



**Synthese heterologer Membranproteine
und Carotinoide in dem phototrophen Bakterium**
Rhodobacter capsulatus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Diplom-Chemiker
Achim Heck

aus Lindau am Bodensee

Düsseldorf, Dezember 2008

Aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger
Korreferent: Prof. Dr. Georg Groth
Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2009

Meinen Eltern und Anne

Die Neugier steht immer an erster Stelle
eines Problems, das gelöst werden will.

Galileo Galilei

Veröffentlichungen während der Promotion

Drepper, T., Circolone, F., Heck, A., Krauss, U., Jaeger, K.-E. (2007): Bakterien sehen Blau – Neues über LOV-Photorezeptoren. *BIOspektrum* 04, 361-363.

Drepper, T., Eggert, T., Circolone, F., Heck, A., Krauss, U., Guterl, J. K., Wendorff, M., Losi, A., Gärtner, W. & Jaeger, K.-E. (2007): Reporter proteins for *in vivo* fluorescence without oxygen. *Nat Biotechnol* 25, 443-445.

Drepper, T., Heck, A., Jaeger, K.-E. (*invited review*, in Vorbereitung): Lighting up microbial processes – design and development of novel fluorescent proteins. *Microb Biotechnol*.

Katzke, N., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Heck, A., Markert, A., Svensson, V., Jaeger, K.-E., Drepper, T. (in Vorbereitung): A novel T7-polymerase dependent broad host range expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*.

Patentanmeldungen

Eggert, T., Drepper, T., Guterl, J. K., Krauss, U., Heck, A., Jaeger, K.-E. (2005): Fluoreszenzmarker und dessen Verwendung. DE 10 2005 048 828.5.

Drepper, T., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Heck, A., Jaeger, K.-E., Katzke, N., Markert, A., Svensson, V. (2008). Verfahren und Vektor zur heterologen Genexpression. DE 10 2008 013 304.3.

Vorträge im Rahmen der Jahrestagungen des Virtuellen Instituts für Biologische Strukturforschung (VIBS)

Heck, A., Drepper, T., Jaeger, K.-E. (2007): Novel genetic tools for photobiotechnological applications. *1st Annual VIBS Symposium*, Dortmund.

Heck, A., Drepper, T., Jaeger, K.-E. (2008): A novel high-level expression system in phototrophic bacteria – *Rhodobacter capsulatus* genetic toolbox for the synthesis of membrane proteins. *2nd Annual VIBS Symposium*, Bielefeld.

Posterpräsentationen auf internationalen Tagungen

Heck, A., Circolone, F., Guterl, J.-K., Krauß, U., Eggert, T., Jaeger, K.-E., Drepper, T. (2006): Fluorescence without oxygen: Development of a novel *in vivo* fluorescence reporter gene system in the facultative anaerobic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Jena.

Drepper, T., Circolone, F., Heck, A., Guterl, J.-K., Krauß, U., Eggert, T., Jaeger, K.-E. (2006): Fluorescence without oxygen: Development of a novel *in vivo* fluorescence reporter gene system in the facultative anaerobic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *10th International Congress on the Genetics of Industrial Microorganisms (GIM)*, Prag.

Circolone, F., Heck, A., Krauß, U., Wendorff, M., Guterl, J.-K., Eggert, T., Losi, A., Gärtner, W., Drepper, T., Jaeger, K.-E. (2007): *In vivo* fluorescence without oxygen: Novel fluorescent reporters for anaerobic systems. *Jahrestagung der DFG-Forschergruppe 526: Blue Light Photoreceptors (BLP)*, Bielefeld und *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Osnabrück.

Heck, A., Circolone, F., Potzkei, J., Svensson, V., Jaeger, K.-E., Drepper, T. (2008): A novel strategy for the high-level expression of heterologous membrane proteins. *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Frankfurt am Main.

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger danke ich für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas, den sehr guten Arbeitsbedingungen im Institut für Molekulare Enzymtechnologie, sowie für sein stetiges Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Georg Groth danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats sowie für die Überlassung des *EIN2*-Gens.

Ich bedanke mich beim Virtuellen Institut für Biologische Strukturforschung der Helmholtz-Gemeinschaft für die finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. M. Rögner, Ruhr-Universität Bochum, Prof. Dr. R. Müller, Universität des Saarlandes, Prof. Dr. U. Schurr, Jülich Forschungszentrum, Dr. L. Eggeling, Jülich Forschungszentrum und K. Blessing, Insta Elektro GmbH für die konstruktiven Kooperationen.

Ich danke Herrn Dr. Thomas Drepper für die hervorragende, engagierte und freundschaftliche Betreuung, die Diskussionsbereitschaft und die vielen wertvollen Ratschläge während der letzten Jahre.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des IMET, besonders aus L206, L306 und L409, für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die vielen lustigen Mittagessen.

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern. Ohne ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihren Zuspruch wäre die Anfertigung dieser Arbeit sicher nicht möglich gewesen.

Ebenso bedanke ich mich bei Anne, die jederzeit für mich da war und mir stets Halt gegeben hat.

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung	1
1 Engpässe bei der Synthese von Membranproteinen	2
1.1 Der genetische Code ist degeneriert	3
1.2 Oft haben Genprodukte toxische Wirkung auf heterologe Wirtszellen	3
1.3 Zellulärer Stress verursacht eine erhöhte proteolytische Aktivität	4
1.4 Probleme bei der Proteinfaltung	4
1.5 Notwendigkeit von Kofaktoren und weiteren Komponenten	5
2 Lösungsstrategien zur Überwindung der Engpässe bei der Synthese von Membranproteinen	6
2.1 Optimierung von Standardexpressionsstämmen	6
2.2 Das Purpurbakterium <i>Rhodobacter capsulatus</i> als alternativer Expressionswirt für heterologe Membranproteine	8
3 Funktion und industrielle Synthese von Carotinoiden	13
3.1 Physiologische Aufgaben von Carotinoiden	13
3.2 Alltägliche Verwendung von Carotinoiden	14
3.2.1 Carotinoide als Nahrungsergänzungsmittel und Kosmetikzusatz	14
3.2.2 Carotinoide als Lebensmittelfarbstoffe	15
3.2.3 Carotinoide als Zusatzstoffe in Futtermitteln	16
3.3 Industrielle Synthese von Carotinoiden	16
3.4 Carotinoidbiosynthese in <i>R. capsulatus</i>	18
4 Zielsetzung	20
II Material und Methoden	22
1 Bakterienstämme	22
1.1 <i>Escherichia coli</i> Stämme	22
1.2 <i>Rhodobacter capsulatus</i> Stämme	22
2 Vektoren und rekombinante Plasmide	22
2.1 Vektoren	22
2.2 Rekombinante Plasmide	23
3 Oligonukleotide und Sequenzierungen	23
3.1 Verwendete Oligonukleotide	23
3.2 Sequenzierungen	25
4 Nährmedien und Zusätze	25
4.1 Nährmedien	25
4.1.1 <i>E. coli</i> LB-Flüssigmedium	25
4.1.2 <i>E. coli</i> LB-Agar	25
4.1.3 <i>E. coli</i> Autoinduktionsmedium / TB-Medium	25

4.1.4	<i>E. coli</i> α -Komplementations-Agar	26
4.1.5	<i>R. capsulatus</i> PY-Agar	26
4.1.6	<i>R. capsulatus</i> PY-Flüssigmedium	26
4.1.7	<i>R. capsulatus</i> RCV-Minimalmedium	27
4.2	Antibiotika	28
5	Antiseren, Enzyme und Chemikalien	28
5.1	Verwendete Antiseren	28
5.2	Verwendete Enzyme	28
5.3	Verwendete Chemikalien	29
6	Puffer und Lösungen	31
6.1	Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung	31
6.2	Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese	31
6.3	Puffer und Lösungen zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	32
6.4	Puffer und Lösungen zur Proteinisolierung und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
6.4.1	Spezielle Puffer und Lösungen zur Proteinisolierung und SDS-PAGE bei Verwendung des Mini-PROTEAN Gelkammersystems der Firma Bio-Rad	34
6.4.2	Spezielle Puffer und Lösungen zur Proteinisolierung und SDS-PAGE bei Verwendung des XCell Sure Lock Systems der Firma Invitrogen	35
6.5	Puffer und Lösungen für das Immunoblotting	35
6.5.1	Spezielle Puffer und Lösungen für das Immunoblotting bei Verwendung des Mini-PROTEAN Gelkammersystems der Firma Bio-Rad	36
6.5.2	Spezielle Puffer und Lösungen für das Immunoblotting bei Verwendung des XCell Sure Lock Systems der Firma Invitrogen	36
7	Reaktions- und Nachweis-„Kits“	36
8	Sonstige Materialien und Geräte	36
9	Mikrobiologische Methoden	37
9.1	Anzucht von Bakterien	37
9.1.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	37
9.1.2	Induzierte Genexpression in <i>E. coli</i>	37
9.1.3	Phototrophe Anzucht von <i>R. capsulatus</i> unter Starklichtbedingungen	38
9.1.4	Aerobe Anzucht von <i>R. capsulatus</i> im Dunkeln	38
9.2	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	38
9.2.1	Herstellung chemisch transformationskompetenter <i>E. coli</i> Zellen	38
9.2.2	Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i> Zellen und phänische Expression	39
9.3	Konjugativer Plasmidtransfer mobilisierbarer Plasmide von <i>E. coli</i> nach <i>R. capsulatus</i>	39
10	RNA-Techniken	40
10.1	Standard-Präparation von bakterieller Gesamt-RNA	40
10.2	Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration	40
10.3	Reverse Transkription von RNA mit anschließender <i>real-time</i> -PCR	41

11	DNA-Techniken	41
11.1	Standard-Präparation von Plasmid-DNA	41
11.2	Midi-Präparation von Plasmid-DNA	42
11.3	Präzipitation von DNA durch Isopropanolfällung	42
11.4	DNA Konzentrationsbestimmung	43
11.5	Bestimmung der durchschnittlichen Plasmidkopienzahl pro Zelle in einer Bakterienkultur	43
12	In vitro Rekombination von DNA	44
12.1	Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	44
12.2	Agarosegelelektrophorese	44
12.3	Elution von DNA aus Agarosegelen	45
12.4	Ligation von Vektor- und Fragment-DNA	45
12.5	Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	45
12.6	Aufreinigung von PCR-Produkten	47
13	Protein-Techniken	47
13.1	Zellaufschluss zur Proteinisolierung	47
13.2	Fraktionierung von Zellbestandteilen	47
13.3	Fraktionierung für Lokalisationsstudien	48
13.4	TCA-Fällung	48
13.5	Gesamtproteinisolierung aus <i>E. coli</i>	48
13.6	Gesamtproteinisolierung aus <i>R. capsulatus</i>	49
13.7	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
13.8	Coomassie-Färbung zur Proteindetektion	50
13.9	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen	50
13.10	Immunodetektion von Proteinen	50
13.11	Färbung von PVDF-Membranen	51
14	Optische Methoden	51
14.1	Aufnahme von Carotinoidabsorptionsspektren	51
14.2	Verwendung von <i>light emitting diodes</i> (LEDs) zur Beleuchtung phototropher Organismen	51
15	Computerprogramme und Datenbanken	51
III	Ergebnisse	53
1	Etablierung von <i>R. capsulatus</i> als Wirt für die Synthese heterologer Membranproteine	53
1.1	Verwendung des neuen <i>R. capsulatus</i> Expressionssystems zur Synthese von heterologen Membranproteinen	55
1.1.1	Das Transmembranprotein Bacterioopsin aus <i>Halobacterium salinarum</i>	56
1.1.2	Klonierung des P _{T7} -abhängigen Bacterioopsin-Expressionsvektors	58
1.2	Untersuchungen zur P _{T7} -abhängigen Expression von Bacterioopsin in <i>E. coli</i>	59
1.2.1	Bestimmung der Plasmidkopienzahl des P _{T7} -abhängigen Expressionsvektors pRhotHi-2- <i>bop</i> in den <i>E. coli</i> Expressionsstämmen BL21(DE3) und C43(DE3)	59

1.2.2	Bestimmung der Bacterioopsintranskriptmasse in den <i>E. coli</i> Expressionsstämmen BL21(DE3) pRhotHi-2- <i>bop</i> und C43(DE3) pRhotHi-2- <i>bop</i> _____	62
1.2.3	Lokalisation von Bacterioopsin in den <i>E. coli</i> Stämmen BL21(DE3) pRhotHi-2- <i>bop</i> und C43(DE3) pRhotHi-2- <i>bop</i> _____	65
1.3	Untersuchungen zur Expression von Bacterioopsin in <i>R. capsulatus</i> _____	68
1.3.1	Bestimmung der Plasmidkopienzahl des P _{T7} -abhängigen Expressionsplasmids pRhotHi-2- <i>bop</i> im neuen <i>R. capsulatus</i> Expressionsstamm B10S-T7 _____	68
1.3.2	Bestimmung der Bacterioopsintranskriptmasse im <i>R. capsulatus</i> Expressionsstamm B10S-T7 pRhotHi-2- <i>bop</i> _____	70
1.3.3	Akkumulation und Lokalisation von Bacterioopsin im <i>R. capsulatus</i> Expressionsstamm B10S-T7 pRhotHi-2- <i>bop</i> _____	73
1.3.4	Etablierung eines qualitativen photometrischen Tests zum Nachweis des Bacterioopsineinbaus in die Vesikel des ICM von <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 pRhotHi-2- <i>bop</i> _____	80
1.4	Synthese weiterer Membranproteine unterschiedlicher Topologie und Herkunft in <i>R. capsulatus</i> _____	83
1.4.1	Die Arabinofuranosyltransferasen AftA und Emb aus <i>Corynebacterium glutamicum</i> _____	83
1.4.2	Das eukaryotische Ethyleninsensitivprotein 2 (EIN2) aus <i>Arabidopsis thaliana</i> _____	85
1.4.3	Die Squalenepoxidase Sqep aus <i>Stigmatella aurantiaca</i> _____	87
1.4.4	Untersuchungen zur P _{T7} -abhängigen Synthese ausgewählter pro- und eukaryotischer Membranproteine in den <i>E. coli</i> Expressionsstämmen BL21(DE3) und C43(DE3) _____	90
1.4.4.1	Untersuchungen zu den Plasmidkopienzahlen der erzeugten rekombinanten P _{T7} -abhängigen Expressionsplasmide pro Zelle in den <i>E. coli</i> Expressionsstämmen BL21(DE3) und C43(DE3). _____	91
1.4.4.2	Bestimmung der Transkriptmassen ausgewählter heterologer Gene im P _{T7} -abhängigen Expressionsplasmid pRhotHi-2 in den <i>E. coli</i> Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3) _____	96
1.4.4.3	Akkumulation und Lokalisation von AftA, Emb, Sqep und EIN2-MB in den <i>E. coli</i> Expressionsstämmen BL21(DE3) und C43(DE3) _____	99
1.4.5	Untersuchungen zur P _{T7} -abhängigen Synthese ausgewählter pro- und eukaryotischer Membranproteine im neuen <i>R. capsulatus</i> Expressionsstamm B10S-T7 _____	102
1.4.5.1	Analyse der Plasmidkopienzahlen der erzeugten rekombinanten P _{T7} -abhängigen Expressionsplasmide pro Zelle im neuen <i>R. capsulatus</i> Expressionsstamm B10S-T7 _____	102
1.4.5.2	Bestimmung der Transkriptmassen der heterologen Gene <i>aftA</i> , <i>emb</i> , <i>sqep</i> und <i>EIN2</i> -MB im <i>R. capsulatus</i> Expressionsstamm B10S-T7 _____	106
1.4.5.3	Akkumulation und Lokalisation der Genprodukte AftA, Emb, Sqep und EIN2-MB im <i>R. capsulatus</i> Expressionsstamm B10S-T7 _____	109
2	Untersuchungen zur Carotinoidsynthese in <i>R. capsulatus</i> _____	117
2.1	Einfluss der Lichtqualität auf das Wachstum und die Carotinoidsynthese von <i>R. capsulatus</i> : Das Standardbeleuchtungssystem für die photoheterotrophe Anzucht von <i>R. capsulatus</i> B10S _____	119
2.2	Einsatz von Leuchtdioden als alternatives Beleuchtungssystem für <i>R. capsulatus</i> B10S _____	123
IV	Diskussion _____	136
1	Synthese heterologer Membranproteine _____	136

1.1	Synthese heterologer Membranproteine in dem phototrophen Organismus <i>R. capsulatus</i> _____	138
1.2	Synthese heterologer Membranproteine in <i>E. coli</i> _____	141
1.3	Synthese heterologer Membranproteine in <i>Lactococcus lactis</i> _____	143
1.4	Synthese heterologer Membranproteine in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> _____	145
1.5	<i>R. capsulatus</i> B10SS-T7 – Ein Expressionswirt für die heterologe Synthese von <i>G protein-coupled receptors</i> ? _____	145
2	Carotinoidbiosynthese in <i>R. capsulatus</i> _____	146
2.1	Carotinoïdsynthese in Algen als mögliche Alternative zur industriellen Synthese _____	146
2.2	Bakterielle Carotinoïdsynthese in <i>R. capsulatus</i> _____	147
2.3	Ist <i>R. capsulatus</i> blaulichtreguliert? _____	148
V	Zusammenfassung _____	150
VI	Summary _____	152
VII	Literatur _____	154
VIII	Anhang _____	164

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das einzellige, freilebende nicht Schwefel-Purpurbakterium <i>Rhodobacter capsulatus</i> .	9
Abbildung 2: Ausbildung der intracytoplasmatischen Membran in <i>R. capsulatus</i> unter phototrophen Wuchsbedingungen.	10
Abbildung 3: Industriell hergestellte Carotinoide.	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Carotinoïdbiosynthese in <i>R. capsulatus</i> .	19
Abbildung 5: Dreidimensionale Struktur des Bacterioopsins.	57
Abbildung 6: Schematische Darstellung zur Klonierung des P_{T7} -abhängigen <i>Rhodobacter</i> -Expressionsvektors <i>pRhotHi-2-bop</i> .	58
Abbildung 7: Graphische Darstellung der real-time-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Plasmidkopienzahl des P_{T7} -abhängigen Bacterioopsin-Expressionsvektors <i>pRhotHi-2-bop</i> pro Zelle in den Expressionswirten <i>E. coli</i> BL21(DE3) und C43(DE3).	60
Abbildung 8: Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte der quantitativen real-time-PCR zur Bestimmung der <i>bop</i> -Transkriptmassen in den <i>E. coli</i> Expressionsstämmen BL21(DE3) und C43(DE3).	63
Abbildung 9: Graphische Darstellung der real-time-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Bacterioopsintranskriptmenge in den Expressionswirten <i>E. coli</i> BL21(DE3) und C43(DE3) mit dem P_{T7} -abhängigen Expressionsplasmid <i>pRhotHi-2-bop</i> .	64
Abbildung 10: Akkumulation von Bacterioopsin in <i>E. coli</i> BL21(DE3) <i>pRhotHi-2-bop</i> und C43(DE3) <i>pRhotHi-2-bop</i> .	66
Abbildung 11: Graphische Darstellung der real-time-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Plasmidkopienzahl des P_{T7} -abhängigen Bacterioopsin-Expressionsvektors <i>pRhotHi-2-bop</i> pro Zelle im <i>R. capsulatus</i> Expressionsstamm B10S-T7.	69
Abbildung 12: Graphische Darstellung der real-time-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Bacterioopsintranskriptmenge im Expressionswirt <i>R. capsulatus</i> B10S-T7.	71
Abbildung 13: Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte der quantitativen real-time-PCR zur Bestimmung der <i>bop</i> -Transkriptmassen im <i>R. capsulatus</i> Expressionsstamm B10S-T7.	72
Abbildung 14: Akkumulation und Lokalisation von Bacterioopsin in <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 <i>pRhotHi-2-bop</i>	74
Abbildung 15: Auftrennung der Membranfraktion einer <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 <i>pRhotHi-2-bop</i> Expressionskultur durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation.	76
Abbildung 16: Isolierung der ICM Vesikel aus der photosynthetischen Membran von <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 <i>pRhotHi-2</i> und B10S-T7 <i>pRhotHi-2-bop</i> .	77
Abbildung 17: Immunologischer Nachweis von Bacterioopsin in den Vesikeln des ICM von <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 <i>pRhotHi-2-bop</i> .	78

Abbildung 18: Photomertrischer Test zum Nachweis des Bacterioopsineinbaus in die ICM Vesikel des Expressionsstamms <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 pRhotHi-2-bop.	81
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Zellwand von <i>Corynebacteriaceae</i> und Start der Arabinansynthese am Galaktan.	84
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die P_{T7} -abhängigen Expressionsvektoren pRhotHi-2-EIN2 sowie pRhotHi-2-EIN2-MB.	88
Abbildung 22: Graphische Darstellung der real-time-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Plasmidkopienzahlen der erzeugten rekombinanten Expressionsvektoren für <i>aftA</i> , <i>emb</i> , <i>sqep</i> und EIN2-MB pro Zelle in den Expressionswirten <i>E. coli</i> BL21(DE3) und C43(DE3).	94
Abbildung 23: Graphische Darstellung der real-time-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Transkriptmassen für die Gene <i>aftA</i> , <i>emb</i> , <i>sqep</i> und EIN2-MB pro Zelle in den Expressionswirten <i>E. coli</i> BL21(DE3) und C43(DE3).	97
Abbildung 24: Akkumulation und Lokalisation von <i>AftA</i> , <i>Emb</i> , <i>Sqep</i> und EIN2-MB in <i>E. coli</i> BL21(DE3) und C43(DE3).	100
Abbildung 25: Graphische Darstellung der real-time-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Plasmidkopienzahlen der erzeugten rekombinanten Expressionsvektoren für <i>aftA</i> , <i>emb</i> , <i>sqep</i> und EIN2-MB pro Zelle in <i>R. capsulatus</i> B10S-T7.	105
Abbildung 26: Graphische Darstellung der real-time-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Transkriptmassen für die Gene <i>aftA</i> , <i>emb</i> , <i>sqep</i> und EIN2-MB pro Zelle im <i>R. capsulatus</i> Expressionsstamm B10S-T7.	107
Abbildung 27: Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte der quantitativen real-time-PCR zur Bestimmung der Zielgen-Transkriptmassen von <i>aftA</i> , <i>emb</i> , <i>sqep</i> und EIN2-MB im <i>R. capsulatus</i> Expressionsstamm B10S-T7.	108
Abbildung 28: Akkumulation und Lokalisation von <i>AftA</i> , <i>Emb</i> , <i>Sqep</i> und EIN2-MB in <i>R. capsulatus</i> B10S-T7.	110
Abbildung 29: Photomertrischer Test zum Nachweis des Squalenepoxidaseeinbaus in die ICM Vesikel des Expressionsstamms <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 pRhotHi-2-sqep.	112
Abbildung 30: Auftrennung der Membranfraktion einer <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 pRhotHi-2-sqep Expressionskultur durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation.	113
Abbildung 31: Isolierung der ICM Vesikel aus der photosynthetischen Membran von <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 pRhotHi-2-sqep.	114
Abbildung 32: Immunologischer Nachweis von Squalenepoxidase in den Vesikeln des ICM von <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 pRhotHi-2-sqep.	115
Abbildung 33: Carotinoidsynthese in <i>R. capsulatus</i> .	118
Abbildung 34: Lichtemission des Standardbeleuchtungssystems für die phototrophe Anzucht von <i>R. capsulatus</i> B10S.	120
Abbildung 35: Wuchsverhalten von <i>R. capsulatus</i> im definierten Standardbeleuchtungssystem mit Glühlampen.	121

Abbildung 36: Absorptionsspektren der Photopigmente aus *R. capsulatus* B10S Kulturen, die im Standardbeleuchtungssystem mit Glühlampen kultiviert wurden. _____ 122

Abbildung 37: Neuartige LED-Beleuchtungsplatinen zur alternativen Beleuchtung von *R. capsulatus* B10S. _____ 125

Abbildung 38: Lichtemissionsspektrum der für *R. capsulatus* entwickelten LED-Beleuchtungsplatinen. _____ 126

Abbildung 39: Wuchsverhalten von *R. capsulatus* B10S bei der Illumination mit LED-Beleuchtungssystemen. _____ 127

Abbildung 40: Untersuchung zur Blaulichtanpassung in *R. capsulatus* B10S. _____ 129

Abbildung 41: Absorptionsspektren der Photopigmente aus *R. capsulatus* B10S Kulturen, die im Blau- und Infrarotlicht, Infrarotlicht bzw. Blaulicht kultiviert wurden. _____ 132

Abbildung 42: Schematische Darstellung zur Synthese heterologer Membranproteine in *R. capsulatus* B10S-T7 mit dem P_{T7} -abhängigen Expressionsplasmid pRhotHi-2. _____ 137

Abbildung 43: Kommerzielle Biosynthese von Carotinoiden. _____ 146

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eingruppierung und Anzahl von Membranproteinen bekannter dreidimensionaler Struktur an Hand ihrer Topologie.	2
Tabelle 2: Auflistung der Carotinoide, die in der Europäischen Union als Lebensmittelfarbstoffe zugelassen sind.	15
Tabelle 3: Genotypen der verwendeten <i>E. coli</i> Stämme.	22
Tabelle 4: Genotypen der verwendeten <i>R. capsulatus</i> Stämme.	22
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Vektoren.	22
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Vektoren mit weitem Wirtsbereich.	23
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide.	23
Tabelle 8: Als Primer verwendete Oligonukleotide.	24
Tabelle 9: Verwendete Antibiotika.	28
Tabelle 10: Verwendete Chemikalien.	29
Tabelle 11: Plasmidkopienzahl der P_{T7} -abhängigen Vektoren pRhotHi-2 und pRhotHi-2-bop in den <i>E. coli</i> Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3).	61
Tabelle 12: Masse an Bacterioopsintranskript in den Expressionsstämmen <i>E. coli</i> BL21(DE3) pRhotHi-2-bop und C43(DE3) pRhotHi-2-bop.	65
Tabelle 13: Plasmidkopienzahl der bop-Expressions- und Kontrollvektoren in <i>R. capsulatus</i> B10S-T7.	70
Tabelle 14: Proteine, deren Synthese im Rahmen dieser Arbeit in <i>R. capsulatus</i> untersucht wurde.	88
Tabelle 15: Ergebnisse des basic local alignment search tools für den Vergleich der Aminosäuresequenz (BLASTP) der Squalenepoxidase aus <i>S. aurantiaca</i> mit den Aminosäuresequenzen der Organismen in den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI).	89
Tabelle 16: Topologievorhersage für die Squalenepoxidase aus <i>S. aurantiaca</i> mit Hilfe der Computerprogramme TMpred und TopPred.	89
Tabelle 17: Bestimmung der Zelldichten der transformierten <i>E. coli</i> Expressionskulturen BL21(DE3) und C43(DE3).	91
Tabelle 18: Plasmidkopienzahlen der verwendeten Expressions- und Kontrollvektoren in den <i>E. coli</i> Expressionsstämmen BL21(DE3) und C43(DE3).	93
Tabelle 19: Vergleich der Transkriptmassen der heterologen Gene <i>aftA</i> , <i>emb</i> , <i>sqep</i> und EIN2-MB in den <i>E. coli</i> Expressionsstämmen BL21(DE3) und C43(DE3).	98
Tabelle 20: Bestimmung der Zellzahlen der erzeugten Expressionskulturen des <i>R. capsulatus</i> Expressionsstamms B10S-T7.	103
Tabelle 21: Plasmidkopienzahlen der verwendeten Expressions- und Kontrollvektoren im <i>R. capsulatus</i> Expressionsstamm B10S-T7.	104
Tabelle 22: Vergleich der Transkriptmassen der heterologen Gene <i>aftA</i> , <i>emb</i> , <i>sqep</i> und EIN2-MB im <i>R. capsulatus</i> Expressionsstamm B10S-T7.	108
Tabelle 23: Wellenlängen der lokalen Absorptionsmaxima der Photopigmente in <i>R. capsulatus</i> B10S in vivo.	124

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Ampere
A. dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenintriphosphat
Bchl	Bakteriochlorophyll a
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CM	Cytoplasmamembran
Cm	Chloramphenicol
C-Terminus	Carboxyterminus
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPG	Eppendorfgefäß
g	Gramm
GPCR	G Protein-gekoppelter Rezeptor
h	Stunde(n)
ICM	Intracytoplasmatische Membran
IMET	Institut für Molekulare Enzymtechnologie
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
kPa	Kilopascal
l	Liter
LB	Luria-Bertani Broth
LOV	Light Oxygen Voltage
M	Mol/Liter
max.	maximal
mg	Milligramm
min	Minute(n)
min.	minimal, mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimol/Liter
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
N-Terminus	Aminoterminus
o.D. ₅₈₀	optische Dichte bei 580 nm
o.D. ₆₆₀	optische Dichte bei 660 nm
P	Promotor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pmol	Picomol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
STAS	Sulfate Transporter Anti Sigma
Tab.	Tabelle
Tc	Tetracyclin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TZ	Tischzentrifuge
U	Enzymeinheit
u. a.	unter anderem
u. U.	unter Umständen
ÜK	Übernachtskultur
UpM	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galctopyranosid
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein
λ	Wellenlänge

I Einleitung

Biomembranen sind Strukturen, die sowohl Zellen von ihrer Umgebung abgrenzen als auch einzelne Kompartimente innerhalb einer Zelle voneinander trennen. Diese Membranen bestehen aus Lipiden – angeordnet in einer Phospholipiddoppelmembran – sowie Proteinen, den Membranproteinen. Sie können entweder an der Biomembran angelagert oder in die Biomembran eingelagert (integrales Membranprotein) sein. Zu den integralen Membranproteinen zählen Transmembranproteine, die die Biomembran vollständig durchziehen und kanalartige Gebilde ausbauen können, sowie membranständige (periphere) Proteine, die nur in einer Seite der Membran verankert sind.

In den letzten Jahren haben zahlreiche Genomprojekte die außerordentliche Bedeutung von Membranproteinen weiter aufgedeckt: Aus diesen Projekten geht hervor, dass ungefähr 20 – 30 % aller bislang sequenzierten offenen Leserahmen (*open reading frames*, ORF) für Membranproteine kodieren (Ahram *et al.*, 2006; Elofsson & von Heijne, 2007). Das gilt auch für das humane Genom, in dem ebenfalls ungefähr ein Drittel aller ORFs für Membranproteine kodieren (Yin, 2008).

Diese Proteine erfüllen wichtige Funktionen in nahezu allen zellulären Prozessen, so z. B. bei der Signal-, Energie- und Reizweiterleitung oder bei Transportphänomenen (Elofsson & von Heijne, 2007). Dabei handelt es sich um hochkomplexe Prozesse in Netzwerken, deren einzelne Schritte bislang häufig nur unvollständig bekannt sind. Dennoch sind diese Netzwerke viel versprechende Angriffspunkte für neuartige Wirkstoffe und Pharmazeutika: Da heutzutage 60 – 70 % aller neuen pharmazeutischen Wirkstoffe mit Membranproteinen interagieren (Yin, 2008) beschäftigt die Aufklärung ihrer Wechselwirkungen und Funktion folglich in gleicher Weise die biologische Grundlagenforschung, wie auch die Biotechnologie, Medizin und Pharmazie.

Auf Grund des besonderen, amphiphilen Charakters von Membranproteinen, der sowohl große hydrophile wie auch lipophile Strukturelemente miteinander kombiniert, ergeben sich bei der Synthese von Membranproteinen jedoch besondere Engpässe, deren Überwindung eine große Herausforderung darstellt. So wurden bislang nur ungefähr 170 einmalige hochaufgelöste dreidimensionale Strukturen von Membranproteinen entschlüsselt. Von diesen sind weniger als 15 humanen Ursprungs (Tabelle 1, White, Stand Oktober 2008). Demgegenüber sind bereits knapp 50000 Strukturen löslicher Proteine bekannt (RCSB-ProteinDataBank, Stand Oktober 2008).

Tabelle 1: Eingruppierung und Anzahl von Membranproteinen bekannter dreidimensionaler Struktur an Hand ihrer Topologie.
(Nach White, Stand Oktober 2008).

Eingruppierung der Proteine auf Grund ihrer Topologie	Anzahl der bekannten Strukturen
Monotrope Membranproteine	10
Transmembranproteine mit β -Faltblatt-Strukturelementen	45
Transmembranproteine mit α -Helix-Strukturelementen	115

1 Engpässe bei der Synthese von Membranproteinen

Grundlage für das umfassende Verständnis der Funktion von Proteinen ist ihre Struktur. Es ist jedoch erforderlich, eine ausreichende Menge an Proteinen zu synthetisieren, um deren Struktur aufklären zu können. Die geringe zelluläre Konzentration der meisten Membranproteine im Ursprungsorganismus führt allerdings dazu, dass eine Aufreinigung der Proteine aus der Membran häufig schwierig bis unmöglich ist, weil sich die betreffenden Membranproteine auf Grund ihrer amphiphilen Natur nur unzureichend anreichern lassen oder hochkomplexe Isolations- und Reinigungsverfahren erfordern.

