gene by the photosynthesis response regulator." *Mol Microbiol* **34**(4): 822-35.
- Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi and D. Trollinger (1988).** "Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria." *Gene* **70**(1): 191-7.
- Kennis, J. T., S. Crosson, M. Gauden, I. H. van Stokkum, K. Moffat and R. van Grondelle (2003).** "Primary reactions of the LOV2 domain of phototropin, a plant blue-light photoreceptor." *Biochemistry* **42**(12): 3385-92.
- Kiley, P. J. and S. Kaplan (1988).** "Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*." *Microbiol Rev* **52**(1): 50-69.
- Klar, T., G. Kaiser, U. Hennecke, T. Carell, A. Batschauer and L. O. Essen (2006).** "Natural and non-natural antenna chromophores in the DNA photolyase from *Thermus thermophilus*." *Chembiochem* **7**(11): 1798-806.
- Klug, G., C. W. Adams, J. Belasco, B. Doerge and S. N. Cohen (1987).** "Biological consequences of segmental alterations in mRNA stability: effects of deletion of the intercistronic hairpin loop region of the *Rhodobacter capsulatus* *puf* operon." *EMBO J* **6**(11): 3515-20.
- Klug, G. and S. N. Cohen (1991).** "Effects of translation on degradation of mRNA segments transcribed from the polycistronic *puf* operon of *Rhodobacter capsulatus*." *J Bacteriol* **173**(4): 1478-84.
- Knapp, G. S., J. W. Tsai and J. C. Hu (2009).** "The oligomerization of OxyR in *Escherichia coli*." *Protein Sci* **18**(1): 101-7.
- Konzer, A. (2008).** "Charakterisierung putativer Blaulichtrezeptoren in *Rhodobacter sphaeroides*." Diplomarbeit. Institut für Mikro- und Molekularbiologie. Justus-Liebig-Universität. Gießen.
- Krauss, U., A. Losi, W. Gartner, K. E. Jaeger and T. Eggert (2005).** "Initial characterization of a blue-light sensing, phototropin-related protein from *Pseudomonas putida*: a paradigm for an extended LOV construct." *Phys Chem Chem Phys* **7**(14): 2804-11.
- Laan, D. W. (2005).** Signal sensing and transduction in the blue-light photoreceptor AppA and the cyanobacterial phytochrome Cph1. University of Amsterdam, The Netherlands, Ipskamp Enchede.
- Laan, W., M. Gauden, S. Yeremenko, R. van Grondelle, J. T. Kennis and K. J. Hellingwerf (2006).** "On the mechanism of activation of the BLUF domain of AppA." *Biochemistry* **45**(1): 51-60.

- Laan, W., M. A. van der Horst, I. H. van Stokkum and K. J. Hellingwerf (2003).** "Initial characterization of the primary photochemistry of AppA, a blue-light-using flavin adenine dinucleotide-domain containing transcriptional antirepressor protein from *Rhodobacter sphaeroides*: a key role for reversible intramolecular proton transfer from the flavin adenine dinucleotide chromophore to a conserved tyrosine?" *Photochem Photobiol* **78**(3): 290-7.
- Laemmli, U. K. (1970).** "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Laguri, C., M. K. Phillips-Jones and M. P. Williamson (2003).** "Solution structure and DNA binding of the effector domain from the global regulator PrrA (RegA) from *Rhodobacter sphaeroides*: insights into DNA binding specificity." *Nucleic Acids Res* **31**(23): 6778-87.
- Laguri, C., R. A. Stenzel, T. J. Donohue, M. K. Phillips-Jones and M. P. Williamson (2006).** "Activation of the global gene regulator PrrA (RegA) from *Rhodobacter sphaeroides*." *Biochemistry* **45**(25): 7872-81.
- Lazazzera, B. A., H. Beinert, N. Khoroshilova, M. C. Kennedy and P. J. Kiley (1996).** "DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen." *J Biol Chem* **271**(5): 2762-8.
- Li, Z. R., S. Wakao, B. B. Fischer and K. K. Niyogi (2009).** "Sensing and Responding to Excess Light." *Annual Review of Plant Biology* **60**: 239-60.
- Lin, C., H. Yang, H. Guo, T. Mockler, J. Chen and A. R. Cashmore (1998).** "Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2686-90.
- Liu, H., X. Yu, K. Li, J. Klejnot, H. Yang, D. Lisiero and C. Lin (2008).** "Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis*." *Science* **322**(5907): 1535-9.
- Lloyd, G., P. Landini and S. Busby (2001).** "Activation and repression of transcription initiation in bacteria." *Essays Biochem* **37**: 17-31.
- Lomovskaya, O. and K. Lewis (1992).** "Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(19): 8938-42.
- Losi, A. (2007).** "Flavin-based Blue-Light photosensors: a photobiophysics update." *Photochem Photobiol* **83**(6): 1283-300.
- Losi, A. and W. Gärtner (2008).** "Bacterial bilin- and flavin-binding photoreceptors." *Photochem Photobiol Sci* **7**(10): 1168-78.
- Losi, A., E. Polverini, B. Quest and W. Gartner (2002).** "First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes." *Biophys J* **82**(5): 2627-34.
- Macheroux, P., S. Hill, S. Austin, T. Eydmann, T. Jones, S. O. Kim, R. Poole and R. Dixon (1998).** "Electron donation to the flavoprotein NifL, a redox-sensing transcriptional regulator." *Biochem J* **332** (Pt 2): 413-9.
- Mackenzie, C., M. Choudhary, F. W. Larimer, P. F. Predki, S. Stilwagen, J. P. Armitage, R. D. Barber, T. J. Donohue, J. P. Hosler, J. E. Newman, J. P. Shapleigh, R. E. Sockett, J. Zeilstra-Ryalls and S. Kaplan (2001).** "The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1." *Photosynth Res* **70**(1): 19-41.
- Madigan, M. T. (1995).** *Microbiology of Nitrogen Fixation by anoxygenic Photosynthetic bacteria. Anoxygenic photosynthetic bacteria.* R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer. Heidelberg, Springer.
- Mank, N. (2009).** "Der Einfluss von Licht und Sauerstoff auf die Expression der Photosynthesegene und kleine RNAs in *Rhodobacter sphaeroides*." Diplomarbeit. Institut für Mikro- und Molekularbiologie. Justus-Liebig-Universität. Gießen.
- Mao, L., C. Mackenzie, J. H. Roh, J. M. Eraso, S. Kaplan and H. Resat (2005).** "Combining microarray and genomic data to predict DNA binding motifs." *Microbiology* **151**(Pt 10): 3197-213.
- Masepohl, B., W. Klipp and A. Puhler (1988).** "Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated nifA/nifB gene region of *Rhodobacter capsulatus*." *Mol Gen Genet* **212**(1): 27-37.
- Masuda, S. and C. E. Bauer (2002).** "AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*." *Cell* **110**(5): 613-23.

