

Inauguraldissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

**Unterschiedliche und gemeinsame  
Strategien der photooxidativen  
Stressantwort zwischen  
*Rhodobacter capsulatus* und  
*Rhodobacter sphaeroides***

Vorgelegt von

Mathieu Karel Licht (M.Sc. Mikrobiologie)

angefertigt am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie

Fachbereich Biologie und Chemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

November 2020

---

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen, in der Zeit vom September 2016 bis November 2020 unter der Leitung von Prof. Dr. Gabriele Klug angefertigt.

**Erstgutachterin:** **Prof. Dr. Gabriele Klug**  
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Heinrich-Buff-Ring 26–32, 35392 Gießen

**Zweitgutachter:** **Prof. Dr. Albrecht Bindereif**  
Institut für Biochemie  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Heinrich-Buff-Ring 17, 35392 Gießen

---

# Erklärung

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

Rauenberg, 9. November 2020

Mathieu Karel Licht

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>viii</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>x</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>xii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Rhodobacter</i> als Modellorganismus	1
1.2 Oxidativer Stress	2
1.2.1 Unterteilung reaktiver Sauerstoffspezies	3
1.2.2 $^1\text{O}_2$ und photooxidativer Stress	5
1.2.3 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies durch Elektronenübertragung	7
1.3 $^1\text{O}_2$ -induzierte Schäden an Biomolekülen	10
1.3.1 Proteinschäden	10
1.3.2 Nukleinsäureschäden	11
1.3.3 Lipidperoxidation	11
1.4 Regulation der bakteriellen Genexpression im Allgemeinen	12
1.5 Regulation der Photosynthesegene in <i>Rhodobacter</i>	15
1.5.1 Regulatoren der Photosynthesegene	15
1.5.2 Carotinoide – Lichtabsorption und Quenching	19
1.6 Regulation der (photo-)oxidativen Stressantwort in <i>R. sphaeroides</i>	22
1.6.1 Alternative Sigmafaktoren der (photo-)oxidativen Stressantwort in <i>R. sphaeroides</i>	22
1.6.2 Kleine RNAs der (photo-)oxidativen Stressantwort in <i>R. sphaeroides</i>	24
1.7 Zielsetzung der Arbeit	25
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>26</b>
2.1 Materialien	26
2.1.1 Stämme und Plasmide	26
2.1.2 Oligonukleotide	29
2.1.3 Reagenzien	31
2.1.4 Enzyme und molekularbiologische Kits	31
2.1.5 Nährmedien	32
2.1.6 Geräte	34
2.2 Sterilisation und Reinigung der Glasware	34
2.3 Mikrobiologische Methoden	35
2.3.1 Kultivierung von Mikroorganismen	35
2.3.2 Messung der optischen Dichte	36
2.3.3 Kryokonservierung	36
2.3.4 Photooxidative Stressexperimente mit Flüssigkulturen	36
2.3.5 Messung des Pigmentgehalts	37
2.3.6 Aufnahme von Vollzellspektren	38

---

2.3.7	Messung reaktiver Sauerstoffspezies . . . . .	38
2.3.7.1	Messung reaktiver Sauerstoffspezies via H <sub>2</sub> DCFDA . . . . .	38
2.3.7.2	<sup>1</sup> O <sub>2</sub> -Messung mittels Singulett Oxygen Sensor Green . . . . .	38
2.3.8	Zellernte für RNA- und Proteinuntersuchungen . . . . .	39
2.3.9	Hemmhoftests . . . . .	39
2.3.10	Methanolstresstest in <i>Rhodobacter</i> . . . . .	40
2.3.11	Beta-Galaktosidase-Assay . . . . .	40
2.3.12	Elektrotransformation von <i>E. coli</i> . . . . .	41
2.3.13	Mikroskopie . . . . .	42
2.3.14	Konjugation von Plasmiden zu <i>R. capsulatus</i> . . . . .	42
2.4	Molekularbiologische Methoden . . . . .	43
2.4.1	Extraktion von Nukleinsäuren aus Bakterien . . . . .	43
2.4.1.1	Extraktion chromosomaler DNA aus <i>Rhodobacter</i> . . . . .	43
2.4.1.2	Extraktion von RNA aus <i>Rhodobacter</i> . . . . .	44
2.4.1.2.1	RNA-Extraktion mit Hot-Phenol . . . . .	44
2.4.1.2.2	RNA-Extraktion mit Trizol . . . . .	45
2.4.1.3	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> . . . . .	45
2.4.2	Extraktion von DNA aus Agarosegelen . . . . .	47
2.4.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren . . . . .	47
2.4.4	DNase-Verdau von RNA . . . . .	47
2.4.5	Restriktionsspaltung von DNA . . . . .	47
2.4.6	Dephosphorylierung von DNA . . . . .	48
2.4.7	Ligation von DNA und n-Butanolfällung . . . . .	48
2.4.8	Northern-Blot-Analyse . . . . .	49
2.4.8.1	Radioaktivmarkierung von Sonden . . . . .	49
2.4.8.2	Hybridisierung von sRNA mit radioaktiv markierten Sonden . . . . .	50
2.4.8.3	Stripping von Northern Blot-Membranen . . . . .	50
2.4.8.4	Phosphoimaging und Auswertung von Northern Blots . . . . .	51
2.4.9	Amplifikation von Nukleinsäuren . . . . .	51
2.4.10	Quantitative Real Time-PCR . . . . .	53
2.5	Gelelektrophoretische Methoden . . . . .	54
2.5.1	Agarosegelelektrophorese . . . . .	54
2.5.2	Polyacrylamid-Minigele . . . . .	56
2.5.3	Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamidgele und Northern Blotting . . . . .	56
2.6	'Omics'-Analysen . . . . .	58
2.6.1	Transcriptomics . . . . .	58
2.6.2	Proteomics . . . . .	58
2.7	Bioinformatische Methoden und Statistik . . . . .	58
2.7.1	Alignments, Homologie- und Syntänie-Analysen . . . . .	58
2.7.2	Phylogenetische Analysen . . . . .	59
2.7.3	sRNA-Ziel-Vorhersagen . . . . .	59
2.7.4	STRING-Datenbank-Analyse . . . . .	60
2.7.5	Analyse funktionell angereicherter Gruppen . . . . .	60
2.8	Statistische Auswertungen . . . . .	61

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
3.1	Physiologie der $^1\text{O}_2$ -Antwort . . . . .	63
3.1.1	Wachstum unter verschiedenen Licht- und Sauerstoffbedingungen . . . . .	64
3.1.2	Pigmentierung unter verschiedenen Licht- und Sauerstoffbedingungen . . . . .	67
3.1.3	Phototrophes Wachstum und Pigmentierung von grünen <i>Rhodobacter-Tn5</i> -Mutanten mit unterbrochener Carotinoid-Biosynthese . . . . .	72
3.1.4	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies unter photooxidativem Stress . . . . .	75
3.1.4.1	Entwicklung eines <i>in vivo</i> - $^1\text{O}_2$ -Assays für <i>Rhodobacter</i> . . . . .	75
3.1.4.2	Quantifizierung von $^1\text{O}_2$ und allgemeinen ROS in <i>Rhodobacter</i> . . . . .	78
3.1.4.3	Sensitivität gegenüber $^1\text{O}_2$ und anderen reaktiven Sauerstoffspezies . . . . .	79
3.2	Regulatorische Faktoren der $^1\text{O}_2$ -Antwort von <i>R. capsulatus</i> . . . . .	80
3.2.1	Alternative Sigmafaktoren . . . . .	80
3.2.1.1	RpoE und ChrR in der $^1\text{O}_2$ . . . . .	80
3.2.1.2	Regulation der $^1\text{O}_2$ -Antwort von <i>R. capsulatus</i> durch RpoH <sub>II</sub> und RpoH <sub>I</sub> . . . . .	87
3.2.2	Kleine RNAs . . . . .	88
3.3	Funktionelle Antwort des Transkriptom auf $^1\text{O}_2$ . . . . .	93
3.4	Funktionelle Antwort des Proteoms auf $^1\text{O}_2$ . . . . .	99
3.5	Vergleich der $^1\text{O}_2$ -Antwort von Transkriptom und Proteom in <i>Rhodobacter capsulatus</i> . . . . .	109
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>113</b>
4.1	Einschätzung der Omics-Datenlage . . . . .	115
4.2	Physiologische Unterschiede der $^1\text{O}_2$ -Antwort zwischen <i>R. capsulatus</i> und <i>R. sphaeroides</i> . . . . .	117
4.2.1	<i>R. capsulatus</i> produziert weniger reaktive Sauerstoffspezies als <i>R. sphaeroides</i> zu Beginn photooxidativen Stresses . . . . .	117
4.2.2	Sensitivität gegenüber verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies in <i>R. capsulatus</i> und <i>R. sphaeroides</i> . . . . .	118
4.2.3	Schutzpotential der $^1\text{O}_2$ -induzierten Carotinoid-BChl <i>a</i> -Verhältnis-Erhöhung in <i>R. capsulatus</i> . . . . .	119
4.3	Regulation der $^1\text{O}_2$ -Antwort in <i>R. capsulatus</i> . . . . .	121
4.3.1	Rolle des <i>rpoEchrR</i> -Lokus und RpoH . . . . .	121
4.3.2	Kleine RNAs in <i>R. capsulatus</i> unter photooxidativem Stress . . . . .	122
4.4	Funktionelle Unterschiede der $^1\text{O}_2$ -Antwort zwischen <i>R. capsulatus</i> und <i>R. sphaeroides</i> . . . . .	123
4.4.1	CbiX und das <i>crtI-tspO</i> -Operon als potentielle Schlüsselfaktoren der photooxidativen Stressantwort in <i>R. capsulatus</i> . . . . .	123
4.4.1.1	Eisenchelation durch CbiX zur Vermeidung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Fenton-Reaktion . . . . .	123
4.4.1.2	Potentielle Vermeidung der Protoporphyrin IX-Bildung durch <i>crtI-tspO</i> -Expression in <i>R. capsulatus</i> . . . . .	126
4.4.2	<i>R. capsulatus</i> und <i>R. sphaeroides</i> teilen sich mit verschiedenen Genen eine ähnliche Kernantwort auf $^1\text{O}_2$ . . . . .	126
4.4.2.1	Schutz des Proteoms . . . . .	126
4.4.2.2	DNA-Schutz . . . . .	128

4.4.3	Zunahmen von Transkripten und Proteinen von Reduktions- Oxidations-Prozessen und sonstiger funktioneller Gruppen . . . . .	129
4.4.4	Abnahmen von Transkripten und Proteinen . . . . .	130
4.4.4.1	Abnahme von Transkripten und Proteinen für Transport- prozesse . . . . .	130
4.4.4.2	Abnahme von Transkripten und Proteinen für Fortbewe- gung, Signaltransduktion und Gasvesikel . . . . .	131
4.4.4.3	Abnahme von Transkripten und Proteinen des Citratzyklus	132
4.4.4.4	Abnahme von Transkripten und Proteinen diverser Funk- tionen . . . . .	132
4.4.4.5	Abnahme von Transkripten und Proteinen nach 180 min photooxidativem Stress . . . . .	133
4.5	Relevanz der Ergebnisse im größeren Kontext . . . . .	134
4.5.1	Implikationen für mikrobielle Ökologie . . . . .	134
4.5.2	Implikationen für biotechnologische Anwendungen mit <i>Rhodobacter</i>	135
4.6	Ausblick und offene Fragen . . . . .	135
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>137</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>138</b>
<b>7</b>	<b>Referenzen</b>	<b>139</b>
7.1	Publikationen und Konferenzbeiträge . . . . .	162
7.2	Abschlussarbeiten . . . . .	162
<b>Anhang</b>		<b>163</b>
A.1	Zusätzliche Informationen zu Methoden . . . . .	163
A.2	Zusätzliche Ergebnisse . . . . .	165
<b>Danksagung</b>		<b>170</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies . . . . .	4
1.2	Entstehung von $^1\text{O}_2$ . . . . .	6
1.3	Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies in der Atmungskette . . . . .	7
1.4	Eisenkatalysierte Haber-Weiss-Reaktion . . . . .	8
1.5	Lipidperoxidation via $^1\text{O}_2$ . . . . .	12
1.6	Schema eines Zwei-Komponenten-Regulationssystems . . . . .	13
1.7	Wechselwirkung zwischen sRNAs und ihren Ziel-mRNAs . . . . .	14
1.8	Schema der Regulation der Transkription der Photosynthesegene durch PpsR/AppA in <i>R. sphaeroides</i> . . . . .	16
1.9	Cobalamin-gesteuerte AerR-Aktivität in <i>R. capsulatus</i> . . . . .	17
1.10	Schema der Regulation der Transkription der Photosynthese in <i>R. capsulatus</i> und <i>R. sphaeroides</i> . . . . .	19
1.11	Carotinoidbiosynthese in <i>Rhodobacter</i> . . . . .	20
1.12	Regulation der $^1\text{O}_2$ -Antwort in <i>R. sphaeroides</i> . . . . .	23
2.1	Schema des photooxidativen Stressexperiments . . . . .	37
2.2	Beispiel der Zuordnung von Transkripten und Proteinen in der BiNGO-Analyse	61
3.1	Wachstum von <i>Rhodobacter</i> unter verschiedenen Licht- und Sauerstoffbedingungen . . . . .	65
3.2	Wachstum von <i>Rhodobacter</i> unter photooxidativem Stress . . . . .	66
3.3	Pigmentierung in <i>Rhodobacter</i> unter mikroaeroben Bedingungen . . . . .	67
3.4	Pigmentierung in <i>Rhodobacter</i> beim Wechsel von mikroaeroben zu aeroben Bedingungen . . . . .	68
3.5	Pigmentierung in <i>Rhodobacter</i> beim Wechsel von aeroben zu anaeroben (phototrophen) Bedingungen . . . . .	69
3.6	Pigmentierung in <i>Rhodobacter</i> unter photooxidativem Stress . . . . .	70
3.7	Carotinoid-BChl <i>a</i> -Verhältnis in <i>Rhodobacter</i> unter verschiedenen Licht- und Sauerstoffbedingungen . . . . .	71
3.8	Wachstum und Pigmentierung in <i>R. capsulatus</i> 37b4 und <i>R. sphaeroides</i> KD131 unter photooxidativem Stress . . . . .	72
3.9	Färbung von <i>Rhodobacter</i> -Tn5-Mutanten mit unterbrochener Carotinoid-Biosynthese . . . . .	73
3.10	Analyse von grünen <i>Rhodobacter</i> -Tn5-Mutanten mit unterbrochener Carotinoid-Biosynthese . . . . .	74
3.11	Excitations- und Emissionsspektren von SOSG . . . . .	75
3.12	Lichtbedingungen für SOSG-Versuche . . . . .	76
3.13	Wachstum von <i>R. capsulatus</i> -Kulturen mit Methanol . . . . .	77
3.14	Mikroskopie von <i>R. capsulatus</i> mit und ohne SOSG . . . . .	77
3.15	Intrazelluläre $^1\text{O}_2$ - und ROS-Level in <i>Rhodobacter</i> unter photooxidativem Stress . . . . .	78
3.16	Hemmhoftest mit <i>R. capsulatus</i> und <i>R. sphaeroides</i> . . . . .	79

---

3.17	Bootstrap Maximum Likelihood-Baum auf Basis von <i>rpoE</i> . . . . .	82
3.18	Bootstrap Maximum Likelihood-Baum auf Basis von <i>chrR</i> . . . . .	83
3.19	Syntänie-Plot für <i>R. sphaeroides</i> und <i>R. capsulatus</i> . . . . .	84
3.20	Syntänie von <i>rpoE</i> in <i>Rhodobacter</i> . . . . .	85
3.21	Syntänie von RpoH <sub>I</sub> und RpoH <sub>II</sub> in <i>Rhodobacter</i> . . . . .	87
3.22	Hemmhofstest mit <i>R. capsulatus</i> und <i>rpoH</i> -Mutanten . . . . .	88
3.23	Mögliche Ziele des XRE-Transkriptionsfaktors RCAP_rcc02527 . . . . .	91
3.24	Auswirkungen einer konstitutiven RCs01897-Überexpression in <i>R. capsulatus</i>	92
3.25	Verteilung von <sup>1</sup> O <sub>2</sub> -induzierten log <sub>2</sub> -Veränderungen im Transkriptom von <i>R. capsulatus</i> (10/0 min <sup>1</sup> O <sub>2</sub> -Stress) . . . . .	93
3.26	Relative Transkriptlevel (RTL) ausgewählter Gene in <i>Rhodobacter</i> nach Beginn photooxidativen Stresses . . . . .	94
3.27	Funktionelle Charakterisierung von Transkripten mit erhöhter Abundanz nach 10 min photooxidativem Stress in <i>R. capsulatus</i> . . . . .	95
3.28	Funktionelle Charakterisierung von Transkripten mit verringerter Abundanz nach 10 min photooxidativem Stress in <i>R. capsulatus</i> . . . . .	98
3.29	Verteilung von <sup>1</sup> O <sub>2</sub> -induzierten log <sub>2</sub> -Veränderungen im Proteom von <i>R. cap-</i> <i>sulatus</i> . . . . .	99
3.30	Korrelation zwischen LC-MS/MS-Daten verschiedener Zeitpunkte unter <sup>1</sup> O <sub>2</sub> -Stress in <i>R. capsulatus</i> . . . . .	100
3.31	Funktionelle Charakterisierung von Proteinen mit verringerter/erhöhter Abundanz nach 45 min photooxidativem Stress in <i>R. capsulatus</i> . . . . .	102
3.32	Funktionelle Charakterisierung von Proteinen mit erhöhter Abundanz nach 90 min photooxidativem Stress . . . . .	104
3.33	Funktionelle Charakterisierung von Proteinen mit verringerter Abundanz nach 90 min photooxidativem Stress . . . . .	106
3.34	Funktionelle Charakterisierung von Proteinen mit verringerter/erhöhter Abundanz nach 180 min photooxidativem Stress in <i>R. capsulatus</i> . . . . .	108
3.35	Korrelation zwischen Proteom- und Transkriptomveränderungen unter <sup>1</sup> O <sub>2</sub> - Stress . . . . .	110
3.36	Die zentralen funktionellen Zunahmen der <sup>1</sup> O <sub>2</sub> -Antwort in <i>R. capsulatus</i> .	111
3.37	Übersicht über gemeinsame Abnahmen in Transkriptom und Proteom unter <sup>1</sup> O <sub>2</sub> -Stress in <i>R. capsulatus</i> . . . . .	112
4.1	Zusammenfassung der wesentlichen Unterschiede in der photooxidativen Stressantwort zwischen <i>R. capsulatus</i> und <i>R. sphaeroides</i> . . . . .	114
A.1	Veränderungen der Expression von <i>chrR</i> in <i>R. capsulatus</i> nach Beginn photooxidativen Stresses . . . . .	166
A.2	Mögliche sRNAs von <i>R. capsulatus</i> in RNA-Seq . . . . .	166
A.3	Korrelationsanalyse von RNA-Seq-Replikaten . . . . .	167
A.4	PCA von RNA-Seq- und LC-MS/MS-Replikaten . . . . .	168
A.5	Promotoraktivitäten in <i>R. capsulatus</i> unter H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Stress. . . . .	168
A.6	Korrelationsanalyse von LC-MS/MS-Replikaten . . . . .	169

# Tabellenverzeichnis

1.1	Wesentliche Produkte der Reaktionen von Aminosäuren mit $^{18}\text{O}_2$ . . . . .	10
2.1	Auflistung der verwendeten Stämme . . . . .	26
2.2	Plasmide für <i>R. capsulatus</i> und <i>E. coli</i> . . . . .	28
2.3	Oligonukleotide für Klonierungen, quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR) und Northern Blotting (NB) . . . . .	29
2.4	Verwendete Größenstandards . . . . .	31
2.5	Verwendete Antibiotika . . . . .	31
2.6	Verwendete Enzyme und molekularbiologische Kits . . . . .	31
2.7	Zusammensetzung von 1 l Rhodobacter-Äpfelsäure-Medium . . . . .	32
2.8	Zusammensetzung von 1 l Spurenelementlösung . . . . .	32
2.9	Zusammensetzung von 1 l Vitaminlösung . . . . .	33
2.10	Zusammensetzung von 1 l Phosphatlösung . . . . .	33
2.11	Zusammensetzung von 1 l Standard I-Nährmedium . . . . .	33
2.12	Zusammensetzung von 1 l Peptone-Yeast-Agar (PY-Agar) . . . . .	33
2.13	Allgemein verwendete Laborgeräte . . . . .	34
2.14	Übersicht über Volumina und Zeitpunkte von Probenahmen für RNA- und Proteinuntersuchungen . . . . .	39
2.15	Zusammensetzung von 1 l Z-Puffer . . . . .	41
2.16	Zusammensetzung von 100 ml TE-Puffer . . . . .	43
2.17	Zusammensetzung von 100 ml TrisHCl-Puffer . . . . .	44
2.18	Zusammensetzung von 100 ml RNA-Lösung I (Resuspensionspuffer) . . . . .	45
2.19	Zusammensetzung von 100 ml RNA-Lösung II (Lysispuffer) . . . . .	45
2.20	Zusammensetzung von 80 ml Minipräp-Lösung I . . . . .	46
2.21	Zusammensetzung von 20 ml Minipräp-Lösung II . . . . .	46
2.22	Zusammensetzung von 100 ml Minipräp-Lösung III . . . . .	47
2.23	Zusammensetzung eines Ligationsansatzes . . . . .	49
2.24	Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Radioaktivmarkierung von Oligonukleotiden . . . . .	49
2.25	Zusammensetzung von 100 ml STE-Puffer . . . . .	49
2.26	Zusammensetzung von 100 ml Church Low-Puffer . . . . .	50
2.27	Zusammensetzung von Taq- und Phusion-basierten PCR-Ansätzen . . . . .	52
2.28	PCR-Programme . . . . .	52
2.29	Zusammensetzung eines qRT-PCR-Mastermix . . . . .	53
2.30	qRT-PCR-Programm . . . . .	54
2.31	Verwendete TAE-/TBE-Konzentrationen für Agarosegelelektrophoresen . . . . .	55
2.32	Zusammensetzung von je 1 l 10 $\times$ -TAE bzw. 10 $\times$ -TBE-Puffer . . . . .	55
2.33	Zusammensetzung von 10 $\times$ -Ladepuffer . . . . .	55
2.34	Zusammensetzung einer Polygelmasse für ein Minigel . . . . .	56
2.35	Zusammensetzung eines Harnstoff-Polyacrylamidgels . . . . .	57
2.36	Zusammensetzung von FU-Mix . . . . .	57

---

3.1	pBlast-Ergebnisse mit <i>rpoE</i> und <i>chrR</i> in <i>Rhodobacter</i> . . . . .	80
3.2	Übersicht über ausgewählte Strukturhomologe der Antisigmafaktoren ChrR ( <i>R. capsulatus</i> und <i>R. sphaeroides</i> ) und RskA ( <i>M. tuberculosis</i> ) . . . . .	81
3.3	Transkriptomveränderungen im <i>rpoE</i> -Regulon von <i>R. sphaeroides</i> nach photooxidativem Stress im Vergleich zu <i>R. capsulatus</i> . . . . .	86
3.4	Mögliche sRNAs in <i>R. capsulatus</i> . . . . .	88
3.5	Mögliche sRNA-Ziele . . . . .	89
A.1	Annealingtemperaturen und Effizienzen für qRT-PCR-Primer . . . . .	163
A.2	Einstellung für MUSCLE Alignment Options in MEGA X . . . . .	164
A.3	Einstellung für Phylogeny Reconstruction in MEGA X . . . . .	164
A.4	Einstellung für mRNA-Ziel-Vorhersagen beim Online-Tool IntaRNA . . . .	165
A.5	Einstellung für mRNA-Ziel-Vorhersagen beim Online-Tool TargetRNA2 . .	165
A.6	Verdopplungszeiten von <i>Rhodobacter</i> . . . . .	165

# Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bchl <i>a</i>	Bacteriochlorophyll <i>a</i>
BiNGO	Biological Networks Gene Ontology Tool
<sub>dd</sub> H <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DIC	Differential Interference Contrast (Differentialinterferenzkontrast)
EVC	Empty Vector Control (Leervektorkontrolle)
FAD	Flavinadenindinukleotid
FADH <sub>2</sub>	Dihydroflavinadenindinukleotid
GFP	Green Fluorescent Protein (grün fluoreszierendes Protein)
GO	Gene Ontology
H <sub>2</sub> DCFDA	2,7-Dihydrodichlorofluorescein-Diacetat
HEPES-Puffer	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
LHC	Light Harvesting Complex (Lichtsammelkomplex)
MB	Methylenblau
MU	Miller Units (Millereinheiten)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotidhydrid
OD <sub>660</sub>	optische Dichte bei 660 nm
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
PCA	Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PY	Peptone Yeast
PYP	Photoactive Yellow Protein
qRT-PCR	quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction (quantitative Real Time-Polymerasekettenreaktion)
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
RTL	relatives Transkriptlevel
RÄ	Rhodobacter-Äpfelsäure
SD	Standardabweichung
SOSG	Singlet Oxygen Sensor Green
sRNA	small RNA (kleine RNA)
StI	Standard I
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
t <sub>d</sub>	Verdopplungszeit
TEMED	Tetramethylethylendiamin
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
ü.N.	über Nacht

# 1 Einleitung

Mikroorganismen zeichnen sich durch eine hohe Stoffwechselvielfalt aus. Sie können die unterschiedlichsten ökologischen Nischen besetzen, unabhängig vom Nährstoffangebot, der Salinität oder von Extremtemperaturen. Erfolgreiches mikrobielles Wachstum erfordert die Anpassung an wechselnde Umgebungsbedingungen mit einer effizienten Energiegewinnung. Ohne mikrobielle Anpassung können wechselnde Umweltbedingungen (tödlichen) Stress auf Bakterien ausüben. In aquatischen Lebensräumen z.B. variieren über kurze und lange Zeiträume Temperatur, Sauerstoffkonzentration oder Lichtbedingungen stark. Auch üben biologische Faktoren Selektionsdruck aus, z.B. die von Mikroben an die Umwelt abgegebenen Antibiotika. Die benötigte Energie für erfolgreiches Wachstum können Bakterien über verschiedene Arten gewinnen: Photosynthese, anaerobe und aerobe Atmung sowie Gärung. *Rhodobacter capsulatus* und *Rhodobacter sphaeroides* sind zwei Bakterien, welche alle vier der genannten Arten der Energiegewinnung nutzen können. Sie leben hauptsächlich in aquatischen und damit sehr dynamischen Habitaten. Beide Arten sind als Modellorganismen für bakterielle Genregulation etabliert.

## 1.1 *Rhodobacter* als Modellorganismus

Die Gram-negativen Alphaproteobakterien *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* sind zwei nahe verwandte Vertreter der Gattung *Rhodobacter*. Als Nicht-Schwefelpurpurbakterien verfügen beide Arten über eine charakteristisch große Stoffwechselvielfalt. Nicht nur betreibt *Rhodobacter* Stickstofffixierung (Avtges et al. 1985) und Biosynthese von Polyhydroxybutyrat (Kranz et al. 1997), *Rhodobacter* gewinnt auch über mehrere Wege Adenosintriphosphat (ATP), nämlich durch anoxygene Photosynthese, aerobe oder anaerobe Atmung und Gärung (Kranz et al. 1997; van Niel 1944; Yen und Marrs 1976). Zwar lebt *Rhodobacter* auch in Böden (Lin et al. 2014; Zhao et al. 2009), jedoch kommen die meisten Vertreter überwiegend in Süß- und Salzwässern vor (van Niel 1944; Yen und Marrs 1976). Neben der Temperatur bestimmen die tiefen- und tageszeitabhängigen Lichtstärken und wechselnden Sauerstoffkonzentrationen den Lebensstil von *Rhodobacter*. Als nicht-pathogene, vollständig sequenzierte Bakterien (Mackenzie et al. 2001; Mackenzie et al. 2007; Strnad et al. 2010) sind *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* etablierte Modellorganismen für die licht- und sauerstoffabhängige Regulation von Photosynthesegenen (Gregor und Klug 1999; Klug et al. 1987; Klug et al. 1985; Newman et al. 1999). Im Detail besteht das Genom des Stamms *R. capsulatus* SB1003 (Yen und Marrs 1976) aus einem Chromosom und einem Plasmid (insgesamt 3,7 Mb) und das des Stamms *R. sphaeroides* 2.4.1 (van Niel 1944)

aus zwei Chromosomen und fünf Plasmiden (insgesamt 4,6 Mb). In dieser Arbeit wurden hauptsächlich die Wildtypstämme *R. capsulatus* SB1003 und *R. sphaeroides* 2.4.1 verwendet. Sofern nicht anders angegeben, sind daher bei Nennung von *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* diese Stämme gemeint.

Ungeachtet der Fragestellungen zur Genregulation ist *Rhodobacter* auch für diverse biotechnologische Prozesse von Interesse. Beispielsweise könnte *Rhodobacter* diverse landwirtschaftliche Abfälle und Rückstände abbauen, etwa Stroh, Abwasser oder Insektizidreste (Laurinavichene et al. 2018; Wang et al. 2018; Wu et al. 2019). Um H<sub>2</sub> zu produzieren, könnte *Rhodobacter* während der anoxygenen Photosynthese als „Photobioreactor“ die gewonnenen Elektronen photo-fermentativ auf Wasser übertragen (Magnin und Deseure 2019; Silva et al. 2016; Zhang et al. 2016). Weiter könnte *Rhodobacter* Carotinoide als Antioxidantien für medizinische Supplemente produzieren (Li et al. 2017; Liu et al. 2015). Im Schnittbereich von Medizin und Ernährung ist *Rhodobacter* auch im Fokus als Produzent von Terpenen, etwa für sogenannte Nutraceuticals (Orsi et al. 2019; Troost et al. 2019). Unter den Nutraceuticals ist auch die Produktion von Coenzym Q<sub>10</sub> durch den Überexpressionsstamm *Rhodobacter sphaeroides* HY01 etabliert; Coenzym Q<sub>10</sub> wird eingesetzt, um Herz-Kreislauf-Erkrankungen vorzubeugen (Zhang et al. 2019). Die Vielzahl biotechnologischer Anwendungen von *Rhodobacter* verdeutlicht seine vielfältige Stoffwechselphysiologie. Umso mehr bedarf der Lebensstil von *Rhodobacter* einer strengen Regulation, um sich optimal auf wechselnde Licht- und Sauerstoffbedingungen einzustellen.

## 1.2 Oxidativer Stress

Können Bakterien nicht adäquat auf Änderungen der Umweltbedingungen reagieren, können sie Stress ausgesetzt sein, welcher ihr Wachstum hemmt oder gar zum Zelltod führt. Neben Stressfaktoren wie etwa erhöhter Salinität oder Hitzestress gibt es auch den sogenannten oxidativen Stress durch Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies, ROS), welcher im Fokus dieser Arbeit steht. Es können ROS auf verschiedene Arten entstehen, in *Rhodobacter* ist dabei besonders der Schutz gegen Singulett-Sauerstoff (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) wichtig, wie nachfolgend an der Entstehung von ROS gezeigt wird.

Als elektronegativstes Molekül stellt Sauerstoff den idealen terminalen Elektronenakzeptor einer Atmungskette dar. Die hohe energetische Ausbeute der Elektronenübertragung ermöglicht es, eine große Anzahl an Protonen über die Membran zu befördern, um einen Protonengradienten aufzubauen. Dieses elektrochemische Potential treibt eine ATP-Synthase an, um die Energie in Form von ATP zu speichern. Die aerobe Atmung birgt allerdings die Gefahr, dass als toxische Nebenprodukte ROS in der Atmungskette entstehen. Auch kann anderweitig ein sauerstoffreiches Milieu mehr externe ROS beinhalten, die Stress auf eine Zelle ausüben. Wichtig für das Überleben einer Zelle ist die Aufrechterhaltung

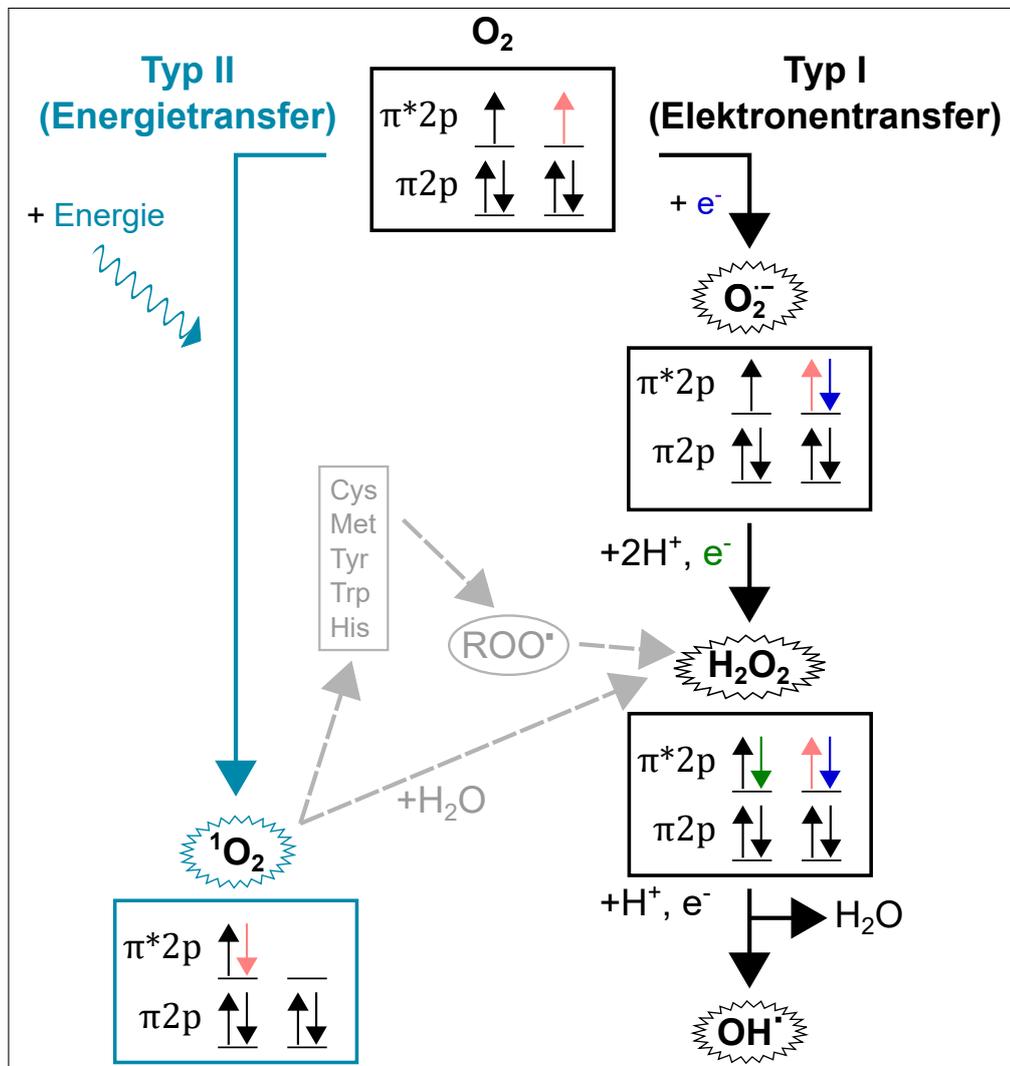
der Redox-Homöostase, des Gleichgewichts reduzierter und oxidierter Substanzen. Ein Ungleichgewicht der Redox-Homöostase durch ROS führt zu oxidativem Stress. Die ROS sind gewissermaßen der Preis für die effiziente Energiegewinnung aerober Atmung.

### 1.2.1 Unterteilung reaktiver Sauerstoffspezies

Man unterscheidet zwei Arten der ROS-Entstehung, je nachdem, ob Energie oder Elektronen auf molekularen Sauerstoff ( $^3\text{O}_2$ , oder einfach nur  $\text{O}_2$ ) übertragen werden. Beim Transfer von Energie handelt es sich um Typ II ROS, beim Transfer von Elektronen um Typ I ROS (Abb. 1.1; Ziegelhoffer und Donohue 2009). Durch Anregung beim Energietransfer auf molekularen Sauerstoff ändert eines der äußeren  $\pi^*2p$ -Elektronen seinen Spin, womit reaktiver Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) entsteht (Halliwell und Gutteridge 2015).

Bei Typ I entstehen je nach Menge der Elektronen unterschiedliche ROS. Eine schrittweise Addition von Elektronen auf molekularen Sauerstoff bildet nacheinander Superoxid ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Hydroxylradikale ( $\text{OH}^{\bullet}$ ).

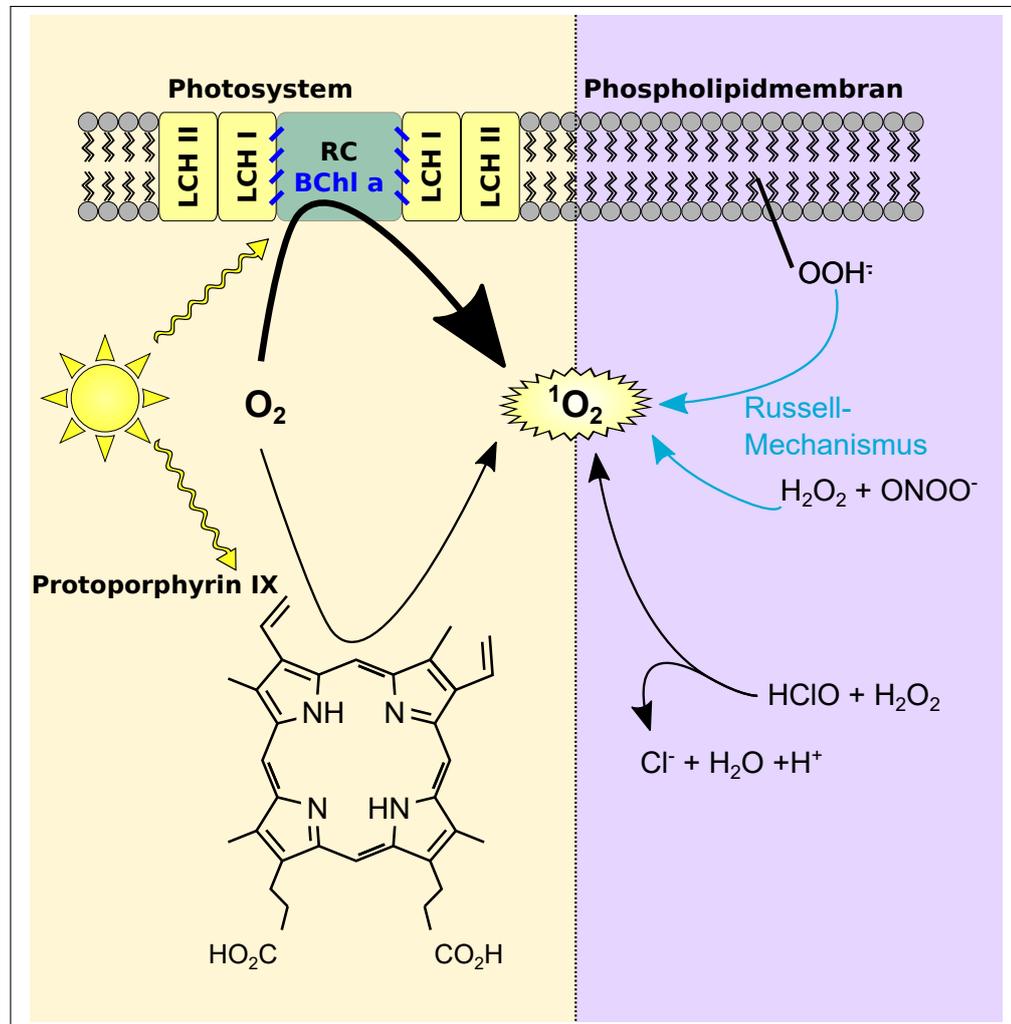
Trotz der Trennung der ROS in diese zwei Gruppen ist zu beachten, dass  $^1\text{O}_2$  Biomoleküle wie Proteine und Lipide oxidieren kann und somit Peroxylradikale sowie Endo- und Wasserstoffperoxide bildet. Bei der Wirkung von  $^1\text{O}_2$  auf eine Zelle sind die downstream gebildeten Radikale bzw. ROS zu berücksichtigen (Davies 2004; Davies 2016; Hirakawa 2017).



**Abbildung 1.1: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies.** Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen durch Übertragung von Energie (Typ II) oder Elektronen ( $e^-$ ; Typ I). Die Kästen skizzieren die Elektronenverteilung in den äußeren p-Orbitalen.  $^1O_2$  kann durch Proteinoxidation zu weiteren ROS und Radikalen führen (grau).  $O_2$  molekularer Sauerstoff,  $^1O_2$  Singulett-Sauerstoff,  $O_2^{\cdot-}$  Superoxid,  $H_2O_2$  Wasserstoffperoxid,  $OH^{\cdot}$  Hydroxyl-Radikal,  $ROO^{\cdot}$  Peroxyl-Radikal, -O-O- Endoperoxid. Adaptiert nach Ziegelhoffer und Donohue (2009), Davies (2016).

### 1.2.2 $^1\text{O}_2$ und photooxidativer Stress

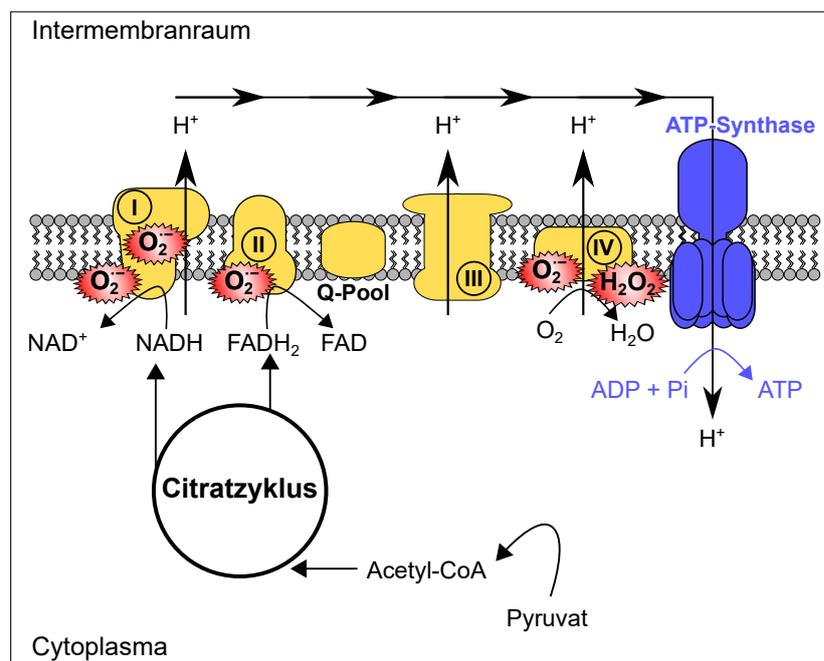
Im Fokus dieser Arbeit steht die photooxidative Stressantwort von *Rhodobacter* und damit die Antwort auf  $^1\text{O}_2$ . Abbildung 1.2 zeigt lichtabhängige und lichtunabhängige Entstehungswege von  $^1\text{O}_2$ . Die hauptsächliche Bildung von  $^1\text{O}_2$  in photosynthetisch aktiven Bakterien wie *Rhodobacter* erfolgt über Bacteriochlorophyll *a* (Bchl *a*) bzw. Chlorophylle. Carotinoide in den Lichtsammelkomplexen II und I absorbieren die Lichtenergie und leiten sie zunächst zum Reaktionszentrum weiter. Die Lichtenergie regt Bchl *a* im Lichtsammelkomplex-Reaktionszentrum-Komplex an. Das Bchl *a* wiederum regt danach normalerweise das Reaktionszentrum an. In der Photosynthese kann das Reaktionszentrum seine Elektronen über Quinone auf den  $\text{bc}_1$ -Komplex übertragen, welcher die Reduktion des löslichen Cytochroms  $\text{c}_2$  mit dem Aufbau eines Protonengradienten über die Membran koppelt. Während der Protonengradient zum Antrieb einer ATP-Synthase und damit der Energiegewinnung dient, überträgt das Cytochrome  $\text{c}_2$  Elektronen wieder zurück zum Bchl *a*. Im Photosystem entsteht allerdings als unerwünschtes Nebenprodukt  $^1\text{O}_2$ , wenn ein angeregtes Bchl *a* Energie auf molekularen Sauerstoff (im Triplettzustand,  $^3\text{O}_2$ ) überträgt. Das Bchl *a* agiert dabei als sogenannter Photosensibilisator. Photooxidativer Stress bedeutet in diesem Sinne durch Licht induzierten  $^1\text{O}_2$ -Stress. Des Weiteren können auch andere Moleküle als Photosensibilisatoren dienen, etwa Porphyrin-Derivate, Flavine oder Rhodopsine, wobei diese eher in nicht-phototrophen Bakterien die wesentlichen  $^1\text{O}_2$ -Quellen sind (Glaeser et al. 2011). Auch lichtunabhängig kann  $^1\text{O}_2$  entstehen, etwa nach dem Russell-Mechanismus beim Abbau von Lipidperoxiden oder der Reaktion von Peroxynitrit mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Glaeser et al. 2011; Miyamoto et al. 2007). Enzymatische Abbauprozesse von  $\text{H}_2\text{O}_2$  können ebenfalls  $^1\text{O}_2$  bilden: Beim Detoxifizieren entstandene hypochlorige Säure kann mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  selbst zu  $^1\text{O}_2$  reagieren (Glaeser et al. 2011). Trotz der möglichen lichtunabhängigen  $^1\text{O}_2$ -Entstehungswege ist speziell für *Rhodobacter* jedoch festzuhalten, dass die größte Menge  $^1\text{O}_2$  durch Photosensibilisatoren wie Bchl *a* mittels Licht entsteht.



**Abbildung 1.2: Entstehung von  $^1\text{O}_2$ .** Man unterteilt die möglichen  $^1\text{O}_2$ -Entstehungswege in lichtabhängige (links) und lichtunabhängige (rechts). In lichtabhängigen Reaktionen übertragen von Licht angeregte Photosensibilisatoren Energie auf molekularen Sauerstoff (im Triplett-Zustand,  $^3\text{O}_2$ , hier  $\text{O}_2$ ). Exemplarisch für alternative Photosensibilisatoren ist der Häm-Vorläufer Protoporphyrin IX aufgeführt. In lichtunabhängigen Reaktionen entsteht  $^1\text{O}_2$  u.a. durch Abbau von durch ROS gebildeten Lipidperoxiden und bei der Detoxifizierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . LCH I/II Light harvesting complex (Lichtsammelkomplex I/II), RC Reaction center (Reaktionszentrum), BChl *a* Bacteriochlorophyll *a*, HClO hypochlorige Säure,  $\text{ONOO}^-$  Peroxinitrit-Anion,  $\text{OOH}^-$  Hydroperoxid-Anion. Adaptiert nach Glaeser et al. (2011).

### 1.2.3 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies durch Elektronenübertragung

Ungeachtet von  $^1\text{O}_2$  können auch andere ROS in Bakterien entstehen und/oder diese stressen. Als terminaler Elektronenakzeptor erzeugt  $\text{O}_2$  mit seinem hohen Redoxpotential  $E^0$  von 0,8 V die größtmögliche protonenmotorische Kraft, welche die ATP-Synthase zur Synthese von ATP nutzen kann (Abb. 1.3; Berg et al. 2007; Madigan und Martinko 2009). Solange  $\text{O}_2$  4 Elektronen aufnimmt und zu 2 Molekülen  $\text{H}_2\text{O}$  reagiert, ist dies unproblematisch. Problematisch wird es, wenn Elektronen einzeln übertragen werden und in der Atmungskette als Nebenprodukt der Zellatmung ROS gebildet werden. Abbildung 1.3 skizziert die wesentlichen Punkte, in denen in der Atmungskette ROS entstehen können. Nachdem in der Glykolyse die Pyruvatdehydrogenase Pyruvat zu Acetyl-CoA decarboxyliert hat, wird letzteres in den Citratzyklus eingeschleust. Je aktiver die Glykolyse und der Citratzyklus sind, desto mehr Reduktionsäquivalente bilden sich, im Detail Nicotinamidadenindinukleotidhydrid (NADH) und Dihydroflavinadenindinukleotid ( $\text{FADH}_2$ ). Diese Reduktionsäquivalente dienen als Elektronenträger und transportieren die Elektronen zu Komplex I (NADH) bzw. Komplex II ( $\text{FADH}_2$ ) der Atmungskette. Beim Transfer von ein bzw. zwei Elektronen auf die Komponenten der Atmungskette bzw. Sauerstoff entstehen mitunter unerwünschte Nebenprodukte:  $\text{O}_2^{\bullet -}$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Abbildung 1.3: Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies in der Atmungskette.** Dargestellt sind Superoxid ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Protonen ( $\text{H}^+$ ), Quinon-Pool (Q-Pool), Atmungsketten-Komplexe I-IV, Dihydroflavinadenindinukleotid ( $\text{FADH}_2$ ), Nicotinamidadenindinukleotidhydrid (NADH), Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Phosphat ( $\text{P}_i$ ). Adaptiert nach Berg et al. (2007), Madigan und Martinko (2009).

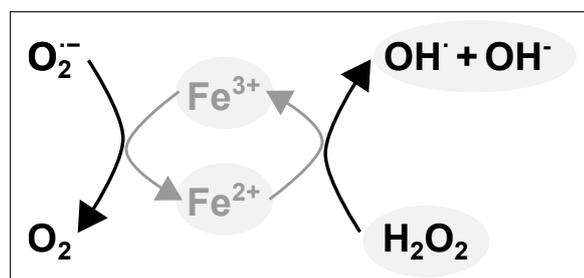
Für aerobes Wachstum ist zur Detoxifizierung von  $\text{O}_2^{\bullet-}$  die Superoxiddismutase unentbehrlich. Zusammen mit Katalasen bauen diese Enzyme Superoxid in zwei Wassermoleküle und Sauerstoff ab:



Mit Bezug auf  $\text{O}_2^{\bullet-}$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  spielt noch die durch Eisen katalysierte Bildung von ROS eine Rolle. Als Spurenelement ist Eisen einerseits überlebenswichtig. Eisenionen fungieren als zentrale Atome von prosthetischen Gruppen wie Häm, werden von Bacterioferritin gespeichert und sind in Eisen-Schwefel-Clustern ([FeS]-Clustern) Kofaktoren von Enzymen vieler Stoffwechselwege, darunter: Photosynthese, Stickstofffixierung und Atmung (Ayala-Castro et al. 2008). Allerdings reduziert Superoxid dreiwertiges Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) zu zweiwertigem Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ), welches in der sogenannten Fenton-Reaktion  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidiert und damit reaktive Hydroxyl-Radikale bildet.



Das Eisen kann auch die Haber-Weiss-Reaktion katalysieren, welche wiederum an die Fenton-Reaktion gekoppelt sein kann; die Fenton-Reaktion wiederholt sich (Abb. 1.4). Es ist zu beachten, dass neben Eisen auch andere Metalle die Haber-Weiss-Reaktion katalysieren und damit oxidativen Stress fördern, z.B. Cobalt oder Kupfer (Clerici et al. 2019; Zufall und Tyrell 2008).



**Abbildung 1.4: Eisenkatalysierte Haber-Weiss-Reaktion.** Die Haber-Weiss-Reaktion (schwarz) kann über Eisen an die Fenton-Reaktion (grau bzw. grau unterlegt) gekoppelt sein. Adaptiert nach Baynes (2009).

Durch die Fenton- und Haber-Weiss-Reaktion entstehen in einer Kettenreaktion immer mehr ROS, womit freies Eisen in der Zelle gefährlich ist. Der Schutz von [Fe-S]-Clustern vor reaktiven Sauerstoffspezies ist damit besonders wichtig. Ebenso wie den Redox-Status müssen Bakterien auch die Eisen-Homöostase aufrechterhalten. Sowohl zu viel als auch zu

wenig Eisen gefährdet die Redox-Homöostase (Touati 2000). Zu wenig Eisen vermindert die Aktivität überlebenswichtiger Enzyme, u.a. auch die der ROS-Detoxifizierung; zu viel Eisen birgt das Risiko oxidativen Stresses durch die Fenton-Reaktion. Der Eisenhaushalt unterliegt daher einer strengen Regulation, was vergangene Studien auch am Beispiel von *R. sphaeroides* demonstriert haben. So zeigte *R. sphaeroides* z.B. bei Eisenmangel eine erhöhte ROS-Produktion und die Unfähigkeit, phototroph zu wachsen, da [Fe-S]-Cluster Bestandteil der Enzyme der BChl *a*-Biosynthese sind (Peuser et al. 2011).

In *Rhodobacter* finden sich mehrere Orthologe bekannter Regulatoren wieder: der Repressor Fur/Mur bindet bei Eisenmangel an die sogenannte Furbox, um die Eisen- und Mangan-Homöostase zu regulieren (Peuser et al. 2011). Ein weiterer Regulator ist OxyR, welcher bei aeroben Bedingungen mehrere Gene zwecks Schutz vor oxidativem Stress induziert, etwa für Eisenaufnahme und -speicherung. Auch induziert OxyR das *iscR-suf*-Operon (Remes et al. 2014), welches für den Zusammenbau von [Fe-S]-Clustern verantwortlich ist. In diesem Operon dient das erste Gen, *iscR*, als eisenabhängiger Repressor der Gene des Operons (Remes et al. 2015). Ein weiteres regulatorisches Protein ist Irr, das wie in anderen Alphaproteobakterien auch die Expression von Genen des Eisenmetabolismus reguliert (Peuser et al. 2012). Wie in vielen anderen Bakterien beeinflussen diese Regulatoren in *Rhodobacter* die Aufnahme, Speicherung und den Einbau von Eisen in Cluster bzw. Bindestellen. Am Beispiel von OxyR zeigt sich auch die Verbindung von Redox- und Eisen-Homöostase.

Die Produktion von ROS bei der Fenton- bzw. Haber-Weiss-Reaktion ist eine Art, wie redoxaktive Metalle oxidativen Stress verursachen. Ein Schwermetall wie Cadmium kann auch anderweitig oxidativen Stress verursachen, ohne redoxaktiv zu sein. Beispielsweise behindern Kationen von Cadmium, Quecksilber und Silber die Redox-Homöostase: Diese Kationen haben eine hohe Affinität für Thiole und verringern die Menge an verfügbarem, reduziertem Glutathion, welches als Antioxidans in der Zelle ROS abwehrt (Cuypers et al. 2010; Xu und Imlay 2012). Auch können besagte Schwermetalle eine Verdrängung von Eisen aus ihren Bindestellen bewirken und damit gebundenes Eisen freimachen, welches in der Fenton-Reaktion weitere ROS generiert (Casalino et al. 1997; Dorta et al. 2003; Xu und Imlay 2012).

Die ROS des photooxidativen Stresses sowie der Atmungskette sind nicht nur die wesentlichen ROS-Quellen in *Rhodobacter*, sondern auch interne ROS-Quellen. Allerdings können auch externe ROS ein Bakterium oxidativ stressen. Wie von Slade und Radman (2011) sowie Imlay (2015) zusammengefasst, führen z.B. ionisierende Strahlung, Trockenheit oder erhöhte Salinität auch zu ROS in der Umgebung und somit zu oxidativem Stress. Speziell für *Rhodobacter* ist in diesem Kontext auch für aquatische Habitate  $^1\text{O}_2$ -Stress durch Huminsäuren relevant, in welchen polyzyklische, aromatische Komponenten als Photosensibilisatoren agieren (Glaeser et al. 2011).

## 1.3 $^1\text{O}_2$ -induzierte Schäden an Biomolekülen

Der bei photooxidativem Stress gebildete  $^1\text{O}_2$  beschädigt Proteine, Nukleinsäuren und Lipide. Bei der Erörterung der Schäden muss bedacht werden, dass neben den direkten Schäden durch  $^1\text{O}_2$  auch downstream gebildete ROS eine Zelle oxidativ stressen. Die nachfolgend besprochenen Schäden fokussieren sich dabei auf  $^1\text{O}_2$ . Dabei kann  $^1\text{O}_2$  seine Ziele entweder direkt oxidieren oder auf zwei Arten Peroxide bilden: entweder Hydroperoxide via (4+2)-ene-Reaktion oder Endoperoxide via [2+2]-Zykloaddition (Frimer 1979).

### 1.3.1 Proteinschäden

Bakterielle Biomasse besteht zu ca. 50 % aus Proteinen. Proteine sind daher das wesentliche Ziel von  $^1\text{O}_2$ -Stress (Davies 2004). Im Detail sind die schwefelhaltigen und aromatischen Aminosäuren der Proteine die primären Ziele von  $^1\text{O}_2$ : Cystein, Histidin, Methionin Tyrosin und Tryptophan (Davies 2003; Wilkinson et al. 1995). Reaktionen mit  $^1\text{O}_2$  führen in diesen Aminosäuren zu Ring-Öffnungen, Peroxiden und Radikalen. Tabelle 1.1 fasst die wesentlichen Reaktionsprodukte der Aminosäuren zusammen.

**Tabelle 1.1: Wesentliche Produkte der Reaktion von Aminosäuren mit  $^1\text{O}_2$ , nach Davies (2003).**

Aminosäure	$^1\text{O}_2$ -Reaktionsprodukte
Tryptophan	Endo- und Hydroperoxide, Photosensibilisatoren (N-Formylkynurenin, Kynurenin)
Tyrosin	C-1-Hydroperoxide
Histidin	Endoperoxide
Methionin	Sulfoxide, $\text{H}_2\text{O}_2$
Cysteine	Disulfide

Die Schäden an Proteinen werden durch die Reaktionsprodukte der besagten Aminosäuren mit  $^1\text{O}_2$  ersichtlich. Die gebildeten Photosensibilisatoren gefährden die Redoxhomöostase, ebenso (Endo-)Peroxide mitsamt ihren (durch Homolyse) abgeleiteten Radikalen. Das auf diesem Weg downstream von  $^1\text{O}_2$  entstandene  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidiert einerseits Thiole und greift [Fe-S]-Cluster an (Storz und Imlay 1999). Andererseits führt weitere Elektronenübertragung auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  (wie bei der Fenton-Reaktion, Abschnitt 1.2.3) zu den wesentlich reaktiveren Hydroxyl-Radikalen (Cabiscol Català et al. 2000). Die Radikale und Nebenprodukte wie N-Formylkynurenin ändern die Struktur eines Proteins bzw. greifen sie an. Weiter verändern Disulfid-Brücken die Tertiärstruktur und fördern Cross-Linking bzw. Proteinaggregation, was die Proteine anfälliger für Proteasen und Proteinumsatz macht (Davies 2003; Davies 2004). Mit den Änderungen der Konformation und der physiologischen Eigenschaften verlieren Enzyme ihre Funktionen (Pattison et al. 2012). Da Enzyme alle

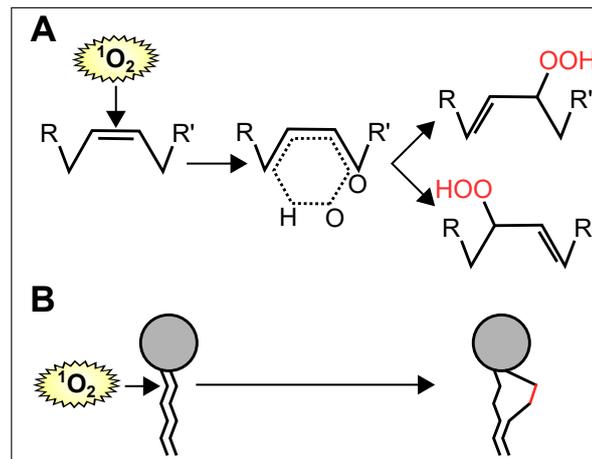
überlebenswichtigen Vorgänge einer Zelle katalysieren und Membranproteine ein wesentlicher Bestandteil der Zellmembran sind, wird deutlich, wie gefährlich die Schäden des Proteoms durch  $^1\text{O}_2$  ohne Abwehrmechanismen sein können.

### 1.3.2 Nukleinsäureschäden

Sowohl DNA als auch RNA sind Ziele von  $^1\text{O}_2$ . Es ist z.B. bekannt, dass Photosensibilisatoren wie Porphyrine DNA beschädigen (Fiel et al. 1981). Speziell für *E. coli* zeigten Studien, dass  $^1\text{O}_2$  Guanin oxidiert, wodurch 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin (8-OHdG) entsteht; 8-OHdG-Reste der DNA sind anfällig für Einzelstrangbrüche (Cavalcante et al. 2002; Devasagayam et al. 1991). Darüber hinaus bindet 8-OHdG auch an Cytosin und Adenin, was die DNA-Synthese und -Replikation stört (Sekiguchi et al. 2013). Auch beim Ribonukleotid-Pool oxidieren ROS Guanin-Reste, was im Falle von 8-OHdG in mRNA bei der Codon-Anticodon-Bindung zu Fehlern führen könnte (Sekiguchi et al. 2013). Neben der Oxidation von Guanin ist des Weiteren bekannt, dass Methylenblau (MB)-generierter  $^1\text{O}_2$  zu Crosslinking zwischen viraler RNA und Proteinen führt, so etwa im Fall von HIV-1-Viren (Floyd et al. 2004).

### 1.3.3 Lipidperoxidation

Mit seiner Fähigkeit zur (Endo-)Peroxid-Bildung beschädigt  $^1\text{O}_2$  Lipidmembranen via Einleitung der Lipidperoxidation an den ungesättigten Fettsäuren. Im Detail reagiert  $^1\text{O}_2$  nach der oben erwähnten Schenk-Ene-Reaktion an *cis*-Doppelbindungen einer ungesättigten Fettsäure, um eine Hydroperoxyl-Gruppe in *trans* einzuführen (Abb. 1.5) – womit Lipidperoxide entstehen (Watabe et al. 2007). Die Einführung der Peroxylgruppe erhöht pro Phospholipid die Oberfläche, stört die Struktur der Fettsäure und damit auch die der Membran. Es sinken die Membranintegrität und die Transporteigenschaften (Joshi et al. 2011; Riske et al. 2009).



**Abbildung 1.5: Lipidperoxidation via  $^1\text{O}_2$ .** (A) Via der Schenk-Ene-Reaktion führt  $^1\text{O}_2$  eine hydrophile Hydroperoxyl-Gruppe (rot) in die Fettsäure ein. (B) Schema der strukturellen Veränderungen nach Einführung einer hydrophilen Hydroperoxyl-Gruppe (rot) bei der Lipidperoxidation. Adaptiert nach Riske et al. (2009), Watabe et al. (2007).

## 1.4 Regulation der bakteriellen Genexpression im Allgemeinen

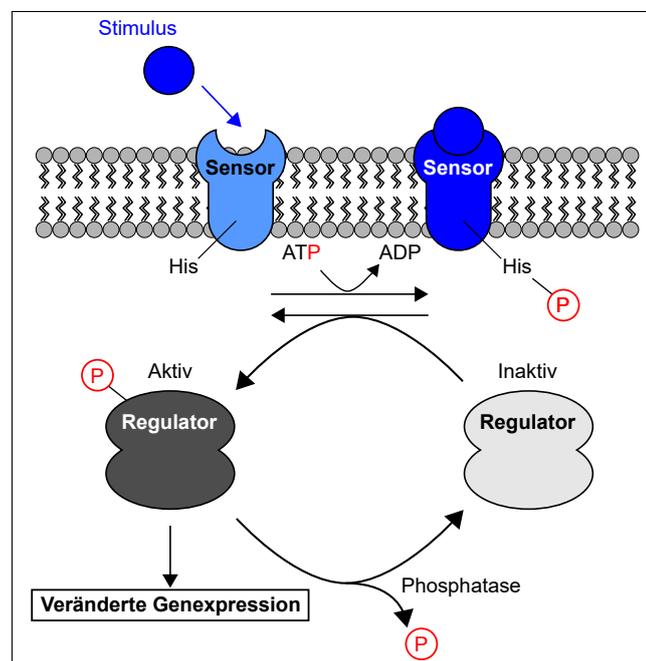
Bakterien müssen ihre Genexpression regulieren, da je nach Wachstumsphase oder Umwelteinfluss andere Proteine benötigt werden. Damit ist die Regulation der Genexpression entscheidend, um oxidativem Stress vorzubeugen bzw. auf diesen zu reagieren. Transkriptionsfaktoren, inklusive alternativer Sigmafaktoren, und small RNAs (kleine RNAs, sRNAs) beeinflussen die Transkription und Translation und steuern somit die Genexpression.

Sigmafaktoren beeinflussen die Transkription in Bakterien, es handelt sich um Untereinheiten der RNA-Polymerase, welche gebunden an diese die Initiation der Transkription spezifischer Gene einleiten: Sigma ( $\sigma$ ) erkennt bestimmte Erkennungssequenzen (Promotoren) upstream der Zielgene und führt die RNA-Polymerase an diese Zielgene (Feklítov et al. 2014). Verschiedene Umwelteinflüsse und damit auch Stressoren beeinflussen die Aktivität der alternativen Sigmafaktoren, welche die Transkription ganzer Gruppen von Genen kontrollieren. In *E. coli* reguliert beispielsweise RpoD die Transkription vieler Gene unter gewöhnlichen Bedingungen, während Hitzestress  $\sigma^{32}$  aktiviert (Feklítov et al. 2014).

Weiter regulieren auch Anti-Sigma-Faktoren die Genexpression mit, indem sie an alternative Sigmafaktoren binden und damit ihre Aktivität repressieren. In der stationären Phase und mutmaßlich unter Hitzestress binden z.B. in *E. coli* Rsd und HscC an  $\sigma^{70}$  und senken dessen Aktivität (Gerardo Treviño-Quintanilla et al. 2013). Transkriptionsfaktoren beeinflussen auch nach Initiation der Transkription die Transkriptionsrate. In *E. coli* gibt es z.B. die Nus-, Gre- oder Mfd-Faktoren, welche an die RNA-Polymerase oder DNA binden und dadurch die Transkription pausieren oder terminieren

(Artsimovitch und Landick 2000; Borukhov et al. 2005). Weitere Transkriptionsfaktoren sind Repressoren, welche an sogenannte Operator-Sequenzen eines Operons binden und damit das Binden der RNA-Polymerase verhindern. Im Gegensatz dazu binden Anti-Repressoren an Repressoren und lösen diese durch Konformationsänderung von der DNA, sodass die RNA-Polymerase an den Promotor binden kann. Ein Beispiel hierfür ist das PpsR/AppA-System in *R. sphaeroides* (Zeng und Kaplan 2001), welches die Transkription der Photosynthesegene steuert und in Abschnitt 1.5 näher beschrieben wird.

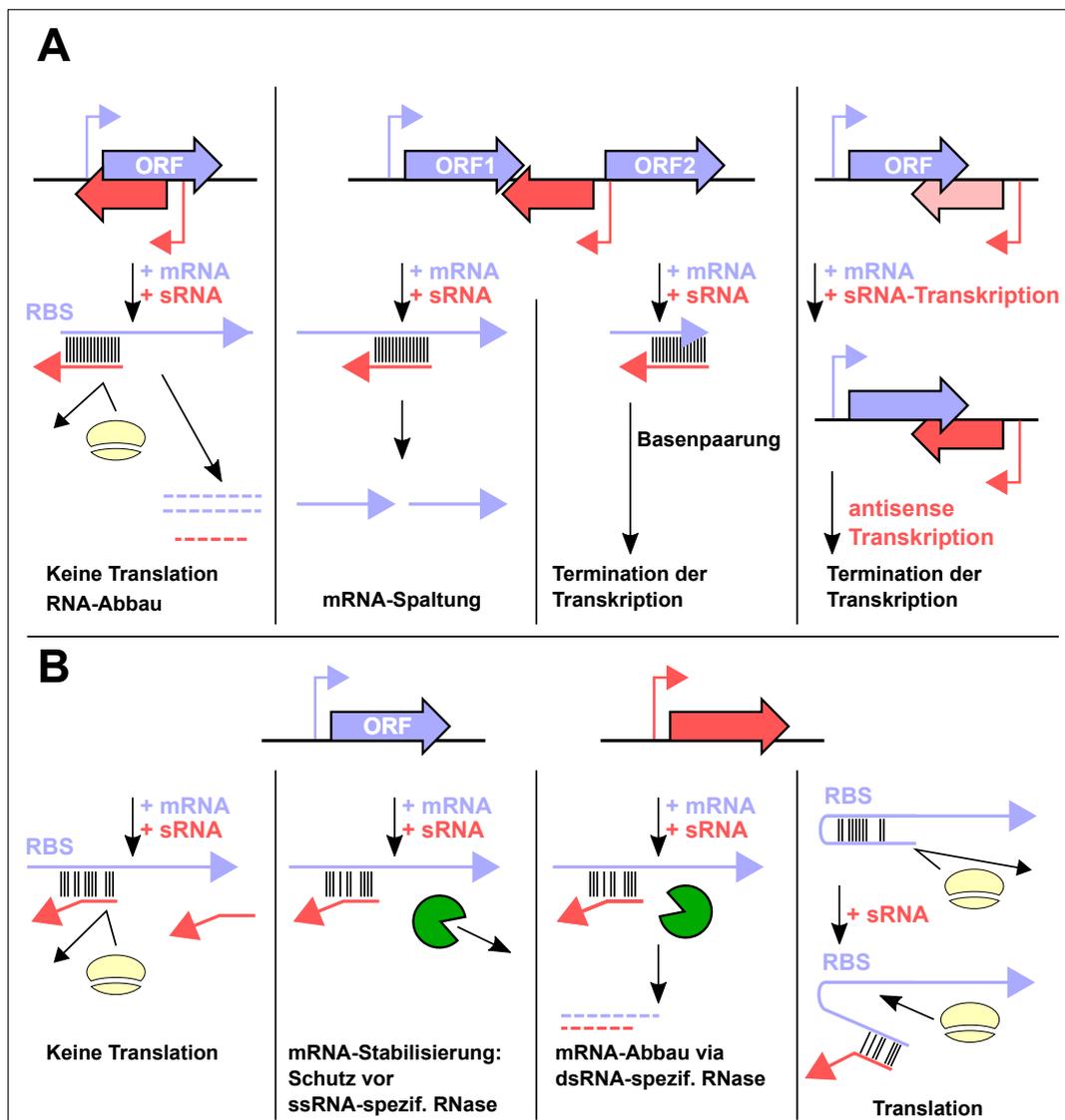
Die vorgestellten regulatorischen Proteine verarbeiten meistens nicht direkt die externen Signale, welche zur veränderten Genexpression führen. Viel eher verarbeitet eine Sensor-kinase das Signal und leitet es im Zuge der Signaltransduktion an den Regulator weiter (Madigan und Martinko 2009a). Sensor-kinase und Regulator bilden damit ein sogenanntes Zwei-Komponenten-System, welches in Abb. 1.6 skizziert ist. Nachdem ein Stimulus an die Sensorkinase bindet bzw. diese erreicht, phosphoryliert diese einen ihrer dem Cytoplasma zugewandten Histidinreste. Das Phosphat wird danach weiter zum Regulator übertragen, womit dieser aktiviert wird und die Genexpression beeinflussen kann. Durch Entfernen des Phosphats wird der Regulator inaktiv. Spontan entfernt sich das Phosphat relativ langsam vom Regulator, eine Phosphatase beschleunigt diesen Prozess. Die Signaltransduktion ist wesentlich für die Verarbeitung externer Stimuli.



**Abbildung 1.6: Schema eines Zwei-Komponenten-Regulationssystems.** Die Signaltransduktion eines Stimulus erfolgt über eine membrandintegrierte Sensorkinase, welche durch Übertragen eines Phosphats ( $P_i$ ) einen Regulator der Genexpression aktiviert. ADP Adenosindiphosphat, ATP Adenosintriphosphat. Adaptiert nach Madigan und Martinko (2009).