Die heterologe Expression der korrespondierenden Gene ist die einfachste und kostengünstigste Methode, große Mengen des Zielproteins für wissenschaftliche und kommerzielle Zwecke zu erzeugen. Dabei erfolgt die Synthese des Zielproteins nicht im Ursprungsorganismus, sondern mit Hilfe gentechnologischer Verfahren in einem anspruchslosen, genetisch und technisch gut handhabbaren Mikroorganismus oder in einer Zellkultur. Heutzutage existiert daher bereits eine Vielzahl etablierter Expressionssysteme, die auf Mikroorganismen wie Bakterien und Hefen oder auf höheren Organismen wie Insekten, Pflanzen und Tieren basieren.

Dabei ist die Expression in prokaryotischen und eukaryotischen Mikroorganismen von besonderer Bedeutung, weil sich diese mit Hilfe einer Vielzahl genetischer Methoden einfach manipulieren lassen. Kurze Generationszeiten und kostengünstige Kultivierung erlauben zudem eine äußerst ökonomische Produktion großer Mengen des Zielgenproduktes. So können die Ausbeuten heterolog synthetisierten Proteins bis zu 50 % des Zellgesamtproteins betragen (Alldread *et al.*, 1992). Allerdings ist nicht jeder Expressionswirt in gleichem Maß für die Synthese jedes heterologen Proteins, insbesondere jedes Membranproteins, geeignet. Die am häufigsten auftretenden Probleme bei der heterologen Synthese von Proteinen, insbesondere von Membranproteinen werden daher im Folgenden kurz erläutert.

1.1 Der genetische Code ist degeneriert

Es ist bekannt, dass unterschiedliche Organismen häufig verschiedene, alternative Kodons bevorzugen, um eine bestimmte Aminosäure zu codieren (Gutman & Hatfield, 1989). Diese Präferenz für bestimmte Kodons bezeichnet man als „*codon bias*“ (Carbone *et al.*, 2003). Dabei ist die Bevorzugung bestimmter Kodons hauptsächlich von der Art des Organismus abhängig. Sie kann allerdings auch innerhalb einer Zelle variieren, z. B. zwischen stark und schwach exprimierten Genen oder zwischen Genen, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen aktiv sind (Makrides, 1996; Saier Jr., 1995). Ein ähnliches Problem entsteht dadurch, dass einige Organismen nicht den „universellen“ genetischen Code verwenden, sondern eine alternative Form (Santos *et al.*, 2004). Bei der funktionellen heterologen Expression kann es folglich leicht zu Problemen kommen, wenn der Ursprungsorganismus eine andere *codon bias* aufweist als der heterologe Expressionswirt. So geht die Bevorzugung bestimmter Kodons meist damit einher, dass die spezifischen tRNA-Moleküle für diese Kodons im tRNA-*Pool* der Zelle deutlich stärker vertreten sind als die tRNA-Moleküle, die seltene Kodons erkennen. Enthält ein Gen nun viele solcher seltener Kodons, wird der Vorrat der kognitiven tRNA-Spezies für diese Kodons rasch erschöpft (Gustafsson *et al.*, 2004; Smith, 1996). Die Folge davon können Verzögerungen bei der Elongation der Peptidkette während der Translation (Zahn, 1996), Leserasterverschiebungen (McNulty *et al.*, 2003), translationale „Sprünge“ (Kane *et al.*, 1992) oder ein fehlerhafter Einbau anderer Aminosäuren (Calderone *et al.*, 1996; Forman *et al.*, 1998; McNulty *et al.*, 2003) sein.

1.2 Oft haben Genprodukte toxische Wirkung auf heterologe Wirtszellen

Neben der *codon bias* stellen toxische Proteine ein weiteres Problem bei der heterologen Expression dar. Die Synthese toxischer, rekombinanter Proteine kann zur Instabilität der Expressionsplasmide führen, wodurch die Ausbeuten des heterologen Proteins stark gemindert werden. Im Extremfall kann es sogar zum Tod des heterologen Wirts kommen. Oft lassen sich Expressionsvektoren, die Gene für stark toxische Genprodukte enthalten, nicht einmal in den Zellen etablieren, wenn der Promotor, der ihre Transkription kontrolliert, auch nicht-induziert ein basales Expressionslevel aufweist (Doherty *et al.*, 1993).

Häufig muss es sich beim exprimierten Genprodukt nicht einmal um ein toxisches Protein handeln, um die Zelle nachhaltig zu schädigen. So kann beispielsweise die Überexpression von nicht-toxischen Proteinen zu einer Überlastung des Metabolismus und damit zu

verminderten Wachstumsraten (Andersson *et al.*, 1996) oder zum Tod des heterologen Wirts führen (Dong *et al.*, 1995). Dies hängt damit zusammen, dass die Expression großer Mengen rekombinanten Proteins die Zelle durch die Erhaltung und Replikation der Expressionsplasmide (Corchero & Villaverde, 1998), sowie durch die Expression der plasmidkodierten Gene (Glick, 1995) wichtige Ressourcen und Energie „kostet“. Das wiederum kann nicht allein die Expression des heterologen Proteins beeinträchtigen, sondern auch die Funktionalität lebenswichtiger Zellprozesse (Glick, 1995; Hoffmann & Rinas, 2001).

1.3 Zellulärer Stress verursacht eine erhöhte proteolytische Aktivität

Eine andere problematische Folge heterologer Überexpression kann die Induktion einer Stress-Antwort der Zelle sein. Dabei werden unter anderem Hitzeschock-Gene und Gene für DNA-Reparatur in verstärktem Maße exprimiert (Gill *et al.*, 2000; Lesley *et al.*, 2002; Rinas, 1996). Eine der Folgen ist dann die erhöhte proteolytische Aktivität der Zellen aufgrund stärkerer Expression von Proteasen (Harcum & Bentley, 1999; Ramírez & Bentley, 1999), welche wiederum die Ausbeute des rekombinanten Proteins senken kann.

1.4 Probleme bei der Proteinfaltung

Die Faltung des heterologen Proteins kann ein weiteres Problem bei der heterologen Expression darstellen (Baneyx & Mujacic, 2004). Da manche Proteine auf spezifische Faltungshelfer wie Foldasen und Chaperone angewiesen sind, die vom heterologen Wirt teilweise nicht exprimiert werden (Schlieker *et al.*, 2002), führt die inkorrekte Faltung eines Proteins zu dessen Abbau durch wirtseigene Proteasen (Goff & Goldberg, 1985; Makrides, 1996) oder zur Aggregation des Proteins und zur Bildung von unlöslichen so genannten Einschlusskörpern („*inclusion bodies*“) (Baneyx & Mujacic, 2004; Wall & Plückthun, 1995). Diese Bildung von *inclusion bodies* ist ein häufig auftretendes Problem bei der heterologen Expression (Rinas & Bailey, 1993; Villaverde & Carrió, 2003), da diese zusätzlich von weiteren verschiedensten Faktoren beeinflusst wird. Dazu gehören neben dem Expressionslevel (Strandberg & Enfors, 1991) auch die strukturellen Eigenschaften des rekombinanten Proteins (Murby *et al.*, 1995). In Bezug auf Membranproteine ist das ein besonders wichtiger Aspekt, da diese große hydrophobe Bereiche aufweisen, mit denen sie an Biomembranen assoziiert oder in ihnen inseriert sind. Aufgrund von hydrophoben Interaktionen dieser Bereiche kommt es besonders schnell zur Bildung von *inclusion bodies*, vor allem, wenn das heterolog synthetisierte Protein nicht schnellstmöglich prozessiert und in die betreffende Biomembran inseriert oder angelagert wird.

1.5 Notwendigkeit von Kofaktoren und weiteren Komponenten

Zusätzlich sind einige Proteine, damit sie in aktiver Form exprimiert werden können, auf weitere Komponenten angewiesen. So benötigen manche Membranproteine die Gegenwart spezifischer assoziierter Lipide (Opekarová & Tanner, 2003), die häufig in heterologen Wirten nicht synthetisiert werden. Andere Proteine durchlaufen eine Vielzahl von Modifikationen, ehe sie ihre aktive Konformation erreichen (Wenzel & Müller, 2005). Wieder andere Proteine benötigen Kofaktoren oder prosthetische Gruppen, um aktiviert zu werden.

2 Lösungsstrategien zur Überwindung der Engpässe bei der Synthese von Membranproteinen

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Strategien entwickelt, um die genannten Probleme bei der heterologen Synthese von Proteinen im Allgemeinen und von Membranproteinen im Speziellen zu überwinden. Grundsätzlich können dabei zwei unterschiedliche Wege beschritten werden. Einerseits ist es möglich, einen vorhandenen Standardexpressionsstamm mit Hilfe molekulargenetischer Verfahren gezielt für die Expression eines problematischen Zielproteins zu optimieren. Andererseits kann die Expression problematischer Proteine auch in alternativen Wirtsorganismen erfolgen, die aufgrund ihrer physiologischen, genetischen oder strukturellen Eigenschaften für eine effiziente Synthese der betreffenden Proteine besser geeignet sind als herkömmliche Synthesewirte.

2.1 Optimierung von Standardexpressionsstämmen

Zur Überwindung einer unterschiedlichen *codon bias* zwischen Ursprungs- und Expressionswirt gibt es zwei verschiedene Methoden. Die erste Möglichkeit ist die Koexpression von Genen, die für die kognitiven tRNAs der seltenen Kodons codieren (Forman *et al.*, 1998; McNulty *et al.*, 2003; Sørensen *et al.*, 2003). Dazu muss die betreffende tRNA jedoch überexprimiert werden und entzieht der Zelle somit einen Teil ihrer „Syntheseleistung“ für ihre eigene Expression. Zusätzlich müssen weitere Expressionsplasmide mit den Genen dieser tRNAs im Organismus etabliert und repliziert werden. Dadurch wird die Auswahl der Expressionsplasmide stark eingeschränkt, da Inkompatibilitäten der verwendeten Vektoren vermieden werden müssen. Anderenfalls käme es zu weiterem, kontraproduktiven, metabolischen Stress für den heterologen Wirt.

Bei der zweiten Methode zur Überwindung der *codon bias* werden seltene Kodons des Zielgens durch gezielte Mutationen in andere Kodons überführt, die für die gleiche Aminosäure codieren, vom Expressionswirt aber bevorzugt verwendet werden (Calderone *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2006; Deng, 1997). Für den Fall, dass sehr viele Veränderungen durchgeführt werden müssen, kann diese Methode die sehr zeit- und kostenaufwendige komplette Neusynthese des betreffenden Gens erfordern (Feng *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 1999; Patterson *et al.*, 2005).

Sollen toxische Proteine synthetisiert werden, ist die Verwendung strikt regulierter Promotoren die effektivste Methode, damit der Wirt zunächst ausreichend Biomasse bilden

kann, bevor mit der Expression begonnen wird (Jonasson *et al.*, 2002; Rossi & Blau, 1998; Studier, 1991; Wycuff & Matthews, 2000).

Um die Bildung von „*inclusion bodies*“ zu verhindern kann durch die Koexpression von Faltungsmodulatoren die Faltung von Proteinen verbessert werden (Baneyx & Mujacic, 2004; Schlieker *et al.*, 2002; Wall & Plückthun, 1995), wobei allerdings ähnliche Probleme entstehen wie bei der Koexpression von tRNAs. Auch die Koexpression molekularer Chaperone wie DnaK, DnaJ und GrpE (Nishihara *et al.*, 1998), GroEL und GroES (Amrein *et al.*, 1995; Nishihara *et al.*, 1998; Yasukawa *et al.*, 1995) sowie FkpA (Arié *et al.*, 2001) kann die Faltung von heterolog synthetisiertem Protein unterstützen und somit die Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein erhöhen, ebenso wie die Optimierung der Wachstumsbedingungen (Georgiou & Valax, 1996).

Zusätzlich kann der proteolytische Abbau von rekombinanten Proteinen häufig durch die Verwendung von Protease-defizienten Expressionsstämmen vermieden werden (Chen *et al.*, 2004; Nishihara *et al.*, 1998; Sørensen & Mortensen, 2005). Auch die Fusion des rekombinanten Proteins mit stabilisierenden Partnerproteinen (Corchero *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 1995; Skosyrev *et al.*, 2003) oder die Koexpression stabilisierender Faktoren (LeThanh *et al.*, 2005) können zum Erfolg führen.

Benötigt ein Protein, um in aktiver Form exprimiert zu werden, spezifische zusätzliche Komponenten wie etwa Kofaktoren oder Komplexpartner, kann dieses Problem manchmal durch die Koexpression der notwendigen Komponenten behoben werden (Weickert *et al.*, 1996).

Häufig führt jedoch die Optimierung eines einzelnen Faktors nicht zu erhöhten Proteinsyntheseraten. Sie hat sogar oftmals negative Auswirkungen auf die heterologe Expression, so dass weitere Faktoren modifiziert werden müssen.

Die vorgestellten Lösungsstrategien ermöglichen dennoch die Behebung von Expressionsproblemen, so z. B. bei der Synthese von löslichen Proteinen in Standardexpressionssystemen wie dem Gram-negativen Enterobakterium *Escherichia coli*.

Sie sind jedoch mit einem hohen Zeit- und Kostenaufwand verbunden und führen nicht immer zum gewünschten Erfolg. Hinzu kommt, dass für jedes „Problemprotein“ eine individuelle Optimierung des Expressionswirts vorgenommen werden muss.

Gerade bei der Synthese von heterologen Membranproteinen kommt es in den bekannten Systemen jedoch in der Regel zu einem Problem, bei dem selbst die oben beschriebenen

Optimierungsstrategien nicht greifen: Membranproteine müssen nach ihrer Synthese in die Membran eingebaut werden, da es sonst auf Grund ihres amphiphilen Charakters unmittelbar zur Bildung von *inclusion bodies* kommt. In den etablierten Expressionsorganismen sind die vorhandenen Biomembranen nur in sehr geringem Maße in der Lage, heterolog synthetisierte Membranproteine aufzunehmen und so die Proteinaggregation zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde versucht, mit Hilfe von *Screening*-Verfahren, bereits etablierte Expressionswirte wie *E. coli* empirisch für die Synthese von Membranproteinen zu optimieren. So entstanden vor mehr als zehn Jahren aus dem für Überexpressionen häufig verwendeten *E. coli* Stamm BL21(DE3) die beiden Stämme C41(DE3) und C43(DE3), die mehrere uncharakterisierte Mutationen aufweisen und dadurch in der Lage sind, einige toxische Proteine und Membranproteine heterolog zu synthetisieren (Miroux & Walker, 1996). Dabei ist bislang unklar, warum die Plasmidstabilität in diesen Stämmen im Vergleich zum parentalen Stamm besser ist oder warum die Synthese einiger Membranproteine für die neuen Stämme weniger toxisch ist.

Aus diesem Grund stellt die Expression in einem alternativen Organismus häufig die bessere Lösung dar. Ein Beispiel für einen alternativen Expressionsorganismus, insbesondere für die Synthese von Membranproteinen, ist das phototrophe Purpurbakterium *Rhodobacter capsulatus*.

2.2 Das Purpurbakterium *Rhodobacter capsulatus* als alternativer Expressionswirt für heterologe Membranproteine

Als Vertreter der Familie der Rhodospirillaceae ist *R. capsulatus* ein einzelliges, frei lebendes, fakultativ anaerobes, phototrophes nicht Schwefel-Purpurbakterium (Weaver *et al.*, 1975), das erstmals 1907 von Molisch beschrieben wurde (Molisch, 1907). Zur α -Untergruppe der Proteobakterien und damit zu den physiologisch vielseitigsten und anpassungsfähigsten Organismen gehörend (Imhoff *et al.*, 1984), dienen dem stäbchenförmigen Gram-negativen Bakterium die lichtdurchdrungenen Schichten von stehenden oder langsam fließenden Gewässern und Seen sowie feuchter Boden und Schlamm als natürliche Habitate (Weaver *et al.*, 1975). *R. capsulatus* zeichnet sich phänotypisch unter anderem durch seine rote Pigmentierung aus, die unter phototrophen Wachstumsbedingungen durch Pigmente der Photosyntheseapparate hervorgerufen wird (Abbildung 1).

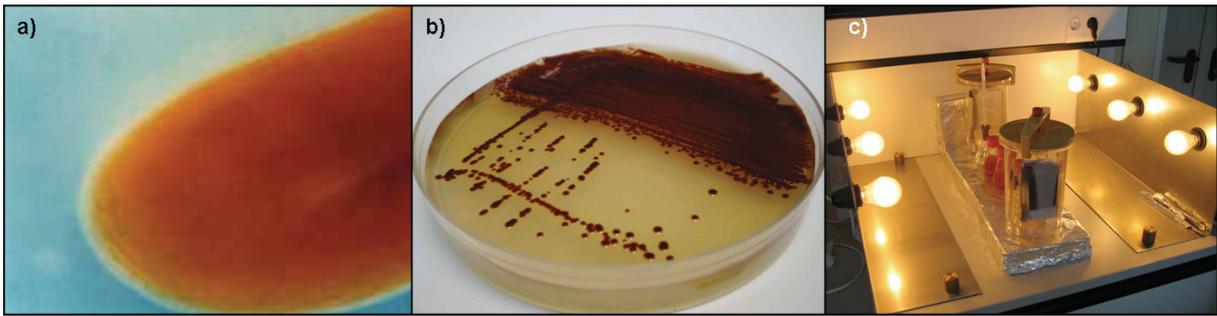


Abbildung 1: Das einzellige, frei lebende nicht Schwefel-Purpurbakterium *Rhodobacter capsulatus*. Die Bezeichnung „*Rhodobacter*“ für das Genus geht auf die rötliche Pigmentierung der Zellen zurück. Sie ist im Lichtmikroskop (a) sowie im Einzelkoloniausstrich auf PY-Agar-Medium (b) deutlich sichtbar. Die Speziesbezeichnung „*capsulatus*“ geht auf die Polysaccharidkapsel zurück, welche die Zellen ausbilden. Da *R. capsulatus* ein fakultativ anaerob phototropher Organismus ist, kann es unter Ausschluss von Sauerstoff in speziellen Anaerobtopfen bei Bestrahlung mit Licht kultiviert werden (c).

So ist *R. capsulatus* sowohl zur aeroben also auch zur anaeroben Respiration in der Lage (Zannoni, 1995) und kann zudem Lichtenergie zur anoxygenen Photosynthese nutzen (Bauer *et al.*, 2003; Gregor & Klug, 1999). Bei der anoxygenen Photosynthese, die ausschließlich unter anaeroben Bedingungen als Energiequelle genutzt werden kann, wird Lichtenergie in einen Protonengradienten umgewandelt, der zur Synthese von Energieäquivalenten in Form von ATP dient. Im Gegensatz zur Photosynthese in Pflanzen werden bei diesem zyklischen Prozess weder Sauerstoff noch Redoxäquivalente erzeugt.

Wie die meisten Purpurbakterien, die zur Photosynthese fähig sind, bildet *R. capsulatus* zusätzlich zur Cytoplasmamembran (CM) ein intracytoplasmatisches Membranensystem (ICM) aus, das aus Ausstülpungen der CM entsteht und durch Abschnürung aus der CM zahlreiche „*inside-out*“ Vesikel bilden kann (Abbildung 2). Dieses System dient dazu, die Enzymkomplexe, die zur Photosynthese notwendig sind, aufzunehmen (Collins *et al.*, 1991; Oelze & Drews, 1972). Dadurch wird die Gesamtmembranoberfläche der Zellen um das 3- bis 9-fache vergrößert (Drews & Golecki, 1995) und bietet so theoretisch ein enormes Reservoir für heterolog synthetisierte Membranproteine, die – in Konkurrenz zu den Photosynthesekomplexen – mit Hilfe hocheffizienter wirtseigener Mechanismen in die ICM inseriert werden könnten.

Unter Stickstoffmangel ist *R. capsulatus* außerdem in der Lage, atmosphärischen Stickstoff als Stickstoffquelle zu verwenden und somit diazotroph zu wachsen (Drepper *et al.*, 2003; Masepohl *et al.*, 2002). Weitere Stoffwechsellleistungen in *R. capsulatus* sind der Wasserstoffmetabolismus (Vignais *et al.*, 2000) und die Fixierung von Kohlenstoffdioxid (Tabita, 1995).

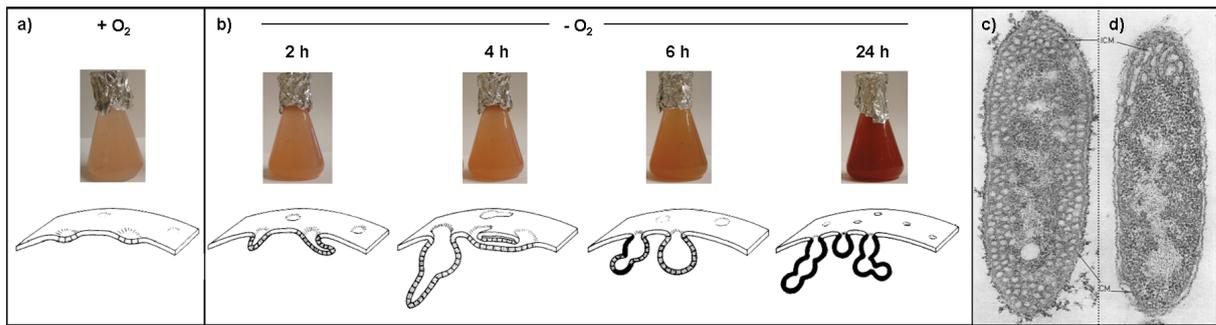


Abbildung 2: Ausbildung der intracytoplasmatischen Membran in *R. capsulatus* unter phototropen Wuchsbedingungen. Unter chemoheterotroph aeroben Wuchsbedingungen (+O₂) bildet *R. capsulatus* kein intracytoplasmatisches Membransystem (ICM) aus (a). Entzieht man während der Kultivierung von *R. capsulatus* den Sauerstoff aus der umgebenden Atmosphäre (-O₂), beginnen sich Ausstülpungen aus der Cytoplasmamembran (CM) zu formen (b, Schema modifiziert nach Chory *et al.*, 1984). Diese bilden tubuläre Strukturen und so genannte „inside-out“-Vesikel aus (Vesikel, deren Lumen nicht aus Cytosol sondern Periplasma besteht) und vergrößern so die innere Membranoberfläche um das 3- bis 9-fache, abhängig von den exakt gewählten Versuchs- und Lichtbedingungen. Dabei werden die Photosystemkomplexe von *R. capsulatus* in die ICM eingebaut. Diese enthalten Photopigmente (Carotinoide und Bakteriochlorophylle) und färben die Zellen sichtbar braunrot. Die Färbung ist somit ein indirekter Nachweis für die Synthese der ICM. Im Elektronenmikroskop erkennt man in einer *R. capsulatus* Zelle die phototroph (-O₂) angezogen wurde eindeutig die gebildete ICM und die Vesikel (c). Unter optimalen Schwachlichtbedingungen werden so bis zu 1150 Vesikel pro Zelle gebildet (Drews & Golecki, 1995). In einer Zelle, die ohne Licht angezogen wurde (+O₂), erkennt man im Gegensatz nur vereinzelte polständige ICM Tubuli (d). (EM-Aufnahmen aus Lampe *et al.*, 1972).

R. capsulatus weist zudem Besonderheiten auf, durch die das Bakterium als neuartiger Wirt für die Synthese von heterologen Proteinen, insbesondere von Membranproteinen, in Frage kommt:

(i) Bei *R. capsulatus* handelt es sich um eines der am besten studierten phototropen Bakterien. Sein Genom wurde vollständig sequenziert (Haselkorn *et al.*, 2001), wodurch die Grundlage geschaffen wurde, mittels moderner Analyseverfahren wie der *Microarray*-Technologie globale Prozesse detailliert zu analysieren. Die Sequenzdaten bilden zudem die Grundlage für die Optimierung beliebiger *R. capsulatus* Produktionsstämme. Das Genom von *R. capsulatus* hat eine Größe von $3,8 \times 10^6$ bp mit einem zusätzlichen Plasmid (134 kb) und weist 3616 offene Leserahmen auf (Fonstein & Haselkorn, 1993). Zusätzlich hat *R. capsulatus* einen hohen GC-Gehalt von 68 % und ist somit für die heterologe Expression GC-reicher Gene in besonderem Maße geeignet.

(ii) Durch die Ausbildung seines intracytoplasmatischen Membransystems (ICM) wird die Membranoberfläche von *R. capsulatus* unter phototropen Wachstumsbedingungen stark vergrößert (Drews & Golecki, 1995). Diese Eigenschaft kann möglicherweise zur effektiven Überexpression von Membranprotein-kodierenden Genen ausgenutzt werden, da ihre Genprodukte in großer Zahl unter Ausnutzung der hocheffizienten, wirtseigenen

Prozessionsmaschinerie in ICM eingebettet werden können, ohne toxische Effekte herbeizuführen.

(iii) Die Membranen von Prokaryoten, Hefen und höherer Eukaryoten unterscheiden sich in ihrer Lipidzusammensetzung. Dadurch kann es ebenfalls zu Problemen bei der heterologen Synthese von Membranproteinen kommen. So ist bekannt, dass bestimmte eukaryotische Membranproteine funktional ausschließlich in Gegenwart von Lipiden synthetisiert werden können, die im eukaryotischen Ursprungsorganismus zu finden sind (Wagner *et al.*, 2006). In *R. capsulatus* findet man die für Prokaryonten typischen Membranlipide Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und Cardiolipin (Pucheu *et al.*, 1997). Interessanterweise synthetisiert *R. capsulatus* aber noch weitere Membranlipide wie das Phosphatidylcholin (Russell & Harwood, 1979), welches auch in eukaryotischen Membranen vorhanden ist. Somit ist *R. capsulatus* potentiell in der Lage, eukaryotische Membranproteine zu synthetisieren, die auf das Vorhandensein von Phosphatidylcholin angewiesen sind.

(iv) Obwohl *R. capsulatus* bevorzugt unter anaeroben, phototrophen Bedingungen wächst, werden unter diesen Bedingungen vergleichsweise hohe Zellteilungsraten erreicht. So ist *R. capsulatus* für die heterologe Synthese von sauerstoffsensitiven Proteinen oder Enzymen, die in Gegenwart von O₂ eine toxische Wirkung entwickeln oder die sauerstoffsensitiv sind, besonders geeignet.

(v) In den meisten bislang etablierten Expressionssystemen werden viele Kofaktoren und prosthetische Gruppen kaum oder gar nicht synthetisiert. *R. capsulatus* dagegen synthetisiert unter phototrophen und diazotrophen Bedingungen eine Reihe solcher Komponenten, wie zum Beispiel Häm-Gruppen, Molybdän-Kofaktoren und verschiedene Eisen-Schwefel-Cluster in großen Mengen (Chevallet *et al.*, 2003; De Smet *et al.*, 2001b; Jeong & Jouanneau, 2000; Lang *et al.*, 1996; Smart *et al.*, 2004; Solomon *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1993). *R. capsulatus* ist daher besonders für die Expression heterologer Proteine geeignet, die solche Kofaktoren tragen. Dies hat bereits die heterologe Synthese von Sulfit:Cytochrom c Oxidoreduktase (SorAB) aus *Starkeya novella* (Kappler & McEwan, 2002), sowie von Flavocytochrom c aus Purpurbakterien (De Smet *et al.*, 2001a) eindeutig gezeigt.

Die einmalige Physiologie und Vernetzung von außergewöhnlichen Stoffwechsellleistungen macht *R. capsulatus* jedoch nicht nur zu einem potenten Wirtsorganismus für die Synthese

von Membranproteinen. Durch seine Fähigkeit anoxygene Photosynthese zu betreiben, ist *R. capsulatus* in der Lage, Bakteriochlorophyll a und verschiedene Carotinoide als Photopigmente zu generieren. Besonders Carotinoide sind heutzutage von großer Bedeutung, da sie als Zusatzstoffe in pharmazeutischen Produkten, Kosmetika und Nahrungsmitteln unersetzlich geworden sind. Die industrielle Synthese ist bislang jedoch auf wenige Carotinoide beschränkt und der Bedarf an neuartigen Bezugsquellen, auch biotechnologischer Natur, wächst stetig, was *R. capsulatus* als carotinogenen Organismus auch in diesem Zusammenhang besonders interessant macht.

3 Funktion und industrielle Synthese von Carotinoiden

Bei Carotinoiden handelt es sich um eine Klasse von natürlichen Farbstoffen mit konjugiertem π -Elektronensystem und einem charakteristischen Absorptionsspektrum zwischen 400 und 500 nm (Häder, 1999). Sie kommen hauptsächlich in Chromoplasten und Plastiden von Pflanzen und in Bakterien sowie in Pilzen vor (Harding & Shropshire Jr., 1980). Man findet sie u. a. aber auch in der Haut, in der Schale und im Panzer von Tieren sowie in Federn von Vögeln, im Eigelb und auch in der Makula des menschlichen Auges. Dazu müssen die betreffenden Lebewesen allerdings farbstoffhaltiges pflanzliches oder bakterielles Material aufnehmen, da Carotinoide nur von Bakterien, Pflanzen und Pilzen *de novo* synthetisiert werden können (Singh & Cama, 1975).

3.1 Physiologische Aufgaben von Carotinoiden

Chemisch bestehen Carotinoide aus acht Isopreneinheiten, die unterschiedlich substituiert sein können. Man unterscheidet (i) Carotine als reine Kohlenwasserstoffe und (ii) Xanthophylle als sauerstoffhaltige Carotinoide-derivate (Wagner & Elmadfa, 2003).

In phototrophen Organismen, so auch in *R. capsulatus*, sind Carotinoide wichtiger Bestandteil der Lichtsammelkomplexe der Photosysteme, so auch des Lichtsammelkomplexes II. Ihre primäre Aufgabe während der Photosynthese ist es, die (Bakterio-) Chlorophyllmoleküle der Lichtsammelkomplexe, die für die Absorption von Photonen verantwortlich sind, vor Zerstörung durch Photooxidation zu schützen (Gläser & Klug, 2005).

Außerdem erweitern Carotinoide das Absorptionsspektrum von photosynthetischen Organismen im blau-grünen Spektralbereich und sind teilweise am Energietransfer innerhalb der Antennenkomplexe und Photosysteme beteiligt. Aus diesem Grund bezeichnet man Carotinoide auch als akzessorische Pigmente (Armstrong, 1997; Demmig-Adams *et al.*, 1996).

Auch in nichtphotosynthetischen Organismen sind Carotinoide wichtig beim Schutz gegen photooxidative Schäden, die durch Singulett-Sauerstoff verursacht werden. So bedienen sich viele nichtphotosynthetische Bakterien oder Pilze des Schutzes von Carotinoiden, wenn sie in Gegenwart von Licht und Sauerstoff wachsen. Außerdem haben Carotinoide große Bedeutung als Signal- und Lockfarbstoff und tragen häufig zur prächtigen Farbgebung vieler Tiere bei (Wagner & Elmadfa, 2003).

3.2 Alltägliche Verwendung von Carotinoiden

Eine wichtige Rolle spielen Carotinoide auch für die Ernährung von Mensch und Tier. So wird z. B. β -Carotin (Provitamin A) im tierischen Organismus zu Vitamin A (all-*trans* Retinal) gespalten, über all-*trans*-Retinal in 11-*cis* Retinal isomerisiert und mit Opsin zum Rhodopsin verbunden (Matsumoto & Yoshizawa, 2008). Dieses wiederum dient als lichtempfindliches Sehpigment vieler Photorezeptoren wie in den Stäbchen von Wirbeltieraugen (Wald & Brown, 1958). Da Tiere jedoch keine Carotinoide *de novo* synthetisieren können, ist die ausreichende Aufnahme aller benötigten Carotinoide essentiell. Dies gilt selbstverständlich auch für den Menschen. So findet man heute in vielen Nahrungsmitteln Carotinoide als Zusatz- oder Farbstoffe.

3.2.1 Carotinoide als Nahrungsergänzungsmittel und Kosmetikzusatz

Die prophylaktische Wirkung von Carotinoiden und deren Umwandlung in Vitamin A im menschlichen Körper wird besonders deutlich wenn man sich vergegenwärtigt, dass Vitamin A Mangel weltweit der Hauptgrund für Kinderblindheit ist. Global geschätzt leiden rund 800 Millionen Menschen an Vitamin-A-Unterversorgung bedingten Krankheitserscheinungen wie Nachtblindheit (250 Mio. Menschen), Austrocknung der Augen (13,5 Mio. Menschen) oder Vitamin-A-bedingter irreversibler Blindheit (3,1 Mio. Menschen). Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) stellt der Mangel an Vitamin A neben Eisen- und Jodmangel das größte Mangelproblem in der „Dritten Welt“ dar (Ohtsu, 2005).