- Masuda, S. and C. E. Bauer (2004).** "Null mutation of HvrA compensates for loss of an essential *relA/spoT*-like gene in *Rhodobacter capsulatus*." *J Bacteriol* **186**(1): 235-9.
- Masuda, S., C. Dong, D. Swem, A. T. Setterdahl, D. B. Knaff and C. E. Bauer (2002).** "Repression of photosynthesis gene expression by formation of a disulfide bond in CrtJ." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10): 7078-83.
- Masuda, S., K. Hasegawa, A. Ishii and T. A. Ono (2004).** "Light-induced structural changes in a putative blue-light receptor with a novel FAD binding fold sensor of blue-light using FAD (BLUF); Slr1694 of *synechocystis* sp. PCC6803." *Biochemistry* **43**(18): 5304-13.
- Masuda, S., K. Hasegawa and T. A. Ono (2005).** "Tryptophan at position 104 is involved in transforming light signal into changes of beta-sheet structure for the signaling state in the BLUF domain of AppA." *Plant Cell Physiol* **46**(12): 1894-901.
- Masuda, S., Y. Matsumoto, K. V. Nagashima, K. Shimada, K. Inoue, C. E. Bauer and K. Matsuura (1999).** "Structural and functional analyses of photosynthetic regulatory genes *regA* and *regB* from *Rhodovulum sulfidophilum*, *Roseobacter denitrificans*, and *Rhodobacter capsulatus*." *J Bacteriol* **181**(14): 4205-15.
- Masuda, S., Y. Tomida, H. Ohta and K. Takamiya (2007).** "The critical role of a hydrogen bond between Gln63 and Trp104 in the blue-light sensing BLUF domain that controls AppA activity." *J Mol Biol* **368**(5): 1223-30.
- Matsuoka, D., T. Iwata, K. Zikihara, H. Kandori and S. Tokutomi (2007).** "Primary processes during the light-signal transduction of phototropin." *Photochem Photobiol* **83**(1): 122-30.
- Maywood, E. S., J. S. O'Neill, A. B. Reddy, J. E. Chesham, H. M. Prosser, C. P. Kyriacou, S. I. Godinho, P. M. Nolan and M. H. Hastings (2007).** "Genetic and molecular analysis of the central and peripheral circadian clockwork of mice." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**: 85-94.
- McRee, D. E., J. A. Tainer, T. E. Meyer, J. Van Beeumen, M. A. Cusanovich and E. D. Getzoff (1989).** "Crystallographic structure of a photoreceptor protein at 2.4 Å resolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(17): 6533-7.
- Meselson (1968).** "DNA restriction enzyme from *E. coli* ." *Nature* **217**: 1110-14.
- Metz, S. (2006).** "Einfluss von Blaulicht auf die Regulation von Photosynthesegenen in *Rhodobacter sphaeroides* - Die Rolle von PpsR bei der blaulichtabhängigen Regulation des *puf*-Operons in *Rhodobacter sphaeroides*." Diplomarbeit. Institut für Mikro- und Molekularbiologie. Justus-Liebig-Universität. Gießen.
- Metz, S., J. Hendriks, A. Jäger, K. J. Hellingwerf and G. Klug (2010).** "In Vivo Effects on Photosynthesis Gene Expression of Base Pair Exchanges in the Gene Encoding the Light-Responsive BLUF Domain of AppA in *Rhodobacter sphaeroides*." *Photochemistry and Photobiology*.
- Meyer, T. E. and T. Donohue (1995).** Cytochromes, iron-sulfur and copper proteins mediating electron transfer from the cytochrome bc1 complex to photosynthetic reaction center complexes. Anoxygenic photosynthetic bacteria. R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer. Heidelberg, Springer.
- Meyer, T. E., E. Yakali, M. A. Cusanovich and G. Tollin (1987).** "Properties of a water-soluble, yellow protein isolated from a halophilic phototrophic bacterium that has photochemical activity analogous to sensory rhodopsin." *Biochemistry* **26**(2): 418-23.
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Missiakas, D., M. P. Mayer, M. Lemaire, C. Georgopoulos and S. Raina (1997).** "Modulation of the *Escherichia coli* sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins." *Mol Microbiol* **24**(2): 355-71.
- Möglich, A., X. Yang, R. A. Ayers and K. Moffat (2010).** "Structure and function of plant photoreceptors." *Annu Rev Plant Biol* **61**: 21-47.
- Moradas-Ferreira, P., V. Costa, P. Piper and W. Mager (1996).** "The molecular defences against reactive oxygen species in yeast." *Mol Microbiol* **19**(4): 651-8.
- Morimyo, M. (1982).** "Anaerobic incubation enhances the colony formation of a *polA recB* strain of *Escherichia coli* K-12." *J Bacteriol* **152**(1): 208-14.

- Moskvin, O. V., L. Gomelsky and M. Gomelsky (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., S. Kaplan, M. A. Gilles-Gonzalez and M. Gomelsky (2007).** "Novel heme-based oxygen sensor with a revealing evolutionary history." *J Biol Chem* **282**(39): 28740-8.
- Murray, R. G. E., N. R. Krieg and J. G. Holt (1984).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins.
- Newman, J. D., M. J. Falkowski, B. A. Schilke, L. C. Anthony and T. J. Donohue (1999).** "The *Rhodobacter sphaeroides* ECF sigma factor, sigma(E), and the target promoters *cycA* P3 and *rpoE* P1." *J Mol Biol* **294**(2): 307-20.
- Nuss, A. M., J. Glaeser and G. Klug (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.
- Oh, J. I. and S. Kaplan (2000).** "Redox signaling: globalization of gene expression." *EMBO J* **19**(16): 4237-47.
- Oh, J. I., I. J. Ko and S. Kaplan (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.
- Oh, J. I., I. J. Ko and S. Kaplan (2004).** "Reconstitution of the *Rhodobacter sphaeroides* *cbb3*-PrrBA signal transduction pathway in vitro." *Biochemistry* **43**(24): 7915-23.
- Ote, T., M. Hashimoto, Y. Ikeuchi, M. Su'etsugu, T. Suzuki, T. Katayama and J. Kato (2006).** "Involvement of the *Escherichia coli* folate-binding protein YgfZ in RNA modification and regulation of chromosomal replication initiation." *Mol Microbiol* **59**(1): 265-75.
- Outten, F. W. and E. C. Theil (2009).** "Iron-based redox switches in biology." *Antioxid Redox Signal* **11**(5): 1029-46.
- Overduin, P., W. Boos and J. Tommassen (1988).** "Nucleotide sequence of the *ugp* genes of *Escherichia coli* K-12: homology to the maltose system." *Mol Microbiol* **2**(6): 767-75.
- Partch, C. L. and A. Sancar (2005).** "Photochemistry and photobiology of cryptochrome blue-light photopigments: the search for a photocycle." *Photochem Photobiol* **81**(6): 1291-304.
- Pena-Sanchez, J., S. Poggio, U. Flores-Perez, A. Osorio, C. Domenzain, G. Dreyfus and L. Camarena (2009).** "Identification of the binding site of the {sigma}54 hetero-oligomeric FleQ/FleT activator in the flagellar promoters of *Rhodobacter sphaeroides*." *Microbiology* **155**(Pt 5): 1669-79.
- Peri, K. G., H. Goldie and E. B. Waygood (1990).** "Cloning and characterization of the N-acetylglucosamine operon of *Escherichia coli*." *Biochem Cell Biol* **68**(1): 123-37.
- Pfaffl, M. W. (2001).** "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45.
- Plumbridge, J. (1995).** "Co-ordinated regulation of amino sugar biosynthesis and degradation: the NagC repressor acts as both an activator and a repressor for the transcription of the *glmUS* operon and requires two separated NagC binding sites." *EMBO J* **14**(16): 3958-65.
- Plumbridge, J. (2001).** "DNA binding sites for the Mlc and NagC proteins: regulation of *nagE*, encoding the N-acetylglucosamine-specific transporter in *Escherichia coli*." *Nucleic Acids Res* **29**(2): 506-14.
- Pomposiello, P. J. and B. Dimple (2002).** "Global adjustment of microbial physiology during free radical stress." *Adv Microb Physiol* **46**: 319-41.
- Ponnampalam, S. N. and C. E. Bauer (1997).** "DNA binding characteristics of CrtJ. A redox-responding repressor of bacteriochlorophyll, carotenoid, and light harvesting-II gene expression in *Rhodobacter capsulatus*." *J Biol Chem* **272**(29): 18391-6.
- Potter, C. A., A. Ward, C. Laguri, M. P. Williamson, P. J. Henderson and M. K. Phillips-Jones (2002).** "Expression, purification and characterisation of full-length histidine protein kinase RegB from *Rhodobacter sphaeroides*." *J Mol Biol* **320**(2): 201-13.