Posttranskriptionell beeinflussen sRNAs auch die Genexpression. Diese RNAs sind

nicht-kodierend und können an Ziel-mRNAs binden, um ihre Translationsrate sowie Stabilität entweder zu erhöhen oder zu verringern, wobei letzterer Fall häufiger nachgewiesen wurde (Waters und Storz 2009). Man unterteilt die sRNAs in zwei Gruppen, welche Abbildung 1.7 mit ihren mRNA-Wechselwirkungen darstellt (Waters und Storz 2009): *cis*-kodierte sRNAs werden vom Gegenstrang des Ziel-Gens transkribiert und sind zu einem gewissen Bereich perfekt komplementär zur Ziel-mRNA, *trans*-kodierte sRNAs sind weiter entfernt vom Ziel-Gen lokalisiert, sind nicht perfekt komplementär und können mehrere Ziele haben.



**Abbildung 1.7: Wechselwirkung zwischen sRNAs und ihren Ziel-mRNAs.** Die Schemata zeigen die möglichen Effekte von *cis*-sRNAs (**A**) und *trans*-sRNAs (**B**) bei ihren Interaktionen mit Ziel-mRNAs. Große Pfeile mit angewinkelten Pfeilen indizieren ORFs von Genen (blau) und sRNAs (rot). Ribosomen sind hellgelb und RNasen dunkelgrün dargestellt. Adaptiert nach Waters und Storz (2009) und Müller (2016).

sRNAs erhöhen die Translationsrate einer mRNA, indem sie nach Bindung an die mRNA Sekundärstrukturen entwinden, welche die Ribosomenbindestelle blockieren (Hammer und Bassler 2007; Majdalani et al. 1998; Sledjeski et al. 1996). Auch kann die Bindung die mRNA stabilisieren, indem sie vor dem Abbau durch einzelstrangspezifische RNasen geschützt wird (Opdyke et al. 2004).

Die sRNA-mRNA-Bindung kann allerdings eine mRNA destabilisieren, wenn sie dadurch ein Ziel von doppelstrangspezifischen RNasen wird (Massé et al. 2003). Auch kann diese Bindung Sekundärstrukturen einführen und so die Ribosomenbindestelle für die RNA-Polymerase unzugänglich machen (Stork et al. 2007). Sofern die sRNA an das 3'-Ende der mRNA bindet, kann eine verfrühte Termination stattfinden (Dühning et al. 2006; Stork et al. 2007; Wen et al. 2013). Zwischen zwei ORFs bindende sRNAs können auch die Spaltung der mRNA bezwecken (Waters und Storz 2009). Auch kann die Transkription einer sRNA die einer mRNA vorzeitig terminieren, wenn die Polymerasen sich aufeinander zubewegen (Mars et al. 2015).

Da die Bindung zwischen einer *trans*-sRNA mit ihrer Ziel-mRNA durch wenige komplementäre Basenpaare schwächer ist, muss diese Bindung i.d.R. durch ein RNA-Chaperon, wie z.B. Hfq, stabilisiert werden (Møller et al. 2002). Dies wurde auch bereits für *R. sphaeroides* nachgewiesen (Berghoff et al. 2011a). Auch für die Genregulation unter photooxidativem Stress sind sRNAs von Bedeutung, wie in Abschnitt 1.6.2 näher erläutert wird.

In der posttranskriptionellen Genregulation spielen sRNAs eine entscheidende Rolle, um die Level bestimmter mRNA feinzustimmen, meistens nach unten.

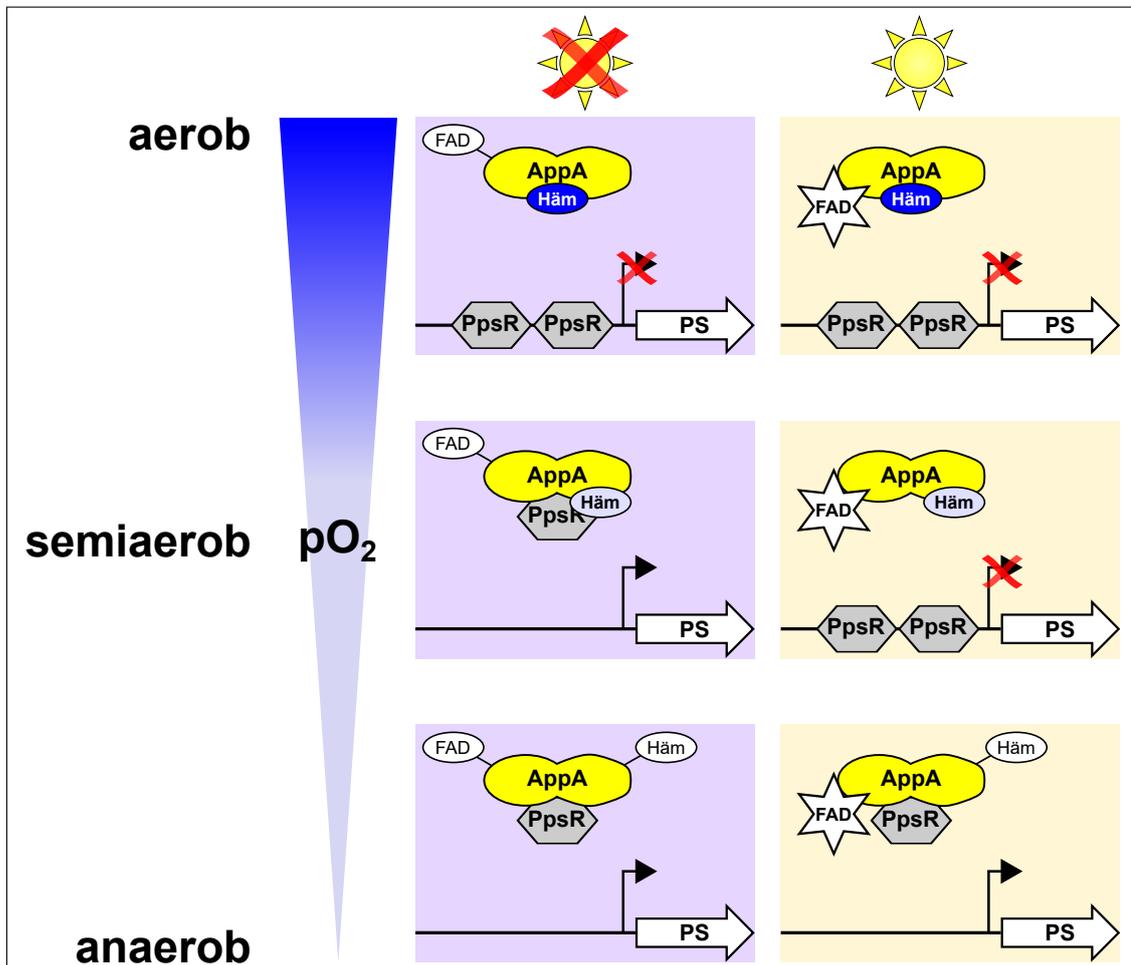
## 1.5 Regulation der Photosynthesegene in *Rhodobacter*

### 1.5.1 Regulatoren der Photosynthesegene

Probleme durch  $^1\text{O}_2$ -Stress in photosynthetisch-aktiven Bakterien wie *Rhodobacter* basieren hauptsächlich auf der simultanen Präsenz von Sauerstoff, Licht und Photosystemen. Mit Blick auf die Vermeidung von  $^1\text{O}_2$ -Stress und die optimale Energiegewinnung überrascht es nicht, dass Sauerstoff und Licht die Transkription der Photosynthesegene in *Rhodobacter* maßgeblich beeinflussen (Happ et al. 2005; Masuda und Bauer 2002; Metz et al. 2009). Photosynthesegene, welche in *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* reguliert werden, sind u.a.: *bch*-Gene (Bacteriochlorophyllbiosynthese) und *crt*-Gene (Carotinoidbiosynthese; Elsen et al. 1998; Choudhary und Kaplan 2000; Schindel und Bauer 2016), *tspO* (Regulator; Kumka und Bauer 2015) und die *puf*- und *puc*-Gene (Lichtsammelkomplexproteine; Sganga und Bauer 1992; Gomelsky und Kaplan 1995; Choudhary und Kaplan 2000).

Die Transkription der Photosynthesegene steht unter der Kontrolle eines Repressor/Antirepressor-Paares, nämlich PpsR/AppA in *R. sphaeroides* bzw. den

homologen CrtJ/AerR in *R. capsulatus*. Diese Transkriptionsfaktoren regulieren zusammen mit einem Zwei-Komponenten-System und Regulatoren wie sRNAs die Transkription der Photosynthesegene (Abb. 1.8), wie nachfolgend im Detail erläutert wird.

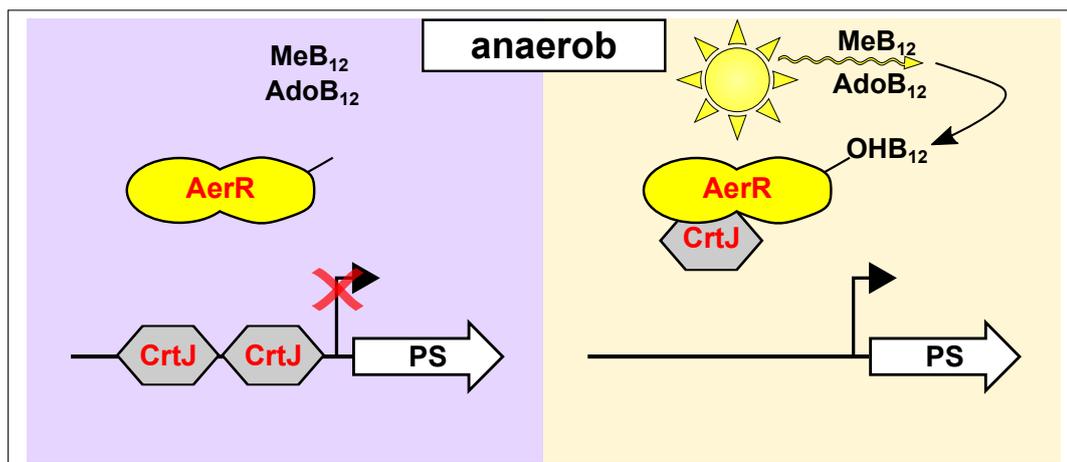


**Abbildung 1.8: Schema der Regulation der Transkription der Photosynthesegene durch PpsR/AppA in *R. sphaeroides*.** Es ist die Transkription für verschiedene Sauerstoffkonzentrationen und dunkle (links) sowie helle (rechts) Bedingungen aufgeführt. PpsR repressiert die Transkription der Photosynthesegene (PS). Der Antirepressor AppA kann die Repression durch Bindung an PpsR aufheben. Cofaktoren von AppA, Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Häm registrieren Blaulicht bzw. Redoxlevel. AppA kann PpsR nicht binden, wenn Häm oxidiert ist (blau) bzw. gleichzeitig FAD angeregt ist (☆). Adaptiert nach Braatsch et al. (2002).

Die grundlegende Regulation ist in *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* gleich: *Rhodobacter* detektiert den Licht- und Redoxstatus und unterdrückt bei zu hohem Sauerstofflevel die Photosynthesegentranskription. Studien lassen vermuten, dass oxidierte Repressoren (PspR/CrtJ) intramolekular Disulfidbrücken zwischen Cysteinen ausbilden, welche wiederum die Bindung des Repressors an die DNA fördern (Cheng et al. 2012; Masuda und Bauer 2002); die Repressoren binden an die Photosynthesegene und behindern ihre

Transkription (Fang und Bauer 2017; Gomelsky und Kaplan 1995; Masuda und Bauer 2002; Ponnampalam et al. 1995). Ein Antirepressor (AppaA/AerR) bindet bei anaeroben Bedingungen sowie intermediären Sauerstoffkonzentrationen (ca. 100 mM) im Dunkeln an den Repressor, womit dieser sich von der DNA löst und die Photosynthesegene transkribiert werden können (Braatsch et al. 2002). Bei AppA überprüfen Licht- und Redox-Sensoren die Bedingungen: das Licht regt am N-Terminus ein Flavinadenindinukleotid (FAD) in der sogenannten BLUF-Domäne (Blue Light Sensing using FAD-Domäne) an (Gomelsky und Klug 2002). Weiter enthält der C-Terminus des Antirepressors einen Tetrapyrrol-Cofaktor. Dieser Cofaktor ist in *R. sphaeroides* ein oxidierbares Häm (Han et al. 2007). Ist FAD angeregt und gleichzeitig die Häm-Domäne oxidiert, kann AppA nicht an PpsR binden und es werden keine Photosynthesegene abgelesen.

In *R. capsulatus* hingegen zeigen Studien für den Antirepressor AerR nur eine Sensorik für Licht. Unter anaeroben Bedingungen bindet *R. capsulatus* Hydroxycobalamin als C-terminalen Cofaktor von AerR (Abb. 1.9; Cheng et al. 2014), was Voraussetzung für die AerR-CrtJ-Bindung ist. Im Umkehrschluss bedeutet das für *R. capsulatus*, dass Cobalamin (ergo Vitamin B<sub>12</sub>) essentiell für die Expression von Photosynthesegenen ist. Ein Mangel an Cobalamin z.B. zeigte in Studien von Cheng et al. (2014) eine reduzierte *bchC*-Expression und in anderen Studien auch eine verringerte Expression der *puf*- und *puc*-Operons, die für Pigmentbindeproteine kodieren (Fang und Bauer 2017; Pollich und Klug 1995). In Bakterien kommt *in vivo* Cobalamin als Adenosylcobalamin und Methylcobalamin vor, Licht kann aber in beiden die Kohlenstoff-Cobalt-Bindung spalten, wodurch Hydroxycobalamin entsteht. Unter anaeroben Bedingungen spaltet Licht Hydroxycobalamin aus Adenosylcobalamin in *R. capsulatus*, welches an AerR bindet.



**Abbildung 1.9: Cobalamin-gesteuerte AerR-Aktivität in *R. capsulatus*.** Erst wenn unter anaeroben Bedingungen Licht Hydroxycobalamin (OHB<sub>12</sub>) photolytisch aus Adenosylcobalamin (AdoB<sub>12</sub>) spaltet und OHB<sub>12</sub> an AerR bindet, kann AerR an CrtJ binden. Es ist die Situation für dunkle Bedingungen (links) und Licht (rechts) dargestellt. Adaptiert nach Klug (2014).

Die Repressor/Antirepressor-Paare PpsR/AppA und CrtJ/AerR sind wichtige Komponenten der Photosynthesegen-Regulation, aber nicht die einzigen. Beispielsweise reguliert ein redox-sensitives Zwei-Komponenten-System die Gene der Photosynthese bei zu hohem Sauerstoffpartialdruck herunter: es handelt sich dabei um das PrrB/PrrA-System in *R. sphaeroides* und das homologe RegB/RegA-System in *R. capsulatus*. Eine Komponente arbeitet als Histidinkinase (RegB bzw. PrrB), welche den Antwort-Regulator (RegA/PrrA) phosphoryliert; im phosphorylierten Zustand binden RegA bzw. PrrA an bestimmte Sequenzen der Photosynthesegene. Das Zwei-Komponenten-System registriert den Redox-Status über Messen des Elektronentransports der Cytochrom *cbb<sub>3</sub>*-Oxidase und induziert die Transkription der Photosynthesegene bei anaeroben bzw. mikroaeroben Bedingungen. Die Kinase-Aktivität ist dabei antiproportional zur Elektronenflussintensität an der Cytochrom *cbb<sub>3</sub>*-Oxidase (Happ et al. 2005; Oh et al. 2000).

Auch der redoxensitive Transkriptionsfaktor FnrL reguliert die Expression der Photosynthesegene (Kumka und Bauer 2015). Anders als bei dem Zwei-Komponenten-System zeigen sich aber deutliche Unterschiede im Regulon zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*: FnrL induziert bestimmte Photosynthesegene nur in *R. capsulatus*, aber nicht in *R. sphaeroides*, wie nachfolgend erläutert wird.

FnrL ist entscheidend für die Expression von Photosynthesegenen unter anaeroben Bedingungen in *R. sphaeroides*, darunter welche für die Tetrapyrrol- und BChl *a*-Biosynthese, nämlich *hemA*, *hemZ*, *hemN*, *bchEJG* und *puc*-Gene (Oh et al. 2000; Zeilstra-Ryalls und Kaplan 1998). Im Gegensatz dazu haben in *R. capsulatus* einige dieser Schlüsselenzyme (*bchE*, *hemA*) keine FnrL-Konsensussequenz upstream. Infolgedessen können FnrL-Mutanten von *R. capsulatus* anders als solche von *R. sphaeroides* noch phototroph wachsen (Zeilstra-Ryalls et al. 1997; Zeilstra-Ryalls und Kaplan 1998). Weiter ist von *R. sphaeroides* bekannt, dass FnrL in *R. sphaeroides* zusammen mit PrrA/B das Transkriptlevel der sRNA PcrZ reguliert; unter geringem Sauerstoffpartialdruck steigt das PcrZ-Transkriptlevel. PcrZ bindet neben *bchN* auch an *puc2A* (Lichtsammelkomplex  $\alpha$ -Untereinheit), womit die Bildung von Photosynthesekomplexen verringert wird (Mank et al. 2012). Ähnlich regulieren FnrL und PrrA auch die sRNA PcrX, welche ebenfalls die Bildung von Photosynthesekomplexen unterdrückt. Im Detail bindet PufX an *pufBALM*-mRNAs und senkt deren Halbwertszeit (Eisenhardt et al. 2018).

Interessanterweise haben *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* zwar ein ähnliches FnrL-Regulon, allerdings reguliert FnrL einige Gene verschieden, wie eine Studie von Kumka und Bauer (2015) im Vergleich zu Ergebnissen von Imam et al. (2014) zeigte. FnrL induziert *bchCEF* in *R. capsulatus* und reprimiert diese in *R. sphaeroides*, während *hemA* von FnrL nur in *R. sphaeroides* direkt aktiviert wird. Auch induziert FnrL das *pufALM*-Operon nur in *R. capsulatus*. Ein besonders interessanter Unterschied ist, dass laut CHIP-Analyse FnrL in *R. capsulatus* an die Promotor-Region des CrtJ-Antirepressors AerR bindet und diesen

mehr als zweifach induziert – dies würde auch die Transkription der Photosynthesegene fördern (Imam et al. 2014; Kumka und Bauer 2015).

Alles in allem zeigen die Regulatoren der Photosyntheseexpression in *R. sphaeroides* und *R. capsulatus* neben gemeinsamen Zielen auch zum Teil untereinander entgegengesetzte Effekte auf die Expression. Dies verdeutlicht, wie komplex und streng die Regulation ist. In *R. capsulatus* zeigen z.B. 25 Gene eine gemeinsame Regulation durch FnrL, RegA und CrtJ (Kumka et al. 2017). Zusammenfassend stellt Abb. 1.10 die Erkenntnisse schematisch dar.

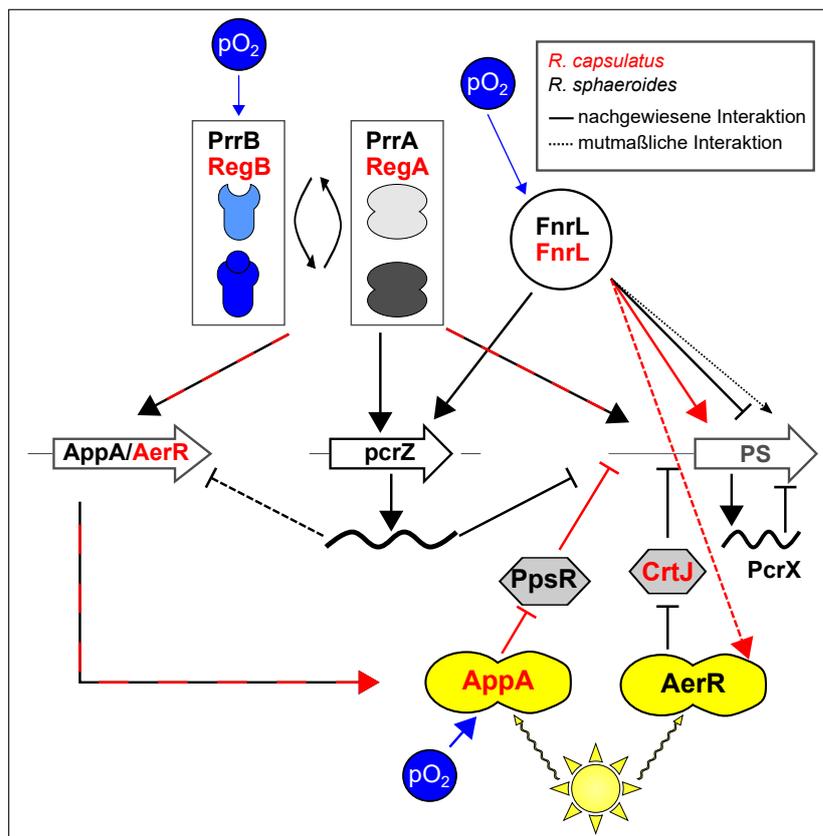
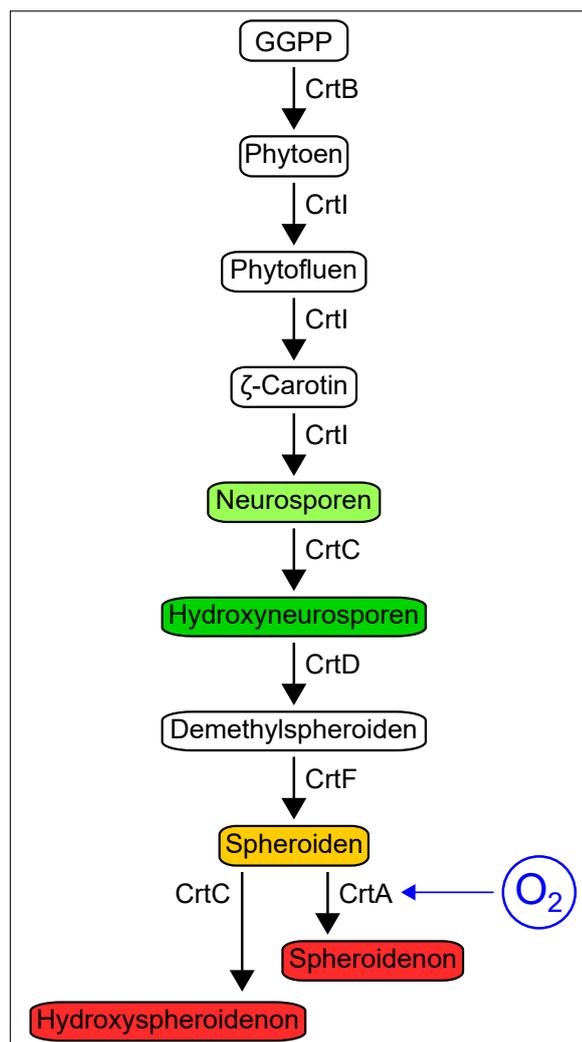


Abbildung 1.10: Schema der Regulation der Transkription der Photosynthese in *R. capsulatus* (rot) und *R. sphaeroides* (schwarz). Adaptiert nach Mank et al. (2012) und Eisenhardt et al. (2018).

## 1.5.2 Carotinoide – Lichtabsorption und Quenching

Carotinoide erweitern das Spektrum des für Photosynthese absorbierbaren Lichts und transportieren Lichtenergie zum Reaktionszentrum des Photosystems, sie erhöhen damit die Licht- bzw. Energieausbeute für die Photosynthese. Carotinoide können je nach Struktur allerdings auch als Quencher eine photoprotektive Funktion gegen photooxidativen Stress erfüllen (Beutner et al. 2001; Martin et al. 1999; Young und Lowe 2018). Beispielsweise können Blaulicht und Kupfer im nicht-phototrophen *Myxococcus xanthus* nicht nur

$^1\text{O}_2$  generieren, sondern auch die Biosynthese von Carotinoiden anregen (Burchard und Dworkin 1966; Fontes et al. 2003; Moraleda-Muñoz et al. 2005). Die Fähigkeit zur Lichtabsorption und zum Quenching von  $^1\text{O}_2$  und Peroxyl-Radikalen hängt von der Struktur der Carotinoide ab (Martin et al. 1999; Stahl und Sies 2003). Zunächst kondensieren zwei Moleküle Geranylgeranylpyrophosphat zum C40-Vorläufermolekül Phytoen. Aus Phytoen entstehen durch schrittweise Entsättigungen der Kohlenstoffkette (ca. 3–15 Mal) und durch Einführen von Ringstrukturen und sauerstoffhaltigen Gruppen (etwa Hydroxy- oder Carboxy-Gruppen) spezifischere Carotinoide (Abb. 1.11; Armstrong und Hearst 1996).



**Abbildung 1.11: Carotinoidbiosynthese in *Rhodobacter*.** Ausgangspunkt des Schemas ist Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). Die Farben der Carotinoide sind angezeigt. Sauerstoff aktiviert die Spheroidenmonooxygenase CrtA (Yeliseev et al. 1996; Zhu et al. 1986). Adaptiert nach Kovács et al. (2003); Chi et al. (2015).

Nicht alle Carotinoide sind gute Quencher, was z.T. auch von äußeren Faktoren abhängt: Betacarotin z.B. zeigt bei erhöhten Konzentrationen und hohem Sauerstoffpartialdruck sogar Prooxidant-Aktivität (Martin et al. 1999). Insbesondere die Anzahl von konjugierten

Doppelbindungen entscheidet neben dem Bereich der Lichtabsorption (ca. 400–500 nm) auch über die Quenchingfähigkeiten (Armstrong und Hearst 1996; Foote et al. 1970; Martin et al. 1999; Stahl und Sies 2003). Man schätzt, dass der Großteil (ca. 95,5 %) des Carotinoidquenchings bei  $^1\text{O}_2$  physisch und damit ohne Strukturveränderungen der Carotinoide verläuft (Beutner et al. 2001; Stahl und Sies 2003), im Unterschied zum chemischen Quenching. Dies bedeutet am Beispiel von  $^1\text{O}_2$ , dass durch Energieübertragung  $^1\text{O}_2$  wieder in den Triplettzustand zurückfällt, während das Carotinoid diesen erreicht. Anders als  $^1\text{O}_2$  allerdings geben Carotinoide ihre Energie zerstreuter und damit ungefährlich an das umgebende Medium ab (Stahl und Sies 2003). Nach diesem Prozess erreichen Carotinoide wieder den Grundzustand. Damit kann ein Carotinoidmolekül auch mehrmals hintereinander quenchen, ohne verbraucht zu werden.

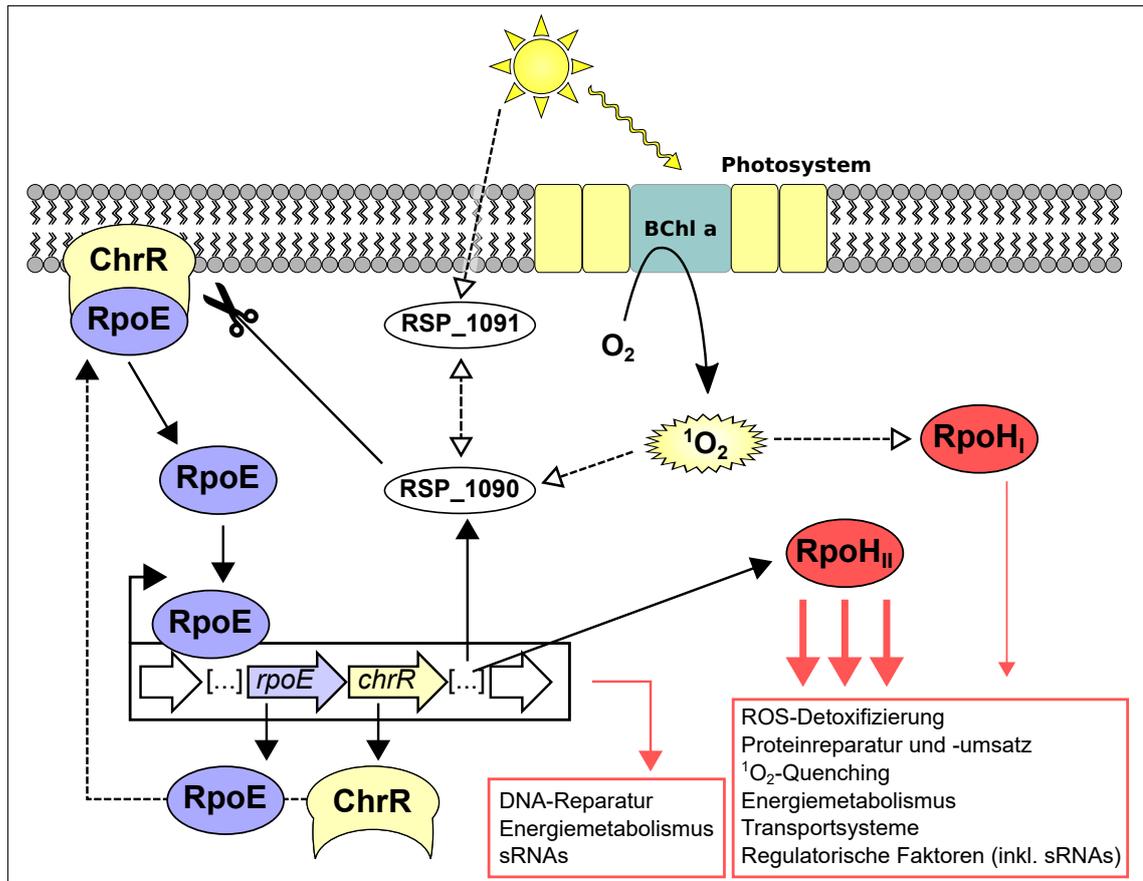
Die grundlegende Carotinoid-Biosynthese für *Rhodobacter* zeigt Abbildung 1.11. Entscheidend für *Rhodobacter* ist auch hier der Sauerstoffpartialdruck. Unter anaeroben Bedingungen akkumulieren *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* Spheroiden, unter aeroben Bedingungen aber Spheroidenon (Glaeser und Klug 2005; Li et al. 2017; Schmidt 1978; Scolnik et al. 1980; Yeliseev et al. 1996; Zhu et al. 1986). Grund für die Akkumulation von Spheroidenon ist, dass Sauerstoff die Spheroidenmonooxygenase CrtA aktiviert, welche Spheroiden zu Spheroidenon durch Einfügen einer Ketogruppe umsetzt (Yeliseev et al. 1996; Zhu et al. 1986). Diese weitere Differenzierung der Carotinoide ist wichtig für die Anpassung an  $^1\text{O}_2$  unter aeroben Bedingungen. Über die eingefügte Ketogruppe bindet das Carotinoid an das Reaktionszentrum des Lichtsammelkomplexes I. Die Bindung bewirkt, dass bei Anregung des Carotinoids durch  $^1\text{O}_2$  der sogenannte Intramolecular Charge Transfer-Zustand stabilisiert wird. Der Vorteil dieser Stabilisierung liegt darin, dass Spheroidenon im Intramolecular Charge Transfer-Zustand ein energetisch niedrigeres Level als  $^1\text{O}_2$  hat und damit  $^1\text{O}_2$  oder angeregtes BChl *a* quencht, ohne gleich die Lichtabsorptionfähigkeiten aufzugeben (Šlouf et al. 2012). Ein Trade-off zwischen diesen zwei Funktionen der Carotinoide bleibt somit aus. Die Ergebnisse von Šlouf et al. (2012) demonstrieren, wie wichtig Spheroidenon für die Abwehr gegen photooxidativen Stress ist. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten *R. sphaeroides*-Mutanten mit gestörter Carotinoidbiosynthese deutlich geringere Überlebensraten in einer Studie von Glaeser und Klug (2005). Eine Induktion der Carotinoidgene unter photooxidativem Stress bleibt in *R. sphaeroides* aus (Berghoff et al. 2013; Glaeser und Klug 2005). Carotinoide können als eine Art erste Verteidigungslinie gegen ROS und speziell  $^1\text{O}_2$  angesehen werden. Wenn diese Verteidigung nicht ausreicht – bzw. experimentell ausgeschaltet wird – muss ein anderes System zur Abwehr dienen (Anthony et al. 2005), welches in Abschnitt 1.6 vorgestellt wird.

## 1.6 Regulation der (photo-)oxidativen Stressantwort in *R. sphaeroides*

### 1.6.1 Alternative Sigmafaktoren der (photo-)oxidativen Stressantwort in *R. sphaeroides*

Allgemein sorgt die licht- und sauerstoffbestimmte Expression der Photosynthesegene dafür, dass photooxidativer Stress durch BChl *a* vermieden wird. Ein Versagen der Regulationsmechanismen, rapide Änderungen der Umweltbedingungen oder  $^1\text{O}_2$ -Stress durch äußere Einflüsse (etwa Huminsäuren; Glaeser et al. 2011) erfordern allerdings eine  $^1\text{O}_2$ -Antwort von *Rhodobacter*. Bisherige Studien haben die photooxidative Stressantwort speziell für *R. sphaeroides* hinsichtlich der Regulatoren sowie der funktionellen bzw. physiologischen Anpassung untersucht. Besonders gut erforscht ist dabei aus regulatorischer Sicht die Rolle der alternativen Sigmafaktoren RpoE, RpoH<sub>II</sub> und RpoH<sub>I</sub> sowie des Antisigmafaktors ChrR (Anthony et al. 2005; Dufour et al. 2012; Glaeser et al. 2007; Nuss et al. 2013; Nuss et al. 2010; Nuss et al. 2009). Die alternativen Sigmafaktoren bilden dabei eine Signalkaskade, in deren Hierarchie RpoE an der Spitze steht (Abb. 1.12): Unter  $^1\text{O}_2$ -Stress spaltet sich der Antisigmafaktor ChrR von RpoE ab, womit RpoE aktiv wird und u.a. die Expression von RpoH<sub>II</sub> fördert. Das *rpoE*-Regulon ist mit 15 Genen ca. zehn Mal kleiner als das von RpoH<sub>II</sub> (Dufour et al. 2012; Nuss et al. 2010; Nuss et al. 2009; Ziegelhoffer und Donohue 2009) und beinhaltet neben RpoH<sub>II</sub> auch *rpoE*, *chrR* und die Photolyase *phrA*. Dass *rpoE* und *chrR* selbst durch RpoE reguliert werden, demonstriert, wie eng die photooxidative Stressantwort reguliert ist.

Der alternative Sigmafaktor RpoH<sub>II</sub> induziert die meisten Gene der  $^1\text{O}_2$ -Antwort. Das RpoH<sub>II</sub>-Regulon überschneidet sich zu einem kleinen Teil auch mit dem des alternativen Sigmafaktors RpoH<sub>I</sub>, welcher unter Hitzestress Gene reguliert (Dufour et al. 2012). Im Detail verglich eine Studie von Dufour et al. (2012) RpoH<sub>I</sub> und RpoH<sub>II</sub> auf gemeinsame Regulons zwischen Microarray- und Chromatin-Immunoprecipitationsdaten, nach den Autoren beinhaltet das gemeinsame Regulon 45 Gene. Zum Vergleich: RpoH<sub>II</sub> regulierte exklusiv 144 Gene, RpoH<sub>I</sub> hingegen 175 Gene. Zu den gemeinsam regulierten Genen gehörten die für die DNA-Reparatur benötigte Excinuclease-ABC-Untereinheit A (*uvrA*) oder das Chaperon (*hslO*) und die Peptidmethioninsulfoxidreduktase RSP\_2617. Weiter werden durch RpoH<sub>II</sub> (und RpoH<sub>I</sub>) Gene der Redoxhomeostase und -prozesse wie CycF (Cytochrom *c*<sub>544</sub>) und sRNAs wie RSs0680a, RSs2461, und RSs1543 positiv reguliert (Nuss et al. 2010).



**Abbildung 1.12: Regulation der  $^1\text{O}_2$ -Antwort in *R. sphaeroides*.** Durch Licht angeregtes BChl *a* des Reaktionszentrums in den Photosystemen überträgt Energie auf molekularen Sauerstoff (Tripletzustand,  $^3\text{O}_2$ , hier  $\text{O}_2$ ), wodurch Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) entsteht. Der photooxidative Stress wird möglicherweise über Licht oder  $^1\text{O}_2$  via RSP\_1091 und/oder RSP\_1090 detektiert. Abhängig von RSP\_1090 wird via Proteolyse der Antisigmafaktor ChrR vom alternativen Sigmafaktor RpoE gespalten, womit RpoE aktiv die Transkription beeinflussen kann. Zum RpoE-Regulon gehören wenige Gene, darunter *rpoE*, *chrR* und der alternative Sigmafaktor RpoH<sub>II</sub>, welcher die Transkription der meisten  $^1\text{O}_2$ -induzierten Gene induziert. Ein kleiner Teil dieser Gene wird auch von RpoH<sub>I</sub> reguliert. Adaptiert nach Glaeser et al. (2011).

Die aufgeführten Beispiele  $^1\text{O}_2$ -induzierter bzw. regulierter Gene sind exemplarisch für die durch  $^1\text{O}_2$  induzierten, funktionellen Gruppen in *R. sphaeroides*: DNA- und Proteinreparatur, Chaperone, Redoxhomöostase, Oxidationsprozesse und sRNAs (Berghoff et al. 2013; Nuss et al. 2010).

RpoE und RpoH<sub>II</sub> kommen ubiquitär in Alphaproteobakterien vor und sind in *R. sphaeroides* die entscheidenden Sigmafaktoren der photooxidativen Stressantwort.

## 1.6.2 Kleine RNAs der (photo-)oxidativen Stressantwort in *R. sphaeroides*

In *R. sphaeroides* induziert  $^1\text{O}_2$ -Stress sRNAs, welche ebenfalls die Stressantwort regulieren. Zu diesen sRNAs zählen auch die durch Sauerstoff induzierte PcrZ (Abschnitt 1.5.1), die durch Senken der Translationsrate von Photosynthesegenen photooxidativem Stress vorbeugen.

In vielen Fällen steuern RpoE, RpoH<sub>II</sub> und/oder RpoH<sub>I</sub> die Transkription dieser sRNAs. Berghoff et al. (2009) identifizierten z.B. 20 durch  $^1\text{O}_2$  oder  $\text{O}_2^{\bullet-}$  induzierte sRNAs, von denen neun konservierte Bindestellen für RpoE, RpoD, RpoH<sub>II</sub> oder RpoH<sub>I</sub> aufwiesen, welche teilweise auch verifiziert wurden (Nuss et al. 2010). In vielen Fällen ist die Bindung der sRNAs auch in *R. sphaeroides* abhängig von Hfq (Berghoff et al. 2011a).

Ein Beispiel für eine RpoH<sub>I</sub>/RpoH<sub>II</sub>-regulierte sRNA ist RSs0827, welche mutmaßlich an die *rpoE*-mRNA binden könnte (Müller 2016). In dem Fall würde die sRNA zusammen mit *chrR* die Aktivität von *rpoE* kontrollieren. Damit würde RpoE neben ChrR auf einer weiteren Ebene in seiner Aktivität kontrolliert werden.

Unabhängig von regulatorischen Proteinen regulieren sRNAs auch diverse Zellprozesse direkt, z.B. die Expression von Genen von Transportprozessen. Die sRNA SorY z.B. bindet an die mRNA von *takP*, einem Transporter für Malat (Adnan et al. 2015). Eine durch SorY vermittelte Verringerung von TakP in der Zelle bewirkt, dass weniger Malat in den Citratzyklus gelangt. Dies wirkt auf zwei Arten gegen (photo-)oxidativen Stress: es werden geringere Mengen des Prooxidants NADH gebildet und der Elektronenfluss zur Atmungskette – und damit die Gefahr durch interne ROS – wird unterbunden. Im Vergleich dazu bindet die sRNA SorX an einen Spermidintransporter (*potA*; Peng et al. 2016). Der verringerte Spermidinimport unter photooxidativem Stress könnte die Bildung von Glutathionylspermidin verhindern, damit ausreichend Glutathion als Antioxidans zur Verfügung steht.

Ein Cluster von vier homologen sRNAs, Ccsr1–4, könnte nicht nur ähnlich wie SorX auf den Glutathion-Pool einwirken, sondern auch auf den C1-Metabolismus (Billenkamp et al. 2015). Eine Überexpression dieser sRNA bewirkt eine Abnahme der Transkriptlevel von Genen des C1-Metabolismus und der Pyruvatdehydrogenase, womit geringere Mengen des Prooxidants NADH und weniger ROS in der Atmungskette entstehen. Darüber hinaus wäre eine Ziel-mRNA die des Regulators FlhR, welcher den Glutathion-abhängigen Methanol-/Formaldehyd-Metabolismus aktiviert. Eine verringerte Translation dieser mRNA und damit eine Abnahme von FlhR könnte bezwecken, dass weniger Glutathion in diesen Stoffwechselweg verstoffwechselt wird und stattdessen mehr Glutathion als Reduktant den Schäden von ROS entgegenwirkt. In diesem Zusammenhang zu erwähnen wäre bezüglich der Glutathionlevel noch die sRNA Pos19, welche RSP\_0557 als Ziel hat und

bei Überexpression die Transkription von 30 Genen des Schwefelstoffwechsels (direkt oder indirekt) beeinflusst, darunter *serA*, *cysH* und *cysI* (Müller et al. 2016). Da zuviel Cystein in der Zelle unter  $^1\text{O}_2$ -Stress Disulfide bildet und in der Fenton-Reaktion  $\text{Fe}^{3+}$  reduzieren könnte, könnte es sich hier um Feinregulation des Schwefelstoffwechsels handeln (Müller 2016).

Im Vergleich zu *R. sphaeroides* ist das Vorwissen über  $^1\text{O}_2$ -induzierte sRNAs in *R. capsulatus* eingeschränkt, allerdings konnte bereits eine durch  $^1\text{O}_2$  hervorgerufene Induktion zweier sRNAs, RCs01897 und RCs1681, nachgewiesen werden (Volk 2016). Die genaue Wirkung oder die Ziele der sRNAs sind allerdings unklar.

Die bislang charakterisierten sRNAs in *R. sphaeroides* zeigen vielfältige (und teilweise mutmaßliche) Effekte auf die Transkriptlevel von Regulatoren und Genen des Glutathionstoffwechsels, der Transportprozesse, der Photosynthese und des Energiemetabolismus.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, die  $^1\text{O}_2$ -Antwort von *R. capsulatus* zu charakterisieren, mit dem nahe verwandten *R. sphaeroides* zu vergleichen und spezies-spezifische Eigenheiten der Antwort in *R. capsulatus* zu beschreiben. Über mehrere Jahre wurde die  $^1\text{O}_2$ -Antwort in *R. sphaeroides* untersucht. Mehrere Studien haben hierbei die wesentlichen Aspekte auf Ebene differentieller Genexpression (inkl. Transkriptom- und Proteomantwort), physiologischer Änderungen sowie regulatorischer Elemente (Transkriptionsfaktoren, sRNAs) untersucht. Mit Ausnahme der Rolle von *cfaS* bei der Spaltung des Antisigmafaktors ChrR sind bereits viele wesentliche Elemente der  $^1\text{O}_2$ -Antwort in *R. sphaeroides* bekannt. Im Unterschied dazu sind viele Aspekte der photooxidativen Stressantwort in *R. capsulatus* unbekannt.

Um die Unterschiede zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* zu bestimmen, sollen zunächst beide Arten in Bezug auf ihr Wachstumsverhalten systematisch unter verschiedenen Licht- und Sauerstoffbedingungen verglichen werden. Darauf aufbauend soll die Resistenz bzw. Reaktion auf diverse Stressoren getestet und *R. capsulatus*-spezifische sRNAs näher in ihrer Rolle der  $^1\text{O}_2$ -Antwort analysiert werden. Im Fokus steht das Aufdecken der Gemeinsamkeiten und Unterschiede beider Arten in Bezug auf die differentielle Genexpression unter Stress. Hierfür werden Transkriptom- und Proteomdaten vor und nach photooxidativem Stress in *R. capsulatus* via RNA-Seq und Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS) untersucht und mit bekannten Omicsdaten von *R. sphaeroides* verglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Nachfolgend sind allgemeine bzw. häufig verwendete Materialien aufgeführt (Tab. 2.1 bis 2.13). Einige versuchsspezifische Materialien sind bei den entsprechenden Methodenbeschreibungen mit aufgeführt.

#### 2.1.1 Stämme und Plasmide

**Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Stämme.** Alle S17-1-Stämme mit Plasmiden gab es zwischenzeitlich auch als JM109-Stämme.

Stamm	Beschreibung	Quelle
<i>R. capsulatus</i>		
SB1003	Wildtypstamm SB1003	Yen und Marrs (1976)
37b4	Wildtypstamm 37b4	van Niel (1944)
Tn5-Grün	Grünfarbiger <i>R. capsulatus</i> SB1003 mit Tn5-Insertion in den Carotinoidbiosynthesegenen, Km <sup>R</sup>	Licht et al. (2020)
Tn5-Blau	Blaufarbiger <i>R. capsulatus</i> SB1003 mit Tn5-Insertion in den Carotinoidbiosynthesegenen, Km <sup>R</sup>	Diese Arbeit
$\Delta rpoH_I$	<i>R. capsulatus</i> SB1003 mit Mutation in <i>rpoH_I</i> , Km <sup>R</sup>	Mercer und Lang (2014)
$\Delta rpoH_{II}$	<i>R. capsulatus</i> SB1003 mit Mutation in <i>rpoH_{II}</i> , Sp <sup>R</sup>	Mercer und Lang (2014)
pRK	<i>R. capsulatus</i> SB1003 mit pRK4352pst_term, Tc <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pRK_RCs01897	Überexpression von RCs01897 unter Kontrolle des RSP_4352 16S rRNA Promotors in <i>R. capsulatus</i> SB1003, Tc <sup>R</sup>	Diese Arbeit

Antibiotikaresistenzen: Km<sup>R</sup> Kanamycin, Sp<sup>R</sup> Spectinomycin, Tc<sup>R</sup> Tetracyclin, Gm<sup>R</sup> Gentamycin.

## Auflistung der verwendeten Stämme: Fortsetzung

Stamm	Beschreibung	Quelle
SB1003- <i>lacZ</i> -EVC	SB1003 mit pBBR1-MCS5- <i>lacZ</i> , Gm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
SB1003- <i>lacZ</i> - <i>cbbL</i>	SB1003 mit pBBR1-MCS5- <i>lacZ</i> - <i>cbbL</i> , Gm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
SB1003- <i>lacZ</i> - <i>macA</i>	SB1003 mit pBBR1-MCS5- <i>lacZ</i> - <i>macA</i> , Gm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
SB1003- <i>lacZ</i> - <i>phrB</i>	SB1003 mit pBBR1-MCS5- <i>lacZ</i> - <i>phrB</i> , Gm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
SB1003- <i>lacZ</i> - <i>msrB2</i>	SB1003 mit pBBR1-MCS5- <i>lacZ</i> - <i>msrB2</i> , Gm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<hr/>		
<i>R. sphaeroides</i>		
2.4.1	Wildtypstamm 2.4.1	van Niel (1944)
KD131	Wildtypstamm KD131	Lim et al. (2009)
Tn5-Grün	Grünfarbiger <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 mit Tn5-Insertion in den Carotinoidbiosyntheseegenen, Km <sup>R</sup>	Licht et al. (2020)
Tn5-Blau	Blaufarbiger <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 mit Tn5-Insertion in den Carotinoidbiosyntheseegenen, Km <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<hr/>		
<i>E. coli</i>		
JM109	Klonierungstamm (Plasmidreplikation), F' traD36 proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> Δ(lacZ)M15/Δ(lac-proAB) glnV44 e14 <sup>-</sup> gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17	NEB
S17-1	Für diparentale Konjugation in <i>Rhodobacter</i> , <i>recA</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> , RP4 <sup>-2</sup> -(Tc::Mu)(Km::Tn7); Tp <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	Simon et al. (1983)
pRK4352pst_term	S17-1 mit pRK4352pst	Diese Arbeit
S17-1-pBBR1-MCS5- <i>LacZ</i>	S17-1 mit pBBR1-MCS5- <i>lacZ</i> , Gm <sup>R</sup>	Diese Arbeit

Antibiotikaresistenzen: Km<sup>R</sup> Kanamycin, Sp<sup>R</sup> Spectinomycin, Tc<sup>R</sup> Tetracyclin, Gm<sup>R</sup> Gentamycin.

**Auflistung der verwendeten Stämme: Fortsetzung**

Stamm	Beschreibung	Quelle
S17-1-pBBR1-MCS5- <i>cbbL</i>	S17-1 mit pBBR1-MCS5- <i>cbbL</i> , Gm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
S17-1-pBBR1-MCS5- <i>macA</i>	S17-1 mit SB1003 mit pBBR1- MCS5- <i>macA</i> , Gm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
S17-1-pBBR1-MCS5-03477	S17-1 mit pBBR1-MCS5- <i>msr2B</i> , Gm <sup>R</sup>	Diese Arbeit

Antibiotikaresistenzen: Km<sup>R</sup> Kanamycin, Sp<sup>R</sup> Spectinomycin, Tc<sup>R</sup> Tetracyclin, Gm<sup>R</sup> Gentamycin.

**Tabelle 2.2: Plasmide für *R. capsulatus* und *E. coli*.**

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pJET1.2/blunt	Blunt-End-Klonierungsvektor für <i>E. coli</i> , Ap <sup>R</sup>	Thermo Scientific
pJET-RCs01897	pJET1.2/blunt mit der sRNA RCs01897 für <i>E. coli</i> , Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pRK453pst_term	Broad-Host-Range Cloning Vector pRK415 (Keen et al. 1988) mit dem RSP_4352 16S rRNA Promotor (Mank et al. 2012) und mit Terminator des Proteins 32 des PhagenT4 (KpnI/EcoRI), Tc <sup>R</sup>	Kerstin Haberzettl
pRK4532-RCs01897	pRK453pst_term mit der sRNA RCs01897 unter Kontrolle des RSP_4352 16S rRNA Promotors, Tc <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pSUP202	Plasmid mit Tn5 und <i>mob</i> -Genen für Tn5-Transposonmutagenese in <i>Rhodobacter</i> , Km <sup>R</sup>	Simon et al. (1983)
pBBR1-MCS5- <i>lacZ</i>	pBBR1MCS-5 mit <i>lacZ</i> , Gm <sup>R</sup>	Fried et al. (2012)
pBBR1-MCS5- <i>cbbL</i>	pBBR1-MCS5- <i>lacZ</i> , in welches vor <i>lacZ</i> 278 BP der Promotorregion von RCAP_rcc00579 eingefügt wurden, Gm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBBR1-MCS5- <i>macA</i>	pBBR1-MCS5- <i>lacZ</i> , in welches vor <i>lacZ</i> 254 BP der Promotorregion von RCAP_rcc00358 eingefügt wurden, Gm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBBR1-MCS5- <i>phrB</i>	pBBR1-MCS5- <i>lacZ</i> , in welches vor <i>lacZ</i> 250 BP der Promotorregion von RCAP_rcc02958 eingefügt wurden, Gm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBBR1-MCS5- <i>msr2B</i>	pBBR1-MCS5- <i>lacZ</i> , in welches vor <i>lacZ</i> 258 BP der Promotorregion von RCAP_rcc03477 eingefügt wurden, Gm <sup>R</sup>	Diese Arbeit

Antibiotikaresistenzen: Ap<sup>R</sup> Ampicillin, Tc<sup>R</sup> Tetracyclin, Km<sup>R</sup> Kanamycin, Gm<sup>R</sup> Gentamycin.

## 2.1.2 Oligonukleotide

**Tabelle 2.3: Oligonukleotide für Klonierungen, quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR) und Northern Blotting (NB).** Überhänge sind kursiv gekennzeichnet, eingefügte Restriktionsschnittstellen via Überhänge sind nicht-kursiv und unterstrichen gekennzeichnet.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Zielgen(e)
<u>Klonierung</u>		
Rcs01897short-BamHI_F	<i>ACTAGGATCCT</i> <u>CCCGAGCGCC</u> GCAGT	RCs01897
RCs01897NEWshort-KpnI_R	<i>ACTAGGTACCC</i> <u>GGGAAAAAA</u> GGCCGGA	RCs01897
Rcs01897long-BamHI_F	<i>ACTAGGATCCT</i> <u>CCCGAGCGCC</u> GCAGTCC	RCs01897
RCs01897NEWlong-KpnI_R	<i>ACTAGGTACCC</i> <u>GGGAAAAAA</u> GGCCGGATGC	RCs01897
rcc00579-F	<i>TGGGGATCC</i> <u>CAGGAAATATTG</u> CGCGGTGGAGACG	RCAP_rcc00579 ( <i>cbbL</i> )
rcc00579-R	<i>TGGGAATTC</i> <u>ACCCGCGCCGC</u> CGAGGAATTGC	RCAP_rcc00579 ( <i>cbbL</i> )
rcc00358-F	<i>TGGGGATCC</i> <u>GATCAGGGCCA</u> GGAGCTTGCT	RCAP_rcc00358 ( <i>macA</i> )
rcc00358-R	<i>TGGGAATTC</i> <u>CGTCCGGTCCAA</u> TCGACGCCGT	RCAP_rcc00358 ( <i>macA</i> )
rcc02958-F	<i>TGGGGATCC</i> <u>CAGGCCCTCGA</u> CCTCGAAACC	RCAP_rcc02958 ( <i>phrB</i> )
rcc02958-R	<i>TGGGAATTC</i> <u>AACTGGGGCCG</u> CCAGAGCGGT	RCAP_rcc02958 ( <i>phrB</i> )
rcc03477-F	<i>TGGGGATCC</i> <u>CCCCGTCTGCA</u> GTTTTTCCAGTG	RCAP_rcc03477 ( <i>msrB2</i> )
rcc03477-R	<i>TGGGAATTC</i> <u>TTCGGCCTCCT</u> GCGGCCCA	RCAP_rcc03477 ( <i>msrB2</i> )
<u>qRT-PCR</u>		
rpoZ-for	GATGATCTGCGCGAGCGTCT	RCAP_rcc03318 ( <i>rpoZ</i> )
rpoZ-rev	CCTTGC GCGTCCATCAATGC	
1669-A	ATCGCGGAAGAGACCCAGAG	RSP_1669 ( <i>rpoZ</i> )
1669-B	GAGCAGCGCCATCTGATCCT	
RCC_01829_RTfor	GGCCTACATGCTGACCGA	RCAP_rcc01829 ( <i>cbbM</i> )
RSP_3271_RTfor	CCCGAGGTCTGGATCACG	RCAP_rcc01829 ( <i>cbbM</i> )

## Oligonukleotide: Fortsetzung

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Zielgen(e)
RSP_3271_RTfor	CCCGAGGTCTGGATCACG	RSP_3271 ( <i>rbpL</i> )
RSP_1149_RTfor	CCCGCTGCACAACAACA	RCAP_rcc00163 ( <i>gltD</i> ) RSP_1149 ( <i>gltD</i> )
RCC_00163_RTrev	CGCAGATTTCCGGGAAGC	RCAP_rcc00163 ( <i>gltD</i> )
RSP_1149_RTrev	CTCGGGGAAGGTGTTGGT	RSP_1149 ( <i>gltD</i> )
RCC_01531_RTfor	ATGAAAAGGGGCCGC	RCAP_rcc01531 ( <i>nuoI</i> )
RCC_01531_RTrev	CAGATCGCCTCGCAAAGC	
RSP_2523_RTfor	ACTACCCGCACGAGAAGG	RSP_2523 ( <i>nuoI</i> )
RSP_2523_RTrev	TTCCGCGTCGATGGTGAT	
RT-cysH-F	CGACGGCACGCTTTATCAGT T	RCAP_rcc01593 ( <i>cysH</i> )
RT-cysH-R	ATTCTTCCAGATCCTCGCGC	
1941-A	TGCATCTCGTCTCGGTCATC	RSP_1941 ( <i>cysH</i> )
1941-B	TCGGTGTGTAGCGGTTTCAG	
RT-cysP-F	GAAGGGGATCAAGGATTGGG	RCAP_rcc02744 ( <i>cysP</i> )
RT-cysP-R	AGCGACAGATAGGCCTCGTT	
3697-A	AATGCGCGCTACACCTATCT	RSP_3697 ( <i>cysP</i> )
3697-B	GTCATGCACCCGGTAGAAAT	
RCC_00679_RTfor	ACAAGGCCAAGGTGCTGA	RCAP_rcc00679 ( <i>crtI</i> )
RCC_00679_RTrev	AAGCCCGTCCACCTCTTC	
RSP_0271_RTfor	CCCTTCAACGTGACCTCGAT	RSP_0271 ( <i>crtI</i> )
RSP_0271_RTrev	ACCTCGGTGTTTCATGCGGAA	
RT-cbiX-F	GCGCGGATCTATCCGTTCTT	RCAP_rcc03504 ( <i>cbiX</i> )
RT-cbiX-R	CTCTGCGACCGTTTTTCACCA	
ChrR-RT-F	ATGCTGGTCTCGGACATGGT	RCAP_rcc00698 ( <i>chrR</i> )
ChrR_KOcontroll_R	CATCACGCCAGCGAAAT	
RT-RSP_1566-F	GTCTATCCGCTCTTCATGGC	RSP_1566 ( <i>cbiX</i> )
RT-RSP_1566-R	GCAATCTCCACGGTGAGATC	
RSP_1566_F1	GTCTATCCGCTCTCCATGCC	RSP_1566 ( <i>cbiX</i> )
RSP_1566_R1	GCAATCTCCACGCTGAGATC	
RSP_1566_F2	GATCTCACCGTGGAGATTGC	RSP_1566 ( <i>cbiX</i> )
RSP_1566_R2	TGCGGCTCCTGATCGATGAA	
<hr/>		
<u>NB</u>		
pRCs01897	CCGACAGGGGACTGCGGCGC TCGG	RCs01897

### 2.1.3 Reagenzien

**Tabelle 2.4: Verwendete Größenstandards.**

Größenstandard	Hersteller
GeneRuler 1 kb Plus DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 100 bp Plus DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific

**Tabelle 2.5: Verwendete Antibiotika.** Antibiotikalösungen wurden vor Einsatz sterilfiltriert (0,22 µm-Filter, ROTILABO®).

		Stammlösung		<i>E. coli</i>	<i>Rhodobacter</i>
		mg ml <sup>-1</sup>	Solvens	µg ml <sup>-1</sup>	µl ml <sup>-1</sup>
Tetracyclin	Serva	10	75 % EtOH	20	2
Kanamycin	Serva	10	H <sub>2</sub> O	25	25
Ampicillin	Roth	100	H <sub>2</sub> O	200	–
Gentamycin	Serva	10	H <sub>2</sub> O	10	10
Spectinomycin	Roth	10	H <sub>2</sub> O	10	10

### 2.1.4 Enzyme und molekularbiologische Kits

**Tabelle 2.6: Verwendete Enzyme und molekularbiologische Kits.**

Enzym	Hersteller
Phusion DNA Polymerase	Invitrogen
Taq DNA Polymerase (Kit)	Qiagen
Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA Ligase (5 U µl <sup>-1</sup> )	NEB
RNase A (7 U µl <sup>-1</sup> )	Qiagen
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Lysozym	Boehringer Ingelheim
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U µl <sup>-1</sup> )	Thermo Fisher Scientific
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Qiagen
Polynukleotidkinase (PNK)	Thermo Fisher Scientific
Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QRT-PCR Master Mix	Agilent
innuPREP Gel Extraction Kit	Analytik Jena
peqGOLD TriFast™ Kit	Peqlab
TURBO DNA-free™ Kit	Thermo Fisher Scientific

### 2.1.5 Nährmedien

**Tabelle 2.7: Zusammensetzung von 1 l Rhodobacter-Äpfelsäure-Medium (RÄ-Medium; Remes et al. 2014).**

Bestandteil	Menge	Konzentration (mM)
Malat	3,00 g	20,0
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,20 g	0,8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,20 g	9,0
CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,07 g	0,4
Spurenelementlösung (Tab. 2.8)	1,50 ml	
<sub>dd</sub> H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1,00 l	
Autoklavieren		
Vitaminlösung (Tab. 2.9)	8,00 ml	
Phosphatlösung (Tab. 2.10)	20,00 ml	

**Tabelle 2.8: Zusammensetzung von 1 l Spurenelementlösung.** Die Lösung wurde vor Benutzung autoklaviert.

Bestandteil	Menge	Konzentration (mM)
Fe-(II)-Citrat	500,00 mg	2,000
MgCl <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O	20,00 mg	3,500
ZnCl <sub>2</sub>	4,00 mg	0,030
LiCl	5,00 mg	0,100
KI	2,50 mg	0,020
KBr	2,50 mg	0,020
CuSO <sub>4</sub>	0,15 mg	0,009 · 10 <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	1,00 mg	0,002
CoC <sub>12</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	5,00 mg	0,020
SnCl <sub>2</sub>	0,50 mg	0,002
BaCl <sub>2</sub>	0,50 mg	0,002
AlCl <sub>3</sub>	1,00 mg	0,007
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	10,00 mg	0,100
EDTA	20,00 mg	0,060
<sub>dd</sub> H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1,00 l	

**Tabelle 2.9: Zusammensetzung von 1 l Vitaminlösung.** Die Lösung wurde vor Benutzung sterilfiltriert.

Bestandteil	Menge	Konzentration (mM)
Nicotinsäure	3,00 g	24,0
Thiamin/HCl	1,20 g	3,5
Nicotinamid	0,20 g	1,6
Biotin	0,07 g	0,3
$\text{ddH}_2\text{O}$	<i>ad</i> 1,00 l	

**Tabelle 2.10: Zusammensetzung von 1 l Phosphatlösung.** Die Lösung wurde vor Benutzung sterilfiltriert.

Bestandteil	Menge	Konzentration (mM)
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	45,0 g	260
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	30,0 g	250
$\text{ddH}_2\text{O}$	<i>ad</i> 1,0 l	

**Tabelle 2.11: Zusammensetzung von 1 l Standard I-Nährmedium.** Das Medium wurde vor Benutzung autoklaviert.

Bestandteil	Menge
Standard I-Medium	25,0 g
$\text{ddH}_2\text{O}$	<i>ad</i> 1,0 l

**Tabelle 2.12: Zusammensetzung von 1 l Peptone-Yeast-Agar (PY-Agar).** Der Agar wurde vor Benutzung autoklaviert.

Bestandteil	Menge	Konzentration (mM)
Pepton	10,0 g	
Hefeextrakt	0,5 g	
$\text{CaCl}_2$ (1 M)	2,0 ml	2 mM
$\text{MgCl}_2$ (1 M)	2,0 ml	2 mM
$\text{FeSO}_4$ (0,5 %)	2,4 ml	
$\text{ddH}_2\text{O}$	<i>ad</i> 800,0 ml	
pH einstellen	7,0	
$\text{ddH}_2\text{O}$	<i>ad</i> 1,0 l	
Bacto-Agar	8,0 g	

## 2.1.6 Geräte

**Tabelle 2.13: Allgemein verwendete Laborgeräte.** 50 ml-Zentrifugationsröhrchen wurden mit Sorvall-Zentrifugen zentrifugiert, Reaktionsgefäße von 0,5–2,0 ml in Heraeus-Zentrifugen.

Gerät	Hersteller
Sorvall RC5/RC6 Plus (Kühlzentrifuge)	Sorvall
SS-34-Rotor (für Sorvall-Zentrifugen)	Thermo Fisher Scientific
SA-600-Rotor (für Sorvall-Zentrifugen)	Thermo Fisher Scientific
Heraeus™ Biofuge Fresco 17 (Tischkühlzentrifuge)	Thermo Scientific
Heraeus™ Biofuge Pico 17 (Tischzentrifuge)	Thermo Scientific
Omnilux 18W-Leuchtstoffröhre	Omnilux
Specord 50 Plus (Photometer)	Analytik Jena
LI-250A Light Meter	LI-COR Biosciences
Infinite M200 microplate reader	Tecan
Vibramax 100 shaker	Heidolph Instruments
MicroPulser Electroporator	Bio-Rad
UV-Stratalinker™ 1800	Stratagene Corp.
Leica DMI 6000 B Inverse Microscope	Leica
Concentrator plus	Eppendorf
CFX Connect Real-Time System	Bio-Rad
NanoDrop	PeqLab
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad
S1000™ Thermal Cycler	Bio-Rad
Szintillationszähler	Beckman Coulter
Imaging Screen	Bio-Rad
Personal Molecular Imager FX	Bio-Rad
Screen Eraser K	Bio-Rad
UVT-20 M/W-Transilluminator	Herolab GmbH
Multiple Gel Caster	Serva
Mini-Gel System	Serva
ElectroBlotter	PeqLab

## 2.2 Sterilisation und Reinigung der Glasware

*R. capsulatus* wurde in Glasware kultiviert, die von Hand gespült wurde und nicht von den Spülmaschinen des Instituts. Es zeigte sich in *R. capsulatus* eine starke Schaumbildung, wenn Kulturen aerob in von Spülmaschinen gereinigten Meplatflaschen kultiviert wurden. Der Austausch dieser Spülmaschinen deckte sich in etwa zeitlich mit dem Auftreten der Schaumbildung der Kulturen und könnte die Ursache für diese sein. Unter Umständen war *R. capsulatus* bei aerober Kultivierung empfindlicher für mögliche Spülmittelrückstände in der Glasware (ein gängiger Inhibitor bakteriellen Wachstums; Sandle und Satyada 2016).

Um die Schaumbildung und damit ausgeschwemmte Zellen zu vermeiden, wurde neue Glasware eine Woche lang mit sterilem RÄ-Medium (Tab. 2.7) gefüllt und bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Das RÄ-Medium wurde ausgeschüttet, die Glasware wurde einmal mit 70 % EtOH und viermal mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) gespült. Die Glasware wurde über Nacht (ü.N.) bei RT getrocknet und im Anschluss mit dem Feststoff-Programm des Autoklav autoklaviert. Das Glaswarensatz für *R. capsulatus*-Versuche hatte seine eigenen Stopfen bzw. Schraubdeckel, um mögliche Kontaminationen aus der Spülmaschine des Instituts zu vermeiden. Nach Versuchen wurden die Kulturen autoklaviert und die Glasware mit 70 % EtOH für 20 min sterilisiert. Danach wurde die Glasware wie oben beschrieben mit VE-Wasser gespült und autoklaviert.

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Kultivierung von Mikroorganismen

Entsprechend der gewünschten Wachstumsbedingungen wurde *Rhodobacter* unter verschiedenen Licht- und Sauerstoffbedingungen kultiviert. Die verwendete Glasware und die Füllstände richteten sich nach den gewollten Bedingungen. Ungeachtet der Bedingungen wurde *Rhodobacter* stets bei 32 °C in Rhodobacter-Äpfelsäure (RÄ)-Medium kultiviert. Für mikroaerobe Bedingungen ( $\sim 25 \mu\text{M O}_2$ ) wurden Erlenmeyerkolben zu 80 % ihres genannten maximalen Füllvolumens mit Kultur befüllt und bei 140 rpm im Dunkeln geschüttelt. Für aerobe Bedingungen ( $\sim 160\text{--}180 \mu\text{M O}_2$ ) wurden Erlenmeyerkolben zu 20 % ihres genannten maximalen Füllvolumens mit Kultur befüllt und bei 140 rpm im Dunkeln geschüttelt. Alternativ wurde *Rhodobacter* auch aerob kultiviert, indem die mit Alufolie umhüllten Meplatflaschen mit Luft begast wurden (Fülllevel der Flaschen: 80 % des maximalen Füllvolumens). *Rhodobacter* wurde anaerob bzw. phototroph in Meplatflaschen kultiviert, welche randvoll mit Kultur gefüllt und verschlossen waren. Die Flaschen wurden mit einer Fluoreszenzröhre (Omnilux 18W) mit Weißlicht beleuchtet:  $60 \text{ W m}^{-2}$  Weißlicht für Wildtypstämme,  $20 \text{ W m}^{-2}$  für Tn5-Mutanten mit gestörter Carotinoidbiosynthese. Ein Ventilator kühlte die Kulturen auf 32 °C. Um eine *Rhodobacter*-Kultur von einer zu einer anderen der aufgeführten Bedingungen zu wechseln, wurde die Kultur auf eine optische Dichte bei 660 nm ( $\text{OD}_{660}$ ) von  $\sim 0,4$  auf 0,2 mit RÄ-Medium verdünnt.

*E. coli* wurde in Standard I (StI)-Medium (Tab. 2.11) in Erlenmeyerkolben (aufgefüllt auf 80 % des Maximalvolumens) bei 37 °C im Dunkeln bei 180 rpm kultiviert. Alternativ wurden 2–6 ml Kultur in Reagenzgläsern statt Erlenmeyerkolben kultiviert. Um *Rhodobacter* auf RÄ-Agarplatten bzw. *E. coli* auf StI-Agarplatten zu kultivieren, wurde mit einer Impföse entweder Flüssigkultur oder ein Stückchen Cryokultur auf einer Platte ausgestrichen und im Dunkeln inkubiert: *Rhodobacter* für ca. 48–72 h bei 32 °C und *E. coli* ü.N. bei

37°C. Stämme mit Antibiotikaresistenzen als Selektionsmarker enthielten entsprechend Tab. 2.5 (S. 31) Antibiotikum im Medium. Für die Durchführung von Experimenten wurden *Rhodobacter*-Stämme mit Selektionsmarkern bis zu einer OD<sub>660</sub> von mindestens 0,4 kultiviert und dann auf 0,2 mit RÄ-Medium (ohne Antibiotikum) verdünnt.

### 2.3.2 Messung der optischen Dichte

Die OD<sub>660</sub> von *Rhodobacter* wurde mittels eines Photometers bei 660 nm in Polystyrenküvetten gemessen. Ab einer OD<sub>660</sub> von ca. 0,5 wurden Proben vor der Messung mit RÄ-Medium verdünnt. Proben aerob gewachsener Kulturen wurden vor der Messung zehn Mal auf- und abpipettiert, um etwaige Zellklümpchen zu resuspendieren.

### 2.3.3 Kryokonservierung

Für das Aufbewahren eines Stammes wurden Kryokulturen angelegt. Dafür wurden 8 ml einer exponentiell wachsenden Kultur in vier 2 ml-Reaktionsgefäßen bei 7.500 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden mit je 800 µl RÄ-Medium (*Rhodobacter*) bzw. StI-Medium (*E. coli*) zum Waschen resuspendiert. Die Kulturen wurden bei 7.500 rpm für 5 min zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Pellets zusammen in 1 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zusammen mit 500 µl 80 %-Glycerin gemischt, in ein Kryoreaktionsgefäß überführt und in Flüssigstickstoff gefroren. Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden die Kryokulturen danach bei -80 °C gelagert. Kryokulturen wurden nur in Flüssigstickstoff transportiert.