In „Industrieländern“ dagegen ist die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) eine der schwersten Augenerkrankungen, bei der es zu zentralem Gesichtsfeldausfall kommt (Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e. V.). Die Krankheit ist bislang nicht therapierbar, sodass der Prophylaxe eine besondere Bedeutung zukommt: Die Makula in der Mitte der Netzhaut des menschlichen Auges weist die höchste Konzentration an Photorezeptoren auf. Ihre gelbe Pigmentierung stammt von Lutein und Zeaxanthin. Da die Retina so aufgebaut ist, dass einfallendes Licht zuerst die Lutein- und Zeaxanthinschicht passiert, bevor es auf die Photorezeptoren des Auges trifft, kann eine genügende Pigmentierung für den Schutz der Makula entscheidend sein. Weil die Pigmentdichte von Lutein und Zeaxanthin im Auge von der Carotinoidmenge abhängt, die mit der Nahrung aufgenommen wird, dienen diese Pigmente als Nahrungsergänzungsmittel und zur Prophylaxe (Landrum *et al.*, 1997). Außerdem wirken viele Carotinoide als Antioxidanzien. In besonderem Maße ist Lycopin in der Lage, Singulett-Sauerstoff und freie Radikale abzufangen

und unschädlich zu machen. Epideminologische Studien zeigen, dass eine lycopinreiche Diät eventuell die Häufigkeit gewisser Krebsformen reduzieren kann (Giovannucci, 1999; Rao & Agarwal, 2000). So können Carotinoide zum Schutz der Haut beitragen und wirken, neben dem verantwortungsbewussten Umgang mit Sonneneinstrahlung und Verwendung eines Sonnenschutzmittels, als „innere Prophylaxe“.

3.2.2 Carotinoide als Lebensmittelfarbstoffe

Carotinoide finden auf Grund ihrer intensiven Farben auch weit verbreitet Anwendung als Lebensmittelfarbstoffe. So erhöhen verschiedenfarbige Lebensmittel den Genuss von Speisen, ganz nach dem Motto: „Das Auge isst mit“. Da viele Lebensmittel heute nicht mehr im eigenen Garten angebaut, sondern in Industriebetrieben verarbeitet oder zubereitet werden, treten bei der Verarbeitung, beim Transport und bei der Lagerung unerwünschte farbliche und geschmackliche Veränderungen auf. Weil sich die industriell hergestellten Lebensmittel sowohl im physiologischen Gehalt als auch im Aussehen und Geschmack nach den Bedürfnissen und Wünschen der Konsumenten richten, kann auf Lebensmittelzusätze nicht mehr verzichtet werden. So werden Carotinoide als Zusatzstoffe u. a. in Margarine, Speiseölen, Salatsaucen, Limonaden, Gebäck, Süßwaren, Käse, Suppen, *Instant*-Pulvern und Milchprodukten wie Joghurt oder Eiscreme verwendet. Tabelle 2 fasst die Carotinoide zusammen, die als Lebensmittelfarbstoffe mit „E-Nummer“ in der Europäischen Union zugelassen sind.

Tabelle 2: Auflistung der Carotinoide, die in der Europäischen Union als Lebensmittelfarbstoffe zugelassen sind. Für die Zulassung der neuer Lebensmittelfarbstoffe ist das Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin zuständig, bzw. der Wissenschaftliche Lebensmittelausschuss der EU (SCF). Zugelassene Lebensmittelfarbstoffe tragen eine so genannte E-100-Nummer (http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/flav_index_de.html).

Als Lebensmittelfarbstoff zugelassene Carotinoide	E-Nummer
β -Carotin und Carotinoidegemische	E-160a
Bixin, Norbixin, Annatto	E-160b
Capsanthin, Capsorubin	E-160c
Lycopin	E-160d
β -Apo-8'-carotinal	E-160e
β -Apo-8'-carotinsäureethylester	E-160f
Lutein	E-161b
Canthaxanthin	E-161f

3.2.3 Carotinoide als Zusatzstoffe in Futtermitteln

Verschiedene Lebensmittel können jedoch nicht erst bei ihrer Verarbeitung mit Carotinoiden versetzt werden. Daher ist es erforderlich, diese bereits dem Tierfutter beizumischen. Dies gilt insbesondere für die Eidotter-, Geflügel- und Lachspigmentierung.

So verleiht Astaxanthin dem Lachsfleisch seine charakteristische rosa Farbe (Bernhard, 1990). Beim Wildlachs stammt dieses Pigment aus Kleinkrebsen, die dem Fisch als Nahrung dienen. Zuchtlachs hingegen, dem diese Krebse als natürliche Nahrungsquelle nicht zur Verfügung steht, muss Astaxanthin als Zusatzstoff in das Futter beigemischt werden, da sein Fleisch sonst eine unappetitliche gräuliche Färbung annimmt. In Aquakulturen für Regenbogenforellen sowie in Shrimpsfarmen kommt Astaxanthin ebenso als Futterzusatz zum Einsatz.

Carotinoide sind auch für die Gelbfärbung der Haut vieler Vögel verantwortlich. Die Tiere speichern die Pigmente im Unterhautfettgewebe. Da in der Mastgeflügelhaltung weitgehend auf natürliches Futter verzichtet wird und statt dessen spezielles Schnellmastfutter zum Einsatz kommt, werden auch hier Carotinoide als Futterzusatzmittel verwendet (hauptsächlich β -Apo-8'-carotinsäureethylester und Canthaxanthin; Meyer, 2002). Außerdem lässt sich durch Verabreichung von Carotinoiden die Dotterpigmentierung verändern und den Konsumentenwünschen anpassen.

Um jedoch den enormen Bedarf an Carotinoiden im Weltmarkt bedienen zu können, reicht es bei weitem nicht mehr aus, Carotinoide aus pflanzlichem Material zu extrahieren. Daher ist die industrielle Synthese unumgänglich.

3.3 Industrielle Synthese von Carotinoiden

Bis heute wurden mehr als 700 verschiedenen Carotinoide aus natürlichen Quellen isoliert (Meyer, 2002). Die größten Carotinoidmengen in der Natur werden dabei in photosynthetischen Geweben von Pflanzen und Algen gebildet. Von den vielen natürlich vorkommenden Carotinoiden werden bislang jedoch nur acht industriell hergestellt. Dabei handelt sich um die fünf symmetrischen Carotinoide Lycopin [1], β -Carotin [2], Zeaxanthin [3], Astaxanthin [4] und Canthaxanthin [5] sowie um die drei Apocarotinoide Citranaxanthin [6], β -Apo-8'-carotinsäureethylester [7] und β -Apo-8'-carotinal [8] (Abbildung 3).

Für industrielle Synthesen müssen die Bausteine für diese Carotinoide aus günstigen, gut zugänglichen Grundstoffen wie Acetylen, Aceton, Isobutylen oder Isopren hergestellt werden können. Totalsynthesen von Carotinoiden sind daher notwendigerweise Vielschritt-

Synthesen. Da die Investitionskosten für eine Totalsynthese daher sehr hoch sind, ist sie vom wirtschaftlichen Standpunkt unattraktiv. So findet man kaum Unternehmen, die Carotinoide mittels Totalsynthese herstellen. Mehr als $\frac{3}{4}$ des Weltmarkts werden von der BASF AG und der DSM bedient (Meyer, 2002).

Um den steigenden weltweiten Bedarf an Carotinoiden jedoch auch in Zukunft decken zu können, ist man auch auf alternative Synthesewege angewiesen. Dabei stellt die biotechnologische Produktion eine wirtschaftlich interessante und umweltfreundliche Alternative dar.

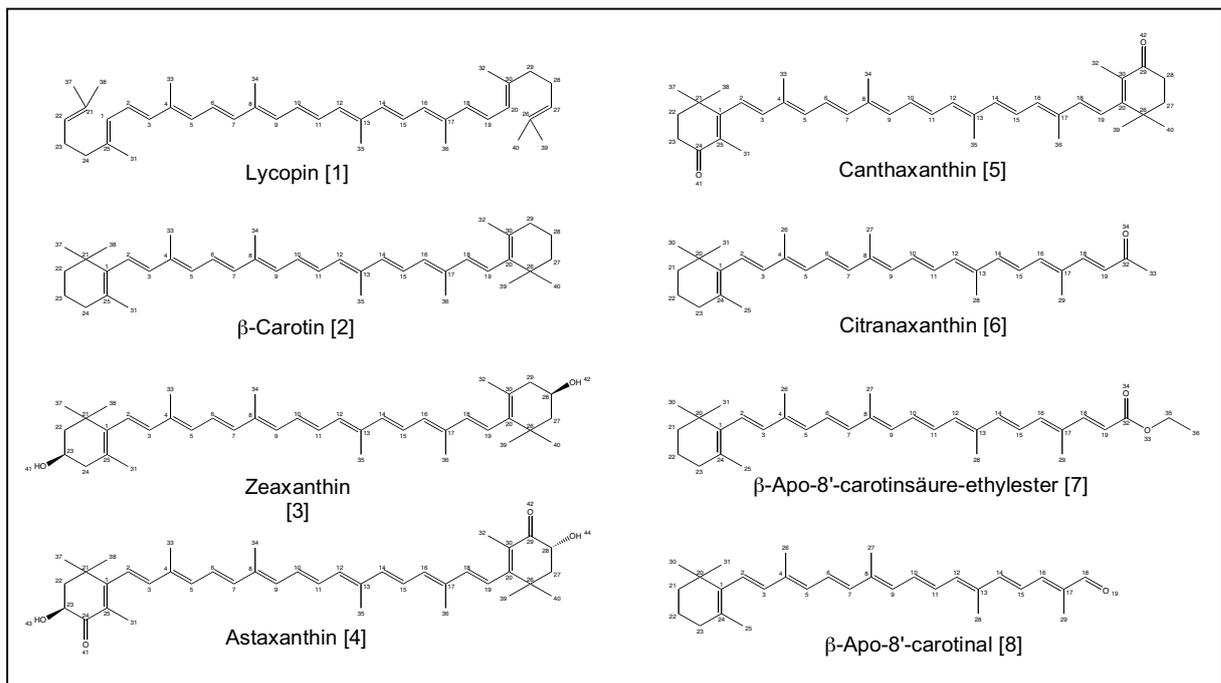


Abbildung 3: Industriell hergestellte Carotinoide. Von den bislang bekannten über 700 natürlich vorkommenden Carotinoiden werden nur acht industriell hergestellt. Es handelt sich dabei um die fünf symmetrischen Carotinoide Lycopin [1], β -Carotin [2], Zeaxanthin [3], Astaxanthin [4] und Canthaxanthin [5] sowie um die drei Apocarotinoide Citranaxanthin [6], β -Apo-8'-carotinsäureethylester [7] und β -Apo-8'-carotinal [8].

Neben der Produktion von homologen Carotinoiden in Algen bietet die Synthese von Carotinoiden in geschlossenen, genetisch gut manipulierbaren bakteriellen Systemen die Möglichkeit, das bislang industriell zur Verfügung stehende Carotinoidspektrum beträchtlich zu erweitern.

So existieren bereits genetisch manipulierte *E. coli* Stämme, die in der Lage sind, Carotinoide, wie z. B. Zeaxanthin zu synthetisieren (Ruther *et al.*, 1997). Das Problem dabei ist jedoch, dass alle Gene des Carotinoidsynthesewegs von der Isoprenoidsynthese an genetisch in das Bakterium eingebracht werden müssen, was bei der anschließenden Synthese zu erheblichem zellulären Stress und niedrigen Ausbeuten führt. Ein weiteres Problem bei der Synthese von Carotinoiden in *E. coli* ist, dass für die lipophilen Carotinoide nicht genug

Membranoberfläche zur Verfügung steht, in die sie inserieren können, was die Ausbeute weiter senkt. Aus diesem Grund bietet sich für die Synthese von Carotinoiden das phototrophe Bakterium *R. capsulatus* an, das auf Grund seiner bereits beschriebenen physiologischen Besonderheiten zum einen bereits Carotinoide synthetisiert und zum anderen eine im Vergleich zu *E. coli* enorm vergrößerte Membranoberfläche zur Aufnahme von Carotinoiden besitzt.

3.4 Carotinoidbiosynthese in *R. capsulatus*

Isopentylpyrophosphat (IPP) ist der zentrale Ausgangsmetabolit für die Synthese von Carotinoiden in *R. capsulatus* (Hahn *et al.*, 1996). Drei solcher IPP-Moleküle und ein Molekül des IPP-Tautomers Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) kondensieren in mehreren sukzessiven Reaktionen zu Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). Diese Synthese ist in den meisten carotinogenen Organismen hoch konserviert (Bartley *et al.*, 1990).

Im weiteren Verlauf der Carotinoidbiosynthese in *R. capsulatus* (Abbildung 4, orange unterlegt) werden anschließend zwei GGPP-Einheiten zu Phytoen kondensiert, welches in mehreren Schritten zu Neurosporen desaturiert wird. Aus biotechnologischer Sicht ist Neurosporen ein besonders interessantes Carotinoid, da es Vorstufe vieler weiterer Carotinoide ist (Abbildung 4, grau unterlegt). Physiologisch wird Neurosporin in *R. capsulatus* in mehreren Reaktionsschritten zu Spheroiden hydroxyliert und desaturiert. Spheroiden ist das Hauptcarotinoid in *R. capsulatus*, welches in Gegenwart von Sauerstoff jedoch weiter zu Spheroidenon oxydiert werden kann. Abbildung 4 zeigt schematisch den Carotinoidsyntheseweg in *R. capsulatus* sowie verschiedene Carotinoide, die sich von den Intermediaten des Synthesewegs ableiten.

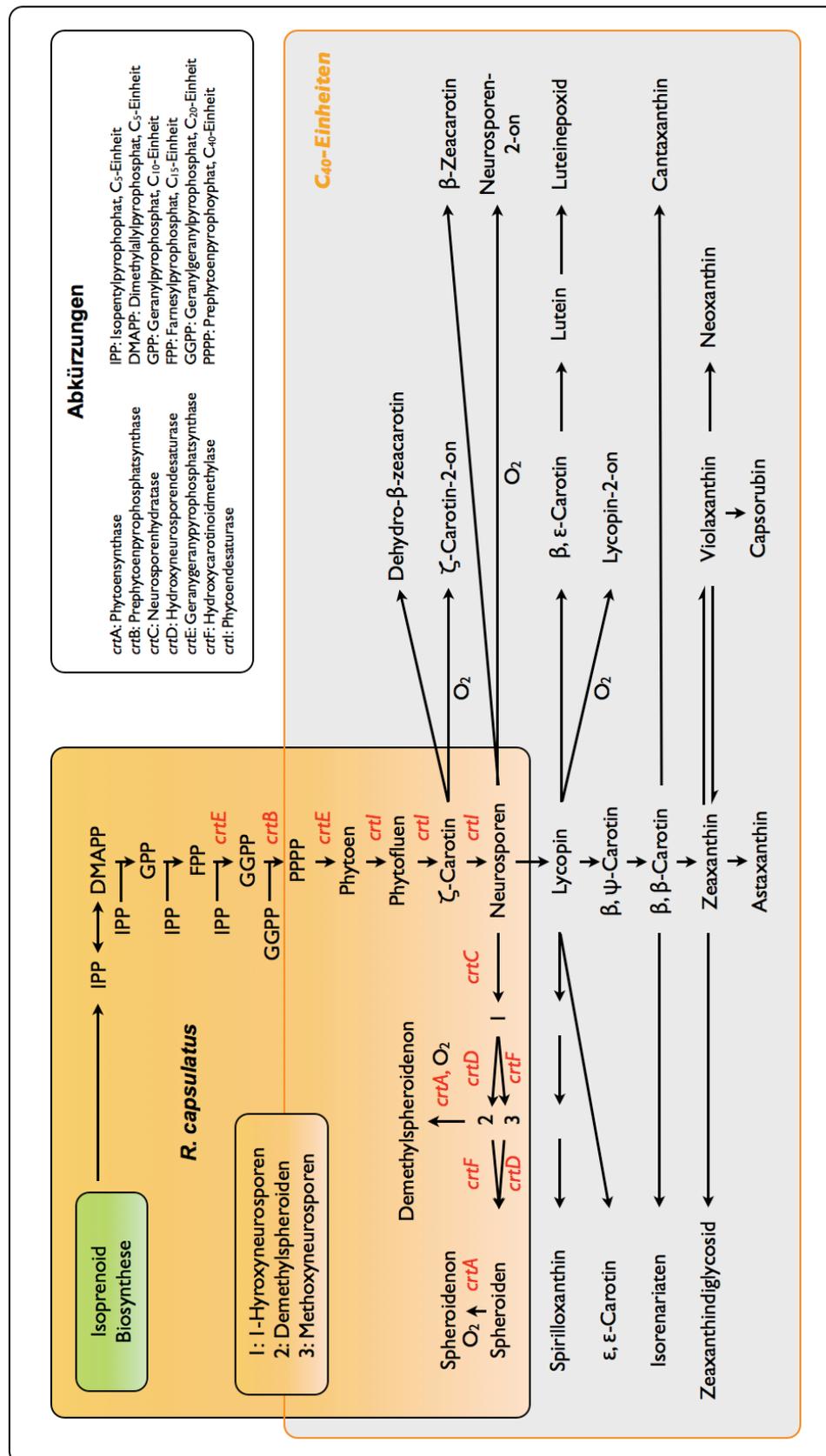


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Carotinoidbiosynthese in *R. capsulatus*. Orange unterlegt ist die Carotinoidbiosynthese in *R. capsulatus*, ausgehend von der Isoprenoidbiosynthese bis zum Hauptpigment Spheroiden und dessen Oxidationsprodukt Spheroidenon. Das Intermediat Neurosporen hat im Biosyntheseweg einen besonderen Stellenwert, da es Ausgangspunkt für eine Vielzahl weiterer wichtiger natürlicher Carotinoide ist (grau unterlegt).

4 Zielsetzung

Voraussetzung für die Synthese heterologer Membranproteine in dem phototrophen Organismus *R. capsulatus* ist ein etabliertes Expressionssystem, das die heterologe Überexpression beliebiger Zielgene unter phototrophen Wuchsbedingungen erlaubt. Ein solches Expressionssystem wurde mit dem Expressionsvektor pRhotHi-2, der die Zielgenexpression unter der Kontrolle des T7-Promotors aus dem T7-Phagen erlaubt, und dem Expressionsstamm *R. capsulatus* B10S-T7 realisiert (Drepper *et al.*, 2008). Dieser Expressionsstamm trägt das T7-RNA-Polymerasegen als stabile chromosomale Integration unter der Kontrolle des Promotors des Fruktoseoperons (P_{fru}). Die Funktionalität dieses Systems wurde bereits mit löslichen Testproteinen unter Beweis gestellt (Katzke *et al.*, in Vorbereitung).

Mit Hilfe dieses Systems sollte untersucht werden

- i) inwieweit *R. capsulatus* unter photoheterotrophen Anzuchtbedingungen in der Lage ist, wirtsfremde Membranproteine unterschiedlicher Herkunft und Struktur zu exprimieren. Dazu wurden Expressionsstudien mit ausgewählten Beispielgenen auf der Ebene der Transkription, Proteinakkumulation und Proteinlokalisierung durchgeführt. Bei diesen Beispielgenen handelte es sich um die Gene der Arabinofuranosyltransferasen *aftA* und *emb* aus *Corynebacterium glutamicum*, der Squalenepoxidase aus *Stigmatella aurantiaca*, dem Bacterioopsin aus *Halobacterium salinarum* und dem Gen des Ethyleninsensitivprotein 2 aus *Arabidopsis thaliana*. Als Referenzstämme wurden die beiden *E. coli* Expressionsstämme BL21(DE3) und C43(DE3) verwendet. Außerdem sollte dadurch überprüft werden, inwieweit sich Unterschiede bei der Expression der ausgewählten Gene in *E. coli* BL21(DE3) und C43(DE3) zeigen.
- ii) ob *R. capsulatus* während der heterologen Synthese von Membranproteinen in der Lage ist, diese in seine Photosynthesemembran einzubauen. Dabei sollten die Fragestellungen beantwortet werden, ob die Proteine des *Rhodobacter*-Photosystems verdrängt werden und ob dies anhand der veränderten Absorption der photosynthetischen Membranen messbar ist. Außerdem sollte geklärt werden, ob gezielt die Vesikel des intracytoplasmatischen Membransystems von *R.*

capsulatus isoliert werden können und ob sie sich in Hinblick auf ihre strukturellen Merkmale durch den Einbau unterschiedlicher heterologer Membranproteine voneinander unterscheiden.

- iii) welche Proteinausbeuten mit dem *R. capsulatus* Expressionssystem erzielt werden können.

- iv) welchen Einfluss die Lichtqualität auf das photoheterotrophe Wachstum von *R. capsulatus* hat. Dazu sollte der Fragestellung nachgegangen werden, mit Licht welcher Wellenlänge *R. capsulatus* kultiviert werden kann und welchen Einfluss dies sowohl auf das Zellwachstum als auch auf den Photopigmentgehalt, speziell auf den Gehalt der Carotinoide hat.

II Material und Methoden

1 Bakterienstämme

1.1 *Escherichia coli* Stämme

Tabelle 3: Genotypen der verwendeten *E. coli* Stämme. Nomenklatur nach Bachmann, 1990.

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ^- , <i>thi-1</i> , <i>gyrAB</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , λ (<i>Its857</i> , <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lavUV5-T7gene1</i>)	Studier & Moffatt, 1986
C43(DE3)	BL21(DE3)-Derivat mit mindestens einer weiteren, nicht charakterisierten Mutation	Miroux & Walker, 1996
S17-1	Ec294::[RP4-2(<i>Tc</i> ::Mu)(<i>Km</i> ::Tn7)], <i>pro</i> , <i>res</i> , <i>recA</i> , Tp ^r , Sm ^r	Simon <i>et al.</i> , 1986

1.2 *Rhodobacter capsulatus* Stämme

Tabelle 4: Genotypen der verwendeten *R. capsulatus* Stämme.

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
B10S	Spontane Sm ^r -Mutante des <i>R. capsulatus</i> B10	Klipp <i>et al.</i> , 1988
B10S-T7	B10S, <i>recA</i> ::(P _{fru} >T7 Gm ^r)	Drepper <i>et al.</i> , 2008

2 Vektoren und rekombinante Plasmide

2.1 Vektoren

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Vektoren.

Vektorplasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz
pSVB10	pUC8, <i>lacZ bla</i> (MCS pCSV03)	Arnold & Pühler, 1988

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Vektoren mit weitem Wirtsbereich.

Vektoren mit weitem Wirtsbereich	Relevante Eigenschaften	Referenz
pRhokHi-2	pBBR1mcs (<i>rep mob Cm^r</i>), pET22b (MCS, <i>pelB</i>), pBSL15 (<i>aphII</i>) Orientierung I, P _{T7}	Drepper <i>et al.</i> , 2008
pRhotHi-2	pBBR1mcs (<i>rep mob Cm^r</i>), pET22b (MCS, <i>pelB</i>), pBSL15 (<i>aphII</i>) Orientierung II, P _{T7}	Drepper <i>et al.</i> , 2008

2.2 Rekombinante Plasmide

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide.

Rekombinante Plasmide	Relevante Eigenschaften	Referenz
pRhotHi-2- <i>bop</i>	788 bp Fragment (<i>NdeI-bop-XhoI</i>) in <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> von pRhotHi-2; Expressionsvektor; <i>aphII</i> Orientierung II	Bernds, 2006
pRhotHi-2- <i>sqep</i>	1382 bp Fragment (<i>NdeI-sqep-XhoI</i>) in <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> von pRhotHi-2; Expressionsvektor; <i>aphII</i> Orientierung II	Kucz, 2005
pRhotHi-2- <i>aftA</i>	2032 bp Fragment (<i>NdeI-aftA-XhoI</i>) in <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> von pRhotHi-2; Expressionsvektor; <i>aphII</i> Orientierung II	Seidel, IBT-1, Jülich Forschungszentrum
pRhotHi-2- <i>emb</i>	3440 bp Fragment (<i>NdeI-emb-XhoI</i>) in <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> von pRhotHi-2; Expressionsvektor; <i>aphII</i> Orientierung II	Seidel, IBT-1, Jülich Forschungszentrum
pET21a/28c- <i>EIN2</i>	pET21a mit veränderter MCS (<i>XbaI-pET28c-NheI</i>), <i>EIN2</i>	Allekotte, Biochem. Pflanzenphysiologie, HHU Düsseldorf
pRhotHi-2- <i>EIN2-MB</i>	2131 bp Fragment (<i>NdeI-EIN2-MB-BclI</i>) in <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> von pRhotHi-2; Expressionsvektor; <i>aphII</i> Orientierung II	diese Arbeit
pRhotHi-2- <i>EIN2</i>	3577 bp Fragment in pRhotHi-2; Expressionsvektor; <i>aphII</i> Orientierung II	diese Arbeit

3 Oligonukleotide und Sequenzierungen

3.1 Verwendete Oligonukleotide

Als Startermoleküle (*Primer*) für Polymerasekettenreaktionen (PCR, II-12.5) wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Diese wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

Tabelle 8: Als Primer verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]	Länge [bp]	Verwendung
<i>aphII</i> -RTup	GAAGTGTTCGCCAGGCTCAA	59,7	20	<i>Up-Primer</i> , reverse Transkription und <i>real-time</i> -PCR-Analyse von <i>aphII</i> zur Transkriptionskontrolle und Bestimmung der Plasmidkopienzahl
<i>aphII</i> -RTdn	GAAAAGCGGCCATTTCCAC	57,3	20	<i>Down-Primer</i> , reverse Transkription und <i>real-time</i> -PCR-Analyse von <i>aphII</i> zur Transkriptionskontrolle und Bestimmung der Plasmidkopienzahl
<i>aftA</i> -RTup	GGCAGTTGCTGCTTCTGTGT TAGT	64,1	24	<i>Up-Primer</i> , reverse Transkription und <i>real-time</i> -PCR-Analyse von <i>aftA</i>
<i>aftA</i> -RTdn	GAATTCATCGCCAAGATAAT GCAG	64,0	24	<i>Down-Primer</i> , reverse Transkription und <i>real-time</i> -PCR-Analyse von <i>aftA</i>
<i>bop</i> -RTup	GAAGGTCTACTCGTACCGCT TCGT	64,1	24	<i>Up-Primer</i> , reverse Transkription und <i>real-time</i> -PCR-Analyse von <i>bop</i>
<i>bop</i> -RTdn	TACGCAGTACTTTGAACGTG GATG	63,4	24	<i>Down-Primer</i> , reverse Transkription und <i>real-time</i> -PCR-Analyse von <i>bop</i>
<i>emb</i> -RTup	GAAGCAGTAAACAACGCCT ACGAA	63,8	24	<i>Up-Primer</i> , reverse Transkription und <i>real-time</i> -PCR-Analyse von <i>emb</i>
<i>emb</i> -RTdn	TGGATGGTTTCAAGGTTGAT GTCT	64,0	24	<i>Down-Primer</i> , reverse Transkription und <i>real-time</i> -PCR-Analyse von <i>emb</i>
<i>EIN2</i> -MB- Rtup	AATATCGAAGGAGGTGCTC GTTTC	64,0	24	<i>Up-Primer</i> , reverse Transkription und <i>real-time</i> -PCR-Analyse von <i>EIN2</i> -MB
<i>EIN2</i> -MB- RTdn	TGAGCCAAGTGTTTACCAGT CACA	64,0	24	<i>Down-Primer</i> , reverse Transkription und <i>real-time</i> -PCR-Analyse von <i>EIN2</i> -MB
<i>sqep</i> -RTup	AATCCCTTCGGGAAAGTCTC AAC	63,9	23	<i>Up-Primer</i> , reverse Transkription und <i>real-time</i> -PCR-Analyse von <i>sqep</i>
<i>sqep</i> -RTdn	CTGAATGGAGAACGCCTGAT AGAG	63,5	24	<i>Down-Primer</i> , reverse Transkription und <i>real-time</i> -PCR-Analyse von <i>sqep</i>

3.2 Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeit von der Firma Sequiserve GmbH (Vaterstetten) durchgeführt.

4 Nährmedien und Zusätze

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Medien 20 min bei 200 kPa und 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wurden sterilfiltriert (Millipore-Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm) und dem Medium nachträglich zugesetzt (T < 60 °C).

4.1 Nährmedien

4.1.1 *E. coli* LB-Flüssigmedium (nach Sambrook *et al.*, 1989)

Trypton	10,0 g
NaCl	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
A. dest.	ad 1000 ml

Um die basale Genexpression zu unterbinden, wurde dem LB-Medium für Überexpressionen mit den Bakterienstämmen *E. coli* BL21(DE3) und C43(DE3) Glukose (4,0 g ad 1000 ml LB-Medium) zugesetzt.

4.1.2 *E. coli* LB-Agar

Agar	15,0 g
LB-Flüssigmedium	ad 1000 ml

4.1.3 *E. coli* Autoinduktionsmedium / TB-Medium (nach Schulz, 2008)

Caseinhydrolysat	12,0 g
Hefeextrakt	24,0 g
Glycerol	5,0 g
100 mM Phosphat-Puffer (pH 7,0)	ad 890 ml

Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium 100 ml sterile Laktoselösung (20 g/l) sowie 10 ml sterile Glukoselösung (50 g/l) zugegeben.

Der Phosphatpuffer (pH 7,0) wurde wie folgt angesetzt:

KH ₂ PO ₄	81,3 g
K ₂ HPO ₄	78,7 g
A. dest.	ad 500 ml

Der Puffer wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und anschließend sterilfiltriert.

4.1.4 *E. coli* α-Komplementations-Agar (nach Sambrook *et al.*, 1989)

100 mM IPTG in 70 % (v/v) Ethanol	1 ml
2 % (w/v) X-Gal in DMF	5 ml
LB-Agar	300 ml

IPTG und X-Gal wurden vor Gebrauch frisch angesetzt.

4.1.5 *R. capsulatus* PY-Agar

Agar	15,0 g
PY-Flüssigmedium	ad 1000 ml

4.1.6 *R. capsulatus* PY-Flüssigmedium (nach Sambrook *et al.*, 1989)

Bacto Pepton	10,0 g
Hefeextrakt	0,5 g
1 M MgCl ₂	2,0 ml
1 M CaCl ₂	2,0 ml
0,5 % (w/v) FeSO ₄ ·HCl	2,4 ml
A. dest.	ad 1000 ml

Zur Herstellung der 0,5 % (w/v) FeSO₄·HCl-Lösung wurden 0,5 % (w/v) FeSO₄ und 1 ml 32 %-ige Salzsäure ad 200 ml A. dest. gegeben.

Die Zusätze MgCl₂, CaCl₂ und FeSO₄·HCl wurden sterilfiltriert (II-4) und nach dem Autoklavieren zum Medium zugegeben.

4.1.7 *R. capsulatus* RCV-Minimalmedium (nach Weaver *et al.*, 1975)

10 % (w/v) DL-Malat, pH 6,8	40,0 ml
20 % (w/v) MgSO ₄	1,0 ml
7,5 % (w/v) CaCl ₂	1,0 ml
1 % (w/v) Na ₂ -EDTA	2,0 ml
0,5 % (w/v) FeSO ₄ ·HCl	2,4 ml
0,1 % (w/v) Thiamin	1,0 ml
Spurenelement-Lösung	1,0 ml
1 M Phosphat-Puffer, pH 6,8	9,6 ml
A. dest.	ad 990 ml

Der Phosphatpuffer (pH 6,8) wurde sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren zugegeben.

RCV-Minimalmedium wurde mit zwei unterschiedlichen Stickstoffquellen verwendet. Für ammoniumhaltiges RCV-Medium (RCV+N) wurden 10 ml steriles 10 %-iges (w/v) (NH₄)₂SO₄ zu 990 ml RCV-Medium gegeben. Für serinhaltiges RCV-Medium (RCV+S) wurden 10 ml steriles 10 %-iges (w/v) Serin zu 990 ml RCV-Medium gegeben.

Die Spurenelement-Lösung für RCV-Medien wurde wie folgt angesetzt:

MnSO ₄ ·H ₂ O	0,40 g
H ₃ BO ₃	0,70 g
Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,06 g
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,02 g
A. dest.	ad 250 ml

Der Phosphatpuffer (pH 6,8) wurde wie folgt angesetzt:

KH ₂ PO ₄	81,3 g
K ₂ HPO ₄	78,7 g
A. dest.	ad 500 ml

Der Puffer wurde mit NaOH auf pH 6,8 eingestellt und anschließend sterilfiltriert.

4.2 Antibiotika

Tabelle 9: Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Konzentration in <i>E. coli</i> -Medien [$\mu\text{g/ml}$]	Konzentration in <i>R. capsulatus</i> -Medien [$\mu\text{g/ml}$]
Ampicillin (Ap)	100,0	—
Kanamycin (Km)	50,0	25,0
Streptomycin (Sm)	—	200,0
Tetracyclin (Tc)	10,0	1,5 (PY-Medium) 0,25 (RCV-Medium)

5 Antiseren, Enzyme und Chemikalien

5.1 Verwendete Antiseren

Antiserum

Anti-His-(C-term)-Antikörper

Bezugsfirma

Invitrogen GmbH (Karlsruhe)

5.2 Verwendete Enzyme

Enzym

Pfu-Polymerase

Ribonuklease A

T4-DNA-Ligase

Phusion High-Fidelity-DNA-Polymerase

RNase-freie DNase

Bezugsfirma

Isoliert und gereinigt im IMET

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH
(Seelze)

Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

New England Biolabs GmbH (Frankfurt)

Qiagen GmbH (Hilden)

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen sowie deren zugehörige Enzympuffer wurden von den Firmen Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) und New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main) bezogen.