- Pritchard, A. E. and M. L. Vasil (1986).** "Nucleotide sequence and expression of a phosphate-regulated gene encoding a secreted hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **167**(1): 291-8.
- Puskas, A., E. P. Greenberg, S. Kaplan and A. L. Schaefer (1997).** "A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*." *J Bacteriol* **179**(23): 7530-7.
- Qi, Y., Y. Kobayashi and F. M. Hulett (1997).** "The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the *pho* regulon." *J Bacteriol* **179**(8): 2534-9.
- Qian, Y. and F. R. Tabita (1996).** "A global signal transduction system regulates aerobic and anaerobic CO₂ fixation in *Rhodobacter sphaeroides*." *J Bacteriol* **178**(1): 12-8.
- Rabus, R., D. L. Jack, D. J. Kelly and M. H. Saier, Jr. (1999).** "TRAP transporters: an ancient family of extracytoplasmic solute-receptor-dependent secondary active transporters." *Microbiology* **145 (Pt 12)**: 3431-45.
- Rajagopal, S., J. M. Key, E. B. Purcell, D. J. Boerema and K. Moffat (2004).** "Purification and initial characterization of a putative blue light-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli*." *Photochem Photobiol* **80**(3): 542-7.
- Ranson-Olson, B. and J. H. Zeilstra-Ryalls (2008).** "Regulation of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 hemA gene by PrrA and FnrL." *J Bacteriol* **190**(20): 6769-78.
- Repoila, F. and F. Darfeuille (2009).** "Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects." *Biol Cell* **101**(2): 117-31.
- Rinalducci, S., J. Z. Pedersen and L. Zolla (2004).** "Formation of radicals from singlet oxygen produced during photoinhibition of isolated light-harvesting proteins of photosystem II." *Biochim Biophys Acta* **1608**(1): 63-73.
- Ritchie, M. E., J. Silver, A. Oshlack, M. Holmes, D. Diyagama, A. Holloway and G. K. Smyth (2007).** "A comparison of background correction methods for two-colour microarrays." *Bioinformatics* **23**(20): 2700-7.
- Roh, J. H., W. E. Smith and S. Kaplan (2004).** "Effects of oxygen and light intensity on transcriptome expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. Redox active gene expression profile." *J Biol Chem* **279**(10): 9146-55.
- Romby, P., F. Vandenesch and E. G. Wagner (2006).** "The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression." *Curr Opin Microbiol* **9**(2): 229-36.
- Rozsak, A. W., T. D. Howard, J. Southall, A. T. Gardiner, C. J. Law, N. W. Isaacs and R. J. Cogdell (2003).** "Crystal structure of the RC-LH1 core complex from *Rhodospseudomonas palustris*." *Science* **302**(5652): 1969-72.
- Rowe, S., N. Hodson, G. Griffiths and I. S. Roberts (2000).** "Regulation of the *Escherichia coli* K5 capsule gene cluster: evidence for the roles of H-NS, BipA, and integration host factor in regulation of group 2 capsule gene clusters in pathogenic *E. coli*." *J Bacteriol* **182**(10): 2741-5.
- Sabri, M., S. Leveille and C. M. Dozois (2006).** "A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide." *Microbiology* **152**(Pt 3): 745-58.
- Sakai, T., T. Kagawa, M. Kasahara, T. E. Swartz, J. M. Christie, W. R. Briggs, M. Wada and K. Okada (2001).** "*Arabidopsis* *nph1* and *npl1*: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12): 6969-74.
- Salmon, K., S. P. Hung, K. Mekjian, P. Baldi, G. W. Hatfield and R. P. Gunsalus (2003).** "Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR." *J Biol Chem* **278**(32): 29837-55.
- Salomon, M., J. M. Christie, E. Knieb, U. Lempert and W. R. Briggs (2000).** "Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin." *Biochemistry* **39**(31): 9401-10.
- Salomon, M., W. Eisenreich, H. Durr, E. Schleicher, E. Knieb, V. Massey, W. Rudiger, F. Muller, A. Bacher and G. Richter (2001).** "An optomechanical transducer in the blue light receptor phototropin from *Avena sativa*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22): 12357-61.
- Sancar, A. (2003).** "Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors." *Chem Rev* **103**(6): 2203-37.