### 2.3.4 Photooxidative Stressexperimente mit Flüssigkulturen

Um *Rhodobacter*-Kulturen mit <sup>1</sup>O<sub>2</sub> zu stressen, wurden wie in Glaeser und Klug (2005) beschrieben photooxidative Stressexperimente durchgeführt. Abbildung 2.1 zeigt den Aufbau des Stressexperiments. Zunächst wuchsen *Rhodobacter*-Kulturen unter mikroaeroben Bedingungen bis zu einer OD<sub>660</sub> von ~0,4 an. Die Kulturen wurden mit RÄ-Medium auf eine OD<sub>660</sub> von 0,2 in 100 ml-Meplatflaschen verdünnt. Die Flaschen wurden zwecks Lichtschutz in Alufolie gewickelt und es wurde zu jeder Kultur Methylenblau (MB) hinzugegeben (finale Konzentration 0,2 µM). Die Kulturen wurden in ein 32 °C warmes Wasserbad platziert und über Silikonschläuche mittels einer Aquariumpumpe mit Luft begast. Nachdem die Kulturen eine OD<sub>660</sub> von ~0,4 erreicht hatten, wurden diese photooxidativ gestresst. Dafür wurde die Alufolie entfernt und die Kulturen wurden über eine Lampe mit 800 W m<sup>-2</sup> bestrahlt. Unter Berücksichtigung der Lichtintensitäten vor der Scheibe des Wasserbeckens (I<sub>1</sub>) und hinter der Meplatflasche (I<sub>2</sub>) wurde die Lichtintensität (I) von 800 W m<sup>-2</sup> mit Gleichung 2.1 mittels eines LI-250A Light Meter (LI-COR Biosciences) kontrolliert

(van Liere und Walsby 1982). Auf Grund der Wärme durch die Lampe wurde ein Ventilator eingeschaltet, um die Temperatur des Wassers auf 32 °C zu halten.

$$I = \frac{I_1 - I_2}{\ln(I_1/I_2)} \quad (2.1)$$

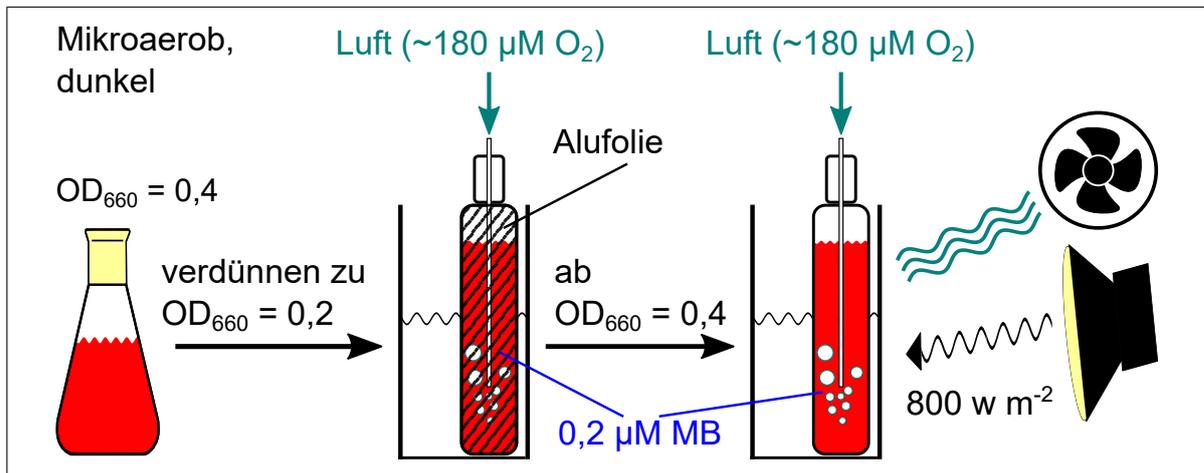


Abbildung 2.1: Schema des photooxidativen Stressexperiments.

### 2.3.5 Messung des Pigmentgehalts

Um von *Rhodobacter*-Kulturen die Gehalte an Carotinoiden und Bchl *a* zu bestimmen, wurden zunächst in technischen Duplikaten Proben zu 1 ml entnommen. Die Proben wurden bei 5.000 rpm für 5 min zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Pellets in je 50  $\mu\text{l}$  bidestilliertes Wasser ( $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$ ) resuspendiert. Es wurden zu den Proben jeweils 500  $\mu\text{l}$  Aceton-Methanol (7:2, v/v) hinzupipettiert. Die Proben wurden für 30 s auf einem Vortex geschüttelt und bei 13.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Überstände mit den gelösten Pigmenten wurden in eine Quarzküvette überführt und es wurde die Absorption bei 484 und 770 nm ( $A_{484}$  und  $A_{770}$ ) gemessen. Als Leerwert diente die  $A_{484}$  von Aceton-Methanol (7:2, v/v). Die Gehalte der Pigmente wurden mittels der Extinktionskoeffizienten für Carotinoide ( $128 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; Shiozawa et al. 1982) und Bchl *a* ( $76 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; Clayton 1966) berechnet, wie in den Gleichungen (2.2) und (2.3) gezeigt ist.

$$\frac{\mu\text{M Carotinoide}}{OD_{660}} = \frac{Abs_{484} * 1000 \mu\text{M} * V_{\text{Aceton-Methanol}}}{128 * 1 * V_{\text{Probe}} * OD_{660}} \quad (2.2)$$

$$\frac{\mu\text{M Bchl } a}{OD_{660}} = \frac{Abs_{770} * 1000 \mu\text{M} * V_{\text{Aceton-Methanol}}}{76 * 1 * V_{\text{Probe}} * OD_{660}} \quad (2.3)$$

### 2.3.6 Aufnahme von Vollzellspektren

Mittels eines Photometers wurden in Polystyrenküvetten Vollzellspektren aufgenommen. Als Leerwert diente RÄ-Medium. Es wurden Spektren im Bereich von 300–950 nm aufgenommen. Alle aufgenommenen Absorptionswerte wurden durch den Absorptionswert von 660 nm geteilt, um sie auf die Zelldichte der Kultur zu normalisieren.

### 2.3.7 Messung reaktiver Sauerstoffspezies

#### 2.3.7.1 Messung reaktiver Sauerstoffspezies via H<sub>2</sub>DCFDA

Mittels 2,7-Dihydrodichlorofluorescein-Diacetat (H<sub>2</sub>DCFDA) wurde nach Remes et al. (2014) die Bildung von ROS in *Rhodobacter* bestimmt. Für eine ROS-Messung einer Kultur wurden je drei Proben à 100 µl mit H<sub>2</sub>DCFDA (finale Konzentration: 10 µM) inkubiert, als Leerwert inkubierte eine Kulturprobe ohne Sonde. Die Proben inkubierten in einer 96-Well Blackwellplate (Greiner) für 30 min bei 32 °C im Dunkeln. Danach wurde mittels eines Tecan Plate Readers die Fluoreszenzintensität (Ex<sub>492</sub>/Em<sub>525</sub>) gemessen und der Hintergrundwert der Leerwertkontrolle abgezogen. Die Fluoreszenzintensität wurde auf die OD<sub>660</sub> des Probennahmezeitpunkts normalisiert.

#### 2.3.7.2 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Messung mittels Singulett Oxygen Sensor Green

Die Menge des von *Rhodobacter* gebildeten <sup>1</sup>O<sub>2</sub> wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) bestimmt. Das SOSG wurde vor den Versuchen mit 82,5 µl Methanol versetzt, um eine Stammlösung von 2 mM zu erhalten. Für jeden Versuchstag wurde die SOSG-Experimentierlösung frisch angesetzt, hierfür wurde die Stammlösung mit 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES-Puffer) auf 100 µM verdünnt und bei 4 °C im Dunkeln bis zum Versuch gelagert. Der HEPES-Puffer (pH 7) zum Verdünnen enthielt 1 % Methanol.

Für den *in vivo*-Assay wurden in Meplat-Flaschen kultivierte *Rhodobacter*-Kulturen wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben aerob kultiviert, bis die Kulturen eine OD<sub>660</sub> von ca. 0,4 erreichten. Daraufhin wurden von jeder Kultur in technischen Duplikaten jeweils 114 µl in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte (Greiner) pipettiert: transparente Platten für zu stressende Proben, schwarze Platten für Dunkelkontrollen. Zu jeder Probe wurden 6 µl SOSG-Experimentierlösung hinzupipettiert (finale SOSG-Konzentration: 5 µM). Zusätzlich wurde für Messungen von Hintergrundwerten pro Kultur eine weitere Probe von 114 µl mit 6 µl 40 mmol HEPES-Puffer (pH 7) versetzt und in eine Vertiefung der Platten pipettiert. Transparente Platten wurden mit einem transparenten Deckel bedeckt, auf welchem ein rotes Transparent zwecks Lichtfilterung aufgeklebt war. Schwarze Platten wurden mit Alufolie bedeckt. Die Proben inkubierten so auf einem Plattenschüttler für 30 min bei

450 rpm. Eine Schreibtischlampe beleuchtete dabei Vertiefungen mit zu stressenden Proben mit  $800 \text{ W m}^{-2}$ , ein Ventilator kühlte die Temperatur auf  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Anschließend wurden die Proben in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 8.000 rpm für 5 min pelletiert, die Überstände wurden verworfen. Die Pellets wurden in jeweils  $100 \mu\text{l}$  40 mmol HEPES-Puffer (pH 7, mit 1 % Methanol) resuspendiert und in Vertiefungen einer transparenten 96-Well-Platte überführt. Im einem Tecan-Plate Reader wurden die Fluoreszenzintensitäten bei  $\text{Ex}_{500}/\text{Em}_{532}$  gemessen (zusätzliche Einstellungen: Gain = 100, Number of Flashes = 5). Testläufe ohne Zellen ergaben für verschiedene Extinktions- und Emissionswellenlängen ohne Zellen für diese Bedingungen die maximale Fluoreszenzintensität. Nach Abzug der jeweiligen Hintergrundwerte wurden die Fluoreszenzintensitäten einer Kultur gemittelt und auf die vor Versuchsbeginn gemessenen Werte der  $\text{OD}_{660}$  oder des BChl *a*-Gehalts normalisiert.

### 2.3.8 Zellernte für RNA- und Proteinuntersuchungen

Um aus *Rhodobacter*-Kulturen Proben für RNA- und Proteinuntersuchungen zu gewinnen, wurde je nach Versuch Probenmaterial in verschiedenen Mengen zu unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelt (Tab. 2.14).

**Tabelle 2.14: Übersicht über Volumina und Zeitpunkte von Probennahmen für RNA- und Proteinuntersuchungen.**

Untersuchungszweck	Kultivierung	Zeitpunkte (min)	Probenvolumen (ml)
RNA (Northern Blotting)	mikroaerob	0; 240	20
RNA (qRT-PCR)	photoox. Stress	0; 10	10
Protein (LC-MS/MS)	photoox. Stress	0; 45; 90; 180	60

Die Proben wurden in 50 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert, welche ca. zur Hälfte mit Eis gefüllt waren. Zwischen den folgend beschriebenen Schritten wurden Proben auf Eis gelagert. Nach der Probennahme wurden die Proben bei  $10.000 \text{ g}$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Proben wurden jeweils in 1 ml eiskaltem RÄ-Medium resuspendiert und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden bei  $10.000 \text{ g}$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 10 min zentrifugiert und nach Verwerfen der Überstände bis zur weiteren Verwendung bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.3.9 Hemmhoftests

Die Sensitivität von Stämmen gegenüber diversen Stressoren wurde mittels Hemmhoftests bestimmt. Für Hemmhoftests wurden zunächst Kulturen wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben mikroaerob kultiviert, bis sie eine  $\text{OD}_{660}$  von 0,4–0,6 erreicht hatten. Im Anschluss wurden

Proben der Kulturen mit 50 °C warmem Weichagar (1:1 RÄ-Medium/RÄ-Agar, v/v) im folgenden Verhältnis in Falcon-Reaktionsgefäßen via Vortexen vermischt:

$$\frac{0,4}{\text{OD}_{660}} * 1,2 \text{ ml Kultur} + 600 \text{ } \mu\text{l Phosphatlg.} + 240 \text{ } \mu\text{l Vitaminlg.} \rightarrow \text{pro 30 ml Weichagar}$$

Es wurden jeweils 5 ml Weichagar-Kultur-Gemisch auf eine 15 ml-RÄ-Agarplatte pipettiert. Nach Erhärten des Weichagars wurde ein Filterplättchen (Whatman-Papier, ca. 5 mm Durchmesser) auf die Mitte der Platte per Pinzette gelegt. Danach wurden jeweils 5 ml des Stressors auf das Filterplättchen pipettiert, als Negativkontrolle diente  $\text{ddH}_2\text{O}$ . Platten mit MB als Stressor wurden seitlich mit Parafilm abgedichtet und für 48 h bei 32 °C unter  $20 \text{ W m}^{-2}$  inkubiert. Platten mit anderen Stressoren oder  $\text{ddH}_2\text{O}$  wurden in Alufolie gewickelt und 48 h bei 32 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Inkubation wurden die Hemmhöfe ausgemessen.

### 2.3.10 Methanolstresstest in *Rhodobacter*

Da die SOSG-Experimentierlösung Methanol enthielt (siehe Abschnitt 2.3.7.2), wurde die Empfindlichkeit von *Rhodobacter* gegenüber Methanol überprüft. Es wurden von *R. capsulatus*-Kulturen (biologische Triplikate) je fünf Proben à 2  $\mu\text{l}$  entnommen. Zu den Proben wurde Methanol zu folgenden finalen Konzentrationen dazugegeben: 2 %, 4 %, 6 %, 8 % und 10 % (alle v/v). Von jeder Probe wurden 5  $\mu\text{l}$  auf eine RÄ-Agarplatte aufgetropft. Nach dem Eintrocknen inkubierten die Kulturen für 48 h und es wurde das Wachstum der Kulturen kontrolliert.

### 2.3.11 Beta-Galaktosidase-Assay

Der  $\beta$ -Galaktosidase-Assay ermöglicht eine kolorimetrische Quantifizierung von Transkriptions- oder Translationsaktivitäten *in vivo* (Miller 1972). Um die Promotoraktivität eines Gens zu untersuchen, kann in der sogenannten transkriptionellen Fusion die entsprechende Promotorregion auf einem Reporterplasmid vor das *lacZ*-Gen ( $\beta$ -Galaktosidase) kloniert werden. Die  $\beta$ -Galaktosidase ist in der Lage, *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (ONPG) hydrolytisch in zwei Produkte zu spalten: Galaktose und das gelbfarbene *o*-Nitrophenol. Da sich die Intensität der Gelbfärbung spektrometrisch messen lässt, lässt sich über die transkriptionelle Fusion einer Promotorregion von Interesse mit *lacZ* und ONPG als Substrat die Promotoraktivität nach folgendem Protokoll ermitteln.

Es wurden in den Versuchen Stämme untersucht, die das MCS5-LacZ-Plasmid trugen, in welchen Promotorregionen von Interesse vor dem *lacZ*-Gen fusioniert waren. Als Leervektorkontrolle diente ein *R. capsulatus*-Stamm mit dem MCS5-LacZ-Plasmid ohne transkriptionelle Fusion. Es wurden von biologischen Triplikaten in technischen

Duplikaten Proben von je 2 ml entnommen, zu folgenden Zeitpunkten: vor Stress (0 min) sowie 10 und 30 min nach Stress. Zusätzlich wurden zu jedem Zeitpunkt die OD<sub>660</sub>-Werte aufgenommen. Die Proben wurden solange auf Eis gekühlt, bis sie für 10 min bei 10.000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets wurden jeweils in 750 ml Z-Puffer (Tab. 2.15) aufgenommen. Zusätzlich wurde ein Reaktionsgefäß mit 750 ml Z-Puffer als Kontrolle angesetzt. Es wurden zu allen Proben und zur Kontrolle jeweils 10 µl 0,1 % SDS und 20 µl Chloroform hinzupipettiert. Die Proben und die Kontrolle wurden für 30 s auf einem Vortex gemischt, danach inkubierten sie genau wie eine ONPG-Lösung (4 mg ml<sup>-1</sup>) für 5 min auf einem 28 °C-warmen Heizblock. Die Hydrolyse des ONPG wurde gestartet, indem zum ersten Reaktionsansatz 200 µl der ONPG-Lösung hinzupipettiert und der Ansatz kurz per Schütteln gemischt wurde. Die übrigen Reaktionen der restlichen Ansätze wurden zeitverzögert genauso gestartet; alle inkubierten mit ONPG für 5 min. Die Reaktionen wurden jeweils durch Zugabe von 500 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> abgestoppt. Die Reaktionsansätze zentrifugierten bei 13.000 rpm für 3 min. Es wurde jeweils von 800 µl Überstand die Absorption bei 420 nm (A<sub>420</sub>) und 550 nm (A<sub>550</sub>) gemessen, als Leerwert diente die Kontrolle. Unter Berücksichtigung des ursprünglichen Probenvolumens V (2 ml) und der Reaktionszeit t (5 min) wurde die Promotoraktivität über die β-Galaktosidaseaktivität in Miller Units (Millereinheiten, MU) nach Gleichung (2.4) berechnet:

$$\text{Miller Units} = \frac{1000 * (A_{420} - 1,82 * A_{550})}{\text{OD}_{660} * V * t} \quad (2.4)$$

**Tabelle 2.15: Zusammensetzung von 1 l Z-Puffer.** Das β-Mercaptoethanol wurde frisch zur Experimentierlösung kurz vor Verwendung hinzugegeben.

Bestandteil	Menge	Konzentration (mM)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,24 g	40
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,70 g	60
KCl	0,75 g	10
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,25 g	1
	zu pH 7,20	
ddH <sub>2</sub> O	ad 1,00 l	
β-Mercaptoethanol	2,70 µl ml <sup>-1</sup>	50

### 2.3.12 Elektrotransformation von *E. coli*

Plasmide wurden in elektrokompente *E. coli* JM109 und *E. coli* S17-1 via Elektroporation eingefügt. Dafür wurde Plasmidisolat zu 60 µl auf Eis aufgetauten, kompetenten Zellen zugegeben: es wurden entweder 2 µl nicht gefällte Plasmidlösung oder 10 µl gefällte Plasmidlösung zu den Zellen gegeben. Im Anschluss wurden die Reaktionsansätze in

Elektroporationsküvetten (Bio-Rad) überführt und mittels eines Micro Pulser (Bio-Rad) bei 2,5 kV für ca. 5,0 ms geschockt. Es wurden kurz darauf jeweils 400 µl StI-Medium zu den Reaktionsansätzen hinzupipettiert. Die Ansätze inkubierten bei 140 rpm und 37 °C und wurden im Anschluss bei 8.000 rpm und 5 min zentrifugiert. Per Invertieren wurden die Überstände verworfen; die Zellen wurden in den Restflüssigkeiten durch Rühren mit einer Pipettenspitze vorsichtig resuspendiert und auf zwei StI-Agarplatten mit Antibiotika als Selektionsmarkern ausplattiert (einmal 10 µl, einmal das Restvolumen). Die Kulturen inkubierten ü.N. bei 37 °C, im Anschluss wurden die Platten auf gewachsene Kolonien untersucht. Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze gepickt, welche wiederum in ein Reagenzglas mit 2–8 µl StI-Medium (und Antibiotikum) abgeworfen wurde. Die gepickten Klone inkubierten ü.N. bei 180 rpm und 37 °C. Am Folgetag wurden gewachsene Kulturen für das Anlegen von Kryokulturen, für Plasmidisolationen oder Konjugationen verwendet.

### 2.3.13 Mikroskopie

Von *Rhodobacter* wurden mikroskopische Aufnahmen mittels eines Leica DMI 6000 B Inverse Microscope (Leica, Wetzlar) mit sCMOS camera und HCX PL APO 100×/1.4-Objektiv aufgenommen. Dafür mussten 2 µl Kultur zunächst auf einer Agarosegeleinlage auf einem Objektträger fixiert werden (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, 1 % Agarose; Brenzinger et al. 2018). Die Aufnahmen wurden mit dem VisiView-Programm (Visitron Systems, Puchheim) durchgeführt, speziell mit den Kanälen für Differential Interference Contrast (Differentialinterferenzkontrast, DIC) und Green Fluorescent Protein (grün fluoreszierendes Protein, GFP). Kontrast und Helligkeit der Aufnahmen wurden nachträglich in ImageJ 1.52a bearbeitet, ebenso wurden darin Überlagerungen von DIC- und GFP-Bildern erzeugt (Schindelin et al. 2012; Schneider et al. 2012). Als Maßstab wurden in den Bildern in ImageJ 15,5039 Pixel als 1 µm gesetzt.

### 2.3.14 Konjugation von Plasmiden zu *R. capsulatus*

Mittels di-parentaler Konjugation wurden Plasmide von *E. coli* S17-1-Stämmen auf *R. capsulatus* übertragen. Mit einer Impföse wurde etwas Koloniematerial des jeweiligen *E. coli* S17-1-Stamms in 1 ml einer exponentiell wachsenden *R. capsulatus*-Kultur (OD<sub>660</sub> von ca. 0,6) resuspendiert. Der Konjugationsansatz wurde bei 8.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden in 200 µl StI-Medium resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 100 µl auf ein Filterpapier (Cellulose nitrate, GE Healthcare) auf einer Peptone Yeast (PY)-Agarplatte (Tab. 2.12) pipettiert. Als Negativkontrolle wurden 100 µl *R. capsulatus*-Kultur ohne *E. coli* S17-1-Zellen auf ein Filterpapier auf einer PY-Agarplatte pipettiert. Nach dem Eintrocknen der Zellsuspension inkubierten die Platten (mit dem Deckel nach oben) bei 32 °C im Dunkeln für 8–16 h.

Im Anschluss wurden die Filter in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und die Zellen jeweils mit 1 ml RÄ-Medium von den Filtern heruntergewaschen. Die Zellsuspension wurde auf RÄ-Agarplatten in einer Verdünnungsreihe (mit RÄ-Medium) ausplattiert: jeweils 100 µl der Verdünnungsstufen  $10^0$ ,  $10^{-2}$  und  $10^{-4}$ . Die Platten wurden für ca. 24–72 h bei 32 °C im Dunkeln inkubiert, bis *Rhodobacter*-Kolonien wuchsen. Zur Kontrolle wurden diese Kulturen mit einer Pipettenspitze gepickt, in 5 µl RÄ-Medium resuspendiert, auf einer neuen RÄ-Agarplatte (mit Antibiotikum) aufgetropft und wie oben beschrieben inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden für weitere Kultivierungen bzw. Arbeitsschritte verwendet.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Extraktion von Nukleinsäuren aus Bakterien

#### 2.4.1.1 Extraktion chromosomaler DNA aus *Rhodobacter*

Um chromosomale DNA aus mikroaerob gewachsenen *Rhodobacter*-Kulturen zu isolieren, wurden zunächst 10 ml einer Kultur ( $OD_{660}$  von ca. 0,6) bei 8.000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach Verwerfen der Überstände wurde jedes Zellpellet in 700 µl TE-Puffer (Tab. 2.16) resuspendiert. Nach Überführen der Suspensionen in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße lysierten die Zellen für 10 min bei RT. Im Anschluss wurden Proteine eines Zellpellets jeweils durch folgende vier Schritte lysiert: Zugabe von 30 µl 10 % SDS, Zugabe von 16 µl Proteinase K ( $20 \text{ mg ml}^{-1}$ ), Mixen durch mehrmaliges Invertieren, Inkubation für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurden zu jeder Probe 100 µl NaCl (5 M) und 80 µl 10 % CTAB (w/v, in 700 mM NaCl) hinzugegeben, danach wurden die Proben bei 65 °C für 10 min erhitzt.

**Tabelle 2.16: Zusammensetzung von 100 ml TE-Puffer.**

Bestandteil	Menge	Konzentration (mM)
EDTA- $\text{Na}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (20 % w/v)	40 mg	40
1 M TrisHCl (pH 8,0)*	1 ml	10
$\text{ddH}_2\text{O}$	<i>ad</i> 100 ml	

\* Siehe Tab. 2.17.

Zur Präzipitation von Zelltrümmern und Proteinen wurden zu jeder Probe 750 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben, dann wurden die Proben nach mehrmaligen Invertieren bei 13.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Es wurden 650 µl der oberen Phase in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und jeweils mit 650 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) via Invertieren gemischt. Nach erneuter Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min wurden jeweils 550 µl der oberen Phase in ein neues

1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Zur Präzipitation der DNA wurde zu den Proben jeweils 300 µl Isopropanol hinzugegeben und diese dann für 5 min inkubiert. Die Proben wurden bei 3.000 rpm für 3 min zentrifugiert und die Überstände in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden jeweils mit 2 ml eiskaltem EtOH (70 %) gewaschen und bei 3.000 rpm für 3 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets für 10 min in einer SpeedVac (Concentrator Plus, Eppendorf) mit dem V-AL-Programm getrocknet. Die Pellets wurden in 50 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  gelöst und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

**Tabelle 2.17: Zusammensetzung von 100 ml TrisHCl-Puffer.**

Bestandteil	Menge	Konzentration (M)
Tris	12,1 mg	1
$\text{ddH}_2\text{O}$	<i>ad</i> 80,0 ml	
HCl	pH einstellen	
$\text{ddH}_2\text{O}$	<i>ad</i> 100,0 ml	

#### 2.4.1.2 Extraktion von RNA aus *Rhodobacter*

##### 2.4.1.2.1 RNA-Extraktion mit Hot-Phenol

Nach der Zellernte auf Eis (Abschnitt 2.3.8) wurden alle Pellets auf Eis in 200 µl RNA-Puffer I (Tab. 2.18) resuspendiert. Es wurden zu jeder Probe 200 µl RNA-Puffer II (Tab. 2.19) hinzupipettiert. Zur Zellyse wurden die Proben für 30 s via Vortex gemischt und für 90 s in einem  $65^\circ\text{C}$ -warmen Wasserbad inkubiert. Danach startete die Phenolisierung, indem zu jeder Probe 400 µl  $65^\circ\text{C}$ -warmes Phenol-Wasser (Roth) hinzugegeben wurde. Nachdem die Proben für 30 s via Vortex gemischt wurden, inkubierten sie für 3 min in einem  $65^\circ\text{C}$ -warmen Wasserbad. Im Anschluss wurden Proben für mindestens 30 s in Flüssigstickstoff gefroren. Zwecks Druckausgleich wurden danach kurz die Deckel der Reaktionsgefäße geöffnet und geschlossen, ehe die Proben bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Das beschriebene Protokoll, beginnend mit der Phenolisierung, wurde noch zweimal hintereinander mit den Überständen durchgeführt. Danach wurden zu den Überständen jeweils 400 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben und die Proben gemischt. Die Proben zentrifugierten bei 13.000 rpm für 10 min, die Überstände wurden in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Zu jeder Probe wurden NaOAc (pH 4,5;  $\frac{1}{10}$  des Probenvolumens) und 96 % EtOH (eiskalt, das 2,5-fache des Probenvolumens) hinzugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren der Proben wurden diese ü.N. bei  $-20^\circ\text{C}$  zur RNA-Fällung gelagert. Nach der Fällung wurden die Proben bei 13.000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  für 20 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und das Pellet in 200 µl 75 % EtOH gewaschen. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  für 20 min wurde der Überstand entfernt

und die Pellets für 7 min in einer SpeedVac mit dem V-AL-Programm getrocknet. Die Pellets wurden in je 25  $\mu\text{l}$   $\text{ddH}_2\text{O}$  resuspendiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur Verwendung der RNA gelagert.

**Tabelle 2.18: Zusammensetzung von 100 ml RNA-Lösung I (Resuspensionspuffer).**  
Die Lösung wurde vor Benutzung autoklaviert.

Bestandteil	Menge	Konzentration (mM)
Saccharose	10,27 g	300
NaOAc (3 M, pH 4,5)	0,33 ml	10
DEPC-H <sub>2</sub> O (1 % v/v)	<i>ad</i> 100,00 ml	

**Tabelle 2.19: Zusammensetzung von 100 ml RNA-Lösung II (Lysispuffer).**

Bestandteil	Menge	Konzentration
SDS (20 % w/v)	10,00 ml	2 %
NaOAc (3 M, pH 4,5)	0,33 ml	10 mM
DEPC-H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 100,00 ml	

#### 2.4.1.2.2 RNA-Extraktion mit Trizol

Für quantitative Real Time-Polymerase Chain Reactions (quantitative Real Time-Polymerasekettenreaktionen, qRT-PCRs) wurde RNA aus *Rhodobacter* mittels Trizol isoliert. Zu Beginn wurden die Zellpellets in je 500  $\mu\text{l}$  peqGOLD TriFast™ resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von jeweils 100  $\mu\text{l}$  Chloroform wurden die Proben für 30 s per Vortex gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei 13.000 rpm für 15 min zentrifugiert, ca.  $\frac{3}{4}$  der oberen Phase wurden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Durch folgende Schritte wurde die RNA gefällt: Zugabe von Isopropanol (gleiches Volumen wie Probe), Inkubation auf Eis für 20 min, Zentrifugation bei 13.000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  für 15 min, Verwerfen des Überstandes. Die Pellets wurden danach zweimal hintereinander gewaschen, nämlich durch Zugabe von jeweils 750  $\mu\text{l}$  EtOH mit anschließender Zentrifugation bei 13.000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  für 15 min mit Verwerfen des Überstandes. Die Pellets wurden für 7 min mit dem V-AL-Programm der Speedvac getrocknet und in 100  $\mu\text{l}$   $\text{ddH}_2\text{O}$  resuspendiert. Die RNA wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 2.4.1.3 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Plasmide wurden aus *E. coli* auf zwei Arten isoliert, i.d.R. aus 2 ml-Kulturproben. Diese wurden bei 8.000 rpm für 5 min zentrifugiert, die Überstände wurden verworfen. In der ersten Methode wurden zur Konjugation in *R. capsulatus* benötigte Plasmide mittels

des Plasmid DNA Purification-Kits (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach dem DNA Plasmid-Protokoll isoliert, mit dem Unterschied, dass die DNA am Ende mit 25  $\mu\text{l}$   $\text{ddH}_2\text{O}$  eluiert wurde. Ansonsten wurden Plasmide nach dem Prinzip der alkalischen Lyse isoliert (Bimboim und Doly 1979). Zu Beginn der alkalischen Lyse wurden die Zellpellets in jeweils 100  $\mu\text{l}$  Minipräp-Lösung I (frisch mit 4  $\mu\text{l}$  RNase A pro 1 ml versetzt, Tab. 2.20) aufgenommen. Nach Vortexen der Proben wurden zu jeder 200  $\mu\text{l}$  Minipräp-Lösung II (Tab. 2.21) hinzugegeben, gefolgt von sechsmaligem Invertieren der Proben. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde zu den Proben jeweils 150  $\mu\text{l}$  Minipräp-Lösung III (Tab. 2.22) hinzugegeben. Die Proben wurden sechs Mal invertiert und inkubierten für 10 min auf Eis, ehe sie bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert wurden. Es wurden jeweils 400  $\mu\text{l}$  Probe in neue 2 ml-Reaktionsgefäße überführt, welche bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert wurden. Danach wurden jeweils 350  $\mu\text{l}$ -Probe in neue 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von jeweils 1 ml eiskaltem EtOH (96 %) wurden die Proben bei 13.000 rpm für 30 min zentrifugiert. Nach Verwerfen der Überstände wurden die Pellets jeweils mit 200  $\mu\text{l}$  eiskaltem EtOH (70 %) gewaschen und bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets wurden für 10 min mittels einer SpeedVac mit dem V-AL-Programm getrocknet. Zuletzt wurden die Pellets in jeweils 25  $\mu\text{l}$   $\text{ddH}_2\text{O}$  gelöst und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

**Tabelle 2.20: Zusammensetzung von 80 ml Minipräp-Lösung I.** Die Lösung wurde nach dem Autoklavieren bei 4 °C gelagert.

Bestandteil	Menge	Konzentration (mM)
Glukose	0,72 g	50
1 M Tris (pH 8)	2,00 ml	25
0,5 M EDTA (pH 8)	1,60 ml	10
$\text{ddH}_2\text{O}$	<i>ad</i> 80,00 ml	

**Tabelle 2.21: Zusammensetzung von 20 ml Minipräp-Lösung II.** Die Lösung wurde bei Raumtemperatur maximal 3 Wochen lang gelagert.

Bestandteil	Menge (ml)	Konzentration
1 N NaOH	4	0,2 N
20 % SDS	1	1,0 %
$\text{ddH}_2\text{O}$	<i>ad</i> 20	

**Tabelle 2.22: Zusammensetzung von 100 ml Minipräp-Lösung III.** Die Lösung wurde nach dem Autoklavieren bei 4 °C gelagert.

Bestandteil	Menge	Konzentration (mM)
5 M KaAcO	29,45 g	3
Eisessig	pH einstellen auf 5,60	
<sub>dd</sub> H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 100,00 ml	

### 2.4.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Sofern bestimmte DNA-Fragmente aus Agarosegelen isoliert werden sollten, wurden die Gele auf eine Glasplatte gelegt, unter UV-Licht die Banden ausgeschnitten und in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Mittels des innuPREP Gel Extraction Kit (Analytik Jena) wurde die DNA aus den Gelstücken isoliert. Dafür wurde das „Mini Elute“-Protokoll verwendet, wobei die DNA anstatt mit Elutionspuffer mit 25 µl <sub>dd</sub>H<sub>2</sub>O eluiert wurde.

### 2.4.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Konzentrationen von DNA und RNA wurden mittels eines NanoDrop (PeqLab) mit den Programmen für dsDNA und ssRNA spektralphotometrisch gemessen. Bei Probenvolumina von 1,5 µl wurde gegen einen Leerwert (Lösungsmittel der Nukleinsäuren) die Absorption bei 260 nm ( $A_{260}$ ) gemessen. Ein Absorptionswert von 1 entsprach 50 ng µl<sup>-1</sup> DNA bzw. 40 ng µl<sup>-1</sup> RNA. Proteine absorbieren über aromatische Aminosäuren bei  $A_{280}$ , damit wurde der Reinheitsgrad der Nukleinsäuren über das Verhältnis von  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$  kontrolliert: DNA wurde mit Werten von ca. 1,8 als rein angesehen, RNA mit 2,0.

### 2.4.4 DNase-Verdau von RNA

Es wurde das TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) verwendet, um aus Trizol-isolierter RNA die DNA-Reste zu entfernen. Dabei wurde aus Proben mit je 10.000 ng der DNA-Verdau nach dem „Routine DNase treatment“-Protokoll durchgeführt. Nach dem Verdau wurde via PCR und Gelelektrophorese kontrolliert, ob mit den Proben als Template das *rpoZ*-Gen amplifiziert werden konnte. Proben mit ausbleibenden PCR-Produkten wurden als DNA-frei angesehen und auf 20 ng µl<sup>-1</sup> verdünnt. Falls *rpoZ* amplifiziert werden konnte, wurde die Probe erneut einem DNase-Verdau unterzogen.

### 2.4.5 Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsspaltungen wurden durchgeführt, um bei Klonierungen Vektoren für Ligationen zu schneiden. Auch wurden via Restriktionsspaltung Inserts aus Vektoren herausgeschnitten,

um sie mit anderen Vektoren zu ligieren oder um zusammen mit Agarosegelelektrophorese ihren Einbau in einem Vektor zu kontrollieren. Restriktionsspaltungen wurden mit FastDigest-Restriktionsenzymen (ThermoFisher Scientific) fast komplett nach Herstellerprotokoll durchgeführt, anders als im Protokoll wurde die Spaltung für 1 h durchgeführt. Falls Restriktionsspaltungen den Einbau eines Inserts positiv nachgewiesen haben, wurde die Korrektheit der Sequenz von Interesse mittels des Sequenzierservices der Firma Microsynth Seqlab GmbH (Göttingen) kontrolliert.

#### **2.4.6 Dephosphorylierung von DNA**

Um bei Ligationen eine Re-Ligation von geschnittenen Vektoren ohne Insert zu vermeiden, konnten geschnittene Vektoren dephosphoryliert werden. Während einer Dephosphorylierung werden die 5'-Monophosphate der Vektoren hydrolysiert, womit DNA-Ligasen die Enden der geschnittenen Vektoren nicht ligieren können. Die Dephosphorylierung von Vektoren wurde nach ihrer Spaltung mit der FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

#### **2.4.7 Ligation von DNA und n-Butanolfällung**

DNA-Fragmente wurden auf verschiedene Arten in Vektoren ligiert. Die Ligation von PCR-Produkten mit Restriktionsschnittstellen als Überhängen in den Vektor pJET1.2/blunt Cloning Vector (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific) erfolgte fast komplett nach Herstellerprotokoll; abweichend vom Protokoll wurde die Ligation für 30 min durchgeführt. Die einzusetzende Menge PCR-Produkt in einem Reaktionsansatz wurde mit dem „Ligation Calculator“-Online-Tool berechnet (HHU Düsseldorf o.D.).

Auf andere Weise wurden hingegen gespaltene Vektoren und DNA-Fragmente ligiert. Nach der Dephosphorylierung des Vektors (Abschnitt 2.4.6) wurden pro Reaktionsansatz 50 ng Vektor mit dem DNA-Fragment ü.N. ligiert. Das Vektor-Insert-Verhältnis betrug 1:3 und wurde über die Längen von Vektor und DNA-Fragment mittels des „Ligation Calculator“-Online-Tool berechnet (HHU Düsseldorf o.D.). Ein Reaktionsansatz ist in Tab. 2.23 aufgeführt. Die Ligation wurde in einem 16 °C-warmen Wasserbad ü.N. durchgeführt, als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Insert.

Die Ligation wurde anschließend für 20 min bei 65 °C abgestoppt. Salze wurden via n-Butanolfällung entfernt. Der Ligationsansatz wurde dazu mit 50 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  und 500 µl n-Butanol aufgefüllt, via Vortex für 5 s gemischt und für 30 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Fällung wurde zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und für 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde für 5 min in einer SpeedVac mit dem V-AL-Programm getrocknet. Das Pellet wurde in 10 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  resuspendiert.

**Tabelle 2.23: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.**

Bestandteil	Menge ( $\mu\text{l}$ )
Vektor (50 ng)	variabel
Insert	variabel
T4-DNA-Ligase-Puffer (10 $\times$ )	2
T4-DNA-Ligase	1
$\text{ddH}_2\text{O}$	<i>ad</i> 20

## 2.4.8 Northern-Blot-Analyse

### 2.4.8.1 Radioaktivmarkierung von Sonden

Radioaktiv markierte Oligonukleotide wurden als Sonden verwendet, um (s)RNAs spezifisch zu detektieren. Dafür wurden zur Ziel-RNA komplementäre, einzelsträngige Oligonukleotide mittels einer Polynukleotidkinase mit radioaktivem  $[\text{P}^{32}]\gamma\text{-dATP}$  markiert. Der Reaktionsansatz für eine Markierung einer Sonde ist in Tab. 2.24 zusammengefasst.

**Tabelle 2.24: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Radioaktivmarkierung von Oligonukleotiden.** Das  $[\text{P}^{32}]\gamma\text{-dATP}$  wurde zuletzt im Radioaktivlabor dazugegeben.

Bestandteile	Volumen ( $\mu\text{l}$ )	Konzentration
$\text{ddH}_2\text{O}$	3	
10 $\times$ PNK-Puffer A	1	1 $\times$
Oligonukleotidsonde (10 $\mu\text{M}$ )	2	2 $\mu\text{M}$
T4-Polynukleotidkinase (10 U $\mu\text{l}^{-1}$ )	1	1 U $\mu\text{l}^{-1}$
$[\text{P}^{32}]\gamma\text{-dATP}$	3	3 Ci $\mu\text{l}^{-1}$

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40  $\mu\text{l}$  STE-Puffer (Sodium Chloride-Tris-EDTA-Puffer, Tab. 2.25) abgestoppt.

**Tabelle 2.25: Zusammensetzung von 100 ml STE-Puffer (Sodium Chloride-Tris-EDTA-Puffer).**

Bestandteil	Menge	Konzentration ( $\mu\text{M}$ )
5 M NaCl	2 ml	100
1 M Tris HCl (pH 7,5)	2 ml	20
$\text{ddH}_2\text{O}$	<i>ad</i> 100 ml	

Im Anschluss wurde die markierte Sonde von restlichen Bestandteilen des Reaktionsansatzes entfernt, indem sie mittels einer GE Healthcare illustra<sup>TM</sup> MicroSpin<sup>TM</sup> G-25-Säule (GE Healthcare Life Sciences) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt wurde. Die Radioaktivität einer Sonde wurde mittels eines Geigerzählers (Beckman Coulter) kontrolliert. Eine Sonde wurde bis zur Verwendung bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  in einem Bleigefäß aufbewahrt.

### 2.4.8.2 Hybridisierung von sRNA mit radioaktiv markierten Sonden

Um (s)RNAs auf Northern Blot-Membranen nachzuweisen, mussten die Membranen mit den entsprechenden radioaktiv markierten Sonden hybridisieren. Die Hybridisierung unterteilte sich in zwei Schritte, die Prähybridisierung und die Hybridisierung. Bei der Prähybridisierung wurde die Membran in einem Glasrohr mit ca. 20 ml Church Low-Puffer (Tab. 2.26; Church und Gilbert 1984) für 30–60 min bei 42 °C unter Rotieren in einem Hybridisierungssofen inkubiert. Im Anschluss wurde an die Glasinnenwand des Rohres die Sonde pipettiert (mit Radioaktivität von ca. 2.000.000 Counts min<sup>-1</sup>). Danach inkubierte die Membran ü.N. im Hybridisierungssofen wie oben beschrieben.

**Tabelle 2.26: Zusammensetzung von 100 ml Church Low-Puffer.**

Bestandteile	Menge	Konzentration
BSA	1,0 g	10,0 mg ml <sup>-1</sup>
DEPC-H <sub>2</sub> O	15,0 ml	
NaP-Puffer (1 M, pH 7,2)	50,0 ml	0,5 M
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	0,2 ml	1,0 mM
SDS (20 %, w/v)	35,0 ml	7,0 %

Anschließend wurde die Membran zwei bis drei Mal für 30 s mit Waschpuffer (0,01 % SDS w/v; 5 × SSC) gewaschen. Mittels eines Geigerzählers wurde überprüft, ob die detektierten Signale schwächer und spezifisch für einen Bereich (den mit den gebundenen Sonden) waren. Die Membran wurde in eine Plastikfolie gelegt und die Restflüssigkeit vorsichtig durch Druck auf die Plastikfolie entfernt. Die Membran wurde verschweißt und in einer Kassette mit einem Imaging Screen (Bio-Rad) gelegt. Das Bandenmuster wurde verschieden lange auf den Screen exponiert, ca. 30 min für 5S rRNA-Sonden und, je nach Signalstärke, 24–96 h für sRNA-Sonden. Das Prinzip der autoradiographischen Abbildung des Bandenmusters auf dem Imaging Screen läuft allgemein wie folgt ab: Die Strahlung radioaktiver Sonden regt BaFBr:Eu<sup>2+</sup>-Kristalle in der Matrix des Screens an. Dadurch werden Europium-Elektronen in der Kristallstruktur gefangen und BaFBr:Eu<sup>3+</sup>-Kristalle gebildet (Baldi und Hatfield 2011). Beim Phosphoimaging (Abschnitt 2.4.8.4) später regt ein Laser die Kristalle an, welche daraufhin ein Elektron sowie Fluoreszenzsignal aussendeten. Auf diese Weise konnten Fluoreszenzsignale detektiert werden, welche zusammen mit der Bandenintensität anstiegen.

### 2.4.8.3 Stripping von Northern Blot-Membranen

Um an Membranen gebundene Sonden zu entfernen, wurde die Membran in einer Glasschale mit Stripping-Puffer (0,1 % SDS, 5 × SSC) für 20 min in einem 96 °C-warmen Wasserbad

unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde mit VE-Wasser gewaschen. Damit war die Membran einsatzbereit, um eine neue Sonde zu binden.

#### 2.4.8.4 Phosphoimaging und Auswertung von Northern Blots

Die auf Imaging Screens exponierten RNA-Bandenmuster wurden mittels eines Phosphoimagers (Molecular Imager FX, Bio-Rad) gescannt. Nach dem Scannen wurde ein Screen für weitere Exponierungen 30 min lang dem Gelblicht eines Erasers (Screen Eraser-K, Bio-Rad) ausgesetzt, damit alle Kristalle der Matrix wieder den BaFBr:Eu<sup>2+</sup>-Zustand erreichten (Baldi und Hatfield 2011).

Die Scans des Phosphoimaging wurden mittels des Programms Quantity One 4.6.6 (Basic-Version; Bio-Rad) ausgewertet, um die Bandenintensitäten von Northern Blots zu quantifizieren. Zunächst wurden unter dem Menüpunkt „Image → Transform“ mittels der „Auto-scale“-Funktion Kontrast und Helligkeit des Scans optimiert. Zum Erfassen der Bandenintensitäten wurde über dem Menüpunkt „Volume → Volume Rect Tool“ ein Rechteck gezeichnet, welches die größte Bande im Scan knapp begrenzte. Dieses Rechteck wurde für jede der anderen Banden kopiert und zentral auf die Bande gelegt. Das Rechteck wurde auf eine Stelle ohne Signal gelegt, um das Hintergrundrauschen zu erfassen. Danach wurde unter „Volume → Volume Analysis Report“ die Signalstärke der Banden quantifiziert und nach Excel exportiert. Die Signalstärken der Banden abzüglich des Hintergrundwerts wurden dabei prozentual als „% Adj, Vol,“ von Quantity One ausgegeben. Diese adjustierten Signalstärken für sRNAs wurden auf die RNA-Menge normalisiert (mittels der 5S rRNA-Signalstärke). Die relative Änderung der Signalstärke für eine sRNA zwischen zwei Zeitpunkten ( $T_2$  und  $T_1$ ) wurde damit wie in Gleichung 2.5 gezeigt berechnet.

$$\text{Relative Änderung Signalstärke} = \left( \frac{sRNA_{T_2}}{5S_{T_2}} \right) / \left( \frac{sRNA_{T_1}}{5S_{T_1}} \right) \quad (2.5)$$

#### 2.4.9 Amplifikation von Nukleinsäuren

Mittels Polymerase Chain Reactions (Polymerasekettenreaktionen, PCRs) wurden DNA-Fragmente amplifiziert (Mullis et al. 1986). Die Menge an Template und die verwendete Polymerase richteten sich wie die genauen Konzentrationen der einzelnen PCR-Ansatzbestandteile nach dem Zweck der PCR. Fanden die Amplifikate weiter in einer Klonierung Verwendung, wurde ein Phusion-Polymerase-basierter Ansatz verwendet. Zur Kontrolle des Vorhandenseins von Fragmenten wurde hingegen die Taq-Polymerase verwendet. Im Falle einer Colony-PCR wurde zunächst eine Einzelkolonie mit einer Pipettenspitze gepickt, in 10 µl RÄ-Medium resuspendiert und von dieser Suspension 1 µl als Template im PCR-Ansatz verwendet. In Tab. 2.27 sind die PCR-Ansätze aufgelistet, die dazugehörigen PCR-Programme zeigt Tabelle 2.28.

**Tabelle 2.27: Zusammensetzung von Taq- und Phusion-basierten PCR-Ansätzen.** Alle Angaben beziehen sich auf einen 10  $\mu\text{l}$ -Reaktionsansatz.

Bestandteil	Phusion-basiert		Taq-basiert	
	Vol. ( $\mu\text{l}$ )	Fin. Konz.	Vol. ( $\mu\text{l}$ )	Fin. Konz.
5 $\times$ GC-Puffer	2,0	1,00 $\times$	–	–
10 $\times$ Dream-Taq-Puffer	–	–	1,0	1,0 $\times$
dNTP (jeweils 2,5 mM)	0,2	0,05 mM	0,4	0,1 mM
Forward-Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0,2	0,20 $\mu\text{M}$	0,4	0,4 $\mu\text{M}$
Reverse-Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0,2	0,20 $\mu\text{M}$	0,4	0,4 $\mu\text{M}$
Phusion-Polymerase (2 U $\mu\text{l}^{-1}$ )	0,1	0,02 U $\mu\text{l}^{-1}$	–	–
Taq-Polymerase (5 U $\mu\text{l}^{-1}$ )	–	–	0,2	0,1 U $\mu\text{l}^{-1}$
Template*	1,0	–	1,0	–
ddH <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 10,0		10,0	

\* Chromosomale DNA (100 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ ) oder 1  $\mu\text{l}$  von einer in 10  $\mu\text{l}$  RÄ-Medium resuspendierten Kolonie für Kolonie-PCR.

**Tabelle 2.28: Verwendete PCR-Programme für Taq- und Phusion-basierte PCR-Ansätze.**

Vorgang	Taq-basiert		Phusion-basiert		
	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Zeit	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Zeit	
Denaturierung	95	5 min	98	5 min	↑ 35 $\times$
Denaturierung	95	30 s	98	30 s	
Annealing	variabel	30 s	variabel	30 s	
Elongation	72	10 min	72	10 min	
Elongation	72	10 min	72	10 min	
Anhalten	8	$\infty$	8	$\infty$	

### 2.4.10 Quantitative Real Time-PCR

Die qRT-PCR wurde verwendet, um aus Proben Trizol-isolierter RNA die Menge eines Transkripts zu quantifizieren. Bei der qRT-PCR bildet eine reverse Transkriptase aus dem RNA-Template cDNA, welche in mehreren Zyklen amplifiziert wird. Währenddessen interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup> Green in die DNA-Kopien. Der SYBR<sup>®</sup> Green-dsDNA-Komplex absorbiert blaues Licht ( $\lambda = 494 \text{ nm}$ ) und emittiert grünes Licht ( $\lambda = 521 \text{ nm}$ ); je stärker das Fluoreszenzsignal, desto mehr Kopien des Templates sind gebildet worden. Der Anstieg des Signals korrelierte dabei während der exponentiellen Phase mit der Amplifikation. Es wurde ein Schwellenwert für die Fluoreszenzintensität festgelegt: Je weniger Amplifikationszyklen zum Erreichen dieses Schwellenwerts benötigt wurden, desto mehr Kopien eines Transkripts waren in der Probe vorhanden. Der Amplifikationszyklus zum Erreichen des Schwellenwerts wird als Ct-Wert (Cycle Treshold-Wert) bezeichnet. Die verwendete RNA-Menge war in allen Reaktionsansätzen (Tab. 2.29) gleich (40 ng), das verwendete qRT-PCR-Programm zeigt Tab. 2.30. Die Ct-Werte wurden auf ein Referenzgen (*rpoZ*) normalisiert und auf die verschiedenen Primereffizienzen (E) korrigiert. Zusammen mit dem Unterschied der Ct-Werte ( $\Delta\text{Ct}$ ) zwischen zwei Zeitpunkten (vor und nach 10 min <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Stress) konnte nach Pfaffl (2001) die relative Expression (R) nach Gleichung (2.6) berechnet werden.

$$R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{Zielgen}}}}{(E_{\text{Referenz}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{Referenz}}}} \quad (2.6)$$

**Tabelle 2.29: Zusammensetzung eines qRT-PCR-Mastermix.**

Bestandteil	Vol. ( $\mu\text{l}$ )	
Enzymmix*	5,0	
Forward-Primer	1,0	1 $\mu\text{M}$
Reverse-Primer	1,0	1 $\mu\text{M}$
DTT*	0,1	
RT Block*	0,4	
ddH <sub>2</sub> O	0,5	
Template-RNA (20 ng $\mu\text{l}^{-1}$ )	2,0	40 ng

\* Bestandteil des Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QRT-PCR Master Mix (Agilent Technologies).

**Tabelle 2.30: PCR-Programm für qRT-PCR** Messungen der Fluoreszenz sind mit (\*) gekennzeichnet.

Vorgang	Temperatur (°C)	Zeit
Reverse Transkription	50	10 min
Denaturierung	95	3 min
Denaturierung	94	5 s
Annealing	variabel <sup>‡</sup>	5 s
Elongation (*)	63	5 s
Denaturierung	95	10 s
Schmelzkurve in 0,5 °C-Schritten (*)	65–95	
Ende	10	5 min

<sup>‡</sup> Siehe Tab. A.1 auf S. 163.

## 2.5 Gelelektrophoretische Methoden

### 2.5.1 Agarosegelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese wurden DNA-Fragmente von Restriktionsspaltungen sowie PCR-Produkte aufgetrennt. Die Agarosekonzentration der Agarosegele richtete sich nach der Länge des aufzutrennenden Fragments (Tab. 2.31). Zum Gießen der Gele wurde die Agarose entsprechend der Konzentration in einer Schottflasche eingewogen, mit Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) oder Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) aufgefüllt (Tab. 2.32) und in einer Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach ca. 5 min Abkühlen bei RT wurde die Agarose in Gelschlitten mit eingesetzten Kämmen gegossen, um Agarosegele mit Taschen für DNA-Proben zu erstellen. Nach ca. 20 min waren die Gele erhärtet, sodass die Kämmen gezogen und die Gele aus den Schlitten herausgetrennt werden konnten. Bis zur Verwendung wurden Gele in einer halb mit TAE-Puffer- bzw. TBE-Puffer gefüllten Box bei 4 °C aufbewahrt.

Die Gelelektrophorese wurde in Gelkammern durchgeführt, welche mit dem gleichen Puffer aufgefüllt waren wie die Agarosegele. Die Gele wurden in der Gelkammer platziert. Es wurden pro Geltasche 10 µl Probe zusammen mit 1,1 µl 10 ×-Ladepuffer (Tab. 2.33) geladen. Als Größenmarker wurden entweder 6 µl GeneRuler 1 kb Plus DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific) oder GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific) verwendet, letzterer für kleinere Fragmente (1,0 kBP). Bei einer Spannung von 120 V wurden die Fragmente für ca. 30–45 min aufgetrennt. Nach der Agarosegelelektrophorese wurden die Gele in einer Ethidiumbromidlösung für ca. 5–10 min inkubiert. Das in der DNA-interkalierte Ethidiumbromid wurde unter dem UV-Licht eines UVT-20 M/W-Transilluminators (Herolab GmbH) sichtbar, womit die DNA-Fragmente inspiziert werden konnten.

**Tabelle 2.31: Verwendete TAE-/TBE-Konzentrationen für Agarosegelelektrophoresen.**

Länge (kBP)	TAE/TBE (% w/v)
1,0– 30,0	0,5
0,5– 10,0	1,0
0,2– 3,0	1,5
0,1– 2,0	2,0

**Tabelle 2.32: Zusammensetzung von je 1 l 10×-TAE bzw. 10×-TBE-Puffer.**

Bestandteil	10×-TAE-Puffer		10×-TBE-Puffer	
	Menge	Konz. (mM)	Menge	Konz. (M)
Tris	48,4 g	400	121,1 g	1,00
Eisessig	11,4 ml	200	–	–
Borsäure	–	–	61,8 g	1,00
EDTA-Na <sub>2</sub> Dihydrat	3,7 g	10	7,4 g	0,02
<sub>dd</sub> H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1,0 l	–	<i>ad</i> 1,0 l	–

**Tabelle 2.33: Zusammensetzung von 10×-Ladepuffer.**

Bestandteil	Volumen (ml)	Konzentration (% w/v)
Glycerin	6,00	60,0
Bromphenolblau	0,01	0,1
Xylencyanol	0,01	0,1
<sub>dd</sub> H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 10,00	–

## 2.5.2 Polyacrylamid-Minigele

Mittels Polyacrylamid-Minigelen wurden zweierlei DNA-Fragmente unter 200 BP nachgewiesen: zum einen die DNA-Sequenz der sRNA RCs01897 (während der Klonierung dieser zwecks Überexpression), zum anderen qRT-PCR-Amplifikate zwecks Kontrolle der Amplifikation. Die einzelnen Bestandteile für ein Polyacrylamid-Minigel sind in Tab. 2.34 dargestellt. Nachdem die einzelnen Bestandteile zusammengemixt wurden, wurde die Gelmasse in ein Multiple Gel Caster (Serva)-Gestell zwischen einer Glas- und Keramikplatte gegossen. Ein Kamm wurde eingesetzt, um Geltaschen zu formen. Das Gel polymerisierte für 1 h. Nach Ziehen des Kamms wurde das Gel in ein Mini-Gel System (Serva) eingespannt, die Reservoirs wurden mit 1×-TBE-Puffer gefüllt. Im Anschluss wurden die Proben in die Taschen geladen, wobei je 10 µl Probe mit 1,1 µl-10×-DNA-Ladepuffer zuvor gemischt wurde. Als Marker diente die GeneRuler 100 bp Plus DNA-Leiter (Thermo Fischer Scientific). Die Proben wurden unter 120 V für 1 h aufgetrennt und danach die Bandenmuster via Ethidiumbromid-Färbung untersucht (siehe Abschnitt 2.5.1).

**Tabelle 2.34: Zusammensetzung einer Polyacrylamidgelmasse für ein Minigel.** Ammoniumperoxidsulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurden zuletzt dazugegeben.

Bestandteil	Menge
$\text{ddH}_2\text{O}$	3,9 ml
10×-TBE-Puffer	0,6 ml
40 % Acrylamid	1,5 ml
APS (10 %, w/v)	24,0 µl
TEMED	6,0 µl

## 2.5.3 Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamidgele und Northern Blotting

RNA-Proben für Northern Blotting-Analysen wurden mittels Polyacrylamidgelen in einer denaturierenden Gradientengelelektrophorese aufgetrennt. Die Zusammensetzung eines solchen Gels ist in Tab. 2.35 aufgeführt. Es wurden alle Bestandteile des Gels bis auf Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) mittels eines Magnetrührers in einem mit Alufolie abgedichteten Bechergesäß für 30 min gerührt. Zum Gießen des Gels mussten zwei Glasplatten vorbereitet werden. Dazu wurden die Glasplatten, drei Spacer und ein Kamm mit 70 % EtOH geputzt. Eine der Platten wurde silanisiert, damit sich das Gel später leichter von der Glasplatte trennen ließ. Auf eine Platte wurden seitlich und am unterem Ende Spacer an die Ränder gelegt. Auf die Spacer wurde die

zweite Glasplatte platziert. Mit erhitzter Agarosegelmasse wurden die Seiten und der untere Rand abgedichtet.

**Tabelle 2.35: Zusammensetzung eines Harnstoff-Polyacrylamidgels.**

Bestandteil	Menge	Konzentration
Harnstoff	16,8 g	7 M
Acrylamid (40 %, w/v)	10,0 ml	8 %
10×-TBE-Puffer	4,0 ml	1 ×
$\text{ddH}_2\text{O}$	<i>ad</i> 40,0 ml	
APS (10 %, w/v)	120,0 $\mu\text{l}$	
TEMED	20,0 $\mu\text{l}$	

Die fertige (und mit APS und TEMED gemischte) Acrylamidlösung wurde zwischen beide Glasplatten gegossen. Es wurde ein Kamm am oberen Rand eingeführt, um Taschen zu formen. Nachdem das Gel mindestens 1 h polymerisierte, wurde der Kamm gezogen und das Gel in eine Gelapparatur gestellt. Das untere Reservoir der Apparatur war mit 1×-TBE-Puffer gefüllt. Das Einsetzen des Gels erfolgte frei von Luftblasen am unteren Rand. Im Anschluss wurde das obere Reservoir mit 1×-TBE-Puffer gefüllt.

Es mussten RNA-Proben geladen werden, deren Volumina so eingestellt waren, dass alle Proben die gleiche Menge an RNA enthielten (mindestens 6–10  $\mu\text{g}$ ). Bevor die Proben geladen wurden, inkubierten sie mit ihrer 0,7-fachen Menge an FU-Mix (Tab. 2.36) für 10 min bei 65 °C. Die Taschen des Gels wurden mittels einer Spritze mit 1×-TBE-Puffer kurz durchgespült, ehe die Proben in die Taschen pipettiert wurden. Es wurden jeweils nacheinander drei Taschen gespült und mit Proben geladen.

**Tabelle 2.36: Zusammensetzung von Formamid-Urea-Mix (FU-Mix).**

Bestandteil	Konzentration
Harnstoff	6,0 M
Formamid	80,0 %
10×-TBE	10,0 %
Bromphenolblau	0,1 %
Xylencyanol	0,1 %

Die Proben wurden für 10 min bei 100 V, dann bei maximaler Volt-Zahl aufgetrennt, bis die Farbfront des FU-Mixes am unteren Rand des Gels auslief. Die Auftrennung wurde gestoppt und das Gel von den Glasplatten gelöst. Das Gel wurde mittels eines Pizzaschneiders auf den Bereich mit Proben zurechtgeschnitten. Es wurden sechs Rechtecke aus Whatman-Papier in Größe des Gels ausgeschnitten und in 1×-TBE-Puffer getränkt. Ebenfalls in Größe der Whatman-Papiere wurde eine Nitrozellulosemembran (GE Healthcare) zurechtgeschnitten. Danach wurde für das Northern Blotting ein Elektroblogger wie folgt

von unten nach oben aufgebaut: Anodenplatte, drei Whatman-Papiere, Nitrozellulosemembran, Gel, drei Whatman-Papiere. Durch Rollen eines Falcon-Reaktionsgefäßes auf den oberen Whatman-Papieren wurden etwaige Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten herausgedrückt. Die Kathodenplatte wurde aufgesetzt und bei 250 mV wurden die RNAs für 2:45 h auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Im Anschluss wurde die RNA auf die Membran fixiert, indem die Membran in einem Stratallinker UV Crosslinker 1800 (Stratagene Corp.) mit UV-Licht bestrahlt wurde: zweimal mit 1.200 kJ. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Membran in Whatman-Papieren aufbewahrt.

## 2.6 'Omics'-Analysen

### 2.6.1 Transcriptomics

Es wurden die Abundanzveränderungen von Transkripten in *R. capsulatus* in biologischen Triplikaten vor und nach 10 min photooxidativem Stress untersucht. Für die Untersuchung der Transkriptomveränderungen wurden von der AG Klug neu-analyisierte RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)-Daten basierend auf Probenmaterial von (Volk 2016) zur Verfügung gestellt. Die Verifizierung via qRT-PCR (Abschnitt 2.4.10), die Auswertung (Abschnitt 2.7.5) inklusive der Statistik (Abschnitt 2.8) erfolgte im Rahmen dieser Arbeit.

### 2.6.2 Proteomics

Mittels Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS) wurde untersucht, wie sich die Proteinabundanzwerte in *R. capsulatus* unter photooxidativem Stress veränderten. Hierfür wurde Probenmaterial von *R. capsulatus* vor (0 min) und nach photooxidativem Stress (Abschnitt 2.3.4, S. 36) genommen, im Detail nach 45 min, 90 min sowie 180 min. Die massenspektrometrische Analyse mitsamt der Proteinquantifizierungen via LFQ-Funktion der MaxQuant-Software (Cox und Mann 2008) erfolgte nach etabliertem Protokoll (Bathke et al. 2019; Licht et al. 2020) am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim. Die Auswertung der Daten inklusive der Statistik ist in Abschnitt 2.7.5 sowie Abschnitt 2.8 näher beschrieben.

## 2.7 Bioinformatische Methoden und Statistik

### 2.7.1 Alignments, Homologie- und Syntänie-Analysen

Das Alignment von Aminosäuresequenzen erfolgte mittels des Standard Protein BLAST-Online-Tools (Madden 2013) mit dem BLASTP-Algorithmus mit Standardeinstellungen (d.h. Non-redundant protein sequences-Datenbank, Expect threshold = 10, word size = 6).

Nach dem pBlast-Algorithmus wurden zudem mittels des Genome Gene Best Homologs-Tools (IMG-Webseite; Chen et al. 2018) homologe Gene von *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* einander zugeordnet. Als Grenzwert wurde eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von  $\geq 30\%$  festgelegt. In einigen Ausnahmefällen wurden Gene auch mit geringerer Identität als homolog gewertet, sofern andere Analysen oder Vorwissen dies nahelegten. Strukturhomologie wurde zwischen zwei Proteinen mittels des Online-Tools PHYRE<sup>2</sup> analysiert (Kelley et al. 2015). Bei Klonierungen wurde der korrekte Einbau eines Inserts im Zielvektor durch Alignments mittels EMBL-EB-Online-Tools kontrolliert (Madeira et al. 2019). Für Syntänie-Analysen mit dem *rpoEchrR*-Lokus wurden zum einen alle Vertreter der *Rhodobacteraceae* mittels des Online-Tools SyntTax (Oberto 2013) untersucht (Standardeinstellungen: „Best match“ als Suchparameter, BLAST-Score-Minimum 10%). Zum anderen wurde ein Syntänieplot mittels der entsprechenden Funktion in EDGAR 2.3 berechnet (Blom et al. 2016).

### 2.7.2 Phylogenetische Analysen

Phylogenetische Untersuchungen wurden mittels des *rpoE*- bzw. *chrR*-Gens durchgeführt und enthielten neben *R. capsulatus* SB1003 und *R. sphaeroides* 2.4.1 noch folgende Taxa: 23 bzw. 15 Vertreter der *Rhodobacteraceae* (RpoE bzw. ChrR) und 2 bzw. 3 Vertreter der Gattung *Mycobacterium* (RpoE bzw. ChrR). Bei den jeweiligen Taxa handelt es sich um die besten Treffer, die mit einer BLASTP-Analyse gefunden wurden. Das Alignment der Sequenzen und die Berechnung der phylogenetischen Bäume wurde mittels des Programms MEGA X (Kumar et al. 2018) durchgeführt. Das Alignment der Sequenzen erfolgte mittels des eingebauten MUSCLE-Algorithmus über die „Unweighted PairGroup Method with Arithmetic Mean“-Methode (Tab. A.2, S. 164). Mit den Alignments wurden jeweils 1000 Maximum Likelihood-Bäume auf Grundlage der Standardeinstellungen des Programms (Tab. A.3, S. 164) mit dem Jones-Taylor-Thornton-Substitutionsmodell (Jones et al. 1992) errechnet und der jeweilige Bootstrap-Konsensusbaum bestimmt (Felsenstein 1985).

### 2.7.3 sRNA-Ziel-Vorhersagen

Potentielle Ziel-mRNAs von (möglichen) sRNAs wurden mittels zweier Tools ermittelt, IntaRNA (Busch et al. 2008; Kery et al. 2014; Mann et al. 2017; Raden et al. 2018; Wright et al. 2014) und TargetRNA2 (Kery et al. 2014). Es wurden die jeweiligen sRNA-Sequenzen für die Suche von Ziel-mRNAs in *R. capsulatus* SB1003 eingegeben. Es wurden die Standard-Suchparameter benutzt, welche auch in Tab. A.4 und A.5 (S. 165) aufgelistet sind.

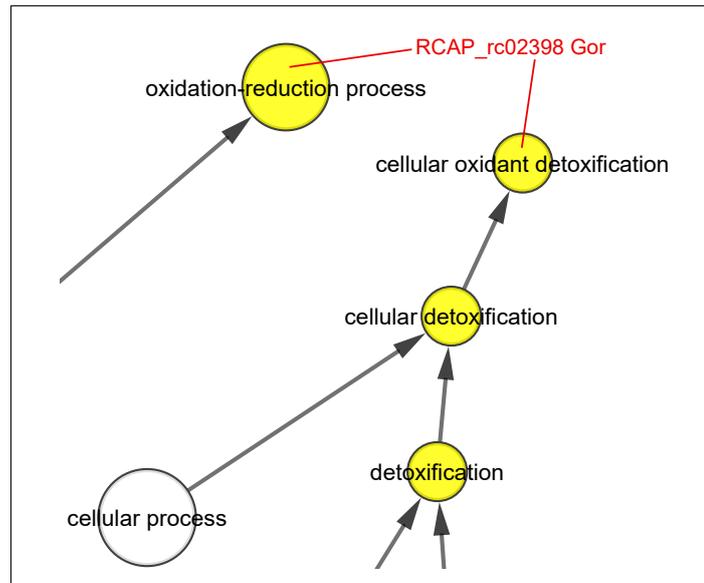
### 2.7.4 STRING-Datenbank-Analyse

Mittels der STRING-Datenbank (<https://string-db.org/>, letzter Aufruf 05.04.2020) wurden mögliche Interaktionspartner des XRE-Transkriptionsfaktors RCAP\_rcc02527 gesucht (Szkarczyk et al. 2019). Unter dem Menüpunkt „Protein families (“COG”)...by protein sequence“ wurde mit der Aminosäuresequenz von RCAP\_rcc02527 automatisch das Cluster of Orthologous Groups COG2944 ermittelt und das dazugehörige Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk zur Ansicht ausgewählt. Standardmäßig wurden zehn mögliche Interaktionspartner in das Netzwerk miteinbezogen.

### 2.7.5 Analyse funktionell angereicherter Gruppen

Die in den Omics-Untersuchungen quantifizierten Veränderungen der Transkript- und Proteinabundanz wurden daraufhin untersucht, ob sie funktionelle Gruppen anreicherten bzw. verringerten. Diese Gruppen wurden durch Gene Ontology (GO)-Terme deklariert. Diese Analyse wurde mittels des Programms Cytoscape Version 3.6.0 (Shannon et al. 2003) mit der „BiNGO“-App (Maere et al. 2005) durchgeführt. Es wurden nur Transkripte bzw. Proteine in diese Analysen miteinbezogen, deren Abundanz bezogen auf den Nullzeitpunkt sich um den Faktor 2 oder mehr veränderte:  $\log_2$ -Werte signifikant  $\geq 1$  deklarierten Anreicherungen, solche von  $\leq -1$  Abnahmen. Als Referenzen dienten jeweils die ganzen Genome von *R. capsulatus* bzw. *R. sphaeroides*. Als „ontology file“ wurde gb.obo (Formatversion 1.2, 06.10.2017) verwendet (Botstein et al. 2000; The Gene Ontology Consortium 2019). Die Analyse bestimmte angereicherte (bzw. verringerte) GO-Terme an Hand eines hypergeometrischen Tests mit Benjamini-Hochberg-Prozedur bei einem Signifikanzlevel von 0,05. Ungeachtet der GO-Terme wurden einige Transkripte bzw. Proteine mit Bezug auf die Fragestellung in die Gruppen „Photooxidative Stressantwort“ sowie „Eisenmetabolismus“ eingeordnet. Ein Gen kann mehrere GO-Terme haben und damit bei seiner Abundanzänderung zur Anreicherung oder Abnahme mehrerer GO-Terme in den Analysen beitragen. Für die Zusammenfassung der Analyse wurden Transkripte bzw. Proteine i.d.R. eher den spezifischeren, untergeordneten GO-Termen zugewiesen (Abb. 2.2).

Mittels des Online-Tools InteractiVenn (Heberle et al. 2015) wurde untersucht, ob Proteine mit erhöhter bzw. verringerter Abundanz auch eine erhöhte bzw. verringerte Transkriptabundanz in der RNA-Seq-Analyse zeigten.



**Abbildung 2.2: Beispiel der Zuordnung von Transkripten und Proteinen in der BiNGO-Analyse.** Die Kreise zeigen GO-Terme, die gelben sind signifikant angereicherte. Ein GO-Term kann mehrere Unter-GO-Terme einschließen, z.B. umfasst „detoxification“ sowohl „cellular detoxification“ als auch „cellular oxidant detoxification“. Für die Auswertung waren v.a. die spezifischeren Gruppen von Interesse. Auch ist am Beispiel von RCAP\_rcc02398 gezeigt, dass ein Gen mehrere GO-Terme anreichern kann. Für die Auswertung wurde i.d.R. das Transkript/Protein den spezifischeren Gruppen zugewiesen, in diesem Beispiel „cellular oxidant detoxification“.

## 2.8 Statistische Auswertungen

Die nachfolgend beschriebenen statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software o.D.) durchgeführt. Wachstumsraten (bzw. Verdopplungszeiten) von Wachstumskurven wurden mit der „exponential growth“-Funktion unter Standardeinstellungen berechnet (Motulsky und Christopoulos 2004). Vergleiche von Daten von mehr als zwei Gruppen wurden mittels Analysis of Variance (Varianzanalyse, ANOVA) getestet, da die vorliegenden Fragestellungen die hinreichenden Bedingungen für ANOVA zulassen (Armstrong und Hilton 2011; Cochran und Cox 1957; Ridgman 1975). Mittels einer zweifachen ANOVA wurden Unterschiede zwischen *Rhodobacter*-Arten bzw. -Stämmen untersucht, stets mit nicht-gepaarten Stichproben und einem Signifikanzniveau von 0,05 inklusive Bonferroni post-Tests (Neter et al. 1990). Für Beta-Galaktosidase-Assays, Hemmhoftests und ROS-Messungen wurden die Daten von *R. sphaeroides* bzw. *R. capsulatus*-Stämmen gegen die von *R. capsulatus* SB1003 getestet. Bei der Etablierung des SOSG-Assays wurde die SOSG-Fluoreszenz zwischen Weißlicht-, Rotlicht- und Dunkelproben auf Unterschiede mit einer einfachen ANOVA und Bonferroni-post-Tests mit einem Signifikanzniveau von 0,05 geprüft; es wurden alle möglichen Paare von Datensätzen miteinander verglichen. Mittels eines zweiseitigen *t*-Tests unter Annahme einer

Gaußschen Verteilung wurden *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* auf Unterschiede in der SOSG-Fluoreszenz überprüft (Signifikanzniveau 0,05).