5.3 Verwendete Chemikalien

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Bezugsfirma
β -Mercaptoethanol	Sigma
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid, X-Gal	Sigma
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)-Lösung	Roth
Agar-Agar	Gibco BRL, Invitrogen
Agarose	Roth, Gibco BRL
Amidoschwarz	Merck
Ammoniumperoxodisulfat, APS	Roth
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Serva
Adenosintriphosphat, ATP	Fermentas
Borsäure	Merck
Bromphenolblau, BPB	Serva
Calciumchlorid	Merck
Coomassie Brilliant Blau	Serva
D-Glukose	Sigma
Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	Calbiochem
Dimethylformamid, DMF	Sigma
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma
Dinatriumcarbonat	Merck
Dinatriummethyldiamintetraacetat, Na ₂ -EDTA	Merck
DL-Malat	Sigma
Eisen-(II)-sulfat-Heptahydrat	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerol	Riedel de Haën
Hefeextrakt	Gibco BRL
Isopropyl- β -D-Thiogalactosid, IPTG	Biomol
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	Serva
Kupfernitratt-Trihydrat	Merck
L-Glycin	Roth

Chemikalie	Bezugsfirma
L-Serin	Calbiochem
Laktose	Roth
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Calbiochem
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Manganchlorid	Merck
Mangansulfat-Hydrat	Merck
Methanol	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, TEMED	Roth
Natrimdodecylsulfat, SDS	Roth
Natriumformiat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxid	Roth
Natriummolybdat-Dihydrat	Merck
Pepton	BD
Polyethylenglycol, PEG	Roth
Polyoxyethylensorbitolmonolaurat, Tween	Roth
Rubidiumchlorid	Sigma
Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
Streptomycin	Sigma
Tetracyclin	Serva
Thiamin	Sigma
Trishydroxymethylaminomethan, Tris	Biomol
Trypton	Sigma
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck

Alle aufgeführten Chemikalien wurden in ausreichender Reinheit für molekularbiologische Arbeiten von den angegebenen Firmen bezogen. Nicht aufgelistete, allgemeine Verbrauchskemikalien wurden in entsprechender Reinheit von den Firmen Sigma, Roth, Merck, Serva, Calbiochem und Riedel de Haën bezogen.

6 Puffer und Lösungen

6.1 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Tris

Tris-Puffer wurde je nach Verwendungszweck mit konzentrierter HCl auf pH-Werte zwischen 6,8 und 8,8 eingestellt.

Mix I (pH 8,0)

Tris	50 mM
Na ₂ -EDTA	10 mM

Mix II

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

Mix III

Kaliumacetat	3 M
Natriumformiat	1,8 M

TE-Puffer (pH 8,0)

Tris	10 mM
Na ₂ -EDTA	1 mM

6.2 Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

TBE-Puffer

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
Na ₂ -EDTA	2,5 mM

DNA-Probenpuffer

Na ₂ -EDTA	100 mM
Glycerol	43 % (v/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)

DNA-Molekulargewichtsstandard „O’RangeRuler 50 bp DNA Ladder“ (Fermentas)

1000; 950; 900; 850; 800; 750; 700; 650; 600; 550; **500**; 450; 400; 350; 300; 250; **200**; 150; 100; 50 bp.

Zur besseren Orientierung heben sich die Banden bei 1000, 500 und 200 bp im Agarosegel durch eine höhere DNA-Konzentration von den anderen Banden ab.

DNA-Molekulargewichtsstandard „GeneRuler 100 bp DNA Ladder“ (Fermentas)

1000; 900; 800; 700; 600; **500**; 400; 300; 200; 100 bp.

Zur besseren Orientierung hebt sich die Bande bei 500 bp im Agarosegel durch eine höhere DNA-Konzentration von den anderen Banden ab.

DNA-Molekulargewichtsstandard „GeneRuler 1kb DNA Ladder (alt)“ (Fermentas)

10000; 8000; 6000; 5000; 4000; 3500; **3000**; 2500; **2000**; 1500; 1000; 750; 500; 250 bp.

Zur besseren Orientierung heben sich die Banden bei 3000 und 2000 bp im Agarosegel durch eine höhere DNA-Konzentration von den anderen Banden ab.

DNA-Molekulargewichtsstandard „GeneRuler 1kb DNA Ladder (neu)“ (Fermentas)

10000; 8000; **6000**; 5000; 4000; 3500; **3000**; 2500; 2000; 1500; **1000**; 750; 500; 250 bp.

Zur besseren Orientierung heben sich die Banden bei 6000, 3000 und 1000 bp im Agarosegel durch eine höhere DNA-Konzentration von den anderen Banden ab.

6.3 Puffer und Lösungen zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNAMagnesium-Mix

MgCl ₂	500 mM
MgSO ₄	500 mM

Transformationspuffer (TMF)

CaCl ₂	100 mM
RbCl ₂	50 mM
MnCl ₂	40 mM

6.4 Puffer und Lösungen zur Proteinisolierung und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SP-Puffer

Dikaliumhydrogenphosphat	40 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	22 mM
Natriumchlorid	150mM

Zusätzlich wurde dem Puffer Proteaseinhibitor Complete EDTA-frei nach Herstellerangaben zugegeben.

SDS-Probenpuffer (pH 6,8)

Tris	50 mM
Glycerol	10 % (v/v)
SDS	4 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	2 % (v/v)
Bromphenolblau	0,03 % (w/v)

Protein-Größenstandard „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Fermentas)

170; 130; 100; **72**; 55; 40; 33; 24; 17; 11 kDa

Zur besseren Orientierung ist die 72 kDa Bande rot gefärbt.

Protein-Größenstandard „Precision Plus Protein Dual Color Standard“ (Bio-Rad)

250; 150; 100; **75**; 50; 37; **25**; 20; 15; 10 kDa

Zur besseren Orientierung sind die 75 und 25 kDa Banden rot gefärbt.

Coomassie-Blau-Färbelösung

Methanol	25 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue	0,2 % (w/v)

Zusätzlich wurde „Bio-Safe Coomassie Stain“-Färbelösung der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München) verwendet.

Entfärber-Lösung

Methanol	5 % (v/v)
Essigsäure	7 % (v/v)

6.4.1 Spezielle Puffer und Lösungen zur Proteinisolierung und SDS-PAGE bei Verwendung des Mini-PROTEAN Gelkammersystems der Firma Bio-Rad

10-fach Elektrophorese-Puffer (pH 8,8)

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)
A. dest.	ad 1000 ml

4-fach Sammelgelpuffer (pH 6,8)

Tris	0,5 M
A. dest.	ad 200 ml

4-fach Trenngelpuffer (pH 8,8)

Tris	1,5 M
A. dest.	ad 200 ml

SDS-Quick-Trenngel (für 3-4 Mini-Gele)

Acrylamid/Bisacrylamidgehalt	15 %	10 %
4-fach Trenngelpuffer	2,500 ml	2,500 ml
87 % (v/v) Glycerol	3,150 ml	4,400 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)-Lösung	3,750 ml	2,500 ml
10 % (w/v) SDS	0,100 ml	0,100 ml
10 % (w/v) APS	0,075 ml	0,075 ml
TEMED	0,015 ml	0,015 ml

SDS-Quick-Sammelgel (für zwei Mini-Gele)

Acrylamid/Bisacrylamidgehalt	4 %
4-fach Sammelgelpuffer	1,2500 ml
A. dest.	3,1500 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)-Lösung	0,7150 ml
10 % (w/v) SDS	0,0500 ml
10 % (w/v) APS	0,0500 ml
TEMED	0,0035 ml

6.4.2 Spezielle Puffer und Lösungen zur Proteinisolierung und SDS-PAGE bei Verwendung des XCell Sure Lock Systems der Firma Invitrogen

1-fach NuPAGE SDS-Laufpuffer

NuPAGE SDS Running Buffer (20x)	50 ml
A. dest.	ad 1000 ml

6.5 Puffer und Lösungen für das Immunoblotting (*Western Blot*)

20-fach TBS-Puffer (pH 8,0)

Tris	25 mM
NaCl	150 mM
KCl	3 mM

TBST-Puffer

Tween 20 in 1-fach TBS-Puffer	0,2 % (v/v)
-------------------------------	-------------

Färbelösung für die PVDF-Membran

Amidoschwarz	0,1 % (w/v)
Methanol	45 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

6.5.1 Spezielle Puffer und Lösungen für das Immunoblotting bei Verwendung des Mini-PROTEAN Gelkammersystems der Firma Bio-Rad

10-fach Dunn-Carbonat-Puffer (pH 9,45) (nach Dunn, 1986)

NaHCO ₃	10 mM
Na ₂ CO ₃	3 mM
Methanol	20 % (v/v)

6.5.2 Spezielle Puffer und Lösungen für das Immunoblotting bei Verwendung des XCell Sure Lock Systems der Firma Invitrogen

1-fach Transferpuffer

NuPAGE Transfer Buffer (20x)	50 ml
A. dest.	ad 1000 ml

7 Reaktions- und Nachweis-,Kits“

<i>Reaktions-/Nachweis-,Kit“</i>	<i>Bezugsfirma</i>
ECL Western Blotting Detection System	Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg)
HiSpeed Plasmid Mini Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
HiSpeed Plasmid Midi Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
DNesay Blood & Tissue Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
Quanti-Tect SYBR-Green one step RT-PCR Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
Perfectprep Gel Cleanup Kit	Eppendorf AG (Hamburg)
omnipure-OLS DNA-Geextraktions Kit	OMNI Life Science GmbH (Hamburg)
RQ1 RNase-free DNase Kit	Promega GmbH (Mannheim)
Real Master Mix SYBR ROX Kit	5 Prime GmbH (Hamburg)

8 Sonstige Materialien und Geräte

Besondere Laborgeräte, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in den folgenden Methoden-Beschreibungen erwähnt. Alle nicht ausdrücklich erwähnten Geräte entsprechen den allgemeinen Laborstandards.

9 Mikrobiologische Methoden

9.1 Anzucht von Bakterien

9.1.1 Anzucht von *E. coli*

E. coli wurde, wenn nicht anders angegeben, auf LB-Agarplatten (II-4.1.2) oder in LB-Flüssigmedium (II-4.1.1) unter Selektionsdruck bei 37 °C kultiviert. Übernachtskulturen (ÜK) wurden für mindestens 16 h inkubiert.

Kulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden in Reagenzgläsern auf einem Brutroller (160 UpM, II-8), größere Kulturen in Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen max. 1/10 des Gefäßvolumens) auf einem Inkubationsschüttler (120 UpM, II-8) angezogen.

Vorkulturen wurden entweder mit Einzelkolonien von Stamm- bzw. Transformationsplatten oder mit 1/500 Volumen aus einer Gefrierkultur inokuliert. Hauptkulturen wurden mit einer ÜK auf eine Zelldichte angeimpft, die einer o.D.₅₈₀ von 0,05 entsprach.

Die Zelldichte einer Kultur wurde durch Trübungsmessung mit Hilfe eines Spektralphotometers (II-8) bei einer Wellenlänge von 580 nm gemessen (o.D.₅₈₀ = 1 entspricht ca. 2×10^9 Zellen pro ml Kultur).

Für Gefrierkulturen wurden 1,8 ml einer ÜK mit 138 µl DMSO vermischt und bei -80 °C gelagert.

9.1.2 Induzierte Genexpression in *E. coli*

Zur Expression T7-Promoter-kontrollierter Gene in Expressionsplasmiden in *E. coli* BL21(DE3) und C43(DE3) wurden die Zellen bei 37 °C unter Selektionsdruck in LB-Glukose-Medium (II-4.1.1) unter Agitation (120 UpM) bis zu einer Zelldichte inkubiert, die einer o.D.₅₈₀ von 0,5 entsprach. Die Induktion der Expression erfolgte dann durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM bevor die Zellen über Nacht unter den genannten Bedingungen inkubiert wurden.

Alternativ wurden die entsprechenden Kulturen unter Selektionsdruck in Autoinduktionsmedium (II-4.1.3) über Nacht bei 37 °C und Agitation (120 UpM) inkubiert. Dabei erfolgte die Genexpression automatisch, nachdem die im Medium vorhandene Glukose metabolisiert wurde und der Stoffwechsel der Zellen auf die aktive Aufnahme von Laktose durch die β-Galaktosid-Permease (codiert durch *lacY*) umgestellt wurde. Laktose induziert intrazellulär die Expression der T7-RNA-Polymerase.

Durch die Menge der Glukose im Autoinduktionsmedium wurde der Zeitpunkt der Induktion gesteuert.

9.1.3 Phototrophe Anzucht von *R. capsulatus* unter Starklichtbedingungen (nach Klipp *et al.*, 1988)

R. capsulatus wurde vorzugsweise anaerob im Licht (photoheterotroph) angezogen. Die anaerobe Anzucht erfolgte als Einzelkolonieausstrich auf Festmedium (II-4.1.5) in einem speziellen Anaerob-Inkubationstopf unter Verwendung des „Gas-Pack Anaerobic-Systems“ (BD). Flüssigkulturen wurden in Minimalmedium (II-4.1.7) in gasdicht verschließbaren Röhrchen (Hungates, bis 10 ml Kulturvolumen) oder Schottflaschen (bis 1000 ml Kulturvolumen), die mit Hilfe eines im Deckel befindlichen Septums mit Argon bzw. Stickstoff begast werden konnten, angezogen. Unter diesen Wuchsbedingungen wurde *R. capsulatus* für drei Tage im Licht inkubiert.

Lichtquelle waren entweder sechs Glühbirnen a 60 W (Firma Osram, ca. 2500 lux) oder mit Leuchtdioden bestückte Platinen der Firma Insta GmbH, Lüdenscheid. Diese ermöglichten die Anzucht bei exakt definierten Wellenlängen von 460 nm bzw. 856 nm (II-14.2).

Die Zelldichte von *R. capsulatus* Kulturen wurde durch Trübungsmessung mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 660 nm gemessen (o.D.₆₆₀ = 1 entspricht ca. 3×10^8 Zellen pro ml Kultur).

9.1.4 Aerobe Anzucht von *R. capsulatus* im Dunkeln

Die Inkubation von *R. capsulatus* Einzelkolonieausstrichen konnte außerdem unter aeroben Bedingungen im Brutschrank (30 °C, im Dunkeln) erfolgen. Mit Zellmaterial von anaerob angezogenen Plattenkulturen konnte *R. capsulatus* auch aerob in Flüssigmedium kultiviert werden. Die Inkubation erfolgte in einem Reagenzglas über Nacht, bei 30 °C und 300 UpM (II-8) im Dunkeln auf einem Brutroller.

R. capsulatus-Stammpplatten wurden bei Raumtemperatur als Einzelkolonieausstriche im Dunkeln gelagert.

9.2 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA (nach Hanahan, 1983)

9.2.1 Herstellung chemisch transformationskompetenter *E. coli* Zellen

LB-Medium (II-4.1.1) wurde mit 0,04 Volumen Magnesium-Mix (II-6.3) versetzt und mit der Menge einer *E. coli*-ÜK auf eine Zelldichte entsprechend einer o.D.₅₈₀ von 0,05 angeimpft.

Die Kultur wurde bei 37 °C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($\text{o.D.}_{580} = 0,5 - 0,8$) auf einem Schüttler (120 UpM, II-8) angezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (20 min, $2790 \times g$, Rotina R35, 4 °C) geerntet. Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Sediment in $\frac{1}{2}$ Volumen eiskaltem TMF-Puffer (II-6.3) resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min, $2790 \times g$, Rotina R35, 4 °C) wurde das Pellet in $\frac{1}{10}$ Volumen eiskaltem TMF-Puffer aufgenommen und in Aliquots von 200 μl auf EPG verteilt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Ansätze auf Eis oder nach Zugabe von Glycerol in einer Endkonzentration von 20 % (v/v) bei -80 °C gelagert.

9.2.2 Hitzeschock-Transformation von *E. coli* Zellen und phänische Expression

Zur Transformation wurden 200 μl transformationskompetente Zellen (II-9.2.1) mit dem Ansatz einer vorausgegangenen Ligation (II-12.4) oder ca. 100 ng isolierter Plasmid-DNA vermischt, mindestens 30 min auf Eis inkubiert, und anschließend für 120 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Nach direkter Zugabe von 700 μl LB-Medium (II-4.1.1) folgte die phänische Expression, bei der der Ansatz je nach Antibiotikaresistenz für 0,5 h bis 3 h bei 37 °C inkubiert wurde. 100 μl dieses Ansatzes wurden auf entsprechendem Selektivagar ausplattiert. Der restliche Ansatz wurde zentrifugiert (3 min, $16000 \times g$, TZ, RT), das Pellet in 100 μl LB-Medium resuspendiert und auf einer weiteren Selektivagarplatte ausplattiert. Als Negativkontrolle wurden transformationskompetente Zellen ohne zugegebene Plasmid-DNA ausplattiert.

9.3 Konjugativer Plasmidtransfer mobilisierbarer Plasmide von *E. coli* nach *R. capsulatus* (nach Elhai & Wolk, 1988)

R. capsulatus gilt als schlecht transformierbar, deshalb müssen Plasmide aus *E. coli* mittels di- oder triparentaler Konjugation in diesen Organismus eingebracht werden (Klug & Drews, 1984). Die Übertragung von rekombinanten Plasmiden nach *R. capsulatus*, die dann stabil repliziert werden konnten, erfolgte durch Konjugation (Filterkreuzung) mit dem Stamm *E. coli* S17-1.

Für die Kreuzung wurde der Rezipient von einer frischen anaeroben Stammplatte in 5 ml RCV+N (II-4.1.7) überführt und über Nacht bei 30 °C auf einem Brutroller resuspendiert (300 UpM). Der Donorstamm *E. coli* S17-1 wurde über Nacht mit entsprechendem Plasmid selektiv bei 37 °C auf Festmedium (II-4.1.2) angezogen. Danach wurden 6-8 Einzelkolonien von der Donorplatte geerntet und in 1 ml PY-Flüssigmedium (II-4.1.6, ohne FeSO_4)

resuspendiert. Anschließend wurde 1 ml der *R. capsulatus* Rezipientenkultur in der stationären Wachstumsphase mit 0,5 ml *E. coli* S17-1 in PY-Flüssigmedium vorsichtig gemischt und in einem EPG durch Zentrifugation (10 min, 16000 × g, TZ, RT) pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Sediment im Rücklauf vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Nitrozellulosefilter (Schleicher und Schüll, OE 66, Porendurchmesser 0,2 µm) bei 30 °C über Nacht auf PY-Agarplatten inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Filter in 2 ml EPG mit 1 ml RCV+N gegeben, die Konjugation durch starkes Schütteln (Vortex) beendet und die Bakterien vom Kreuzungsfilter abgelöst. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 16000 × g, TZ, RT) wurde der Überstand abgenommen, das Pellett im Rücklauf vorsichtig resuspendiert, auf PY-Selektagar-Platten (II-4.1.5) ausgestrichen und 3 Tage bei 30 °C anaerob im Licht inkubiert.

10 RNA-Techniken

10.1 Standard-Präparation von bakterieller Gesamt-RNA

Zur Isolierung bakterieller Gesamt-RNA wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben (RNeasy Mini Handbook 06/2001) verwendet (II-7). Bei der Isolierung der RNA aus *R. capsulatus* wurden die sedimentierten Zellen, abweichend vom Standardprotokoll, in 50 µl lysozymhaltigem TE-Puffer (400 µg Lysozym/ml) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem erneuten Auftauen bei RT wurden weitere 50 µl lysozymhaltigem TE-Puffer zugegeben.

Ebenfalls abweichend vom Standardprotokoll wurde während der RNA-Isolierung ein erster, optionaler, DNase-Verdau mit RNase-freier DNase der Firma Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt (II-5.2).

Nach erfolgter RNA-Isolierung wurde ein zweiter DNase-Verdau mit dem RQ1 RNase-free DNase Kit der Firma Promega nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die isolierte, DNA-freie RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

10.2 Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgte photometrisch mit Hilfe des BioPhotometers der Firma Eppendorf nach Herstellerangaben in einer TrayCell Küvette der Firma Hellma (II-8).

10.3 Reverse Transkription von RNA mit anschließender *real-time*-PCR

Zur Bestimmung der Menge spezifischen Transkripts in der Gesamt-RNA einer Probe wurde dieses Transkript mit Hilfe von Reverser Transkriptase in cDNA transkribiert und anschließend mittels *real-time*-PCR quantifiziert. Dazu wurde das QuantiTect SYBR-Green One Step PCR Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet (II-7). Dabei wurden für die *real-time*-PCR jeweils Ansätze zu 20 µl Gesamtvolumen eingesetzt.

Die notwendigen Oligonukleotidstartermoleküle (*Primer*, II-3.1) für die reverse Transkription der RNA sowie für die anschließende *real-time*-PCR mit der gebildeten cDNA als Matrize wurden mit Hilfe der „Primer3“-Software ermittelt (II-15).

Die Programmeinstellungen waren folgende:

Produktlänge:	100 – 150 bp	
Primerlänge:	18 – 30 bp	(optimal: 25 bp)
GC-Gehalt:	45 – 65 %	(optimal: 60 %)
Schmelztemperatur der Primer:	63 – 67 °C	(optimal: 64 °C)
Schmelztemperatur des Produkts:	65 – 85 °C	(optimal: 75 °C)

Real-time-PCReaktionen wurden in einem ep gradient S realplex⁴ Automaten der Firma Eppendorf durchgeführt.

11 DNA-Techniken

11.1 Standard-Präparation von Plasmid-DNA (nach Birnboim & Doly, 1979)

Die Präparation von DNA beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Es handelt sich um eine geeignete Methode kleine DNA-Mengen zu isolieren.

Von einer unter Selektionsdruck angezogenen ÜK wurden 2 ml entnommen und die Bakterienzellen durch Zentrifugation (3 min, 16000 × g, TZ, RT) geerntet. Nach vollständigem Entfernen des Kulturüberstandes wurde das verbliebene Sediment in 300 µl Mix I (II-6.1) resuspendiert und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Mix II (II-6.1) hinzu gegeben, mehrmals vorsichtig invertiert und für max. 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Mix III (II-6.1) und 10 min Inkubation auf Eis wurden die entstandenen Protein-SDS-Präzipitate, die gefällte chromosomale DNA sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation (15 min, 16000 × g, TZ, RT) sedimentiert. Der klare,

Plasmid-DNA enthaltende Überstand, wurde abgenommen, mit 10 µl Ribonuklease A (2 mg/ml) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Isopropanolfällung (II-11.3) wurde die Plasmid-DNA in 30 – 50 µl A. dest. oder 0,1-fach TE-Puffer (II-6.1) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Alternativ wurde Plasmid-DNA mit dem „HiSpeed Plasmid Mini Kit“ der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben unter Verwendung der mitgelieferten Puffer isoliert. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde die gereinigte Plasmid-DNA abschließend mit 30 µl A. dest. (65 °C) eluiert.

11.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden nach Anweisung des Herstellers mit dem „HiSpeed Plasmid Midi Kit“ der Firma QIAGEN unter Verwendung der vom Hersteller mitgelieferten Puffer isoliert. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde die Plasmid-DNA mit 750 µl A. dest. (65 °C) eluiert. Durch die Elution mit vorgewärmtem Wasser wurden höhere Ausbeuten erzielt. Zudem konnten inhibitorische Effekte des im TE-Puffer enthaltenden EDTA auf nachfolgende Enzym- oder Sequenzierungsreaktionen ausgeschlossen werden.

11.3 Präzipitation von DNA durch Isopropanolfällung

Das Prinzip der Alkohol-Fällung dient dazu, Salze und andere Verunreinigungen aus einer Nukleinsäurelösung zu entfernen. Dabei wird, in Gegenwart von einfach geladenen Salzen wie Kaliumacetat in einer wässrigen Phase, die Hydrathülle der Nukleinsäuren verdrängt und die DNA ausgefällt.

Bei durch Standard-Minipräparation (II-11.1) gewonnener Plasmid-DNA, wurde zur Aufreinigung eine Isopropanolfällung durchgeführt.

Die DNA-haltige, wässrige oder salzige Lösung wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol (abs.) versetzt, gut durchmischt und dann zur Sedimentation der präzipitierten DNA zentrifugiert (30 min, 16000 × g, TZ, RT). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Sediment mit 400 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 16000 × g, TZ, RT) wurde der Überstand vorsichtig entfernt, die gefällte DNA in einer Vakuumzentrifuge oder an der Luft getrocknet und in 30 – 50 µl A. dest. oder 0,1-fach TE-Puffer (II-6.1) aufgenommen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

11.4 DNA Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte in Agarosegelen (II-12.2) anhand der entsprechend gelagerten Banden eines Molekulargewichtsstandards (II-6.2). Alle Banden des Molekulargewichtsstandards enthielten eine vom Hersteller definierte Menge an DNA.

Alternativ wurde die DNA-Konzentration mit Hilfe des BioPhotometers der Firma Eppendorf nach Herstellerangaben in einer TrayCell-Küvette der Firma Hellma photometrisch bestimmt.

11.5 Bestimmung der durchschnittlichen Plasmidkopienzahl pro Zelle in einer Bakterienkultur

Zur Bestimmung des Einflusses eines heterologen Gens auf die Plasmidkopienzahl eines Vektors wurde die durchschnittliche Plasmidkopienzahl pro Zelle in der betreffenden Bakterienkultur mit Hilfe der *real-time*-PCR ermittelt.

Dazu wurde zunächst die Zellzahl der zu analysierenden Kulturen photometrisch mittels Trübungsmessung ermittelt und die enthaltene DNA quantitativ mit Hilfe des „DNeasy Blood & Tissue“ Kits der Firma Qiagen isoliert. Abweichend von den Herstellerangaben wurde die Zellyse über Nacht durchgeführt. Zusätzlich wurde die optionale RNase-Behandlung nach Herstellerangaben vorgenommen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mittels *real-time*-PCR, unter Verwendung des „Real Master Mix SYBR ROX“ Kits der Firma 5 Prime nach Herstellerangaben, mit geeigneten Oligonukleotidstartermolekülen (komplementär zur Bereichen des *aphII*-Gens, welches pro Plasmid einmal kodiert war) gegen einen definierten Plasmid-DNA-Massenstandard (pRhotHi-2; 10 ng – 10⁻⁵ ng, photometrisch mit Hilfe des BioPhotometers der Firma Eppendorf nach Herstellerangaben bestimmt) quantifiziert.

Über die quantifizierte DNA-Masse ließ sich unter Verwendung der Molmasse der synthetisierten doppelsträngigen *real-time*-PCR-Produkte die Stoffmenge der einzelnen PCR-Produkte errechnen, woraus wiederum die absolute PCR-Produkt-Zahl errechnet wurde. Da das *aphII*-Gen pro Plasmid nur einmal kodiert war, entsprach die errechnete absolute Zahl der PCR-Produkte der Zahl der Plasmide im für die DNA-Isolierung eingesetzten Volumen. Nach Berechnung der Zellzahl in diesem Volumen durch Messung der optischen Dichte (Trübungsmessung), wurde die Anzahl der Plasmide pro Zelle errechnet.

12 *In vitro* Rekombination von DNA

12.1 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (nach Smith & Birnstiel, 1976)

Die hydrolytische Spaltung der DNA erfolgte durch Typ II-Restriktionsendonukleasen, die an eine spezifische Nukleotidsequenz binden und innerhalb dieser Erkennungssequenzen die DNA spalten. Für die hydrolytische Spaltung wurden die vom Hersteller empfohlenen Bedingungen mit dem jeweils optimalen Reaktionspuffer gewählt. Pro µg DNA wurden 5 bis 10 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease verwendet und der Ansatz für 60 – 120 Minuten inkubiert (Temperatur nach Herstellerangaben). Zur Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen vor Ligationsreaktionen (II-12.4) wurden die Ansätze nach Herstellerangaben thermisch inaktiviert. Nicht hitzeinaktivierbare Restriktionsenzyme wurden nach Hitzebehandlung bei 80 °C für 20 min eingefroren (-20 °C) und erneut hitzebehandelt oder durch Agarosegelelektion von der restringierten DNA separiert.

12.2 Agarosegelelektrophorese (nach Sambrook *et al.*, 1989)

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Trennverfahren, das auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten verschieden großer, geladener Moleküle im elektrischen Feld beruht. Nukleinsäuren, die auf Grund ihres Zucker-Phosphat-Rückrats ein konstantes Masse-Ladungs-Verhältnis besitzen, wandern durch ihre negative Ladung im elektrischen Feld zur Anode. Dabei hängt ihre Wanderungsgeschwindigkeit von der Molekülgröße der DNA-Fragmente, ihrer Konformation, der Konzentration des Agarosegels und der Stärke des elektrischen Feldes ab.

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA-Restriktionen (II-12.1) und PCR-Reaktionen (II-12.5), zur präparativen Isolierung bestimmter DNA-Fragmente (II-12.3) und bei der Mengenabschätzung von DNA (II-11.4) angewendet. Für die Gelmatrix wurden je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente Agarosekonzentrationen zwischen 0,8 % und 3,0 % (w/v) in 0,5-fach TBE-Puffer (II-6.2) eingesetzt. Zur Anfärbung der DNA im Gel wurde pro ml der aufgekochten Agaroselösung 0,1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) zugesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 0,2 Volumen 5-fach DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern bei einer Spannung von bis zu 11 V pro cm Elektrodenabstand mit 0,5-fach TBE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Die Visualisierung der DNA erfolgte nach Elektrophorese durch Bestrahlung

mit UV-Licht ($\lambda = 254 - 366 \text{ nm}$). Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die Helix von doppelsträngiger DNA interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht Strahlung im sichtbaren Bereich ($\lambda = 590 \text{ nm}$) emittiert. Die Dokumentation der mit UV-Licht bestrahlten Gele erfolgte mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage (II-8).

12.3 Elution von DNA aus Agarosegelen (nach Vogelstein & Gillespie, 1979)

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen nach DNA-Restriktionen (II-12.2) wurde das „Perfectprep Gel-Cleanup-Kit“ der Firma Eppendorf nach Herstellerangaben mit den mitgelieferten Puffern verwendet.

Alternativ wurde das omnipure-OLS DNA-Gelextraktions Kit der Firma OMNI Life Science nach Herstellerangaben verwendet.

12.4 Ligation von Vektor- und Fragment-DNA (nach Dugaiczky *et al.*, 1975)

Die Ligation von DNA-Fragmenten und entsprechend hydrolysiertes Vektor-DNA wurde durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Die Ligase ist in der Lage, unter Hydrolyse von ATP, die kovalente Verknüpfung benachbarter 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden sowohl zwischen kompatiblen, überhängenden („*sticky ends*“) als auch zwischen zwei glatten Enden („*blunt ends*“) doppelsträngiger DNA-Moleküle zu bilden. In einem Reaktionsvolumen von 10 μl bis 50 μl wurden die Fragment-DNA und die Vektor-DNA im molaren Verhältnis eingesetzt. Nach Zugabe des vom Hersteller mitgelieferten T4-DNA-Ligasepuffers und von 1 U Ligase („*blunt end*“-Ligation: 5 U) wurden die Ansätze 1 h bei RT inkubiert. Bei der Ligation von glatten Enden wurde den Ligationsansätzen zusätzlich PEG 4000 (Fermentas) in einer Endkonzentration von 5 % (v/v) zugegeben. Alternativ wurde die Ligationsreaktion für 2 h bei 11 °C oder über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Die Inaktivierung der T4-DNA-Ligase fand durch 10 min Inkubation bei 65 °C statt. Für nachfolgende Transformationen (II-9.2.2) wurden die Ligationsansätze im Verhältnis 1:10 mit TMF-Puffer (II-6.3) verdünnt, um die Konzentration des im Ligasepuffer befindlichen β -Mercaptoethanols herabzusetzen.

12.5 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) (nach Mullis & Faloona, 1987)

Bei der Polymerasekettenreaktion werden bestimmte DNA-Bereiche *in vitro* aus einem Gemisch von DNA-Molekülen selektiv angereichert. Hierzu werden eine thermostabile DNA-Polymerase, geringe Mengen Ausgangsmaterial als Matrize, zwei Oligonukleotidprimer, die

in weiten Bereichen komplementär zu der zu amplifizierenden Sequenz sind sowie DNA-Polymerasepuffer und ein dNTP-Mix benötigt. Das Prinzip der PCR beruht auf einer sich wiederholenden Abfolge von drei Schritten. Zuerst wird die Matrize denaturiert. In dem darauf folgenden Schritt, der Hybridisierung, lagern sich die *Primer* an die komplementären Sequenzen der Matrize an. Im dritten Schritt, der Elongation, verlängert die DNA-Polymerase die angelagerten Oligonukleotid-*Primer* (3'→5') und kopiert auf diese Weise die Matrize. Die Hybridisierung erfolgt an beiden Strängen der Matrizen-DNA, wodurch sich die DNA in einem Zyklus verdoppelt. Nach 30 bis 40 Zyklen erhält man ausreichende Mengen der gewünschten DNA. Zur Amplifizierung wurden die in Abschnitt II-5.2 angegebenen Polymerasen verwendet, die alle 5'→3' Exonuklease-Aktivität („Proofreading“) aufwiesen.