- Scandalios, J. G. (2002).** "The rise of ROS." *Trends Biochem Sci* **27**(9): 483-6.
- Scherrer, K. and J. E. Darnell (1962).** "Sedimentation characteristics of rapidly labelled RNA from HeLa cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**: 486-90.
- Schilke, B. A. and T. J. Donohue (1995).** "ChrR positively regulates transcription of the *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c2 gene." *J Bacteriol* **177**(8): 1929-37.
- Schleicher, E., R. M. Kowalczyk, C. W. Kay, P. Hegemann, A. Bacher, M. Fischer, R. Bittl, G. Richter and S. Weber (2004).** "On the reaction mechanism of adduct formation in LOV domains of the plant blue-light receptor phototropin." *J Am Chem Soc* **126**(35): 11067-76.
- Schmehl, M., A. Jahn, A. Meyer zu Vilsendorf, S. Hennecke, B. Masepohl, M. Schuppler, M. Marxer, J. Oelze and W. Klipp (1993).** "Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*: a putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase." *Mol Gen Genet* **241**(5-6): 602-15.
- Schobert, B. and J. K. Lanyi (1982).** "Halorhodopsin is a light-driven chloride pump." *J Biol Chem* **257**(17): 10306-13.
- Seaver, L. C. and J. A. Imlay (2004).** "Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide?" *J Biol Chem* **279**(47): 48742-50.
- Selby, C. P. and A. Sancar (2006).** "A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(47): 17696-700.
- Self, W. T., A. M. Grunden, A. Hasona and K. T. Shanmugam (2001).** "Molybdate transport." *Res Microbiol* **152**(3-4): 311-21.
- Shimada, H., K. Iba and K. Takamiya (1992).** "Blue-light irradiation reduces the expression of *puf* and *puc* operons in *Rhodobacter sphaeroides* under semiaerobic conditions." *Plant Cell Physiol* **33**: 471-75.
- Sies, H. and C. F. Menck (1992).** "Singlet oxygen induced DNA damage." *Mutat Res* **275**(3-6): 367-75.
- Simon, L. D., B. Randolph, N. Irwin and G. Binkowski (1983).** "Stabilization of proteins by a bacteriophage T4 gene cloned in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(7): 2059-62.
- Simpson, D. A., T. C. Hammarton and I. S. Roberts (1996).** "Transcriptional organization and regulation of expression of region 1 of the *Escherichia coli* K5 capsule gene cluster." *J Bacteriol* **178**(22): 6466-74.
- Smith, H. (1982).** "Light Quality, Photoreception, and Strategy." *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **33**: 481-518.
- Smyth, G. K. (2005).** Limma: linear models for microarray data. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor.* R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry and W. Huber. New York, Springer: 397-420.
- Smyth, G. K. and T. Speed (2003).** "Normalization of cDNA microarray data." *Methods* **31**(4): 265-73.
- Socket, R. E., T. J. Donohue, A. R. Varga and S. Kaplan (1989).** "Control of photosynthetic membrane assembly in *Rhodobacter sphaeroides* mediated by *puhA* and flanking sequences." *J Bacteriol* **171**(1): 436-46.
- Sokolowsky, K., M. Newton, C. Lucero, B. Wertheim, J. Freedman, F. Cortazar, J. Czocho, J. P. Schelvis and Y. M. Gindt (2010).** "Spectroscopic and Thermodynamic Comparisons of *Escherichia coli* DNA Photolyase and *Vibrio cholerae* Cryptochrome 1." *J Phys Chem B*.
- Song, S. H., B. Dick, A. Penzkofer, R. Pokorny, A. Batschauer and L. O. Essen (2006).** "Absorption and fluorescence spectroscopic characterization of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*." *J Photochem Photobiol B* **85**(1): 1-16.
- Spee, J. H., W. M. de Vos and O. P. Kuipers (1993).** "Efficient random mutagenesis method with adjustable mutation frequency by use of PCR and dITP." *Nucleic Acids Res* **21**(3): 777-8.
- Storz, G. and J. A. Imlay (1999).** "Oxidative stress." *Curr Opin Microbiol* **2**(2): 188-94.
- Suwanto, A. and S. Kaplan (1989).** "Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: genome size, fragment identification, and gene localization." *J Bacteriol* **171**(11): 5840-9.

- Swingley, W. D., S. Sadekar, S. D. Mastrian, H. J. Matthies, J. Hao, H. Ramos, C. R. Acharya, A. L. Conrad, H. L. Taylor, L. C. Dejesa, M. K. Shah, E. O'Huallachain M, M. T. Lince, R. E. Blankenship, J. T. Beatty and J. W. Touchman (2007). "The complete genome sequence of *Roseobacter denitrificans* reveals a mixotrophic rather than photosynthetic metabolism." *J Bacteriol* **189**(3): 683-90.
- Tabita, F. R. (1995). The biochemistry and metabolic Regulation of Carbon Metabolism and CO₂ fixation in purple bacteria. Anoxygenic photosynthetic bacteria. R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer. Heidelberg, Springer.
- Taboy, C. H., K. G. Vaughan, T. A. Mietzner, P. Aisen and A. L. Crumbliss (2001). "Fe³⁺ coordination and redox properties of a bacterial transferrin." *J Biol Chem* **276**(4): 2719-24.
- Tamanini, F., I. Chaves, M. I. Bajek and G. T. van der Horst (2007). "Structure function analysis of mammalian cryptochromes." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**: 133-9.
- Tanabe, H., K. Yamasak, M. Furue, K. Yamamoto, A. Katoh, M. Yamamoto, S. Yoshioka, H. Tagami, H. A. Aiba and R. Utsumi (1997). "Growth phase-dependent transcription of *emrKY*, a homolog of multidrug efflux *emrAB* genes of *Escherichia coli*, is induced by tetracycline." *J Gen Appl Microbiol* **43**(5): 257-63.
- Tanabe, M., G. Szakonyi, K. A. Brown, P. J. Henderson, J. Nield and B. Byrne (2009). "The multidrug resistance efflux complex, *EmrAB* from *Escherichia coli* forms a dimer in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* **380**(2): 338-42.
- Tang, K., R. Zong, F. Zhang, N. Xiao and N. Jiao (2010). "Characterization of the photosynthetic apparatus and proteome of *Roseobacter denitrificans*." *Curr Microbiol* **60**(2): 124-33.
- Tavano, C. L. and T. J. Donohue (2006). "Development of the bacterial photosynthetic apparatus." *Curr Opin Microbiol* **9**(6): 625-31.
- Taylor, B. L. and I. B. Zhulin (1999). "PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light." *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(2): 479-506.
- Tester, M. and C. Morris (1987). "The penetration of light through soil." *Plant, Cell and Environment* **10**: 281-86.
- Thanassi, D. G., L. W. Cheng and H. Nikaido (1997). "Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **179**(8): 2512-8.
- Thompson, J. M., H. A. Jones and R. D. Perry (1999). "Molecular characterization of the hemin uptake locus (*hmu*) from *Yersinia pestis* and analysis of *hmu* mutants for hemin and hemoprotein utilization." *Infect Immun* **67**(8): 3879-92.
- Tomioka, K. and A. Matsumoto (2010). "A comparative view of insect circadian clock systems." *Cell Mol Life Sci* **67**(9): 1397-406.
- Townsend, C. R., J. L. Harper and M. E. Begon (1993). *Ökologie*. Heidelberg, Springer Verlag.
- Traxler, M. F., S. M. Summers, H. T. Nguyen, V. M. Zacharia, G. A. Hightower, J. T. Smith and T. Conway (2008). "The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **68**(5): 1128-48.
- Unno, M., S. Kikuchi and S. Masuda (2010). "Structural refinement of a key tryptophan residue in the BLUF photoreceptor AppA by ultraviolet resonance Raman spectroscopy." *Biophys J* **98**(9): 1949-56.
- van Aalten, D. M., C. C. DiRusso, J. Knudsen and R. K. Wierenga (2000). "Crystal structure of FadR, a fatty acid-responsive transcription factor with a novel acyl coenzyme A-binding fold." *EMBO J* **19**(19): 5167-77.
- van der Horst, M. A., W. Laan, S. Yeremenko, A. Wende, P. Palm, D. Oesterhelt and K. J. Hellingwerf (2005). "From primary photochemistry to biological function in the blue-light photoreceptors PYP and AppA." *Photochem Photobiol Sci* **4**(9): 688-93.
- Vander Jagt, D. L. (1993). "Glyoxalase II: molecular characteristics, kinetics and mechanism." *Biochem Soc Trans* **21**(2): 522-7.
- Waters, L. S. and G. Storz (2009). "Regulatory RNAs in bacteria." *Cell* **136**(4): 615-28.