Die Replikate der RNA-Seq- und LC-MS/MS wurden auf zwei Arten auf ihre Reproduzierbarkeit in R 3.6.2 (R Core Team 2019) überprüft: über Korrelationsanalysen (Pearson-Korrelationskoeffizient) und Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse, PCA). Die durchschnittliche Verteilung von  $\log_2$ -Werten wurde beim RNA-Seq und bei der LC-MS/MS in GraphPad Prism 5.03 über nichtlineare, Gaußsche Regression modelliert.

## 3 Ergebnisse

Mit seiner breiten Stoffwechselvielfalt und der seit 2001 vollständigen Genomsequenzierung (Mackenzie et al. 2001) war bislang *R. sphaeroides* 2.4.1 ein Modellorganismus für die photooxidative Stressantwort und die ihr zugrunde liegende Genregulation (Anthony et al. 2005; Berghoff et al. 2011a; Berghoff et al. 2013; Nuss et al. 2010). Während viele der grundlegenden Prinzipien der  $^1\text{O}_2$ -Antwort dabei auch auf andere Alphaproteobakterien übertragbar sind, sind Detailunterschiede bekannt, etwa in der  $^1\text{O}_2$ -Produktion oder der Induktion von Regulatoren bzw. Genen der Stressantwort (Berghoff et al. 2011b; Glaeser et al. 2011). Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit die  $^1\text{O}_2$ -Antwort in *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* verglichen, da eine stärkere Pigmentierung von *R. capsulatus* unter allen möglichen Sauerstoffbedingungen Unterschiede für die Anpassung an photooxidativen Stress beinhalten könnte. Die Versuche verglichen die  $^1\text{O}_2$ -Antwort in *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* hauptsächlich auf drei Ebenen. Diese waren: (1) die Physiologie inkl. Wachstum, Pigmentierung sowie ROS- und  $^1\text{O}_2$ -Produktion unter verschiedenen Licht-, Sauerstoff- und Stressbedingungen, (2) die Veränderungen im Transkriptom (via RNA-Seq, qRT-PCR, Northern Blotting) und (3) die Veränderungen im Proteom (via LC-MS/MS). Ungeachtet der Vergleiche lieferten die Proteomdaten zusätzlich Erkenntnisse über die frühe und späte Phase photooxidativen Stresses in *R. capsulatus*. Die Verknüpfungen der Ergebnisse unter Berücksichtigung bioinformatischer (Netzwerk-)Analysen gaben Aufschluss darüber, inwiefern *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* sich in ihrer  $^1\text{O}_2$ -Antwort ähneln bzw. unterscheiden.

### 3.1 Physiologie der $^1\text{O}_2$ -Antwort

Für das Verständnis der Unterschiede in der  $^1\text{O}_2$ -Antwort in *Rhodobacter* wurde untersucht, wie semiaerobe, anaerobe (phototrophe) sowie aerobe Bedingungen das Wachstum beeinflussten. Zusätzlich wurde die Pigmentierung über den Gehalt an Bchl *a* und Carotinoiden gemessen und die ROS- bzw.  $^1\text{O}_2$ -Produktion quantifiziert. *R. capsulatus* demonstrierte im Vergleich zu *R. sphaeroides* eine stärkere Pigmentierung ohne zwangsläufig höhere ROS-Level oder Nachteile bei Lebensstilwechseln aufzuweisen.

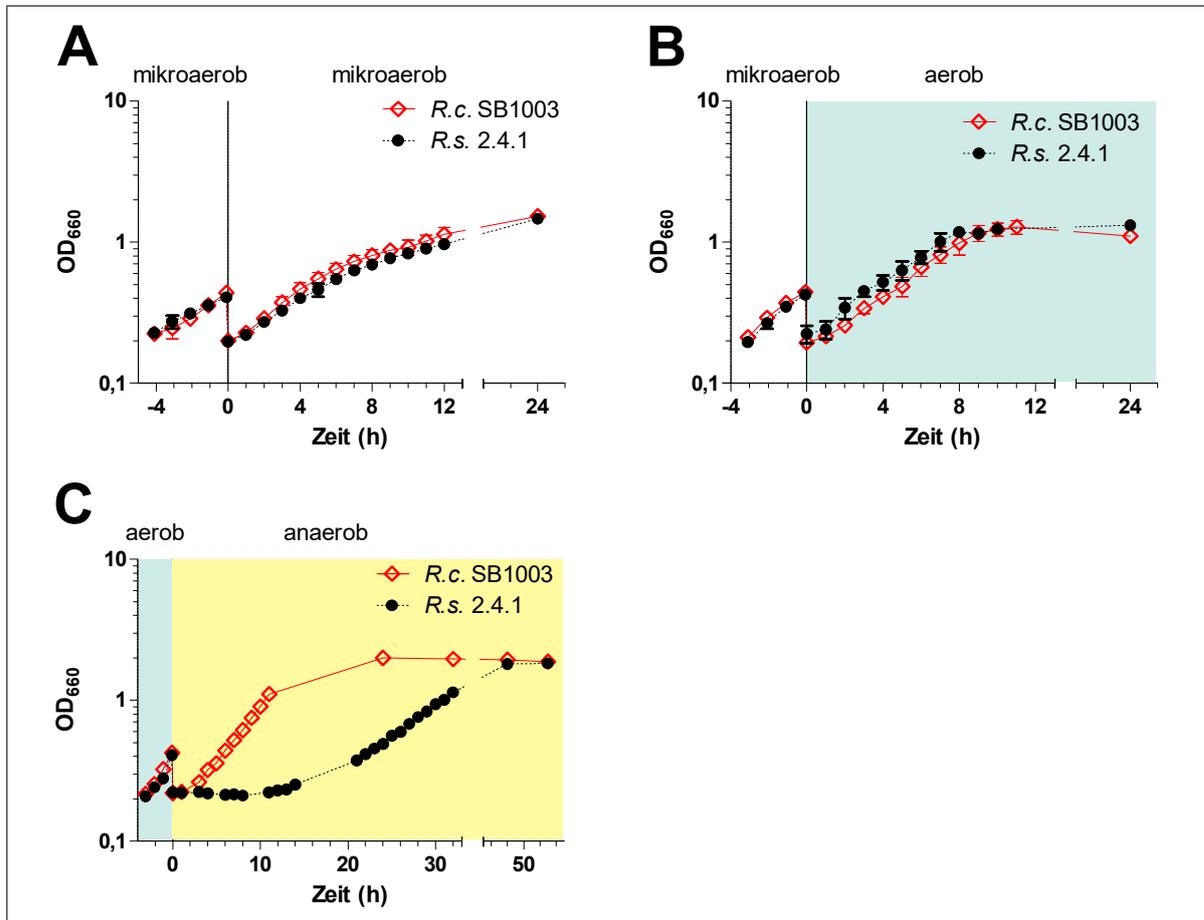
### 3.1.1 Wachstum unter verschiedenen Licht- und Sauerstoffbedingungen

Unter mikroaeroben Bedingungen hatte zuvor *R. capsulatus* eine stärkere Rotfärbung als *R. sphaeroides* aufgewiesen. Eine stärkere Pigmentierung von *R. capsulatus* könnte vorteilhaft beim Wechsel zu phototrophem Wachstum sein, allerdings könnten höhere BChl *a*-Level auch zu mehr  $^1\text{O}_2$ -Stress führen. Basierend darauf wurde das Wachstum von *Rhodobacter* unter mikroaeroben Bedingungen und unter zwei extremen Lebensstilwechseln verglichen: von dunkel/aerob (schwach pigmentiert) zu beleuchtet/anaerob und von dunkel/semiaerob (pigmentiert) zu aerob, gefolgt von photooxidativem Stress. Wie Abb. 3.1 zeigt, wirkten sich die wechselnden Bedingungen z.T. unterschiedlich auf das Wachstum aus (siehe auch Tab. A.6, S. 165).

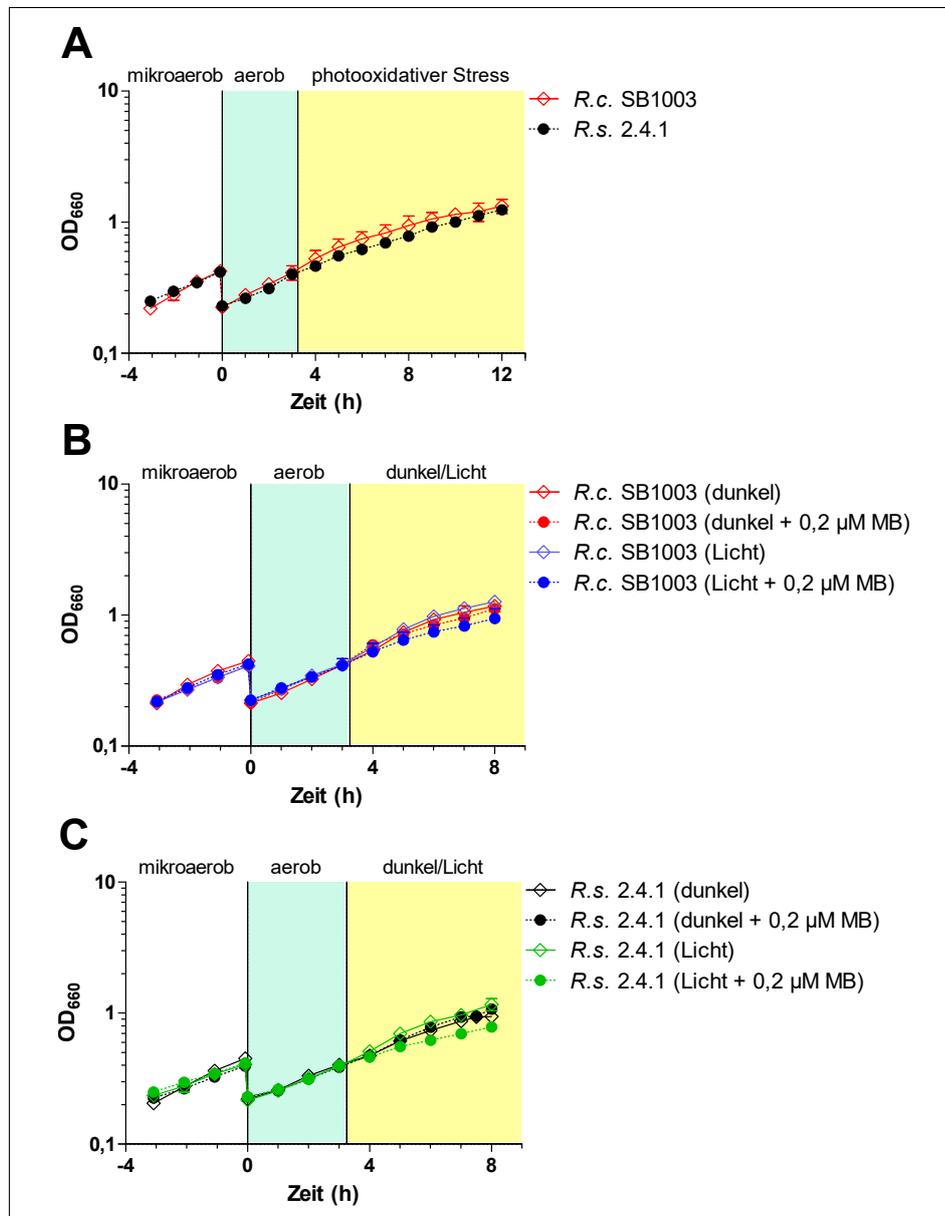
Beide Spezies wuchsen unter (mikro)aeroben Bedingungen vergleichbar und erreichten ähnliche End- $\text{OD}_{660}$ -Werte (Abb. 3.1A). Nach einer Verdünnung auf  $\text{OD}_{660}$  0,2 betrug die Werte der Verdopplungszeit ( $t_d$ )  $3:57 \text{ h} \pm 3 \text{ min}$  in *R. capsulatus* und  $4:11 \text{ h} \pm 14 \text{ min}$  in *R. sphaeroides*. Bei aerobem Wachstum betrug die  $t_d$ -Werte  $3:03 \text{ h} \pm 18 \text{ min}$  für *R. capsulatus* und  $3:17 \text{ h} \pm 16 \text{ min}$  für *R. sphaeroides*. Beim Wechsel zu phototrophem Wachstum hingegen kam *R. capsulatus* im Vergleich zu *R. sphaeroides* schneller in die exponentielle Phase (nach 4 h statt 21 h, Abb. 3.1B). Auch war in *R. capsulatus* die  $t_d$  signifikant kürzer ( $3:37 \text{ h} \pm 4 \text{ min}$ ) als in *R. sphaeroides* ( $6:49 \text{ h} \pm 29 \text{ min}$ ).

Wachstumsanalysen unter photooxidativem Stress sollten untersuchen, ob *R. capsulatus* sich auch besser an andere extreme Veränderungen von Licht- und Sauerstoffbedingungen anpasste. Hierfür wurden mikroaerob gewachsene *Rhodobacter*-Kulturen ab einer  $\text{OD}_{660}$  von ca. 0,4 auf  $\text{OD}_{660}$  0,2 verdünnt und in mit Alufolie abgedeckte Meplatflaschen überführt. Es wurde Methylenblau (MB) zu den Kulturen hinzugegeben (finale Konzentration  $0,2 \mu\text{M}$ ) und die Flaschen wurden in einem  $32^\circ\text{C}$ -warmen Wasserbad aerob (via Luftbegasung) kultiviert. Ab einer  $\text{OD}_{660}$  von 0,4 wurde der photooxidative Stress gestartet: Die Alufolie wurde entfernt und die Kulturen wurden mit  $800 \text{ W m}^{-2}$  Weißlicht beleuchtet, während ein Ventilator die Temperatur auf  $32^\circ\text{C}$  hielt. Analog dazu wurden Kontrollen kultiviert, und zwar mit und ohne MB sowie mit und ohne Beleuchtung ab  $\text{OD}_{660}$  0,4 (Abb. 3.2).

Beide Arten wuchsen unter photooxidativem Stress schlechter als die jeweiligen Kontrollen ohne MB, unabhängig von den Lichtverhältnissen. Unter photooxidativem Stress erreichten beide Spezies eine vergleichbare End- $\text{OD}_{660}$  nach 12 h, jedoch hatte *R. capsulatus* im Zeitraum von  $T_{3\text{h}}$  bis  $T_{6\text{h}}$  eine signifikant höhere Wachstumsrate  $\mu$ : Sie betrug  $0,190 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ , bei *R. sphaeroides* hingegen  $0,148 \pm 0,009 \text{ h}^{-1}$  (Abb. 3.2).



**Abbildung 3.1: Wachstum von *Rhodobacter* unter verschiedenen Licht- und Sauerstoffbedingungen.** Das Wachstum ist halblogarithmisch als  $OD_{660}$  gegen die Zeit (h) dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 h wurden die Kulturen auf eine  $OD_{660}$  von 0,2 verdünnt. Die Datenpunkte zeigen von biologischen Triplikaten die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (SD). Nicht sichtbare Fehlerbalken beruhen auf zu geringen SD. Das Wachstum wurde analysiert unter (A) mikraeroben Bedingungen, (B) beim Wechsel von mikraeroben Bedingungen zu aeroben Bedingungen und (C) beim Wechsel von aeroben zu anaeroben/phototrophen Bedingungen. Adaptiert nach Licht et al. (2020).

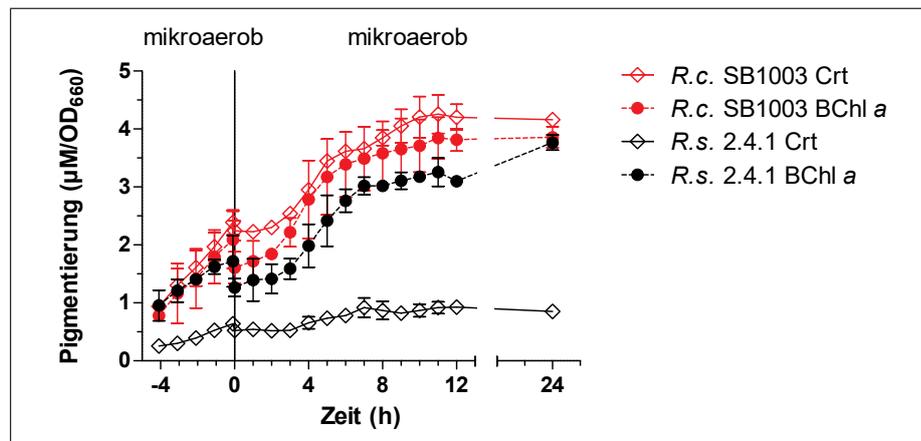


**Abbildung 3.2: Wachstum von *Rhodobacter* unter photooxidativem Stress.** Das Wachstum ist halblogarithmisch als OD<sub>660</sub> gegen die Zeit (h) dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 h wurden die Kulturen auf eine OD<sub>660</sub> von 0,2 verdünnt. Die Datenpunkte zeigen von biologischen Triplikaten die Mittelwerte ± Standardabweichungen (SD). Nicht sichtbare Fehlerbalken beruhen auf zu geringen SD. Zum Einsetzen photooxidativen Stresses erhielten die Kulturen ab 0 h 0,2 μM Methylenblau (MB) und wurden nach 3:15 h mit 800 W m<sup>-2</sup> Weißlicht beleuchtet (**A**). Das Wachstum gestresster Kulturen im Vergleich mit den Kontrollen mit/ohne MB bzw. mit/ohne Beleuchtung ist in (**B**) und (**C**) gezeigt. Adaptiert nach Licht et al. (2020).

### 3.1.2 Pigmentierung unter verschiedenen Licht- und Sauerstoffbedingungen

Parallel zu den Wachstumsanalysen wurden Proben für eine Extraktion von BChl *a* und Carotinoiden via Aceton-Methanol entnommen. Die quantifizierten Mengen der Pigmente wurden auf die  $OD_{660}$ -Werte normalisiert. Der Pigmentgehalt könnte entscheidend für die Anpassung an sowohl Phototrophie als auch photooxidativen Stress sein, da BChl *a* als Photosensibilisator  $^1O_2$  generiert und Carotinoide  $^1O_2$  wiederum quenchen könnten. Die Pigmentgehalte unter mikroaeroben, aeroben und anaeroben (phototrophen) Bedingungen fassen Abb. 3.3 bis 3.5 zusammen.

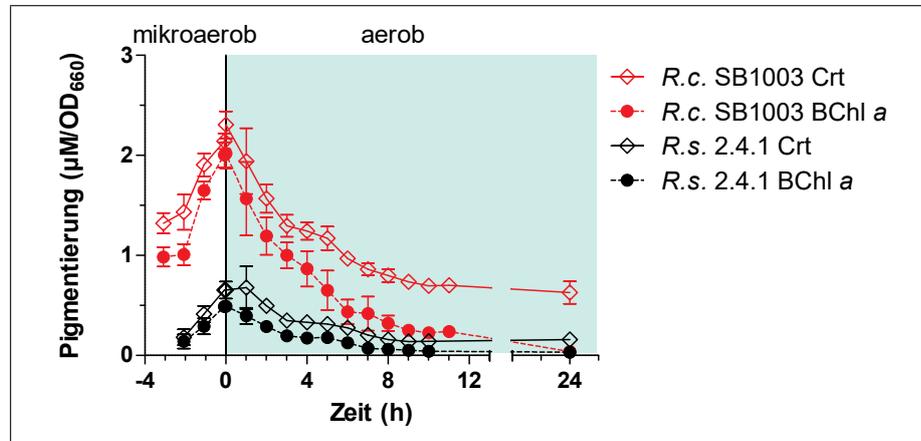
Allgemein hatte *R. capsulatus* immer einen höheren Gehalt an BChl *a* und Carotinoiden. Beim mikroaeroben Wachstum etwa enthielt *R. capsulatus* zu Beginn der exponentiellen Phase (Zeitpunkt  $T_{4h}$ )  $3,0 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  Carotinoide und  $2,8 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  BChl *a*, *R. sphaeroides* hingegen ca.  $0,7 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  Carotinoide und  $2,0 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  BChl *a* (Abb. 3.3). Der Unterschied zwischen den Carotinoidgehalten prägte sich nachfolgend stärker aus als beim BChl *a*. Zum Zeitpunkt  $T_{11h}$  hatte *R. capsulatus* ca. 1,2 mal soviel BChl *a* wie *R. sphaeroides*, aber 4,3 mal mehr Carotinoide.



**Abbildung 3.3: Pigmentierung in *Rhodobacter* unter mikroaeroben Bedingungen.** Es sind die Gehalte an Carotinoiden und BChl *a* in  $\mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  gegen die Zeit (h) dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 h wurden die Kulturen auf eine  $OD_{660}$  von 0,2 verdünnt. Die Datenpunkte zeigen von biologischen Triplikaten die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (SD). Nicht sichtbare Fehlerbalken beruhen auf zu geringen SD. Adaptiert nach Licht et al. (2020).

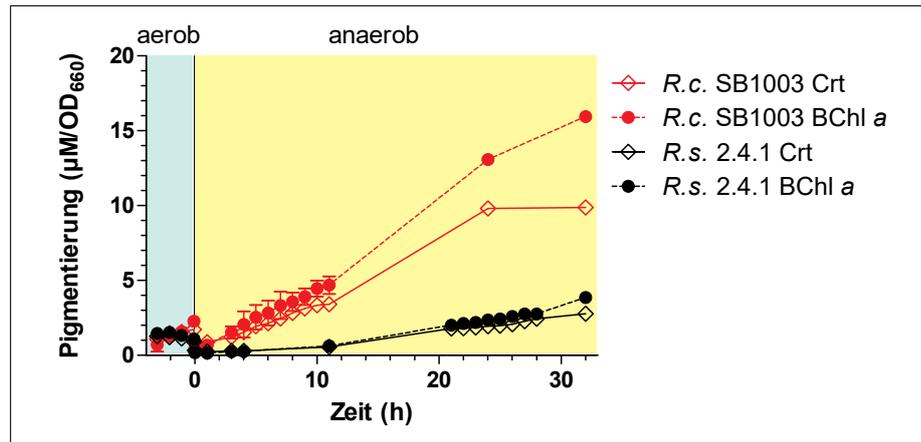
Beim Wechsel von mikroaeroben zu aeroben Bedingungen verringerte sich in beiden Spezies der Gehalt an Carotinoiden und BChl *a* kontinuierlich (Abb. 3.4). Initial hatte zum Zeitpunkt  $T_0$  *R. capsulatus* mit  $2,3 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  Carotinoiden und  $2,0 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  BChl *a* ca. 3 mal bzw. 4 mal höhere Pigmentgehalte als *R. sphaeroides*. Nach 10 h enthielt *R. capsulatus* zwar immer noch mehr Pigmente als *R. sphaeroides*, aber besonders der BChl *a*-Gehalt unterschied sich absolut gesehen wenig ( $< 0,2 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$ ). Anders dazu enthielt im Zeitraum

$T_{3h}$  bis  $T_{9h}$  *R. capsulatus* 3,7 bis 5,3 mal mehr Carotinoide als *R. sphaeroides*. Nach 24 h sanken die Carotinoidgehalte auf Werte von ca.  $0,6 \pm 0,1 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  (*R. capsulatus*) und  $0,2 \pm < 0,0 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  (*R. sphaeroides*).



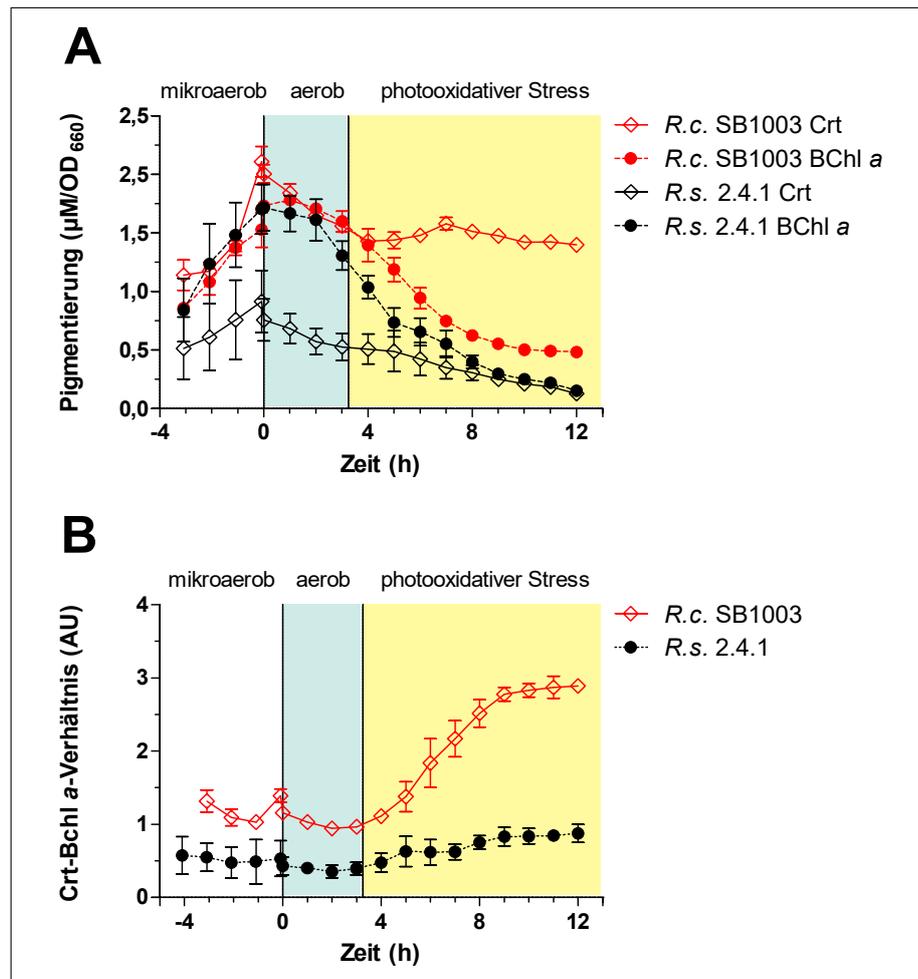
**Abbildung 3.4: Pigmentierung in *Rhodobacter* beim Wechsel von mikroaeroben zu aeroben Bedingungen.** Es sind die Gehalte an Carotinoiden und BChl *a* in  $\mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  gegen die Zeit (h) dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 h wurden die Kulturen auf eine  $\text{OD}_{660}$  von 0,2 verdünnt. Die Datenpunkte zeigen von biologischen Triplikaten die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (SD). Nicht sichtbare Fehlerbalken beruhen auf zu geringen SD. Adaptiert nach Licht et al. (2020).

Auch beim Wechsel von aeroben zu anaeroben Bedingungen wies *R. capsulatus* höhere Pigmentgehalte auf (Abb. 3.5). In beiden Arten stieg der Gehalt an BChl *a* und Carotinoiden kontinuierlich an, in *R. capsulatus* jedoch schneller: nach 12 h phototrophen Wachstums hatte *R. capsulatus* z.B. gegenüber *R. sphaeroides* fast 8 mal mehr BChl *a* und 6 mal mehr Carotinoide als *R. sphaeroides*. Nach 24 h phototrophen Wachstums enthielt *R. capsulatus*  $13,1 \pm 0,2 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  BChl *a* und  $9,8 \pm 0,2 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  Carotinoide, *R. sphaeroides*  $2,4 \pm < 0,0 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  BChl *a* und  $1,9 \pm 0,2 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  Carotinoide.



**Abbildung 3.5: Pigmentierung in *Rhodobacter* beim Wechsel von aeroben zu anaeroben (phototrophen) Bedingungen.** Es sind die Gehalte an Carotinoiden und BChl *a* in  $\mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  gegen die Zeit (h) dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 h wurden die Kulturen auf eine  $\text{OD}_{660}$  von 0,2 verdünnt. Die Datenpunkte zeigen von biologischen Triplikaten die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (SD). Nicht sichtbare Fehlerbalken beruhen auf zu geringen SD. Adaptiert nach Licht et al. (2020).

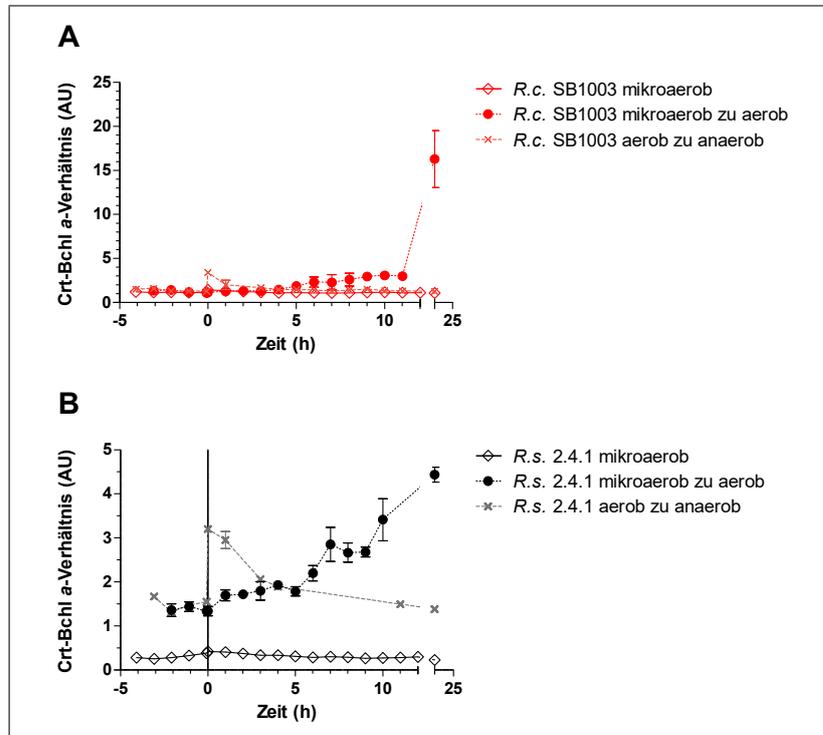
Zusammenfassend zeigte *R. capsulatus* im Vergleich zu *R. sphaeroides* höhere Gehalte an BChl *a* und Carotinoiden, ein Unterschied, der durch Wechsel an aeroben oder anaeroben Bedingungen weiter ausgeprägt wurde. Dies trifft z.T. auch auf die Anpassung an photooxidativen Stress zu (Abb. 3.6A). Während des photooxidativen Stresses sanken in *R. sphaeroides* die Gehalte an BChl *a* und Carotinoiden von  $1,3 \pm 0,2 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  (BChl *a*) bzw.  $0,5 \pm 0,2 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  (Carotinoide) beide auf  $< 0,2 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$ . Im Unterschied dazu zeichnete sich für *R. capsulatus* ein anderer Verlauf der Pigmentierung ab: Zwar sank auch hier der Gehalt an BChl *a* (besonders zu Anfang des Stresses), um sich letztlich im Bereich von  $0,5 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$  zu bewegen. Jedoch hörte eine Stunde nach Beginn des photooxidativen Stresses der Gehalt an Carotinoiden auf zu fallen; er schwankte bis zum Ende der Messungen im Bereich von  $1,4\text{--}1,6 \mu\text{M OD}_{660}^{-1}$ . Der konstante Carotinoidgehalt in *R. capsulatus* führte zur Frage, wie sich das Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis und damit das Verhältnis von potentiellen Quenchern zu Photosensibilisatoren in beiden Spezies verhielt. Wie Abb. 3.6B zeigt, verdreifachte sich unter Stress in *R. capsulatus* das Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis von Anfang bis Ende der Messungen (von ca. 0,9 auf 2,9); in *R. sphaeroides* hingegen war der Anstieg dieses Verhältnisses von 0,4 auf 0,9 geringer.



**Abbildung 3.6: Pigmentierung in *Rhodobacter* unter photooxidativem Stress.** Es sind gegen die Zeit (h) die (A) Gehalte an Carotinoiden und BChl *a* in  $\mu\text{M}/\text{OD}_{660}^{-1}$  und (B) ihr Verhältnis zueinander in willkürlichen Einheiten, (arbitrary units, AU) dargestellt. Bis zum Zeitpunkt 0 h wuchsen die Kulturen mikroaerob, danach wurden sie auf eine  $\text{OD}_{660}$  von 0,2 verdünnt und wuchsen aerob mit nachfolgendem photooxidativem Stress. Die Datenpunkte zeigen von biologischen Triplikaten die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (SD). Nicht sichtbare Fehlerbalken beruhen auf zu geringen SD. Adaptiert nach Licht et al. (2020).

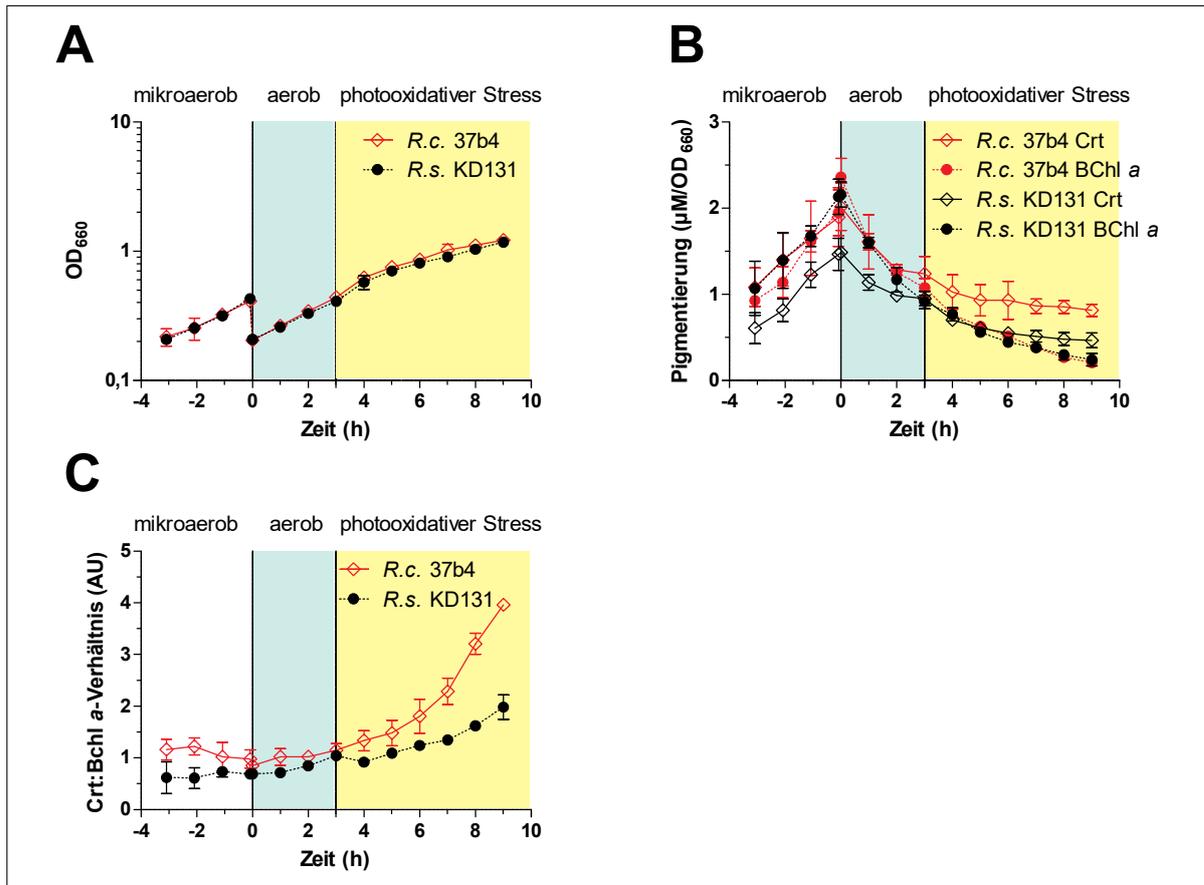
Diese Ergebnisse führten zu den Fragen, ob dieser Anstieg des Carotinoid-BChl *a*-Verhältnisses (1) speziell unter aeroben Bedingungen bzw. photooxidativem Stress auftritt und ob (2) die Beobachtungen nur auf die vorliegenden Stämme zutreffen. Zur Beantwortung der ersten Frage wurden die Carotinoid-BChl *a*-Verhältnisse unter anderen Sauerstoff- und Lichtbedingungen berechnet (Abb. 3.7). Unter mikroaeroben Bedingungen war das Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis innerhalb von 24 h in beiden Spezies konstant (ca. 1,1 in *R. capsulatus* und 0,3 in *R. sphaeroides*). *R. capsulatus* zeigte unter anaeroben Bedingungen das gleiche (und konstante) Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis wie unter mikroaeroben Bedingungen; in *R. sphaeroides* sank das Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis im Zeitraum von

$T_{3h}$  auf  $T_{24h}$  von ca. 2,1 auf 1,4. Aerob gewachsene Kulturen hatten nach 10 h ein ähnliches Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis von  $3,1 \pm 0,0$  (*R. capsulatus*) bzw.  $3,4 \pm 0,8$  (*R. sphaeroides*). Nach 24 h aber zeigte *R. capsulatus* ein fast vierfach höheres Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis mit  $16 \pm 2,7$  (*R. sphaeroides*:  $4,4 \pm 0,2$ ).



**Abbildung 3.7: Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis in *Rhodobacter* unter verschiedenen Licht- und Sauerstoffbedingungen.** Das Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis ist für (A) *R. capsulatus* und (B) *R. sphaeroides* gegen die Zeit (h) in willkürlichen Einheiten (arbitrary units, AU) dargestellt. Kulturen wurden zum Zeitpunkt 0 h auf eine  $OD_{660}$  von 0,2 verdünnt. Die Datenpunkte zeigen von biologischen Triplikaten die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (SD). Nicht sichtbare Fehlerbalken beruhen auf zu geringen SD. Adaptiert nach Licht et al. (2020).

Um zu testen, ob der sauerstoffinduzierte Anstieg des Carotinoid-BChl *a*-Verhältnisses stammspezifisch ist, wurde das Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis unter aeroben Bedingungen mitsamt photooxidativem Stress auch für die Wildtypstämme *Rhodobacter capsulatus* 37b4 und *Rhodobacter sphaeroides* KD131 untersucht. Während beide Stämme vergleichbar schnell unter Stress wuchsen und eine ähnliche End- $OD_{660}$  aufwiesen (Abb. 3.8A), unterschieden sie sich ähnlich wie *R. capsulatus* SB1003 und *R. sphaeroides* 2.4.1 in der Pigmentierung (Abb. 3.8B und C). In beiden Stämmen sank nach Beginn aerober Bedingungen der Gehalt an BChl *a* und Carotinoiden. In *R. capsulatus* sank der Gehalt an Carotinoiden deutlich langsamer. So fiel im Zeitraum von  $T_{3h}$  zu  $T_{9h}$  der Gehalt an BChl *a* von ca.  $1,1 \mu\text{M } OD_{660}^{-1}$  in *R. capsulatus* 37b4 bzw. von  $0,9 \mu\text{M } OD_{660}^{-1}$  in *R. sphaeroides* KD131 für beide Arten auf  $0,2 \mu\text{M } OD_{660}^{-1}$ .



**Abbildung 3.8: Wachstum und Pigmentierung von *R. capsulatus* 37b4 und *R. sphaeroides* KD131 unter photooxidativem Stress.** Es sind gegen die Zeit (h) (A) das Wachstum, (B) der Gehalt an Carotinoiden und BChl *a* sowie (C) das Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis dargestellt. Die Kulturen wurden zum Zeitpunkt 0 h auf eine OD<sub>660</sub> von 0,2 verdünnt. Die Datenpunkte zeigen von biologischen Triplikaten die Mittelwerte ± Standardabweichungen (SD). Nicht sichtbare Fehlerbalken beruhen auf zu geringen SD.

Der Gehalt an Carotinoiden war im gleichen Zeitraum in beiden Stämmen etwas höher: in *R. capsulatus* 37b4 nahm der Carotinoidgehalt von 1,2 auf 0,8 µM OD<sub>660</sub><sup>-1</sup> ab, in *R. sphaeroides* KD131 von 0,9 auf 0,5 µM OD<sub>660</sub><sup>-1</sup>. Damit war auch in diesen Stämmen das Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis erhöht, in *R. capsulatus* um das 3,4-fache und damit fast doppelt so stark wie in *R. sphaeroides*, wo das Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis um das 1,9-fache stieg.

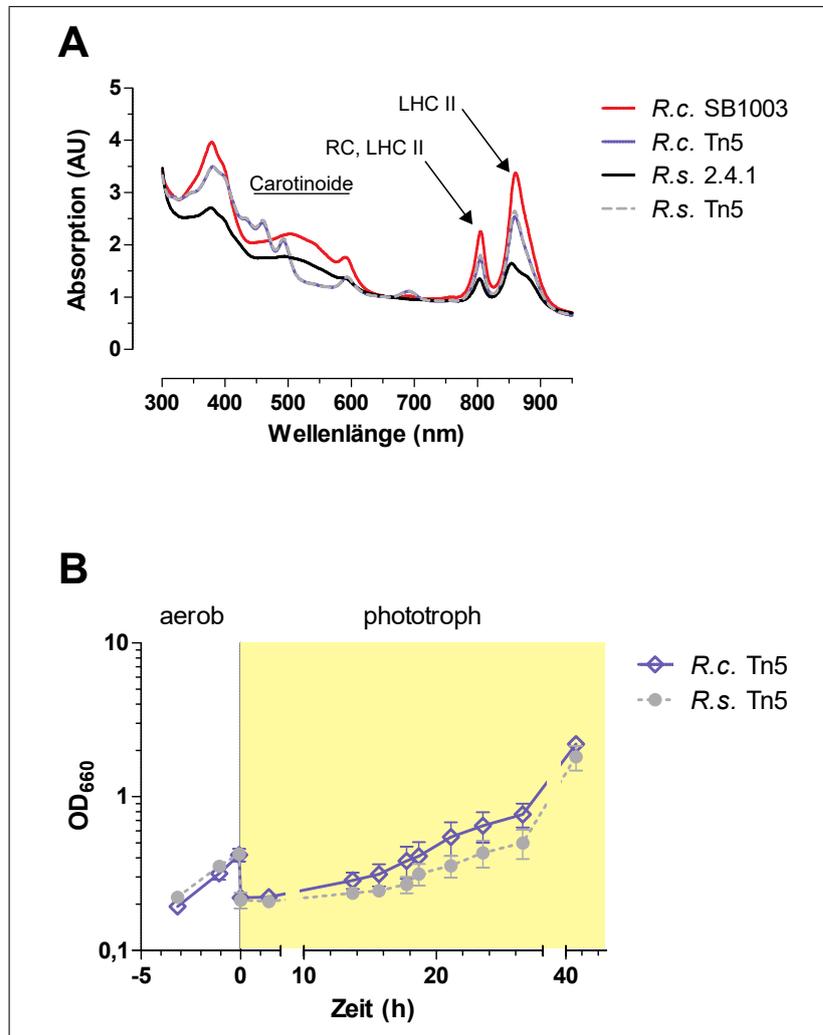
### 3.1.3 Phototrophes Wachstum und Pigmentierung von grünen *Rhodobacter*-Tn5-Mutanten mit unterbrochener Carotinoid-Biosynthese

Unter den Wildtypstämmen erreichte *R. capsulatus* höhere Pigmentgehalte und passte sich schneller an phototrophes Wachstum sowie an die Anfangsphase photooxidativen

Stresses an. Da der höhere Carotinoidgehalt in *R. capsulatus* diese Unterschiede begründen könnte, wurde das phototrophe Wachstum von *Rhodobacter*-Stämmen mit gestörter Carotinoidbiosynthese analysiert. Hierfür wurden Tn5-Inserationsmutanten von *R. capsulatus* SB1003 und *R. sphaeroides* 2.4.1 (*R. capsulatus*-Tn5-Grün und *R. sphaeroides*-Tn5-Grün) untersucht, deren grüne Farbe und Absorptionsspektren im Vergleich zu einer Studie von Chi et al. (2015) auf eine Mutation von *crtC* oder *crtD* hindeuteten, was eine Akkumulation von (Hydroxy-)Neurosporen bedeutet (Abb. 3.9 und 3.10). Beim Wechsel von aeroben und phototrophen Bedingungen erreichten beide Mutanten die exponentielle Wachstumsphase nach ca. 18 h. Zwar war die  $t_d$  in *R. capsulatus*-Tn5-Grün mit ca.  $9:25 \text{ h} \pm 1:20 \text{ h}$  kürzer als in *R. sphaeroides*-Tn5-Grün (ca.  $13:20 \text{ h} \pm 2:25 \text{ h}$ ), aber beide Arten erreichten eine vergleichbare End-OD<sub>660</sub> im Bereich 2,0.



**Abbildung 3.9: Färbung von *Rhodobacter*-Tn5-Mutanten mit unterbrochener Carotinoid-Biosynthese.** Am Beispiel von *R. capsulatus* mit stationären, phototrophen Kulturen zeigt die Mutante (links) eine grüne Färbung anstatt eine orange-rote wie beim Wildtyp (rechts).



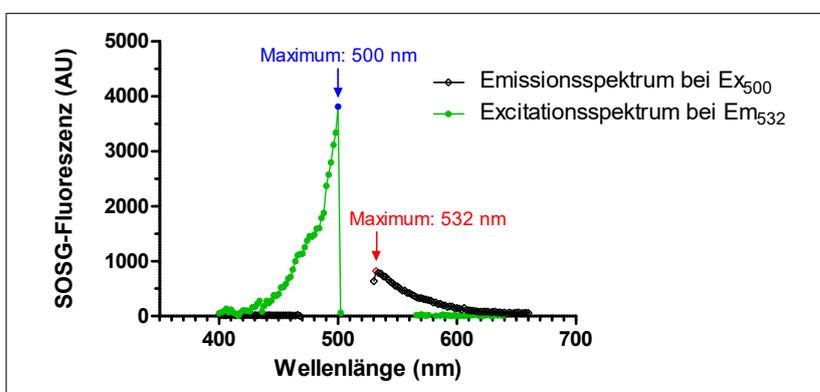
**Abbildung 3.10: Analyse von grünen *Rhodospirillum rubrum*-Tn5-Mutanten mit unterbrochener Carotinoid-Biosynthese.** (A) Absorptionsspektren von *R. capsulatus*-Tn5-Grün und *R. sphaeroides*-Tn5-Grün. Die Absorption ist in willkürlichen Einheiten (arbitrary units, AU) gegen die Wellenlänge (nm) aufgetragen. Neben den Carotinoiden sind die Absorptionsbereiche für das Reaktionszentrum (RC) und die Lichtsammelkomplexe I und II (LHC I, LHC II) markiert. (B) Wachstum von *Rhodospirillum rubrum* Tn5-Kulturen beim Wechsel von aeroben Bedingungen im Dunkeln zu anaeroben/phototrophen Bedingungen. Es ist die OD<sub>660</sub> gegen die Zeit (h) aufgetragen, zum Zeitpunkt 0 h wurden die Kulturen auf eine OD<sub>660</sub> von 0,2 verdünnt. Es sind jeweils die Mittelwerte ± SD aufgetragen (n = 3). Ausbleibende Fehlerbalken beruhen auf zu geringen SD-Werten. Adaptiert nach Licht et al. (2020).

### 3.1.4 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies unter photooxidativem Stress

#### 3.1.4.1 Entwicklung eines *in vivo*- $^1\text{O}_2$ -Assays für *Rhodobacter*

Die  $^1\text{O}_2$ -Produktion in *Rhodobacter* wurde mittels der Fluoreszenzsonde SOSG untersucht. Im Gegensatz zu Herstellerangaben kann SOSG auch in Zellen eindringen, z.B. durch einen mittelstarken Hitzeschock (Prasad et al. 2018). Auf Grundlage der Erkenntnisse von Prasad et al. (2018) wurde ein Assay entwickelt, um die  $^1\text{O}_2$ -Produktion in *Rhodobacter in vivo* zu quantifizieren. Grundlegend für diesen Assay wurden folgende Aspekte sichergestellt: die Reduzierung des Hintergrundrauschens bei den Fluoreszenzintensitätsmessungen, geeignete Kontrollen, die Penetration der Sonde in *Rhodobacter* und geeignete Pufferbedingungen.

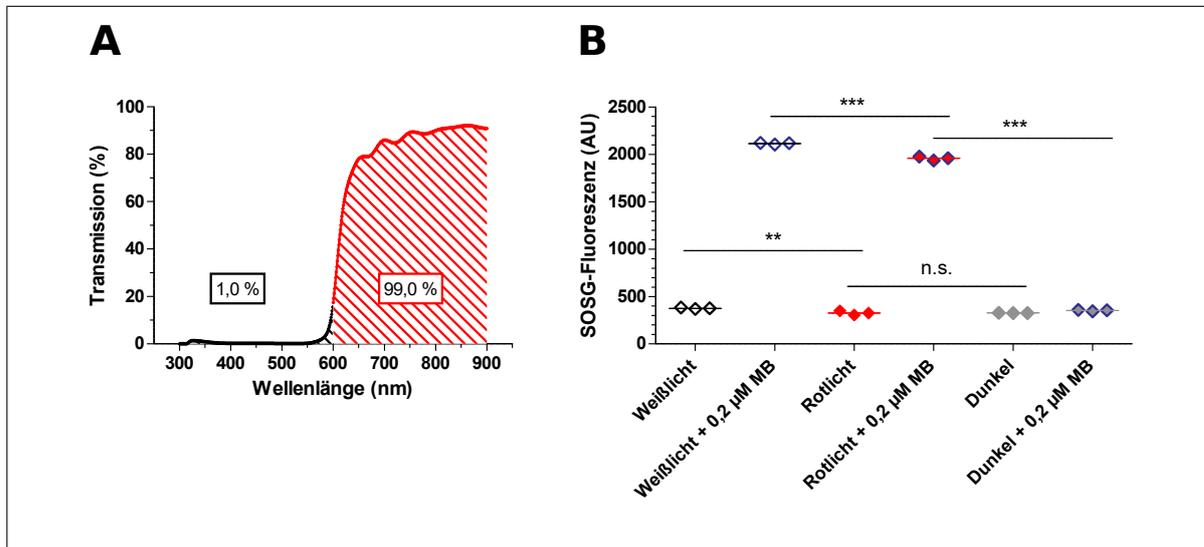
In Anlehnung an Prasad et al. (2018) wurden die mit SOSG zu inkubierenden Proben in HEPES-Puffer für die Fluoreszenzmessungen aufgenommen. Für ein möglichst starkes Signal ohne Hintergrundrauschen wurden zunächst Extinktions- und Emissionsspektren von HEPES-Puffer mit SOSG aufgenommen und dann diese Werte von denen der Spektren ohne SOSG als Hintergrund abgezogen. Die Proben wurden vor den Messungen für 30 min bei 32 °C und 450 rpm in einer transparenten 96-Wellplatte unter 800 W m<sup>-2</sup> Weißlicht inkubiert. Die in Abb. 3.11 aufgeführten Emissions- und Excitationspektren zeigen, dass für maximal hohe Fluoreszenzintensitäten in diesem Puffer die Fluoreszenzintensität bei einer Excitation von 500 nm und einer Emission von 532 nm gemessen werden musste.



**Abbildung 3.11: Excitations- und Emissionsspektren von SOSG.** Gezeigt ist gegen die Wellenlänge (nm) von SOSG in HEPES-Puffer die SOSG-Fluoreszenz in willkürlichen Einheiten (arbitrary units, AU). Von den Werten wurde die Fluoreszenzintensität von HEPES-Puffer ohne SOSG als Hintergrundwert abgezogen. Das gezeigte Emissionsspektrum hatte als Excitationwellenlänge 500 nm, das Excitationspektrum hatte als Emissionswellenlänge 532 nm.

Zuvor konnten *in vitro*-Experimente mit SOSG demonstrieren, dass Weißlicht die  $^1\text{O}_2$ -Produktion durch SOSG anregen kann, während die  $^1\text{O}_2$ -Produktion durch Rotlicht vergleichbar gering wie bei einer Dunkelkontrolle war (Prasad et al. 2018). Deshalb wurden die Effekte von Weiß- und Rotlicht für die vorliegende Assay-Entwicklung in *Rhodobacter*

untersucht. Die Effizienz der Filterung im Versuchsaufbau sowie die gemessenen Fluoreszenzintensitäten von Dunkel-, Weißlicht- und Rotlichtproben sind in Abb. 3.12 dargestellt.

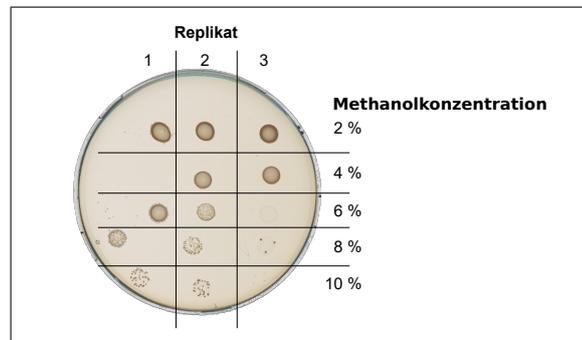


**Abbildung 3.12: Lichtbedingungen für SOSG-Versuche.** (A) Filterung des Lichts für SOSG-Versuche. Es ist die (summierte) Transmission (%) für Rotlicht ( $\geq 600$  nm) und Licht geringerer Wellenlängen ( $\leq 600$  nm) angegeben. (B) Mit SOSG in RÄ-Medium gemessene Fluoreszenzintensitäten für  $Ex_{500}/Em_{532}$  unter verschiedenen Lichtbedingungen ( $800 \text{ W m}^{-2}$  Weißlicht,  $800 \text{ W m}^{-2}$  Rotlicht, dunkel) sowie mit und ohne  $0,2 \mu\text{M}$  Methylenblau. Es ist die SOSG-Fluoreszenz in willkürlichen Einheiten (arbitrary units, AU) gegen die verschiedenen Bedingungen aufgetragen. Dargestellt sind die einzelnen Replikate mit samt Mittelwert ( $n = 3$ ). Eingezeichnet sind Signifikanzniveaus für ausgewählte Unterschiede: n.s. nicht signifikant, \*\* p-Wert < 0,01, \*\*\* p-Wert < 0,001. Adaptiert nach Licht et al. (2020).

Für die Versuche konnte eine rote, transparente Folie sicherstellen, dass 99,0 % des Lichts aus dem Bereich von  $\geq 600$  nm kamen. Die Durchführung des SOSG-Assays mit HEPES-Puffer mit und ohne MB zeigte signifikante Unterschiede bei den Fluoreszenzintensitäten: Proben unter  $800 \text{ W m}^{-2}$  Weißlicht zeigten mit und ohne MB signifikant höhere Fluoreszenzintensitäten als Proben unter  $800 \text{ W m}^{-2}$  Rotlicht. Ohne MB zeigte sich im Vergleich kein signifikanter Unterschied zwischen mit Rotlicht behandelten und im Dunkeln inkubierten Proben. Erst bei Zugabe von MB wiesen die mit Rotlicht behandelten Proben eine signifikant höhere Fluoreszenzintensität auf. Im Vergleich zu mit Weißlicht behandelten Proben war die mittlere Fluoreszenzintensität unter Rotlicht ohne MB 13,4 % kleiner ( $p < 0,01$ ), mit MB 7,4 % ( $p < 0,001$ ). Um Hintergrundrauschen zu minimieren, wurden die Versuche daher mit Rot- statt Weißlicht durchgeführt.

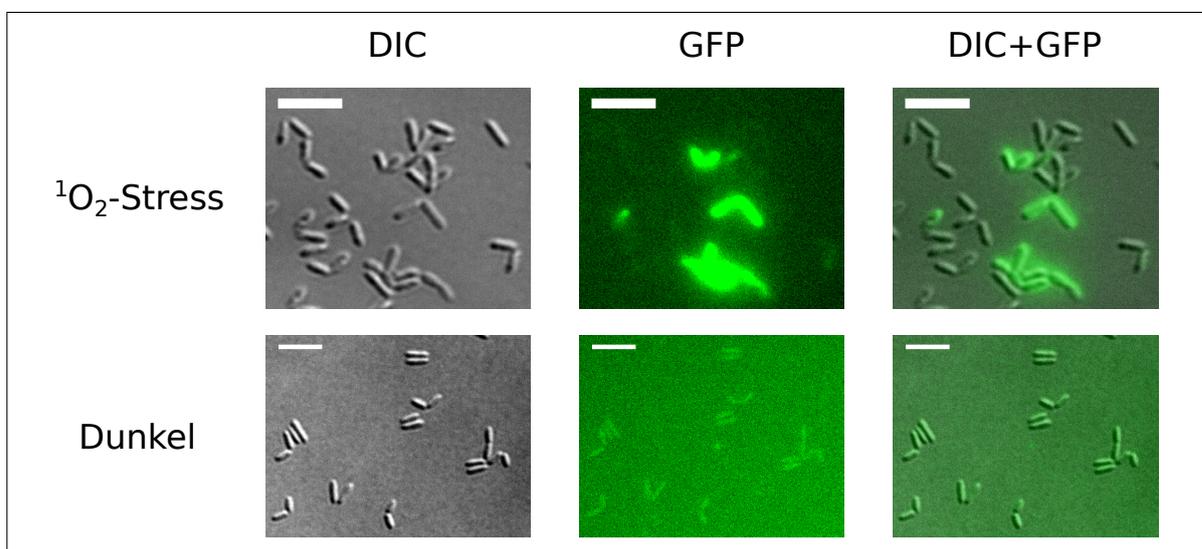
Da SOSG-Stamm- und Experimentierlösungen Methanol enthielten, wurde die Wirkung verschiedener Methanolkonzentrationen auf das *Rhodobacter*-Wachstum untersucht. Die finale Methanolkonzentration im SOSG-Assay betrug 0,25 %. In den Vorversuchen zeigten

*R. capsulatus*-Kulturen bei 2 % Methanol (finale Konzentration) noch Wachstum, womit die Effekte des Methanols in den SOSG-Experimentierlösungen als vernachlässigbar eingestuft wurden (Abb. 3.13).



**Abbildung 3.13: Wachstum von *R. capsulatus*-Kulturen mit Methanol.** Unmittelbar vor dem Auftropfen wurden die biologischen Triplikate mit Methanol versetzt. Die finalen Methanolkonzentrationen betragen 2–10 %. Die Kulturen inkubierten für 48 h bei 32 °C.

Mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen wurde überprüft, ob SOSG auch in *Rhodobacter*-Zellen unter Versuchsbedingungen eindringt. Bei einer finalen Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  zeigten mehrere Zellen eine grüne Fluoreszenz, wenn sie zuvor 800  $\text{W m}^{-2}$  Rotlicht ausgesetzt wurden. Die Dunkelkontrollen zeigten keine Fluoreszenz (Abb. 3.14).



**Abbildung 3.14: Mikroskopie von *R. capsulatus* mit und ohne 5  $\mu\text{M}$  SOSG.** Die Kulturen inkubierten für 30 min und 32 °C bei 800  $\text{W m}^{-2}$  Rotlicht (oben) bzw. im Dunkeln (unten). Die Kulturen wurden im Anschluss für 4 min bei 4.000 rpm abzentrifugiert und in 100  $\mu\text{l}$  HEPES-Puffer resuspendiert. Die Aufnahmen erfolgten über Differential Interferenz Contrast (Differentialinterferenzkontrast, DIC) und den Green Fluorescent Protein (GFP)-Kanal. Der weiße Strich zeigt den Messbalken für eine Länge von 5  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.4.2 Quantifizierung von $^1\text{O}_2$ und allgemeinen ROS in *Rhodobacter*

Mittels der Fluoreszenzsonden SOSG und  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  wurden die Mengen an  $^1\text{O}_2$  und ROS allgemein untersucht, welche *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* unter photooxidativen Stress produzierten. Abbildung 3.15A–C fasst die Ergebnisse zusammen.

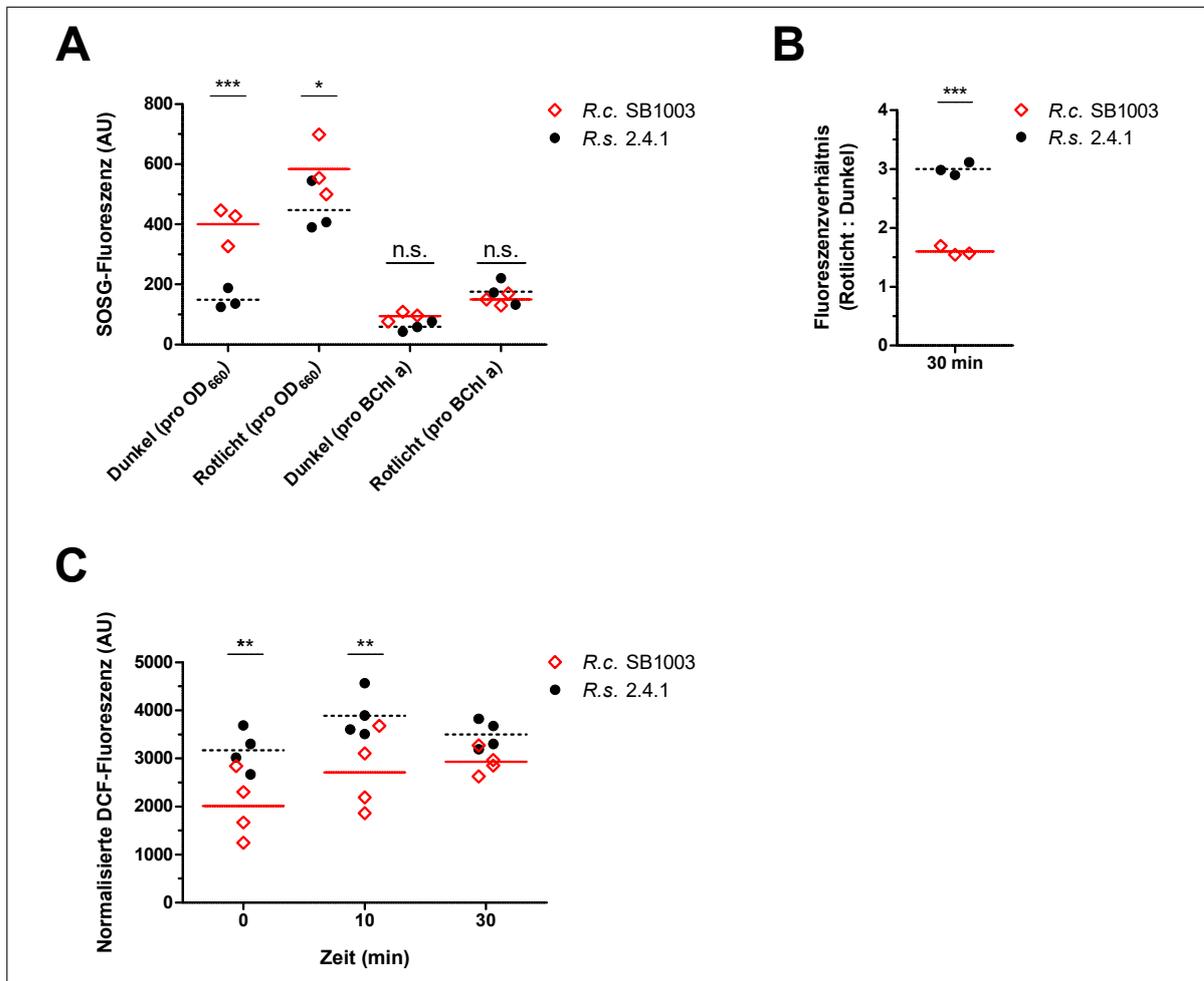


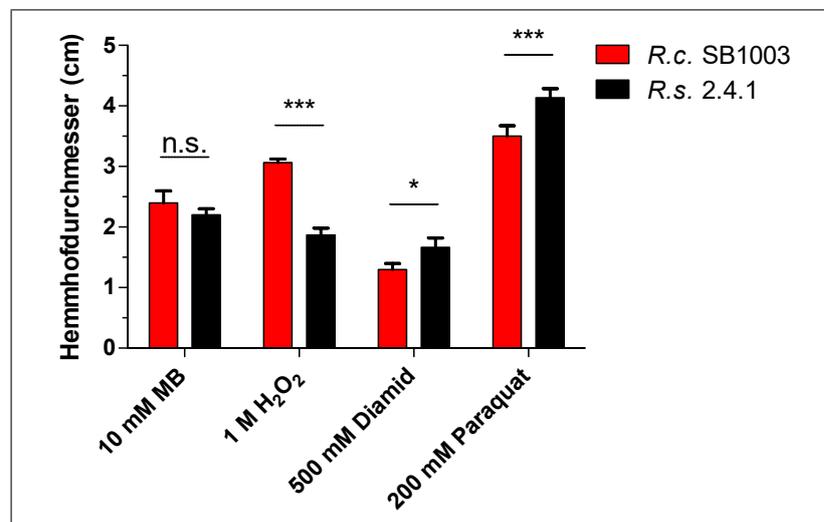
Abbildung 3.15: Intrazelluläre  $^1\text{O}_2$ - und ROS-Level in *Rhodobacter* unter photooxidativem Stress. (A)  $^1\text{O}_2$ -Bestimmung mittels SOSG. SOSG-Fluoreszenzintensitäten in willkürlichen Einheiten (arbitrary units, AU) nach Inkubation der Sonde in *Rhodobacter* nach 30 min im Dunkeln bzw. unter  $800 \text{ W m}^{-2}$  Rotlicht. Die Fluoreszenz wurde auf die  $\text{OD}_{660}$  und den Bchl *a*-Gehalt normalisiert ( $n = 3$ ). (B) Verhältnisse der SOSG-Fluoreszenzen von Proben unter Rotlicht gegen Dunkelkontrollen ( $n = 3$ ). (C) ROS-Bestimmung mittels  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ . Die DCF-Fluoreszenz wurde gegen die  $\text{OD}_{660}$  normalisiert und ist in AU dargestellt ( $n = 4$ ). Alle Diagramme zeigen die biologischen Replikate mitsamt Mittelwerten. Mittels zweifaktorieller ANOVA und Post-Bonferroni-Tests wurden die Werte verglichen: n.s. nicht signifikant; \* p-Wert  $< 0,05$ ; \*\* p-Wert  $< 0,01$ ; \*\*\* p-Wert  $< 0,001$ . Adaptiert nach Licht et al. (2020).

Gemessen an der  $\text{OD}_{660}$ -normalisierten SOSG-Fluoreszenz zeigte *R. capsulatus* im Vergleich zu *R. sphaeroides* signifikant höhere  $^1\text{O}_2$ -Mengen, sowohl in den Dunkelkontrollen

( $400,0 \pm 69,9$  gegen  $149,7 \pm 33,7$ ) als auch unter Rotlicht ( $584,0 \pm 102,4$  gegen  $447,3 \pm 85,0$ ). Im Gegensatz dazu zeigte eine auf den BChl *a*-Gehalt normalisierte SOSG-Fluoreszenz keine signifikanten Unterschiede zwischen den Arten (Abb. 3.15A). Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von gestressten Proben zu Dunkelkontrollen betrug in *R. sphaeroides* mit  $3,1 \pm 0,1$  fast das Doppelte von *R. capsulatus* ( $1,7 \pm 0,1$ ) und war damit signifikant größer (Abb. 3.15B). Messungen intrazellulär gebildeter ROS via H<sub>2</sub>DCFDA wiesen unter photooxidativem Stress Unterschiede zwischen beiden Spezies auf: die DCF-Fluoreszenz war in *R. sphaeroides* vor photooxidativem Stress 1,6 mal höher, 10 min nach Stress 1,5 mal höher (Abb. 3.15C). Diese Unterschiede waren signifikant; nach 30 min Stress unterschied sich die Fluoreszenz nicht signifikant.

### 3.1.4.3 Sensitivität gegenüber <sup>1</sup>O<sub>2</sub> und anderen reaktiven Sauerstoffspezies

Mittels Hemmhoftests wurde untersucht, ob *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* unterschiedlich sensitiv gegenüber diversen oxidativen Stressoren sind. Während photooxidativer Stress via MB keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Spezies hervorbrachte, hatte *R. capsulatus* mit  $3,1 \pm 0,1$  cm signifikant größere Hemmhöfe als *R. sphaeroides* mit  $1,9 \pm 0,1$  cm (Abb. 3.16). Im Gegensatz dazu erzeugte Stress durch Glutathionschwund (via Diamid) oder Superoxid (via Paraquat) signifikant größere Hemmhöfe in *R. sphaeroides*.



**Abbildung 3.16: Hemmhoftest mit *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*** Dargestellt sind die Mittelwerte mitsamt Standardabweichungen der Hemmhoftestdurchmesser in cm ( $n = 3$ ). Getestet wurden 10 mM Methylenblau (MB), 1 M Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 500 mM Diamid und 200 mM Paraquat. Eingezeichnet sind Signifikanzniveaus für ausgewählte Unterschiede: n.s. nicht signifikant; \* p-Wert < 0,05; \*\*\* p-Wert < 0,001. Adaptiert nach Licht et al. (2020).

## 3.2 Regulatorische Faktoren der $^1\text{O}_2$ -Antwort von *R. capsulatus*

### 3.2.1 Alternative Sigmafaktoren

Die alternativen Sigmafaktoren *rpoE* und RpoH<sub>II</sub> steuern hauptsächlich die  $^1\text{O}_2$ -Antwort in *R. sphaeroides*. In einer Signaltransduktionskaskade bezweckt dabei  $^1\text{O}_2$  zunächst die proteolytische Abspaltung des Antisigmafaktors *chrR* von *rpoE*, womit letzteres u.a. auch die Transkription von RpoH<sub>II</sub> fördert. Beide Sigmafaktoren regulieren die meisten Gene der (photo-)oxidativen Stressantwort. Ein Teil dieses Regulons überschneidet sich mit RpoH<sub>I</sub>, welches primär die Hitzestressantwort einleitet. Bezüglich des Vergleichs der  $^1\text{O}_2$ -Antwort von *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* offenbarten sich bei den alternativen Sigmafaktoren mehrere Eigenheiten in *R. capsulatus*.

#### 3.2.1.1 RpoE und ChrR in der $^1\text{O}_2$

Eine pBlast-Analyse zeigte, dass *R. capsulatus* zwar ein Homolog für das *R. sphaeroides-rpoE* hat, aber keines für *chrR* haben sollte (Tab. 3.1). Ein möglicher Kandidat für ein *chrR*-Homolog wäre RCAP\_rcc00698, da *chrR* oft downstream von *rpoE* kolokalisiert: Eine Analyse der *rpoE*-Syntanie mittels des SyntTax-Onlinetools zeigte, dass neben *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* über 140 von 155 untersuchten Taxa der *Rhodobacteraceae* die Kolokalisation von *rpoE* und *chrR* aufwiesen (etwa in *Roseobacter denitrificans*, *Dinoroseobacter shibae*, *Jannaschia rubra*). Eine pBlast-Analyse mit RCAP\_rcc00698 fand allerdings in *R. sphaeroides* als Homolog nur RSP\_0903 (Katalase) und nicht *chrR* (Tab. 3.1).

**Tabelle 3.1: pBlast-Ergebnisse mit *rpoE* und *chrR* in *R. sphaeroides* und *R. capsulatus*.** Es wurden für *R. capsulatus* SB1003 die Homologe in *R. sphaeroides* 2.4.1 gesucht und umgekehrt. Für das *R. sphaeroides-chrR* gab es keine Treffer in *R. capsulatus*.