Standard-PCR Ansatz

Verwendete Polymerase	<i>Pfu</i>	<i>Phusion</i>
Oligonukleotidprimer I	100 pmol	0,5 µM
Oligonukleotidprimer II	100 pmol	0,5 µM
Polymerasepuffer	1× Puffer	1× Puffer
dNTP Mix	2,5 mM	200 µM
DMSO	6 % (v/v)	3 % (v/v)
Matrizen-DNA	~ 50 ng	10 – 50 ng
Polymerase	1,0 – 3,5 U	0,02 U/µl
A. dest.	ad 50 µl	ad 50 µl

PCR-Reaktionen wurden in den PCR-Automaten ep gradient S und ep gradient der Firma Eppendorf durchgeführt.

Standardprogramm für die PCR

Verwendete Polymerase	<i>Pfu</i>	<i>Phusion</i>
Initiale Denaturierung	98 °C, 10 min	98 °C, 30 s
Denaturierung	98 °C, 1 min	98 °C, 10 s
Hybridisierung	T _m , 1 min	T _m , 20 s
Elongation	72 °C, 2 min/kb	72 °C, 30 s/kb
Terminale Elongation	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min

Die Schritte Denaturierung, Hybridisierung und Elongation wurden zyklisch 35-mal durchlaufen. Die Hybridisierungstemperatur T_m richtete sich nach den Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotidprimer (T_{m1} und T_{m2}) sowie der verwendeten Polymerase. Für Reaktionen mit *Pfu*-Polymerase errechnete sich die Hybridisierungstemperatur nach $[(T_{m1} + T_{m2})/2] - 5$ °C). Wurde „Phusion High Fidelity Polymerase“ verwendet, errechnete sich die Hybridisierungstemperatur nach $[(T_{m1} + T_{m2})/2] + 3$ °C), wobei die Differenz der Schmelztemperaturen der *Primer* für beide Polymerasen 4 °C nicht überschritt.

PCR-Produkte wurden mit Hilfe von Agarosegelelektrophoresen (II-12.2) analysiert.

12.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte entweder direkt aus dem Ansatz oder mittels Agarosegelelektion (II-12.3), wenn das gewünschte PCR-Produkt zunächst von unerwünschten Artefakten separiert werden musste. In beiden Fällen wurde die Aufreinigung mittels „Perfectprep Gel Cleanup“ Kit der Firma Eppendorf oder mittels omnipure-OLS DNA-Gelextraktions Kit der Firma OMNI Life Science nach Herstellerangaben durchgeführt.

13 Protein-Techniken

13.1 Zellaufschluss zur Proteinisolierung

Gekühlte Zellsuspensionen mit einem Volumen von bis zu 2 ml wurden mit Hilfe von Ultraschall lysiert. Dazu wurde ein Sonifier 250 der Firma Branson mit MS72 Sonotrode bei 80 W und 50 Zyklen/min für 5 min (zweimal 2,5 min) verwendet.

Zellsuspensionen bis 30 ml wurden durch viermalige Scherung mit einer *French Press* der Firma Thermo Electron in einer 40K-Zelle bei 550 bar lysiert.

13.2 Fraktionierung von Zellbestandteilen

Von einer Testkultur (II-9.1.1) wurden 1,5 ml sedimentiert (10 min, $16000 \times g$, RT) und das Zellsediment in 1x Sammelgelpuffer (II-6.4.1) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert (II-13.1) und drei Zentrifugationsschritten unterzogen:

Der erste Schritt erfolgte bei $2370 \times g$ für 3 min bei RT. Das Sediment wurde in 100 μ l SDS-Probenpuffer (II-6.4) aufgenommen und stellte Fraktion 1 dar: Ganze Zellen und Proteineinschlusskörper (*inclusion bodies*). Der Überstand wurde in ein neues EPG überführt und bei $16000 \times g$ für 30 min bei RT sedimentiert. Das Sediment wurde ebenfalls in 100 μ l SDS-Probenpuffer aufgenommen und stellte Fraktion 2 dar: Die Membranfraktion. Der

Überstand wurde in ein weiteres EPG überführt und bildete Fraktion 3: Die löslichen Proteine. Diese wurden mittels der TCA-Fällung sedimentiert (II-13.4).

13.3 Fraktionierung für Lokalisationsstudien

Die betreffende 1000 ml Testkultur wurde vollständig sedimentiert, das Pellet in 1/10 Volumen SP-Puffer (II-6.4) gewaschen und erneut vollständig sedimentiert. Anschließend wurde das Zellpellet in SP-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 30 ml resuspendiert und in einer *Frech Press* bei 550 bar Zellinnendruck 5-mal durch Scherung lysiert. Nach diesem Zellaufschluss wurden die Zelltrümmer durch 30 min Zentrifugation bei $12000 \times g$ sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und ein zweites Mal zentrifugiert. Die Pellets wurden vereinigt, in SP-Puffer gewaschen und erneut für 30 min bei $12000 \times g$ sedimentiert. Das erhaltene Pellet stellt die Fraktion der Zelltrümmer und *inclusion bodies* dar und wurde in SP Puffer bis zur weiteren Verwendung aufgenommen.

Die vereinigten Überstände der ersten und zweiten Zentrifugation nach dem Zellaufschluss wurden einem weiteren Zentrifugationsschritt bei $175000 \times g$ für 60 min unterzogen um die Zellmembranen und Vesikel zu sedimentieren. Das Pellet wird anschließend in SP-Puffer bis zur weiteren Verwendung aufgenommen.

Der Überstand, der nur noch lösliche Proteine enthielt, wurde anschließend einer TCA-Fällung unterzogen (II-13.4).

13.4 TCA-Fällung

Für die Fällung der löslichen Proteine wurden 1 Volumen Proteinlösung und 0,1 Volumen 70% TCA gemischt, kurz gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei $16000 \times g$ und RT für 5 min sedimentiert und das Sediment mit 80% Aceton gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in einer Vakuumzentrifuge (alternativ 15 min bei 65°C) getrocknet und in 100 μl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Bei Eintreten einer Gelbfärbung, wurde der Ansatz mit wenigen Mikrolitern 1M Tris neutralisiert.

13.5 Gesamtproteinisolierung aus *E. coli*

Zur Gewinnung eines zellfreien, denaturierten Proteinlysats wurde der zu untersuchende *E. coli* Stamm in 5 ml LB-Selektmedium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Von dieser Kultur wurden 1,5 ml nach Bestimmung der Zellzahl durch Trübungsmessung (bei 580 nm) für 3 min zentrifugiert ($16000 \times g$, TZ, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1,0 ml 1-fach Sammelgelpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut 3

min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert (Vortex). Die Proteinproben wurden 10 min bei 99 °C und Agitation (Eppendorf Thermomixer) denaturiert. Zelltrümmer wurden durch anschließende Zentrifugation bei 16000 × g sedimentiert und der Überstand in ein neues EPG überführt. Die Proteinextrakte konnten bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert werden.

13.6 Gesamtproteinisolierung aus *R. capsulatus*

Zur Gewinnung eines zellfreien, denaturierten Proteinlysats wurde der zu untersuchende *R. capsulatus* Stamm je nach Anforderung als aerobe (II-9.1.4) oder anaerobe (II-9.1.3) Flüssigkultur bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Nach Bestimmung der Zellzahl durch Trübungsmessung (bei 660 nm) wurde analog zur Proteinisolierung aus *E. coli* (II-13.5) verfahren, lediglich die Zentrifugationszeiten wurde auf 10 min erhöht.

13.7 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (nach Laemmli, 1970)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinproben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem. Durch Komplexbildung der Proteine mit SDS wird infolge der negativen Ladung des SDS die Eigenladung der Proteine kompensiert, sodass die Protein-SDS-Komplexe eine negative Ladung erhalten. Die Protein-SDS-Komplexe werden während der Elektrophorese auf Grund ihres Masse-/Ladungsverhältnis nach ihrer Molekülgröße getrennt. Dazu wurden die Protein-SDS-Komplexe in einem Sammelgel (4 % (v/v) Acrylamid) fokussiert und anschließend in einem Trenngel (10% oder 15 % (v/v) Acrylamid) ihrer Molekülgröße nach aufgetrennt. Die Proteinproben (II-13.5, II-13.6) wurden 5 – 10 min bei 99 °C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Gelapparatur „Mini-PROTEAN Gelkammer II“ (Bio-Rad) in 1-fach Elektrophorese-Laufpuffer durchgeführt. Dabei wurde, während sich die Proben im Sammelgel befanden, eine Spannung von 150 V angelegt, die beim Übertritt der Proben in das Trenngel auf 200 V erhöht wurde.

Alternativ wurde das „X Cell Sure Lock System“ der Firma Invitrogen mit dem „Novex PowerEase 500“ unter Verwendung von NuPAGE 4 – 12% Bis-Tris Gelen (1 mm) in 1-fach NuPAGE SDS Running Buffer nach Herstellerangaben eingesetzt.

13.8 Coomassie-Färbung zur Proteindetektion (nach Merrill, 1990)

Die Färbung von SDS-PAGE-Gelen (II-13.7) in Coomassie Brilliant Blau-Färbelösung (II-6.4) erfolgte nach der Elektrophorese bei 60 °C im Wasserbad unter langsamem Schütteln. Nach 30 min Inkubation wurde die Färbelösung durch Entfärbelösung ersetzt, welche alle 20 min bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes gewechselt wurde.

Alternativ wurden die Gele mit Bio-Safe Coomassie Stain (Bio-Rad) nach Herstellerangaben gefärbt und durch mehrmaliges Waschen mit A. dest. bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes entfärbt.

Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage (II-8).

13.9 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (nach Wilson & Juan, 1989)

Die durch SDS-PAGE (II-13.7) aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe der „Mini-Transfer-Blot Elektrophoretic Transfer Cell“ (Bio-Rad) auf eine PVDF-Membran übertragen. Vor dem Transfer wurde die PVDF-Membran 1 min in Methanol, dann für 5 min in A. dest. und abschließend für 10 min in Dunn-Carbonat-Puffer (II-6.5) equilibriert. Das SDS-PAGE-Gel wurde für 10 min in Dunn-Carbonat-Puffer equilibriert. Der Transfer der Proteine erfolgte in Dunn-Carbonat Puffer 15 min bei 150 mA und weitere 20 min bei 300 mA. Alternativ wurde das XCell Sure Lock System der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet.

13.10 Immunodetektion von Proteinen

Nach Übertragung von Proteinen auf eine PVDF-Membran konnten diese Proteine immunologisch nachgewiesen werden. Die Hybridisierung erfolgte unter Verwendung eines spezifischen Antiserums (II-5.1), welches mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt war. Unter Verwendung des „Enhanced-Chemo-Luminescence“ (ECL) Western-Blotting-Detektionssystems (II-7) der Firma Amersham erfolgte die Visualisierung. Dabei wurde durch eine Peroxidase-katalysierte Reaktion Chemolumineszenz erzeugt, die photographisch (II-8) detektiert wurde.

Dazu wurde die PVDF-Membran nach dem Transfer der Proteine für 1 h bei 30 °C mit TBST-Puffer (II-6.5) mit 3 % (w/v) Magermilchpulver unter Bewegung blockiert um freie Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Nach 15 min Waschen in TBST-Puffer bei 30 °C wurde die Membran für eine Stunde mit dem spezifischen Anti-Histidin-Antikörper (1/5000) bei 30 °C leicht geschüttelt. Durch zweimaliges 25 min Waschen in TBST-Puffer wurde der nicht gebundene Antikörper entfernt. Das auf der Membran gebundene Protein konnte

anschließend indirekt, über die gebundene HRP mit Hilfe des ECL-Systems, nachgewiesen werden. Dieses wurde nach den Herstellerangaben verwendet, wobei die Dokumentation photographisch, mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage, erfolgte (II-8).

13.11 Färbung von PVDF-Membranen

Nach der photographischen Dokumentation der Proteine (II-13.10) wurden diese zusätzlich auf der PVDF-Membran angefärbt. Dazu wurde die Membran 15 min in TBST-Puffer gewaschen und 30 min in Amidoschwarz-Färbelösung (II-6.5) inkubiert. Die Membran wurde anschließend über Nacht an der Luft getrocknet.

14 Optische Methoden

14.1 Aufnahme von Carotinoidabsorptionsspektren

Zur Aufnahme von Carotinoidabsorptionsspektren wurden zunächst 2 ml einer *R. capsulatus* Testkultur (II-9.1.3, II-9.1.4) abgenommen und sedimentiert. Das Pellet wurde in 1 ml Ethanol (70 %) resuspendiert und anschließend 1 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei $16000 \times g$ wurde der Überstand abgenommen, vor Licht und Sauerstoff geschützt und von 300 nm bis 900 nm photometrisch vermessen.

14.2 Verwendung von *light emitting diodes* (LEDs) zur Beleuchtung phototropher Organismen

Im Rahmen dieser Arbeit kamen erstmals LEDs zur Beleuchtung phototropher Bakterien zum Einsatz. In Kooperation mit der Firma Insta GmbH aus Lüdenscheid wurden LED-Platinen konstruiert, die die wahlweise Beleuchtung bei 460 nm, 856 nm oder beiden Wellenlängen ermöglichten. Bei den Leuchtdioden handelte es sich um den High Power Infrared Emitter SFH 4257 der Firma Osram sowie die Blue LED NSSB100BT der Firma Nichia im Abstand von je 1,5 cm auf der Platine. Pro LED-Platine wurden 120 blaue und 120 rote LEDs verbaut. Zur Illumination von Testkulturen wurden stets 2 Platinen im Abstand von 10 cm zur Kultur verwendet.

15 Computerprogramme und Datenbanken

Die Erstellung von Klonierungsstrategien erfolgte unter Verwendung des Programms Clone Manager 7.03 (Scientific & Educational Software).

Die Dokumentation und Verarbeitung von SDS-PAGEs sowie Western-Blots erfolgte mit Hilfe der STELLA- sowie AIDA-Software der Firma Raytest.

Real-time-PCR-Ergebnisse wurde mit Hilfe der realplex-Software der Firma Eppendorf ausgewertet.

Chemische Strukturen wurden mit ChemBioOffice 2008 der Firma Cambridge Soft realisiert. Poteinstrukturen wurden mit Chimera modelliert.

Für die Sequenz- und Datenbankrecherchen sowie Primerdesign im Internet wurden die folgenden Adressen verwendet:

National Center for Biotechnological Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
ExPASy Molecular Biology Server	http://www.expasy.org
ERGO Light	http://www.ergo-light.com
Graphical Codon Usage Analyzer	http://www.gcu.de
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu

III Ergebnisse

1 Etablierung von *R. capsulatus* als Wirt für die Synthese heterologer Membranproteine

Membranproteine besitzen auf Grund ihrer Topologie große hydrophobe Strukturelemente, die dazu führen, dass es bei der heterologen Synthese dieser Proteine fast immer zur Bildung unlöslicher Einschlusskörper (*inclusion bodies*) kommt. Um die Bildung dieser Einschlusskörper während der heterologen Synthese zu vermeiden, ist es notwendig, dass das korrespondierende Genprodukt unmittelbar in die Zellmembran der Wirtszelle eingebaut wird.

In herkömmlichen Expressionswirten, wie *Escherichia coli*, ist die Zellmembran jedoch durch wirtseigene Membranproteine bereits abgesättigt, so dass die Inkorporation heterologer Genprodukte in der Regel nicht erfolgt.

Das phototrophe nicht-Schwefel Purpurbakterium *Rhodobacter capsulatus* hingegen bildet unter phototrophen Wuchsbedingungen ein zusätzliches Membransystem aus, das dazu dient, die Komplexe seines Photosystems aufzunehmen. Es wird als intracytoplasmatisches Membransystem bezeichnet und vergrößert die Membranoberfläche von *R. capsulatus* durch die Bildung von Membranausstülpungen und Vesikeln um das 3- bis 9-fache (Drews & Golecki, 1995).

Dieses Membransystem sollte ausgenutzt werden, um heterologe Membranproteine in Konkurrenz zu den Photosynthese-Enzymkomplexen des *R. capsulatus* Photosystems aufzunehmen und so *R. capsulatus* als Wirt für die Synthese heterologer Membranproteine zu etablieren.

Dazu war es jedoch zunächst erforderlich, einen geeigneten Expressionsvektor zu finden. Dieser musste die induzierbare Genexpression in allen Wachstumsphasen des Wirts ermöglichen, stabil replizieren, eine selektierbare Resistenz in *R. capsulatus* ausbilden und die vergleichende Expression in anderen Wirtsorganismen zulassen.

Ein solcher Vektor ist das Plasmid pRhotHi-2, welches eigens für den Einsatz in *R. capsulatus* konstruiert wurde (Drepper *et al.*, 2008; Katzke *et al.*, in Vorbereitung). Als Grundgerüst für diesen Vektor wurde das Expressionsplasmid pBBR22b (Rosenau & Jaeger, 2004), das aus Teilen des *broad host range* Vektors pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994) und

des *E. coli* T7-Expressionvektors pET22b (Novagen) besteht, verwendet. Somit steht im pRhotHi-2-Vektor auch der Promotor der T7-RNA-Polymerase zur Zielgenexpression zu Verfügung. Dieses T7-System nimmt unter den bakteriellen Expressionssystemen einen besonderen Stellenwert ein: Im Fall des T7-Expressionssystems stehen die rekombinanten Zielgene unter der Transkriptionskontrolle eines Promotors aus dem Bakteriophagen T7 (Studier & Moffatt, 1986; Tabor & Richardson, 1985). Diese 23 bp lange Sequenz wird ausschließlich von der spezifischen RNA-Polymerase aus dem T7-Phagen erkannt (Kochetkov *et al.*, 1998). Die wirtseigene bakterielle RNA-Polymerase erkennt den Promotor nicht und hat daher keinerlei Einfluss auf die Expression der Zielgene. Außerdem zeichnet sich die T7-RNA-Polymerase im Vergleich zu bakteriellen RNA-Polymerasen durch eine sehr hohe Prozessivität aus. Daher können mit T7-RNA-Polymerase-basierten Expressionssystemen sehr hohe Proteinausbeuten erzielt werden (Studier & Moffatt, 1986). Um den T7-Promotor des pRhotHi-2-Expressionsvektors jedoch uneingeschränkt nutzen zu können, wurde das pBBR22b-lokalisierte *lacI*-Gen deletiert und somit die LacI-unabhängige Zielgenexpression möglich.

Außerdem wurde in den P_{T7} -abhängigen Expressionsvektor pRhotHi-2 das *aphII*-Gen des Tn5 Transposons eingesetzt, um dem *R. capsulatus* Rezipientenstamm eine selektierbare Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin zu verleihen, da das Chloramphenicol-Resistenzgen des pBBR22b in *R. capsulatus* nicht exprimiert wird.

Um die P_{T7} -abhängige Genexpression im Expressionsplasmid pRhotHi-2 überhaupt zu ermöglichen, musste im Rahmen dieser Arbeit ein spezieller *R. capsulatus* Stamm verwendet werden, der das T7-RNA-Polymerasegen unter Kontrolle eines wirtseigenen Promotors exprimiert.

Dabei handelt es sich um den *R. capsulatus* Stamm B10S-T7 (Drepper *et al.*, 2008; Katzke *et al.*, in Vorbereitung), der das T7-RNA-Polymerasegen unter Kontrolle des Fruktose-induzierbaren Promotors (P_{fru} , Duport *et al.*, 1994) chromosomal integriert hat. Dieser genetisch stabile Expressionswirt zeichnet sich dadurch aus, dass er eine in hohem Maße reproduzierbare, sowie kontrollierbare Expression der Phagenpolymerase erlaubt. Außerdem weist der *R. capsulatus* Stamm B10S-T7 durch die Integration des T7-RNA-Polymerasegens in das *recA*-Gen eine *recA*-Mutation auf, wodurch homologe Rekombinationsereignisse zwischen Expressionsvektor und Wirtschromosom komplett unterbunden werden.

Die Expression des T7-RNA-Polymerasegens kann im *R. capsulatus* Stamm B10S-T7 durch die Zugabe von Fruktose in das Anzuchtmedium induziert werden. Dabei reicht eine

Fruktosekonzentration von 8 mmol/l aus, um die vollständige Induktion des T7-RNA-Polymerasegens zu erreichen (Drepper *et al.*, 2008; Katzke *et al.*, in Vorbereitung).

Somit steht für die Synthese heterologer Membranproteine in *R. capsulatus* ein System zur Verfügung, welches die induzierbare, starke Expression der entsprechenden Zielgene unter der Kontrolle des T7-Promotors in einem genetisch stabilen Expressionswirt erlaubt.

1.1 Verwendung des neuen *R. capsulatus* Expressionssystems zur Synthese von heterologen Membranproteinen

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob mit dem neu entwickelten *R. capsulatus* Expressionssystem, bestehend aus dem T7-Expressionsstamm B10S-T7 und dem P_{T7}-abhängigen Expressionsplasmid pRhotHi-2, heterologe Membranproteine synthetisiert werden können.

Dazu sollte jedoch nicht nur die Akkumulation und Lokalisation der synthetisierten Genprodukte analysiert werden. Es sollte ebenso untersucht werden, welchen Einfluss das Einbringen ihrer Gene in den P_{T7}-abhängigen Expressionsvektor pRhotHi-2 auf dessen Plasmidkopienzahl pro Zelle in *R. capsulatus* B10S-T7 hat. Außerdem sollte die Transkriptionseffizienz bzw. Transkriptausbeute im neuen *R. capsulatus* Expressionssystem untersucht werden.

Um jedoch überhaupt eine Aussage über die Leistungsfähigkeit des neuen *R. capsulatus* Expressionssystem machen zu können, sollte das *R. capsulatus* B10S-T7 System in den oben beschriebenen Punkten mit bereits etablierten *E. coli* Systemen verglichen werden. Aus diesem Grund sollten die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche in Bezug auf die heterologe Synthese von Membranproteinen nicht nur im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7 durchgeführt werden, sondern auch in den *E. coli* Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3). Der *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) eignet sich besonders für die P_{T7}-abhängige Überexpression vieler heterologer Gene und wird daher standardmäßig im mikrobiologischem Alltag eingesetzt. Dieser *E. coli* Stamm besitzt das T7-RNA-Polymerasegen des DE3-Phagen unter der Kontrolle des *lacUV*-Promotors als stabile chromosomale Integration. Bei dem *E. coli* Stamm C43(DE3) handelt es sich um einen Tochterstamm des BL21(DE3), der jedoch durch *Screening*-Methoden von Miroux und Walker optimiert wurde und eine vergrößerte Membranoberfläche aufweist (Miroux & Walker, 1996). Er zeichnet sich durch den Phänotyp des BL21(DE3)-Stamms aus, besitzt

jedoch mindestens zwei uncharakterisierte Mutationen, die die Synthese einiger toxischer Proteine und Membranproteine zulassen (Miroux & Walker, 1996).

Im Gegensatz zu diesen beiden *E. coli* Expressionsstämmen ist *R. capsulatus* B10S-T7, wie bereits beschrieben, in der Lage, phototroph zu wachsen. Dazu bildet das α -Proteobakterium ein intracytoplasmatisches Membransystem aus. Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass in dieses Membransystem nicht nur die Enzymkomplexe des Photosystems aufnehmen kann, sondern – in Konkurrenz dazu – auch heterologe Membranproteine. Daher sollte im *R. capsulatus* B10S-T7 Expressionssystem, im Gegensatz zu den ausgewählten *E. coli* Systemen, auch untersucht werden, ob heterologe Membranproteine tatsächlich in das ICM System inserieren und ob es möglich ist, diesen Einbau in einem einfachen photometrischen Test nachzuweisen.

Um diesen Fragestellungen jedoch nachgehen zu können, war es zunächst notwendig, ein Modellprotein auszuwählen, welches in *E. coli* bereits erfolgreich synthetisiert werden konnte. So konnte sichergestellt werden, dass der neue P_{T7}-abhängige Expressionsvektor pRhotHi-2 geeignet ist, heterologe Gene für Membranproteine zu exprimieren.

Ein solches Modellprotein ist das Bacterioopsin aus dem Archaeon *Halobacterium salinarum*. Im Folgenden werden daher die Funktion und Eigenschaften dieses Proteins kurz erläutert.

1.1.1 Das Transmembranprotein Bacterioopsin aus *Halobacterium salinarum*

Bei Bacterioopsin (Bop) handelt es sich um ein integrales Membranprotein der Zellmembran des extremophilen Archaeon *Halobacterium salinarum* (Dunn *et al.*, 1981). Das native Protein besteht aus 248 Aminosäuren und ist in sieben näherungsweise parallelen, transmembranen α -Helices angeordnet, die eine Pore bilden (Abbildung 5). Wird in diese Pore ein Molekül des Chromophors Retinal eingelagert, spricht man nicht mehr von Bacterioopsin, sondern von dem 27,6 kDa großen Bacteriorhodopsin (bR, Hohenfeld *et al.*, 1999). Dazu muss das Retinal über eine Imidbindung als Schiff'sche Base an die Aminfunktion der Aminosäure Lysin 216 gebunden werden (Lanyi, 2004). Es liegt dann physiologisch entweder als all-*trans*- oder als 13-*cis*,15-*anti*-Isomer vor (Lanyi, 2004). Lichtinduziert isomerisieren diese Retinalformen, was zu Änderungen der Protonenaffinitäten bestimmter Aminosäurefunktionen innerhalb des Bacteriorhodopsins führt und schließlich dazu, dass Protonen von der cytoplasmatischen zur extrazellulären Membranseite – durch die Pore des Proteins – transportiert werden. Dabei durchläuft das Bacteriorhodopsin einen reversiblen Photozyklus.

Da das Genprodukt des *bop*-Gens bereits erfolgreich in *E. coli* synthetisiert werden konnte (Hohenfeld *et al.*, 1999), handelt es sich um eines der bestcharakterisierten Membranproteine und eignet sich daher in besonderem Maße als Modellprotein für die Synthese im neuen *R. capsulatus* Expressionssystem. Außerdem wurden bereits ein Aktivitäts-Assay für dieses Protein entwickelt, der die spätere funktionelle Charakterisierung ermöglichen soll (Kouyama *et al.*, 1987).

Dennoch sollte in *R. capsulatus* zunächst die Expression und Lokalisation von Bacterioopsin analysiert werden, bevor in einem weiteren Schritt durch Zugabe des Chromophors Retinal die Aktivität des synthetisierten Proteins durch einen einfachen photometrischen Test untersucht werden sollte.

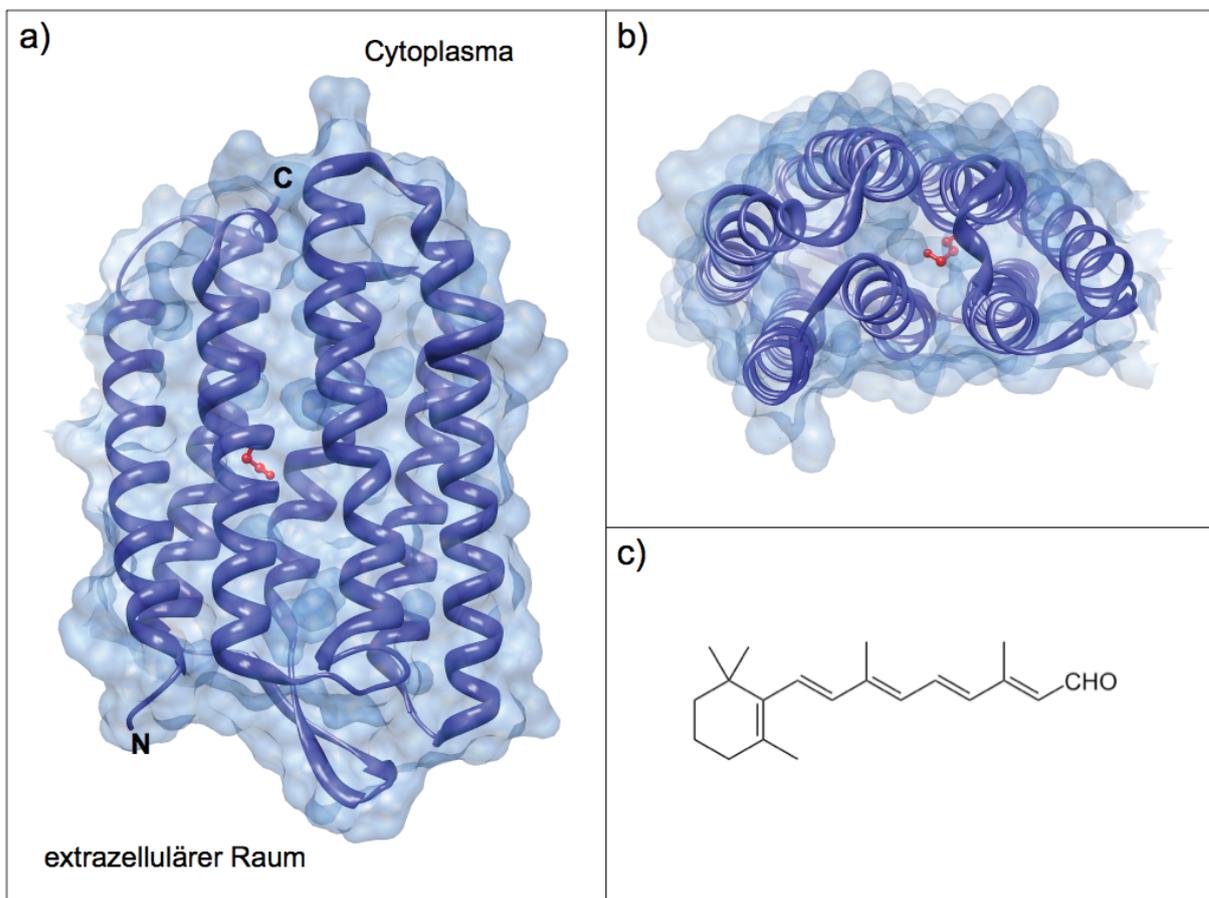


Abbildung 5: Dreidimensionale Struktur des Bacterioopsins. Bacterioopsin besteht aus 7 näherungsweise parallelen Transmembranhelices (a, Seitenansicht), die in der Membran des Archaeen *Halobacterium salinarum* eine Pore ausbilden (b, Aufsicht von der cytoplasmatischen Seite). Wird in dieser Pore an den Aminosäurerest Lysin 216 (rot hervorgehoben) ein Molekül Retinal (c, all-*trans*-Retinal) als Schiff'sche Base gebunden, spricht man von Bacteriorhodopsin. Die Moleküldarstellung erfolgte mit Hilfe des Programms Chimera anhand der Strukturdaten der pdb-Datei 1py6. Die Moleküloberfläche ist in transparentem Blau dargestellt. N: N-Terminus; C: C-Terminus.

1.1.2 Klonierung des P_{T7} -abhängigen Bacterioopsin-Expressionsvektors

Um die T7-RNA-Polymerase-abhängige Expression, Akkumulation und Lokalisation von Bacterioopsin sowohl in *E. coli* als auch im neuen *Rhodobacter*-Expressionssystem untersuchen zu können, wurde das korrespondierende *bop*-Gen zunächst in den Expressionsvektor pRhotHi-2 kloniert (Abbildung 6).

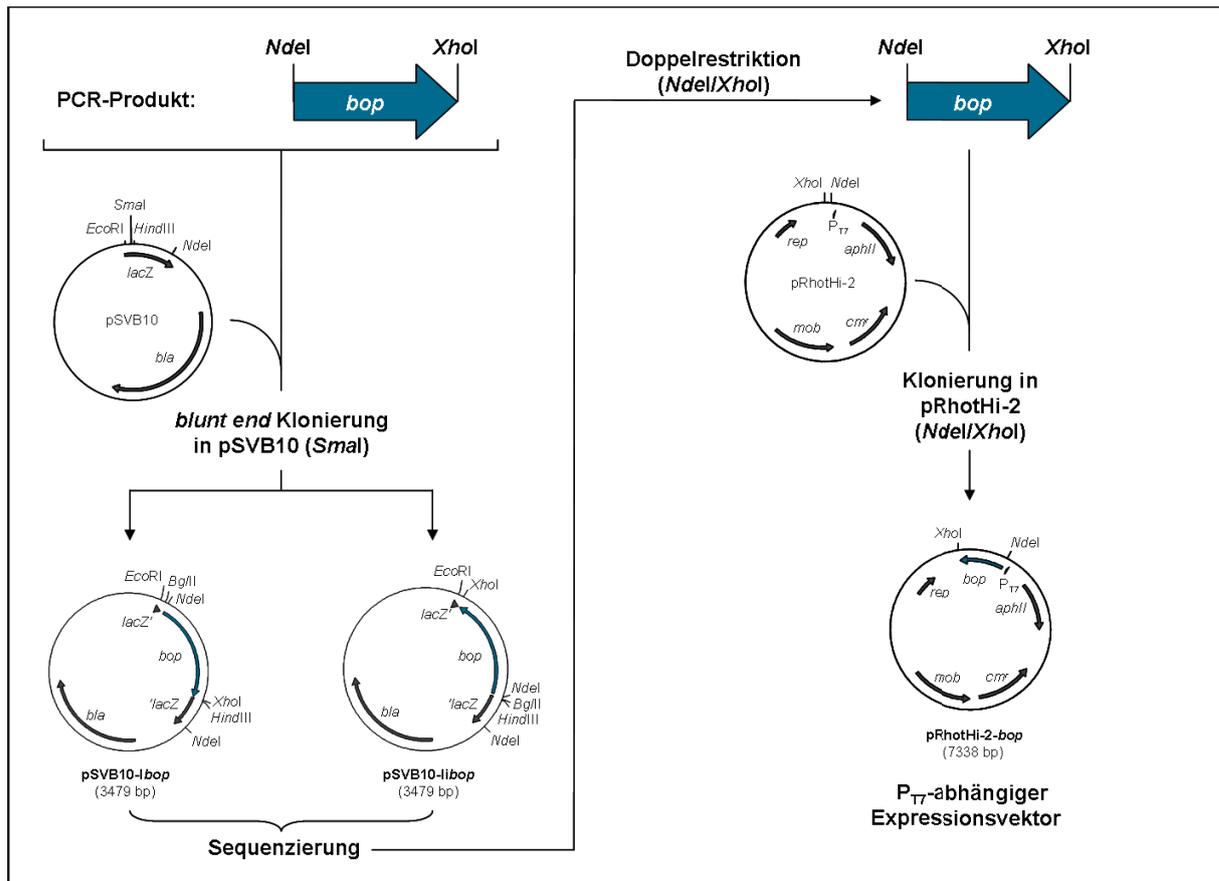


Abbildung 6: Schematische Darstellung zur Klonierung des P_{T7} -abhängigen *Rhodobacter*-Expressionsvektors pRhotHi-2-*bop*. Zur Expression des Bacterioopsingens wurde ein spezieller P_{T7} -abhängiger Expressionsvektor erzeugt. Dazu wurde das *bop*-Gen mittels PCR amplifiziert und *blunt end* in die *SmaI*-Restriktionsschnittstelle des Sequenziervektors pSVB10 kloniert. Nach dessen Sequenzierung wurde das *bop*-Gen zur Synthese des P_{T7} -abhängigen *bop*-Expressionsvektors aus den pSVB10-Derivaten herausgeschnitten (*NdeI/XhoI*) und in die *NdeI*- und *XhoI*-Restriktionsschnittstellen des Vektors pRhotHi-2 kloniert.