- Whitfield, C. and I. S. Roberts (1999).** "Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **31**(5): 1307-19.
- Wick, L. M. and T. Egli (2004).** "Molecular components of physiological stress responses in *Escherichia coli*." Adv Biochem Eng Biotechnol **89**: 1-45.
- Wilson, D. N. and K. H. Nierhaus (2007).** "The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation." Crit Rev Biochem Mol Biol **42**(3): 187-219.
- Wosten, M. M. (1998).** "Eubacterial sigma-factors." FEMS Microbiol Rev **22**(3): 127-50.
- Wu, X., A. S. Faqi, J. Yang, B. P. Pang, X. Ding, X. Jiang and I. Chahoud (2002).** "2-Bromopropane induces DNA damage, impairs functional antioxidant cellular defenses, and enhances the lipid peroxidation process in primary cultures of rat Leydig cells." Reprod Toxicol **16**(4): 379-84.
- Xu, H. and T. R. Hoover (2001).** "Transcriptional regulation at a distance in bacteria." Curr Opin Microbiol **4**(2): 138-44.
- Yadav, S. K., S. L. Singla-Pareek and S. K. Sopory (2008).** "An overview on the role of methylglyoxal and glyoxalases in plants." Drug Metabol Drug Interact **23**(1-2): 51-68.
- Yamanaka, K. and M. Inouye (1997).** "Growth-phase-dependent expression of cspD, encoding a member of the CspA family in *Escherichia coli*." J Bacteriol **179**(16): 5126-30.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing (1985).** "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." Gene **33**(1): 103-19.
- Yeh, K. C., S. H. Wu, J. T. Murphy and J. C. Lagarias (1997).** "A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system." Science **277**(5331): 1505-8.
- Yoshikawa, S., T. Suzuki, M. Watanabe and M. Iseki (2005).** "Kinetic analysis of the activation of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), a blue-light receptor for photomovements of *Euglena*." Photochem Photobiol Sci **4**(9): 727-31.
- Zeilstra-Ryalls, J. H., K. Gabbert, N. J. Mouncey, S. Kaplan and R. G. Kranz (1997).** "Analysis of the fnrL gene and its function in *Rhodobacter capsulatus*." J Bacteriol **179**(23): 7264-73.
- Zeilstra-Ryalls, J. H. and S. Kaplan (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. and S. Kaplan (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.
- Zeller, T. (2005).** "Mechanismen der Genregulation unter oxidativem Stress in *Rhodobacter* - Die Rolle des Transkriptionsregulators OxyR." Dissertation. Institut für Mikro- und Molekularbiologie. Justus-Liebig-Universität. Gießen.
- Zeller, T., O. V. Moskvina, K. Li, G. Klug and M. Gomelsky (2005).** "Transcriptome and physiological responses to hydrogen peroxide of the facultatively phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*." J Bacteriol **187**(21): 7232-42.
- Zeng, J., Q. Wang, J. Lin, K. Deng, X. Zhao, D. Tang and X. Liu (2010).** "*Arabidopsis* cryptochrome-1 restrains lateral roots growth by inhibiting auxin transport." J Plant Physiol **167**(8): 670-3.
- Zeng, X., M. Choudhary and S. Kaplan (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.
- Zeugner, A., M. Byrdin, J. P. Bouly, N. Bakrim, B. Giovani, K. Brettel and M. Ahmad (2005).** "Light-induced electron transfer in *Arabidopsis* cryptochrome-1 correlates with in vivo function." J Biol Chem **280**(20): 19437-40.
- Zhou, S., E. Kvistad, A. Kile, J. Severin, D. Forrest, R. Runnheim, C. Churas, J. W. Hickman, C. Mackenzie, M. Choudhary, T. Donohue, S. Kaplan and D. C. Schwartz (2003).** "Whole-genome shotgun optical mapping of *Rhodobacter sphaeroides* strain 2.4.1 and its use for whole-genome shotgun sequence assembly." Genome Res **13**(9): 2142-51.

Internetquellen :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>

DNA - und Aminosäuresequenzen von Proteinen

<http://www.uniprot.org/>

DNA - und Aminosäuresequenzen von Proteinen

<http://www.genome.jp/kegg/> (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

upstream und *downstream* Sequenzen von Gene

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (BLAST)

Homologieanalysen von DNA - Sequenzen und Aminosäuresequenzen

<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

Primerdesign

<http://molbiol.ru/eng/scripts/>

Tool zur Umrechnung von Protein - und DNA - Konzentrationen

<http://www.expasy.ch/tools/>

pI und MW - Vorhersagen von Proteinen, Strukturvorhersagen von Proteinen

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/>

Kristallstrukturen von Proteine

<http://www.pymol.org/>

Darstellungssoftware für Kristallstrukturen

<http://bellumaeternum.blogspot.com/>

tabletop - news

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>

Domänenstrukturvorhersage und - vergleich

<http://img.jgi.doe.gov/>

Genomdatenbank für Prokaryoten

<http://david.abcc.ncifcrf.gov/> (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)

Tool zu funktionellen Vergleich differenziell exprimierter Gengruppen in Transkriptomanalysen

<http://www.r-project.org/>

Statistiksoftware R

<http://www.bioconductor.org/>

Add - ons für R zur statistischen Auswertung von Transkriptomanalysen

<http://www.spiegel.de/>

Das Tor zur Aussenwelt ...

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption / Adenin / Ampere / <i>average intensity</i>	g	Gramm / Gravitationskonstante
Abb.	Abbildung	G	Guanosin
ad	auffüllen auf	h	Stunde(n), (hour(s))
Ap	Ampicillin	8-HDF	8 - Hydroxy - 7 , 8 - didemethyl - 5 - deazariboflavin
APS	Ammoniumpersulfat	His	Histidin
ATP	Adenosintriphosphat	IPTG	Isopropyl - β - D - thiogalaktosid
BChl	Bacteriochlorophyll	k	kilo
BLUF	Sensor for blue light using FAD	kb	Kilobasenpaare
bp	Basenpaare	kDa	Kilodalton
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)	Km	Kanamycin
bzw.	beziehungsweise	l	Liter
C	Cytosin / Cystein	λ	Wellenlänge
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	LHC	Lichtsammelkomplex (<i>light harvesting complex</i>)
Ci	Curie	LOV	<i>light, oxygen, voltage</i>
cpm	<i>counts per minute</i>	m	Meter oder Milli
Crt	Carotinoid	M	Molar / <i>average intensity ratio</i>
Cry	Cryptochrom	μ	Mikro
Cy3	Carbocyanin 3	mA	Milliampere
Cy5	Carbocyanin 5	min	Minute(n)
Da	Dalton	mol	Basiseinheit der Stoffmenge
dATP	Desoxyriboadenosintriphosphat	MOPS	3 - Morpholino - 1 - Propansulfonsäure
dCTP	Desoxyribocytosintriphosphat	mRNA	<i>messenger RNA</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser	MTHF	5 , 10 - Methylentetrahydrofolat
DEPC	Diethylpyrocarbonat	n	Nano
dGTP	Desoxyriboguanosintriphosphat	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	nm	Nanometer
DNase	Desoxyribonuklease	nt	Nukleotid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat	NTA	Nitroltriessigsäure (<i>nitrilotriacetic acid</i>)
ds	doppelsträngig	NADH	reduziertes Nicotinamid - Adenin - Dinukleotid
DTT	Dithiothreitol	NADPH	reduziertes Nicotinamid - Adenin - Dinukleotid - Phosphat
dTTP	Desoxyribotyrosintriphosphat	NTP	Nukleosidtriphosphat
EDTA <i>et al.</i>	Ethylendiamintetraessigsäure und andere (<i>et altera</i>)		
f / F	femto / Phenylalanin		
FAD	Flavinadenindinukleotid		
FMN	Flavinmononukleotid		
[Fe - S] -	Eisen - Schwefel -		