Query	Ergebnis	Max/Total Score	Query Cover (%)	E-Value	ID (%)
<i>R.c. rpoE</i>	<i>R.s. rpoE</i>	56,2	98	$5e^{-11}$	30,0
<i>R.c. RCAP_rcc00698</i>	<i>R.s. RSP_0903</i>	25,4	12	3,5	42,9
<i>R.s. rpoE</i>	<i>R.c. rpoE</i>	30,4	37	0,046	30,6
<i>R.s. chrR</i>	-	-	-	-	-

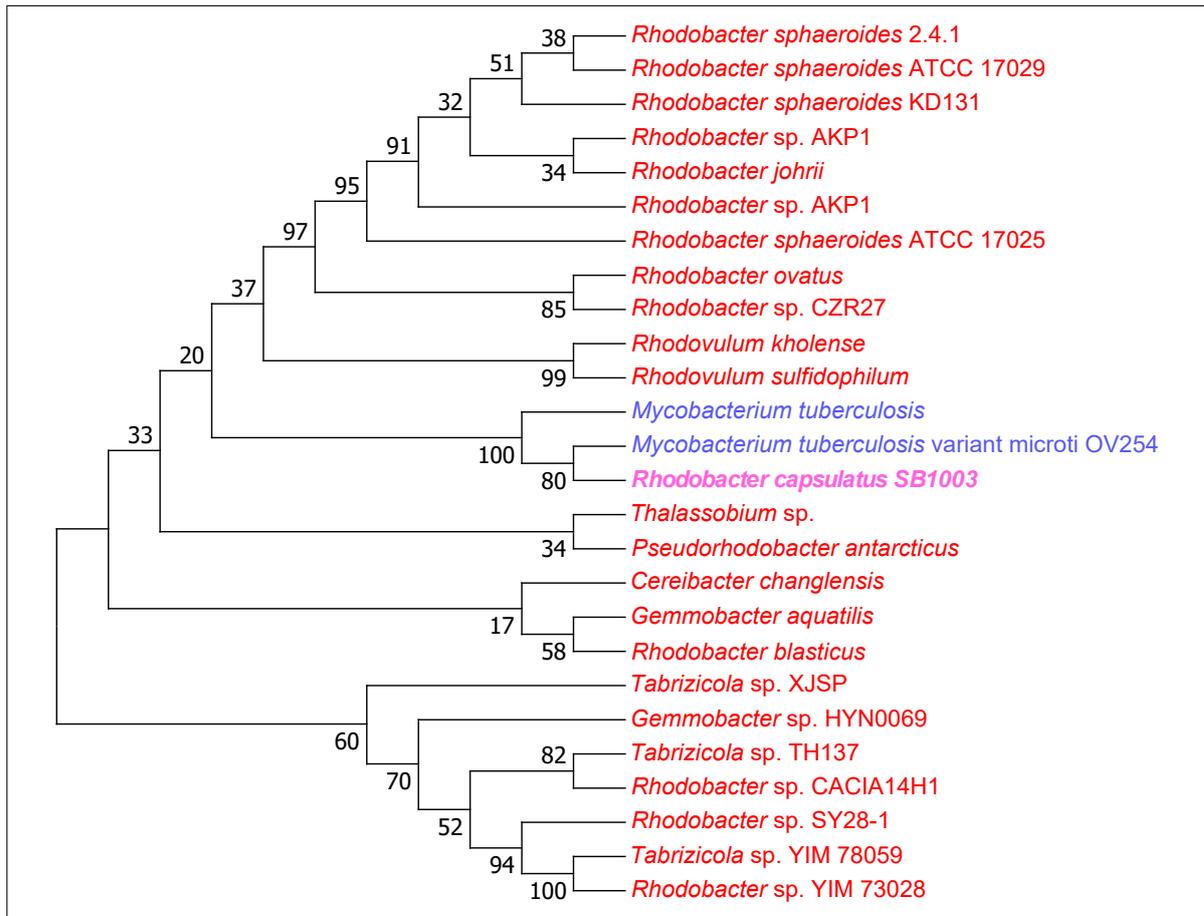
Im Unterschied zu den fehlenden Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen zeichnen allerdings Analysen der Strukturhomologie mittels des Tools PHYRE<sup>2</sup> ein anderes Bild, welches Tab. 3.2 zusammenfasst. Eine Suche, ausgehend von der Struktur von

RCAP\_rcc00698, wies 76 Strukturhomologe auf, wobei *R. sphaeroides* mit 13% Identität der einzige Vertreter der *Rhodobacteraceae* war. Allerdings teilte sich der Antisigmafaktor RskA von *Mycobacterium tuberculosis* mit 24% die höchste Identität mit RCAP\_rcc00698. Ausgehend vom *R. sphaeroides*-ChrR hingegen trat RCAP\_rcc00698 unter den Homologen nicht auf, RskA nur entfernt mit nur 10% Identität. Umgekehrt wies eine Suche mit RskA kein Strukturhomolog in *R. capsulatus* auf, jedoch das *R. sphaeroides*-*chrR* (11% Identität). Die Ähnlichkeit der *chrR*-Proteine von *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* zeigte sich indirekt über RskA. Bemerkenswert ist dabei, dass *M. tuberculosis* phylogenetisch weiter entfernt von *R. capsulatus* ist (und anders als *Rhodobacter* Gram-positiv).

**Tabelle 3.2: Übersicht über ausgewählte Strukturhomologe der Antisigmafaktoren ChrR (*R. capsulatus* und *R. sphaeroides*) und RskA (*Mycobacterium tuberculosis*). Die Konfidenzwerte aller Analyseergebnisse betragen  $\geq 99,3\%$ . Die Strukturhomologe sind gemessen am Rang von höchster zu niedrigster Homologie sortiert. Es sind die Identitätswerte (ID) angegeben.**

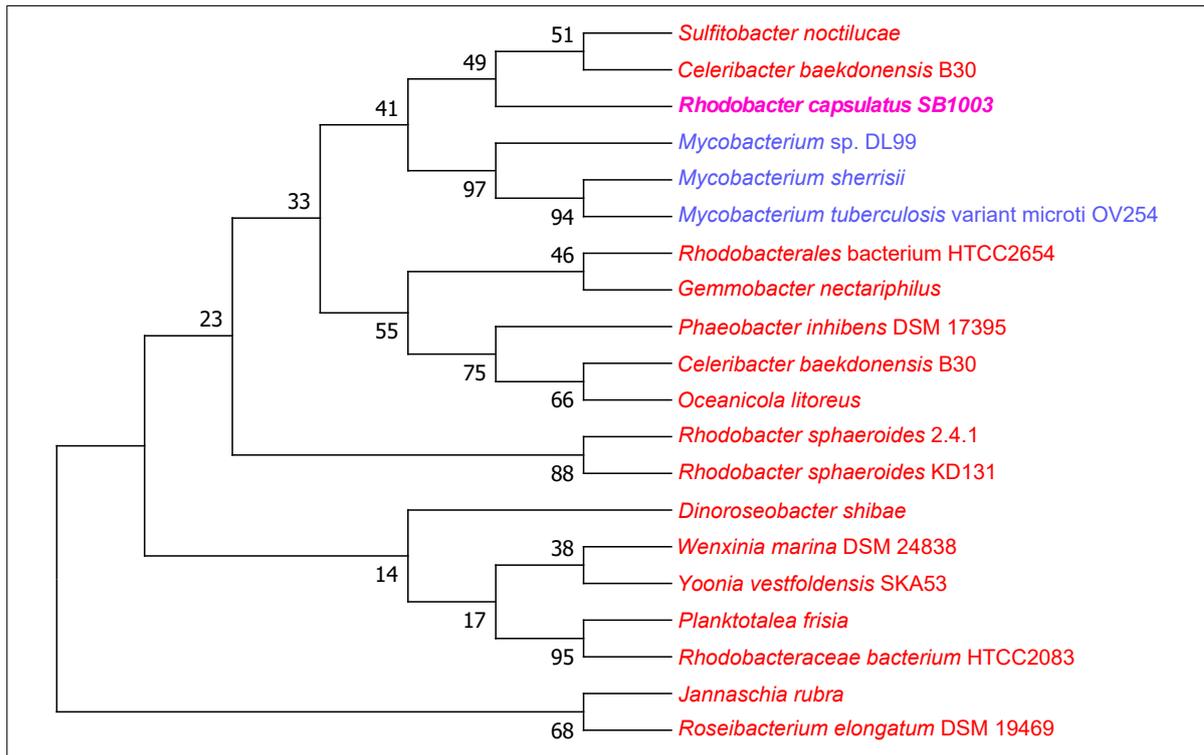
Rang	<i>R. capsulatus</i> ChrR	ID (%)	<i>R. sphaeroi-</i> <i>des</i> ChrR	ID (%)	<i>M. tuberculo-</i> <i>sis</i> RskA	ID (%)
1	<i>M.t.</i> RskA	24	<i>R.s.</i> ChrR	99	<i>M.t.</i> RskA	100
2	<i>R.s.</i> ChrR	13	<i>Marinobacter</i> <i>aquaeolei</i> ChrR	16	<i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> RsiW	9
3	<i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> RsiW	12	<i>Ralstonia</i> <i>eutropha</i> RmlC- ähnliches Cupin- Protein	23	<i>Streptomyces</i> <i>coelicolor</i> RsrA	15
4					<i>R.s.</i> ChrR	11
40			<i>M.t.</i> RskA	10		

Phylogenetische Analysen mit Aminosäuresequenzen spiegelten die Ergebnisse der PHYRE<sup>2</sup>-Analyse wider: In einem Maximum Likelihood-Baum auf Basis von *rpoE*-Sequenzen bildete *M. tuberculosis* die Schwestergruppe von *R. capsulatus* (Abb. 3.17). Ein solider Bootstrap-Wert von 80 unterstützte die Verwandtschaft der *rpoE*-Gene von *R. capsulatus* SB1003 und *M. tuberculosis variant microti* OV254.



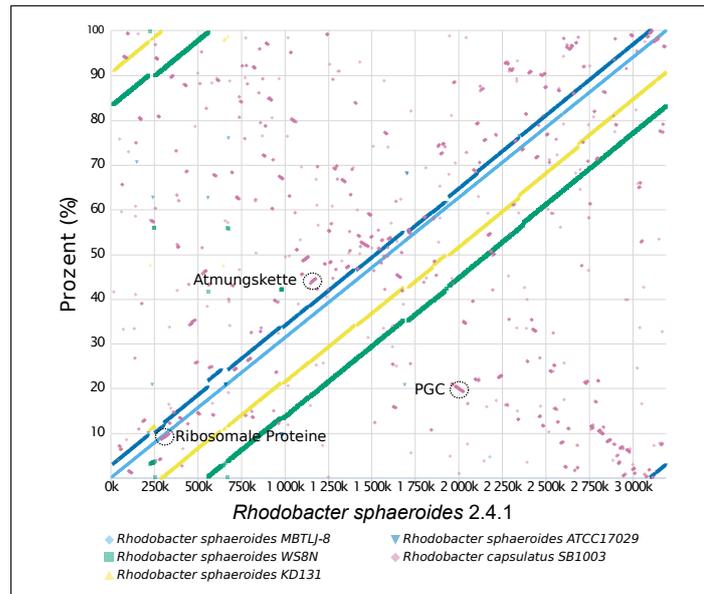
**Abbildung 3.17: Bootstrap Maximum Likelihood-Konsensusbaum auf Basis von *rpoE* mit *R. capsulatus* SB1003 (rosa), *Rhodobacteraceae* (rot) und *Mycobacterium* (blau). Zahlenwerte geben die Bootstrap-Werte für die jeweiligen Zweige an.**

Ein Maximum Likelihood-Baum mit *chrR* hingegen zeigte zwei *Rhodobacteraceae* (*Sulfitobacter noctilucae*, *Celeribacter baekdonensis* B30) als die nächsten Verwandten von *R. capsulatus* an. Jedoch waren mit *R. capsulatus* Mycobakterien auch hier näher verwandt als *R. sphaeroides* (Abb. 3.18). Im Unterschied zu *rpoE* waren die Bootstrap-Werte der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Kladen schwächer: von der *R. capsulatus*-Klade zur *Mycobacterium*-Klade betrug der Bootstrapwert 41, was in etwa doppelt so hoch war wie zur Klade von *R. sphaeroides* 2.4.1 (23).



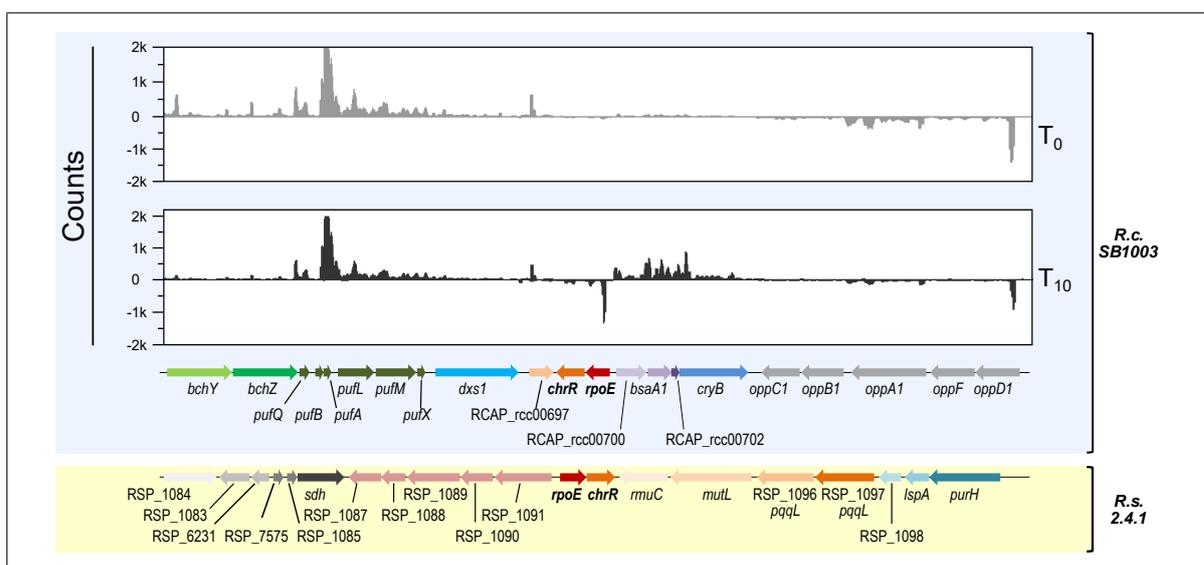
**Abbildung 3.18:** Bootstrap Maximum Likelihood-Konsensusbaum auf Basis von *chrR* mit *R. capsulatus* SB1003 (rosa), *Rhodobacteraceae* (rot) und *Mycobacterium* (blau). Zahlenwerte geben die Bootstrap-Werte für die jeweiligen Zweige an.

Die fehlende Syntänie basierend auf *rpoE* und *chrR* wies in diesem Kontext aber auf einen allgemeinen Umstand hin: Generell kolokalisieren nur wenige Gene ähnlich zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*, wie eine Microsynteny-Analyse via der EDGAR-Plattform zeigte (Abb. 3.19). Darunter fallen Gene, die z.B. ribosomale Untereinheiten oder Enzyme der Atmungskette kodieren. Im Gegensatz dazu zeigen andere *R. sphaeroides*-Stämme wie KD131 als eine Art Positivkontrollen eine überwiegend hohe Ähnlichkeit in der Syntänie zu *R. sphaeroides* 2.4.1. Bei der erwähnten SyntTax-Analyse mit 155 Taxa der *Rhodobacteraceae* war dabei die Syntänie des *rpoE-chrR*-Lokus in *R. capsulatus* einzigartig. Mit *chrR* kolokalisierten *pufQBALMX* und *bch*-Gene, *bsaA1* (Glutathionperoxidase), *cryB* (Cryptochrome/Photolyase) und zwei hypothetische Proteine (Abb. 3.20). Obwohl die Syntänie von *rpoE* und *chrR* in *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* unterschiedlich ist, zeigten RNA-Seq-Daten vor und nach 10 min photooxidativem Stress, dass in *R. capsulatus*, wie von *R. sphaeroides* bekannt, das *rpoE-chrR*-Transkriptlevel in *R. sphaeroides* ansteigt, im Detail mit einem  $\log_2$ -Wert von 3,7 nach 10 min photooxidativem Stress (Abb. 3.20, Tab. 3.3, Abb. A.1 auf S. 166).



**Abbildung 3.19: Syntänie-Plot mit *R. sphaeroides* 2.4.1 als Referenz, im Vergleich zu anderen *R. sphaeroides*-Stämmen und *R. capsulatus* SB1003**  
 Es ist die relative Position auf dem Chromosom eines zu vergleichenden Mikroorganismus (in %) gegen die Position auf dem *R. sphaeroides* 2.4.1-Chromosom dargestellt. Jeder Datenpunkt entspricht einem homologen Gen. Es sind Gencluster der Atmungskette, ribosomaler Untereinheiten und des photosynthetischen Gencluster (PGC) gekennzeichnet. Adaptiert nach Licht et al. (2020).

Bezüglich des RpoE-Regulons fällt auf, dass mehrere Homologe von diesem in *R. capsulatus* fehlen (Tab. 3.3). Es fehlen in *R. capsulatus* z.B. Homologe von RSP\_1087–1091, welche Proteine der Cyclopropanfettsäurephospholipidsynthase, Zucker-/Kation-Symporter oder eine kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase kodieren. Das gleiche gilt auch für RSP\_1409 (Beta-Ig-H3/Fasciclin) und RSP\_6222 (hypothetisches Protein). Unter den Homologen in *R. capsulatus* zeigten mehrere ein kaum verändertes Transkriptlevel unter  $^1\text{O}_2$ -Stress; anders als bei *cfaS* in *R. sphaeroides* fehlt ein signifikanter Anstieg von *rsmB1* (Cyclopropanfettsäurephospholipidsynthase), *cycA1* (Cytochrome  $c_2$ ) und *potH1* (Spermidine/Putrescin-ABC-Transporter). Abseits der regulatorischen Faktoren (*rpoE*, *chrR* und RpoH<sub>II</sub>) zeigten nur zwei Homologe des *R. sphaeroides*-RpoE-Regulons in *R. capsulatus* ebenfalls einen signifikanten Anstieg mit einem  $\log_2$ -Wert  $>2$ , nämlich eine DNA-Photolyase (*phrB*) und die GTP-Cyclohydrolase *folE2*. Da die Annotationen der *rpoH*-Gene in *R. capsulatus* in offiziellen Datenbanken verkehrt sind, wird zur besseren Übersicht hiermit hervorgehoben: In dieser Arbeit bezeichnet RCAP\_rcc00458 *rpoH<sub>II</sub>* und RCAP\_rcc002811 *rpoH<sub>I</sub>*. Analysen der Syntänie und Hemmhoftests mit *rpoH*-Knockoutstämmen stützen diese Zuordnung (Abschnitt 3.2.1.2).



**Abbildung 3.20: Syntanie von *rpoE* in *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* im Zusammenhang mit RNA-Seq-Daten von *R. capsulatus*.** Die RNA-Seq-Daten zeigen die Transkriptlevel (in Counts), welche gegen *rpoE* mitsamt der kolokalisierten Gene aufgetragen sind. Der obere Graph (grau) zeigt die Transkriptlevel unmittelbar vor Beginn des photooxidativen Stresses ( $T_0$ ), der untere Graph nach 10 min photooxidativen Stresses ( $T_{10}$ , schwarz). Gleiche Farben symbolisieren homologe Gene. Adaptiert nach Licht et al. (2020).

**Tabelle 3.3: Transkriptomveränderungen im *rpoE*-Regulon von *R. sphaeroides* nach photooxidativem Stress im Vergleich zu *R. capsulatus*.** Die  $\log_2$ -Werte zeigen die Veränderung im Vergleich zu  $T_0$ . Signifikanz der  $\log_2$ -Werte ist wie folgt indiziert: \* p-Wert < 0,05; \*\* p-Wert < 0,01; \*\*\* p-Wert < 0,001. Adaptiert nach Licht et al. (2020).

<i>R.s.-Gen</i>	Beschreibung	$\log_2$ (7 min) <sup>†</sup>	$\log_2$ (45 min) <sup>†</sup>	<i>R.c.-Gen</i> <sup>†</sup>	$\log_2$ (10 min)
RSP_1092	<i>rpoE</i>	2,2**	2,0***	RCAP_rcc00699	<i>rpoE</i>
RSP_1092	<i>chrR</i>	2,0**	2,2***	RCAP_rcc00698	<i>chrR</i>
RSP_2144	<i>cfaS</i>	1,4*	1,0***	RCAP_rcc00273	<i>rsmB1</i>
RSP_2143	<i>phrA</i>	1,6**	1,5***	RCAP_rcc02958	<i>phrB</i>
RSP_1091	(Mutmaßliches) Cyclopropan- oder Cyclopropanfettsäuresyntheseprotein	2,2***	2,0***	Kein Homolog	Kein Homolog
RSP_1090	(Mutmaßliches) Cyclopropan- oder Cyclopropanfettsäuresyntheseprotein	2,4	1,9***	Kein Homolog	Kein Homolog
RSP_1089	Zucker-/Kation-Symporter (GPH-Familie)	1,9*	1,8***	Kein Homolog	Kein Homolog
RSP_1088	Hypothetisches Protein	1,1	0,8*	Kein Homolog	Kein Homolog
RSP_1087	Kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase	0,9	0,7**	Kein Homolog	Kein Homolog
RSP_0601	<i>rpoH11</i>	2,0*	2,1*	RCAP_rcc00458	<i>rpoH11</i> <sup>§</sup>
RSP_1409	Beta-Ig-H3/Fascilin	2,8**	4,5*	Kein Homolog	Kein Homolog
RSP_1852	<i>foIE2</i>	2,2***	2,3***	RCAP_rcc01493	<i>foIE2</i>
RSP_0296	<i>cycA</i>	-0,3	0,5**	RCAP_rcc01240	<i>cycA1</i>
RSP_3336	Spermidin-/Putrescin-ABC-Transporter, innere Membran-Untereinheit	0,0	0,2	RCAP_rcc01895	<i>potH1</i>
RSP_6222	Hypothetisches Protein	0,1	0,3	Kein Homolog	Kein Homolog

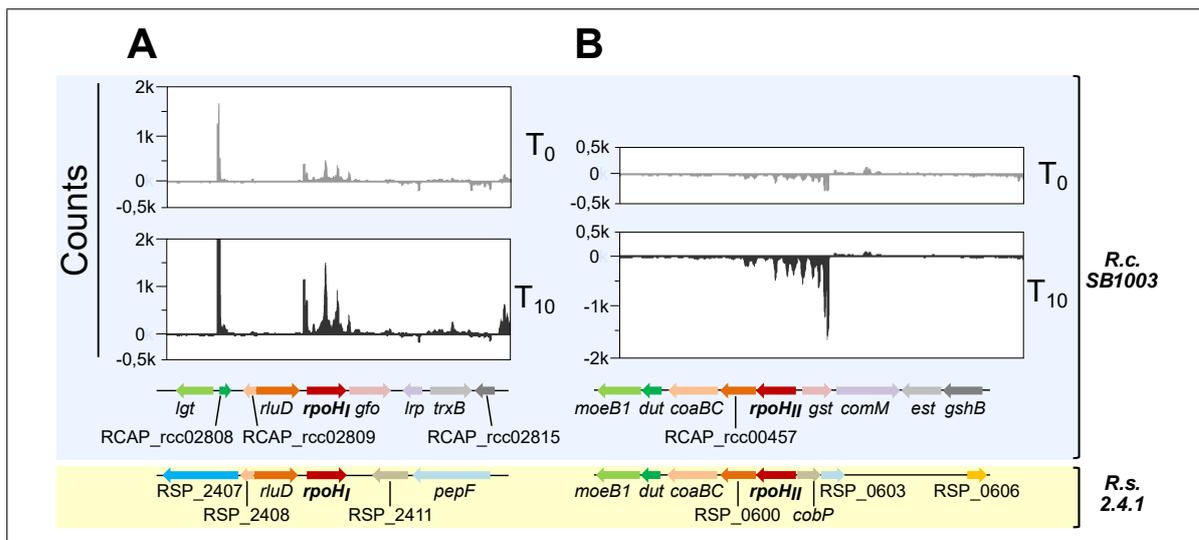
<sup>†</sup> *R. sphaeroides*-Daten wurden aus Berghoff et al. (2013) entnommen.

<sup>‡</sup> Homologe wurden entweder mittels pBLAST (30 % Aminosäureidentität) oder PHYRE<sup>2</sup> ermittelt.

<sup>§</sup> Als *rpoH1* in öffentlichen Datenbanken annotiert.

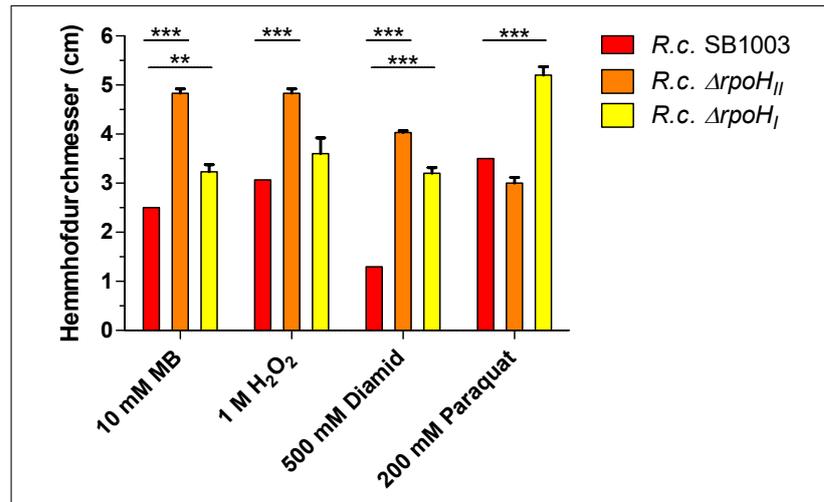
### 3.2.1.2 Regulation der $^1\text{O}_2$ -Antwort von *R. capsulatus* durch RpoH<sub>II</sub> und RpoH<sub>I</sub>

Ob RpoH<sub>II</sub> für die (photo-)oxidative Stressantwort in *R. capsulatus* eine ähnliche Funktion erfüllt wie in *R. sphaeroides*, wurde via RNA-Seq und Hemmhoftests analysiert. Zunächst wurde aber die Syntanie der *rpoH*-Gene untersucht, da sie die Zuordnung von RCAP\_rcc00458 als *rpoH<sub>II</sub>* und RCAP\_rcc02811 als *rpoH<sub>I</sub>* auch verdeutlicht (Abb. 3.21). Während *rluD* upstream von RpoH<sub>I</sub> in beiden Arten kolokalisiert, teilen sich beide Arten eine homologe Region downstream von RpoH<sub>II</sub>. Für die *rpoH*-Gene ist anders als zu *rpoE-chrR* der genetische Kontext teilweise konserviert.



**Abbildung 3.21: Syntanie von RpoH<sub>I</sub> (A) und RpoH<sub>II</sub> (B) in *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* im Zusammenhang mit RNA-Seq-Daten von *R. capsulatus*.** Die RNA-Seq-Daten zeigen die Transkriptlevel (in Counts), welche gegen RpoH<sub>I</sub> bzw. RpoH<sub>II</sub> mitsamt der kolokalisierten Gene aufgetragen sind. Der obere Graph (grau) zeigt die Transkriptlevel unmittelbar vor Beginn des photooxidativen Stresses (T<sub>0</sub>), der untere Graph (schwarz) nach 10 min photooxidativen Stresses (T<sub>10</sub>). Gleiche Farben symbolisieren homologe Gene. Adaptiert nach Licht et al. (2020).

Weiter wird diese Zuordnung der *rpoH*-Gene in *R. capsulatus* dadurch unterstützt, dass Hemmhoftests zeigten, dass für *R. capsulatus* im Vergleich zum Wildtyp der *rpoH<sub>II</sub>*-Knockout-Stamm  $\Delta rpoH_{II}$  sensitiver gegenüber  $^1\text{O}_2$ -Stress reagierte als der *rpoH<sub>I</sub>*-Knockout-Stamm  $\Delta rpoH_I$  (Abb. 3.22). Unter  $^1\text{O}_2$ -Stress zeigte  $\Delta rpoH_{II}$  Hemmhofdurchmesser von  $4,8 \pm 0,2$  cm, was fast das Doppelte im Vergleich zum Wildtyp war. Im Gegensatz dazu war  $\Delta rpoH_I$  gegenüber  $^1\text{O}_2$  zwar auch sensitiver als der Wildtyp, jedoch mit einem Hemmhofdurchmesser von  $3,2 \pm 0,3$  cm weniger sensitiv als  $\Delta rpoH_{II}$ . Unter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stress und Glutathiondepletion durch Diamid zeigte sich in den drei Stämmen die gleiche Rangfolge der Sensitivität. Bei durch Paraquat ausgelöstem  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Stress hingegen unterschied sich *R. capsulatus* SB1003 nicht signifikant von  $\Delta rpoH_{II}$ , wohl aber von  $\Delta rpoH_I$ , welcher hier den größten Hemmhofdurchmesser ( $5,2 \pm 0,3$  cm) aufwies.



**Abbildung 3.22: Hemmhoftest mit *R. capsulatus* und *rpoH*-Mutanten.** Dargestellt sind die Mittelwerte mitsamt Standardabweichungen (SD) der Hemmhoftestdurchmesser in cm ( $n = 3$ ). Nicht sichtbare Fehlerbalken beruhen auf zu geringen SD-Werten. Getestet wurden 10 mM Methylenblau (MB), 1 M Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), 500 mM Diamid und 200 mM Paraquat. Mittels zweifaktorieller ANOVA gefolgt von Bonferroni-Posttests wurden die Ergebnisse zwischen den Stämmen verglichen (\*\* p-Wert < 0,01; \*\*\* p-Wert < 0,001). Adaptiert nach Licht et al. (2020).

### 3.2.2 Kleine RNAs

Aus früheren Studien sind mehrere sRNAs bekannt, die in *R. sphaeroides* für die photooxidative Stressantwort eine Rolle spielen (Adnan et al. 2015; Berghoff et al. 2009; Eisenhardt et al. 2018). Die RNA-Seq-Analyse mit *R. capsulatus* zeigte auch hypothetische, durch  $^1O_2$  induzierte sRNAs, darunter die bereits validierte RCs01897 (downstream von RCAP\_rcc01897; Volk 2016). Letztere ist zusammen mit drei anderen sRNAs in Tab. 3.4 und Abb. A.2 (S. 166) aufgeführt, deren relativ hohe read counts ( $\sim 470$ –10000) sich unter  $^1O_2$ -Stress um > 50 % erhöhten. Tabelle 3.5 fasst die potentiellen Ziel-mRNAs dieser sRNAs zusammen, welche via der Online-Tools IntaRNA und TargetRNA2 ermittelt wurden (Busch et al. 2008; Kery et al. 2014; Mann et al. 2017; Raden et al. 2018; Wright et al. 2014).

**Tabelle 3.4: Mögliche sRNAs in *R. capsulatus*, deren Transkriptlevel dem RNA-Seq nach um mindestens 50 % erhöht wurden.**

sRNA	Position	Flankierende Gene		Länge (nt)
RCs01296	1346399–1346449	RCAP_rcc01268	RCAP_rcc01269	51
RCs01897	2048983–2049035	RCAP_rcc01897	RCAP_rcc01898	53
RCs02566	2755378–2755435	RCAP_rcc02565	RCAP_rcc02566	58
RCs02783	2970435–2970490	RCAP_rcc02783	RCAP_rcc02784	56

**Tabelle 3.5: Mögliche sRNA-Ziele in *R. capsulatus*.** Angezeigt sind die mit IntaRNA und TargetRNA2 vorhergesagten Ziel-mRNAs (inklusive des Rankings unter den möglichen Treffern).

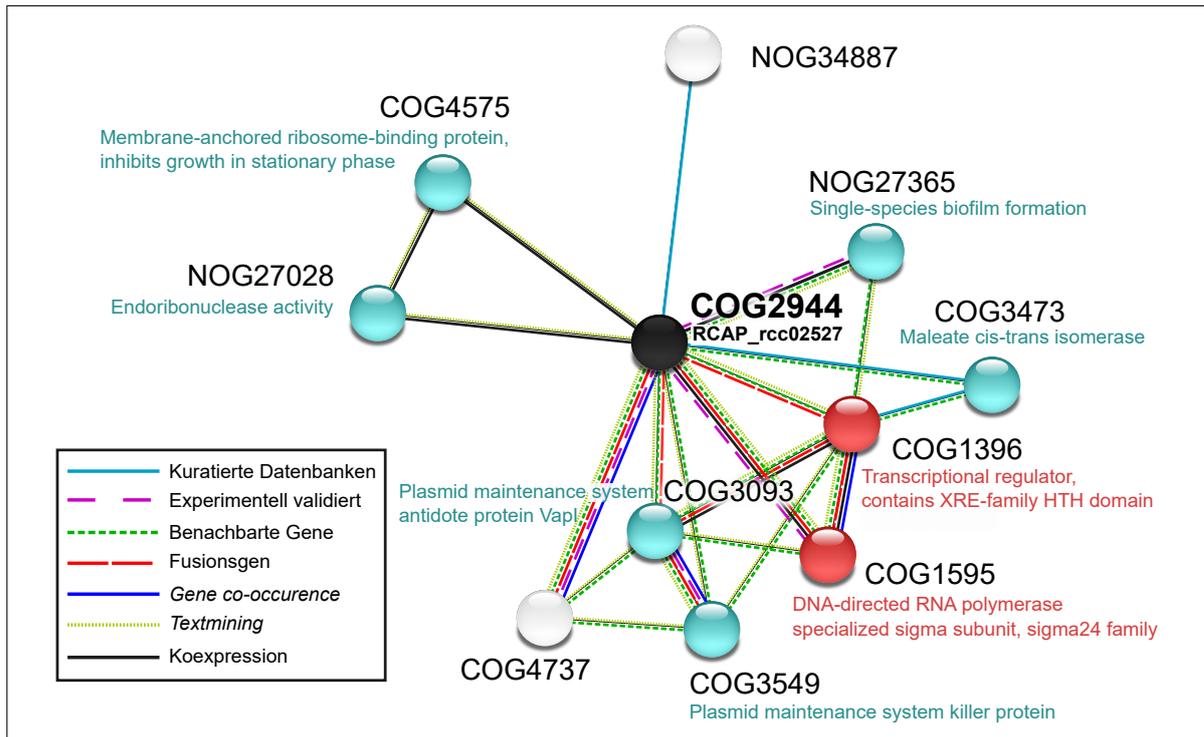
sRNA	Ziel-mRNA	Beschreibung	Energie (kcal mol <sup>-1</sup> )	Bindung (Position)		Tool (Rang)
				mRNA	sRNA	
RCs01296	RCAP_rcc00383	FAD-abhängige Oxidoreduktase	-17,99	37-61	7-33	IntaRNA (1)
	<i>livK2</i>	ABC-Transporter-Substratbindeprotein	-32,53	55-93	1-42	IntaRNA (16)
RCs01897	RCAP_rcc02527	Transkriptionsregulator (XRE-Familie)	-10,35	7-22	28-43	TargetRNA2 (1)
			-19,84	1-45	8-48	IntaRNA (1)
RCs02566	RCAP_rcc02285	Hypothetisches Protein	-21,37	97-139	3-49	IntaRNA (1)
RCs02783	RCAP_rcc02783	CoA-Bindedomänenprotein	-49,39	1-23	1-23	IntaRNA (1)
			-31,01	57-75	4-24	TargetRNA2 (1)

---

Bei der Suche nach möglichen Ziel-mRNAs gaben sowohl IntaRNA als auch TargetRNA2 als bestmögliche Treffer für RCs02783 RCAP\_rcc02783 an, womit RCs02783 als *cis*-kodierte sRNA binden würde. RCAP\_rcc02783 kodiert ein Protein mit CoA-Bindedomäne.

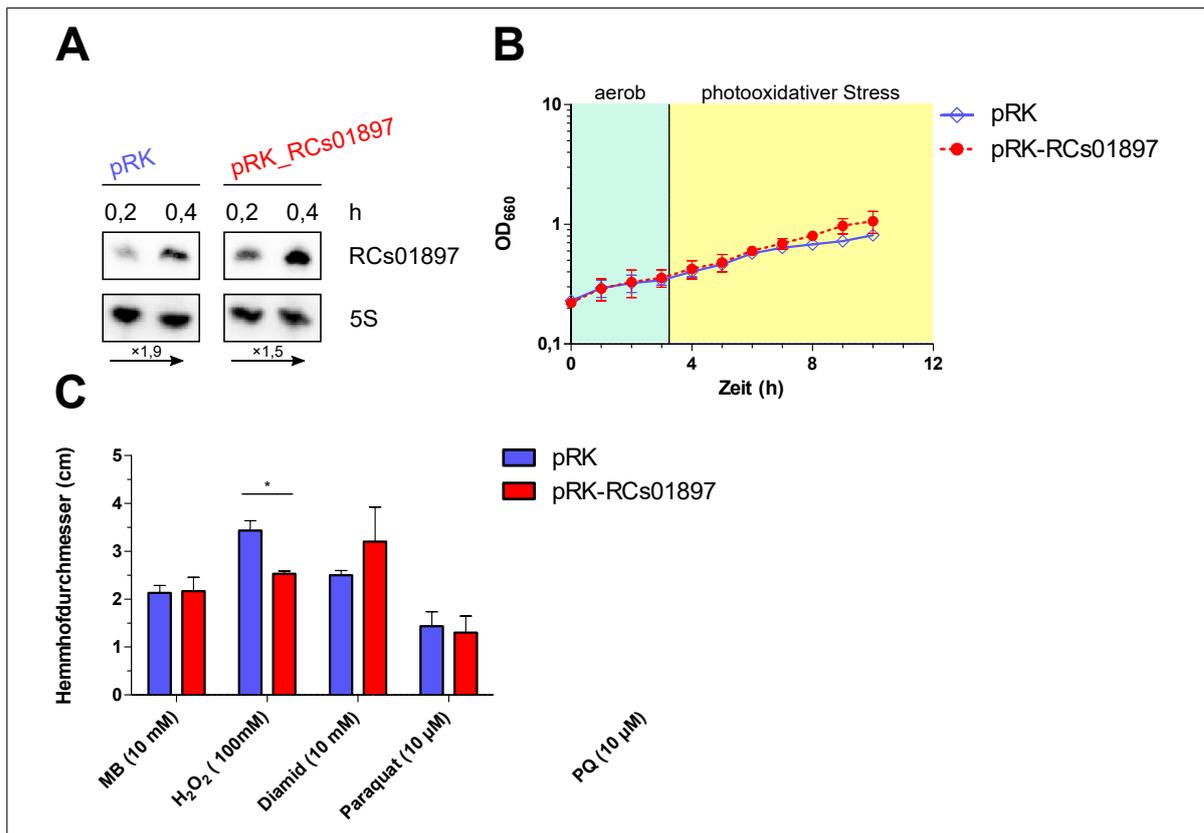
Ein mögliches Ziel von RCs01296 ist die FAD-abhängige Oxidoreduktase RCAP\_rcc00383, welche via IntaRNA als bestmöglicher Treffer ausgemacht wurde. RCAP\_rcc00383 synthetisiert mit Iminoglycin einen Vorläufer von Thiamin. Ein anderes mögliches Ziel wäre *livK2*, welches der ranghöchste Treffer bei der TargetRNA2-Analyse war und bei der IntaRNA-Analyse mit Platz 16 (von 100) ebenfalls eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit als Ziel aufwies. Es handelt sich mit *livK2* um eine Substratbindeeinheit eines ABC-Transporters für verzweigtkettige Aminosäuren (Leucin, Isoleucin, Valin).

Für RCs02566 und RCs01897 konnten via TargetRNA2 keine Ziele ermittelt werden. In der IntaRNA-Analyse war der ranghöchste Treffer für RCs02566 ein hypothetisches Protein (RCAP\_rcc02285). Für RCs01897 gab IntaRNA die mRNA von RCAP\_rcc02527 (YiaG) als ranghöchstes Ziel an, es handelt sich um einen möglichen Transkriptionsfaktor der XRE-Familie. In der Protein-Protein-Interaktionsdatenbank STRING waren keine Interaktionen und damit mögliche Bindungspartner von RCAP\_rcc02527 gezeigt. Über die Aminosäuresequenz von RCAP\_rcc02527 konnte allerdings das Cluster of Orthologous Groups COG2944 ausgemacht werden, um darüber mögliche Interaktionspartner zu finden (Abb. 3.23). Ungeachtet benachbarter oder koexpressierter Gene sind dabei besonders Gene interessant, deren Interaktion durch kuratierte Datenbanken oder Experimente bewiesen wurde. Insofern könnte RCAP\_rcc02527 Gene in *R. capsulatus* mit folgenden Funktionen regulieren: Biofilmformation, Maleat *cis-trans*-Isomerisierung sowie Repression eines Toxin-Antitoxin-Systems.



**Abbildung 3.23: Mögliche Ziele des XRE-Transkriptionsfaktors RCAP\_rcc02527.** Ausgehend von der Aminosäuresequenz von RCAP\_rcc02527 wurde in der STRING-Datenbank eine Funktion nach COG (Cluster of Orthologous Groups) dem Protein zugewiesen; von diesem COG sind andere assoziierte COGs bzw. NOGs (Nonsupervised Orthologous Groups) dargestellt. Siehe Legende für die Art der Assoziation („Textmining“ bezeichnet eine automatisierte Suche auf PubMed, in welcher zwei COGs häufig zusammen genannt werden). Sofern bekannt, sind die Funktionen der COGs angegeben.

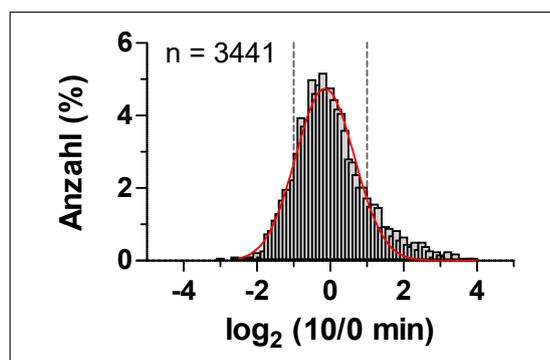
Physiologische Untersuchungen sollten die Wirkungsweise von RCs01897 mittels des Überexpressionsstamms SB1003 pRK\_RCs01897 (RCs01897 unter Kontrolle des 16S rRNA Promotors von *R. sphaeroides*) näher charakterisieren (Abb. 3.24). Im Vergleich zur Leervektorkontrolle zeigte SB1003 pRK\_RCs01897 neben einem höheren Transkriptlevel von RCs01897 auch ab 4 h photooxidativem Stress eine kürzere  $t_d$  ( $4:11 \text{ h} \pm 28 \text{ min}$  anstatt  $5:07 \text{ h} \pm 6 \text{ min}$ ). In Hemmhöftests zeigte eine ANOVA mit Post-Bonferroni-Tests, dass unter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stress SB1003 pRK\_RCs01897 signifikant kleinere Hemmhöfe als die Leervektorkontrolle bildete ( $2,5 \pm 0,1 \text{ cm}$  gegen  $3,4 \pm 0,2 \text{ cm}$ ). Keine signifikanten Unterschiede zeigten die Stämme bei den Stressoren MB ( $^1\text{O}_2$ ), Diamid (Glutathionschwund) und Paraquat ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ).



**Abbildung 3.24: Auswirkungen einer konstitutiven RCs01897-Überexpression in *R. capsulatus*.** Die Überexpression (pRK\_RCs01897) wurde mit einer Leervektorkontrolle (pRK) verglichen (n = 3). **(A)** Transkriptlevel von RCs01897 im Vergleich zur Ladekontrolle (5S) zu den OD<sub>660</sub> 0,2 und 0,4. **(B)** Wachstum unter aeroben Bedingungen/photooxidativem Stress, dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (SD). **(C)** Hemmhoftests, dargestellt sind die Mittelwerte mitsamt SD der Hemmhofdurchmesser in cm. Getestet wurden 10 mM Methylenblau (MB), 100 mM Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 10 mM Diamid und 10  $\mu$ M Paraquat. Nicht sichtbare Fehlerbalken beruhen auf zu geringen SD. Ein signifikanter Unterschied ist gekennzeichnet (\* p-Wert < 0,05). Die Versuche wurden von Vanessa Bolduan durchgeführt (Bolduan 2018).

### 3.3 Funktionelle Antwort des Transkriptoms auf $^1\text{O}_2$

Um die Antwort von *R. capsulatus* auf transkriptioneller Ebene zu charakterisieren, wurde in biologischen Triplikaten eine RNA-Seq mit Proben vor ( $T_0$ ) und nach 10 min ( $T_{10}$ ) photooxidativem Stress durchgeführt. Vor dieser Arbeit erfolgte dabei die Probennahme und -vorbereitung (Volk 2016) sowie die RNA-Seq-Analyse am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig (Licht et al. 2020). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Analyse der RNA-Seq-Ergebnisse. Mittels einer DESeq2-basierten Analyse wurden Unterschiede im Transkriptlevel der mRNAs quantifiziert. Die Änderung der einzelnen Transkriptlevel wurden als  $\log_2$ -Werte von 10/0 min festgehalten. Die Rohdaten sowie eine Zusammenfassung der DESeq2-Analyse sind online verfügbar auf der NCBI Gene Expression Omnibus-Plattform, GEO Serien-Nr. GSE134200. Eine modellierte Gaußverteilung (Abb. 3.25) via nichtlinearer Regression mit den 3441 quantifizierten Transkripten zeigte für die  $\log_2$ -Werte einen Mittelwert bei  $-0,09 \pm 0,25$  ( $R^2 = 0,97$ ).

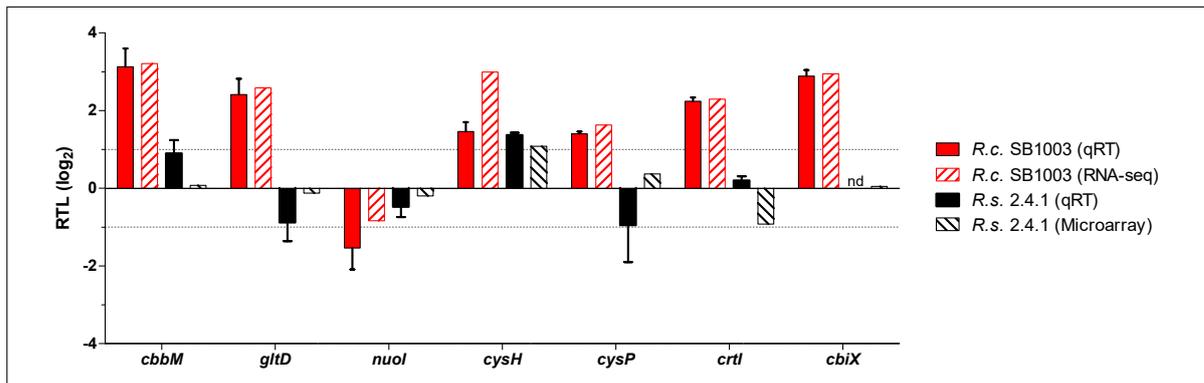


**Abbildung 3.25:** Verteilung von  $^1\text{O}_2$ -induzierten  $\log_2$ -Veränderungen im Transkriptom von *R. capsulatus* (10/0 min  $^1\text{O}_2$ -Stress). Aufgetragen ist die relative Anzahl der Transkripte (in %) gegen die jeweiligen  $\log_2$ -Werte. Die Verteilungsfunktion (basierend auf nichtlinearer Regression) ist in rot eingezeichnet.

Korrelationsanalysen und PCA bestätigten die Reproduzierbarkeit der biologischen Triplikate: Der Pearson-Korrelationskoeffizient  $r$  nahm Werte von 0,985–0,995 an ( $p < 0,001$ ) und dem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  nach erklärten die Regressionsgeraden stets  $> 97,1\%$  der Daten (Abb. A.3). In der PCA gruppieren sich die Replikate entlang der ersten Dimension nach den Probennahmezeitpunkten (Abb. A.4).

Die vorliegenden RNA-Seq-Daten wurden mit Microarray-Daten von *R. sphaeroides* einer früheren Studie (Berghoff et al. 2013) verglichen. Im Gegensatz zu der RNA-Seq-Analyse mit *R. capsulatus* ist für die *R. sphaeroides*-Daten zu beachten, dass (1) die Microarray-Methode im Vergleich eine geringere Sensitivität und Abdeckung des Transkriptoms bietet (Kukurba und Montgomery 2015), (2) *R. sphaeroides* für 7 min (statt 10 min) photooxidativ gestresst wurde und (3) *R. sphaeroides* in biologischen Duplikaten untersucht wurde.

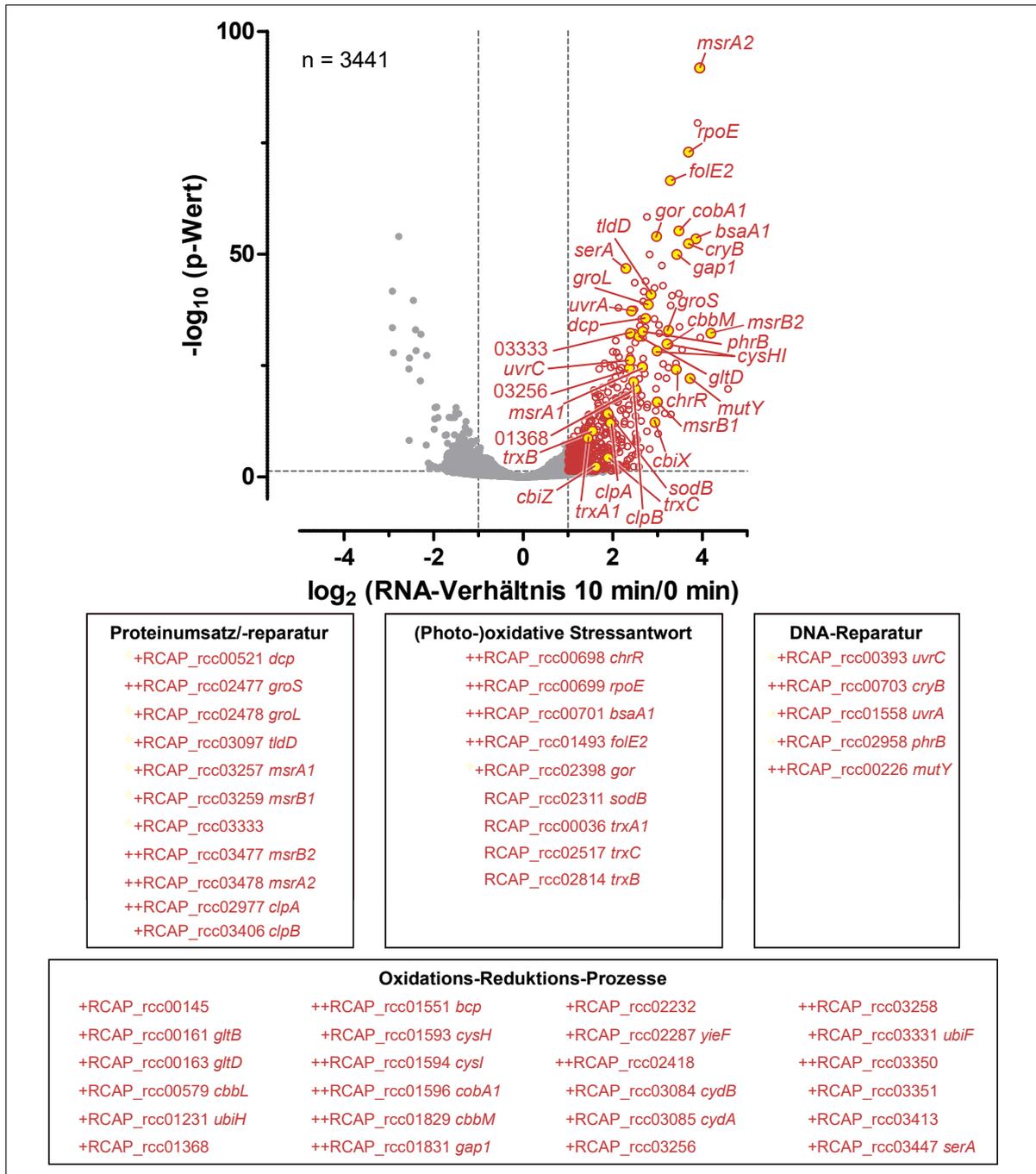
Die Ergebnisse des RNA-Seq spiegeln sich in qRT-PCRs mit *Rhodobacter*-Proben vor und nach 10 min photooxidativem Stress wider (Abb. 3.26). Mehrere untersuchte Gene demonstrierten nur in *R. capsulatus* höhere relative Transkriptlevel (RTL)  $\geq 1$ , nämlich *cbbM*, *gltD*, *cysP* und *crtI*. Dies trifft auch auf *cbiX* zu; in *R. sphaeroides* konnten drei verschiedene Primerpaare unter verschiedenen Konzentrationen und Annealingtemperaturen *cbiX* nicht nachweisen, vermutlich aus Mangel an Transkript unter aeroben Bedingungen.



**Abbildung 3.26: Relative Transkriptlevel (RTL) ausgewählter Gene in *Rhodobacter* nach Beginn photooxidativen Stresses.** Die RTL wurden in Relation zu ungestressten Kontrollen von *R. capsulatus* SB1003 und *R. sphaeroides* 2.4.1 bestimmt. Zum Vergleich gezeigt sind die RNA-Seq-Daten (*R. capsulatus*) sowie Microarray-Daten (*R. sphaeroides*; Berghoff et al. 2013). Die qRT-PCR (qRT)-Daten stellen die Mittelwerte biologischer Triplikate dar, die dazugehörigen Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. In *R. sphaeroides* konnten keine *cbiX*-Transkripte detektiert werden. Adaptiert nach Licht et al. (2020).

Insgesamt zeigten 471 Gene einen signifikanten Anstieg im Transkriptlevel mit  $\log_2$ -Werten von  $\geq 1$ . Die GO-Terme der 100 am stärksten akkumulierten Transkripte wurden verwendet, um in einer Analyse mit dem Biological Networks Gene Ontology Tool (BiNGO)-Plugin des Programms Cytoscape die signifikant angereicherten funktionellen Gruppen zu ermitteln. Abbildung 3.27 stellt diese Gruppen mitsamt ihren Genen dar.

*R. capsulatus* akkumulierte besonders Transkripte des Proteinumsatzes bzw. der Proteinreparatur. Die elf Transkripte dieser Gruppe kodierten die Methioninsulfoxidreduktasen *msrA1* und *msrB1* (und ihre Paraloge), Chaperone (*groS*, *groL*) sowie Proteasen bzw. Peptidasen (*dcp*, *tldD*, RCAP\_rcc03333, *clpA*, *clpB*). Neun Transkripte reicherten die funktionellen Gruppen der photooxidativen Stressantwort an, fünf Transkripte die der DNA-Reparatur. Bei den Transkripten der photooxidativen Stressantwort zeigten vier  $\log_2$ -Werte über 3, darunter *rpoE*, *chrR*, die Peroxidase *bsaA1* und die RpoE-abhängige GTP-Cyclohydrolase *folE2*. Die Glutathiondisulfidreduktase *gor* steigerte ihre Transkriptabundanz um über zwei  $\log_2$ -Stufen, während die Superoxiddismutase *sodB* sowie drei Thioredoxine (*trxA1*, *trxC*, *trxB*) im Bereich von einer  $\log_2$ -Stufe in ihrer Abundanz anstiegen.



**Abbildung 3.27: Funktionelle Charakterisierung von Transkripten mit erhöhter Abundanz nach 10 min photooxidativem Stress in *R. capsulatus*.** In biologischen Triplikaten wurden die Abundanzveränderungen via RNA-Seq bestimmt. Der Volcano-Plot zeigt von allen erfassten Transkripten die p-Werte (als negative  $\log_{10}$ ) gegen die  $\log_2$ -Werte der Abundanzveränderungen von 10 min gegen 0 min. Graue Linien stellen Grenzwerte dar: die horizontale für statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ), die vertikalen für  $\log_2$ -Werte  $\leq -1$  bzw.  $\geq 1$ . Ausgewählte Transkripte sind hervorgehoben (Nummern beziehen sich auf Genloci). Über die GO-Terme der 100 am stärksten induzierten Transkripte wurden funktionell angereicherte Gruppen bestimmt (Kästen unten), + und ++ indizieren Transkripte mit  $\log_2$ -Werten  $\geq 2$  bzw.  $\geq 3$ . Adaptiert nach Licht et al. (2020).

Transkripte mit Funktion in der DNA-Reparatur waren angereichert, darunter die Photolyasen *phrB* und *cryB*, die A/G-spezifische Adeninglycosylase *mutY* sowie Transkripte des *uvrABC*-Komplexes

Vielen anderen GO-Termen übergeordnet ist der Term Oxidations-Reduktions-Prozesse, womit viele der untersuchten Transkripte diese Gruppe signifikant (und funktionell vielfältig) anreicherten. *R. capsulatus* akkumulierte v.a. Transkripte verschiedener Biosynthesewege, z.B. für Antibiotika (RCAP\_rcc01368), Cytochrome (RCAP\_rcc03256) und auch für Aminosäuren wie Glutamat (*gltD*), Methionin und Cystein (*cysHI*) oder Serin (*serA*). Es stiegen die Transkriptlevel zweier Enzyme der Kohlenstofffixierung um einen  $\log_2$ -Wert von  $> 3$ , nämlich *gap1* und *cbbM*. Ähnlich stark angereichert waren die Uroporphyrin-III C-Methyltransferase *cobA1* ( $\log_2$ -Wert = 3,48) und *cbiX* ( $\log_2$ -Wert = 2,95; fällt nicht unter Oxidations-Reduktions-Prozesse), welche an der Biosynthese von Sirohäm beteiligt sind. Bezüglich der *cbi*-Gene fällt auch der Anstieg der Abundanz von *cbiZ* ( $\log_2$ -Wert = 1,52) auf, wenngleich dieser nicht so stark wie der von *cbiX* ist.

Mit Blick auf die stabilen Carotinoid-Level von *R. capsulatus* (siehe Abb. 3.6) ist erwähnenswert, dass fast keine Transkripte der Carotinoidbiosynthese angestiegen waren. Eine Ausnahme bildet das *tspO-crtI*-Operon, im Detail stiegen die Transkriptlevel hier wie folgt: *crtI* 2,29  $\log_2$ -Stufen, *crtB* 2,00  $\log_2$ -Stufen und *tspO* 1,25  $\log_2$ -Stufen (siehe RNA-Seq-Daten unter GEO Serien-Nr. GSE134200 auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>).

Ergänzend zu den qRT-PCR- und RNA-Seq-Ergebnissen zeigten Reporteranalysen mit *msrB2*, *macA* *cbbL* und *phrB* – einige der stärker akkumulierten Transkripte – dass  $H_2O_2$  nur für *msrB2* eine erhöhte Promotoraktivität auslöste (siehe Abb. A.5 auf S. 168).

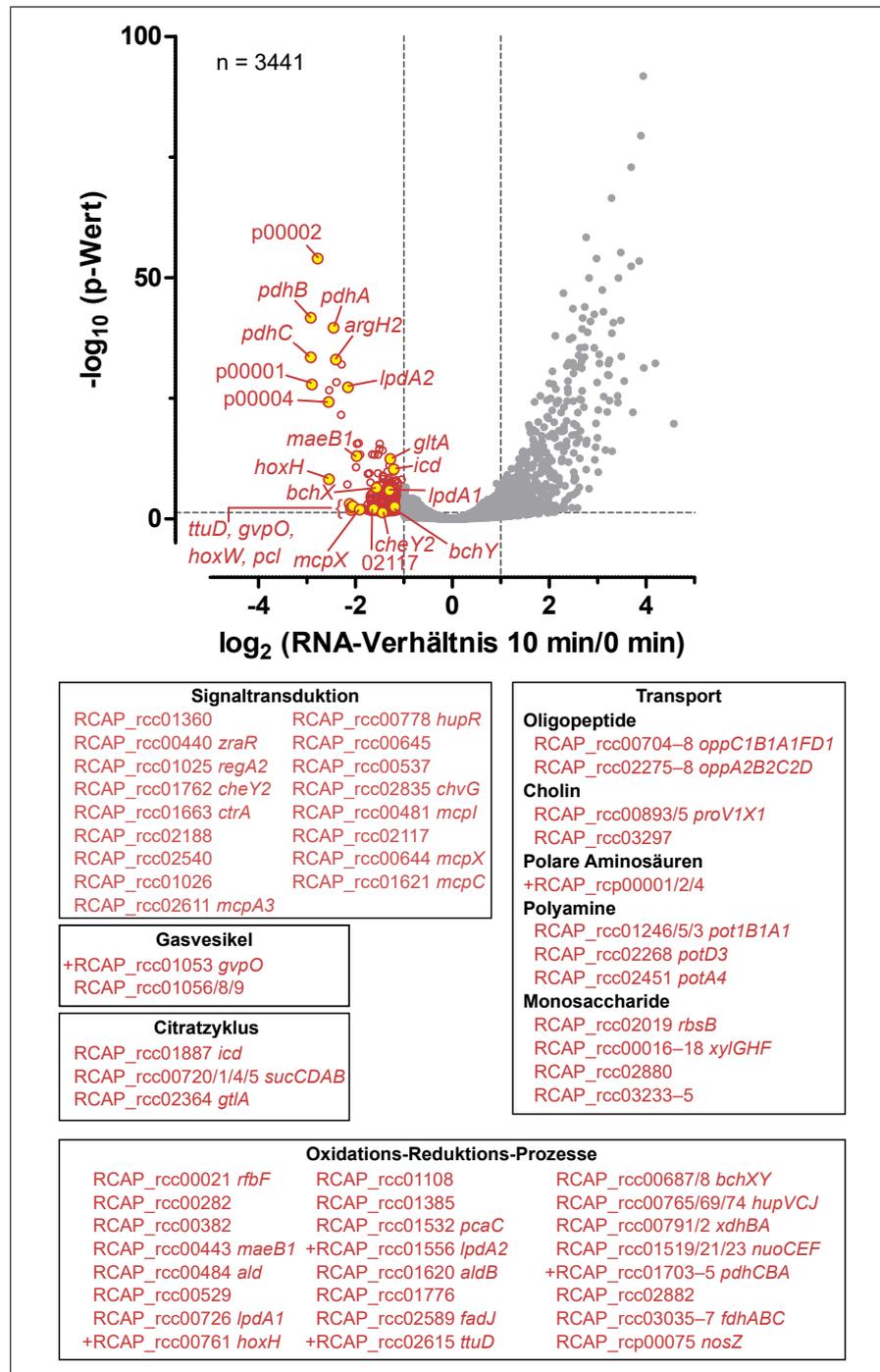
Da die 100 am stärksten gesunkenen Transkriptlevel keine abgenommenen GO-Terme in der BiNGO-Analyse aufzeigten, wurden alle 316 signifikant verringerten Transkriptabnahmen ( $\log_2$ -Wert  $\leq -1$ ) analysiert. Damit zeigt Abb. 3.28 Abnahmen von Transkripten in neun GO-Termen. Im Vergleich zu den Zunahmen waren bei den Abnahmen die absoluten  $\log_2$ -Werte kleiner.

Nur acht Transkripte sanken um  $\log_2$ -Werte  $\leq -2$ , darunter RCAP\_rcp00001, RCAP\_rcp00002 und RCAP\_rcp00004, welche für Proteine des Transports polarer Aminosäuren kodieren. Überhaupt zählten 28 Transkripte zu signifikant verringerten GO-Termen für Transportprozesse, speziell solche für Oligopeptide, Cholin, Polyamine und Monosaccharide. Siebzehn Transkripte mit GO-Termen der Signaltransduktion sanken in ihrer Abundanz, wobei mehrere dieser Gene wie z.B. *mcpX*, *cheY2* oder RCAP\_rcc02117 auch Proteine der GO-Terme Chemotaxis und Bewegungsprozesse kodieren. Der GO-Term für Gasvesikelorganisation verringerte sich mit vier Transkripten, darunter z.B. *gvpO* mit einem  $\log_2$ -Wert von  $-2,05$ . Ebenfalls waren Transkripte des Citratzyklus signifikant verringert, wie etwa die Citratsynthese *gltA* oder die Isocitrate-Dehydrogenase *icd*.

Es nahmen 34 Transkripte des GO-Terms für Oxidations-Reduktions-Prozesse in ihrer

Abundanz ab. Neben *bchXY* (BChl *a*-Biosynthese) fallen hier die Transkripte mit  $\log_2$ -Werten von  $< -2$  auf, darunter die Hydroxypyruvatreduktase *ttuD* sowie die Hydrogenase *hoxH*. Ergänzend zu letzterem fiel auch der Hydrogenase Maturation Factor *hoxW* in seiner Abundanz (zählt nicht zum GO-Term Oxidations-Reduktions-Prozesse). Die übrigen vier gesunkenen Transkriptlevel mit  $\log_2$ -Werten  $< -2$  gehörten Genen der Acetyl-CoA-Produktion, nämlich *lpdA2* (Dihydrolipoyl-Dehydrogenase) und Komponenten der Pyruvat-Dehydrogenase (*pdhCBA*). Überhaupt kodierten viele der abgenommenen Transkripte Proteine, die Pyruvat oder Stoffwechselprodukte des Citratzyklus synthetisieren bzw. in diesen einschleusen. Zum Beispiel sanken die Transkriptlevel einer weiteren Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (*lpdA1*), des Pyruvatproduzenten *maeB1* und (außerhalb der Oxidations-Reduktions-Prozesse) des Fumaratproduzenten *arghH2*.

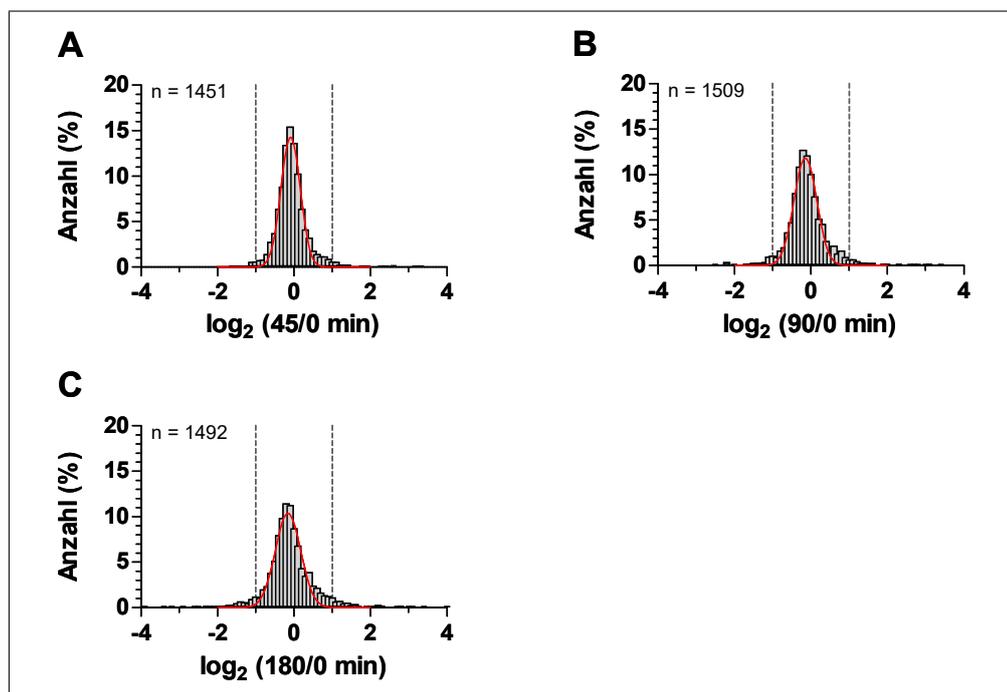
Ungeachtet der GO-Terme fällt das stark gesunkene Transkriptlevel der 4-Coumarat-CoA-Ligase *pcl* auf ( $\log_2$ -Wert  $-2,08$ ). Über *pcl* wird das Photoactive Yellow Protein (PYP) aktiviert, wobei dessen Abundanz auf Proteinebene auch signifikant abnahm (siehe dazu auch später Abb. 3.33 auf S. 106 und Abb. 3.34 auf S. 108).



**Abbildung 3.28: Funktionelle Charakterisierung von Transkripten mit verringerter Abundanz nach 10 min photooxidativem Stress in *R. capsulatus*.** In biologischen Triplikaten wurden die Abundanzveränderungen via RNA-Seq bestimmt. Der Volcano-Plot zeigt von allen erfassten Transkripten die p-Werte (als negative  $\log_{10}$ ) gegen die  $\log_2$ -Werte der Abundanzveränderungen von 10 min gegen 0 min. Graue Linien stellen Grenzwerte dar: die horizontale für statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ), die vertikalen für  $\log_2$ -Werte  $\leq -1$  bzw.  $\geq 1$ . Ausgewählte Transkripte sind hervorgehoben (Nummern beziehen sich auf Genloci). Über die GO-Terme der Transkripte wurden abgenommene funktionelle Gruppen bestimmt (Kästen unten), + indiziert Transkripte mit  $\log_2$ -Werten  $\leq -2$ .

### 3.4 Funktionelle Antwort des Proteoms auf $^1\text{O}_2$

Mittels LC-MS/MS wurden in *R. capsulatus* Proteinabundanzwerte untersucht, und zwar unmittelbar vor photooxidativem Stress ( $T_0$ ) und 45, 90 und 180 min danach ( $T_{45}$ ,  $T_{90}$ ,  $T_{180}$ ). Die Veränderungen der Proteinabundanzwerte im Vergleich zu  $T_0$  wurden als  $\log_2$ -Werte festgehalten. Abbildung 3.29 zeigt, dass von ca. 1400–1500 quantifizierten Proteinen die  $\log_2$ -Werte sich im Bereich zwischen  $-4$  und  $+4$  verteilten. Eine modellierte Gaußverteilung via nichtlinearer Regression mit den  $\log_2$ -Werten der einzelnen Zeitpunkte zeigte Mittelwerte um 0:  $T_{45}$ :  $-0,09 \pm 0,25$ ;  $T_{90}$ :  $-0,15 \pm 0,30$ ;  $T_{180}$ :  $-0,16 \pm 0,33$ . Dem  $R^2$  nach konnten die berechneten Verteilungsfunktionen stets  $> 95\%$  der Daten erklären.