Dazu wurde es durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit spezifischen Oligonukleotidstarmolekülen amplifiziert, wodurch dem PCR-Produkt am 5'-Ende eine *NdeI*- und am 3'-Ende eine *XhoI*-Restriktionsschnittstelle angefügt wurde. Außerdem wurde das Stoppkodon deletiert, was die spätere Proteinbiosynthese mit C-terminalem Hexahistidin-Tag zum immunologischen Proteinnachweis sowie die Affinitätschromatographische Aufreinigung ermöglichen soll. Als DNA-Matrize für das *bop*-Gen diente das rekombinante Plasmid pAWG/P(T5)His₁₀*bop* (Dyczmons, 2006). Diese Matrize enthielt neben der DNA-

Sequenz für das Protein auch die DNA-Sequenz für dessen Signalpeptid. Das Signalpeptid besteht translatiert aus 13 Aminosäuren am N-Terminus des Bacterioopsins und wird nach seiner Prozessierung abgespalten.

Nach erfolgreicher PCR wurde das amplifizierte DNA-Fragment mit glatten Enden in die *Sma*I-Restriktionsschnittstelle des Sequenziervektors pSVB10 kloniert und die DNA-Sequenz des klonierten PCR-Fragments durch Sequenzierung (Sequiserie GmbH, Vaterstetten, Deutschland) bestätigt.

Anschließend wurde das *bop*-Gen mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Xho*I in einer Doppelrestriktion aus den pSVB10-Derivaten herausgeschnitten und in die korrespondierenden Schnittstellen des T7-RNA-Polymerase-abhängigen Expressionsvektors pRhotHi-2 kloniert. Das entstandene rekombinante Plasmid wurde mit pRhotHi-2-*bop* bezeichnet (Abbildung 6).

1.2 Untersuchungen zur P_{T7}-abhängigen Expression von Bacterioopsin in *E. coli*

Im Rahmen dieses Teilaspekts der vorliegenden Arbeit sollte nun überprüft werden, inwieweit Bacterioopsin mit dem neuen P_{T7}-abhängigen Expressionsvektor pRhotHi-2-*bop* in bereits beschriebenen *E. coli* Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3) exprimiert werden kann. So sollte zum einen überprüft werden, ob das verwendete Expressionsplasmid pRhotHi-2-*bop* in der Lage ist, Gene für heterologe Membranproteine zu exprimieren. Zum anderen sollten so zwei Referenzsysteme geschaffen werden, um die spätere Expression von Bacterioopsin in *R. capsulatus* mit den gewählten *E. coli* Systemen vergleichen zu können. Besonderes Augenmerk wurde dazu auf die Plasmidkopienzahl des Vektors, die Transkriptionseffizienz und Transkriptausbau sowie die Proteinlokalisierung gelegt.

1.2.1 Bestimmung der Plasmidkopienzahl des P_{T7}-abhängigen Expressionsvektors pRhotHi-2-*bop* in den *E. coli* Expressionsstämmen BL21(DE3) und C43(DE3)

Um die Plasmidkopienzahl des Expressionsvektors pRhotHi-2-*bop* in den beiden *E. coli* Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3) zu bestimmen, wurden zunächst Zellen beider *E. coli* Stämme mit dem Expressionsplasmid pRhotHi-2-*bop* und dem korrespondierenden Leervektor (pRhotHi-2) als Kontrollvektor transformiert und auf LB-Festmedium unter Selektionsdruck vermehrt. Von diesem LB-Festmedium wurden geeignete Kolonien geerntet und verwendet, um Vorkulturen in 5 ml LB-Flüssigmedium anzupflanzen. Nach Wachstum über Nacht (37 °C, 120 UpM) wurden diese Vorkulturen eingesetzt, um Testkulturen in Autoinduktionsmedium mit einer Zellzahl, die einer optischen Dichte von 0,05 bei 580 nm

entsprach, anzupflanzen. Das Kulturvolumen betrug dabei 10 ml. Durch Verwendung von Autoinduktionsmedium war gewährleistet, dass jede Anzucht stets unter gleichen Bedingungen ablief und die Induktion der Bacterioopsinexpression immer bei gleicher Zellzahl geschah. Die weitere Anzucht erfolgte über Nacht bei 37 °C und Agitation (120 UpM). Anschließend wurde aus 1,5 ml der verwendeten *E. coli* Stämme die Gesamt-DNA quantitativ isoliert. Mit geeigneten Oligonukleotidstartermolekülen und 150 ng dieser isolierten Gesamt-DNA wurde dann in einer quantitativen *real-time*-PCR unter Verwendung eines definierten DNA-Massenstandarts die absolute Masse der gebildeten PCR-Produkte bestimmt. Bei dem verwendeten Massenstandard handelte es sich um gereinigte Plasmid-DNA (pRhotHi-2), die zuvor photometrisch quantifiziert wurde. Der gesamte Versuch wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Das Ergebnis der quantitativen *real-time*-PCR ist in Abbildung 7 dargestellt.

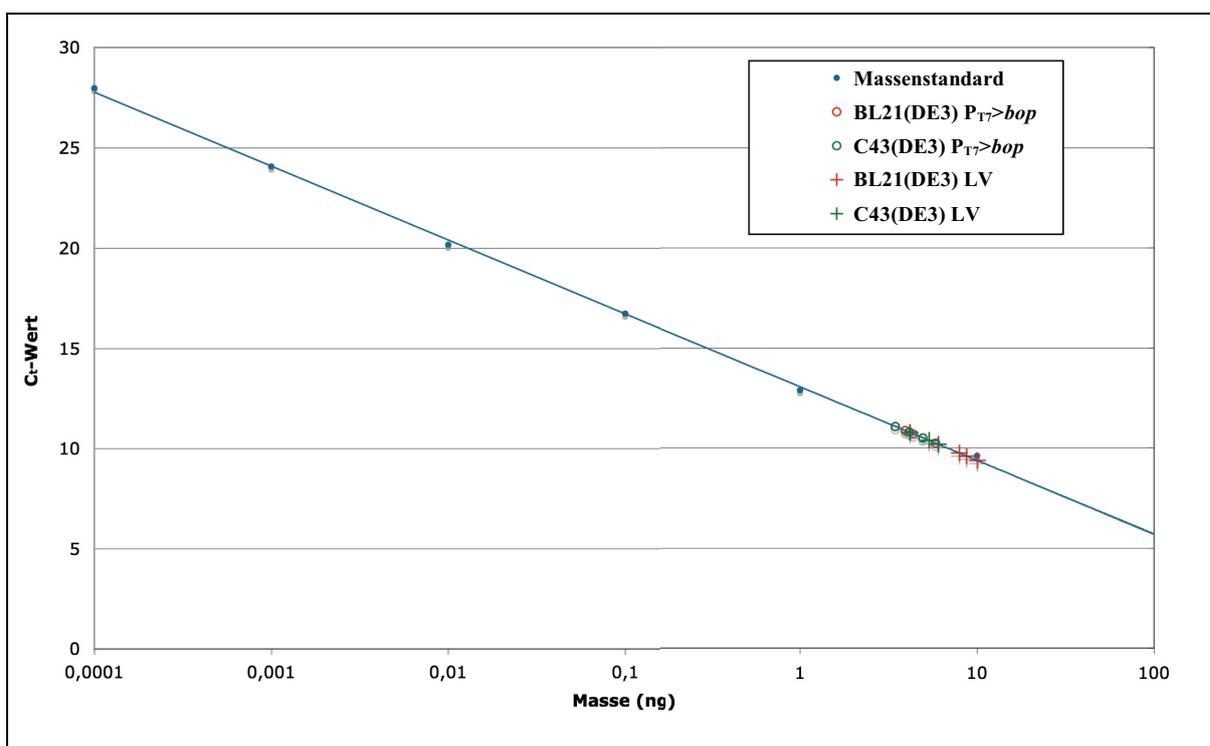


Abbildung 7: Graphische Darstellung der *real-time*-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Plasmidkopienzahl des P₁₇-abhängigen Bacterioopsin-Expressionsvektors pRhotHi-2-*bop* pro Zelle in den Expressionswirten *E. coli* BL21(DE3) und C43(DE3). Dargestellt ist der C_T-Wert des erzeugten PCR-Produkts in Abhängigkeit der Masse der synthetisierten PCR-Produkts. Dieser C_T-Wert bezeichnet den Schwellenwert-PCR-Zyklus (*threshold cycle*), bei dem im Verlauf der *real-time*-PCR die Fluoreszenzemission des verwendeten SYBR-Green-Farbstoffs das Hintergrundrauschen überschreitet. Wird in der *real-time*-PCR ein Massenstandard verwendet, kann mit dessen Hilfe die Kopienzahl des eingesetzten Vektors pro Zelle berechnet werden. Weitere Informationen befinden sich im Text. Das Bestimmtheitsmaß des dargestellten Massenstandards betrug $R^2 = 0,9992$. BL21(DE3) P₁₇>*bop*: *E. coli* BL21(DE3) pRhotHi-2-*bop*; C43(DE3) P₁₇>*bop*: *E. coli* C43(DE3) pRhotHi-2-*bop*; BL21(DE3) LV: *E. coli* BL21(DE3) pRhotHi-2; C43(DE3) LV: *E. coli* C43(DE3) pRhotHi-2.

Mit Hilfe der aus der quantitativen *real-time*-PCR erhaltenen Massedaten wurde anschließend die Plasmidkopienzahl des P_{T7} -abhängigen Expressionsvektors pRhotHi-2-*bop* in den verwendeten *E. coli* Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3) berechnet (Tabelle 11).

Tabelle 11: Plasmidkopienzahl der P_{T7} -abhängigen Vektoren pRhotHi-2 und pRhotHi-2-*bop* in den *E. coli* Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3). Die Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen inklusive Standardabweichung.

Bakterienstamm	pRhotHi-2 (Leervektor)	pRhotHi-2- <i>bop</i>
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	5,3 ± 0,6	2,5 ± 0,5
<i>E. coli</i> C43(DE3)	2,5 ± 0,5	2,4 ± 0,4

Die in Tabelle 11 dargestellten Ergebnisse zur Berechnung der Plasmidkopienzahl des P_{T7} -abhängigen Bacterioopsin-Expressionsvektors zeigen, dass sich dieser sowohl in *E. coli* BL21(DE3) als auch in *E. coli* C43(DE3) wie ein *low-copy*-Vektor verhält. Mit $2,5 \pm 0,5$ Kopien pro Zelle replizierte das Plasmid pRhotHi-2-*bop* dabei in *E. coli* BL21(DE3) praktisch gleich stark wie in *E. coli* C43(DE3) mit $2,4 \pm 0,4$ Kopien pro Zelle. Vergleicht man hingegen die Plasmidkopienzahlen des Bacterioopsin-Expressionsvektors mit den Kopienzahlen des korrespondierenden Leervektors (pRhotHi-2) in den betreffenden *E. coli* Stämmen, so fällt auf, dass die Expression von Bacterioopsin in *E. coli* BL21(DE3) offensichtlich einen Einfluss auf die Plasmidkopienzahl pro Zelle hat. So war die Kopienzahl des Leervektors in diesem Stamm mit $5,3 \pm 0,6$ pro Zelle doppelt so hoch, wie im korrespondierenden *E. coli* Stamm BL21(DE3) pRhotHi-2-*bop*. Dieses Ergebnis deutet auf eine Stressantwort der Wirtszelle hin, die durch das exprimierte Zielgen verursacht wurde. Durch Abbau des Expressionsplasmids versuchten die betroffenen Wirtszellen, diesem zellulären Stress entgegenzuwirken. Im Gegensatz dazu war die Kopienzahl des Leervektors im *E. coli* Stamm C43(DE3) mit $2,5 \pm 0,5$ pro Zelle vergleichbar mit den Werten für das korrespondierende Bacterioopsin-Expressionsplasmid ($2,4 \pm 0,4$ Plasmide pro Zelle). Somit scheint die Expression des Bacterioopsingens keinen zellulären Stress auf den *E. coli* Stamm C43(DE3) auszuüben. Das Ergebnis bestätigt damit die bereits beschriebenen Befunde, dass sich dieser Stamm für die Synthese verschiedener Membranproteine besonders eignen kann (Miroux & Walker, 1996).

Als Konsequenz der geringen Plasmidkopienzahl des Bacterioopsin-Expressionsvektors pRhotHi-2-*bop* in den untersuchten *E. coli* Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3) war damit zu rechnen, dass auch die *bop*-Transkriptmenge gering ausfällt.

1.2.2 Bestimmung der Bacterioopsintranskriptmasse in den *E. coli* Expressionsstämmen BL21(DE3) pRhotHi-2-*bop* und C43(DE3) pRhotHi-2-*bop*

Um die Bacterioopsin-Transkriptmenge in *E. coli* zu bestimmen, wurden zunächst *E. coli* BL21(DE3)- sowie C43(DE3)-Kulturen, deren Zellen das Expressionsplasmid pRhotHi-2-*bop* trugen, wie bereits beschrieben, in 10 ml Autoinduktionsmedium über Nacht bei 37 °C unter Agitation (120 UpM) angezogen. Als Kontrollen wurden entsprechende Kulturen verwendet, deren Zellen den Leervektor trugen (pRhotHi-2). Anschließend wurde aus jeweils 1,5 ml der verwendeten Kulturen die Gesamt-RNA quantitativ isoliert. Aus 150 ng dieser Gesamt-RNA wurde das Bacterioopsintranskript mit Hilfe geeigneter Oligonukleotidstarmoleküle und reverser Transkriptase in cDNA transkribiert. Diese cDNA wurde anschließend als Matrize in einer quantitativen *real-time*-PCR verwendet, und so die Masse des ursprünglichen Bacterioopsintranskripts bestimmt. Als Massenstandard für die quantitative *real-time*-PCR diente dabei gereinigte Plasmid-DNA des korrespondierenden Leervektors pRhotHi-2, dessen Masse zuvor photometrisch bestimmt wurde. Die gesamte Versuchsdurchführung erfolgte als Dreifachbestimmung. Nach Abschluss der *real-time*-PCR wurden die gebildeten PCR-Produkte gelelektrophoretisch untersucht. Dazu wurde jeweils 1 µl PCR-Produkt in einem 3%-igen Agarosegel aufgetrennt und die darin enthaltene DNA mit Hilfe von Ethidiumbromid und UV-Licht visualisiert. Neben dem PCR-Produkt des Bacterioopsintranskripts wurden außerdem die PCR-Produkte folgender Kontrollen analysiert:

Um die gleich bleibende Qualität der isolierten Gesamt-RNA zu überprüfen, wurde ein interner Standard generiert. Hierzu wurde in jeder untersuchten Probe das Transkript des konstitutiv abgelesenen *aphII*-Gens mit spezifischen *Primern* nachgewiesen (Transkriptionskontrolle). Sein Genprodukt verlieh den Zellen die plasmidkodierte Kanamycinresistenz, auf die selektiert wurde. Um ferner sicherzustellen, dass das *real-time*-PCR-Produkt des Bacterioopsins tatsächlich auf spezifisches Transkript zurückzuführen war, wurde außerdem in einem weiteren *real-time*-PCR-Ansatz überprüft, ob die verwendeten *Primer* spezifisch gebunden haben oder ob ein falsch-positives Signal durch Kreuzreaktion erzeugt wurde (Negativkontrolle 1). Dazu wurden dem Transkript der Kontrollkulturen, die den Leervektor pRhotHi-2 trugen, während der reversen Transkription und *real-time*-PCR die

gezeigt, dass im Rahmen dieses Transkriptnachweises keine falsch positiven Signale durch Kreuzreaktionen der verwendeten *Primer* generiert wurden (Negativkontrolle 1). Außerdem wurde eine DNA-Kontamination der Proben ausgeschlossen (Negativkontrolle 2). Somit handelte es sich beim nachgewiesenen *bop*-Transkript tatsächlich um Bacterioopsin und nicht um ein Artefakt.

Anhand der in Abbildung 9 dargestellten Standardgerade konnte aus den Daten der quantitativen *real-time*-PCR die absolute Masse der ursprünglich eingesetzten Bacterioopsintranskripte errechnet werden. Diese Transkriptmassen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

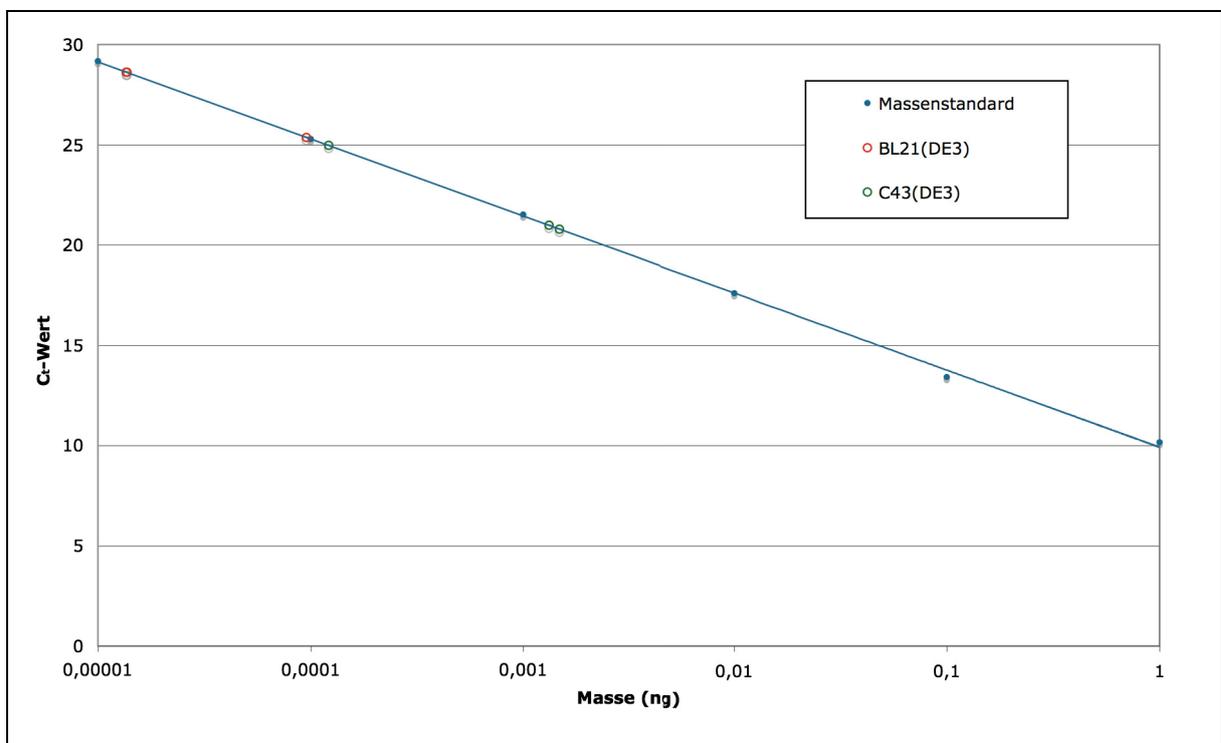


Abbildung 9: Graphische Darstellung der *real-time*-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Bacterioopsintranskriptmenge in den Expressionswirten *E. coli* BL21(DE3) und C43(DE3) mit dem P_{T7} -abhängigen Expressionsplasmid pRhotHi-2-*bop*. Dargestellt sind die C_t -Werte der erzeugten PCR-Produkte in Abhängigkeit ihrer Masse. Der C_t -Wert bezeichnet den Schwellenwert-PCR-Zyklus (*threshold cycle*), bei dem im Verlauf der *real-time*-PCR die Fluoreszenzemission des verwendeten SYBR-Green-Farbstoffs das Hintergrundrauschen überschreitet. Wird in der *real-time*-PCR ein Massenstandard verwendet, kann mit dessen Hilfe die Masse des ursprünglichen Bacterioopsintranskripts berechnet werden. Weitere Informationen befinden sich im Text. Das Bestimmtheitsmaß des dargestellten Massenstandards betrug $R^2 = 0,9993$. Die Masse des eingesetzten Gesamttranskripts betrug 150 ng. BL21(DE3): *E. coli* BL21(DE3) pRhotHi-2-*bop*; C43(DE3): *E. coli* C43(DE3) pRhotHi-2-*bop*.

Tabelle 12: Masse an Bacterioopsintranskript in den Expressionsstämmen *E. coli* BL21(DE3) pRhotHi-2-*bop* und C43(DE3) pRhotHi-2-*bop*. Die angegebenen Massen repräsentieren jeweils den Mittelwert aus drei unabhängigen Berechnungen inklusive Standardabweichung.

Bakterienstamm	Masse <i>bop</i> -Transkript (ng / 150 ng Gesamt-RNA)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pRhotHi2- <i>bop</i>	$4,10 \cdot 10^{-5} \pm 4,74 \cdot 10^{-5}$
<i>E. coli</i> C43(DE3) pRhotHi-2- <i>bop</i>	$9,75 \cdot 10^{-4} \pm 7,44 \cdot 10^{-4}$

Wie aus dem Vergleich der Transkriptmassen in Tabelle 12 hervorgeht, wurde sehr wenig Bacterioopsin in den untersuchten *E. coli* Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3) transkribiert. Mit $9,75 \cdot 10^{-4} \text{ ng} \pm 7,44 \cdot 10^{-4} \text{ ng}$ pro 150 ng Gesamt-RNA wurde aber dennoch im *E. coli* Stamm C43(DE3) fast 25-mal soviel Bacterioopsin transkribiert, wie im Stamm BL21(DE3) mit $4,10 \cdot 10^{-5} \text{ ng} \pm 4,74 \cdot 10^{-5} \text{ ng}$ pro 150 ng Gesamt-RNA. Bei gleichen Plasmidkopienzahl pro Zelle des P_{T7}-abhängigen Expressionsvektors pRhotHi-2-*bop* in beiden Stämmen, scheint *E. coli* C43(DE3) damit tatsächlich deutlich besser für die Transkription von Bacterioopsin zu sein, als *E. coli* BL21(DE3).

1.2.3 Lokalisation von Bacterioopsin in den *E. coli* Stämmen BL21(DE3) pRhotHi-2-*bop* und C43(DE3) pRhotHi-2-*bop*

Für die Synthese von Bacterioopsin ist jedoch nicht alleine eine erfolgreiche Transkription erforderlich. Nach der Transkription muss das entsprechende Transkript auch translatiert und akkumuliert werden.

Um diese Akkumulation im verwendeten *E. coli* Stamm BL21(DE3) pRhotHi-2-*bop* untersuchen zu können, wurde dieser, wie bereits beschrieben, über Nacht in 10 ml Autoinduktionsmedium bei 37 °C und Agitation (120 UpM), kultiviert. Anschließend wurden zellfreie Proteinextrakte aus 1,5 ml des Expressionsstamms fraktioniert. Wegen der geringen Transkriptmasse wurde die Bacterioopsinakkumulation jedoch nicht gelelektrophoretisch mittels SDS-PAGE-Analyse untersucht, sondern direkt unter Verwendung eines spezifischen Antiserums (Anti-His₆-Antikörper) mittels Westernblotanalyse. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 10 dargestellt.

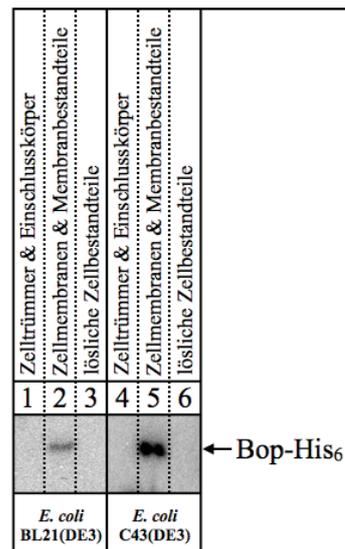


Abbildung 10: Akkumulation von Bakterioopsin in *E. coli* BL21(DE3) pRhotHi-2-*bop* und C43(DE3) pRhotHi-2-*bop*. Unter Verwendung gleicher Zellextraktmengen ist die Akkumulation von Bakterioopsin (als Fusionsprotein mit einem Hexahistidinpeptid am C-Terminus; Bop-His₆) in den *E. coli* Stämmen BL21(DE3) pRhotHi-2-*bop* und C43(DE3) pRhotHi-2-*bop* dargestellt. Der immunologische Nachweis des Bakterioopsins in fraktionierten, zellfreien Proteinextrakten erfolgte unter Verwendung eines spezifischen Antiserais. Die Akkumulation von Bakterioopsin ist sowohl in den Zellmembranen des *E. coli* Stamms BL21(DE3) (Spur 2) als auch C43(DE3) (Spur 5) deutlich sichtbar. Für diesen Nachweis wurde jeweils eine Zellzahl verwendet, die einer optischen Dichte von 1,0 bei 580 nm entsprach.

Das in Abbildung 10 dargestellte Ergebnis dieser immunologischen Untersuchung verdeutlicht, dass Bakterioopsin in *E. coli* BL21(DE3) in signifikanten Mengen akkumulierte, und zwar ausschließlich in seiner Zellmembran bzw. Membranbestandteilen (Abbildung 10, Spur 2).

Dieses Ergebnis stimmt mit den bereits in der Literatur veröffentlichten Aussagen überein, dass Bakterioopsin im *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) synthetisiert wird und ausschließlich in der Membran akkumuliert (Hohenfeld *et al.*, 1999). Somit steht nun, neben dem von Hohenfeld verwendeten pET27b-basierten *E. coli* Expressionsvektor pET27bmod mit dem P_{T7}-abhängigen Expressionsvektor pRhotHi-2-*bop* ein weiteres Plasmid für die Synthese von Bakterioopsin und dessen Akkumulation in die Cytoplasmamembran des *E. coli* Stamms BL21(DE3) zur Verfügung.

Um ferner zu überprüfen, ob die größere Membranoberfläche und somit die potentiell größere Aufnahmekapazität für Membranproteine zur vermehrten Akkumulation von Bakterioopsin führte, wurde die Bop-Akkumulation in *E. coli* C43(DE3) mit dem Expressionsplasmid pRhotHi2-*bop* ebenfalls immunologisch analysiert. Dazu wurden – wie bereits beschrieben – zellfreie Proteinextrakte des betreffenden Expressionsstamms fraktioniert. So konnte gezeigt werden, dass Bakterioopsin auch im *E. coli* Stamm C43(DE3) in signifikanten Mengen ausschließlich in der Membran akkumuliert (Abbildung 10, Spur 5). Im Vergleich zur Akkumulation in *E. coli* BL21(DE3) war jedoch eine enorme Steigerung der Ausbeute

erkennbar, die offensichtlich mit der gesteigerten Transkriptmasse in *E. coli* C43(DE3) pRhotHi-2-*bop* korrelierte.

Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Synthese von Bacterioopsin auch in dem *E. coli* Stamm C43(DE3) pRhotHi-2-*bop* möglich ist. Darin erfolgt die Akkumulation von Bacterioopsin, wie in *E. coli* BL21(DE3) pRhotHi-2-*bop*, ausschließlich in der Membran des heterologen Wirts. Im Gegensatz zu *E. coli* BL21(DE3) pRhotHi-2-*bop* akkumuliert jedoch deutlich mehr Bacterioopsin in dessen Tochterstamm C43(DE3) pRhotHi-2-*bop*.

Bezüglich der Fragestellungen konnte mit den beschriebenen Versuchen gezeigt werden, dass sich das neue P_{T7}-abhängige Expressionsplasmid pRhotHi-2 in den *E. coli* Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3) wie ein *low-copy*-Plasmid verhielt. Dies galt auch für das P_{T7}-abhängige Expressionsplasmid pRhotHi-2-*bop*, das eingesetzt wurde, um in den genannten Stämmen Bacterioopsin zu exprimieren. Mit Hilfe von quantitativer *real-time*-PCR wurde die Bacterioopsin-Transkriptmenge in *E. coli* BL21(DE3) und C43(DE3) errechnet. Dadurch wurde gezeigt, dass in *E. coli* C43(DE3), trotz gleicher Plasmidkopienzahl pro Zelle, mehr als die 25-fache Masse an Bacterioopsintranskript vorhanden war. Mit Hilfe immunologischer Methoden wurde ferner gezeigt, dass Bacterioopsin bei Verwendung des Vektors pRhotHi-2-*bop* ausschließlich in der Zellmembran der *E. coli* BL21(DE3) Wirtszellen akkumuliert. Diese Akkumulation konnte erstmals auch in den Membranen des *E. coli* Stamms C43(DE3) nachgewiesen werden. Dabei wurde gezeigt, dass die Bacterioopsinakkumulation in *E. coli* C43(DE3) pRhotHi-2-*bop* deutlich stärker war als in *E. coli* BL21(DE3) pRhotHi-2-*bop* und mit der erhöhten Bacterioopsintranskriptmasse in *E. coli* C43(DE3) pRhotHi-2-*bop* korrelierte.

Somit stehen nun zwei *E. coli* Expressionssysteme zur Akkumulation von Bacterioopsin in der Zellmembran zur Verfügung. Außerdem wurden so mit den beiden *E. coli* Expressionssystemen zwei Referenzsysteme geschaffen, mit denen die Akkumulation von Bacterioopsin in *R. capsulatus* verglichen werden kann.

1.3 Untersuchungen zur Expression von Bacterioopsin in *R. capsulatus*

R. capsulatus eignet sich potentiell besonders für die Synthese von Membranproteinen, da es sich um einen Organismus handelt, der bei phototrophen Wachstum ein intracytoplasmatisches Membransystem (ICM) ausbildet, welches die Enzymkomplexe des Photosystems aufnimmt. Theoretisch könnte heterologes Membranprotein so in Konkurrenz zu diesen Enzymkomplexen in das ICM eingebaut werden. Deshalb sollte nun untersucht werden, in wie weit der neue *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7 im Vergleich zu den etablierten *E. coli* BL21(DE3) und C43(DE3) Expressionsstämmen in der Lage war, Bacterioopsin zu akkumulieren. Da der *R. capsulatus* Stamm B10S-T7 das T7-RNA-Polymerasegen unter der Kontrolle des induzierbaren Fruktosepromotors trägt, ermöglichte er somit die Verwendung des P_{T7}-abhängigen Expressionsvektors pRhotHi-2-*bop* zur Synthese von Bacterioopsin.

Um aussagekräftige Antworten auf die Fragestellung zu erhalten, sollte wie in *E. coli* für die Charakterisierung des *R. capsulatus* Expressionsystems zunächst die Plasmidkopienzahl des Bacterioopsin-Expressionsvektors pRhotHi-2-*bop* im *R. capsulatus* Stamm B10S-T7 untersucht werden. Außerdem sollten sowohl die Transkriptionseffizienz und Transkriptaussbeute, als auch die Proteinakkumulation im Vergleich zu den bereits untersuchten *E. coli* Systemen analysiert werden. Weiter sollte untersucht werden, ob Bacterioopsin in *R. capsulatus* B10S-T7 in der Cytoplasmamembran oder in das ICM inseriert und ob es möglich ist, einen photometrischen Test zu entwickeln, der die Detektion des Genprodukt einbaus in das ICM ermöglicht.