OD	optische Dichte	T	Thymin
ONPG	2 - Nitrophenyl - β - D - Galaktopyranosid	TAE	Tris - Acetat - EDTA - Puffer
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)	TBE	Tris - Borat - EDTA - Puffer
		TBS	Tris - <i>base sodium</i> - Puffer
p	Piko	Tc	Tetrazyklin
PAA	Polyacrylamid	TEMED	N , N , N' , N' - Tetramethyl - ethylendiamin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	Trp	Trimethoprim
PAS	PER - ARNT - SIM	Tris	Tris (hydroxymethyl) - aminomethan
PBS	Phosphat - gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)	tRNA	<i>transfer</i> RNA
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)	Trp	Tryptophan
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	TRAP	<i>tripartite</i> ATP - <i>independent periplasmic</i>
PHR	photolyaseähnlich (photolyase related)	U	Unit
		UV	Ultraviolett
RÄ	Rhodobacter - Äpfelsäure	V	Volt
RC	Reaktionszentrum (<i>reaction centre</i>)	Vis	sichtbar (<i>visible</i>)
RNA	Ribonukleinsäure	W	Watt / Tryptophan
RNase	Ribonuklease	WT	Wildtyp
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)	Y	Tyrosin
rRNA	ribosomale RNA	X - Gal	5 - Bromo - 4 - chloro - 3 - indoxyl - β - D-galactopyranosid
RT	Raumtemperatur / Reverse Transkription		
sec	Sekunde(n)		
SDS	Natriumdodecylphosphat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)		
Sm	Streptomycin		
Sp	Spectinomycin		
sRNA	<i>small noncoding</i> RNA		
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)		
STAS	<i>sulphate transporter and antisigma factor antagonist</i>		
Std I	Standard I Medium		

8. Anhang

```

tggggccggg acaggcagcg tcaatttccc gcgcccTGC GGCaaaattG TCCCttttca
                                     PrrA1
agccgttagc caggattccc ggccgatctG GCGGCcaata aGTCGCaccc aaaacggccT
                                     PrrA2
TGTCAGCCAA CACTGACAFT gAATCTGTCA GCGCAA TGTG ACAcccataa tgcgagccgg
FnrL1 PpsR1 FnrL2 PpsR2
ggcggatcag aaatcgccga caagtgatc caggtctctc cggctctcgtc gaagcccgcg

tgcaggccct acacgcaaac cgtcgattta ccagttggga gacgacacaG TGACTGACGA
                                     Transkriptionsstart pucB

```

Abbildung 72 : Ausschnitt aus der upstream Sequenz des *pucB* Gens mit den putativen tandem Bindestellen von PrrA, FnrL und PpsR. Die DNA Sequenz von *pucB* (RSP_0314) wurde zusammen mit 200bp upstream des Startcodons der KEGG ([Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes](http://www.genome.jp/kegg/)) Datenbank entnommen und anschließend die putativen Bindestellen der drei Regulatoren anhand der publizierten (Mao *et al.*, 2005) DNA Bindemotive ermittelt. Beide FnrL - Bindestellen überlappen mit den PpsR - Bindestellen.

Tabelle 18 : Auflistung verschiedener Habitate und der dort messbaren Gesamtintensität an auftreffendem Weißlicht sowie des ungefähr darin enthaltenen Anteils an Blaulicht (380 - 450 nm). (Angaben hergeleitet aus Brooker, 1927; Smith, 1982; Kapslerbauer und Hunt, 1987; Tester und Morris, 1987; Townsend *et al.*, 1993). Die Messungen für Tageslicht, Sonnenaufgang und Mondlicht wurden in Leicester, UK durchgeführt (Smith, 1982). Die Werte für die in den Boden eindringende Lichtintensität wurden in Florence, USA gemessen (Kapslerbauer und Hunt, 1987; Tester und Morris, 1987). Die Messwerte für klare und trübe Gewässer wurden in Loch Borrallie und Black Loch, UK genommen (Smith, 1982).

Habitat	Weißlichtintensität ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Blaulichtanteil	
Tageslicht (Südseite)	1900 - 2000	≈ 5 %	≈ 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Tageslicht (Nordseite)	450 - 500	≈ 5 %	≈ 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Sonnenaufgang	26 - 32	≈ 10 %	≈ 3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Mondlicht	0,005 - 0,05	≈ 5 %	≈ 0,001 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
trockener Boden (5 mm Tiefe)	200 - 300	≈ 2 %	≈ 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
trockener Boden (10 mm Tiefe)	0,2 - 0,9	≈ 0,5 %	≈ 0,003 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
feuchter Boden (5 mm Tiefe)	0,1 - 0,5	≈ 2 %	≈ 0,01 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
klares Gewässer (1 m Tiefe)	300 - 600	≈ 20 %	≈ 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
klares Gewässer (10 m Tiefe)	1 - 20	≈ 60 %	≈ 6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
trübes Gewässer (1 m Tiefe)	0,1 - 0,5	≈ 20 %	≈ 0,1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
trübes Gewässer (10 m Tiefe)	0,001 - 0,01	≈ 30 %	≈ 0,001 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