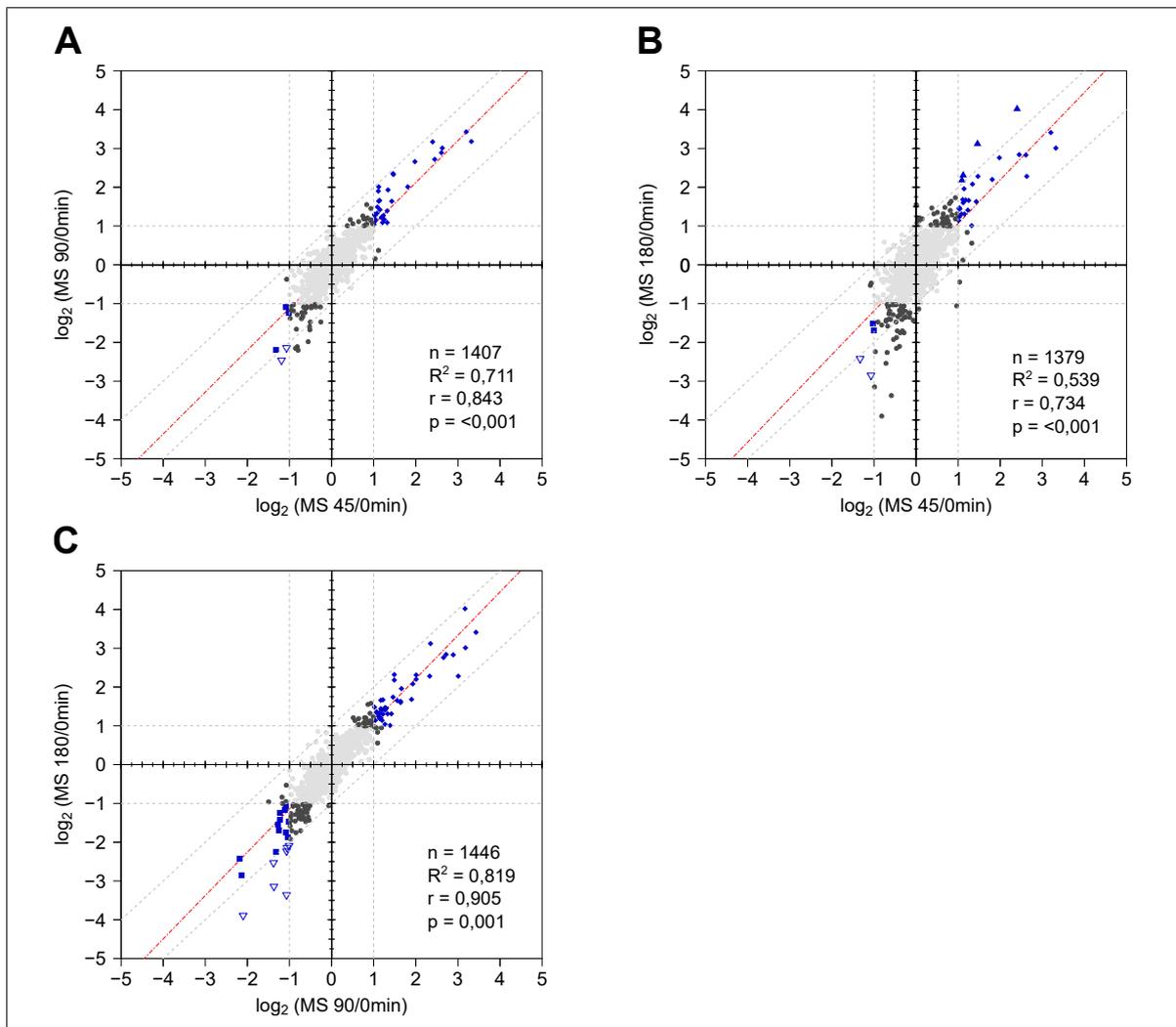


**Abbildung 3.29:** Verteilung von  $^1\text{O}_2$ -induzierten  $\log_2$ -Veränderungen im Proteom von *R. capsulatus*. Gezeigt sind die Verteilungen für 45 min (A), 90 min (B) und 180 min (C)  $^1\text{O}_2$ -Stress, jeweils in Relation zu  $T_0$ . Dargestellt ist die relative Anzahl der Proteine (in %) gegen die jeweiligen  $\log_2$ -Werte. Die Verteilungsfunktionen (basierend auf nichtlinearen Regressionen) sind in rot eingezeichnet.

Korrelationsanalysen und PCA bestätigten die Reproduzierbarkeit der biologischen Triplikate: In allen Zeitpunkten nahmen die Pearson-Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) Werte  $> 0,968$  an ( $p < 0,001$ ) und die Regressionsgeraden konnten den  $R^2$ -Werten nach 93,6–99,0% der Daten erklären (Abb. A.6 auf S. 169). In der PCA gruppierten sich die Replikate entlang der ersten Dimension nach dem Probenahmezeitpunkt (Abb. A.4 auf S. 168).

Weitere Korrelationsanalysen mit den durchschnittlichen  $\log_2$ -Werten der einzelnen Zeitpunkte untersuchten, wie stark  $T_{45}$ ,  $T_{90}$  und  $T_{180}$  miteinander korrelierten (alle  $p < 0,001$ ; Abb. 3.30). Der Pearson-Korrelationskoeffizient  $r$  betrug zwischen  $T_{90}$  und

$T_{45}$  0,843 ( $R^2 = 71,1\%$ ); zwischen  $T_{180}$  und  $T_{90}$  betragen  $r$  0,905 und  $R^2$  81,9%. Die Korrelation zwischen  $T_{45}$  und  $T_{180}$  war am geringsten ( $r = 0,734$  und  $R^2 = 53,9\%$ ).

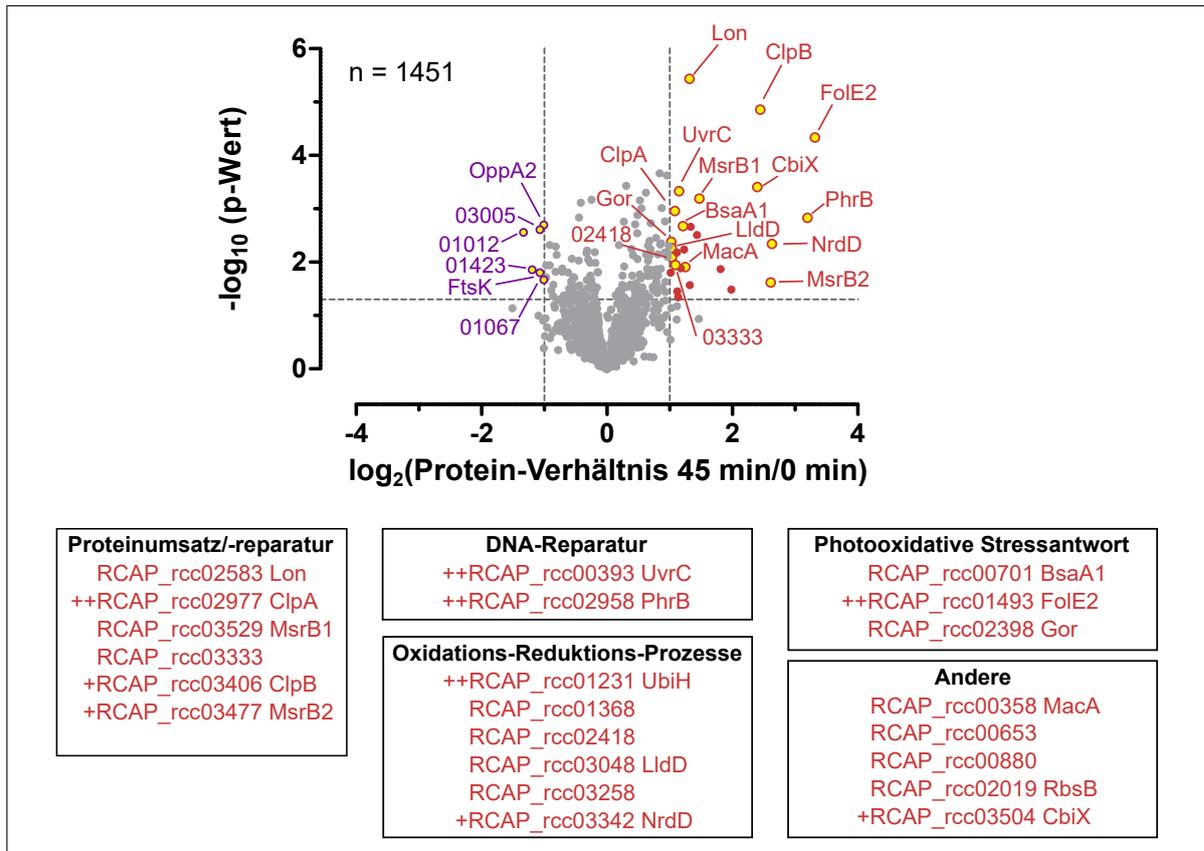


**Abbildung 3.30: Korrelation zwischen LC-MS/MS-Daten verschiedener Zeitpunkte unter  $^1O_2$ -Stress in *R. capsulatus*.** Es sind die  $\log_2$ -Werte der einzelnen Proteine wie folgt aufgetragen: **(A)** 90 min gegen 45 min, **(B)** 180 min gegen 45 min und **(C)** 180 min gegen 90 min. Die Anzahl ( $n$ ), der Determinationskoeffizient ( $R^2$ ) und der Pearson-Korrelationskoeffizient ( $r$ ) mitsamt dessen  $p$ -Wert sind angegeben. Die grauen horizontalen und vertikalen Linien zeigen Grenzwerte für  $\log_2$ -Werte  $\leq -1$  bzw.  $\geq 1$ . Genprodukte zwischen den diagonalen grauen Linien haben vergleichbar starke  $\log_2$ -Werte in beiden Zeitpunkten. Die Ausgleichsgerade (---) ist eingezeichnet. Wenn  $\log_2$ -Werte  $\geq 1$  den Anstieg eines Genprodukts definieren und solche  $\leq -1$  eine Abnahme, sind die Datenpunkte wie folgt indiziert: Weder Anstieg noch Abnahme in einem Zeitpunkt ( $\circ$ ), Anstieg oder Abnahme zu nur einem Zeitpunkt ( $\bullet$ ), Anstieg oder Abnahme in beiden Zeitpunkten ( $\blacklozenge$ ,  $\blacksquare$ ), Anstieg oder Abnahme in beiden Zeitpunkten mit mindestens einer  $\log_2$ -Stufe Unterschied ( $\blacktriangle$ ,  $\blacktriangledown$ ).

Die Proteomdaten wurden einer BiNGO-Analyse in Cytoscape unterzogen, um signifikant angereicherte GO-Terme zu ermitteln. Es wurden alle Proteine in die Analyse

miteinander, deren  $\log_2$ -Werte signifikant  $\leq -1$  bzw.  $\geq 1$  betragen. Die Analysen wurden für alle drei Zeitpunkte separat durchgeführt. Zusätzlich wurden massenspektrometrische Daten von Berghoff et al. (2013) nach der gleichen Methodik reanalysiert, da diese Daten die Proteomveränderungen nach 90 min photooxidativem Stress in *R. sphaeroides* zeigten und einen Vergleich mit den vorliegenden Daten von T<sub>90</sub> nahelegten.

Die Analysen zeigten, dass alle signifikant angereicherten Proteine vom Zeitpunkt T<sub>45</sub> auch in T<sub>90</sub> angereichert blieben (Abb. 3.31 und 3.32). Ähnlich waren 4 der 6 signifikant gesunkenen Proteinabundanzwerte vom Zeitpunkt T<sub>45</sub> auch in T<sub>90</sub> gesunken, nämlich das Zellteilungsprotein FtsK, der Oligopeptid-ABC-Transporter OppA2 und 2 hypothetische Proteine, RCAP\_rcc01012 und RCAP\_rcc01423 (Abb. 3.31 und 3.33). Exklusiv zum Zeitpunkt T<sub>45</sub> zeigten nur das hypothetische Protein RCAP\_rcc01067 und die Diguanilat-Zyklase/Phosphodiesterase RCAP\_rcc03005 eine verringerte Abundanz. Sofern nicht anders angemerkt, gelten die folgend beschriebenen Abundanzenerhöhungen bei *R. capsulatus* sowohl für T<sub>45</sub> als auch für T<sub>90</sub>.



**Abbildung 3.31: Funktionelle Charakterisierung von Proteinen mit verringerter (lila) bzw. erhöhter (rot) Abundanz nach 45 min photooxidativem Stress in *R. capsulatus*.** In biologischen Triplikaten wurden die Abundanzveränderungen via Label-freier LC-MS/MS bestimmt. Der Volcano-Plot zeigt von allen erfassten Proteinen die p-Werte (als negative  $\log_{10}$ ) gegen die  $\log_2$ -Werte der Abundanzveränderungen von 45 min gegen 0 min. Die grauen Linien zeigen Grenzwerte: die horizontale für statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ), die vertikalen für  $\log_2$ -Werte  $\leq -1$  bzw.  $\geq 1$ . Ausgewählte Proteine sind hervorgehoben (Nummern beziehen sich auf Genloci). Eine Auswahl der detektierten Proteine ist den funktionellen Gruppen nach unten zusammengefasst, + und ++ indizieren Proteine mit  $\log_2$ -Werten  $\geq 2$  bzw.  $\geq 3$ .

Nach 90 min photooxidativem Stress zeigte *R. capsulatus* 39 exklusiv angereicherte Proteine, *R. sphaeroides* dagegen 43. Beide Spezies erhöhten signifikant Proteine mit Funktionen in Proteinumsatz und -reparatur, DNA-Reparatur, (photo-)oxidativer Stressantwort sowie Oxidations-Reduktions-Prozessen. Sieben Proteine stiegen in beiden Spezies in ihrer Abundanz signifikant: die Methioninsulfoxidreduktasen MsrA2 (nicht bei  $T_{45}$ ), MsrB1 und MsrB2, die ATP-abhängige Protease ClpA, eine mögliche Protease (RCAP\_rcc03333/RSP\_1760) sowie die potentielle GTP-Zyklohydrolase FolE2 und ein nicht charakterisiertes Protein (RCAP\_rcc00543/RSP\_1760; nicht bei  $T_{45}$ ). Bis auf die beiden letztgenannten handelt es sich um Proteine mit Funktionen in Proteinumsatz und -reparatur. Diese funktionelle Gruppe wurde in beiden Organismen durch unterschiedliche

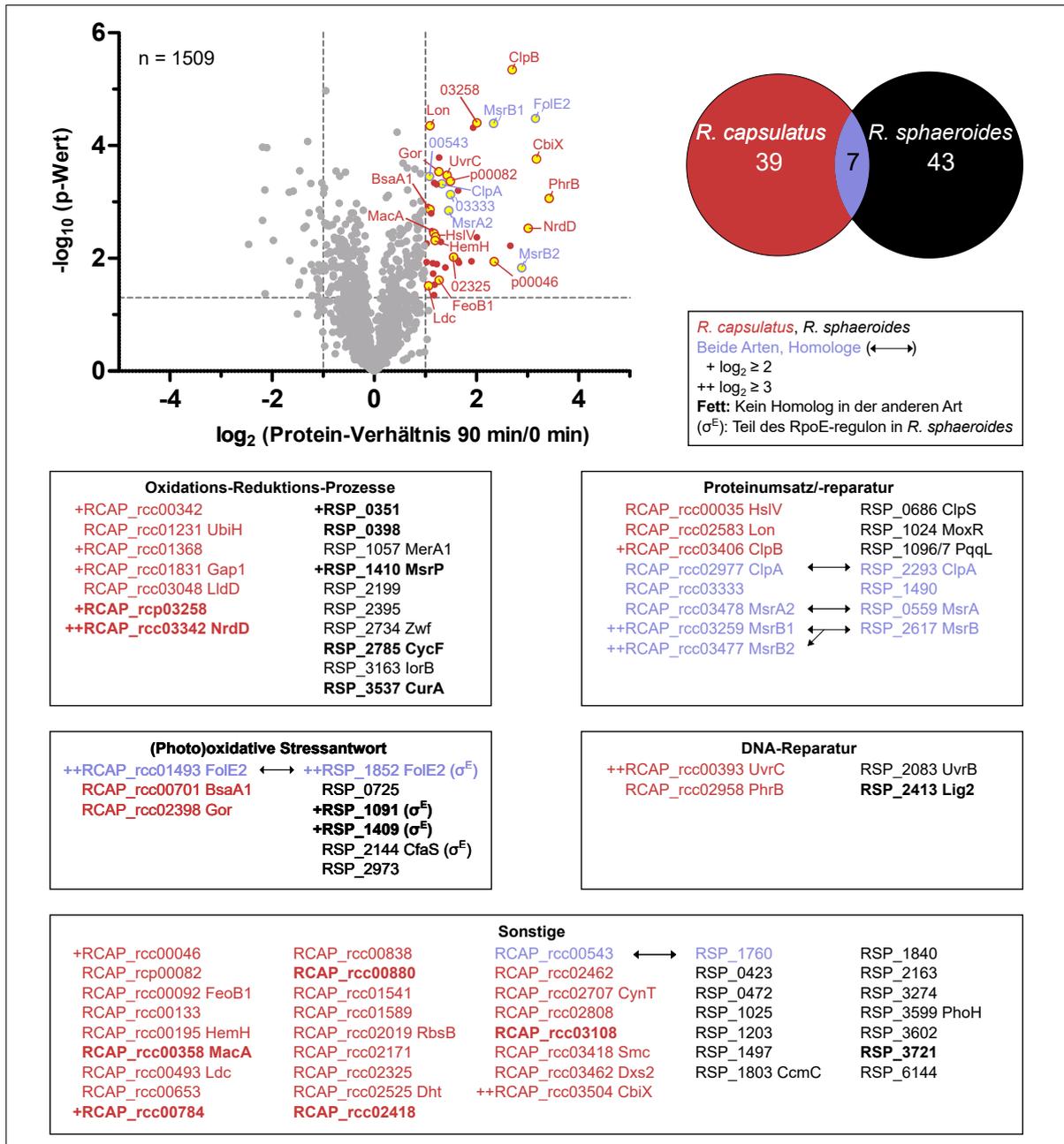
Proteasen weiter angereichert: in *R. capsulatus* mit Lon, ClpB und HslV (nicht bei T<sub>45</sub>), in *R. sphaeroides* mit ClpS, MoxR und PqqL (Abb. 3.32).

Hinsichtlich DNA-Reparatur akkumulierten beide Spezies eine Untereinheit des UvrABC-Komplexes (UvrC in *R. capsulatus*, UvrB in *R. sphaeroides*), ansonsten steigerte *R. capsulatus* die Abundanz der Photolyase PhrB, *R. sphaeroides* hingegen die der DNA-Ligase Lig2. Neben der erwähnten GTP-Zyklohydrolase FolE2 akkumulierte *R. capsulatus* bei den Proteinen der (photo-)oxidativen Stressantwort noch die Glutathionperoxidase BsaA1 und die Glutathiondisulfidreduktase Gor. Im Gegensatz dazu akkumulierte *R. sphaeroides* Proteine des RpoE-Regulons (RSP\_1091, RSP\_1409, CfaS) sowie ein Thioredoxin (RSP\_0725) und ein Peroxiredoxin (RSP\_2973).

Der GO-Term für Oxidations-Reduktions-Prozesse war in beiden Arten signifikant angereichert. Erwähnenswert sind hier zwei Proteine von *R. capsulatus*, die möglicherweise photooxidativem Stress entgegenwirken, aber kein Homolog in *R. sphaeroides* haben. Das erste ist das Cytochrome c Biogenesis Protein RCAP\_rcc03258, welchem auch der GO-Term der Antioxidantfunktion zugewiesen ist, womit RCAP\_rcc03258 zur Redoxhomöostase beiträgt. Das zweite Protein ist NrdD, eine anaerobische Ribonukleosid-Triphosphat-Reduktase ( $\log_2 = 3,01$ ). Dabei reduziert NrdD Ribonukleotide zu Deoxyribonukleotiden, welche für die DNA-Reparatur benötigt werden. Im Unterschied dazu akkumulierte *R. sphaeroides* die Sulfoxid-Reduktase-Untereinheit MsrP und Cytochrom(-Untereinheiten), nämlich CycF (Cytochrom *c*-544) und die Cytochrom *c* Peroxidase RSP\_2395.

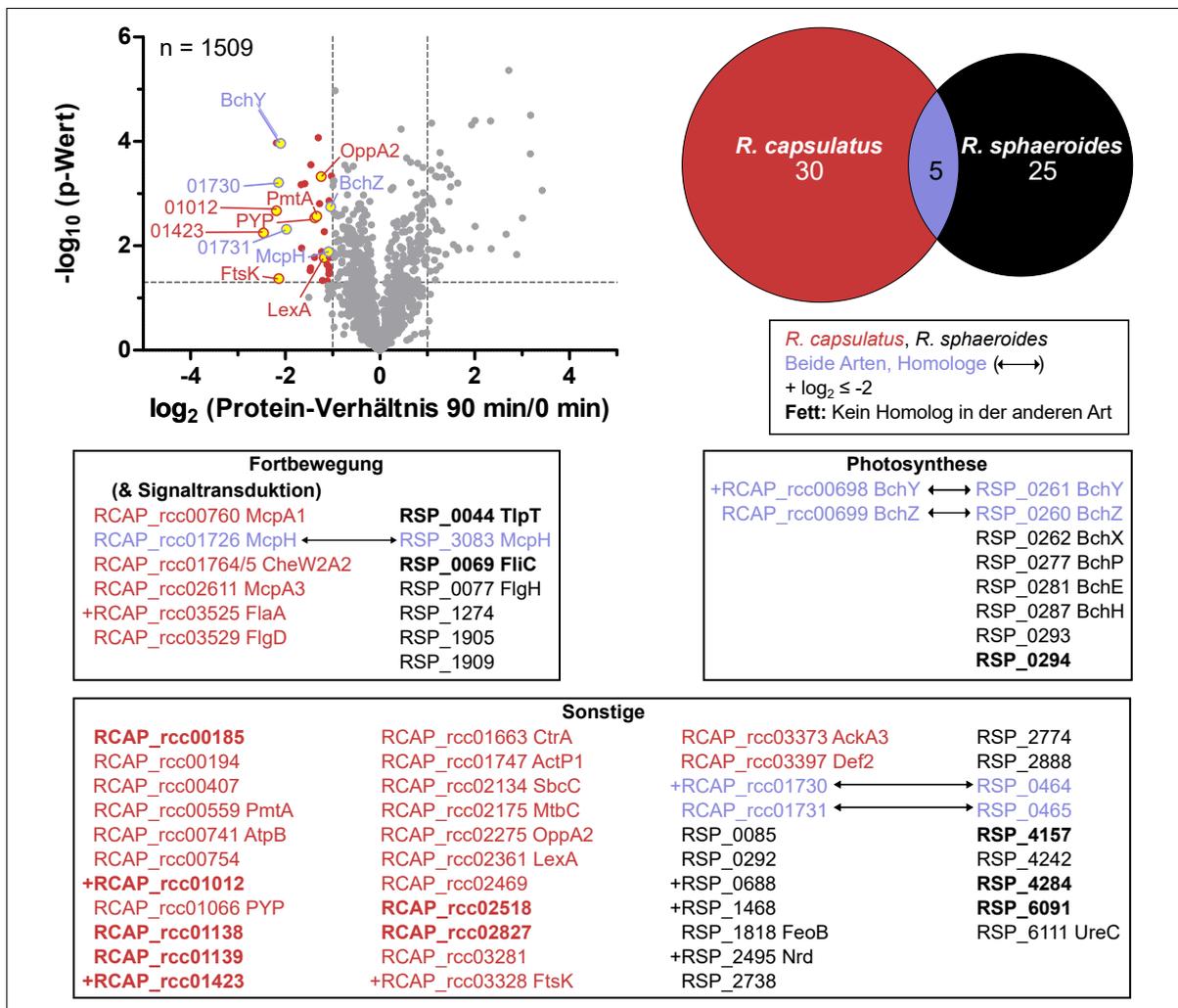
Die meisten Proteine in der BiNGO-Analyse waren mit anderen GO-Termen deklariert. *R. capsulatus* deckte mit 26 angereicherten Proteinen dabei eine breitere Stoffwechselvielfalt ab als *R. sphaeroides* mit 14 Proteinen. *R. sphaeroides* akkumulierte größtenteils wenig charakterisierte oder hypothetische Proteine, neben einigen Proteinen für ABC-Transportsysteme (für Kohlenhydrate oder Multisubstanzefflux), z.B. RSP\_1203, RSP\_3602 oder CcmC. *R. capsulatus* steigerte u.a. die Abundanz von RCAP\_rcp00082, einem möglichen Thioredoxin (nicht in T<sub>45</sub>). Auch akkumulierte *R. capsulatus* die Ornithindecarboxylyase Ldc, welche zur Biosynthese von Putrescin und Polyaminen nötig ist (nicht in T<sub>45</sub>).

Weiter stieg in *R. capsulatus* die Abundanz des Makrolid-Antibiotika-ABC-Transporters MacA, welcher kein Homolog in *R. sphaeroides* hat. Besonders unterschied sich *R. capsulatus* von *R. sphaeroides* durch die Anreicherung mehrerer Proteine des Eisenmetabolismus. Darunter fallen der GTP-abhängige Eisen-(II)-transporter FeoB1, die Protoporphyrin/Coproporphyrin Eisenchelatase RCAP\_rcc00195 und der Eisensiderophor/Cobalmin-ABC-Transporter RCAP\_rcp00046 (alle nicht T<sub>45</sub>). Weiter akkumulierte *R. capsulatus* das terminale Enzym der Sirohäm synthese, die Ferrochelatase CbiX – eines der am stärksten akkumulierten Proteine ( $\log_2$ -Wert = 3,17).



**Abbildung 3.32: Funktionelle Charakterisierung von Proteinen mit erhöhter Abundanz nach 90 min photooxidativen Stress.** In biologischen Triplikaten wurden die Abundanzveränderungen in *R. capsulatus* via Label-freier LC-MS/MS bestimmt. Der Volcano-Plot stellt von allen erfassten Proteinen die p-Werte (als negative  $\log_{10}$ ) gegen die  $\log_2$ -Werte der Abundanzveränderungen von 90 min gegen 0 min dar. Die grauen Linien stellen Grenzwerte dar: die horizontale für statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ), die vertikalen für  $\log_2$ -Werte  $\leq -1$  bzw.  $\geq 1$ . Ausgewählte Proteine sind hervorgehoben (Nummern beziehen sich auf Genloci). Die Proteomdaten wurden mit *R. sphaeroides* (Berghoff et al. 2013) verglichen und sind im Eulerdiagramm dargestellt. Eine Auswahl der detektierten Proteine ist den funktionellen Gruppen nach unten zusammengefasst, + und ++ indizieren Proteine mit  $\log_2$ -Werten  $\geq 2$  bzw.  $\geq 3$ . Farben markieren Proteine, deren Verringerung nur in *R. capsulatus* (rot), nur in *R. sphaeroides* (schwarz) oder in beiden Organismen (blau) detektiert wurde. Adaptiert nach Licht et al. (2020).

Bezüglich abgenommener Proteine und GO-Terme unterschieden sich *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* z.T. sehr stark (Abb. 3.33). Die Abundanz von 30 Proteinen sank exklusiv in *R. capsulatus*, von 25 dagegen in *R. sphaeroides*, von 5 in beiden Arten. In *R. sphaeroides* war der GO-Term für Photosynthese (8 Proteine) signifikant abgenommen – allerdings nicht in *R. capsulatus*, wo sich nur wie in *R. sphaeroides* BchY und BchZ in ihrer Abundanz verringerten. Ebenfalls sank in beiden Spezies die Abundanz des Chemotaxisproteins McpH und anderer Proteine des GO-Terms Fortbewegung (bzw. in *R. capsulatus* auch des GO-Terms Signaltransduktion). Es verringerte sich in beiden Spezies die Abundanz zweier möglicher Proteasen/Peptidasen (RCAP\_rcc01730/RSP\_0464 und RCAP\_rcc01731/RSP\_0465). Besonders auffällig ist, dass *R. sphaeroides* sowohl FeoB als auch Nrd in ihrer Abundanz verringerte, weil in *R. capsulatus* die Proteinabundanzwerte (des homologen) FeoB1 und NrdD zu dieser Dauer des photooxidativen Stresses anstiegen (Abb. 3.32). Weiter verringerte sich in *R. capsulatus* die Abundanz des SOS-Antwort-Repressors LexA sowie des Zellteilungsproteins FtsK und des Oligopeptid-ABC-Transportproteins OppA2 (die letzteren beiden auch in T<sub>45</sub>). Mit Blick auf die Abnahme von Transkripten von Cholintransportern (siehe Abb. 3.28 auf S.98) fällt noch die Abnahme von PmtA (Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase) auf, welches an der Cholinbiosynthese beteiligt ist.



**Abbildung 3.33: Funktionelle Charakterisierung von Proteinen mit verringerter Abundanz nach 90 min photooxidativem Stress.** In biologischen Triplikaten wurden die Abundanzveränderungen via Label-freier LC-MS/MS bestimmt. Der Volcano-Plot stellt von allen erfassten Proteinen die p-Werte (als negative  $\log_{10}$ ) gegen die  $\log_2$ -Werte der Abundanzveränderungen von 90 min gegen 0 min dar. Die grauen Linien stellen Grenzwerte dar: die horizontale für statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ), die vertikalen für  $\log_2$ -Werte  $\leq -1$  bzw.  $\geq 1$ . Ausgewählte Proteine sind hervorgehoben (Nummern beziehen sich auf Genloci). Die Proteomdaten wurden mit *R. sphaeroides* (Berghoff et al. 2013) verglichen und sind im Eulerdiagramm dargestellt. Eine Auswahl der detektierten Proteine ist den funktionellen Gruppen nach unten zusammengefasst, + indiziert Proteine mit  $\log_2$ -Werten  $\geq 2$ . Farben markieren Proteine, deren Verringerung nur in *R. capsulatus* (rot), nur in *R. sphaeroides* (schwarz) oder in beiden Organismen (blau) detektiert wurde.

---

In *R. capsulatus* wurden die Proteomdaten vom Zeitpunkt T<sub>180</sub> auch einer BiNGO-Analyse unterzogen, um signifikant angereicherte oder abgenommene GO-Terme zu ermitteln (Abb. 3.34). Die Analyse ließ 3 Aussagen zu: (1) angereicherte Proteine und funktionelle Gruppen von T<sub>90</sub> blieben weitgehend angereichert, (2) *R. capsulatus* akkumulierte noch mehr Proteine des Proteinumsatzes/der Proteinreparatur und (3) neben BchYZ waren auch weitere Proteine der Photosynthese verringert (insbesondere die der BChl *a*-Biosynthese) und damit auch der GO-Term Photosynthese. Ergänzend zur Abnahme der Photosyntheseproteine sank auch die Abundanz der Spheroidenmonooxygenase CrtA (auch GO-Term Photosynthese).

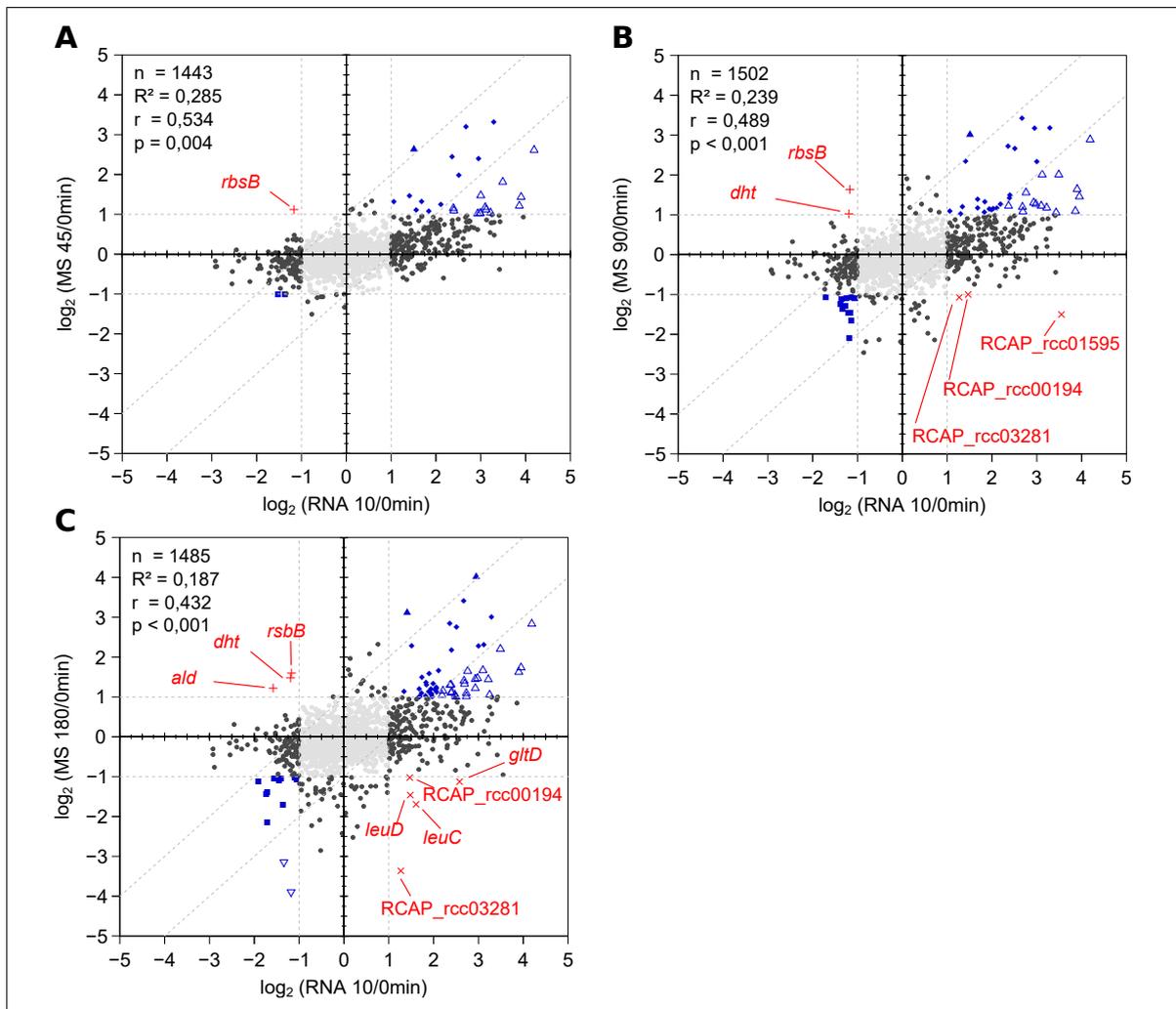
Viele der anderen Proteinabnahmen setzten sich vom Zeitpunkt T<sub>90</sub> fort (z.B. FtsK). Exklusiv zu T<sub>180</sub> sank die Abundanz von LeuCD (3-Isopropylmalat-Dehydratase), Enzyme der Leucinbiosynthese, welche mit [4Fe-4S]-Clustern primäre Ziele von ROS gewesen sein könnten. Weiter auffällig waren die starken Abnahmen (log<sub>2</sub>-Werte < -3) des Peroxiredoxins RCAP\_rcc03281 und des Photoactive Yellow Proteins (PYP; beide auch zu T<sub>90</sub>). Weiter sank zu T<sub>180</sub> u.a. die Abundanz der Polyhydroxyalkanoat-Depolymerase PhaZ und – exklusiv für diesen Zeitpunkt – des Cold Shock-Proteins CspD.

Die angereicherten GO-Terme umfassten größtenteils die gleichen Proteine wie zu T<sub>90</sub>, z.B. blieben die Proteine der DNA-Reparatur die gleichen wie zu T<sub>45</sub> und T<sub>90</sub>. Bei den Proteinen der photooxidativen Stressantwort waren neu ein Peroxiredoxin (RCAP\_rcc03413) und GshA (Glutamate-Cysteine Ligase) angestiegen, BsaA1 dagegen nicht mehr. Mit SufC (FeS Assembly ATPase) stieg ein weiteres Enzym des Eisenmetabolismus in der Abundanz. Unter den Proteinen der Oxidations-Reduktions-Prozesse war Gap1 nicht mehr angereichert, dafür aber mit UbiF ein Protein der Ubiquinone-Biosynthese. Zwar war die Protease Lon nicht mehr angereichert, aber dafür stiegen andere Proteine für Proteinumsatz und -reparatur neu in der Abundanz: die Proteasen DegP, HflKC, ClpS und die Peptidase RCAP\_rcc00267.



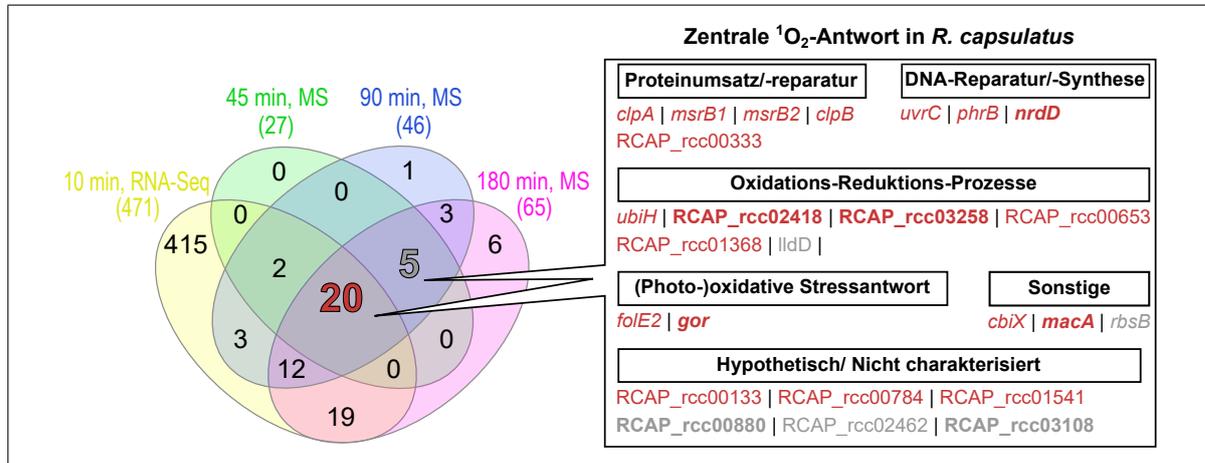
### 3.5 Vergleich der $^1\text{O}_2$ -Antwort von Transkriptom und Proteom in *Rhodobacter capsulatus*

In den Omics-Analysen zeigten die Transkripte bzw. Proteine einiger Gene über mehrere Zeitpunkte des photooxidativen Stresses eine erhöhte bzw. verringerte Abundanz. Dies war der Anlass, die Korrelation zwischen Transkriptom- und Proteomveränderungen in *R. capsulatus* unter photooxidativem Stress zu untersuchen und auf funktioneller Ebene die dominierenden Faktoren der  $^1\text{O}_2$ -Antwort zu bestimmen. Abbildung 3.35 zeigt die Ergebnisse der Korrelationsanalysen zwischen RNA-Seq und LC-MS/MS. Mit fortlaufender Dauer photooxidativen Stresses korrelierten die  $\log_2$ -Werte der LC-MS/MS-Daten weniger mit denen des RNA-Seq. Die Korrelation zwischen  $T_{45}$  (45/0 min) und dem RNA-Seq (10/0 min,  $T_{10}$ ) war noch am höchsten mit einem r-Wert von 0,534 und einem  $R^2$ -Wert von 0,285 ( $p < 0,01$ ). Von einigen Genen war die Abundanz der entsprechenden Proteine erhöht und die der dazugehörigen Transkripte verringert, nämlich die des Ribose-ABC-Transporters RbsB (alle Zeitpunkte), der Dihydropyrimidinase Dht (im Proteom bei  $T_{90}$  und  $T_{180}$ ) und der Alanindehydrogenase Ald ( $T_{180}$ ). Der umgekehrte Fall trat für die Zeitpunkte  $T_{90}$  und  $T_{180}$  ein: nach 90 min und 180 min akkumulierten eine L,D-Transpeptidase (RCAP\_rcc00194) und ein Peroxidredoxin (RCAP\_rcc03281), im Transkriptom sank ihre Abundanz bei  $T_{10}$ . Genauso verhielt es sich zu  $T_{90}$  mit der Protoporphyrin/Coproporphyrin-Ferrochelatase HemH sowie zu  $T_{180}$  mit GltD (Glutaminsynthase) und LeuCD (3-Isopropylmalat-Dehydratase).



**Abbildung 3.35: Korrelation zwischen Proteom- und Transkriptomveränderungen unter  $^1\text{O}_2$ -Stress.** Die  $\log_2$ -Werte der Proteine der LC-MS/MS-Analyse sind aufgetragen gegen die  $\log_2$ -Werte der dazugehörigen Transkripte, jeweils für  $T_{45}$  (A),  $T_{90}$  (B) und  $T_{180}$  (C). Die Anzahl (n), der Determinationskoeffizient ( $R^2$ ), der Pearson-Korrelationskoeffizient (r) und der dazugehörige p-Wert sind angegeben. Die grauen horizontalen und vertikalen Linien sind Grenzwerte für  $\log_2$ -Werte  $\leq -1$  bzw.  $\geq 1$ . Genprodukte zwischen den diagonalen grauen Linien haben vergleichbar starke  $\log_2$ -Werte in beiden Zeitpunkten. Wenn  $\log_2$ -Werte  $\geq 1$  den Anstieg eines Genprodukts definieren und solche  $\leq -1$  eine Abnahme, sind die Datenpunkte wie folgt indiziert: Weder Anstieg noch Abnahme in einem Zeitpunkt ( $\circ$ ), Anstieg oder Abnahme zu nur einem Zeitpunkt ( $\bullet$ ), Anstieg oder Abnahme in beiden Zeitpunkten ( $\blacklozenge$ ,  $\blacksquare$ ), Anstieg oder Abnahme in beiden Zeitpunkten mit mindestens einer  $\log_2$ -Stufe Unterschied ( $\triangle$ ,  $\blacktriangle$ ,  $\blacktriangledown$ ) sowie Anstieg zu einem Zeitpunkt mit Abnahme im anderen Zeitpunkt ( $\times$ ,  $+$ ). Im letzteren Fall sind die Gene angeschrieben.

Um die funktionelle  $^1\text{O}_2$ -Antwort in *R. capsulatus* auf die wichtigsten Gene zu reduzieren, wurden Genprodukte identifiziert, welche zu mehreren oder allen Zeitpunkten akkumuliert waren (Abb. 3.36).

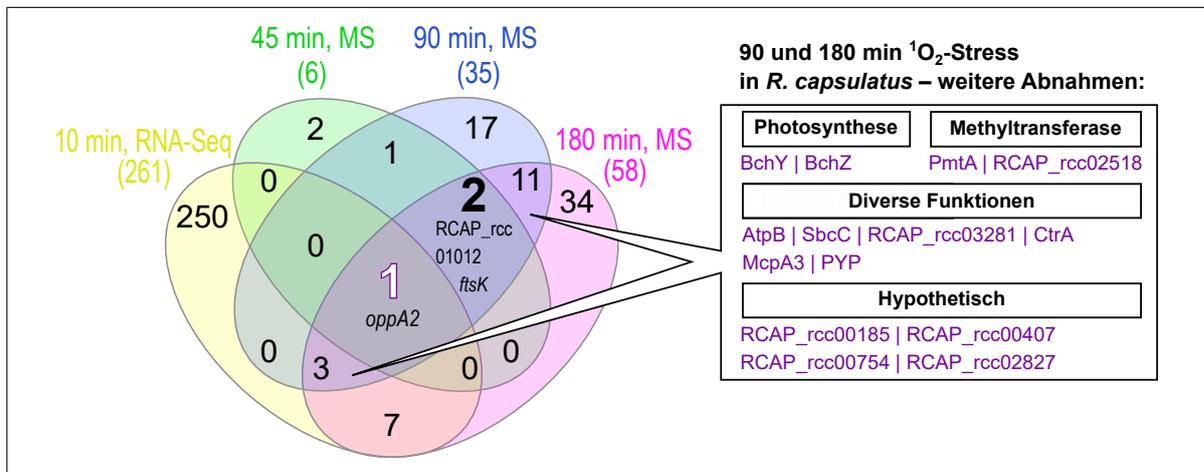


**Abbildung 3.36: Die zentralen funktionellen Zunahmen der  $^1\text{O}_2$ -Antwort in *R. capsulatus*.** Dargestellt sind die Anzahl von  $^1\text{O}_2$ -induzierten Zunahmen von Transkripten und Proteinen in *R. capsulatus* ( $\log_2$ -Wert  $\geq 1$ ,  $p < 0,05$ ), welche in einzelnen bzw. mehreren Zeitpunkten des Stresses auftraten. Im Kasten rechts sind die Transkripte/Proteine der zentralen  $^1\text{O}_2$ -Antwort zusammengefasst, für alle Zeitpunkte (rot) bzw. exklusiv für alle Zeitpunkte der LC-MS/MS-Analyse (grau). Fettgedruckte Gene haben kein Homolog in *R. sphaeroides*.

Im Transkriptom und Proteom akkumulierte *R. capsulatus* unter photooxidativem Stress in allen Zeitpunkten 20 Genprodukte ( $\log_2$ -Werte  $\geq 1$ ,  $p < 0,05$ ). Dauerhaft für Proteinumsatz/-reparatur angereichert waren RCAP\_rcc00333, *clpAB* und *msrB1/msrB2*, für DNA-Reparatur/-synthese waren es *uvrC*, *phrB* und *nrdD*. Neben sechs Genprodukten von Oxidations-Reduktions-Prozessen (z.B. *ubiH*, RCAP\_rcc01368) waren *folE2* und *gor* dauerhaft für die (photo-)oxidative Stressantwort akkumuliert. Unter den sonstigen funktionellen Gruppen waren *macA* und *cbiX* angereichert, letzteres mit  $\log_2$ -Werten von ca. 2–4. Drei hypothetische bzw. nicht charakterisierte Genprodukte gehörten auch zu den dauerhaften Anreicherungen. Ohne das Transkriptom zählten noch fünf weitere Proteine zur zentralen  $^1\text{O}_2$ -Antwort: die L-Laktatdehydrogenase *lldD*, *RbsB* und drei hypothetische Proteine.

Über alle Zeitpunkte bzw. Omics hinweg lassen sich nur sehr wenige gemeinsam abgenommene Proteine in *R. capsulatus* unter photooxidativem Stress ausmachen (Abb. 3.37). Der Oligopeptidtransporter *oppA2* war das einzige Gen, von dem die Abundanz der dazugehörigen Transkripte und Proteine in allen Zeitpunkten sank. In allen Zeitpunkten der LC-MS/MS-Analyse waren zudem die Proteinlevel von *FtsK* und RCAP\_rcc01012 (hypothetisches Protein) verringert. Mit 14 Proteinen teilten sich T<sub>90</sub> und T<sub>180</sub> die meisten

Abnahmen, darunter: BchYZ, Methyltransferasen (PmtA, RCAP\_rcc02518), PYP und CtrA.



**Abbildung 3.37:** Die zentralen Abnahmen von Transkripten und Proteinen unter  $^1\text{O}_2$ -Stress in *R. sphaeroides*. Gegeben ist die Anzahl von  $^1\text{O}_2$ -induzierten Abnahmen in *R. capsulatus*, welche in einzelnen bzw. mehreren Zeitpunkten des Stresses auftraten ( $\log_2$ -Wert  $\geq 1$ ,  $p < 0,05$ ). Im Venndiagramm und im Kasten rechts sind von den Zeitpunkten  $T_{90}$  und  $T_{180}$  die gemeinsamen Abnahmen der Proteine unter  $^1\text{O}_2$ -Stress zusammengefasst.

## 4 Diskussion

*Rhodobacter* kann sowohl anaerob (phototroph) als auch aerob (chemotroph mit O<sub>2</sub>) wachsen. Der Nachteil dieser Stoffwechselfielfalt ist das Risiko der internen <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Produktion an den Photosystemen in Gegenwart von Licht und Sauerstoff. Jahrelang untersuchten Studien die Antwort auf <sup>1</sup>O<sub>2</sub> bzw. photooxidativen Stress in *R. sphaeroides* auf physiologischer und regulatorischer Ebene. Die stärkere Pigmentierung in *R. capsulatus* könnte zu mehr photooxidativem Stress führen. Allerdings zeigt *R. capsulatus* eine schnellere Anpassung von aeroben zu anaeroben Bedingungen, womit sich die Frage stellt, wie sich ein ähnlich starker Wechsel der Bedingungen von (semi-)aerob (und pigmentiert) zu photooxidativem Stress auf *R. capsulatus* auswirkt. In dieser Arbeit wurden *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* in ihrer photooxidativen Stressantwort direkt verglichen. Die Versuche offenbarten die wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Arten: Im Gegensatz zu *R. sphaeroides* produziert *R. capsulatus* weniger <sup>1</sup>O<sub>2</sub> und ROS, erhöht sein Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis und induziert *tspO*, *hemH* und *cbiX*, welche der Bildung des Photosensibilisators Protoporphyrin IX und ROS durch die Fenton-Reaktion von ROS entgegenwirken. Trotz ähnlicher induzierter funktioneller Gruppen und vergleichbaren Wachstums zeigten sich im Detail mehrere Unterschiede, welche nachfolgend sowie in Abb. 4.1 zusammengefasst sind.

*R. capsulatus* hatte innerhalb der ersten 3 h unter <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Stress eine höhere Wachstumsrate, die End-OD<sub>660</sub> war aber die gleiche wie in *R. sphaeroides*. Vor und nach 10 min <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Stress wies *R. capsulatus* weniger ROS auf als *R. sphaeroides*. Passend dazu generierte *R. capsulatus* nach 30 min photooxidativem Stress nur halb so viel <sup>1</sup>O<sub>2</sub> pro BChl *a* wie *R. sphaeroides*. Das Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis war in *R. capsulatus* bis zu dreimal höher, was ein höheres Quencher-zu-Photosensibilisator-Verhältnis bedeuten könnte. Beide Arten verringerten die Abundanz der Proteine der GO-Terme für BChl *a*-Biosynthese und Photosynthese, *R. capsulatus* allerdings erst zum Probennahmezeitpunkt T<sub>180</sub> (*R. sphaeroides* bereits nach 90 min). In beiden Spezies war das Transkriptlevel von *rpoE* erhöht, allerdings fehlten in *R. capsulatus* sieben Homologe des *rpoE*-Regulons von *R. sphaeroides*. Weiter lokalisieren *rpoE* und *chrR* nahe des photosynthetischen Genclusters in *R. capsulatus*, was einzigartig in der Familie der *Rhodobacteraceae* ist.

Die folgenden Abschnitte erörtern die Hintergründe und Implikationen dieser Ergebnisse im Detail.

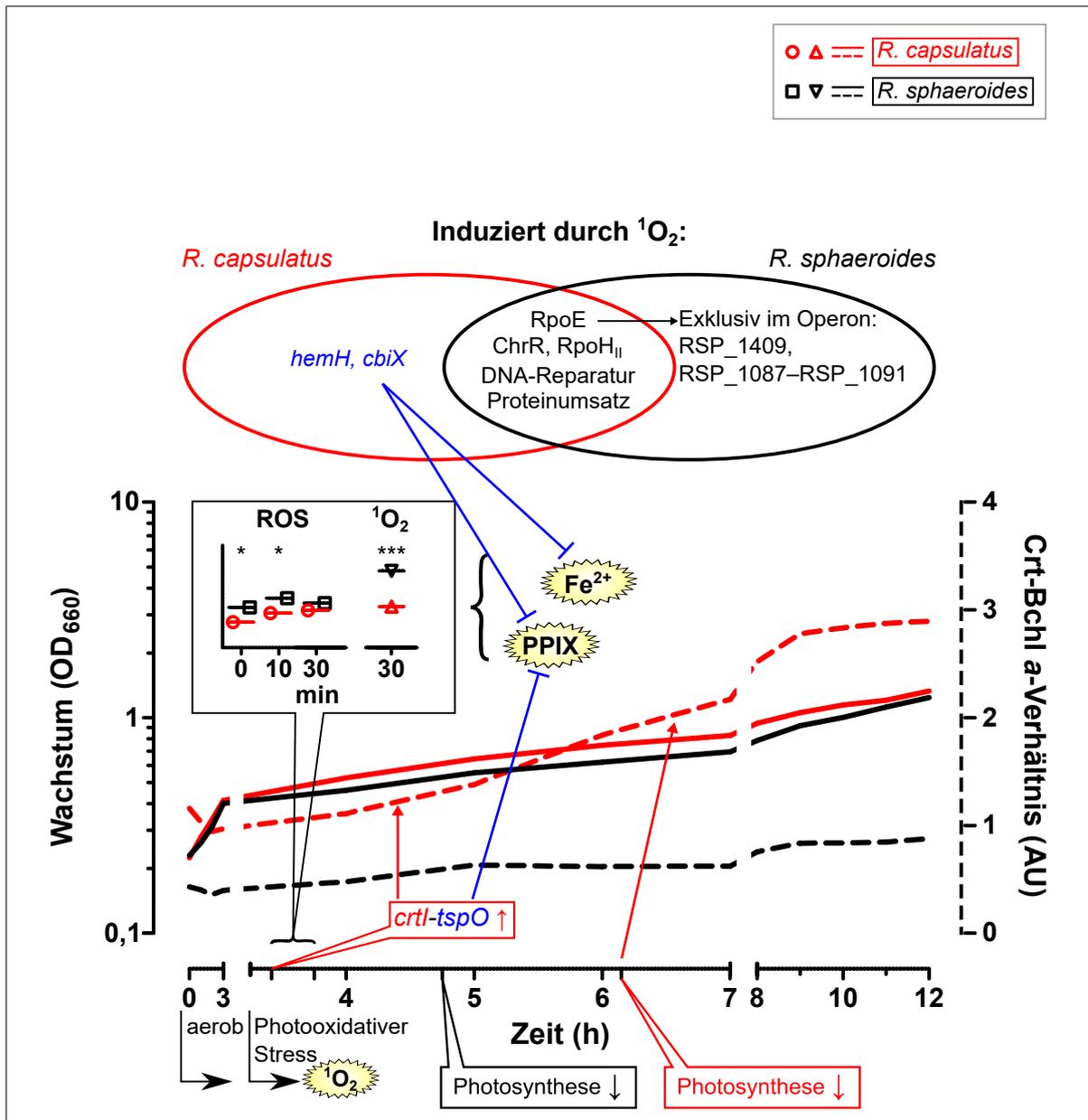


Abbildung 4.1: Zusammenfassung der wesentlichen Unterschiede in der photooxidativen Stressantwort zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*. Die Linien zeigen gegen die Zeit dargestellt die  $\text{OD}_{660}$  (—) und das Carotinoid-Bchl *a*-Verhältnis (- -). ROS reaktive Sauerstoffspezies, PPIX Protoporphyrin IX.

## 4.1 Einschätzung der Omics-Datenlage

Der Vergleich der photooxidativen Stressantwort zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* nimmt Bezug auf Analysen mit Omics-Datensätzen. Von daher ist ein Überblick über die Datenlage *per se* wichtig, insbesondere ihrer Limitationen. Dies trifft besonders auf die Transkriptomanalysen zu. RNA-Seq ist umfassender als Microarray und hat ein feineres Detektionslimit, um auch geringe Veränderungen von Transkriptleveln zu erfassen (Marioni et al. 2008; Zhao et al. 2014). So ist im Transkriptlevel schätzungsweise ein Unterschied von 25 % beim RNA-Seq noch exakt, beim Microarray erst ab 100 % (Mantione et al. 2014).

Auch muss berücksichtigt werden, dass beim Transkriptom die RNA-Seq-Daten in *R. capsulatus* nach 0 und 10 min photooxidativem Stress entnommen wurden, in *R. sphaeroides* für den Microarray aber nach 0 und 7 min. Dies ist insofern zu beachten, weil sich gerade unter oxidativem Stress mRNA-Level in Minutenschritten bereits um mehr als eine  $\log_2$ -Stufe verändern können (Blanchard et al. 2007; Zeller et al. 2006). Dies könnte auch erklären, warum sich die RTL in den qRT-PCR-Daten von 10 min gegen 0 min  $^1\text{O}_2$ -Stress mehr mit den RNA-Seq-Daten von *R. capsulatus* deckten als mit den Transkriptomdaten von *R. sphaeroides* (Abb. 3.26). Speziell war z.B. in *R. capsulatus* immer mindestens die Tendenz der relativen Transkriptänderung gleich, während in *R. sphaeroides* z.B. bei *cysP* und *crtI* sich entgegengesetzte Tendenzen zeigten. Weiter ist bei den Microarray-Daten zu berücksichtigen, dass es sich um biologische Duplikate handelte. Die Unterschiede in der Anzahl biologischer Replikate und bei den Probennahmezeitpunkten sind beim Vergleich der Microarray-Daten zu den vorliegenden qRT-PCR- und RNA-Seq-Daten zu berücksichtigen.

Was die vorliegenden RNA-Seq und LC-MS/MS-Daten angeht, geben die Analysen der einzelnen  $\log_2$ -Werte drei Hinweise auf die Vergleichbarkeit der Replikate. Die ersten beiden Hinweise sind die bei den Korrelationsanalysen ermittelten hohen  $R^2$ -Werte um 0,9 in Kombination mit den signifikanten Pearson-Korrelationskoeffizienten über 0,9 (Abb. A.3 und A.6). Diese Werte bedeuten, dass die einzelnen Transkriptom- bzw. Proteomabundanzwerte eines Replikates sehr gut die eines anderen modellieren konnten. Dies ist ein starker Hinweis auf eine hohe Vergleichbarkeit der biologischen Triplikate. Der dritte Hinweis auf die hohe Vergleichbarkeit der Replikate sind die Gruppierungen der Replikate entlang des Probennahmezeitpunkts im PCA-Plot (Abb. A.4). Diese Gruppierung wäre zu erwarten, wenn die einzelnen Transkriptom- bzw. Proteomabundanzwerte durch die Dauer des Stresses vorrangig bestimmt werden.

Bei den Proteomdaten ist der Vergleich zwischen *R. capsulatus*- und *R. sphaeroides*-Daten nicht nur wegen gleicher Probennahmezeitpunkte (90 und 0 min) naheliegender als bei den Transkriptomdaten. Label-freie und gelabelte massenpektrometrische Methoden

der Proteomics haben eine vergleichbare Auflösung (Patel et al. 2009; Ryu et al. 2008). Dem gegenüber stehen Studien, in denen selbst beim gleichen Forschungsobjekt beide Methoden unterschiedliche bzw. verschieden viele Proteine erfassen (Megger et al. 2014; Merl et al. 2012). Es ist allerdings unklar, ob dies bei den vorliegenden Vergleichen eine Rolle spielt. Für einen sicheren Vergleich spricht zumindest, dass nach 90 min photooxidativem Stress die quantifizierten Proteine in beiden Spezies vergleichbar viele waren (1502 in *R. capsulatus*, 1214 in *R. sphaeroides*) und dass viele Proteine unter photooxidativem Stress bzw. aeroben Bedingungen sowieso nicht produziert werden und unter dem Detektionslimit liegen. Die methodenspezifischen Unterschiede in der Bandbreite der quantifizierten Proteine sollten bedacht werden, spielen aber für die Diskussion von Unterschieden zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* eine untergeordnete Rolle – auch, weil beide Methoden unabhängig voneinander die gleichen wesentlich akkumulierten, funktionellen Gruppen detektiert haben.

Nur *R. capsulatus* betreffend zeigte die Statistik weiter, dass die Korrelation zwischen Proteom- und Transkriptomdaten gering war (r-Werte von 0,53 bis 0,43, Abb. 3.35). Dies betont die Notwendigkeit eines vielfachen Omics-Ansatzes zur Analyse der Stressantwort, gerade auch, weil in *R. sphaeroides* die Proteom-Transkriptom-Korrelation mit einem r-Wert von 0,63 etwas höher war (Berghoff et al. 2013). Generell könnte sich damit zwischen der Transkriptom- und Proteomebene die photooxidative Stressantwort in *R. capsulatus* mehr unterscheiden als in *R. sphaeroides*. In *R. capsulatus* akkumulierten einige Transkripte, deren Proteine später in der Abundanz abnahmen (RCAP\_rcc01595, RCAP\_rcc00194, RCAP\_rcc03281) sowie umgekehrt (*rbsB*, *dht*, *ald*). Diese Unterschiede könnten genau wie die moderaten Proteom-Transkriptom-Korrelationen auf die unterschiedlichen Stabilitäten von mRNA und Proteinen zurückgehen (Ning et al. 2012).

Zusammenfassend zeigt die Statistik eine robuste Datenlage innerhalb der Transkriptom- und Proteomdaten in *R. capsulatus*. Der Vergleich der RNA-Seq-Daten mit den Microarray-Daten ist statistisch schwieriger. Beide Arten zeigten geringe bis mittelmäßige Korrelationen zwischen Transkriptom- und Proteomveränderungen unter photooxidativem Stress. Dies betont den Nutzen von Mehrfach-Omics-Ansätzen zur Untersuchung der differentiellen Genexpression.

## 4.2 Physiologische Unterschiede der $^1\text{O}_2$ -Antwort zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*

### 4.2.1 *R. capsulatus* produziert weniger reaktive Sauerstoffspezies als *R. sphaeroides* zu Beginn photooxidativen Stresses

Der Vergleich der photooxidativen Stressantwort zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* wirft die Frage auf, ob einer der beiden Organismen besser an  $^1\text{O}_2$ -Stress angepasst ist. Aufschluss geben hier die Daten der  $^1\text{O}_2$ - und ROS-Produktion sowie die Wachstumsanalysen. Generell weisen die Fluoreszenzmessungen mit SOSG und  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  darauf hin, dass *R. capsulatus* weniger  $^1\text{O}_2$  und ROS allgemein zu Beginn des Stresses produzierte, wobei der Unterschied in der ROS-Produktion nach 30 min nicht mehr signifikant war (Abb. 3.15). Möglicherweise bedingte die geringere  $^1\text{O}_2$ -Produktion in *R. capsulatus* die geringere ROS-Produktion, da downstream von  $^1\text{O}_2$  weitere ROS entstehen, darunter  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Peroxylradikale und Peroxinitritanionen (Davies 2004; Davies 2016). Diese ROS werden auch von  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  detektiert (Dwyer et al. 2014; Kalyanaraman et al. 2012).

Vermutlich bewirkte der höhere BChl *a*-Anteil (Abb. 3.6) in *R. capsulatus* auch die höheren absoluten  $^1\text{O}_2$ -Level, aber relativiert zur Dunkelkontrolle waren diese durch Stress nur halb so stark gestiegen wie in *R. sphaeroides* (1,5-fach gegen 3-fach; Abb. 3.15). Dies könnte implizieren, dass *R. capsulatus* bereits generell höhere  $^1\text{O}_2$ -Level kompensieren muss, und damit zum Einsetzen photooxidativen Stresses einen Vorteil im Wachstum gegenüber *R. sphaeroides* hat. Dem entspricht, dass *R. capsulatus* gegenüber *R. sphaeroides* einen leichten Wachstumsvorteil zu Beginn des photooxidativen Stresses zeigte (Abb. 3.2). Schnelleres aerobes Wachstum bedeutet eine erhöhte Aktivität der Atmungskette, welche auch in potentiell mehr ROS resultiert. Dass *R. capsulatus* trotzdem niedrigere ROS-Level als *R. sphaeroides* aufwies, weist auf eine effiziente Abwehr gegen ROS hin.

Unterschiede zu der  $^1\text{O}_2$ -Produktion von *R. sphaeroides* sind auch von einem anderen nahe verwandten Vertreter der *Rhodobacteraceae* bekannt, nämlich *Roseobacter* (Berghoff et al. 2011b). Die Analyse der  $^1\text{O}_2$ -Produktion *in vitro* an photosynthetischen Membranen im Dunkeln und unter photooxidativem Stress deckt sich mit den vorliegenden Ergebnissen: *R. sphaeroides* produzierte zwar absolut gesehen weniger  $^1\text{O}_2$  als *Roseobacter denitrificans*, aber das Verhältnis der  $^1\text{O}_2$ -Menge von Stress zur Dunkelkontrolle war 10:1 in *R. sphaeroides* und ca. 3:1 in *R. denitrificans*.

Anders als bei der Methodik der ROS-Messung via  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  (Remes et al. 2014) musste für  $^1\text{O}_2$ -Messungen via SOSG das *in vivo*-Protokoll in *Rhodobacter* noch etabliert werden. Die Validität der Methode und damit der Daten basiert auf den Ergebnissen der Vorversuche und Studien mit dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Prasad et al. 2018). Die Mikroskopie der Zellen zeigte wie bei Prasad et al. (2018), dass SOSG in

*Rhodobacter* eindrang (Abb. 3.14). Die möglichen cytotoxischen Effekte des Methanols in der SOSG-Experimentierlösung sind mit einer finalen Methanolkonzentration von 0,25 % vernachlässigbar, da *R. capsulatus* noch bei 2 % wachsen konnte (Abb. 3.13). Analog zu der Studie von Prasad et al. (2018) unterschied sich die SOSG-Fluoreszenz unter Rotlicht nicht von der von Dunkelkontrollen, wohl aber von Weißlicht (Abb. 3.12). Da SOSG selbst als Photosensibilisator  $^1\text{O}_2$  unter Weißlicht produziert, wurde mit dem photooxidativen Stress durch Rotlicht das Rauschen der Messergebnisse reduziert. Die (reproduzierten) Kontrollen unterstützen damit zusammengefasst die Validität der  $^1\text{O}_2$ -Messungen.

Offen bleibt, ob die ROS- bzw.  $^1\text{O}_2$ -Produktion sich zwischen den Spezies zu späteren Zeitpunkten noch weiter differenziert. Je nach Methode können sich die Zeitpunkte der maximal messbaren  $^1\text{O}_2$ -Level auch unterscheiden, die Fluoreszenzsonde DanePy wies in *R. sphaeroides* z.B. erst nach 120 min Stress einen Anstieg in der  $^1\text{O}_2$ -Konzentration nach (Glaeser und Klug 2005). Die frühe Phase des Stresses könnte sich besser zum Feststellen von Unterschieden in der maximalen  $^1\text{O}_2$ -Produktion eignen als die späteren Phasen: *R. sphaeroides* zeigte in früheren Versuchen die stärksten Wachstumseinschränkungen innerhalb von ca. 45 min Stress (Glaeser und Klug 2005), BChl *a* verdünnt sich weiter in der Kultur und *Rhodobacter* passt sich an den Stress an. Weitere Messreihen relativer  $^1\text{O}_2$ -Level müssten bestätigen, dass *R. capsulatus* dauerhaft einen kleineren Anstieg aufweist als *R. sphaeroides*.

*R. capsulatus* zeigte zu Beginn photooxidativen Stresses ein schnelleres Wachstum und eine schwächere ROS-Produktion, womit sich angesichts der gleichen End-OD<sub>660</sub> die Frage stellt, wie indikativ diese Ergebnisse für Selektionsvorteile in *R. capsulatus* sind. Möglicherweise ist auch eine nur kurzfristige bessere Anpassung schon ein ausreichender Selektionsvorteil, gerade auch, wenn photooxidativer Stress plötzlich, aber nur kurz auftritt.

## 4.2.2 Sensitivität gegenüber verschiedenen reaktiven

### Sauerstoffspezies in *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*

Mit Blick auf die downstream von  $^1\text{O}_2$  gebildeten ROS stellt sich die Frage, wie sensitiv beide Stämme auf verschiedene ROS reagieren. Die Sensitivität gegenüber MB (und damit  $^1\text{O}_2$ ) war in beiden Spezies gleich (Abb. 3.16), dies passt zu dem Ergebnis der gleichen End-OD<sub>660</sub> am Ende der Wachstumsversuche unter Stress (Abb. 3.2). Im Gegensatz dazu war *R. capsulatus* gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  sensitiver als *R. sphaeroides* (Abb. 3.16). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das *R. sphaeroides*-Genom mit KatG und KatE zwei Katalasen kodiert, von denen nachweislich KatE mit seiner erhöhten Aktivität *R. sphaeroides* eine im Vergleich zu *R. capsulatus* bessere  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Abwehr ermöglicht (Zeller und Klug 2004). Dieser mögliche Nachteil in der ROS-Abwehr von *R. capsulatus* wird vielleicht dadurch ausgeglichen, dass *R. capsulatus* gegenüber dem noch reaktiveren  $\text{O}_2^{\bullet-}$  weniger sensitiv

als *R. sphaeroides* war (Abb. 3.16). Möglicherweise basieren die Unterschiede in der  $O_2^{\bullet-}$ -Sensitivität auf der Expression der Superoxiddismutase *sodB* und der Thioredoxine *trxC*, *trxA1* und *trxB* (Abb. 3.27). Es ist bekannt, dass in *R. capsulatus* unter oxidativem Stress bzw. Glutathionschwund der Regulator OxyR aktiviert wird, welcher die Expression von *trxC* induziert (Zeller et al. 2007). Vergleicht man die Transkriptomdaten für *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* für 10 bzw. 7 min photooxidativen Stress, zeigten *sodB* und die Thioredoxine alle  $\log_2$ -Werte über 1 in *R. capsulatus* (Abb. 3.27), aber nicht in *R. sphaeroides* (Berghoff et al. 2013). OxyR ist vermutlich auch unter photooxidativem Stress aktiviert und die Thioredoxine könnten ein Grund sein, warum die beobachteten ROS-Level in *R. capsulatus* niedriger waren.

Im Vergleich zu *R. sphaeroides* zeigte sich *R. capsulatus* in den Hemmhoftests sensitiver gegenüber  $H_2O_2$ , aber weniger sensitiv gegenüber  $O_2^{\bullet-}$  und Glutathionschwund (Abb. 3.16). Übertragen auf die Situation unter photooxidativem Stress könnte dies Wachstumsvorteile für *R. capsulatus* bedeuten, wenn die Schäden durch Superoxid und Glutathionschwund größer als die durch  $H_2O_2$  wären.

### 4.2.3 Schutzpotential der $^1O_2$ -induzierten

#### Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis-Erhöhung in *R. capsulatus*

*R. capsulatus* induzierte im Gegensatz zu *R. sphaeroides* das *crtI-tspO*-Operon unter photooxidativem Stress (Berghoff et al. 2013; Licht et al. 2020). Es handelt sich um einen der hauptsächlichen Unterschiede in der Stressantwort beider Arten. Im Detail waren nur in *R. capsulatus* nach 10 min photooxidativem Stress sowohl die Phytoendesaturase (*crtI*) und die Phytoensynthase (*crtB*) um über 2  $\log_2$ -Stufen im Transkriptlevel gestiegen. Die qRT-PCR-Ergebnisse validierten auch den  $\log_2$ -Wert von *crtI* (Abb. 3.26). Beide Enzyme stehen zu Beginn der Carotinoidbiosynthese in *Rhodobacter* (Abb. 1.11). Die Induktion von *crtI* und *crtB* führt vermutlich zu den stabilen Carotinoidgehalten in *R. capsulatus* unter photooxidativem Stress und damit zu dem beobachteten, steigenden Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis (Abb. 3.6).

Das steigende Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis könnte bedeuten, dass das Verhältnis von quenchenden Carotinoid-Spezies zum  $^1O_2$ -produzierenden Photosensibilisator BChl *a* gesteigert wird, was die Schäden durch  $^1O_2$  senkt. Hierbei muss beachtet werden, dass nicht alle Carotinoide gute Quencher sind (Martin et al. 1999; Young und Lowe 2018). Speziell in *R. sphaeroides* zeigten Studien, dass Mutanten mit Phytoen als einzigem Carotinoid unter photooxidativem Stress nicht überleben (Glaeser und Klug 2005). Es ist denkbar, dass in den vorliegenden Versuchen *R. capsulatus* verstärkt (Hydroxy-)Spheroidenon akkumulierte, da dieses das wesentliche Carotinoid unter aeroben Bedingungen ist (Schmidt 1978; Šlouf et al. 2012; Yeliseev et al. 1996; Zhu et al. 1986). Allerdings zeigte in *R. capsulatus* das notwendige

Enzym der Spheroidenonsynthese (*crtA*) keinen Anstieg des Transkriptlevels. Tatsächlich zeigte bis auf *crtI* und *crtB* keines der *crt*-Gene einen signifikanten Anstieg mit  $\log_2$ -Werten über 1. Jedoch sind *crtI* und *crtB* möglicherweise die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Carotinoidbiosynthese, welche die Carotinoide Phytoen und Neurosporen bilden – Vorläufermoleküle für Spheroidenon. Bei genügender Aktivität von *crtA* reichte die Anreicherung von Vorläufermolekülen vielleicht schon für erhöhte Spheroidenonlevel aus.