1.3.1 Bestimmung der Plasmidkopienzahl des P_{T7}-abhängigen Expressionsplasmids pRhotHi-2-*bop* im neuen *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7

Um zunächst die Plasmidkopienzahl des Bacterioopsin-Expressionsvektors pRhotHi-2-*bop* im *R. capsulatus* Stamm B10S-T7 untersuchen zu können, wurde das P_{T7}-abhängige Plasmid durch konjugativen Transfer in den Expressionswirt eingebracht. Dieser wurde auf PY-Festmedium unter Selektionsdruck vermehrt. Anschließend wurden geeignete Kolonien geerntet und verwendet, um Vorkulturen in 10 ml RCV-Flüssigmedium anzupfen. Nach dreitägigem photoheterotrophen Wachstum wurden diese Vorkulturen eingesetzt, um Testkulturen mit einer Zellzahl, die einer optischen Dichte von 0,02 bei 660 nm entsprach, in RCV-Flüssigmedium anzupfen. Das Kulturvolumen betrug 1000 ml. Die Anzucht erfolgte

photoheterotroph für 24 Stunden. Zur Induktion der *bop*-Expression wurde dem RCV-Medium der Testkulturen Fruktose in einer Endkonzentration von 8 mM zugesetzt. Diese Fruktosekonzentration ist ausreichend für die vollständige Expression des T7-RNA-Polymerasegens (Katzke *et al.*, in Vorbereitung). Als Kontrolle wurden Testkulturen verwendet, die den Leervektor pRhotHi-2 trugen. Anschließend wurde, wie bei den vorangegangenen Versuchen mit *E. coli* in einer Dreifachbestimmung, die Gesamt-DNA eines Aliquots (1,5 ml) der Expressions- und Kontrollkulturen quantitativ isoliert. Mit geeigneten Primern wurde dann erneut in einer quantitativen *real-time*-PCR unter Verwendung eines definierten DNA-Massenstandarts die Plasmidkopienzahl bestimmt. Dabei handelte es sich erneut um gereinigte Plasmid-DNA (pRhotHi-2), die photometrisch quantifiziert wurde. Das Ergebnis der quantitativen *real-time*-PCR ist in Abbildung 11 dargestellt.

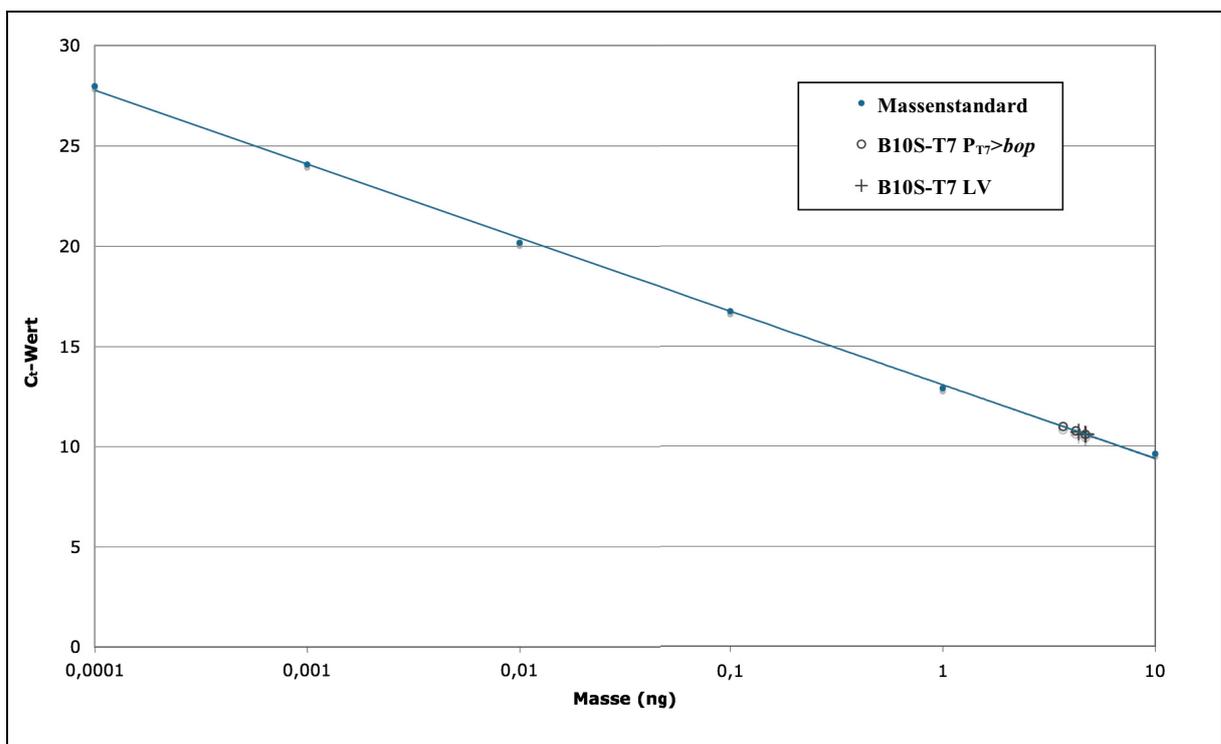


Abbildung 11: Graphische Darstellung der *real-time*-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Plasmidkopienzahl des P_{T7} -abhängigen Bacterioopsin-Expressionsvektors pRhotHi-2-*bop* pro Zelle im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7. Dargestellt ist der C_T -Wert des erzeugten PCR-Produkts in Abhängigkeit der Masse des PCR-Produkts. Dieser C_T -Wert bezeichnet den Schwellenwert-PCR-Zyklus (*threshold cycle*), bei dem im Verlauf der *real-time*-PCR die Fluoreszenzemission des verwendeten SYBR-Green-Farbstoffs das Hintergrundrauschen überschreitet. Wird in der *real-time*-PCR ein Massenstandard verwendet, kann mit dessen Hilfe die Kopienzahl des eingesetzten Vektors pro Zelle berechnet werden. Weitere Informationen befinden sich im Text. Das Bestimmtheitsmaß des dargestellten Massenstandards betrug $R^2 = 0,9992$. B10S-T7 $P_{T7}>bop$: *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*bop*; B10S-T7 LV: *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2 (Leervektor).

Mit Hilfe der aus der quantitativen *real-time*-PCR erhaltenen Massedaten wurde anschließend die Plasmidkopienzahl des P_{T7}-abhängigen Expressionsvektors pRhotHi-2-*bop* und des Leervektors pRhotHi-2 im verwendeten *R. capsulatus* Stamm B10S-T7 berechnet (Tabelle 13)

Tabelle 13: Plasmidkopienzahl der *bop*-Expressions- und Kontrollvektoren in *R. capsulatus* B10S-T7. Die dargestellten Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert aus drei unabhängigen Berechnungen inklusive Standardabweichung.

	<i>R. capsulatus</i> B10S-T7
pRhotHi-2	132,6 ± 5,5
pRhotHi-2- <i>bop</i>	48,0 ± 5,7

Die Ergebnisse aus Tabelle 13 zeigen deutlich, dass sich der T7-RNA-Polymerase-abhängige Expressionsvektor pRhotHi-2 in *R. capsulatus* B10S-T7 nicht wie ein *low-copy*-Plasmid, sondern wie ein *mid-copy*-Plasmid mit $132,6 \pm 5,5$ Kopien pro Zelle verhielt. Während der Transkription des *bop*-Gens ging die Plasmidkopienzahl des Bacterioopsin Expressionsvektors pRhotHi-2-*bop* bis auf $48,0 \pm 5,7$ pro Zelle zurück, was auch für *R. capsulatus* zeigte, dass durch die Gentranskription vermutlich zellulärer Stress erzeugt wurde, dem die Zelle durch Abbau des ursächlichen Plasmids entgegenwirkte. Dennoch war die Plasmidkopienzahl des Bacterioopsin-Expressionsplasmids im *R. capsulatus* Expressionssystem noch um den Faktor 20 größer als in den verglichenen *E. coli* Systemen BL21(DE3) pRhotHi-2-*bop* und C43(DE3) pRhotHi-2-*bop*. Somit könnte *R. capsulatus* B10S-T7 potentiell auch in der Lage sein, mehr Bacterioopsintranskript zur Translation zur Verfügung stellen, was dann möglicherweise zur gesteigerten Proteinakkumulation führt.

1.3.2 Bestimmung der Bacterioopsintranskriptmasse im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7 pRhotHi-2-*bop*

Um zu überprüfen, ob die größere Plasmidkopienzahl des P_{T7}-abhängigen Expressionsvektors pRhotHi-2-*bop* in Vergleich zu den getesteten *E. coli* Systemen auch zu einer gesteigerten Transkriptausbau führte, wurde die Masse des Bacterioopsintranskripts im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7 pRhotHi-2-*bop* bestimmt.

Dazu wurde aus entsprechenden Expressionskulturen (*R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*bop*), die wie bereits beschrieben 24 Stunden photoheterotroph in 1000 ml RCV-Medium (Induktorkonzentration: 8 mM Fruktose) angezogen wurden, die Gesamt-RNA in einer

Dreifachbestimmung quantitativ isoliert. Aus 150 ng dieser Gesamt-RNA wurde das Bacterioopsintranskript mit Hilfe geeigneter Oligonukleotidstartermoleküle und reverser Transkriptase in cDNA transkribiert. Diese cDNA wurde anschließend als Matrize in einer quantitativen *real-time*-PCR verwendet, und so die Masse des Bacterioopsintranskripts quantitativ bestimmt. Als Massenstandard für die *real-time*-PCR wurde gereinigte Plasmid-DNA des korrespondierenden Leervektors verwendet, dessen Masse zuvor photometrisch bestimmt wurde. Das Ergebnis der durchgeführten quantitativen Transkriptbestimmung ist in Abbildung 12 dargestellt.

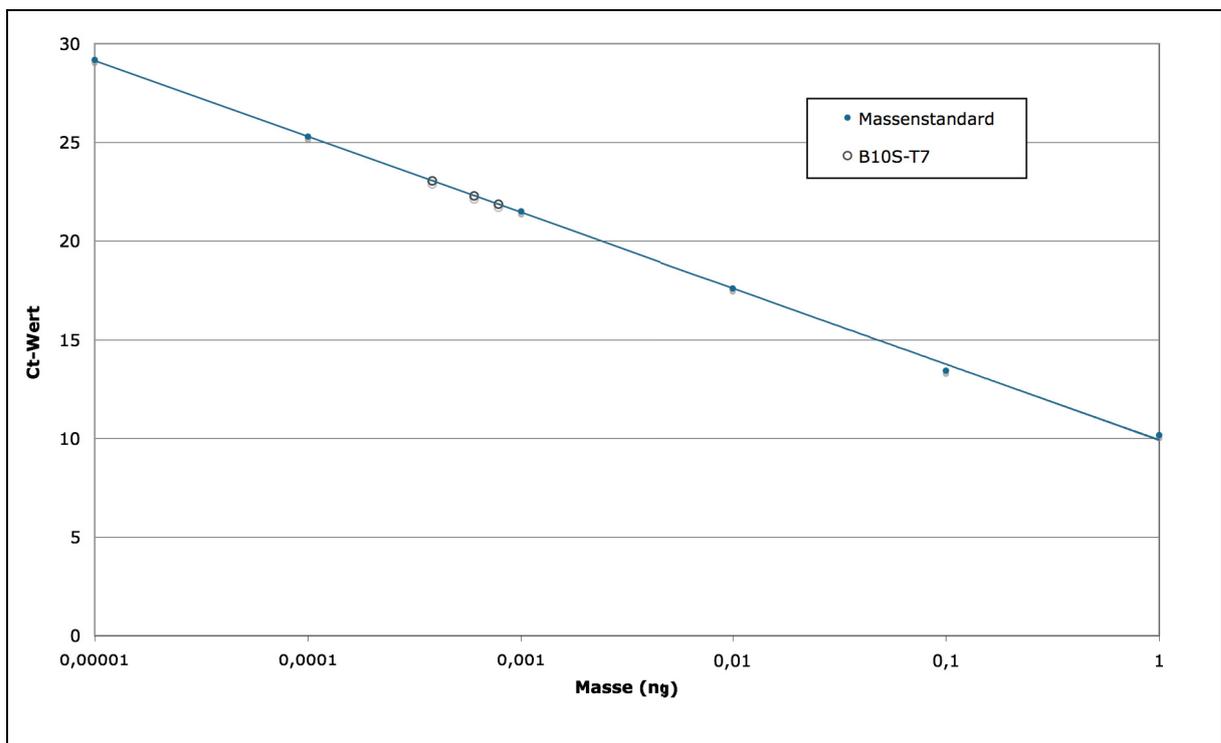


Abbildung 12: Graphische Darstellung der *real-time*-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Bacterioopsintranskriptmenge im Expressionswirt *R. capsulatus* B10S-T7. Dargestellt ist der C_t -Wert des erzeugten PCR-Produkts in Abhängigkeit seiner Masse. Dieser C_t -Wert bezeichnet den Schwellenwert-PCR-Zyklus (*threshold cycle*), bei dem im Verlauf der *real-time*-PCR die Fluoreszenzemission des verwendeten SYBR-Green-Farbstoffs das Hintergrundrauschen überschreitet. Wird in der *real-time*-PCR ein Massenstandard verwendet, kann mit dessen Hilfe die Masse des ursprünglichen Bacterioopsintranskripts berechnet werden. Weitere Informationen befinden sich im Text. Das Bestimmtheitsmaß des dargestellten Massenstandards betrug $R^2 = 0,9993$. Die Masse des eingesetzten Gesamttranskripts betrug 150 ng. B10S-T7: *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-bop.

Um die gleich bleibende Qualität der isolierten RNA auch für das *R. capsulatus* Expressionssystem zu überprüfen und um ausschließen zu können, dass es sich bei den nachgewiesenen Transkripten um Kreuzreaktionen der verwendeten *Primer* oder DNA-Kontaminationen handelte, wurden geeignete Transkriptionskontrollen und Negativkontrollen, wie sie bereits für *E. coli* beschrieben wurden, durchgeführt. Analog zu den Bacterioopsintranskripten aus *E. coli* wurde als Transkriptionskontrolle das konstitutiv

exprimierte *aphII*-Gen nachgewiesen. Zum einen diente als Negativkontrolle erneut eine Bacterioopsin-transkribierende Probe, die keiner reversen Transkription unterzogen wurde, zum anderen wurde eine Probe als Negativkontrolle verwendet, die plasmidkodiert kein Bacterioopsin trug.

Zur Veranschaulichung sind die PCR-Produkte der *real-time*-PCR gelelektrophoretisch analysiert worden (Abbildung 13).

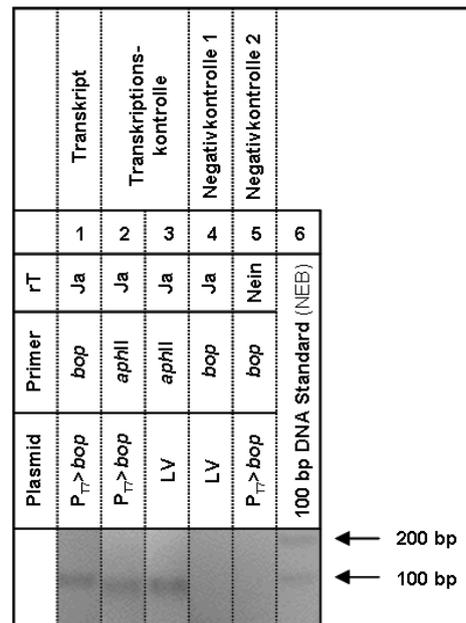


Abbildung 13: Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte der quantitativen *real-time*-PCR zur Bestimmung der *bop*-Transkriptmassen im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7. Dazu wurden jeweils 1 μ l der PCR-Produkte auf ein 3 %-iges Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe von Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert. Wie erkennbar ist, akkumuliert deutlich das PCR-Produkt des Bacterioopsintranskripts in Spur 1. Ebenso akkumulierte das PCR-Produkt des *aphII*-Transkripts (Spuren 2 & 3). Keine PCR-Produkte wurden sichtbar in den Spuren 4 & 5 was damit die Kontamination durch DNA ausschließt sowie die Bildung unspezifischen Produkts durch Kreuzreaktion der verwendeten *Primer*. $P_{T>bop}$: pRhotHi-2-*bop*; LV: Leervektor (pRhotHi-2); rT: reverse Transkription.

Analog zu den entsprechenden Transkriptnachweisen in den *E. coli* Referenzstämmen BL21(DE3) und C43(DE3) konnte auch für den Expressionsstamm *R. capsulatus* B10S-T7 an Hand der in Abbildung 13 visualisierten PCR-Produkte der durchgeführten *real-time*-PCR bestätigt werden, dass es sich bei dem nachgewiesenen Bacterioopsintranskript tatsächlich um das Transkript des *bop*-Gen handelte. So wurden keine unspezifische Signale durch Kreuzreaktionen von *Primern* (kein PCR-Produkt in Spur 4, Negativkontrolle 1) oder DNA-Kontamination der Probe (kein PCR-Produkt in Spur 5, Negativkontrolle 2) erhalten. Auch die gleich bleibende Qualität der eingesetzten Transkripte wurde durch Verwendung des internen Standards bestätigt (deutliches PCR-Produkt sichtbar in den Spuren 2 & 3, Transkriptionskontrolle).

Mit Hilfe der in Abbildung 12 dargestellten Standardgerade konnte aus den Daten der quantitativen *real-time*-PCR so die absolute Masse der ursprünglich eingesetzten Bacterioopsintranskripte aus *R. capsulatus* B10S-T7 errechnet werden. Sie betrug $5,89 \cdot 10^{-4}$ ng $\pm 2,01 \cdot 10^{-4}$ ng pro 150 ng eingesetzter Gesamt-RNA.

Im Vergleich zu den Transkriptmassen in den untersuchten *E. coli* Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3) (Tabelle 12) wurde in *R. capsulatus* knapp 15-mal mehr Bacterioopsintranskript zur Translation zur Verfügung gestellt, als in *E. coli* BL21(DE3). Dieses Ergebnis korreliert ungefähr mit der um den Faktor 20 höheren Plasmidkopienzahl pro Zelle des P_{T7}-abhängigen Expressionsplasmids pRhotHi-2-*bop* im *R. capsulatus* Stamm B10S-T7 im Vergleich zu *E. coli* BL21(DE3). Dieses Ergebnis zeigt, dass durch Erhöhung der Plasmidkopienzahl pro Zelle durchaus die Transkriptmenge deutlich gesteigert werden kann.

Demgegenüber betrug die Masse an Bacterioopsintranskript im *R. capsulatus* Stamm B10S-T7 nur rund 60 % der *bop*-Transkriptmasse des *E. coli* Stamms C43(DE3), obwohl er in Bezug auf die Plasmidkopienzahl des Expressionsplasmids pRhotHi-2-*bop* pro Zelle vergleichbar mit *E. coli* BL21(DE3) war. Offenbar hat der Expressionsstamm *E. coli* C43(DE3) durch das von Miroux und Walker durchgeführte *Screening* tatsächlich Mechanismen ausgebildet, die es dem Stamm ermöglichen mehr Transkript heterologer Proteine bereit zu stellen, als es der Elternstamm *E. coli* BL21(DE3) vermag (Miroux & Walker, 1996). Derartige Mechanismen scheinen im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7 nicht ausgebildet zu sein.

1.3.3 Akkumulation und Lokalisation von Bacterioopsin im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7 pRhotHi-2-*bop*

Um zu überprüfen, ob *R. capsulatus* B10S-T7 unter den oben beschriebenen Anzuchtbedingungen Bacterioopsin nicht nur transkribiert, sondern auch translatiert und akkumuliert, wurde der *R. capsulatus* Expressionsstamms B10S-T7 pRhotHi-2-*bop* erneut photoheterotroph in 1000 ml RCV-Medium unter Selektionsdruck, mit 8 mM Fructose als Induktor, angezogen. Als Kontrolle wurde eine *R. capsulatus* B10S-T7-Kultur mit dem Expressionsplasmid pRhotHi-2-*bop* verwendet, der kein Induktor zugegeben wurde.

Anschließend wurden aus 1,5 ml dieser Kulturen zellfreie Proteinextrakte hergestellt und fraktioniert. Um diese in Bezug auf die Akkumulation und Lokalisation von Bacterioopsin untersuchen zu können, wurden die Extrakte aus Zellen, deren optische Dichte bei 660 nm drei betrug, mittels SDS-PAGE analysiert. Der Nachweis des *bop*-Genprodukts erfolgte dann unter Verwendung eines spezifischen Antiserums mittels Westernblotanalyse (Abbildung 14).

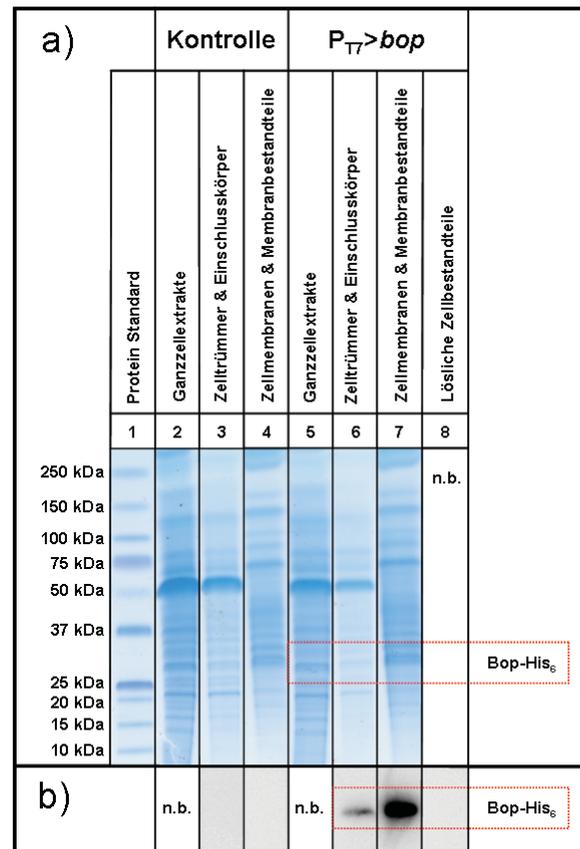


Abbildung 14: Akkumulation und Lokalisation von Bacterioopsin in *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-bop. Die Akkumulation und Lokalisation von Bacterioopsin wurde in *R. capsulatus* B10S-T7-Zellen untersucht, die das Expressionsplasmid pRhotHi-2-bop trugen und denen Fructose als Induktor in einer Endkonzentration von 8 mM zugegeben wurde (P_{T7}>bop), sowie in vergleichbaren Zellen, denen kein Induktor zugegeben wurde (Kontrolle). Dazu wurden zellfreie Proteinextrakte, deren Zellzahl einer optischen Dichte von drei bei 660 nm entsprach, fraktioniert und gelelektrophoretisch mittels SDS-PAGE (a) sowie immunologisch mit spezifischen Antikörpern (b) analysiert. Auf Grund der geringen Transkriptmengen des Bacterioopsins war im Gel der SDS-PAGE jedoch keine Akkumulation von Bacterioopsin erkennbar (a). Demgegenüber war die Akkumulation von Bacterioopsin in der Dokumentation der Westernblotanalyse eindeutig nachweisbar (b). So akkumulierte Bacterioopsin ausschließlich in den Zellen, denen Fructose als Induktor zugegeben wurde (Spuren 6 – 8). Dabei inserierte der Hauptteil des Bacterioopsins in die Zellmembranen der untersuchten Zellen (Spur 7). Ein geringer Anteil akkumulierte in der Fraktion, welche Zelltrümmer und Einschlusskörper enthielt (Spur 6). Kein Bacterioopsin war nachweisbar in löslichen Zellbestandteilen (Spur 8). n. b.: nicht bestimmt.

Das in Abbildung 14 dargestellte Ergebnis verdeutlicht, dass die Akkumulation von Bacterioopsin in *R. capsulatus* B10S-T7 mit Hilfe der SDS-PAGE nicht nachzuweisen war. Auf Grund der geringen Transkriptmassen, war dies jedoch auch nicht zu erwarten. Demgegenüber war Bacterioopsin eindeutig immunologisch mit spezifischen Antikörpern nachweisbar. Es wurde deutlich, dass Bacterioopsin nur in signifikanten Mengen akkumulierte, wenn dem Medium ein geeigneter Induktor zugegeben wurde (Fructose 8 mM Endkonzentration, Spuren 6 – 8). Kein Bacterioopsin war hingegen nachweisbar in Kulturen, denen kein Induktor zugegeben wurde (Spur 3 & 4). Außerdem akkumulierte Bacterioopsin fast ausschließlich in den Zellmembranen von *R. capsulatus* B10S-T7 (Spur 7), kaum in Zelltrümmern und Einschlusskörpern (Spur 6) und gar nicht in löslichen Zellbestandteilen

(Spur 8).

Mit Hilfe der AIDA-Software der Firma Raytest konnte diese qualitative Aussage auch quantifiziert werden. Demnach akkumulierten in *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*bop* unter induzierten Expressionsbedingungen 14,7 % des *bop*-Genprodukts in Zelltrümmern und Einschlusskörpern, 85,3 % in der Membran und 0 % in löslichen Zellbestandteilen.

Somit ist es erstmals gelungen, in dem phototrophen Bakterium *R. capsulatus* B10S-T7, durch Einbringen des Expressionsplasmids pRhotHi-2-*bop*, Bacterioopsin zu akkumulieren und in die Membran zu inserieren. Obwohl *R. capsulatus* B10S-T7 im Vergleich zu den getesteten *E. coli* Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3) nicht das gesamte Genprodukt in seine Membranen einbauen konnte, zeigt dieses Ergebnis eindeutig, dass das neue Expressionssystem, bestehend aus *R. capsulatus* B10S-T7 und dem Expressionsplasmid pRhotHi-2-*bop* dazu verwendet werden kann, Bacterioopsin heterolog zu synthetisieren und in die Membran einzubauen.

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei *R. capsulatus* jedoch um ein Bakterium, das, im Gegensatz zu den getesteten *E. coli* Systemen, in der Lage ist, phototroph zu wachsen. Es bildet unter phototrophen Wuchsbedingungen ein zusätzliches Membransystem (ICM) aus, welches dazu genutzt wird, die Enzymkomplexe des Photosyntheseapparates aufzunehmen. Dieses ICM vergrößert die Membranoberfläche enorm und ermöglicht potentiell auch den Einbau heterologen Membranproteins in Konkurrenz zu den Komplexen des Photosynthesystems. Dabei besteht das ICM zum großen Teil aus Membranvesikeln. Diese haben den enormen Vorteil gegenüber der Cytoplasmamembran, dass sie mit Hilfe einfacher Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden können. Somit stünde das synthetisierte Membranprotein unmittelbar in Vesikeln, wie in einem Nanobioreaktor, in seiner natürlichen Umgebung für weitere Untersuchungen und Anwendungen zur Verfügung.

Um zu überprüfen, ob Bacterioopsin in *R. capsulatus* B10S-T7 tatsächlich in den Vesikeln des ICM akkumulierte, wurden zunächst 1000 ml Expressionskulturen von *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*bop* unter induzierenden Wuchsbedingungen (8 mM Fruktose), wie bereits beschrieben, photoheterotroph in RCV-Medium unter Selektionsdruck angezogen. Als Kontrollkulturen wurden vergleichbare Kulturen des *R. capsulatus* Expressionsstamms B10S-T7 verwendet, die den Leervektor pRhotHi-2 trugen. Aus Zellen dieser Kulturen, die einer optischen Dichte von 500 bei 660 nm entsprachen, wurden erneut zellfreie Proteinextrakte

fraktioniert. Zur Isolierung der Vesikel des ICM wurden anschließend die gesamten Membranfraktionen mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Dazu wurde ein kontinuierlicher Saccharosegradient von 10 bis 60 Gew.-% Saccharose hergestellt und mit den zellfreien Membranbestandteilen für 17 Stunden bei $175000 \times g$ ultrazentrifugiert. Dadurch wurden die Bestandteile der Membranfraktion entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Während schwere und große Membranbestandteile bei dieser Zentrifugation sedimentieren, „schweben“ leichte Bestandteile der Membranfraktion, wie z. B. die Vesikel des ICM, im Gradienten. Da diese als Bestandteile des ICM Photosyntheseenzymkomplexe enthalten, sind sie durch die intensive Färbung ihrer Photopigmente im Gradienten leicht zu identifizieren. Zur Veranschaulichung ist ein Foto eines derartigen Saccharosedichtegradienten in Abbildung 15 dargestellt.

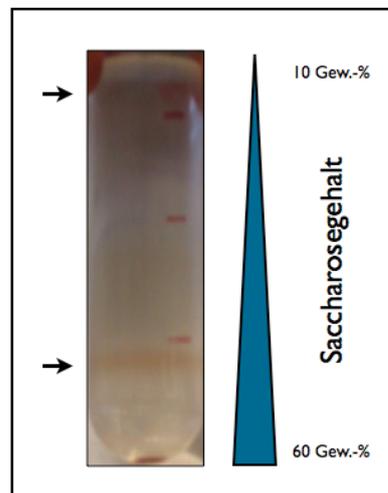


Abbildung 15: Auftrennung der Membranfraktion einer *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-bop Expressionskultur durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation. Dargestellt ist ein Saccharosedichtegradient von 10 – 60 Gew.-% Saccharose, der dazu verwendet wurde, die Vesikel des ICM der eingesetzten Membranfraktion auf Grund ihrer unterschiedlichen Dichte von größeren Membranbestandteilen durch Ultrazentrifugation zu trennen. Mit Pfeilen hervorgehoben sind zwei definierte, gefärbte Banden im Dichtegradienten. Diese Färbung entsteht durch die Pigmente der Photosystemkomplexe der ICM Vesikel.

Nach beendeter Dichtegradientenzentrifugation wurde der Saccharosegradient in Fraktionen zu je 1 ml abgenommen. In diesen Fraktionen wurde der Proteingehalt mittels Bradford-Analyse, sowie der Saccharosegehalt im Refraktometer bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 zusammengefasst.

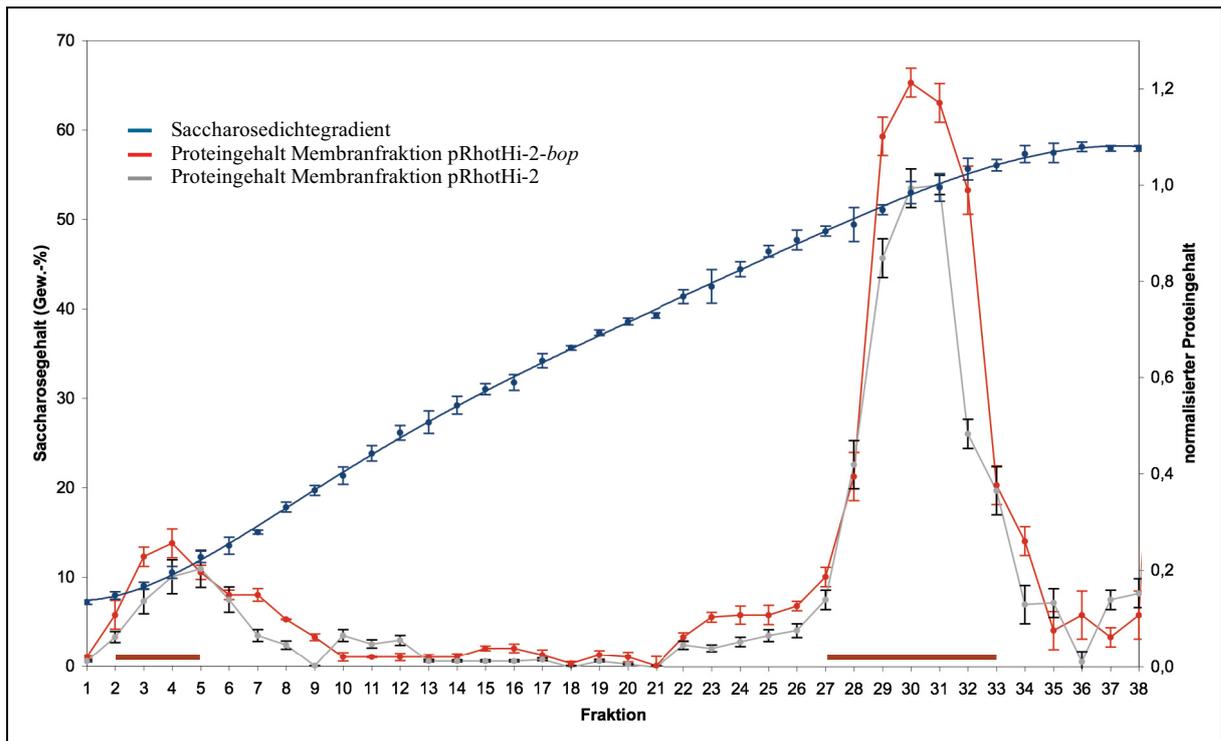


Abbildung 16: Isolierung der ICM Vesikel aus der photosynthetischen Membran von *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2 und B10S-T7 pRhotHi-2-bop. Mit Hilfe analytischer Dichtegradientenzentrifugation im kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten wurden die Vesikel des ICM der untersuchten Membranfraktionen der *R. capsulatus* Expressionskultur B10S-T7 pRhotHi-2-bop und der Kontrollkultur B10S-T7 pRhotHi-2 auf Grund ihrer Dichte von größeren Membranbestandteilen isoliert. Der Gradient wurde anschließend in Fraktionen zu je 1 ml abgetragen und der Proteingehalt in diesen Fraktionen mittels Bradford-Analyse ermittelt. Anschließend wurde der relative Proteingehalt aller Fraktionen auf den Proteingehalt der Fraktion 30 des Kontrollgradienten normalisiert und in Abhängigkeit zur Fraktionsnummer graphisch dargestellt. Dabei beschreibt die rote Kurve den normalisierten Proteingehalt im Dichtegradienten, der Bacterioopsin enthält und die graue Kurve den normalisierten Proteingehalt der verwendeten Kontrolle. Der Saccharosegehalt in den Fraktionen wurde mit Hilfe eines Refraktometers bestimmt (blaue Kurve). Die dargestellten Werte repräsentieren jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Die Fehlbalken repräsentieren die jeweilige Standardabweichung dieser Messungen. Die braunen Balken repräsentieren die Fraktionen der Dichtegradienten, die durch die Photopigmente der Photosystemkomplexe gefärbt waren.