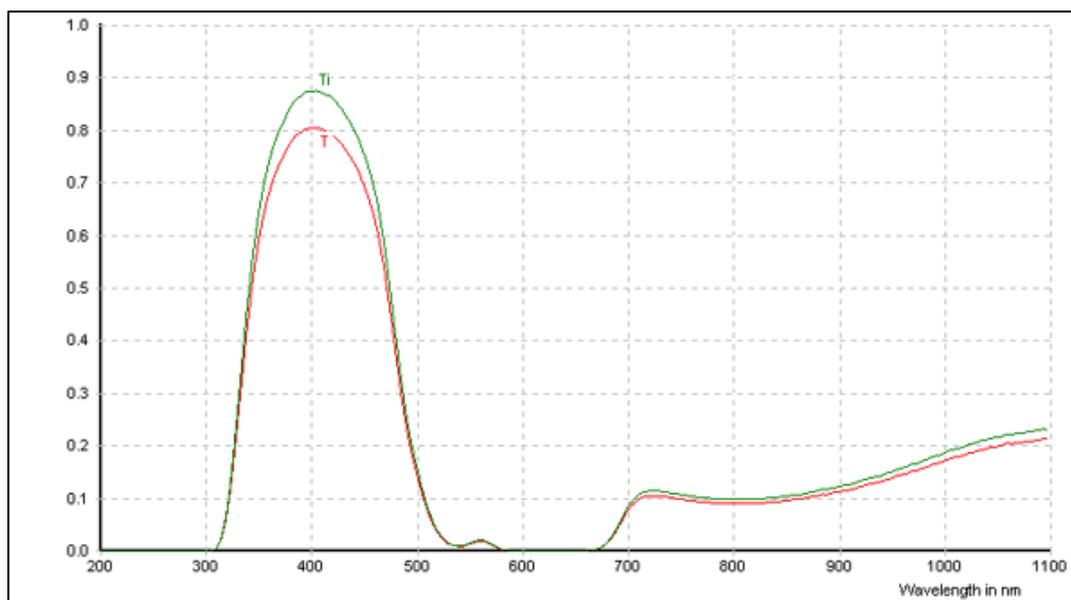


Abbildung 73 : Transmissionsspektrum des Blaulichtfilters BG12. (Quelle : Schott Jahreskatalog 2000)

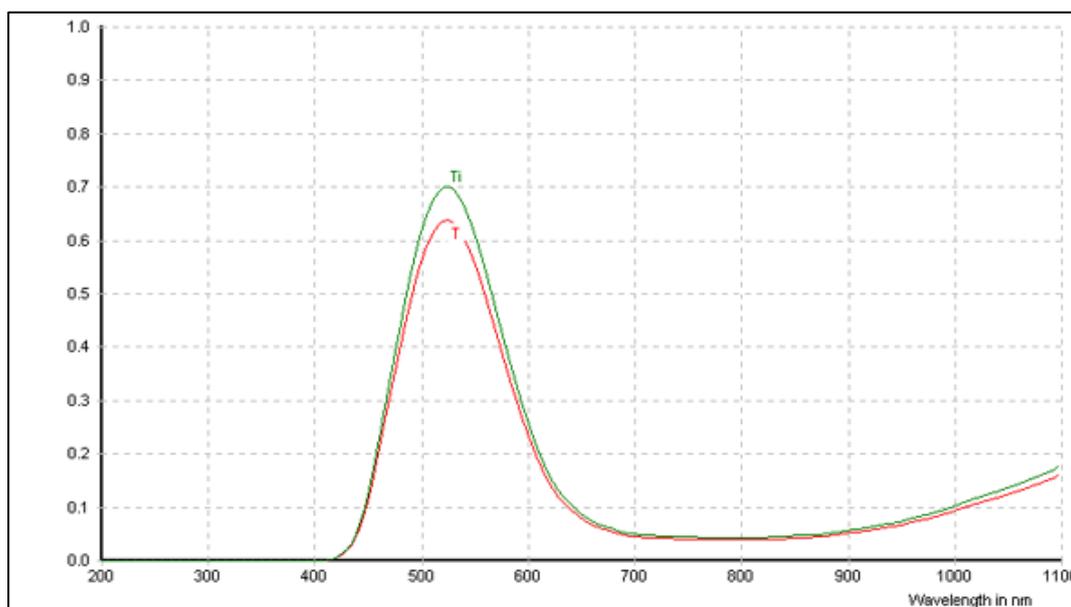


Abbildung 74: Transmissionsspektrum des Grünlichtfilters VG9. (Quelle : Schott Jahreskatalog 2000)

8.1 Datenträger mit den Rohdaten der *microarray* - Analyse

Der beigefügte Datenträger enthält die nach Versuchsbedingungen unterteilten („mikroaerobes Wachstum“, „Blaulichtbestrahlung“, „photooxidativer Stress“) Originaldaten der Transkriptomanalysen in jeweils einem separatem Ordner. Neben den vom *microarray* - scanner ermittelten Rohfluoreszenzwerte enthält ein weiterer Ordner ein Office2007 Excel - *file* mit den sortierbaren A - Werten und Ratios für alle Sonden („A-Werte und Ratios aller Transkriptomanalysen“) der drei Transkriptomanalysen. Die Sequenz der Sonde wird über ihre CUST - Nummer festgelegt und kann im fünften Ordner überprüft werden. Dieser („*design* des *microarrays*“) enthält die für die Erstellung der Sonden verwendeten Sequenzen der Gene und sRNAs von *R. sphaeroides* („Sequenzen der Gene und sRNAs“), sowie die Sequenzen der einzelnen Sonden auf dem *microarray* („Sondensequenzen“).

Eigene Veröffentlichungen

Metz S, Hendriks J, Jäger A, Hellingwerf K & Klug G (2010) „In Vivo Effects on Photosynthesis Gene Expression of Base Pair Exchanges in the Gene Encoding the Light-responsive BLUF Domain of AppA in *Rhodobacter sphaeroides*.“ *Photochem Photobiol*. Epub. May 2010

Hendrischk AK, Frühwirth SW, Moldt J, Pokorny R, **Metz S**, Kaiser G, Jäger A, Batschauer A & Klug G (2009) „A cryptochrome-like protein is involved in the regulation of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides*.“ *Mol Microbiol*. 74 : 990 - 1003

Metz S, Jäger A & Klug G (2009) „In vivo sensitivity of blue-light-dependent signaling mediated by AppA/PpsR or PrrB/PrrA in *Rhodobacter sphaeroides*.“ *J Bacteriol*. 191 : 4473 - 4477

Jäger A, Braatsch S, Habertzettl K, **Metz S**, Osterloh L, Han Y, 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 : 2274 - 2282

Teilnahme an Kongressen (Vorträge und Poster)

Sebastian Metz, Andreas Jäger & Gabriele Klug (2009) „Light-dependent gene regulation in *Rhodobacter sphaeroides* - Investigating the interplay between the AppA/PpsR- and PrrB/PrrA-system.“ Tagungsband der II. Jahrestagung des „Gießener Graduiertenzentrum Lebenswissenschaften“, **Vortrag**

Sebastian Metz, Andreas Jäger & Gabriele Klug (2009) „Light-dependent gene regulation in *Rhodobacter sphaeroides* - Investigating the interplay between the AppA/PpsR- and PrrB/PrrA-system.“ Biospektrum Sonderausgabe zur VAAM - Jahrestagung, Bochum, **Vortrag**

Sebastian Metz, Andreas Jäger & Gabriele Klug (2008) „Light-dependent gene regulation in *Rhodobacter sphaeroides* - Investigating the interplay between the AppA/PpsR- and PrrB/PrrA-system.“ Tagungsband der I. Jahrestagung des „Gießener Graduiertenzentrum Lebenswissenschaften“, **Posterpräsentation**

Sebastian Metz, Andreas Jäger & Gabriele Klug (2008) „Light-dependent gene regulation in *Rhodobacter sphaeroides* - Investigating the interplay between the AppA/PpsR- and PrrB/PrrA-system.“ Tagungsband des 27th Symposium on Mechanisms of Gene Regulation, Witzenhausen, **Vortrag**