Es liegt nahe, dass ein erhöhtes Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis eine Strategie von *R. capsulatus* gegen photooxidativen Stress ist. Um dies zu bestätigen, müssten weiterführende Analysen, z.B. via HPLC, die Carotinoidzusammensetzung unter photooxidativem Stress zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* vergleichen. Eventuell akkumuliert *R. capsulatus* vergleichsweise (prozentual) mehr Spheroidenon. Die Analyse der Zusammensetzung wäre besonders auch nach 180 min Stress interessant, da in den Proteomics zu diesem Zeitpunkt CrtA um 1,4  $\log_2$ -Stufen in der Abundanz abnahm (Abb. 3.34). Alternativ könnten auch zusätzliche Versuche mit den grünfarbenen Tn5-Mutanten von *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* weitere Einblicke in die Rolle der Carotinoide liefern. Wegen der grünen Farbe (Abb. 3.9) akkumulieren beide Stämme vermutlich Neurosporen (Chi et al. 2015). Bei einem (extremen) Wechsel von aerob zu anaerob/phototroph verlor *R. capsulatus*-Tn5-Grün gegenüber *R. sphaeroides*-Tn5-Grün den Wachstumsvorteil, wie er bei den Wildtypen zu beobachten war (Abb. 3.10); beim Wechsel zu photooxidativem Stress könnte dies auch passieren. Zudem könnte sich in den Tn5-Mutanten zeigen, ob *R. capsulatus* ohne Spheroidenon gegenüber  $^1\text{O}_2$  sensitiver ist als *R. sphaeroides*.

Abschließend ist zum Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis zu erwähnen, dass in beiden Spezies zwar die BChl *a*-Gehalte fielen (Abb. 3.6), jedoch in den Proteomics-Daten nach 90 min deutlich weniger *bch*-Proteine in *R. capsulatus* gesunken waren als in *R. sphaeroides* (Abb. 3.33). In beiden Spezies nahmen BchY und BchZ ab, in *R. sphaeroides* aber zusätzlich auch BchX, BchP, BchE und BchH. In *R. capsulatus* wurde die Abnahme der anderen *bch*-Proteine erst zum letzten Probennahmezeitpunkt bei 180 min Stress detektiert (Abb. 3.34). Da die BChl *a*-Gehalte in *R. capsulatus* mindestens so schnell wie in *R. sphaeroides* fielen, haben eventuell auch hier wenige Abundanzänderungen in *R. capsulatus* ausgereicht, um das Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis zu beeinflussen.

Hohe Carotinoidgehalte verschafften *R. capsulatus* nicht nur einen Vorteil beim Wechsel von aerobem zum anaeroben/phototrophen Wachstum (Abb. 3.1 und 3.5), sie waren im Vergleich zu *R. sphaeroides* wahrscheinlich auch ein wichtigerer Teil der Anpassung an photooxidativen Stress. Die Ergebnisse spiegeln die einer Studie von Kumka et al. (2017) wider. Kumka et al. (2017) vermuteten hinter einer relativ hohen basalen Induktion von *crt*- und *bch*-Transkripten unter aeroben Bedingungen im Dunkeln auch eine Strategie von *R. capsulatus* zur schnellen Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen. Der in

dieser Arbeit beobachtete Anstieg des Carotinoid-BChl *a*-Verhältnisses in *R. capsulatus* unter photooxidativem Stress hängt vermutlich mit der Induktion des *crtI-tspO*-Operons zusammen und unterscheidet *R. capsulatus* von *R. sphaeroides*.

## 4.3 Regulation der $^1\text{O}_2$ -Antwort in *R. capsulatus*

### 4.3.1 Rolle des *rpoEchrR*-Lokus und RpoH

Genau wie in *R. sphaeroides* erhöhte photooxidativer Stress in *R. capsulatus* die Transkriptlevel der Hauptregulatoren der  $^1\text{O}_2$ -Antwort, nämlich *rpoE*, *chrR* sowie *rpoH<sub>II</sub>* und *rpoH<sub>I</sub>* (Tab. 3.3; Licht et al. 2020). Hemmhoftests mit *rpoH*-Mutanten haben bestätigt, dass RpoH<sub>II</sub> in *R. capsulatus* die Rolle der  $^1\text{O}_2$ -Antwort übernimmt, da die Mutanten sensitiver gegenüber  $^1\text{O}_2$  waren (Abb. 3.22). Diese Erkenntnis stimmt mit der Rolle von RpoH<sub>II</sub> in *R. sphaeroides* überein (Anthony et al. 2005; Dufour et al. 2012; Glaeser et al. 2007; Nuss et al. 2010; Nuss et al. 2009). Auch die Syntänie ist für RpoH<sub>II</sub> in beiden Spezies ähnlich (Abb. 3.21). Offen bleibt, wie sehr sich das Regulon von RpoH<sub>II</sub>/RpoH<sub>I</sub> zwischen *R. sphaeroides* und *R. capsulatus* unterscheidet. Transcriptomics-Analysen mit RpoH<sub>II</sub>/RpoH<sub>I</sub>-Mutanten von *R. capsulatus* unter photooxidativem Stress könnten das Regulon ermitteln und Unterschiede zu *R. sphaeroides* feststellen. Solche Unterschiede zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* sind auch beim Redox-Regulator FnrL bekannt und bestehen wahrscheinlich auch für RpoH<sub>II</sub>/RpoH<sub>I</sub> (Kumka und Bauer 2015).

RpoE und ChrR wiesen in beiden Spezies zahlreiche Unterschiede auf. Nur ein kleines Set an Genen des *R. sphaeroides*-Regulons findet sich in *R. sphaeroides* wieder (Tab. 3.3), neben *rpoE* und *chrR* die dauerhaft akkumulierten Transkripte bzw. Proteine von *phrB* und *FolE2*. Homologe von RSP\_1087–1091 sowie RSP\_1409 und RSP\_6222 fehlen in *R. capsulatus*; vielleicht reduziert sich das RpoE-Regulon auf die absolut essentiellen Gene der photooxidativen Stressantwort, ähnlich wie in *Dinoroseobacter denitrificans* (Berghoff et al. 2011b). Die Syntänie des *rpoEchrR*-Lokus in *R. capsulatus* unterschied sich komplett von *R. sphaeroides* und seine Nähe zum photosynthetischen Gen-Cluster und *bsaA1-cryB*-Operon könnte vielleicht auf regulatorische und funktionelle Unterschiede hinweisen (Abb. 3.20). Zum Beispiel war im Transkriptom und Proteom die Glutathionperoxidase *gor* zu allen Probennahmezeitpunkten erhöht (Abb. 3.36), und reduzierte unter Stress Peroxide und Wasserstoffperoxide.

Tatsächlich ist die Syntänie von *rpoEchrR* in *R. capsulatus* einzigartig unter 155 analysierten *Rhodobacteraceae*. Die Unähnlichkeit der Syntänie zeigte sich zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* auch im Syntänie-Plot, wo nur sehr wenige Cluster ähnlich arrangiert waren, etwa das photosynthetische Gencluster (Abb. 3.19). Die Unterschiede der Aminosäuresequenzen sowie Strukturen von RpoE und ChrR bestätigten sich auch in den Stamm-

baumanalysen und den Strukturhomologanalysen: In RpoE- und ChrR-Stammbäumen war *R. capsulatus* näher mit *M. tuberculosis* verwandt als mit *R. sphaeroides* und RskA war mit 24 % Strukturhomologie näher am *R. capsulatus*-ChrR als das *R. sphaeroides*-ChrR mit 13 % (Tab. 3.2 und Abb. 3.17 und 3.18). Diese Strukturhomologie zwischen einem Gram-positiven (*M. tuberculosis*) und einem Gram-negativen Bakterium (*Rhodobacter*) ist ungewöhnlich.

Die Unähnlichkeit der *rpoEchrR*-Loki kontrastiert mit der allgemeinen nahen Verwandtschaft zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*: phylogenetische Studien auf Basis von 580 orthologen Proteinen oder der durchschnittlichen Sequenzähnlichkeiten platzieren *R. capsulatus* und *R. capsulatus* in eine Klade (Brinkmann et al. 2018; Satoh et al. 2013). Denkbar ist, dass starke genetische Modifikationen, Remodeling-Prozesse oder horizontaler Gentransfer die Syntänieunterschiede zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* hervorrufen. Tiefergehende Strukturanalysen von RpoE und ChrR und/oder Omics-Analysen mit Mutanten der Gene könnten weiter entschlüsseln, was die aufgeführten Unterschiede implizieren. Es wäre z.B. interessant herauszufinden, ob das *M. tuberculosis*-RskA einen *R. capsulatus*-*chrR*-Knockout-Stamm komplementieren kann.

### 4.3.2 Kleine RNAs in *R. capsulatus* unter photooxidativem Stress

Über RNA-Seq und *in silico*-Analysen wurden potentielle sRNAs in *R. capsulatus* bestimmt und das Vorwissen über die sRNA RCs01897 (Volk 2016) auf physiologischer Ebene vertieft. Die Vorhersagen der möglichen mRNA-Ziele der sRNAs bedürfen einer Validierung, etwa über Reportergenanalysen, um in Mutanten oder Überexpressionen der sRNAs die Expressionsmuster der Ziele auf Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp bzw. der Leervektorkontrolle zu untersuchen. Die Ziel-mRNA-Vorhersagen von IntaRNA wurden zusätzlich mit denen eines weiteren Tools verglichen. Hätten die analysierten sRNAs genügend Homologe in anderen Vertretern der *Rhodobacteraceae* gehabt, hätte sich hier das vergleichsweise ausgefeilte Copra-Tool geeignet (Pain et al. 2015; Raden et al. 2018; Wright et al. 2014; Wright et al. 2013). Da eine Homolog-Suche mit GlassGO (Lott et al. 2018; Raden et al. 2018) aber keine bzw. zu wenige Treffer ergab, suchte zusätzlich das TargetRNA2-Tool (Kery et al. 2014) nach mRNA-Zielen (Tab. 3.5). Tatsächlich zeigte sich dabei für RCs01296, dass das ABC-Transporter-Substratbindeprotein *livK2* in beiden Analysen eine relativ hohe Position im Ranking (1 und 16) erzielte, was es als möglichen Kandidaten für weitere Untersuchungen interessanter macht. Nach IntaRNA wäre das wahrscheinlichste Ziel die FAD-abhängige Oxidoreduktase RCAP\_rcc00383, deren Regulation im Thiamin-Metabolismus die Iminoglycinsynthese beeinflussen würde (Romine et al. 2017). Wie für *livK2* bleibt soweit allerdings unklar, wie eine Regulation dieser Ziele photooxidativem Stress entgegenwirken könnte. Diese Unklarheit besteht auch

bei den potentiellen Zielen von RCs02783 (RCAP\_rcc02783, CoA-Bindedomänenprotein) sowie von RCs02566 (RCAP\_rcc02285, hypothetisches Protein).

Für die bereits validierte sRNA RCs01897 wurde der XRE-Transkriptionsfaktor RCAP\_rcc02527 als Ziel-mRNA ermittelt. Mit Blick auf kuratierte Datenbanken und experimentell validierte Interaktionen von RCAP\_rcc02527 würde RCs01897 die Regulation folgender Prozesse mitregulieren: Biofilmbildung, Toxin-Antitoxin-Systeme oder Maleat-Cis-Trans-Isomerisierung (Abb. 3.23). Diese Funktionen untermauern die Erkenntnisse der Literatur, dass XRE-Transkriptionsfaktoren nicht mit oxidativen Stressantworten assoziiert sind. Eine Ausnahme wäre allerdings eine Studie von Hu et al. (2019). In der Studie trug der XRE-Transkriptionsfaktor SrtR in *Streptococcus suis* zur Toleranz gegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei. Es wäre möglich, dass dies auch auf *R. capsulatus* zutrifft und RCs01897 die Translationsrate von RCAP\_rcc02527 erhöht: In den Hemmhofstests zeigte die RCAP\_rccRCs01897-Überexpression im Vergleich zur Leervektorkontrolle eine verringerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Sensitivität und nach ca. 4 h photooxidativem Stress eine größere Wachstumsrate (Abb. 3.24). Diese Interaktion müsste experimentell ebenfalls validiert werden.

## 4.4 Funktionelle Unterschiede der <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Antwort zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*

### 4.4.1 CbiX und das *crtI-tspO*-Operon als potentielle Schlüsselfaktoren der photooxidativen Stressantwort in *R. capsulatus*

Während der photooxidativen Stressantwort unterschied sich *R. capsulatus* von *R. sphaeroides* neben einem höheren Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis vor allem durch die dauerhafte Akkumulation von *cbiX*-Transkripten und -Proteinen (Abb. 3.36). Vermutlich verringert CbiX ebenso wie TspO die Bildung von Fenton-Reaktion-abgeleiteten ROS und des Photosensibilisators Protoporphyrin IX.

#### 4.4.1.1 Eisenchelation durch CbiX zur Vermeidung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Fenton-Reaktion

Unter photooxidativem Stress stiegen die Transkript- bzw. Proteinlevel von *cbiX* in *R. capsulatus* dauerhaft um knapp 3–4 log<sub>2</sub>-Stufen (Abb. 3.27, 3.31, 3.32 und 3.34), während das homologe RSP\_1566 in *R. sphaeroides* keinen Anstieg verzeichnete (Berghoff et al. 2013). Die qRT-PCR-Daten (Abb. 3.26) bestätigen diese Ergebnisse. In der Literatur ist *cbiX* als Sirohydrochlorin-Cobalt-Chelatase beschrieben, welche den Einbau von Cobalt in Precorrin 2 und damit die Vitamin B<sub>12</sub>-Biosynthese katalysiert. Aus mehreren Gründen

scheint *cbiX* allerdings eine andere Funktion zu haben, nämlich als Ferrochelatase zur Biosynthese von Sirohäm.

Die *cbi*-Gene sind der anaeroben Biosynthese von Vitamin B<sub>12</sub> zugeschrieben (Scott und Roessner 2002) und viele der Intermediate dieses Stoffwechselwegs sind sauerstoffsensibel (Moore und Warren 2012). Jedoch nahm *cbiX* unter aeroben Bedingungen stark in der Abundanz zu. Außer *cbiX* stieg auch nur *cbiZ* in den Omics-Daten, und hier nur im Transkriptom ( $\log_2$ -Wert von 1,5; Abb. 3.27). Demnach ist es unwahrscheinlich, dass die Funktion von *cbiX* die der anaeroben Vitamin B<sub>12</sub>-Synthese ist.

Ein Anstieg der Vitamin B<sub>12</sub>-Konzentration durch *cbiX* wäre zwar theoretisch hilfreich unter oxidativem Stress, jedoch sind die Antioxidant-Funktionen von Vitamin B<sub>12</sub> in der Literatur eukaryotischen bzw. menschlichen Zellen zugeschrieben: ROS-Scavenging (von O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), erhöhte Superoxiddismutase- und Katalase-Aktivitäten, Glutathionerhalt sowie weniger Homocystein-abgeleiteter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress (zusammengefasst von van de Lagemaat et al. 2019). Dass die Literatur diese Schutzfunktionen überwiegend eukaryotischen Zellen zuordnet, macht es unwahrscheinlicher, dass das Ziel der *cbiX*-Akkumulation in *R. capsulatus* höhere Vitamin B<sub>12</sub>-Level sind.

Des Weiteren ist die Funktion als Cobaltochelatase zur Vitamin B<sub>12</sub>-Biosynthese für *cbiX* auch aus regulatorischen Gründen unwahrscheinlich. Der Antirepressor AerR benötigt Vitamin B<sub>12</sub> als Cofaktor, um den Photosynthese-Gen-Repressor CrtJ zu binden (Cheng et al. 2014). Eine weitreichende Induktion von Photosynthese-Genen blieb allerdings aus und sowohl die Carotinoid- als auch die BChl *a*-Level sanken über die Zeit kontinuierlich (Abb. 3.6). Nach 180 min photooxidativem Stress zeigte der GO-Term für Photosynthese auch eine signifikante Abnahme, während das Protein-Level von CbiX über 4  $\log_2$ -Stufen erhöht war (Abb. 3.34) – die stärkste Anreicherung in den Proteomics.

Die Literatur und Beobachtungen widersprechen der Funktion von *cbiX* als Cobaltochelatase in *R. capsulatus*. Gegenbeispiele aus der Literatur, Analysen und die vorliegenden Daten sprechen stattdessen dafür, dass *cbiX* als Ferrochelatase das terminale Enzym der Sirohäm-Biosynthese in *R. capsulatus* ist.

Studien zeigen, dass CbiX (oder auch CbiK und CobA) in Alphaproteobakterien wie *Paracoccus* das multifunktionale Enzym CysG in seiner Funktion als Eisenchelatase für die Sirohäm-Biosynthese ersetzen kann, falls dieses fehlt (Bali et al. 2014; Roessner et al. 2002; Scott und Roessner 2002). Im Detail ersetzt CbiX dabei die Ferrochelatase-Funktion des N-Terminus von CysG (CysG<sub>B</sub>, Roessner et al. 2002). Das oftmals als Cobaltochelatase annotierte CbiX weist dabei eine ähnliche Topologie zur Ferrochelatase auf (Moore und Warren 2012), was auch für *R. capsulatus* zutrifft: eine PHYRE2-Analyse ermittelte eine Ferrochelatase als ähnlichstes Strukturhomolog.

Die CbiX-Anreicherung könnte auf verschiedene Arten photooxidativem Stress entgegenwirken. Eine erhöhte CbiX-Aktivität und damit eine höhere Sirohäm-Konzentration könnte

*R. capsulatus* helfen, den Glutathion-Pool aufrechtzuerhalten und Proteine zu reparieren. Sirohäm ist ein Co-Faktor assimilatorischer Nitrit- und Sulfitreduktasen (Bali et al. 2014) und gerade die Schwefelassimilation könnte zur Glutathionregeneration beitragen. Da  $^1\text{O}_2$  vor allem schwefelhaltige Aminosäuren beschädigt, wäre die Schwefelassimilation hilfreich zur Reparatur von Aminosäuren (Davies 2003; Pattison et al. 2012). Dies würde auch die hohen Transkriptlevel von CysI von über 3  $\log_2$ -Stufen erklären, die in *R. capsulatus* nach 10 min photooxidativem Stress auftraten (Abb. 3.27).

Ungeachtet des Sirohäms hätte eine erhöhte Ferrochelatase-Aktivität in *R. capsulatus* aber auch den Vorteil, dass der Gehalt an freiem Eisen in der Zelle abnimmt und damit weniger ROS durch die Fenton-Reaktion entstehen. Auch würde der Tetrapyrrolmetabolitflux sich weg von Protoporphyrin IX und hin zu Sirohäm bewegen, womit die  $^1\text{O}_2$ -Produktion durch den Photosensibilisator Protoporphyrin IX sinken würde. Es ist denkbar, dass in diesem Kontext auch die erhöhte Abundanz der Ferrochelatase HemH (Abb. 3.32 und 3.34) den gleichen Zweck wie CbiX in *R. capsulatus* erfüllt: als Protoporphyrin-/Coproporphyrin-Ferrochelatase verbraucht HemH auch Protoporphyrin IX zur Bildung von Cytochromen (Yin und Bauer 2013). Da sowohl CbiX als auch HemH nur in *R. capsulatus*, aber nicht in *R. sphaeroides* akkumuliert waren, scheinen die Umleitung des Metabolitfluxes weg von Protoporphyrin IX und die Verringerung freien Eisens charakteristische Strategien der  $^1\text{O}_2$ -Antwort in *R. capsulatus* zu sein. Zwar zeigten sowohl *R. capsulatus* als auch *R. sphaeroides* nach 90 min photooxidativem Stress eine Anreicherung von Eisenchelatoren und -transportern (FeoB1, HemH, SufC, RCAP\_rcc02325, CbiX, RCAP\_rcc00046 in *R. capsulatus*; RSP\_2395, CcMC, CycF, Bfr in *R. sphaeroides*; Abb. 3.32), aber *R. capsulatus* würde gleichzeitig den Metabolitflux weg von Protoporphyrin IX leiten. Genau diese Umlenkung des Metabolitfluxes zur Stressvermeidung stellten auch Studien für *Shewanella oneidensis*, *Shewanella loihica* PV-4 und Reis (*Oryza sativa*) fest (Dai et al. 2015; Kim et al. 2014; Qiu et al. 2016). Im Detail steht HemH2 in *Shewanella loihica* PV-4 unter der Kontrolle von RpoE2 und wirkt Stress durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  und durch von Licht angeregtem Protoporphyrin IX entgegen.

Überexpressions- und Knockoutstämme von *cbiX* könnten dessen Wirkung an der photooxidativen Stressantwort ermitteln, etwa durch Vergleichen der  $^1\text{O}_2$ -Produktion. Auch könnten weiterführende Versuche die Affinität von CbiX für Eisen und Cobalt testen: analog zu Bali et al. (2014) könnte *R. capsulatus* in einem Cystein-freien Minimalmedium kultiviert werden, zu dem in steigenden Konzentrationen exogenes Cobalt hinzugefügt wird. Wäre CbiX affiner für Eisen, müsste auch bei höheren Cobalt-Konzentrationen *R. capsulatus* noch wachsen können, da es weiterhin genug Sirohäm als Cofaktor für Sulfitreduktasen zur Schwefelassimilation synthetisiert.

Zusammenfassend deuten die Literatur und die Ergebnisse darauf hin, dass sich *R. capsulatus* im Gegensatz zu *R. sphaeroides* unter photooxidativem Stress stärker auf die

Chelation von Eisen und die Verringerung des Photosensibilisators Protoporphyrin IX fokussiert.

#### 4.4.1.2 Potentielle Vermeidung der Protoporphyrin IX-Bildung durch *crtI-tspO*-Expression in *R. capsulatus*

Die Induktion des *crtI-tspO*-Operons durch  $^1\text{O}_2$  wurde bereits in Abschnitt 4.2.3 in Bezug auf das Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis in *R. capsulatus* diskutiert. Speziell die Induktion von *tspO* könnte einen weiteren Unterschied zur Stressantwort von *R. sphaeroides* markieren, welcher an die Induktion von *cbiX* und *hemH* anknüpft: die Verringerung von photooxidativem Stress durch Protoporphyrin IX.

Als sogenanntes Tryptophan Rich Sensory Protein ist TspO ein Modulator der Photosyntheseexpression (Zeng und Kaplan 2001), welcher in *R. sphaeroides* vermutlich über AppA auch nachweislich die Konzentration des Protoporphyrin IX-Vorläufers Porphyrin über dessen Efflux negativ beeinflusst. Auf diese Weise würde *R. capsulatus* unter Stress weiterhin die Protoporphyrin IX-Konzentration verringern, um zusätzlichen photooxidativen Stress zu vermeiden.

#### 4.4.2 *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* teilen sich mit verschiedenen Genen eine ähnliche Kernantwort auf $^1\text{O}_2$

Die Omics-Analysen zeigten, dass in *R. capsulatus* mehrere Transkripte bzw. Proteine der Protein- und DNA-Reparatur sowie der (photo-)oxidativen Stressantwort angereichert waren, ähnlich wie in *R. sphaeroides*. Einige von diesen waren zu allen Probennahmezeitpunkten angereichert und können neben RpoE, ChrR und RpoH<sub>II</sub>/RpoH<sub>I</sub> als Kern der  $^1\text{O}_2$ -Antwort in *R. capsulatus* gelten (Abb. 3.36). Diese Ergebnisse bestätigen die früherer Omics-Analysen in *R. sphaeroides* (Berghoff et al. 2013), aber im Vergleich zeigen sich Detailunterschiede zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*.

##### 4.4.2.1 Schutz des Proteoms

Über alle Probennahmezeitpunkte des photooxidativen Stresses akkumulierte *R. capsulatus* Transkripte bzw. Proteine mit Funktion in Proteinumsatz und -reparatur (Abb. 3.27, 3.31, 3.32 und 3.34). In dieser funktionellen Gruppe zeigte sich zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* auch die größte Übereinstimmung unter den Anreicherungen, was die Wichtigkeit dieser Proteine für die Stressantwort unterstreicht. Neben den potentiellen Proteasen RCAP\_rcc03333/RSP\_1490 und der ATP-abhängigen Protease ClpA reicherten beide Spezies Methioninsulfoxidreduktase an. Die Methioninsulfoxidreduktasen reduzieren zusammen mit Thioredoxin oxidiertes Methionin, ein charakteristisches Ziel für  $^1\text{O}_2$ . Es scheint, dass *R. capsulatus* in seiner Stressantwort stärker als *R. sphaeroides*

auf Methioninsulfoxidreduktasen setzt bzw. setzen muss, weil mehr Methionine oxidieren. Nicht nur hatte bei 90 min Stress *R. capsulatus* mit MrsB2 die Abundanz eines weiteren Methioninsulfoxidreduktasen-Paralogs erhöht (ebenfalls wie MrsB1 dauerhaft), es war auch das einzige Protein, welches *R. capsulatus* mehr als doppelt so hoch anreicherte wie *R. sphaeroides* ( $\log_2$ -Wert von 2,9 vs. 1,3; Abb. 3.32). Hinzu kommt, dass *R. capsulatus* zu diesem Zeitpunkt außerdem das potentielle Thioredoxin RCAP\_rcp00082 exklusiv akkumulierte. Auf Transkriptomenebene deutet die *R. capsulatus*-spezifische Anreicherung von Thioredoxin-Transkripten (*trxA1*, *trxC* und *trxB*) ebenfalls auf eine stärkere Gewichtung der Methioninsulfoxidreduktion hin (Abb. 3.27). *R. capsulatus* könnte bzw. müsste damit mehr als *R. sphaeroides* Proteine vor Aggregation, Fehlfaltung und Fragmentierung bewahren (Pattison et al. 2012).

Möglicherweise sind Methioninsulfoxidreduktasen und Thioredoxine für *R. capsulatus* unter photooxidativem Stress wichtig, um  $^1\text{O}_2$ -abgeleitetem  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stress entgegenzuwirken: in Beta-Galaktosidase-Assays bezweckte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stress einen dreifachen Anstieg der Miller Units für *msrB2* (Abb. A.5). Passend dazu zeigten frühere Studien via qRT-PCR auch einen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten Anstieg von *trxC* in *R. capsulatus* (Zeller et al. 2006). In Anbetracht der relativ kleinen Spanne von Miller Units (20–60) ist zu beachten, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  die Aktivität der Beta-Galaktosidase im Assay verringert haben könnte (Hendrischk et al. 2007). Andere Methoden wie qRT-PCR sollten den Anstieg von *msrB2* durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  bestätigen.

Ergänzend zum Proteom zeigen die RNA-Seq-Daten, dass in *R. capsulatus* nur zu Beginn des photooxidativen Stresses Transkripte der Aminosäurebiosynthese in der Abundanz stiegen (Abb. 3.27). Darunter fallen neben *gltD* auch *cysI* und *cysH*, welche die Aminosäuren Cystein und Methionin synthetisieren, zwei typische  $^1\text{O}_2$ -Ziele. Offenbar akkumuliert *R. capsulatus* diese zu Beginn des Stresses, um genügend Ressourcen zur Proteinreparatur zu haben. Ähnlich ließe sich die Akkumulation von *serA*-Transkripten dadurch erklären, dass SerA an der Glutathion-Biosynthese beteiligt ist, womit *R. capsulatus* zu Beginn des Stresses auch den Glutathion-Pool erhöhen würde.

Allgemein priorisierten unter photooxidativem Stress *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* stark den Schutz und die Reparatur ihrer Proteine (Abb. 3.32; Berghoff et al. 2013). Dies macht Sinn, da ca. 50% der bakteriellen Zellmasse Proteine sind und Enzyme auch zahlreiche Prozesse katalysieren. Allein der Ausfall der Enzym-katalysierten Reparatur- und Entgiftungsprozesse würde den Zelltod bedeuten. Die Ergebnisse für *R. capsulatus* spiegeln nicht nur die von *R. sphaeroides* wider (Berghoff et al. 2013). Vielmehr betonen sie auch die Annahme, die sich aus Stressstudien mit dem polyextremen *Deinococcus radiodurans* ergeben hat: In einer Stresssituation mit ROS-induzierten DNA-Schäden ist der Schutz des Proteoms wichtiger als der der DNA, da Enzyme alle lebensnotwendigen Vorgänge katalysieren, inklusive der DNA-Reparatur (Krisiko und Radman 2013; Slade und Radman

2011). Ein Proteom-spezifischer Schutz könnte z.B. die Akkumulation von chemischen Antioxidantien wie  $Mn^{2+}$ -Komplexen sein, welche als  $O_2^{\bullet-}$ -Scavenger wirken (Daly 2009; Robinson et al. 2011). Zusammenfassend zeigte die LC-MS/MS-Analyse, dass *R. capsulatus* ähnlich wie *R. sphaeroides* viele Enzyme des Proteinumsatzes und der -reparatur stark akkumuliert.

#### 4.4.2.2 DNA-Schutz

Da Proteine die Hauptziele von  $^1O_2$  sind, ist es wenig überraschend, dass in den Omics vergleichsweise wenig Enzyme der DNA-Reparatur in *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* akkumulierten. Die kleinere Rolle gegenüber dem Proteomschutz zeigt sich auch in der Abundanz von der A-/G-spezifischen Adenin-Glycosylase *mutY*, welche  $^1O_2$ -induzierte 8-OHdG-Residuen repariert: in *R. capsulatus* war *mutY* nur zu Anfang des Stresses im Transkriptlevel angereichert (Abb. 3.27). Den Proteomdaten nach 90 min Stress zufolge waren angestiegene Abundanzwerte der UvrC-Untereinheit sowie die einer Photolyase (PhrB, *R. capsulatus*) bzw. DNA-Ligase (Lig2, *R. sphaeroides*) ausreichend für die DNA-Reparatur (Abb. 3.32). Die Photolyase PhrB war dabei in allen Probennahmezeitpunkten angereichert und stellt entsprechend auch einen Teil der Kernantwort in *R. capsulatus* dar (Abb. 3.36). Die durch UV-Licht aktivierte Photolyase PhrB repariert UV-induzierte DNA-Schäden.

Was Unterschiede in der DNA-Reparatur zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* angeht, fällt die ebenfalls zu allen Zeitpunkten angereicherte anaerobe Ribonukleosid-Triphosphatreduktase NrdD in *R. capsulatus* auf, welche kein Homolog in *R. sphaeroides* hat (Abb. 3.36). Theoretisch hätte eine erhöhte NrdD-Abundanz zwei Vorteile bei photooxidativem Stress: Es werden zum einen mehr Desoxyribonukleotide für die DNA-Reparatur und -Synthese produziert, zum anderen spaltet NrdD S-Adenosylmethionin zu Methionin, welches bei  $^1O_2$ -Stress durch Oxidation verbraucht wird (Ollagnier et al. 1997). Allerdings ist NrdD als Klasse III Ribonukleosidreduktase strikt anaerob, weil das Glycilradikal am C-Terminus von NrdD sauerstoffempfindlich ist (Sun et al. 1993; Torrents et al. 2002; Torrents et al. 2001). Trotzdem war unter photooxidativem Stress und damit unter aeroben Bedingungen nicht nur NrdD akkumuliert, sondern auch das Transkript des dazugehörigen Aktivators RCAP\_rcc03344. Weitere Analysen müssten klären, ob die theoretischen Vorteile für erhöhte NrdD-Level unter photooxidativem Stress auch praktisch für *R. capsulatus* zutreffen. Im Vergleich zeigte interessanterweise NrdJ1/2 als aerobe/anaerobe Ribonukleosidreduktase keine Anstiege in den Omics.

### 4.4.3 Zunahmen von Transkripten und Proteinen von Reduktions-Oxidations-Prozessen und sonstiger funktioneller Gruppen

Grundsätzlich können beobachtete Abundanzveränderungen unter photooxidativem Stress auch bedingt sein durch die aeroben Bedingungen, die Wachstumsphase oder andere, von der  $^1\text{O}_2$ -Antwort unabhängige Faktoren. Abseits der naheliegenden Anpassungen wie der Proteinreparatur fielen allerdings einige dauerhafte und/oder starke Abundanz erhöhungen in *R. capsulatus* auf, deren Funktion in Bezug auf die photooxidative Stressantwort unklar ist.

Zu den auffälligen akkumulierten Transkripten und Proteinen von *R. capsulatus* gehört dabei MacA, welches unter photooxidativem Stress dauerhaft erhöht war und kein Homolog in *R. sphaeroides* hat (Abb. 3.36). Als Makrolidexport-ABC-Transporter katalysiert MacA den Efflux von Makrolid-Antibiotika und ist damit vermutlich nicht an der  $^1\text{O}_2$ -Abwehr beteiligt. Makrolid-Antibiotika behindern die Proteinbiosynthese, indem sie an die 50S Ribosomenuntereinheit binden (Dinos 2017). Es wäre von daher denkbar, dass *R. capsulatus* allgemein versucht, das durch  $^1\text{O}_2$ -gestresste Proteom vor weiterem Stress durch Makrolide zu bewahren. Antagonisten im gleichen Habitat könnten solche Makrolide sekretieren. Allerdings sind terrestrische Streptomyceten die hauptsächlichen Makrolid-Produzenten, insofern kämen vielleicht *Micromonospora* in Süßgewässern als Antagonisten in Frage (de Menezes et al. 2008; Trujillo et al. 2015).

Ebenfalls dauerhaft angereichert waren unter photooxidativem Stress in *R. capsulatus* zudem auch RCAP\_rcc03258 sowie RCAP\_rcc01368 (Abb. 3.36). Die Anreicherung des Cytochrom c Biogenese Proteins RCAP\_rcc03258 überrascht wenig, mit Blick auf die aeroben Bedingungen und die Antioxidant- bzw. Redoxhomeostase-Funktion von Cytochrom c. Ohne ausreichende Cytochrom c-Mengen würde der Elektronentransport in der Atmungskette verringert und die  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentration steigen. Im Gegensatz dazu hing die Anreicherung der Antibiotika-Biosynthese-Monooxygenase RCAP\_rcc01368 wahrscheinlich ausschließlich mit den aeroben Bedingungen zusammen. Nur unter aeroben Bedingungen produziert dieses Enzym Antibiotika. Die RCAP\_rcc01368-Anreicherung ist allerdings möglicherweise ein Indikator, dass *R. capsulatus* effizient mit dem oxidativen Stress umgehen konnte. *Lactobacillus acidophilus* z.B. senkt unter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stress die Aktivität seiner Antibiotika-Biosynthese-Monooxygenase, da dieses Enzym auch ROS-Nebenprodukte produziert (Calderini et al. 2017).

Nur im Transkriptlevel und nur in *R. capsulatus* zeigten drei Transkripte der Kohlenstofffixierung um 2–3  $\log_2$ -Stufen erhöhte Level unter photooxidativem Stress, nämlich die Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase-Untereinheiten *cbbL* und *cbbM* sowie *gap1* (Abb. 3.27). Es ist unklar, ob jenseits der Kohlenstofffixierung diese Enzyme eine besondere Rolle

in der photooxidativen Stressantwort haben. In den Beta-Galaktosidase-Assays zeigte sich keine Induktion von *cbbL* durch  $H_2O_2$  (Abb. A.5), aber zumindest gibt eine Studie von Hanson und Tabita (2001) anhand von *Chlorobium tepidum* Aufschluss über die Rolle von *cbbL* und *cbbM* unter oxidativem Stress. Eine Mutation von 1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase-ähnlichen Proteinen erhöhte die Aktivität der Superoxiddismutase (Hanson und Tabita 2001), womit hier eine Verbindung zur oxidativen Stressantwort für *R. capsulatus* denkbar wäre.

Unklar bleibt, warum *R. capsulatus* im Gegensatz zu *R. sphaeroides* unter photooxidativem Stress die Transkripte und Proteine der Ornithindecaboxylase Ldc akkumulierte (Abb. 3.32 und 3.34), welche für die Biosynthese von Polyaminen wie Putrescin zuständig ist. Zwar ist u.a. bekannt, dass *E. coli* als Antwort auf oxidativen Stress Putrescin anreichert (Tkachenko et al. 2001), jedoch könnten Polyamine auch den gegenteiligen Effekt erzielen: Studien zeigen für *R. sphaeroides* bei erhöhten Spermidinkonzentrationen und photooxidativem Stress eine erhöhte ROS-Produktion und Sensitivität gegenüber organischen Peroxiden (Peng et al. 2016).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass mehrere Transkripte und Proteine der Oxidations-Reduktions-Prozesse wie MacA, RCAP\_rcc01368 oder *cbbL* zwar dauerhaft eine relativ hohe Akkumulation unter Stress zeigten, diese aber nicht direkt photooxidativem Stress entgegenwirken zu scheinen.

#### 4.4.4 Abnahmen von Transkripten und Proteinen

##### 4.4.4.1 Abnahme von Transkripten und Proteinen für Transportprozesse

Bei den Abnahmen von Transkripten und Proteinen unter photooxidativem Stress zeigten sich im Gegensatz zu den Zunahmen kaum fortlaufende Muster oder hohe  $\log_2$ -Werte (Abb. 3.28, 3.31, 3.33, 3.34 und 3.37). Allgemein zeigten sowohl *R. capsulatus* als auch *R. sphaeroides*, dass nach 10 min Stress v.a. Transporter in der Abundanz sanken (Abb. 3.28). Dies lag vielleicht daran, dass  $^1O_2$  neben Proteinschäden auch Lipidperoxidation induziert, welche das Membranpotential und Transportprozesse disruptiert (Joshi et al. 2011; Riske et al. 2009). Theoretisch könnten die Schäden an Biomolekülen in einer Stresssituation den Import von Aminosäuren oder Monosacchariden als Ressourcen zur Reparatur begünstigen (Slade und Radman 2011). Allerdings wuchs *R. capsulatus* in den Versuchen in Minimalmedium, womit eine Akkumulation von Transportern für z.B. den Import von Polyaminen nutzlos wäre. Die Abnahme von Transportern war nur im Transkriptom für 10 min Stress präsent und setzte sich auf Proteomebene nicht fort (Abb. 3.37).

Als Schutz gegen  $^1O_2$  könnte allerdings die Abnahme der Polyamintransporter-Transkripte wie etwa die von *potA1* gelten. In *R. sphaeroides* bindet die sRNA SorX unter

photooxidativem Stress an *potA*. Eine dadurch bezweckte Senkung der Translationsrate könnte den Import von Polyaminen wie Spermidin vermindern, womit weniger das Reduktant Glutathion in seiner Reaktion mit Spermidin zu Glutathionylspermidin verloren ginge (Peng et al. 2016). Analog zu diesen Studien könnte überprüft werden, ob in *R. capsulatus* eine Spermidinzugabe höhere ROS-Level und Sensitivität gegenüber  $^1\text{O}_2$  auslöst.

#### 4.4.4.2 Abnahme von Transkripten und Proteinen für Fortbewegung, Signaltransduktion und Gasvesikel

Unter photooxidativem Stress zeigte *R. capsulatus* Abnahmen von Transkripten und Proteinen der Signaltransduktion und Fortbewegung (Abb. 3.28, 3.33 und 3.34). Viele Proteine (wie etwa CheW2) sind GO-Termen dieser beiden Funktionen zugeordnet, sodass beide GO-Terme ihre Abundanz gleichzeitig verringerten. Die Ergebnisse bestätigen die gleichen Beobachtungen im Proteom von *R. sphaeroides* unter photooxidativem Stress (Berghoff et al. 2013). Beide Arten verringerten z.B. die Abundanz des Chemotaxisproteins McpH nach 90 min Stress (Abb. 3.33). Eines der wenigen, zu mehreren Probennahmezeitpunkten abgenommenen Transkripte bzw. Proteine war in *R. capsulatus* MpcA3, um ein weiteres Beispiel zu nennen (Abb. 3.37). Die Abundanzsenkungen der GO-Terme für Signaltransduktion und Chemotaxis beruhen vermutlich darauf, dass ROS Phosphatasen und Kinasen inaktivieren (Pattison et al. 2012).

Bezüglich der Signalübertragung ist die Abnahme von *pcl*-Transkripten interessant (Abb. 3.28), welche für Biosyntheseproteine des Photoactive Yellow Protein (PYP) kodieren (Kyndt et al. 2004). Diese Abnahme könnte zwei Beobachtungen unter den Abnahmen erklären, nämlich die des PYP und die von Transkripten der Gasvesikelformation. Die Abnahme eines PYP-Biosynthese-Proteins erklärt die abfallende Abundanz von PYP in *R. capsulatus* nach 90 und 180 min Stress (Abb. 3.37). Es ist unwahrscheinlich, dass dies einen Unterschied zur Stressantwort von *R. sphaeroides* markiert, welches kein PYP-Homolog hat, vermutlich durch Herausselektion in der Laborkultivierung (Kyndt et al. 2004). Des Weiteren reguliert *pcl* in *R. capsulatus* mutmaßlich die Transkription der benachbarten Gasvesikelgene, deren Expression bei hoher Lichtstärke und Sauerstoffsättigung abnimmt (Kyndt et al. 2004) – genauso wie es in den Versuchen beobachtet wurde (Abb. 3.28). Hierbei könnte es sich um eine Anpassung an den photooxidativen Stress handeln, da Gasvesikel *R. capsulatus* zur Wasseroberfläche treiben würden, wo aufgrund der hohen Lichtintensität und Sauerstoffkonzentration der photooxidative Stress sehr hoch ist.

#### 4.4.4.3 Abnahme von Transkripten und Proteinen des Citratzyklus

Mehrere unter photooxidativem Stress verringerte Transkripte in *R. capsulatus* kodieren Proteine, die Stoffwechselprodukte des Citratzyklus synthetisieren oder in diesen einschleusen (Abb. 3.28). Je aktiver der Citratzyklus ist, desto mehr wird das Reduktant NADPH verbraucht und desto mehr Elektronen gelangen zur Atmungskette, wodurch mehr ROS entstehen können. Insofern könnte eine Abnahme dieser Transkripte gegen oxidativen Stress helfen. Zum Beispiel sanken die Transkriptlevel von *lpdA2* und *lpdA1* (Dihydrolipoyl-Dehydrogenase) und Komponenten der Pyruvat-Dehydrogenase (*pdhCBA*), welche alle Acetyl-CoA produzieren. Auch sank das Transkriptlevel des Pyruvatproduzenten *maeB1* sowie von *argH2*, welches bei der Arginin-Synthese Fumarat als Nebenprodukt freigibt (Janausch et al. 2002).

Das Umleiten von Metaboliten um den bzw. im Citratzyklus über alternative Wege wie dem Glyoxylat-Bypass ist eine bekannte Strategie, um ROS aus der Atmungskette zu vermindern (Liu et al. 2003). Die vorliegenden Ergebnisse für *R. capsulatus* würden hiermit eine Gemeinsamkeit zu *R. sphaeroides* zeigen, welches auch auf diese Strategie setzt. Studien zeigten, wie die sRNA SorY etwa den Malatimporter TakP herunterreguliert, um weniger Malat in den Citratzyklus einzubringen (Adnan et al. 2015). Ähnlich reprimierte eine Überexpression der sRNAs CcsR1–4 mehrere Gene des C1-Metabolismus, auch die, die für Untereinheiten der Pyruvatdehydrogenase kodieren (Billenkamp et al. 2015).

#### 4.4.4.4 Abnahme von Transkripten und Proteinen diverser Funktionen

Einige weitere Transkripte und Proteine zeigten unter photooxidativem Stress eine gesunkene Abundanz, welche mitunter auch zur spezifischen Stressantwort von *R. capsulatus* gehören könnte. Beispielsweise sanken nur in *R. capsulatus* die Transkriptlevel der Hydroxypyruvatreduktase *ttuD*, einer der wenigen Fälle einer um 2  $\log_2$ -Stufen gesunkenen Transkriptabundanz (Abb. 3.28). Dies könnte gegen oxidativen Stress insofern helfen, weil TtuD unter Verbrauch von D-Glycerat und NADP<sup>+</sup> Hydroxypyruvat bildet, welches wiederum durch Eisen oxidiert weitere ROS oder Cytotoxika wie Glyoxal bildet (Yang et al. 2011). Ebenfalls um 2  $\log_2$ -Stufen sank *hoxH*, zusammen mit seinem Maturation Factor *howW* (Abb. 3.28). HoxH fungiert laut GO-Term als Ferredoxinhydrogenase, welche reduzierte Ferredoxine oxidiert. Eine gesunkene Aktivität von HoxH (und HoxW) würde in *R. capsulatus* den Pool an reduzierten Ferredoxin aufrechterhalten, um oxidativem Stress entgegenzuwirken.

Ungeachtet der bereits diskutierten späteren Abnahmen der Photosyntheseproteine zeigte *R. capsulatus* bei den Proteinabnahmen nur wenige markante Unterschiede zu *R. sphaeroides*. Nach 45 min Stress sank die Abundanz mehrerer Membranproteine inklusive des Zellteilungsproteins FtsK (Abb. 3.31), welches in der SOS-Antwort normalerweise

angereichert wird (Wang und Lutkenhaus 1998). FtsK zeigte im Proteom dauerhaft eine verringerte Abundanz (Abb. 3.37), auch als zu 90 min Stress der Repressor der SOS-Antwort (LexA) in der Abundanz sank (Abb. 3.33). Eventuell waren trotzdem genügend FtsK-Proteine für die korrekte DNA-Lokalisation und Zellteilung aktiv, in Anbetracht ausgebliebener Wachstumsdefizite in *R. capsulatus*. Anderenfalls haben vielleicht andere Fts-Proteine FtsK ersetzt, so wie Studien es für *E. coli* bereits zeigten (Geissler und Margolin 2005).

Vermutlich unbedeutend als Teil einer Strategie gegen  $^1\text{O}_2$ -Stress war die dauerhafte Verringerung von RCAP\_rcc01012 in *R. capsulatus* (Abb. 3.37). Einer Blast-Analyse nach handelt es sich hier um die *Rhodobacter*-Phage RcapMu5 (Fogg et al. 2011). Wie bei den gesunkenen Transportertranskripten basiert die dauerhafte Abnahme des Oligopeptid-Transporter-Proteins OppA2 (Abb. 3.37) vermutlich darauf, dass *R. capsulatus* im Minimalmedium keine Verwendung für den Import von Biomolekülen hat, welche im Medium fehlen.

#### 4.4.4.5 Abnahme von Transkripten und Proteinen nach 180 min photooxidativem Stress

Nach 180 min photooxidativem Stress zeigte *R. capsulatus* die meisten Abnahmen im Proteom (Abb. 3.34). Die Abnahme des GO-Terms für Photosynthese und Isoprenoidbiosynthese ging einher mit der Herunterregulation der Photosynthesegene unter den Versuchsbedingungen. Nur die zeitliche Verzögerung zu *R. sphaeroides* ist im Vergleich auffällig, aber, wie in Abschnitt 4.2.3 diskutiert, war die Abnahme von BchY und BchZ nach 90 min Stress vielleicht schon ausreichend in *R. capsulatus*, um die Bildung von weiterem  $^1\text{O}_2$  durch BChl *a* zu verringern.

Die BiNGO-Analyse ergab eine signifikante Abnahme des Terms der Leucinbiosynthese. Als Enzyme mit [4Fe-4S]-Clustern könnten LeuCD primäre Ziele von reaktiven Sauerstoffspezies sein, allerdings könnten auch Veränderungen im Glutathionhaushalt in *R. capsulatus* die Abundanz verringert haben – zumindest verringert ein Mangel des Glutathion-Äquivalents Bacillithiol in *Bacillus subtilis* die Aktivität von LeuCD (Fang und Dos Santos 2015).

Die zu 90 und 180 min detektierte Abnahme der Polyhydroxyalkanoatdepolymerase deutet darauf hin, dass *R. capsulatus* zu dieser Stresssituation keine Polyhydroxyalkanoate abbauen konnte bzw. musste, welche (wie z.B. Poly-3-Hydroxybutyrate) als Kohlenstoff- bzw. Energiequelle dienen (Peña et al. 2014). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass *R. capsulatus* Energiereserven wie Poly-3-Hydroxybutyrate unter photooxidativem Stress nicht vermehrt anlegt.

Als Kontrast zu den gestiegenen Proteinen der Protein- und DNA-Reparatur fällt die Abnahme des Cold Shock Proteins CspD zu 180 min Stress auf. Cold Shock Proteine ver-

hindern als RNA-Chaperone die Bildung von Sekundärstrukturen, um die Translationsrate zu erhalten. Sie sind in Stresssituationen wie Kälte aktiv, aber auch unter oxidativem Stress (Keto-Timonen et al. 2016). Es ist denkbar, dass *R. capsulatus* keinen Bedarf an CspD hatte, weil  $^1\text{O}_2$  primär Proteine anstatt Nukleinsäuren beschädigt.

Mit Ausnahme der im Vergleich zu *R. sphaeroides* späteren Abnahme von Photosyntheseproteinen lassen die Abnahmen nach 180 min photooxidativem Stress in *R. capsulatus* keine markanten Strategien gegen  $^1\text{O}_2$  vermuten.

## 4.5 Relevanz der Ergebnisse im größeren Kontext

### 4.5.1 Implikationen für mikrobielle Ökologie

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen einige Implikationen zu, speziell für die mikrobielle Ökologie, aber auch z.T. für die biotechnologische Anwendung von *Rhodobacter*. Grundsätzlich zeigten *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* eine ähnliche Antwort auf photooxidativen Stress im Sinne von Proteinschutz und -reparatur, DNA-Reparatur und Regulation der Antwort durch RpoE, ChrR und RpoH<sub>II</sub> (Abb. 3.32 und 3.36; Berghoff et al. 2013). In diesem Kontext decken sich die Ergebnisse mit denen vorheriger Studien zur funktionellen Antwort in *R. sphaeroides* (Berghoff et al. 2013) mitsamt ihrer Regulatoren (Anthony et al. 2005; Dufour et al. 2012; Glaeser et al. 2007; Nuss et al. 2010; Nuss et al. 2009). Damit sind die Kernfunktionen der photooxidativen Stressantwort in *R. sphaeroides* durch *R. capsulatus* bestätigt und gelten damit auch mit größerer Wahrscheinlichkeit für andere Alphaproteobakterien. Funktionell scheint dabei gerade der Proteomschutz von Bedeutung zu sein, höchstwahrscheinlich, weil unter starken oxidativem Stress für das Überleben einer Zelle das Proteom mit seinen Enzymen für den Erhalt der Zellfunktion – und der DNA-Reparatur – wichtiger als die DNA *per se* ist (Daly 2009; Krisko und Radman 2013; Slade und Radman 2011).

*R. capsulatus* und *R. sphaeroides* zeigten Unterschiede in ihrer ROS- bzw.  $^1\text{O}_2$ -Produktion (Abb. 3.15) sowie in ihren Strategien gegen photooxidativen Stress. Es stellt sich die Frage, was diese Unterschiede für den ökologischen Kontext bedeuten. *R. capsulatus* besaß gegenüber *R. sphaeroides* Wachstumsvorteile bei plötzlichen Änderungen der Licht- und Sauerstoffbedingungen, zeigte aber keine Wachstumsnachteile (Abb. 3.1 und 3.2). Wenn ein Trade-off für diese Vorteile vorliegt, haben die Versuche diesen nicht offengelegt. Ein solcher Trade-off könnte sich in anderen Stresssituationen wie Salzstress zeigen. So zeigte z.B. eine Überexpression des *rpoE*-Homologs RpoE2 in *S. oneidensis* eine geringere Salzstress-Toleranz gegenüber dem Wildtyp, während eine RpoE2-Deletionsmutante sogar besser unter Salzstress wuchs (Dai et al. 2015).

Eine unterschiedliche Besetzung ökologischer Nischen bzw. verschiedener Habitats kann

die beobachteten Unterschiede nicht erklären. Analysen der Ökologie von *Rhodobacter* bzw. photosynthetischen Bakterien beschreiben keine Unterschiede zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* (van Gernerden und Mas 1995; van Niel 1944; Yen und Marrs 1976), beide Spezies leben in Süß- und Salzwässern. Theoretisch wäre es möglich, dass durch den höheren Anteil von Carotinoiden *R. capsulatus* licht- und sauerstoffreiche Nischen eher besetzt als *R. sphaeroides*. Zumindest bestätigten die analogen Wachstumsversuche mit *R. capsulatus* 37b4 und *R. sphaeroides* KD131 die Unterschiede zwischen den Spezies (Abb. 3.8); ein stammspezifischer Vorteil von *R. capsulatus* SB1003 ist unwahrscheinlich.

#### 4.5.2 Implikationen für biotechnologische Anwendungen mit *Rhodobacter*

Für biotechnologische Anwendungen haben die Ergebnisse eine bedingte Relevanz. In den Anwendungsgebieten der Biotechnologie ist *R. capsulatus* von Interesse zur Produktion von H<sub>2</sub> als Biotreibstoff, wobei dies unter phototrophen bzw. anaeroben Anwendungen stattfindet (Mirza et al. 2013; Zhang et al. 2016). Jedoch ist *Rhodobacter* auch durch die Biosynthese von Carotinoiden im Fokus, um potentiell Carotinoid-Nahrungszusätze und Supplemente zu produzieren. Die Antioxidant-Eigenschaften dieser Supplemente würden gegen oxidativen Stress helfen, welcher mit Krankheiten wie Diabetes oder Krebs assoziiert ist (Li et al. 2017; Liu et al. 2015). Zwar wären unter anaeroben Bedingungen größere Carotinoideausbeuten zu erwarten als unter aeroben Bedingungen, aber unter Umständen könnte die Zusammensetzung der Carotinoide unter <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Stress eher dem Bedarf entsprechen. Falls in Produktionsläufen ROS oder gar <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ein Problem darstellen könnten, wäre *R. capsulatus* eine vergleichsweise geeignetere Basis für einen Produktionsorganismus als *R. sphaeroides*.

### 4.6 Ausblick und offene Fragen

Mit Blick auf die Unterschiede zwischen *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* in der photooxidativen Stressantwort zeigten sich potentiell die Eisenchelation durch CbiX und HemH, die Verringerung des Protoporphyrin IX-Vorkommens und ein höheres Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis als Hauptunterschiede in der Strategie der photooxidativen Stressantwort. Auch lokalisierte nur in *R. capsulatus* das photosynthetische Gencluster nahe am *rpoEchrR*-Lokus, wobei dieser Lokus generell eine andere Syntänie aufweist als in *R. sphaeroides*. Möglicherweise bedeutet diese spezifische Syntänie auch Unterschiede im RpoE-Regulon. All diese Beobachtungen liefern Ansatzpunkte für weiterführende Studien.

Bei den funktionellen Unterschieden wäre z.B. zu ermitteln, ob der initiale Wachstumsvorteil unter photooxidativem Stress in *R. capsulatus* auf einen oder mehrere Faktoren

zurückgeht. Knockout-Mutanten von *hemH*, *cbiX*, *tspO-crtI* inklusive Komplementationsstämme sowie Überexpressionsstämme könnten dies in Stressexperimenten auflösen. Bei den analog durchzuführenden Experimenten wären neben dem Wachstum und der Pigmentationsanalyse auch die *in vivo*-Messungen von  $^1\text{O}_2$  und ROS von Interesse. Auch wäre es möglich, die grünfarbigen Tn5-Mutanten von *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* in photooxidativen Stressexperimenten zu vergleichen, um den Beitrag der Carotinoide zur Stressabwehr zu entschlüsseln. Das alternative Einstellen auf gleiche Carotinoid-BChl *a*-Verhältnisse zu Beginn aeroben Wachstums würde vermutlich in zu großen OD<sub>660</sub>-Unterschieden enden, als dass die Ergebnisse noch vergleichbar wären.

Bezüglich der Regulatoren wäre es interessant, die Bedeutung von *rpoE* in der Stressantwort auf ein mögliches anderes Regulon zu untersuchen. Da viele Vertreter des *rpoE*-Regulons in *R. sphaeroides* nahe *rpoEchrR* lokalisiert sind, aber keine Homologe in *R. capsulatus* haben, wäre es aufschlussreich zu sehen, ob andere Gene von *rpoE* in *R. capsulatus* reguliert werden. Hier wären Omics-Analysen mit *rpoE*-Knockout-Stämmen unter Stress eine Möglichkeit dies zu untersuchen.

Hinsichtlich der Regulation bietet das Feld der sRNAs noch Potential für kommende Studien. Die sRNAs RCs01296, RCs02566 und RCs02783 müssten per Northern Blotting verifiziert werden, genauso ihre Ziele mittels Knockout- und Überexpressionsstämmen der sRNAs mit anschließender Quantifizierung der Ziel-mRNA-Level, z.B. via Reportergenanalysen. Im Falle von RCs01897 wäre die Verifizierung möglicher Ziele von Interesse. Falls der XRE-Transkriptionsfaktor tatsächlich ein Ziel von RCs01897 ist, könnten Folgeversuche dessen Regulon ermitteln.

Es fielen exklusiv in *R. capsulatus* einige (starke) Akkumulationen von Transkripten und Proteinen auf, die funktionell nicht offensichtlich photooxidativem Stress entgegenwirken (z.B. *macA*). Hier könnte abseits der physiologischen Untersuchung von Knockout- oder Überexpressionsstämmen zuerst geklärt werden, ob Gene wie *macA* auch unter anderen Bedingungen induziert werden, z.B. beim semiaeroben Wachstum. Falls der Anstieg dieser Transkripte und Proteine exklusiv für photooxidativen Stress wäre, könnten deren Funktionen für die Stressantwort weiter analysiert werden.

## 5 Zusammenfassung

Die nahe verwandten aquatischen Alphaproteobakterien *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* können sowohl (an)aerobe Atmung als auch Photosynthese betreiben. Das in den Photosystemen befindliche BChl *a* kann allerdings durch Lichtanregung als Photosensibilisator wirken, wenn es Energie auf molekularen Sauerstoff überträgt und somit cytotoxischer Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) entsteht. Zur Stressvermeidung reguliert *Rhodobacter* unter aeroben Bedingungen im Licht die Photosynthesegene herunter, doch rapide Änderungen der Licht- bzw. Sauerstoffbedingungen machen Stress unvermeidbar. Studien fokussierten sich bislang auf die photooxidative Stressantwort von *R. sphaeroides*, jedoch könnte *R. capsulatus* mit höheren BChl *a*-Gehalten eine andere  $^1\text{O}_2$ -Stress-Dynamik aufzeigen.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die  $^1\text{O}_2$ -Antwort in *R. capsulatus* und verglich sie mit der von *R. sphaeroides*. Es wurden u.a. das Wachstum, die Pigmentierung und die ROS-Produktion unter photooxidativem Stress analysiert. Weiter wurden mittels RNA-Seq und LC-MS/MS in *R. capsulatus* die relativen Transkript- und Proteinlevel unter photooxidativem Stress untersucht und mit bekannten Abundanzveränderungen von *R. sphaeroides* unter Stress (Berghoff et al. 2013) verglichen.

Unter photooxidativem Stress erreichten *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* die gleiche End-OD<sub>660</sub>, *R. capsulatus* zeigte aber in den ersten 3 h des Stresses eine höhere Wachstumsrate und produzierte im Verhältnis weniger ROS bzw.  $^1\text{O}_2$ . Als Kernstrategie gegen  $^1\text{O}_2$ -Stress akkumulierten beide Arten Transkripte und Proteine mit Funktionen in Proteinumsatz- und -reparatur, DNA-Reparatur und Oxidations-Reduktions-Prozessen. Die Stressantwort unterschied sich bei *R. capsulatus* in drei wesentlichen Aspekten von *R. sphaeroides*: (1) *R. capsulatus* erhöhte sein Carotinoid-BChl *a*-Verhältnis stärker, womit es mehr Carotinoide zum Quenchen von BChl *a* und  $^1\text{O}_2$  hätte. Die Induktion des *crtI-tspO*-Operons könnte die stabilen Carotinoid-Level unter Stress erklären. (2) *R. capsulatus* akkumulierte neben *tspO* auch die Ferrochelatase *hemH* und *cbiX*, welche alle den Metabolitflux so umlenken können, dass das Vorkommen des Photosensibilisators Protoporphyrin IX sinkt. (3) Die stark gestiegenen Level von Eisenchelatoren wie CbiX in *R. capsulatus* könnten auch bedeuten, dass weniger freies Eisen ROS in der Fenton-Reaktion generiert.

Beide Arten induzierten auch die alternativen Sigmafaktoren RpoH<sub>II</sub> und RpoE, welche die  $^1\text{O}_2$ -Antwort regulieren. Die *rpoE*-Syntänie war jedoch verschieden und für viele Gene des *rpoE*-Regulons hat *R. capsulatus* keine Homologe. Für *R. capsulatus* wären die Unterschiede im *rpoE*-Regulon ebenso wie die Carotinoidzusammensetzung unter Stress und der Beitrag von CbiX zur  $^1\text{O}_2$ -Antwort Ansatzpunkte für zukünftige Studien.

## 6 Summary

The closely related aquatic Alphaproteobacteria *R. capsulatus* and *R. sphaeroides* can conduct both (an)aerobic respiration and photosynthesis. However, the BChl *a* in the photosystems can act as a photosensitizer if it is excited by light. Then it transfers energy to molecular oxygen, generating cytotoxic singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ). *Rhodobacter* down-regulates its photosynthesis genes upon aerobic conditions in the light to avoid stress, but rapid changes in light and oxygen conditions result in unavoidable stress. So far, studies have focussed on the photooxidative stress response in *R. sphaeroides*, but *R. capsulatus* might show different  $^1\text{O}_2$ -stress dynamics, due to higher BChl *a*-contents.

In this thesis, the  $^1\text{O}_2$ -response of *R. capsulatus* was analyzed and compared to the one of *R. sphaeroides*. Among others, growth, pigmentation and ROS-production during photooxidative stress were analyzed. The relative transcript- and protein-levels were measured via RNA-Seq and LC-MS/MS and compared to stress-related abundance changes in *R. sphaeroides* (Berghoff et al. 2013).

Both *R. capsulatus* and *R. sphaeroides* reached the same final  $\text{OD}_{660}$  during photooxidative stress, but *R. capsulatus* showed a higher growth rate during the first 3 h of stress and produced relatively less ROS and  $^1\text{O}_2$ . As part of the main strategy against  $^1\text{O}_2$ -stress, both species accumulated transcripts and proteins involved in turnover and repair of proteins, DNA-repair and oxidation-reduction-processes. The stress response of *R. capsulatus* differed from *R. sphaeroides* in three key aspects:

(1) *R. capsulatus* increased its carotenoid-BChl *a*-ratio stronger, so more carotenoids might have quenched BChl *a* and  $^1\text{O}_2$ . The induced *crtI-tspO*-operon might contribute to the stable carotenoid levels during stress. (2) Apart from *tspO*, *R. capsulatus* also accumulated the ferrochelatases *hemH* und *cbiX* to a great extent, and all three can change the metabolic flux to reduce the amounts of the photosensitizer Protoporphyrin IX in the cell. (3) In general, *R. capsulatus* accumulated more ferrochelatases like CbiX and HemH, which might lessen the amount of iron-derived ROS.

Both species also induced the alternative sigma factors RpoH<sub>II</sub> and RpoE, which regulate the  $^1\text{O}_2$ -response. The synteny of *rpoE* was different, however, and *R. capsulatus* lacked homologs of many genes of the *rpoE*-regulon of *R. sphaeroides*. The RpoE-regulon differences, the carotenoid composition during stress and the role of CbiX mark interesting aspects for further studies.

## 7 Referenzen

- Adnan, F., Weber, L. & Klug, G. (2015). The sRNA SorY confers resistance during photooxidative stress by affecting a metabolite transporter in *Rhodobacter sphaeroides*. *RNA Biology*, 12(5), 569–577. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1031948>
- Anthony, J. R., Warczak, K. L. & Donohue, T. J. (2005). A transcriptional response to singlet oxygen, a toxic byproduct of photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(18), 6502–6507. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502225102>
- Armstrong, G. A. & Hearst, J. E. (1996). Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB Journal*, 10(2), 228–237. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.2.8641556>
- Armstrong, R. A. & Hilton, A. C. (2011). *Statistical Analysis in Microbiology*. New Jersey, Wiley-Blackwell.
- Artsimovitch, I. & Landick, R. (2000). Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(13), 7090–7095. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.13.7090>
- Avtges, P., Kranz, R. G. & Haselkorn, R. (1985). Isolation and organization of genes for nitrogen fixation in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Molecular and General Genetics MGG*, 201(3), 363–369. <https://doi.org/10.1007/BF00331324>
- Ayala-Castro, C., Saini, A. & Outten, F. W. (2008). Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(1), 110–125. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-07>
- Baldi, P. & Hatfield, G. W. (2011). *DNA Microarrays and Gene Expression: From Experiments to Data Analysis and Modeling*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511541773>
- Bali, S., Rollauer, S., Roversi, P., Raux-Deery, E., Lea, S. M., Warren, M. J. & Ferguson, S. J. (2014). Identification and characterization of the 'missing' terminal enzyme for siroheme biosynthesis in  $\alpha$ -proteobacteria. *Molecular Microbiology*, 92(1), 153–163. <https://doi.org/10.1111/mmi.12542>
- Bathke, J., Konzer, A., Remes, B., McIntosh, M. & Klug, G. (2019). Comparative analyses of the variation of the transcriptome and proteome of *Rhodobacter sphaeroides* throughout growth. *BMC Genomics*, 20(1), 358. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5749-3>
- Baynes, J. W. (2009). Oxygen and Life. In *Medical Biochemistry E-Book*. Elsevier Health Sciences.

- 
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. (2007). Oxidative Phosphorylation. In P. Zimmermann, G. L. Hadler, M. Bianca, D. Goldman, N. Tymoczko, A. Baker & S. Moran (Hrsg.), *Biochemistry* (6. Aufl., S. 517–527). W. H. Freeman; Company.
- Berghoff, B. A., Glaeser, J., Sharma, C. M., Vogel, J. & Klug, G. (2009). Photooxidative stress-induced and abundant small RNAs in *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular Microbiology*, *74*(6), 1497–1512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06949.x>
- Berghoff, B. A., Glaeser, J., Sharma, M., Cynthia, Zobawa, M., Lottspeich, F., Vogel, J. & Klug, G. (2011a). Contribution of Hfq to photooxidative stress resistance and global regulation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular Microbiology*, *80*(6), 1479–1495. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07658.x>
- Berghoff, B. A., Konzer, A., Mank, N. N., Looso, M., Rische, T., Förstner, K. U., Krüger, M. & Klug, G. (2013). Integrative “Omics“-approach discovers dynamic and regulatory features of bacterial stress responses. *PLOS Genetics*, *9*(6), e100357. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003576>
- Berghoff, B. A., Glaeser, J., Nuss, A. M., Zobawa, M., Lottspeich, F. & Klug, G. (2011b). Anoxygenic photosynthesis and photooxidative stress: a particular challenge for *Roseobacter*. *Environmental Microbiology*, *13*(3), 775–791. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02381.x>
- Beutner, S., Bloedorn, B., Frixel, S., Hernández Blanco, I., Hoffmann, T., Martin, H.-D., Mayer, B., Noack, P., Ruck, C., Schmidt, M., Schülke, I., Sell, S., Ernst, H., Haremza, S., Seybold, G., Sies, H., Stahl, W. & Walsh, R. (2001). Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of  $\beta$ -carotene in antioxidant functions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(6), 559–568. <https://doi.org/10.1002/jsfa.849>
- Billenkamp, F., Peng, T., Berghoff, B. A. & Klug, G. (2015). A cluster of four homologous small RNAs modulates C-1 metabolism and the pyruvate dehydrogenase complex in *Rhodobacter sphaeroides* under various stress conditions. *Journal of Bacteriology*, *197*(10), 1839–1852. <https://doi.org/10.1128/JB.02475-14>
- Bimboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, *7*(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Blanchard, J. L., Wholey, W.-Y., Conlon, E. M. & Pomposiello, P. J. (2007). Rapid changes in gene expression dynamics in response to superoxide reveal SoxRS-dependent and independent transcriptional networks. *PLoS one*, *2*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001186>
-

- 
- Blom, J., Kreis, J., Spänig, S., Juhre, T., Bertelli, C., Ernst, C. & Goesmann, A. (2016). EDGAR 2.0: an enhanced software platform for comparative gene content analyses. *Nucleic Acids Research*, *44*(W1), W22–W28. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw255>
- Borukhov, S., Lee, J. & Laptenko, O. (2005). Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Molecular Microbiology*, *55*(5), 1315–1324. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04481.x>
- Botstein, D., Cherry, J. M., Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Butler, H., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M. & Sherlock, G. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, *25*(1), 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>
- Braatsch, S., Gomelsky, M., Kuphal, S. & Klug, G. (2002). A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular Microbiology*, *45*(3), 827–836. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03058.x>
- Brenzinger, S., Pecina, A., Mrusek, D., Mann, P., Völse, K., Wimmi, S., Ruppert, U., Becker, A., Ringgaard, S., Bange, G. & Thormann, K. M. (2018). ZomB is essential for flagellar motor reversals in *Shewanella putrefaciens* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Molecular Microbiology*, *109*(5), 694–709. <https://doi.org/10.1111/mmi.14070>
- Brinkmann, H., Göker, M., Koblížek, M., Wagner-Döbler, I. & Petersen, J. (2018). Horizontal operon transfer, plasmids, and the evolution of photosynthesis in *Rhodobacteraceae*. *The ISME Journal*, *12*(8), 1994–2010. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0150-9>
- Burchard, R. P. & Dworkin, M. (1966). Light-induced lysis and carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, *91*(2), 535–545. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn544>
- Busch, A., Richter, A. S. & Backofen, R. (2008). IntaRNA: efficient prediction of bacterial sRNA targets incorporating target site accessibility and seed regions. *Bioinformatics*, *24*(24), 2849–2856. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn544>
- Cabiscol Català, E., Tamarit Sumalla, J. & Ros Salvador, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, *3*(1), 3–8.
- Calderini, E., Celebioglu, H. U., Villarroel, J., Jacobsen, S., Svensson, B. & Pessione, E. (2017). Comparative proteomics of oxidative stress response of *Lactobacillus acidophilus* NCFM reveals effects on DNA repair and cysteine *de novo* synthesis. *Proteomics*, *17*(5). <https://doi.org/10.1002/pmic.201600178>
-

- Casalino, E., Sblano, C. & Landriscina, C. (1997). Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *346*(2), 171–179. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0197>
- Cavalcante, A. K. D., Martinez, G. R., Di Mascio, P., Menck, C. F. M. & Agnez-Lima, L. F. (2002). Cytotoxicity and mutagenesis induced by singlet oxygen in wild type and DNA repair deficient *Escherichia coli* strains. *DNA Repair*, *1*(12), 1051–1056. [https://doi.org/10.1016/s1568-7864\(02\)00164-7](https://doi.org/10.1016/s1568-7864(02)00164-7)
- Chen, I.-M. A., Chu, K., Palaniappan, K., Pillay, M., Ratner, A., Huang, J., Huntemann, M., Varghese, N., White, J. R., Seshadri, R., Smirnova, T., Kirton, E., Jungbluth, S. P., Woyke, T., Eloë-Fadrosh, E. A., Ivanova, N. N. & Kyripides, N. C. (2018). IMG/M v. 5.0: an integrated data management and comparative analysis system for microbial genomes and microbiomes. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D666–D677. <https://doi.org/10.1093/nar/gky901>
- Cheng, Z., Li, K., Hammad, L. A., Karty, J. A. & Bauer, C. E. (2014). Vitamin B<sub>12</sub> regulates photosystem gene expression via the CrtJ antirepressor AerR in *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular Microbiology*, *91*(4), 649–664. <https://doi.org/10.1111/mmi.12491>
- Cheng, Z., Wu, J., Setterdahl, A., Reddie, K., Carroll, K., Hammad, L. A., Karty, J. A. & Bauer, C. E. (2012). Activity of the tetrapyrrole regulator CrtJ is controlled by oxidation of a redox active cysteine located in the DNA binding domain. *Molecular Microbiology*, *85*(4), 734–746. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08135.x>
- Chi, S. C., Mothersole, D. J., Dilbeck, P., Niedzwiedzki, D. M., Zhang, H., Qian, P., Vasilev, C., Grayson, K. J., Jackson, P. J., Martin, E. C., Li, Y., Holten, D. & Hunter, C. N. (2015). Assembly of functional photosystem complexes in *Rhodobacter sphaeroides* incorporating carotenoids from the spirilloxanthin pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA-)Bioenergetics*, *1847*(2), 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.10.004>
- Choudhary, M. & Kaplan, S. (2000). DNA sequence analysis of the photosynthesis region of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1<sup>T</sup>. *Nucleic Acids Research*, *28*(4), 862–867. <https://doi.org/10.1093/nar/28.4.862>
- Church, G. M. & Gilbert, W. (1984). Genomic Sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*(7), 1991–1995. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.7.1991>
- Clayton, R. K. (1966). The bacterial photosynthetic reaction center, In *Brookhaven Symposia in Biology*.
- Clerici, M. G., Ricci, M. & Strukul, G. (2019). Formation of C–O-Bonds by Oxidation. In G. P. Chiusoli & P. M. Maitlis (Hrsg.), *Metal-catalysis in industrial organic processes* (S. 27–28). Royal Society of Chemistry.