Sebastian Metz, Andreas Jäger & Gabriele Klug (2008) „Light-dependent gene regulation in *Rhodobacter sphaeroides* - Investigating the interplay between the AppA/PpsR- and PrrB/PrrA-system.“ Biospektrum Sonderausgabe zur VAAM - Jahrestagung, Frankfurt a. M., **Posterpräsentation**

Sebastian Metz, Yuchen Han, Andreas Jäger & Gabriele Klug (2008) „Light-dependent gene regulation in *Rhodobacter sphaeroides* - Investigating the interplay between the AppA/PpsR- and PrrB/PrrA-system.“ Tagungsband der Gordon Research Conference *Photosensory Receptors & Signal Transduction*, Ventura, USA, **Posterpräsentation**

Sebastian Metz, Yuchen Han, Andreas Jäger & Gabriele Klug (2007) „Light-dependent gene regulation in *Rhodobacter sphaeroides* - Investigating the interplay between the AppA/PpsR- and PrrB/PrrA-system.“ Biospektrum Sonderausgabe zur VAAM - Jahrestagung, Osnabrück, **Posterpräsentation**

Sebastian Metz, Yuchen Han & Gabriele Klug (2006) „Light-dependent gene regulation in *Rhodobacter sphaeroides* - Investigating the role of the repressor PpsR on the expression of the *puf* - operon.“ Tagungsband des 26th Symposium on Mechanisms of Gene Regulation, Königswinter, **Posterpräsentation**

Ein herzliches „*Danke*“ möchte ich allen sagen, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben!

Mein besonderer Dank gilt dabei ...

- *Prof. Dr. Gabriele Klug*, die mich während meiner Zeit in der MiBi immer unterstützte und immer ein offenes Ohr und Ratschläge für die kleinen und großen Probleme des Laboralltags besaß. Weiterhin möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken dieses interessante und vielseitige Projekt zu bearbeiten.
- *Prof. Dr. Annegret Wilde*, für die anregenden Diskussionen und die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.
- *Prof. Dr. Klaas Hellingwerf* und *Dr. Johnny Hendriks* für die vielen hilfreichen Ideen im AppA - Projekt und den kleinen Einblick in die Welt der Biophysik während meines Besuches in Amsterdam.
- *Jürgen Tomasch* für seine unverzichtbare Hilfe und die vielen kleinen Tipps bei Anfertigung und Auswertung der Transkriptomanalysen, sowie der Verwendung der *software „R“*.
- *Dr. Birgit Samans* für die vielen, vielen guten Ratschläge zur Welt der Statistik und der Auswertung der Datenflut in den Transkriptomanalysen.
- der *JLU* für die zweijährige finanzielle Unterstützung in Form des „Graduiertenstipendiums der Justus - Liebig - Universität“.
- *Andreas Jäger*, der mir mit unzähligen Kleinigkeiten die Arbeit im Labor seit dem ersten Tag erst möglich gemacht hat, mir eine große Hilfe bei Klonierungsarbeiten war und dessen Späße und Sprüche das Labor zu einem besseren Ort erhoben.
- *Dr. Anne - Kathrin Hendrischk* für die tolle Zeit im Labor (vor allem in den frühen Stunden), die Gesellschaft auf meiner ersten Tagung in Königswinter, die vielen netten Gespräche und das letzte Korrekturlesen meiner Arbeit.
- *Verena Peuser*, der guten Seele von L236, die es immer wieder geschafft hat, mich aufzumuntern, immer ein Ohr für ein nettes Gespräch hatte und die eine unverzichtbare Hilfe bei den Projekten „Bratwurst“ und „Dosenwerfen“ auf den Fachbereichstagen war.
- *Sebastian Frühwirth*, meinem „Blaulichtkollegen“, für die vielen aufmunternden Gespräche und die „spannende“ Zeit in Braunschweig, bevor wir wussten, ob der erste *microarray* wirklich funktioniert.
- *Yannick Hermanns*, meinem ersten Projektpraktikanten und *tabletop - buddy*, für die wirklich tolle Zeit inner - und außerhalb des Labors.

-
- *Nils Mank*, meinem letzten Projektpraktikanten und mittlerweile auch BuchtKollegen im Labor, dafür, dass er mich immer wieder zum Lachen gebracht und die große Aufgabe des Atomkraftbeauftragten übernommen hat.
 - *Bork Berghoff*, dem „*Godfather of small RNAs*“, für die Beantwortung vieler kleiner und großer Fragen, der Hilfe bei der Erstellung des *microarrays*, die schöne Zeit im Labor und die aufbauenden Gespräche.
 - *Aaron Nuss*, dem „*major player*“ der σ^E - und RpoHI / HII - Antwort, für die Hilfe bei allen Sauerstoffstress - bedingten Fragen.
 - *Ramakanth Madhugiri* und *Shoba Rani Basineni* für die vielen netten Gespräche und das Versüßen der Zeit im *hot lab*.
 - *Dr. Steffen Wagner*, *Dr. Jasmin Weisel*, *Verena Roppelt*, *Tom Rische* und *Dr. Elena Evguenieva - Hackenberg*, die bei allen Protein - bedingten Fragen immer eine Antwort und einen guten Ratschlag bereit hielten.
 - *Kerstin Habertzettl* für die unverzichtbare Hilfe bei allen Arbeiten rund um die Hefen und die vielen kleinen und großen Hilfen im Labor.
 - *Angelika Balzer* für die kleinen und großen Hilfen im Labor und das Fläschchen RÄ zur rechten Zeit.
 - *Dr. Mobarak Abu Mraheil*, der durch seine hilfsbereite und offene Art auch die schwierigen Tage im Labor erheitert hat.
 - *Dr. Jens Glaeser* für viele anregende Diskussionen.
 - den Ehemaligen *Dr. Tanja Zeller*, *Dr. Hendrik Happ*, *Dr. Pamela Finsterseifer*, *Dr. Yuchen Han* und *Dr. Sonja Hundt* für die tolle Zeit zu Beginn meiner Promotion.
 - *Sabine Mutz* und *Susanne Barth - Weber* für die schnelle Bearbeitung der Sequenzen und die vielen Tipps, wenn diese mal nicht so gut aussahen.
 - dem *GGL* für das interessante Kursangebot in den beiden letzten Jahren meiner Promotion.
 - *Hartmann - Analytic* für die Versorgung mit Atomkraft und die stetige Akkumulation von Doppelstrangbrüchen und Basenaustauschen in meinem Genom.
 - *meiner Mutter*, *meinem Vater*, *meiner Schwester*, *meiner Nichte*, *meinem Neffen*, *meiner Großmutter*, *meinem Onkel* und dem Rest meiner Familie für die ständige Unterstützung und das Verständnis, dass ich auch mal länger nicht nach Hause kommen konnte.
 - zu guter Letzt meiner Freundin *Carolin*, die mir immer eine Stütze war, mich vom schnöden Laboralltag abzulenken vermochte, mich mit Kuchen und Stückchen versorgte, meine Macken und seltsamen Hobbies tolerierte und mir eine große Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit war.