- 
- Cochran, W. G. & Cox, G. M. (1957). *Experimental Designs* (2nd). New York, Wiley.
- Cox, J. & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, *26*(12), 1367–1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>
- Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A. R., Munters, E., Artois, T. J., Nawrot, T., Vangronsveld, J. & Smeets, K. (2010). Cadmium stress: an oxidative challenge. *BioMetals*, *23*(5), 927–940. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9329-x>
- Dai, J., Wei, H., Tian, C., Damron, F. H., Zhou, J. & Qiu, D. (2015). An extracytoplasmic function sigma factor-dependent periplasmic glutathione peroxidase is involved in oxidative stress response of *Shewanella oneidensis*. *BMC Microbiology*, *15*, 34. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0357-0>
- Daly, M. J. (2009). A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nature Reviews Microbiology*, *7*(3), 237–245. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2073>
- Davies, M. J. (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *305*(3), 761–770. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00817-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00817-9)
- Davies, M. J. (2004). Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *3*(1), 17–25. <https://doi.org/10.1039/B307576C>
- Davies, M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical Journal*, *473*(7), 805–825. <https://doi.org/10.1042/BJ20151227>
- de Menezes, A. B., Lockhart, R. J., Cox, M. J., Allison, H. E. & McCarthy, A. J. (2008). Cellulose degradation by Micromonosporas recovered from freshwater lakes and classification of these Mctinomycetes by DNA gyrase B gene sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(22), 7080–7084. <https://doi.org/10.1128/AEM.01092-08>
- Devasagayam, T. P. A., Steenken, S., Obendorf, M. S. W., Schulz, W. A. & Sies, H. (1991). Formation of 8-hydroxy (deoxy) guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry*, *30*(25), 6283–6289. <https://doi.org/10.1021/bi00239a029>
- Dinos, G. P. (2017). The macrolide antibiotic renaissance. *British Journal of Pharmacology*, *174*(18), 2967–2983. <https://doi.org/10.1111/bph.13936>
- Dorta, D. J., Leite, S., DeMarco, K. C., Prado, I. M., Rodrigues, T., Mingatto, F. E., Uyemura, S. A., Santos, A. C. & Curti, C. (2003). A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *97*(3), 251–257. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(03\)00314-3](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(03)00314-3)
-

- Dufour, Y. S., Imam, S., Koo, B.-M., Green, H. A. & Donohue, T. J. (2012). Convergence of the transcriptional responses to heat shock and singlet oxygen stresses. *PLoS Genetics*, *8*(9), e1002929. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002929>
- Dühning, U., Axmann, I. M., Hess, W. R. & Wilde, A. (2006). An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene *isiA*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(18), 7054–7058. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600927103>
- Dwyer, D. J., Belenky, P. A., Yang, J. H., MacDonald, I. C., Martell, J. D., Takahashi, N., Chan, C. T. Y., Lobritz, M. A., Braff, D., Schwarz, E. G., Ye, J. D., Pati, M., Vercruyse, M., Ralifo, P. S., Allison, K. R., Khalil, A. S., Ting, A. Y., Walker, G. C. & Collins, J. J. (2014). Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(20), E2100–E2109. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401876111>
- Eisenhardt, K. M. H., Reuscher, C. M. & Klug, G. (2018). PcrX, an sRNA derived from the 3'-UTR of the *Rhodobacter sphaeroides* *puf* operon modulates expression of *puf* genes encoding proteins of the bacterial photosynthetic apparatus. *Molecular Microbiology*, *110*(3), 325–334. <https://doi.org/10.1111/mmi.14076>
- Elsen, S., Ponnampalam, S. N. & Bauer, C. E. (1998). CrtJ bound to distant binding sites interacts cooperatively to aerobically repress photopigment biosynthesis and light harvesting II gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(46), 30762–30769. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30762>
- Fang, M. & Bauer, C. E. (2017). The vitamin B<sub>12</sub>-dependent photoreceptor AerR relieves photosystem gene repression by extending the interaction of CrtJ with photosystem promoters. *mBio*, *8*(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00261-17>
- Fang, Z. & Dos Santos, P. C. (2015). Protective role of bacillithiol in superoxide stress and Fe–S metabolism in *Bacillus subtilis*. *MicrobiologyOpen*, *4*(4), 616–631. <https://doi.org/10.1002/mbo3.267>
- Feklítov, A., Sharon, B. D., Darst, S. A. & Gross, C. A. (2014). Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. *Annual Review of Microbiology*, *68*, 357–376. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155737>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, *39*(4), 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Fiel, R. J., Datta-Gupta, N., Mark, E. H. & Howard, J. C. (1981). Induction of DNA damage by porphyrin photosensitizers. *Cancer Research*, *41*(9, Teil 1), 3543–3545.
- Floyd, R. A., Schneider Jr, J. E. & Dittmer, D. P. (2004). Methylene blue photoinactivation of RNA viruses. *Antiviral Research*, *61*(3), 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2003.11.004>

- Fogg, P. C., Hynes, A. P., Digby, E., Lang, A. S. & Beatty, J. T. (2011). Characterization of a newly discovered Mu-like bacteriophage, RcapMu, in *Rhodobacter capsulatus* strain SB1003. *Virology*, *421*(2), 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.09.028>
- Fontes, M., Galbis-Martínez, L. & Murillo, F. J. (2003). A novel regulatory gene for light-induced carotenoid synthesis in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, *47*(2), 561–571. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03319.x>
- Foote, C. S., Chang, Y. C. & Denny, R. W. (1970). Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection. *Journal of the American Chemical Society*, *92*(1), 5216–5218. <https://doi.org/10.1021/ja00720a036>
- Fried, L., Lassak, J. & Jung, K. (2012). A comprehensive toolbox for the rapid construction of lacZ fusion reporters. *Journal of Microbiological Methods*, *91*(3), 537–543. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.09.023>
- Frimer, A. A. (1979). The reaction of singlet oxygen with olefins: the question of mechanism. *Chemical Reviews*, *79*(5), 359–387. <https://doi.org/10.1021/cr60321a001>
- Geissler, B. & Margolin, W. (2005). Evidence for functional overlap among multiple bacterial cell division proteins: compensating for the loss of FtsK. *Molecular Microbiology*, *58*(2), 596–612. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04858.x>
- Gerardo Treviño-Quintanilla, L., Augusto Freyre-González, J. & Martínez-Flores, I. (2013). Anti-sigma factors in *E. coli*: common regulatory mechanisms controlling sigma factors availability. *Current Genomics*, *14*(6), 378–387. <https://doi.org/10.2174/1389202911314060007>
- Glaeser, J. & Klug, G. (2005). Photo-oxidative stress in *Rhodobacter sphaeroides*: protective role of carotenoids and expression of selected genes. *Microbiology*, *151*(6), 1927–1938. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27789-0>
- Glaeser, J., Nuss, A. M., Berghoff, B. A. & Klug, G. (2011). Singlet oxygen stress in microorganisms. In Poole, R K (Hrsg.), *Advances in Microbial Physiology* (S. 141–173). Elsevier Ltd. Elsevier Ltd. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381043-4.00004-0>
- Glaeser, J., Zobawa, M., Lottspeich, F. & Klug, G. (2007). Protein synthesis patterns reveal a complex regulatory response to singlet oxygen in *Rhodobacter*. *Journal of Proteome Research*, *6*(7), <http://dx.doi.org/10.1021/pr060624p>, 2460–2471. <https://doi.org/10.1021/pr060624p>
- Gomelsky, M. & Kaplan, S. (1995). *appA*, a novel gene encoding a trans-acting factor involved in the regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of Bacteriology*, *177*(16), 4609–4618.
- Gomelsky, M. & Klug, G. (2002). BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends in Biochemical Sciences*, *27*(10), 497–500. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)02181-3](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02181-3)

- 
- GraphPad Software. (o.D.). GraphPad Software [San Diego California USA].
- Gregor, J. & Klug, G. (1999). Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light. *FEMS Microbiology Letters*, 179(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08700.x>
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5. Aufl.). Oxford University Press, USA.
- Hammer, B. K. & Bassler, B. L. (2007). Regulatory small RNAs circumvent the conventional quorum sensing pathway in pandemic *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11145–11149. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703860104>
- Han, Y., Meyer, M. H. F., Keusgen, M. & Klug, G. (2007). A haem cofactor is required for redox and light signalling by the AppA protein of *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular Microbiology*, 64(4), 1090–1104. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05724.x>
- Hanson, T. E. & Tabita, F. R. (2001). A ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO)-like protein from *Chlorobium tepidum* that is involved with sulfur metabolism and the response to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8), 4397–4402. <https://doi.org/10.1073/pnas.081610398>
- Happ, H. N., Braatsch, S., Broschek, V., Osterloh, L. & Klug, G. (2005). Light-dependent regulation of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 is coordinately controlled by photosynthetic electron transport via the PrrBA two-component system and the photoreceptor AppA. *Molecular Microbiology*, 58(3), 903–914. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04882.x>
- Heberle, H., Meirelles, G. V., da Silva, F. R., Telles, G. P. & Minghim, R. (2015). InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 16:169. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3>
- Hendrischk, A.-K., Braatsch, S., Glaeser, J. & Klug, G. (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(6), 1842–1851. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/004390-0>
- HHU Düsseldorf. (o.D.). [http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig\\_Input.html](http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html)
- Hirakawa, K. (2017). Biomolecules oxidation by hydrogen peroxide and singlet oxygen, In *Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells*, IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71465>
- Hu, Y., Hu, Q., Wei, R., Li, R., Zhao, D., Ge, M., Yao, Q. & Yu, X. (2019). The XRE family transcriptional regulator SrtR in *Streptococcus suis* is involved in oxidant tolerance and virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 452. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00452>
-

- 
- Imam, S., Noguera, D. R. & Donohue, T. J. (2014). Global analysis of photosynthesis transcriptional regulatory networks. *PLoS Genetics*, *10*(12), e1004837. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004837>
- Imlay, J. A. (2015). Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. *Current Opinion in Microbiology*, *24*, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.004>
- Janausch, I. G., Zientz, E., Tran, Q. H., Kröger, A. & Unden, G. (2002). C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1553*(1–2), 39–56. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(01\)00233-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(01)00233-x)
- Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics*, *8*(3), 275–282. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>
- Joshi, S. G., Cooper, M., Yost, A., Paff, M., Ercan, U. K., Fridman, G., Friedman, G., Fridman, A. & Brooks, A. D. (2011). Non-thermal dielectric-barrier discharge (DBD) plasma-induced inactivation involves oxidative-DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(3), 1053–1062. <https://doi.org/10.1128/AAC.01002-10>
- Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K. J. A., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., Mann, G. E., Moore, K., Roberts II, L. J. & Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, *52*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>
- Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D. & Trollinger, D. (1988). Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene*, *70*(1), 191–197. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90117-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90117-5)
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, *10*(6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kery, M. B., Feldman, M., Livny, J. & Tjaden, B. (2014). TargetRNA2: identifying targets of small regulatory RNAs in bacteria. *Nucleic Acids Research*, *42*(W1), W124–W129. <https://doi.org/10.1093/nar/gku317>
- Keto-Timonen, R., Hietala, N., Palonen, E., Hakakorpi, A., Lindström, M. & Korkeala, H. (2016). Cold shock proteins: a minireview with special emphasis on Csp-family of enteropathogenic *Yersinia*. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1151. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01151>

- Kim, J.-G., Back, K., Lee, H. Y., Lee, H.-J., Phung, T.-H., Grimm, B. & Jung, S. (2014). Increased expression of Fe-chelatase leads to increased metabolic flux into heme and confers protection against photodynamically induced oxidative stress. *Plant Molecular Biology*, *86*(3), 271–287. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0228-3>
- Klug, G., Adams, C. W., Belasco, J., Doerge, B. & Cohen, S. N. (1987). Biological consequences of segmental alterations in mRNA stability: effects of deletion of the intercistronic hairpin loop region of the *Rhodobacter capsulatus puf* operon. *The EMBO Journal*, *6*(11), 3515–3520.
- Klug, G. (2014). Beyond catalysis: vitamin B<sub>12</sub> as a cofactor in gene regulation. *Molecular Microbiology*, *91*(4), 635–640. <https://doi.org/10.1111/mmi.12490>
- Klug, G., Kaufmann, N. & Drews, G. (1985). Gene expression of pigment-binding proteins of the bacterial photosynthetic apparatus: transcription and assembly in the membrane of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *82*(19), 6485–6489. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.19.6485>
- Kovács, A. T., Rákhely, G. & Kovács, K. L. (2003). Genes involved in the biosynthesis of photosynthetic pigments in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(6), 3093–3102. <https://doi.org/10.1128/aem.69.6.3093-3102.2003>
- Kranz, R. G., Gabbert, K. K., Locke, T. A. & Madigan, M. T. (1997). Polyhydroxyalkanoate production in *Rhodobacter capsulatus*: genes, mutants, expression, and physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(8), 3003–3009. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.8.3003-3009.1997>
- Krisko, A. & Radman, M. (2013). Biology of extreme radiation resistance: the way of *Deinococcus radiodurans*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(7), a012765. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012765>
- Kukurba, K. R. & Montgomery, S. B. (2015). RNA sequencing and analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2015*(11), 951–969. <https://doi.org/10.1101/pdb.top084970>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kumka, J. E. & Bauer, C. E. (2015). Analysis of the FnrL regulon in *Rhodobacter capsulatus* reveals limited regulon overlap with orthologues from *Rhodobacter sphaeroides* and *Escherichia coli*. *BMC Genomics*, *16*(1), 895. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2162-4>
- Kumka, J. E., Schindel, H., Fang, M., Zappa, S. & Bauer, C. E. (2017). Transcriptomic analysis of aerobic respiratory and anaerobic photosynthetic states in *Rhodobacter capsulatus* and their modulation by global redox regulators RegA, FnrL and CrtJ. *Microbial Genomics*, *3*(9). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000125>

- Kyndt, J. A., Hurley, J. K., Devreese, B., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A., Tollin, G. & Van Beeumen, J. J. (2004). *Rhodobacter capsulatus* photoactive yellow protein: genetic context, spectral and kinetics characterization, and mutagenesis. *Biochemistry*, *43*(7), 1809–1820. <https://doi.org/10.1021/bi035789f>
- Laurinavichene, T., Tekucheva, D., Laurinavichius, K. & Tsygankov, A. (2018). Utilization of distillery wastewater for hydrogen production in one-stage and two-stage processes involving photofermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, *110*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.11.009>
- Li, Z., Kong, L., Hui, B., Shang, X., Gao, L., Luan, N., Zhuang, X., Wang, D. & Bai, Z. (2017). Identification and antioxidant activity of carotenoids from superfine powder of *Rhodobacter sphaeroides*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *29*(11), 833–845. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2017.v29.i11.1479>
- Lim, S.-K., Kim, S. J., Cha, S. H., Oh, Y.-K., Rhee, H.-J., Kim, M.-S. & Lee, J. K. (2009). Complete genome sequence of *Rhodobacter sphaeroides* KD131. *Journal of Bacteriology*, *191*(3), 1118–1119. <https://doi.org/10.1128/JB.01565-08>
- Lin, Z., Cui, X., Zhao, C., Yang, S. & Imhoff, J. F. (2014). Pigments accumulation via light and oxygen in *Rhodobacter capsulatus* strain XJ-1 isolated from saline soil. *Journal of Basic Microbiology*, *54*(8), 828–834. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200565>
- Liu, S., Zhang, G., Li, X., Wu, P. & Zhang, J. (2015). Enhancement of *Rhodobacter sphaeroides* growth and carotenoid production through biostimulation. *Journal of Environmental Sciences*, *33*, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.01.005>
- Liu, Y., Zhou, J., Omelchenko, M. V., Beliaev, A. S., Venkateswaran, A., Stair, J., Wu, L., Thompson, D. K., Xu, D., Rogozin, I. B., Gaidamakova, E. K., Zhai, M., Makarova, K. S., Koonin, E. V. & Daly, M. J. (2003). Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(7), 4191–4196. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630387100>
- Lott, S. C., Schäfer, R. A., Mann, M., Backofen, R., Hess, W. R., Voß, B. & Georg, J. (2018). GLASSgo – Automated and reliable detection of sRNA homologs from a single input sequence. *Frontiers in Genetics*, *9*, 124. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00124>
- Mackenzie, C., Choudhary, M., Larimer, F. W., Predki, P. F., Stilwagen, S., Armitage, J. P., Barber, R. D., Donohue, T. J., Hosler, J. P., Newman, J. E., Shapleigh, J. P., Sockett, R. E., Zeilstra-Ryalls, J. & Kaplan, S. (2001). The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Photosynthesis Research*, *70*(1), 19–41. <https://doi.org/10.1023/A:1013831823701>
- Mackenzie, C., Eraso, J. M., Choudhary, M., Roh, J. H., Zeng, X., Bruscella, P., Puskás, A. & Kaplan, S. (2007). Postgenomic adventures with *Rhodobacter sphaeroides*. *Annual Review of Microbiology*, *61*, 283–307. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093402>

- 
- Madden, T. (2013). The BLAST sequence analysis tool (2. Aufl.), In *The NCBI Handbook [Internet]* (2. Aufl.), National Center for Biotechnology Information (US).
- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D. & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- Madigan, M. T. & Martinko, J. M. (2009a). Die Regulation des Metabolismus. In *Brock Mikrobiologie* (11. Aufl., S. 230–255). München, Pearson Studium.
- Madigan, M. T. & Martinko, J. M. (2009b). Ernährung, Laborkultivierung und Metabolismus von Organismen. In *Brock Mikrobiologie* (11. Aufl., S. 136–137). München, Pearson Studium.
- Maere, S., Heymans, K. & Kuiper, M. (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*, *21*(16), 3448–3449. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti551>
- Magnin, J.-P. & Deseure, J. (2019). Hydrogen generation in a pressurized photobioreactor: Unexpected enhancement of biohydrogen production by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Applied Energy*, *239*, 635–643. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.01.204>
- Majdalani, N., Cuning, C., Sledjeski, D., Elliott, T. & Gottesman, S. (1998). DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(21), 12462–12467. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12462>
- Mank, N. N., Berghoff, B. A., Hermanns, Y. N. & Klug, G. (2012). Regulation of bacterial photosynthesis genes by the small noncoding RNA PcrZ. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(40), 16306–16311. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207067109>
- Mann, M., Wright, P. R. & Backofen, R. (2017). IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA–RNA interactions. *Nucleic Acids Research*, *45*(W1), W435–W439. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx279>
- Mantione, K. J., Kream, R. M., Kuzelova, H., Ptacek, R., Raboch, J., Samuel, J. M. & Stefano, G. B. (2014). Comparing bioinformatic gene expression profiling methods: microarray and RNA-Seq. *Medical Science Monitor Basic Research*, *20*, 138–141. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.892101>
- Marioni, J. C., Mason, C. E., Mane, S. M., Stephens, M. & Gilad, Y. (2008). RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Research*, *18*(9), 1509–1517. <https://doi.org/10.1101/gr.079558.108>
-

- 
- Mars, R. A. T., Mendonça, K., Denham, E. L. & van Dijl, J. M. (2015). The reduction in small ribosomal subunit abundance in ethanol-stressed cells of *Bacillus subtilis* is mediated by a SigB-dependent antisense RNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1853*(10), 2553–2559. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.06.009>
- Martin, H.-D., Jäger, C., Ruck, C., Schmidt, M., Walsh, R. & Paust, J. (1999). Anti- and prooxidant properties of carotenoids. *Journal für praktische Chemie*, *341*(3), 302–308. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3897\(199904\)341:3<302::AID-PRAC302>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3897(199904)341:3<302::AID-PRAC302>3.0.CO;2-6)
- Massé, E., Escorcia, F. E. & Gottesman, S. (2003). Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes & Development*, *17*(19), 2374–2383. <https://doi.org/10.1101/gad.1127103>
- Masuda, S. & Bauer, C. E. (2002). AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Cell*, *110*(5), 613–623. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00876-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00876-0)
- Megger, D. A., Pott, L. L., Ahrens, M., Padden, J., Bracht, T., Kuhlmann, K., Eisenacher, M., Meyer, H. E. & Sitek, B. (2014). Comparison of label-free and label-based strategies for proteome analysis of hepatoma cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, *1844*(5), 967–976. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.07.017>
- Mercer, R. G. & Lang, A. S. (2014). Identification of a predicted partner-switching system that affects production of the gene transfer agent RcGTA and stationary phase viability in *Rhodobacter capsulatus*. *BMC Microbiology*, *14*(1), 71. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-71>
- Merl, J., Ueffing, M., Hauck, S. M. & von Toerne, C. (2012). Direct comparison of MS-based label-free and SILAC quantitative proteome profiling strategies in primary retinal Müller cells. *Proteomics*, *12*(12), 1902–1911. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100549>
- 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*. *Journal of Bacteriology*, *191*(13), 4473–4477.
- Miller, J. H. (1972). Assay of Beta-galactosidase, In *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Mirza, S. S., Qazi, J. I., Zhao, Q. & Chen, S. (2013). Photo-biohydrogen production potential of *Rhodobacter capsulatus*-PK from wheat straw. *Biotechnology for Biofuels*, *6*(1), 144. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-144>

- 
- Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Prado, F. M., Uemi, M., Corrêa, T. C., Toma, I. N., Bertolucci, A., Oliveira, M. C. B., Motta, F. D., Medeiros, M. H. G. & Di Mascio, P. (2007). Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation. *IUBMB Life*, *59*(4-5), 322–331. <https://doi.org/10.1080/15216540701242508>
- Møller, T., Franch, T., Højrup, P., Keene, D. R., Bächinger, H. P., Brennan, R. G. & Valentin-Hansen, P. (2002). Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Molecular Cell*, *9*(1), 23–30. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00436-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00436-1)
- Moore, J., Simon & Warren, M. J. W. (2012). The anaerobic biosynthesis of vitamin B<sub>12</sub>. *Biochemical Society Transactions*, *40*(3), 581–586. <https://doi.org/10.1042/BST20120066>
- Moraleda-Muñoz, A., Pérez, J., Fontes, M., Murillo, F. J. & Muñoz-Dorado, J. (2005). Copper induction of carotenoid synthesis in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, *56*(5), 1159–1168. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04613.x>
- Motulsky, H. & Christopoulos, A. (2004). *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting*. Oxford University Press.
- Müller, K. M. H., Berghoff, B. A., Eisenhardt, B. D., Remes, B. & Klug, G. (2016). Characteristics of Pos19 – a small coding RNA in the oxidative stress response of *Rhodobacter sphaeroides*. *PLOS ONE*, *11*(9), e0163425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163425>
- Müller, K. M. H. (2016). *Small regulatory RNAs promoting the oxidative stress response and adaptive metabolic changes in Rhodobacter sphaeroides* (Diss.). Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction, In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>
- Neter, J., Wasserman, W. & Kutner, M. H. (1990). *Applied Statistical Models*. Burr Ridge.
- Newman, J. D., Falkowski, M. J., Schilke, B. A., Anthony, L. C. & Donohue, T. J. (1999). The *Rhodobacter sphaeroides* ECF sigma factor,  $\sigma^E$ , and the target promoters *cycA* P3 and *rpoE* P1. *Journal of Molecular Biology*, *294*(2), 307–320. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3263>
- Ning, K., Fermin, D. & Nesvizhskii, A. I. (2012). Comparative analysis of different label-free mass spectrometry based protein abundance estimates and their correlation with RNA-Seq gene expression data. *Journal of Proteome Research*, *11*(4), 2261–2271. <https://doi.org/10.1021/pr201052x>
-

- 
- Nuss, A. M., Adnan, F., Weber, L., Berghoff, B. A., Glaeser, J. & Klug, G. (2013). DegS and RseP homologous proteases are involved in singlet oxygen dependent activation of RpoE in *Rhodobacter sphaeroides*. *PLoS ONE*, 8(11), e79520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079520>
- Nuss, A. M., Glaeser, J., Berghoff, B. A. & Klug, G. (2010). Overlapping alternative sigma factor regulons in the response to singlet oxygen in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, 192(10), 2613–2623. <https://doi.org/10.1128/JB.01605-09>
- Nuss, A. M., Glaeser, J. & Klug, G. (2009). RpoH<sub>II</sub> activates oxidative-stress defense systems and is controlled by RpoE in the singlet oxygen-dependent response in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, 191(1), 220–230. <https://doi.org/10.1128/JB.00925-08>
- Oberto, J. (2013). SyntTax: a web server linking synteny to prokaryotic taxonomy. *BMC Bioinformatics*, 14(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-4>
- Oh, J.-I., Eraso, J. M. & Kaplan, S. (2000). Interacting regulatory circuits involved in orderly control of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of Bacteriology*, 182(11), 3081–3087. <https://doi.org/10.1128/JB.182.11.3081-3087.2000>
- Ollagnier, S., Mulliez, E., Schmidt, P. P., Eliasson, R., Gaillard, J., Deronzier, C., Bergman, T., Gräslund, A., Reichard, P. & Fontecave, M. (1997). Activation of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*: the essential role of the iron-sulfur center for s-adenosylmethionine reduction. *Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24216–24223. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.39.24216>
- Opdyke, J. A., Kang, J.-G. & Storz, G. (2004). GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186(20), 6698–6705. <https://doi.org/10.1128/JB.186.20.6698-6705.2004>
- Orsi, E., Folch, P. L., Monje-López, V. T., Fernhout, B. M., Turcato, A., Kengen, S. W., Eggink, G. & Weusthuis, R. A. (2019). Characterization of heterotrophic growth and sesquiterpene production by *Rhodobacter sphaeroides* on a defined medium. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 46(8), 1179–1190. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02201-6>
- Pain, A., Ott, A., Amine, H., Rochat, T., Bouloc, P. & Gautheret, D. (2015). An assessment of bacterial small RNA target prediction programs. *RNA Biology*, 12(5), 509–513. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1020269>
- Patel, V. J., Thalassinou, K., Slade, S. E., Connolly, J. B., Crombie, A., Murrell, J. C. & Scrivens, J. H. (2009). A comparison of labeling and label-free mass spectrometry-based proteomics approaches. *Journal of Proteome Research*, 8(7), 3752–3759. <https://doi.org/10.1021/pr900080y>
-

- 
- Pattison, D. I., Rahmanto, A. S. & Davies, M. J. (2012). Photo-oxidation of proteins. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11(1), 38–53. <https://doi.org/10.1039/C1PP05164D>
- Peña, C., Castillo, T., García, A., Millán, M. & Segura, D. (2014). Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. *Microbial Biotechnology*, 7(4), 278–293. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12129>
- Peng, T., Berghoff, B. A., Oh, J.-I., Weber, L., Schirmer, J., Schwarz, J., Glaeser, J. & Klug, G. (2016). Regulation of a polyamine transporter by the conserved 3' UTR-derived sRNA SorX confers resistance to singlet oxygen and organic hydroperoxides in *Rhodobacter sphaeroides*. *RNA Biology*, 13(10), 988–999. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1212152>
- Peuser, V., Metz, S. & Klug, G. (2011). Response of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* to iron limitation and the role of a Fur orthologue in this response. *Environmental Microbiology Reports*, 3(3), 397–404. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00245.x>
- Peuser, V., Remes, B. & Klug, G. (2012). Role of the Irr Protein in the regulation of iron metabolism in *Rhodobacter sphaeroides*. *PLoS one*, 7(8), e42231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042231>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pollich, M. & Klug, G. (1995). Identification and sequence analysis of genes involved in late steps in cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, 177(15), 4481–4487. <https://doi.org/10.1128/jb.177.15.4481-4487.1995>
- Ponnampalam, S. N., Buggy, J. J. & Bauer, C. E. (1995). Characterization of an aerobic repressor that coordinately regulates bacteriochlorophyll, carotenoid, and light harvesting-II expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, 177(11), 2990–2997. <https://doi.org/10.1128/jb.177.11.2990-2997.1995>
- Prasad, A., Sedlářová, M. & Pospíšil, P. (2018). Singlet oxygen imaging using fluorescent probe Singlet Oxygen Sensor Green in photosynthetic organisms. *Scientific Reports*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31638-5>
- Qiu, D., Xie, M., Dai, J., An, W., Wei, H., Tian, C., Kempfer, M. L., Zhou, A., He, Z., Gu, B. & Zhou, J. (2016). Differential regulation of the two ferrochelata-se paralogues in *Shewanella loihica* PV-4 in response to environmental stresses (J. L. Schottel, Hrsg.). *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), <https://aem.asm.org/content/82/17/5077.full.pdf>, 5077–5088. <https://doi.org/10.1128/AEM.00203-16>
-

- R Core Team. (2019). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Raden, M., Ali, S. M., Alkhnabashi, O. S., Busch, A., Costa, F., Davis, J. A., Eggenhofer, F., Gelhausen, R., Georg, J., Heyne, S., Hiller, M., Kundu, K., Kleinkauf, R., Lott, S. C., Mohamed, M. M., Mattheis, A., Miladi, M., Richter, A. S., Will, S., Wolff, J., Wright, P. R. & Backofen, R. (2018). Freiburg RNA tools: a central online resource for RNA-focused research and teaching. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W25–W29. <https://doi.org/10.1093/nar/gky329>
- Remes, B., Berghoff, B. A., Förstner, K. U. & Klug, G. (2014). Role of oxygen and the OxyR protein in the response to iron limitation in *Rhodobacter sphaeroides*. *BMC Genomics*, *15*(1), 794. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-794>
- Remes, B., Eisenhardt, B. D., Srinivasan, V. & Klug, G. (2015). IscR of *Rhodobacter sphaeroides* functions as repressor of genes for iron-sulfur metabolism and represents a new type of iron-sulfur-binding protein. *MicrobiologyOpen*, *4*(5), 790–802. <https://doi.org/10.1002/mbo3.279>
- Ridgman, W. J. (1975). *Experimentation in Biology*. London, Blackie.
- Riske, K. A., Sudbrack, T. P., Archilha, N. L., Uchoa, A. F., Schroder, A. P., Marques, C. M., Baptista, M. S. & Itri, R. (2009). Giant vesicles under oxidative stress induced by a membrane-anchored photosensitizer. *Biophysical Journal*, *97*(5), 1362–1370. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.06.023>
- Robinson, C. K., Webb, K., Kaur, A., Jaruga, P., Dizdaroglu, M., Baliga, N. S., Place, A. & DiRuggiero, J. (2011). A major role for nonenzymatic antioxidant processes in the radioresistance of *Halobacterium salinarum*. *Journal of Bacteriology*, *193*(7), 1653–1662. <https://doi.org/10.1128/JB.01310-10>
- Roessner, C. A., Huang, K.-x., Warren, M. J., Raux, E. & Scott, A. I. (2002). Isolation and characterization of 14 additional genes specifying the anaerobic biosynthesis of cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) in *Propionibacterium freudenreichii* (*P. shermanii*). *Microbiology*, *148*, 1845–1853. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-6-1845>
- Romine, M. F., Rodionov, D. A., Maezato, Y., Osterman, A. L. & Nelson, W. C. (2017). Underlying mechanisms for syntrophic metabolism of essential enzyme cofactors in microbial communities. *The ISME Journal*, *11*(6), 1434–1446. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.2>
- Ryu, S., Gallis, B., Goo, Y. A., Shaffer, S. A., Radulovic, D. & Goodlett, D. R. (2008). Comparison of a label-free quantitative proteomic method based on peptide ion current area to the isotope coded affinity tag method. *Cancer Informatics*, *6*, 243–255. <https://doi.org/10.4137/cin.s385>

- Sandle, T. & Satyada, R. (2016). Determination of the cleaning efficiency for glassware in the pharmaceutical microbiology laboratory. *European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 16–22.
- Satoh, S., Mimuro, M. & Tanaka, A. (2013). Construction of a phylogenetic tree of photosynthetic prokaryotes based on average similarities of whole genome. *PLOS ONE*, 8(7), e70290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070290>
- Schindel, H. S. & Bauer, C. E. (2016). The RegA regulon exhibits variability in response to altered growth conditions and differs markedly between *Rhodobacter* species. *Microbial Genomics*, 2(10). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000081>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmidt, K. (1978). Biosynthesis of carotenoids. *The Photosynthetic Bacteria*, 729–750.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Scolnik, P. A., Walker, M. A. & Marrs, B. L. (1980). Biosynthesis of carotenoids derived from neurosporene in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Journal of Biological Chemistry*, 255(6), 2427–2432.
- Scott, A. I. & Roessner, C. A. (2002). Biosynthesis of cobalamin (Vitamin B<sub>12</sub>). *Biochemical Society Transactions*, 30(4), 613–620. <https://doi.org/10.1042/bst0300613>
- Sekiguchi, T., Ito, R., Hayakawa, H. & Sekiguchi, M. (2013). Elimination and utilization of oxidized guanine nucleotides in the synthesis of RNA and its precursors. *Journal of Biological Chemistry*, 288(12), 8128–8135. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.418723>
- Sganga, M. W. & Bauer, C. E. (1992). Regulatory factors controlling photosynthetic reaction center and light-harvesting gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Cell*, 68(5), 945–954. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90037-d](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90037-d)
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B. & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Shiozawa, J. A., Welte, W., Hodapp, N. & Drews, G. (1982). Studies on the size and composition of the isolated light-harvesting B800-850 pigment-protein complex of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 213(2), 473–485. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(82\)90573-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(82)90573-2)

- 
- Silva, F. T. M., Moreiram, L. R., Ferreira, J. d. S., Batista, F. R. X. & Cardoso, V. L. (2016). Replacement of sugars to hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* using dark fermentation effluent as substrate. *Bioresource Technology*, *200*, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.002>
- Simon, R., Prierer, U. & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology*, *1*(9), 784–791.
- Slade, D. & Radman, M. (2011). Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *75*(1), 133–191. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-10>
- Sledjeski, D. D., Gupta, A. & Gottesman, S. (1996). The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, *15*(15), 3993–4000.
- Šlouf, V., Chábera, P., Olsen, J. D., Martin, E. C., Qian, P., Hunter, C. N. & Polívka, T. (2012). Photoprotection in a purple phototrophic bacterium mediated by oxygen-dependent alteration of carotenoid excited-state properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(22), 8570–8575. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201413109>
- Stahl, W. & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, *24*(6), 345–351. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X)
- Stork, M., Di Lorenzo, M., Welch, T. J. & Crosa, J. H. (2007). Transcription termination within the iron transport-biosynthesis operon of *Vibrio anguillarum* requires an antisense RNA. *Journal of Bacteriology*, *189*(9), 3479–3488. <https://doi.org/10.1128/JB.00619-06>
- Storz, G. & Imlay, J. A. (1999). Oxidative Stress. *Current Opinion in Microbiology*, *2*(2), 188–194.
- Strnad, H., Lapidus, A., Paces, J., Ulbrich, P., Vleck, C., Paces, V. & Haselkorn, R. (2010). Complete genome sequence of the photosynthetic purple nonsulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus* SB 1003. *Journal of Bacteriology*, *192*(13), 3545–3546. <https://doi.org/10.1128/JB.00366-10>
- Sun, X., Harder, J., Krook, M., Jörnvall, H., Sjöberg, B. M. & Reichard, P. (1993). A possible glycine radical in anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the cloned *nrdD* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(2), 577–581. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.577>

- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J. & von Mering, C. (2019). STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- The Gene Ontology Consortium. (2019). The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D330–D338. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1055>
- Tkachenko, A. G., Pshenichnov, M. R. & Nesterova, L. Y. (2001). Putrescine as a factor protecting *Escherichia coli* against oxidative stress. *Microbiology*, 70(4), 422–428.
- Torrents, E., Aloy, P., Gibert, I. & Rodríguez-Trelles, F. (2002). Ribonucleotide reductases: divergent evolution of an ancient enzyme. *Journal of Molecular Evolution*, 55(2), 138–152. <https://doi.org/10.1007/s00239-002-2311-7>
- Torrents, E., Eliasson, R., Wolpher, H., Gräslund, A. & Reichard, P. (2001). The anaerobic ribonucleotide reductase from *Lactococcus lactis* interactions between the two proteins NrdD and NrdG. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33488–33494. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103743200>
- Touati, D. (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373(1), 1–6. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1518>
- Troost, K., Loeschke, A., Hilgers, F., Özgür, A. Y., Weber, T. M., Santiago-Schübel, B., Svensson, V., Hage-Hülsmann, J., Habash, S., Grundler, F. M. W., Schleker, A. S. S., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2019). Engineered *Rhodobacter capsulatus* as a phototrophic platform organism for the synthesis of plant sesquiterpenoids. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1998. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01998>
- Trujillo, M. E., Riesco, R., Benito, P. & Carro, L. (2015). Endophytic Actinobacteria and the interaction of *Micromonospora* and nitrogen fixing plants. *Frontiers in Microbiology*, 6(1341). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01341>
- van de Lagemaat, E. E., de Groot, L. C. P. G. M. & van den Heuvel, E. G. H. M. (2019). Vitamin B<sub>12</sub> in relation to oxidative stress: a systematic review. *Nutrients*, 11(2), 482. <https://doi.org/10.3390/nu11020482>
- van Gemerden, H. & Mas, J. (1995). Ecology of phototrophic sulfur bacteria. In N. G. Carr & B. E. Whitton (Hrsg.), *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (S. 49–85). Springer.
- van Liere, L. & Walsby, A. E. (1982). Interactions of cyanobacteria with light. In N. G. Carr & B. E. Whitton (Hrsg.), *The Biology of Cyanobacteria* (S. 9–45). University of California Press.
- van Niel, C. B. (1944). The culture, general physiology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriological Reviews*, 8, 1–118.

- Volk, M. (2016). *Transkriptionsanalyse bei Rhodobacter capsulatus unter dem Einfluss von Singulett-Sauerstoff* (Masterthesis). Justus-Liebig-Universität Gießen – Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie.
- Wang, L. & Lutkenhaus, J. (1998). FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. *Molecular Microbiology*, *29*(3), 731–740. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00958.x>
- Wang, X., Fang, Y., Wang, Y., Hu, J., Zhang, A., Ma, X., Yang, H. & Guo, L. (2018). Single-stage photo-fermentative hydrogen production from hydrolyzed straw biomass using *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy*, *43*(30), 13810–13820. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.057>
- Watabe, N., Ishida, Y., Ochiai, A., Tokuoka, Y. & Kawashima, N. (2007). Oxidation decomposition of unsaturated fatty acids by singlet oxygen in phospholipid bilayer membranes. *Journal of Oleo Science*, *56*(2), 73–80. <https://doi.org/10.5650/jos.56.73>
- Waters, L. S. & Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, *136*(4), 615–628. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.043>
- Wen, Y., Feng, J. & Sachs, G. (2013). *Helicobacter pylori* 5' *ureB*-sRNA, a cis-encoded antisense small RNA, negatively regulates *ureAB* expression by transcription termination. *Journal of Bacteriology*, *195*(3), 444–452. <https://doi.org/10.1128/JB.01022-12>
- Wilkinson, F., Helman, W. P. & Ross, A. B. (1995). Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, *24*(2), 663–677. <https://doi.org/10.1063/1.555965>
- Wright, P. R., Georg, J., Mann, M., Sorescu, D. A., Richter, A. S., Lott, S., Kleinkauf, R., Hess, W. R. & Backofen, R. (2014). CopraRNA and IntaRNA: predicting small RNA targets, networks and interaction domains. *Nucleic Acids Research*, *42*(W1), W119–W123. <https://doi.org/10.1093/nar/gku359>
- Wright, P. R., Richter, A. S., Papenfort, K., Mann, M., Vogel, J., Hess, W. R., Backofen, R. & Georg, J. (2013). Comparative genomics boosts target prediction for bacterial small RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(37), E3487–E3496. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303248110>
- Wu, P., Xie, L., Mo, W., Wang, B., Ge, H., Sun, X., Tian, Y., Zhao, R., Zhu, F., Zhang, Y. Et al. (2019). The biodegradation of carbaryl in soil with *Rhodopseudomonas capsulata* in wastewater treatment effluent. *Journal of Environmental Management*, *249*, 109226. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.127>

- Xu, F. F. & Imlay, J. A. (2012). Silver(I), mercury(II), cadmium(II), and zinc(II) target exposed enzymic iron-sulfur clusters when they toxify *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(10), 3614–3621. <https://doi.org/10.1128/AEM.07368-11>
- Yang, K., Feng, C., Lip, H., Bruce, W. R. & O'Brien, P. J. (2011). Cytotoxic molecular mechanisms and cytoprotection by enzymic metabolism or autoxidation for glyceraldehyde, hydroxypyruvate and glycolaldehyde. *Chemico-Biological Interactions*, 191(1–3), 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.02.027>
- Yeliseev, A. A., Eraso, J. M. & Kaplan, S. (1996). Differential carotenoid composition of the B875 and B800-850 photosynthetic antenna complexes in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: involvement of spheroidene and spheroidenone in adaptation to changes in light intensity and oxygen availability. *Journal of Bacteriology*, 178(20), 5877–5883. <https://doi.org/10.1128/jb.178.20.5877-5883.1996>
- Yen, H. C. & Marrs, B. (1976). Map of genes for carotenoid and bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodospseudomonas capsulata*. *Journal of Bacteriology*, 126(2), 619–629. <https://doi.org/10.1128/JB.126.2.619-629.1976>
- Yin, L. & Bauer, C. E. (2013). Controlling the delicate balance of tetrapyrrole biosynthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1622), 20120262. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0262>
- Young, A. J. & Lowe, G. L. (2018). Carotenoids—antioxidant properties. *Antioxidants*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/antiox7020028>
- Zeilstra-Ryalls, J. H., Gabbert, K., Mouncey, N. J., Kaplan, S. & Kranz, R. G. (1997). Analysis of the *fnrL* gene and its function in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, 179(23), 7264–7273. <https://doi.org/10.1128/jb.179.23.7264-7273.1997>
- Zeilstra-Ryalls, J. H. & Kaplan, S. (1998). Role of the *fnrL* gene in photosystem gene expression and photosynthetic growth of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of Bacteriology*, 180(6), 1496–1503. <https://doi.org/10.1128/JB.180.6.1496-1503.1998>
- Zeller, T. & Klug, G. (2004). Detoxification of hydrogen peroxide and expression of catalase genes in *Rhodobacter*. *Microbiology*, 150(10), 3451–3462. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27308-0>
- Zeller, T., Li, K. & Klug, G. (2006). Expression of the *trxC* gene of *Rhodobacter capsulatus*: response to cellular redox status is mediated by the transcriptional regulator OxyR. *Journal of Bacteriology*, 188(21), 7689–7695. <https://doi.org/10.1128/JB.00660-06>
- Zeller, T., Mraheil, M. A., Moskvina, O. V., Li, K., Gomelsky, M. & Klug, G. (2007). Regulation of hydrogen peroxide-dependent gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*: regulatory functions of OxyR. *Journal of Bacteriology*, 189(10), 3784–3792. <https://doi.org/10.1128/JB.01795-06>

- Zeng, X. & Kaplan, S. (2001). TspO as a modulator of the repressor/antirepressor (PpsR/AppA) regulatory system in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of Bacteriology*, 183(21), 6355–6364. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6355-6364.2001>
- Zhang, L., Liu, L., Wang, K.-F., Xu, L., Zhou, L., Wang, W., Li, C., Xu, Z., Shi, T., Chen, H., Li, Y., Xu, H., Yang, X., Zhu, Z., Chen, B., Li, D., Zhan, G., Zhang, S.-L., Zhang, L.-X. & Tan, G.-Y. (2019). Phosphate limitation increases coenzyme Q<sub>10</sub> production in industrial *Rhodobacter sphaeroides* HY01. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 4(4), 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2019.11.001>
- Zhang, Y., Yang, H. & Guo, L. (2016). Enhancing photo-fermentative hydrogen production performance of *Rhodobacter capsulatus* by disrupting methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase gene. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(1), 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.09.122>
- Zhao, K., Yu, Y., Jiang, D., Wang, D., Li, Z.-M., Huang, G.-Z. & Bai, Z.-H. (2009). Degradation of dichlorvos by *Rhodobacter sphaeroides*. *Huan Jing ke Xue*, 30(4), 1199–1204.
- Zhao, S., Fung-Leung, W.-P., Bittner, A., Ngo, K. & Liu, X. (2014). Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PLOS one*, 9(1), e78644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078644>
- Zhu, Y. S., Cook, D. N., Leach, F., Armstrong, G. A., Alberti, M. & Hearst, J. E. (1986). Oxygen-regulated mRNAs for light-harvesting and reaction center complexes and for bacteriochlorophyll and carotenoid biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus* during the shift from anaerobic to aerobic growth. *Journal of Bacteriology*, 168(3), 1180–1188. <https://doi.org/10.1128/jb.168.3.1180-1188.1986>
- Ziegelhoffer, E. C. & Donohue, T. J. (2009). Bacterial responses to photo-oxidative stress. *Nature Reviews Microbiology*, 7(12), 856–863. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2237>
- Zufall, C. & Tyrell, T. (2008). The influence of heavy metal ions on beer flavour stability. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(2), 134–142. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00318.x>

## 7.1 Publikationen und Konferenzbeiträge

- Licht, M. K., Klug, G. & Konzer, A. (2019). Different strategies to defend against photooxidative stress in *Rhodobacter* (Vortrag), In *Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology 2019 – Abstractband*.
- Licht, M. K., Konzer, A. & Klug, G. (2018). Photooxidative stress response in *Rhodobacter capsulatus*: from physiology to omics (Poster), In *Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology 2018 – Abstractband*.
- Licht, M. K., Nuss, A. M., Volk, M., Konzer, A., Beckstette, M., Berghoff, B. A. & Klug, G. (2020). Adaptation to photooxidative stress: common and special strategies of the Alphaproteobacteria *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus*. *Microorganisms*, 8(2), 283. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020283>

## 7.2 Abschlussarbeiten

- Bolduan, V. M. (2018). *Die Regulation der photooxidativen Stressantwort in Rhodobacter capsulatus durch kleine RNA* (Bachelorthesis). Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Möscheid, M. F. (2017). *Charakterisierung von RpoH<sub>I</sub> und RpoH<sub>II</sub> Mutanten von Rhodobacter capsulatus in Bezug auf Wachstumsverhalten und oxidativen Stress* (Bachelorthesis). Justus-Liebig-Universität Gießen.

# Anhang

## A.1 Zusätzliche Informationen zu Methoden

Tabelle A.1: Annealingtemperaturen und Effizienzen für qRT-PCR-Primerpaare.

Oligonukleotid	Ziel-Gen(e)	Annealing-Temperatur (°C)	Effizienz
rpoZ-for rpoZ-rev	RCAP_rcc03318 ( <i>rpoZ</i> )	61,0	2,02
1669-A 1669-B	RSP_1669 ( <i>rpoZ</i> )	61,0	2,02
RCC_01829_RTfor	RCAP_rcc01829 ( <i>cbbM</i> )	61,0	2,01
RSP_3271_RTfor	RSP_3271 ( <i>rbpL</i> )	61,0	2,00
RSP_3271_RTrev	RCAP_rcc01829 ( <i>cbbM</i> ) RSP_3271 ( <i>rbpL</i> )	61,0	2,01 2,00
RSP_1149_RTfor	RCAP_rcc00163 ( <i>gltD</i> ) RSP_1149 ( <i>gltD</i> )	56,0 56,0	2,02 2,02
RCC_00163_RTrev	RCAP_rcc00163 ( <i>gltD</i> )	56,0	2,02
RSP_1149_RTrev	RSP_1149	56,0	2,02
RCC_01531_RTfor RCC_01531_RTrev	RCAP_rcc01531 ( <i>nuoI</i> )	60,0	1,95
RSP_2523_RTfor RSP_2523_RTrev	RSP_2523 ( <i>nuoI</i> )	66,0	1,93
RT-cysH-F RT-cysH-R	RCAP_rcc01593 ( <i>cysH</i> )	60,0	2,01
1941-F 1941-R	RSP_1941 ( <i>cysH</i> )	64,5	2,01
RT-cysP-F RT-cysP-R	RCAP_rcc02744 ( <i>cysP</i> )	63,0	2,01
3697-A 3697-B	RSP_3697 <i>cysP</i> )	56,0	1,96
RCC_00679_RTfor RCC_00679_RTrev	RCAP_rcc00679 ( <i>crtI</i> )	60,0	2,06
RSP_0271_RTfor RSP_0271_RTrev	RSP_0271 ( <i>crtI</i> )	61,0	2,05
RT-ChrR-F ChrR_KOcontroll_R	RCAP_rcc00698 ( <i>chrR</i> )	60,0	2,00

**Tabelle A.2: Einstellung für MUSCLE Alignment Options in MEGA X.**

Option	Einstellung
Gap Open	-2.90
Gap Extend	0.00
Hydrophobicity Multiplier	1.20
Max Memory in MB	2048
Max Iterations	16
Cluster Method (Iterations 1,2)	UPGMA
Cluster Method (Other Iterations)	UPGMA
Min Diag Length (Lambda)	24

**Tabelle A.3: Einstellung für Phylogeny Reconstruction in MEGA X.**

Option	Einstellung
Test of Phylogeny	Maximum Likelihood
No. of Bootstrap Replications	1000
Substitutionstype	Amino Acid
Model/Method	Jones-Taylor-Thornton (JTT)
Rate among Sites	Uniform Rates
Gap/Missing Data Treatment	Use all sites
ML Heuristic Method	Nearest-Neighbor-Interchange (NNI)
Initial Tree for ML	Make initial tree automatically (Default - NJ/BioNJ)
Branch Swap Filter	None
Number of Threads	3

**Tabelle A.4: Einstellung für mRNA-Ziel-Vorhersagen beim Online-Tool IntaRNA.**

Option	Einstellung
Number of interactions per RNA pair	1
Suboptimal interaction overlap	can overlap in query
No lonely base pairs	✓
No GU at helix ends	✓
Min. number of basepairs in seed	7
Ignore seeds with GU ends	✓

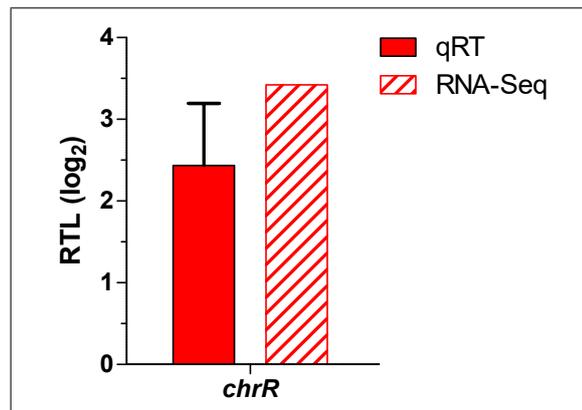
**Tabelle A.5: Einstellung für mRNA-Ziel-Vorhersagen beim Online-Tool TargetRNA2.**

Option	Einstellung
sRNA conservation and accessibility	✓
sRNA window size	13
From <input type="checkbox"/> NTs upstream	80
To <input type="checkbox"/> NTs downstream of the mRNA translation start site	20
Hybridization seed	7
NTs in interaction region	20
mRNA structural accessibility	✓
P-value threshold	0,05
Filter size	400

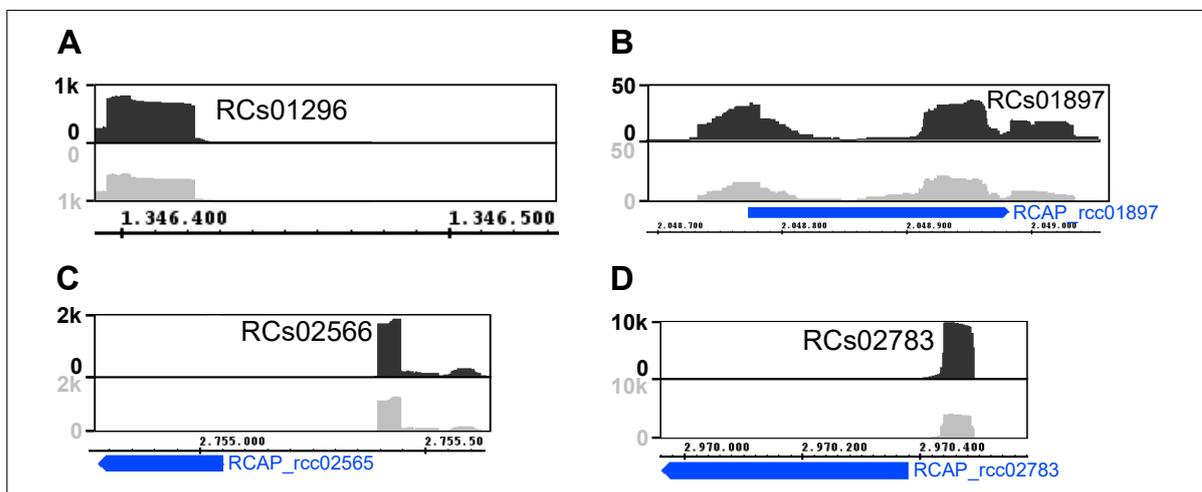
## A.2 Zusätzliche Ergebnisse

**Tabelle A.6: Verdopplungszeiten ( $t_d$ ) von *Rhodobacter* inklusive Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD).**

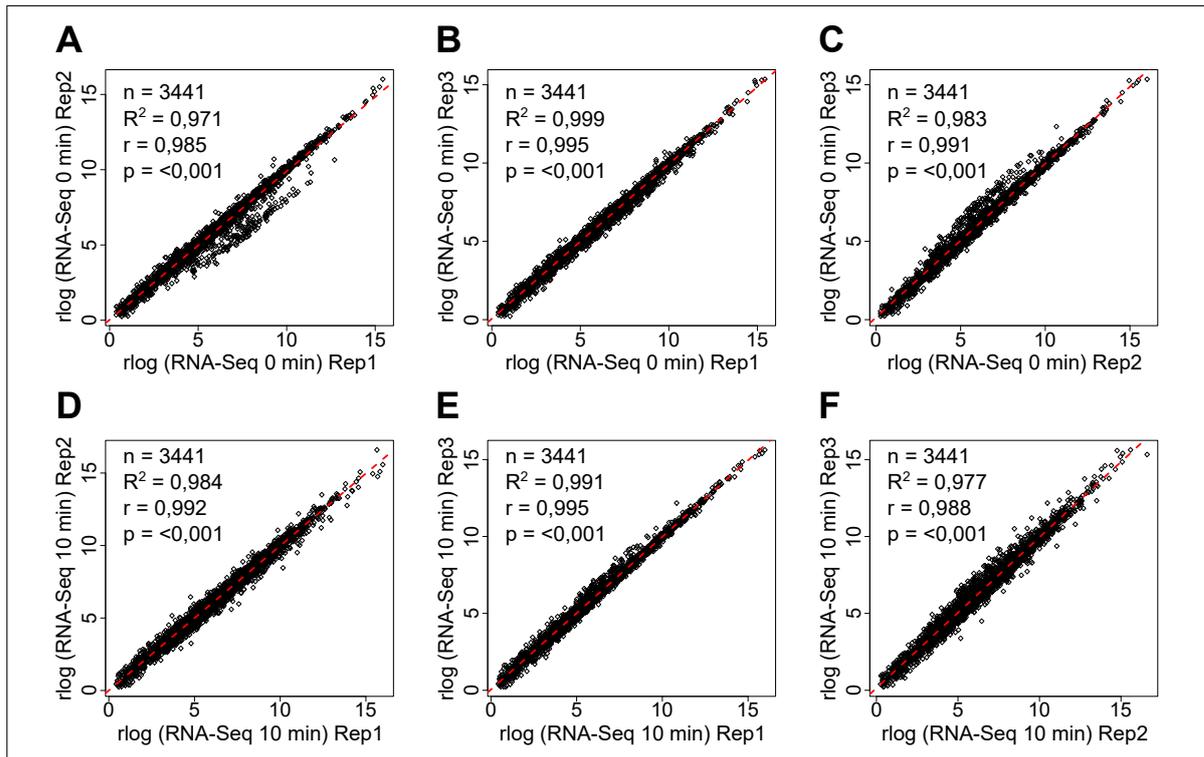
Replikat	<i>R. capsulatus</i> $t_d$ (h:min)					<i>R. sphaeroides</i> $t_d$ (h:min)				
	1	2	3	MW	SD	1	2	3	MW	SD
Mikroaerob	3:58	3:52	4:01	3:57	0:03	4:21	3:50	4:21	4:11	0:14
Aerob	3:06	2:39	3:24	3:03	0:18	2:54	3:24	3:33	3:17	0:16
Anaerob	3:40	3:41	3:31	3:37	0:04	7:26	6:50	6:13	6:49	0:29



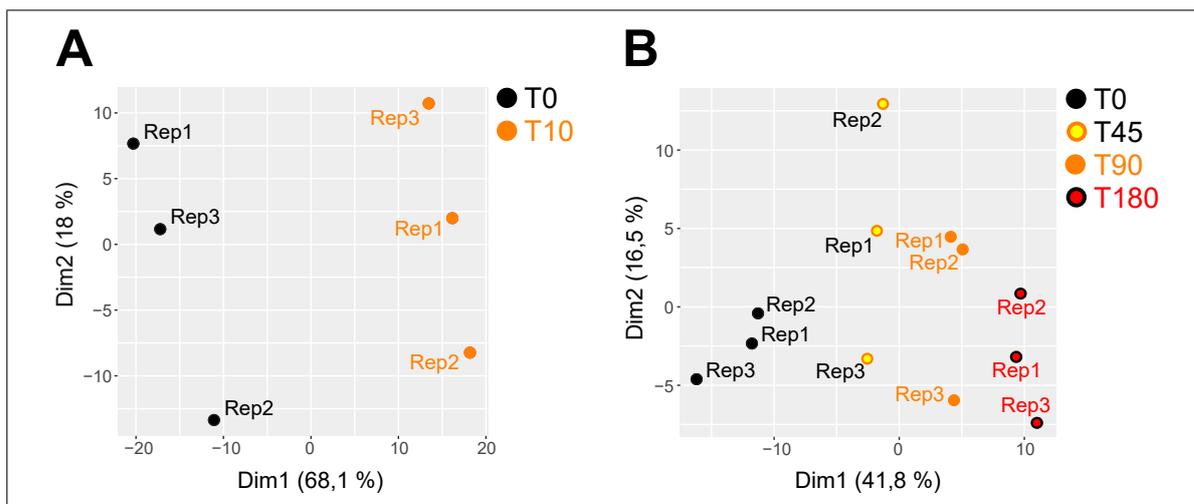
**Abbildung A.1:** Veränderungen der Expression von *chrR* in *R. capsulatus* nach Beginn photooxidativen Stresses. Die relativen Transkriptlevel (RTL) wurden in Relation zu ungestressten Kontrollen von *R. capsulatus* (*R.c.* SB1003) bestimmt. Gezeigt sind zum Vergleich die RNA-Seq-Daten von *R. capsulatus*. Die qRT-PCR (qRT)-Daten stellen den Mittelwert biologischer Triplikate da, der dazugehörige Fehlerbalken zeigt die Standardabweichungen.



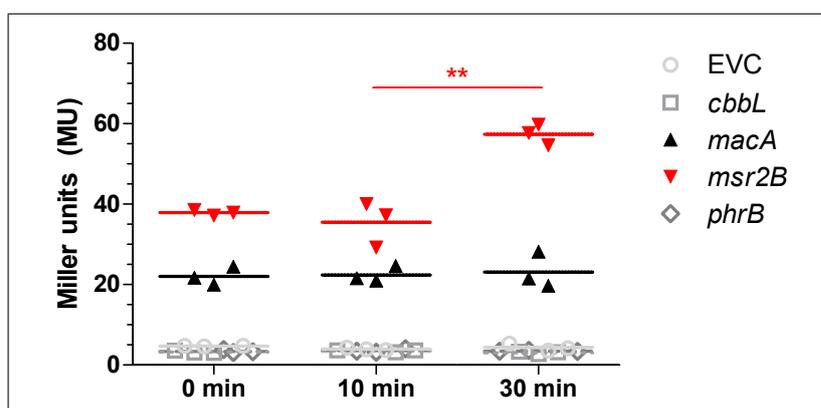
**Abbildung A.2:** Mögliche sRNAs von *R. capsulatus*, welche via RNA-Seq aufgezeigt wurden. Die RNA-Seq-Daten zeigen die Transkriptlevel (in counts), welche gegen die Sequenzen der sRNAs aufgetragen sind. Flankierende Gene sind in blau bzw. als Pfeile dargestellt. Der untere Graph (grau) zeigt die Transkriptlevel unmittelbar vor Beginn des photooxidativen Stresses ( $T_0$ ), der obere Graph (dunkelgrau) nach 10 min photooxidativen Stresses ( $T_{10}$ ).



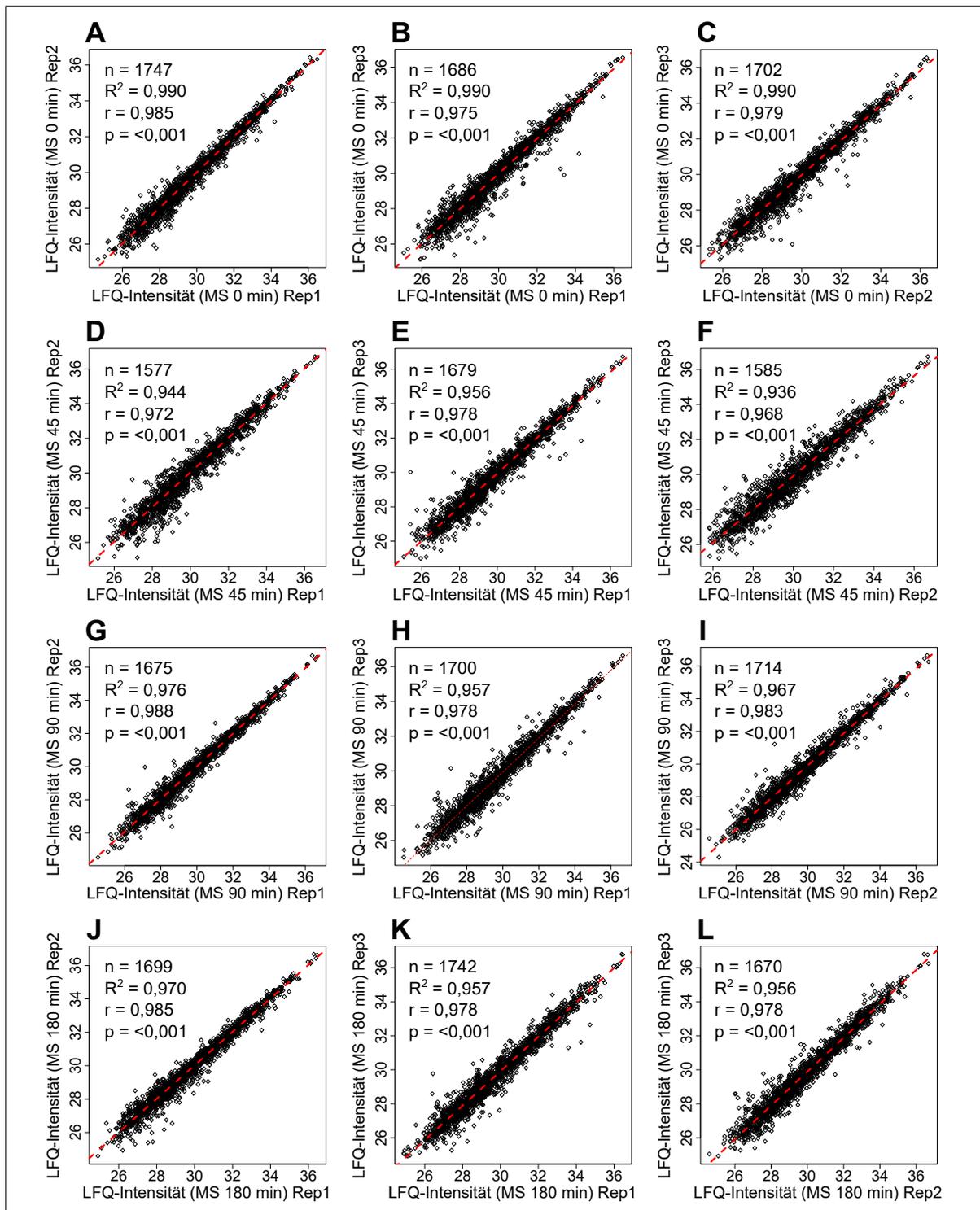
**Abbildung A.3: Korrelationsanalyse von RNA-Seq-Replikaten.** Dargestellt sind normalisierte und rlog-transformierte Read Counts der RNA-Seq-Analyse. Die Streudiagramme zeigen Vergleiche zwischen Replikaten. Rot-gestrichelte Linien zeigen die lineare Regression. Die Anzahl ( $n$ ), der Determinationskoeffizient ( $R^2$ ) und Pearson-Korrelationskoeffizient ( $r$ ) mitsamt dessen  $p$ -Wert sind angegeben. Adaptiert nach Licht et al. (2020).



**Abbildung A.4: Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse, PCA) von RNA-Seq- und LC-MS/MS-Replikaten.** (A) PCA von rlog-transformierten read counts von RNA-Seq unmittelbar vor Beginn photooxidativen Stresses 0 min (T0) und 10 min danach (T10). (B) PCA von LFQ-Intensitäten der LC-MS/MS-Analyse unmittelbar vor Beginn photooxidativen Stresses 0 min (T0) und 45 min, 90 min und 180 min danach (T45, T90 und T180). Dargestellt sind die Positionen der einzelnen Replikate (Rep) innerhalb der ersten beiden Dimensionen (Dim) der PCA. Zum Teil adaptiert nach Licht et al. (2020).



**Abbildung A.5: Promotoraktivitäten in *R. capsulatus* unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress.** Es wurden von den Genen *cbbL* (□), *macA* (▲), *msr2B* (▼), *phrB* (◇) sowie einer Leervektorkontrolle (EVC, ○) jeweils die Promotoraktivitäten in *R. capsulatus* unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress mittels Beta-Gelaktosidase-Assay untersucht. Eingezeichnet sind von biologischen Triplikaten die Beta-Galaktosidase-Aktivitäten (mit Mittelwerten) in Miller Units (Millereinheiten, MU) vor und nach 10 bzw. 30 min. Die MU waren zwischen 10 und 30 min hoch signifikant verschieden (\*\* p-Wert < 0,01).



**Abbildung A.6: Korrelationsanalyse von LC-MS/MS-Replikaten.** Dargestellt sind die LFQ-Intensitäten aus der LC-MS/MS-Analyse. Die Streudiagramme zeigen Vergleiche zwischen Replikaten. Rot-gestrichelte Linien zeigen die lineare Regression. Die Anzahl ( $n$ ), der Determinationskoeffizient ( $R^2$ ) und Pearson-Korrelationskoeffizient ( $r$ ) mitsamt dessen  $p$ -Wert sind angegeben. Zum Teil adaptiert nach Licht et al. (2020).

# Danksagung

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Frau Professorin Gabriele Klug, insbesondere dafür, dass sie mir das Vertrauen, die Möglichkeiten und stets die Unterstützung gab, an einem so spannenden Forschungsprojekt zu arbeiten. Ich danke ihr für das Erstgutachten meiner Arbeit und generell für die Chance, in diesem Projekt und von ihr soviel lernen zu können.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Albrecht Bindereif für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens der Arbeit.

Dr. Bork Berghoff möchte ich für seine unzähligen Ratschläge und seine Unterstützung bzw. Mitarbeit bei der LC-MS/MS-Analyse und unserer Publikation bedanken. Und nicht zuletzt danke ich ihm für seinen Sinn für Humor!

Mit Blick auf die in dieser Arbeit sehr prominenten LC-MS/MS- und RNA-Seq-Daten möchte ich mich an dieser Stelle bei Dr. Anne Konzer und Dr. Aaron Nuss bedanken, deren Hilfe maßgeblich für die Datengrundlage war. Für die Vorarbeiten zum RNA-Seq und die Einführung in das Thema bedanke ich mich auch bei Marcel Volk.

Dr. Jochen Bathke gilt mein Dank dafür, dass er mich so motivierend in die Auswertung von Omics-Daten eingeführt und beraten hat.

Ein großes Dankeschön geht auch an Herrn Dr. Matthew McIntosh dafür, dass er sich stets viel Zeit nahm, mich bei vielen Forschungsproblemen zu beraten. Hierbei denke ich besonders an seine Hilfe beim Entwickeln von Protokollen beim Tecan-Reader.

Auch möchte ich Herrn Professor Dr. Kai Thormann dafür danken, dass ich neben dem Mikroskop ganz besonders den Tecan-Reader so lange nutzen konnte.

Ein besonderer Dank geht natürlich auch an Kerstin, Andrea, Andreas, Carmen, Niklas und Stefan, auf deren Einsatz und zuverlässige Unterstützung ich stets zählen konnte.

Überhaupt danke ich allen Institutsmitarbeitern für das schöne Miteinander, die Hilfe untereinander und die gute Zeit, die ich garantiert nicht vergessen werde. In der Hoffnung, nicht die 200 Seiten-Marke zu knacken, möchte ich einigen MitstreiterInnen hier noch

einmal besonders danken.

Mein großer Dank gilt Carina, die nicht nur für viel Leben im Institut gesorgt hat, sondern mich mit ihrer hilfsbereiten und offenen Art oft kompetent unterstützt hat. Deshalb kann ich ihr auch nachsehen, in *Exploding Kittens* gegen sie verloren zu haben.

Genauso bedanke ich mich bei Julian, ein nicht nur fachkundiger, sondern auch entspannter und hilfsbereiter Kollege zu sein. Ohne ihn und Carina in der gleichen Laborbucht wäre es bestimmt nur halb so schön gewesen.

Mein besonderer Dank gilt auch Katrin, die stets gerne ihr Wissen teilte, was mir besonders in der Anfangsphase sehr geholfen hat.

Ich bedanke mich auch bei Hendrik, dass er mir kurzfristig mit qRT-PCR-Fragen so hilfreich zur Seite stand.

Für die kompetente Hilfe bei der Fluoreszenzmikroskopie mitsamt der Bildauswertung bedanke ich mich nochmals bei Anna, Tim, Marco und John.

Unvergessen bleiben werden mir Saina, Robina und Timon, welche mit ihrer lebhaften Art nicht nur, aber besonders die (Kaffee-)Pausen unterhaltsamer gemacht haben.

Meinen ehemaligen Bachelorstudenten Max Möscheid und Vanessa Bolduan danke ich für ihre Mitarbeit und dass ich durch Lehren lernen konnte.

Last but certainly not least möchte ich meiner Familie und meinem Freundeskreis für jegliche Unterstützung all die Jahre bedanken. Meinen Eltern danke ich auch für ihr Vertrauen in mich und jede moralische Unterstützung! Selbiges gilt auch für meine Geschwister.

Die Unterstützung vieler hat zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen. Danke für alles!