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich wird, stellte sich im verwendeten Saccharosedichtegradienten durch die Ultrazentrifugation ein Saccharosegehalt mit einem fast linearen Konzentrationsverlauf von 7 bis 58 Gew.-% Saccharose ein. Betrachtet man den durch Bradford-Analyse ermittelten Proteingehalt der einzelnen Fraktionen des Kontrollgradienten (*R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2), erkennt man in Korrelation mit den gefärbten Banden des Gradienten aus Abbildung 15, zwei lokale Maxima bezüglich des Proteingehalts. Diese erstreckten sich über die Fraktionen mit einem Saccharosegehalt von 7,94 – 13,50 Gew.-% sowie über die Fraktionen mit einem Saccharosegehalt von 49,44 – 56,06 Gew.-%. Im Bereich zwischen diesen beiden lokalen Maxima befanden sich nach der Bradford-Analyse keine Proteine. Somit scheint es in *R. capsulatus* B10S-T7 ICM-Vesikel mit zwei scharf definierten Dichten zu geben. Ein ähnliches Ergebnis wurde bereits für *Rhodobacter sphaeroides* beschrieben. In diesem nächsten Verwandten von *R. capsulatus* akkumulieren ebenfalls Membranvesikel mit zwei unterschiedlichen Dichten. Dabei bilden

die schweren Vesikel hauptsächlich tubuläre Strukturen aus, die bis zu 1 μm lang werden können, während die leichteren Vesikel hauptsächlich runde Strukturen ausbilden und einem Durchmesser von 0,2 μm erreichen (Siebert *et al.*, 2004).

Vergleicht man nun den Proteingehalt der Fraktionen aus *R. capsulatus* B10S-T7-Zellen, die Bacterioopsin exprimierten, mit der bereits beschriebenen Kontrolle, so erkennt man einen beinahe identischen Verlauf. Auch dieser Gradient mit der Membranfraktion aus der *R. capsulatus* B10S-T7 Bacterioopsin-Expressionskultur weist zwei lokale Maxima bezüglich seines Proteingehalts auf, die sich ebenfalls über die Fraktionen mit einem Saccharosegehalt von 7,94 – 13,50 Gew.-% sowie 49,44 – 56,06 Gew.-% erstreckten. Somit existieren auch in der Bacterioopsin-Expressionskultur ICM-Vesikel mit zwei scharf definierten Dichten. Im Gegensatz zum Kontrollgradienten, ist das lokale Maximum bezüglich des Proteingehalts in den Fraktionen 28 bis 33 jedoch signifikant um bis zu 20 % erhöht, was auf die Inkorporation von Bacterioopsin in Vesikel dieser Fraktionen deutete.

Um zu Überprüfen, ob Bacterioopsin tatsächlich in den Vesikeln der Fraktionen mit erhöhtem Proteingehalt akkumulierte, wurden 0,5 ml der entsprechenden Fraktionen mit 1,5 ml SP-Puffer verdünnt und die Vesikel durch Zentrifugation sedimentiert. Aus dem Sediment wurden anschließend Proteinextrakte hergestellt, von denen 25 μl zur immunologischen Analyse mittels spezifischen Antikörpern verwendet wurden. Die Dokumentation dieses Bacterioopsinnachweises ist in Abbildung 17 dargestellt.

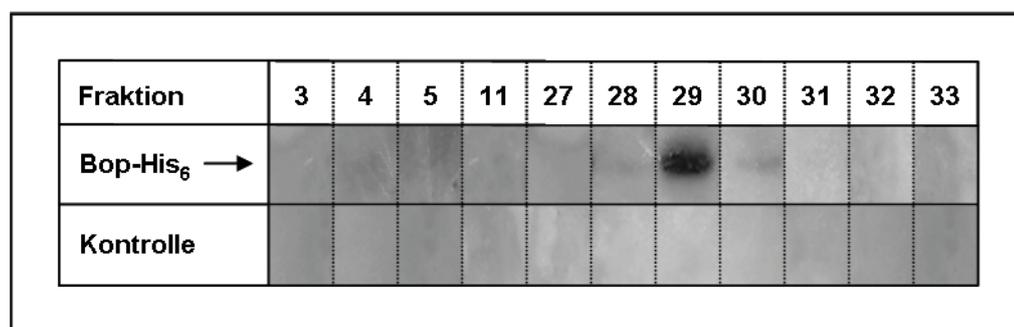


Abbildung 17: Immunologischer Nachweis von Bacterioopsin in den Vesikeln des ICM von *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-bop.

Zunächst wurden die ICM Vesikel einer *R. capsulatus* B10S-T7 Bacterioopsin-Expressionskultur mit P₁₇-abhängigem Expressionsvektor pRhotHi-2-bop durch analytische Saccharosedichtegradientenzentrifugation isoliert. Danach wurde Bacterioopsin in den Proteinenthaltenden Fraktionen (nach Bradford-Analyse) des Dichtegradienten mit Hilfe eines spezifischen Antiserums immunologisch nachgewiesen. Dazu wurden jeweils 0,5 ml der betreffenden Fraktionen mit 1,5 ml SP-Puffer verdünnt und die Vesikel sedimentiert. Aus dem Sediment wurden Proteinextrakte hergestellt. Anschließend wurden 25 μl dieser Proteinextrakte mit einem spezifischen Antiserum immunologisch untersucht. Es wurde festgestellt, dass Bacterioopsin fast ausschließlich in den Vesikeln in Fraktion 29 des analytischen Dichtegradienten akkumuliert. Als Kontrolle wurde eine *R. capsulatus* B10S-T7 Kultur mit Leervektor (pRhotHi-2) verwendet. Für die analytische Dichtegradientenzentrifugation wurde die Membranfraktion von Zellen mit einer Zellzahl verwendet, die einer optischen Dichte von 500 bei 660 nm entsprach.

Wie das in Abbildung 17 dargestellte Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, akkumulierte Bacterioopsin fast ausschließlich in den Vesikeln der Fraktion 29 des entsprechenden Dichtegradienten. Lediglich in den bezüglich des Saccharosegehalts benachbarten Fraktionen 28 und 30 war Bacterioopsin in sehr geringem Maße ebenfalls nachweisbar. In allen anderen Fraktionen des Saccharosedichtegradienten konnte kein Bacterioopsin nachgewiesen werden. In den entsprechenden Kontrollversuchen (*R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2) wurde erwartungsgemäß ebenfalls kein Bacterioopsin nachgewiesen.

Somit ermöglicht das neue *R. capsulatus* Expressionssystem erstmals die Expression und Akkumulation von Bacterioopsin in den Vesikeln des intracytoplasmatischen Membransystems. Diese können durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden und könnten anschließend theoretisch als Nanobioreaktoren zur weiteren Verwendung zur Verfügung stehen.

Da Bacterioopsin in *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*bop* fast ausschließlich in einer definierten Fraktion des untersuchten Saccharosedichtegradienten akkumulierte, konnte an Hand des mit Hilfe der Bradford-Analyse bestimmten Proteingehalts dieser Fraktion (Fraktion 29) in Vergleich zur entsprechenden Fraktion des Kontrollgradienten die absolute Masse an Bacterioopsin in der verwendeten Expressionskultur abgeschätzt werden. Der Proteingehalt der Bacterioopsin-enthaltenden Fraktion 29 betrug laut Bradford-Analyse $9,88 \mu\text{g} \pm 0,3 \mu\text{g}$ pro Zellzahl, die einer optischen Dichte von 1 bei 660 nm entsprach ($\text{oD}_{600} = 1$) und in der entsprechenden Fraktion der Kontrolle $7,61 \mu\text{g} \pm 0,5 \mu\text{g}$ pro $\text{oD}_{600} = 1$. Somit beträgt die Differenz $2,27 \mu\text{g}$ pro $\text{oD}_{600} = 1$. Umgerechnet auf eine durchschnittlich gewachsene photoheterotrophe *R. capsulatus* B10S-T7, die Bacterioopsin exprimiert (pRhotHi-2-*bop*), entspricht dies einer ungefähren Masse an Bacterioopsin von 2,2 mg pro Liter Kultur.

Demgegenüber erreicht das bereits zitierte *E. coli* Expressionssystem BL21(DE3) pET27bmod eine maximale Ausbeute von $84 \mu\text{g}$ Bacterioopsin pro Liter Kultur in der Cytoplasmamembran (Hohenfeld *et al.*, 1999). Somit wurde die Ausbeute im neuen *R. capsulatus* Expressionssystem B10S-T7 pRhotHi-2-*bop* grob geschätzt um den Faktor 25 verbessert. Außerdem steht das Bacterioopsin im neuen *R. capsulatus* Expressionssystem in den Vesikeln des ICM zur Verfügung. Diese können mittels analytischer Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden und wären dann mit dem inserierten Bacterioopsin theoretisch für weitere biotechnologischen Anwendungen, wie ein Nanobioreaktor, verfügbar.

1.3.4 Etablierung eines qualitativen photometrischen Tests zum Nachweis des Bacterioopsineinbaus in die Vesikel des ICM von *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-bop

Nachdem gezeigt wurde, dass Bacterioopsin in *R. capsulatus* tatsächlich in den Vesikeln des ICM akkumulierte, wurde nun im Rahmen der Ausgangsfragestellung ein einfacher photometrischer Test entwickelt, der qualitativ den Einbau von Bacterioopsin in das ICM nachweisen kann. Durch die Akkumulation von Bacterioopsin in den Vesikeln des ICM von *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-bop müssten die darin enthaltenen Photosynthesekomplexe verdrängt werden. Da diese Komplexe Carotinoide und Bacteriochlorophyll a enthalten, müsste man den Einbau des heterologen Bacterioopsins in die Vesikel des ICM durch die Abnahme des relativen Pigmentgehalts der Expressionskulturen qualitativ nachweisen können.

Um dies zu untersuchen, wurden zunächst Bacterioopsin-Expressionskulturen (1000 ml) des *R. capsulatus* Stamms B10S-T7 pRhotHi-2-bop photoheterotroph in RCV-Medium mit einer Induktorkonzentration von 8 mM Fruktose unter Selektionsdruck für 24 Stunden angezogen. Als Kontrolle wurden entsprechende Kulturen verwendet, die kein Bacterioopsin exprimierten und nur den Leervektor pRhotHi-2 trugen. Anschließend wurde aus 1,0 ml der Expressions- und Kontrollkulturen das Photopigment Bacteriochlorophyll a mit Ethanol extrahiert. Das Extrakt wurde anschließend bei 770 nm photometrisch vermessen (bei 770 nm liegt ein lokales Absorptionsmaximum von Bacteriochlorophyll a in Ethanol). Die Absorption des extrahierten Bacteriochlorophyll a, als Indikator für den Gehalt an Photosynthesekomplexen im ICM, wurde zur optischen Dichte der verwendeten Kulturen bei 660 nm sowie deren Volumen ins Verhältnis gesetzt und mit dem relativen Bacteriochlorophyll a Gehalt in den entsprechenden Kontrollkulturen verglichen.

Wie aus Abbildung 18 hervorgeht, unterschied sich der relative Bacteriochlorophyll a Gehalt in den Bacterioopsin-Expressionskulturen sowie den Kontrollkulturen in der stationären Wachstumsphase signifikant. So ging der relative Bacteriochlorophyll a Gehalt in den Expressionskulturen um 17 % zurück, was auf die Verdrängung von Photosyntheseenzymkomplexen durch das heterologe Protein Bacterioopsin zurückzuführen ist.

Somit wurde ein einfacher, qualitativer, photometrischer Test entwickelt, um den Einbau von heterolog exprimiertem Membranprotein in *R. capsulatus* B10S-T7 nachweisen zu können.

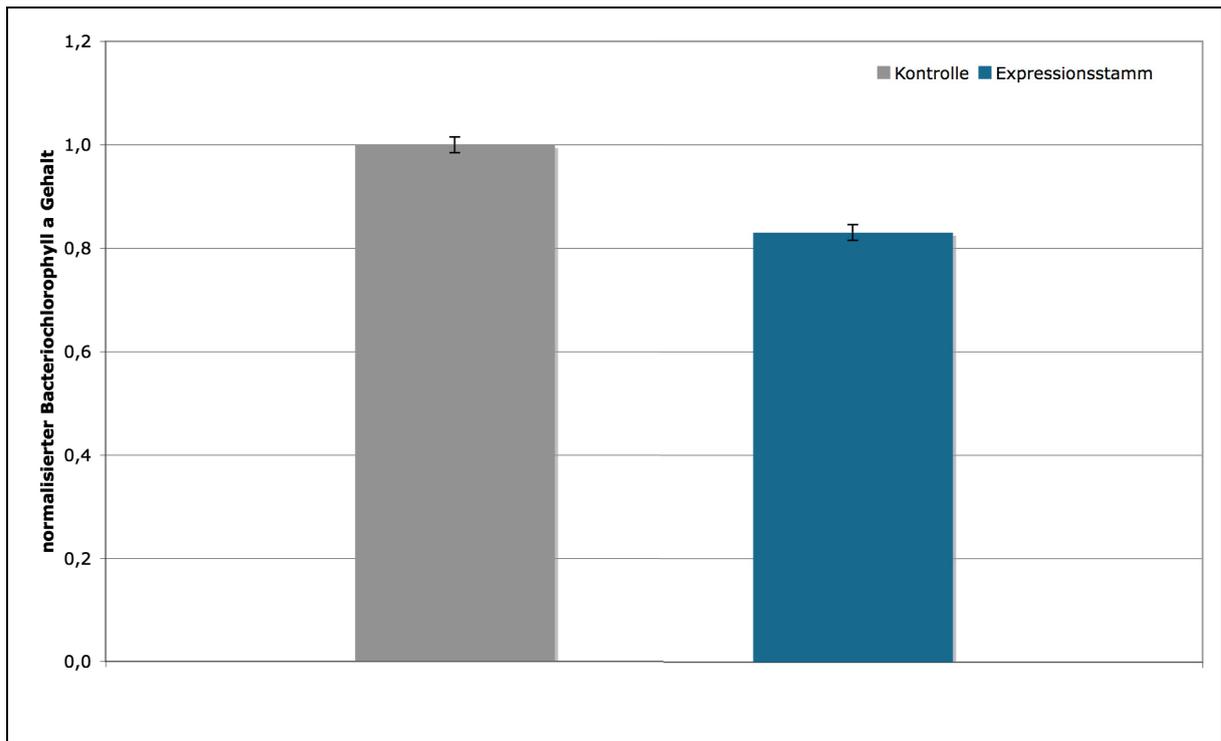


Abbildung 18: Photometrischer Test zum Nachweis des Bacterioopsineinbaus in die ICM Vesikel des Expressionsstamms *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-bop. Zum Nachweis, dass Bacterioopsin in die Vesikel des ICM der Zellen der verwendeten Expressionskultur eingebaut wurde, wurde das Photopigment Bacteriochlorophyll a mit Ethanol extrahiert und der Bacteriochlorophyll a Gehalt des Extrakts bei 770 nm photometrisch bestimmt. Er ist ein Maß für die Menge an photosynthetischen Enzymkomplexen in der ICM, da Bacteriochlorophyll a darin als Photopigment enthalten ist. Als Kontrolle wurde eine *R. capsulatus* B10S-T7 Kultur verwendet, in der kein heterologes Membranprotein synthetisiert wurde. Die Zellen dieser Kultur enthielten den Leervektor pRhotHi-2. Der Bacteriochlorophyll a Gehalt beider Kulturen wurden bezogen auf eine Zellzahl, die einer optischen Dichte von 1 bei 660 nm entsprach sowie auf ein Volumen von 1 ml. Außerdem wurde der Bacteriochlorophyll a Gehalt auf den Wert der Kontrollprobe normalisiert. Die gesamte Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die angegebenen Werte repräsentieren daher den Mittelwert dieser Messungen. Die Fehlerbalken geben die entsprechende Standardabweichung wieder. Kontrolle: *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2; Expressionsstamm: *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-bop.

Mit Blick auf die vorangestellten Fragestellungen wurde nachgewiesen, dass sich der neue P_{T7} -abhängige Expressionsvektor pRhotHi-2 im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7 wie ein *mid-copy*-Vektor verhielt. Auch der zur Synthese von Bacterioopsin verwendete Vektor pRhotHi-2-*bop* verhielt sich wie ein *mid-copy*-Plasmid und erreichte eine fast 20-fach höhere Plasmidkopienzahl im Vergleich zu den analysierten entsprechenden *E. coli* Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Transkriptionseffizienz des Bacterioopsingens im *Rhodobacter*-Expressionssystem 15-mal höher war, als in *E. coli* BL21(DE3), jedoch nur ungefähr 60 % der Transkriptionseffizienz in *E. coli* C43(DE3) erreichte. Es wurde gezeigt, dass Bacterioopsin nicht wie in *E. coli* in der Cytoplasmamembran inseriert, sondern in den Vesikeln des intracytoplasmatischen Membransystems von *R. capsulatus* B10S-T7 in Konkurrenz zu den Enzymkomplexen des Photosystems. Dadurch bietet sich die bislang einmalige Möglichkeit, Bacterioopsin in den Vesikeln durch Dichtegradientenzentrifugation zu isolieren und die Vesikel als Nanobioreaktoren unmittelbar für weitere Anwendungen einzusetzen. Außerdem wurde ein photometrischer Test entwickelt, der den qualitativen Nachweis zum Einbau von heterologen Membranproteinen in das ICM erlaubt. Ein weiterer photometrischer Test für den Einbau des Chromophors Retinal in Bacterioopsin und die Bildung von Bacteriorhodopsin konnte hingegen abschließend nicht etabliert werden.

Die Ausbeute an Vesikel-inserierten Bacterioopsin im neuen *R. capsulatus* Expressionssystem, bestehend aus dem Expressionsstamm B10S-T7 und dem P_{T7} -abhängigen Expressionsplasmid pRhotHi-2-*bop*, wurde auf ca. 2,2 mg Bacterioopsin pro Liter Kultur geschätzt. Dies ist eine Steigerung um den Faktor 25 im Vergleich zu bisher publizierten Werten für *E. coli* Expressionssysteme.

1.4 Synthese weiterer Membranproteine unterschiedlicher Topologie und Herkunft in *R. capsulatus*

Nachdem nun mit dem *R. capsulatus* Stamm B10S-T7 und dem T7-RNA-Polymerase-abhängigen Expressionsvektor pRhotHi-2-*bop* ein System zur Verfügung stand, das es erlaubte, das heterologe Membranprotein Bacterioopsin in *R. capsulatus* zu synthetisieren, sollte anschließend die Akkumulation weiterer Membranproteine unterschiedlicher Topologie und Herkunft analysiert werden. So sollte untersucht werden, ob *R. capsulatus* ein geeigneter Wirt für die Synthese von heterologen Membranproteinen sein kann, deren Akkumulation bislang in keinem bekannten Expressionssystem gelang.

Ebenso sollte untersucht werden, ob die *E. coli* Expressionsstämme BL21(DE3) und C43(DE3) durch den Einsatz des P_{T7}-abhängigen Expressionsvektors pRhotHi-2 dazu verwendet werden können, weitere heterologe Membranproteine in ihren Membransystemen zu akkumulieren.

Mit diesen Expressionsstämmen sollten außerdem erneut zwei Referenzsysteme geschaffen werden, die den Vergleich von Plasmidkopienzahl, Transkriptionseffizienz und Transkriptaubeute sowie den Vergleich der Proteinlokalisierung zum neuen Expressionswirt *R. capsulatus* B10S-T7 ermöglichen.

Dazu wurden nicht nur Membranproteine prokaryotischen Ursprungs, sondern auch eukaryotische Proteine in Bezug auf ihre Akkumulation in *R. capsulatus* untersucht.

Um welche Membranproteine es sich dabei handelte, welche Funktion sie *in vivo* haben und wie ihre korrespondierenden Gene in den P_{T7}-abhängigen Expressionsvektor pRhotHi-2 kloniert wurden, soll daher in den folgenden Abschnitten kurz erläutert werden.

1.4.1 Die Arabinofuranosyltransferasen AftA und Emb aus *Corynebacterium glutamicum*

Die beiden Arabinofuranosyltransferasen AftA und Emb aus *C. glutamicum* sind am Aufbau des Arabinogalaktangerüsts der Zellwand ihres Wirtsorganismus beteiligt (Seidel *et al.*, 2007a; Seidel *et al.*, 2007b). Diese enthält ein weit verzweigtes System aus Arabinose- und Galaktoseresten. Das Arabinogalaktan ist darin über eine spezifische Rhamnose-enthaltende Verbindungseinheit mit dem Peptidogalaktan der Zellwand verbunden und stellt an der Außenseite einen Verankerungspunkt für die Mykolsäurereste der Zellwand dar (Abbildung 19a, Alderwick *et al.*, 2006).

Während der Arabinogalaktansynthese verknüpft das AftA-Protein die erste Arabinoseeinheit mit dem Galaktangerüst und wird daher als initiale Glykosyltransferase charakterisiert (Abbildung 19b, Alderwick *et al.*, 2006). Im weiteren Verlauf der Arabinogalaktansynthese verknüpft das Emb-Protein weitere Arabinoseeinheiten an das wachsende Arabinogalaktangerüst und katalysiert so die Bildung eines verzweigten Netzwerkes.

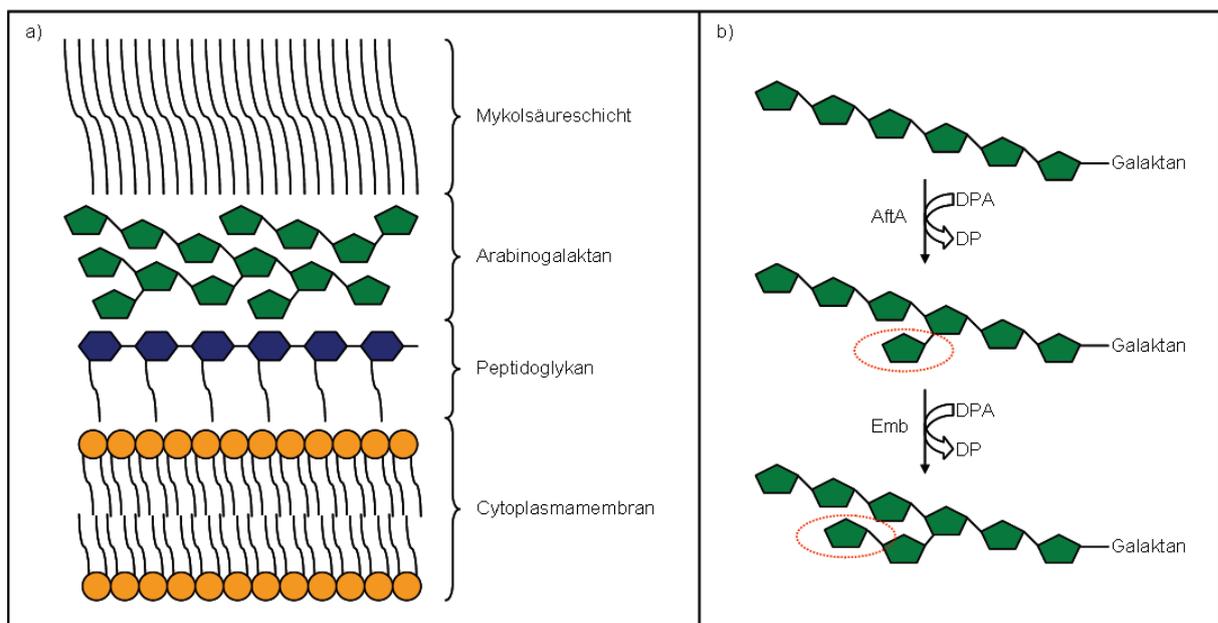


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Zellwand von *Corynebacteriaceae* und Start der Arabinansynthese am Galaktan. (a) Auf der Cytoplasmamembran befindet sich eine Peptidoglykanschicht. An diese schließt sich ein verzweigtes System aus Arabinose- und Galaktoseresten an, das so genannte Arabinogalaktan. Die terminalen Arabinosereste sind teilweise mit Mykolsäuren verestert, welche die äußere Schicht der Zellwand bilden. (b) Die Bindung der ersten Arabinose-Einheit wird von der initialen Glykosyltransferase AftA katalysiert. Die Bindung der zweiten Arabinose-Einheit erfolgt mit Hilfe der Arabinofuranosyltransferase Emb. DPA: Decaprenol-Arabinose. DP: Decaprenolrest.

Beim *emb*-Genprodukt aus *C. glutamicum* handelt es sich um ein 1154 Aminosäuren großes Membranprotein (Tabelle 14), dessen N-terminale Domäne 15 postulierte hydrophobe Helices in der Cytoplasmamembran ausbildet (Seidel *et al.*, 2007b). Die C-terminale Domäne des Proteins ist globulär im Periplasma lokalisiert. AftA hingegen besteht nur aus 685 Aminosäuren (Tabelle 14). Die N-terminale Domäne bildet dennoch vermutlich 12 bis 14 Transmembranhelices in der Cytoplasmamembran aus (Seidel *et al.*, 2007a). Wie beim Emb befindet sich die C-terminale Domäne des AftA ebenfalls im Periplasma.

Das mit Hilfe von AftA und Emb gebildete Arabinogalaktangerüst der Zellwand ist essentiell für *C. glutamicum*, wie in allen mycobakteriellen Spezies. So ist es auch in *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae* vorhanden und ein Grund für die schlechte Therapierbarkeit der durch diese Bakterien hervorgerufene Tuberkulose bzw. Lepra. Nach

Angaben der Weltgesundheitsorganisation WHO starben 2006 weltweit etwa 2 Millionen Menschen an Tuberkulose und ca. 300000 an Lepra.

Die Synthese des Arabinogalaktangerüsts in diesen Spezies ist daher ein wichtiger Angriffspunkt für pharmazeutische Wirkstoffe. Um derartige Wirkstoffe jedoch synthetisieren zu können, müssen die genauen katalytischen Funktionen und Strukturen der beteiligten Proteine geklärt werden.

Für diese Charakterisierung ist die Synthese ausreichender Mengen *aftA*- und *emb*-Genprodukte unerlässlich und sollte mit Hilfe des neuartigen *Rhodobacter*-Expressionssystems vorangetrieben werden.

Dazu wurden die respektiven Gene *aftA* und *emb* jeweils über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in das Expressionsplasmid pRhotHi-2 inkloniert (Seidel & Eggeling, unveröffentlicht). Die rekombinanten Plasmide wurden als pRhotHi-2-*aftA* bzw. pRhotHi-2-*emb* bezeichnet (Anhang).

1.4.2 Das eukaryotische Ethyleninsensitivprotein 2 (EIN2) aus *Arabidopsis thaliana*

Phytohormone spielen in Pflanzen sowohl bei der Wahrnehmung von Umweltreizen als auch bei der Steuerung von Stoffwechsel- und Entwicklungsprozessen eine entscheidende Rolle (Voet van Vormizeele, 2006). Man kennt bis heute insgesamt neun Gruppen an Phytohormonen, zu denen auch Ethylen zählt. Dabei ist die Wirkungsweise des endogenen Phytohormons Ethylen überaus vielfältig und betrifft physiologische Prozesse in allen Abschnitten des pflanzlichen Lebenszyklus.

Ethylen wird in Pflanzen von einer membranassoziierten Rezeptorproteinfamilie wahrgenommen. Vertreter dieser Familie sind inzwischen in vielen Pflanzen identifiziert worden, wobei die ersten Ethylenrezeptorproteine in *A. thaliana* gefunden wurden.

Genetischen Studien haben gezeigt, dass die Bindung von Ethylen zur Inaktivierung bestimmter Ethylenrezeptoren führt. Im weiteren Signaltransduktionsweg ist dann u. a. das Ethyleninsensitivprotein 2 (EIN2), ein Positivregulator des Ethylensignalweges, nachgeschaltet. Dabei ist EIN2 ein den Nramp-Metalltransportern ähnliches, integrales Membranprotein, dessen genaue Funktion noch ungeklärt ist (Alonso *et al.*, 1999). Strukturvorhersagen zufolge handelt es sich dabei jedoch um ein Protein, das 12 Transmembranhelices in seiner N-terminalen Domäne ausbildet und mit 1306 Aminosäuren eine ungefähre Größe von 144 kDa erreicht (Tabelle 14). Die C-terminale Domäne des Proteins ist im Cytoplasma löslich und wurde ohne N-terminale Domäne bereits charakterisiert.

Um den Ethylentransduktionsweg in Pflanzen jedoch vollständig verstehen zu können, ist es für die Grundlagenforschung von großer Bedeutung, gerade die bislang nicht vollständig charakterisierten Proteine, wie das EIN2, untersuchen zu können.

Aus diesem Grund und mit Hinblick auf die Fragestellungen dieser Arbeit sollte versucht werden, das Ethyleninsensitivprotein 2 im neuen *R. capsulatus* Expressionssystem funktionell zu synthetisieren.

Dazu sollte das EIN2-Gen aus dem rekombinanten *E. coli* Expressionsvektor pET21/28-EIN2 (Allekotte und Groth, unveröffentlicht) in den P_{T7}-abhängigen Expressionsvektor pRhotHi-2 kloniert werden. Da jedoch die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *NdeI* mehrfach im *EIN2*-Gen vorhanden ist, war eine direkte Klonierung über die Restriktionsschnittstellen für *NdeI* und *XhoI*, wie sie für die anderen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gene bereits beschrieben wurde, nicht möglich. Aus diesem Grund wurde der *E. coli* Expressionsvektor pET21/28-EIN2 zunächst mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BclI* in einer Doppelrestriktion hydrolysiert (Abbildung 20a). Das dadurch erhaltene 2131 bp große *NdeI-EIN2-BclI*-Fragment wurde anschließend in die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI*, die kompatibel zu *BclI* ist, des P_{T7}-abhängigen Expressionsplasmids pRhotHi-2 kloniert. Da das entstandene rekombinante Plasmid nun lediglich die DNA-Sequenz für die N-terminale, membrangebundene Domäne enthielt, wurde es als pRhotHi-2-*EIN2*-MB bezeichnet (MB: *membrane bound*).

In einem weiteren Schritt wurde dieses rekombinante Plasmid partiell mit der Restriktionsendonuklease *NotI* hydrolysiert. Dabei wurde lediglich die *NotI*-Restriktionsschnittstelle im C-terminalen Bereich der EIN2-Membrandomäne hydrolysiert, wodurch das Plasmid linearisiert wurde. Durch anschließende Restriktion mit der Restriktionsendonuklease *SalI* wurde aus dem bereits linearisierten Vektor ein 1471 bp großes DNA-Fragment, welches für den C-terminalen Bereich der Membrandomäne des EIN2, sowie für sechs der 12 Transmembranhelices kodierte, deletiert. Somit enthielt der linearisierte, verkürzte rekombinante Expressionsvektor pRhotHi-2-*EIN2*-MB nur noch die DNA-Sequenz für die ersten 6 Transmembranhelices der Membrandomäne des EIN2. Um diese Sequenz wieder zum Volllängen-*EIN2* zu vervollständigen, wurde der *E. coli* Expressionsvektor pET21/28-*EIN2* in einer Doppelrestriktion mit den Restriktionsendonukleasen *SalI* und *EagI* hydrolysiert und das entstandene 3205 bp große *SalI-EIN2-EagI*-Fragment in den linearisierten und verkürzten Expressionsvektor pRhotHi-2-*EIN2*-MB kloniert (Abbildung 20b). Dabei war zu beachten, dass die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *EagI* und

NotI zueinander kompatibel waren. Das neue, rekombinante Plasmid, welches nun das gesamte *EIN2*-Gen trug, wurde dementsprechend als pRhotHi2-*EIN2* bezeichnet.

Somit stand nun nicht nur das Gen für *EIN2* im *R. capsulatus* Expressionsvektor pRhotHi-2 zur Verfügung, sondern auch eine verkürzte Version (*EIN2*-MB), die nur für die N-terminale Membrandomäne des *EIN2* kodierte. Welchen Einfluss diese Verkürzung auf die Transkription des korrespondierenden Gens *EIN2*-MB hat und wie sich die Verkürzung auf die Proteinakkumulation auswirkt, sollte daher im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden. Im Gegensatz zum Volllängenprodukt des *EIN2* erreicht die Membrandomäne *EIN2*-MB mit 728 Aminosäuren lediglich eine Größe von 80 kDa und ist damit um 45 % kleiner als *EIN2*.

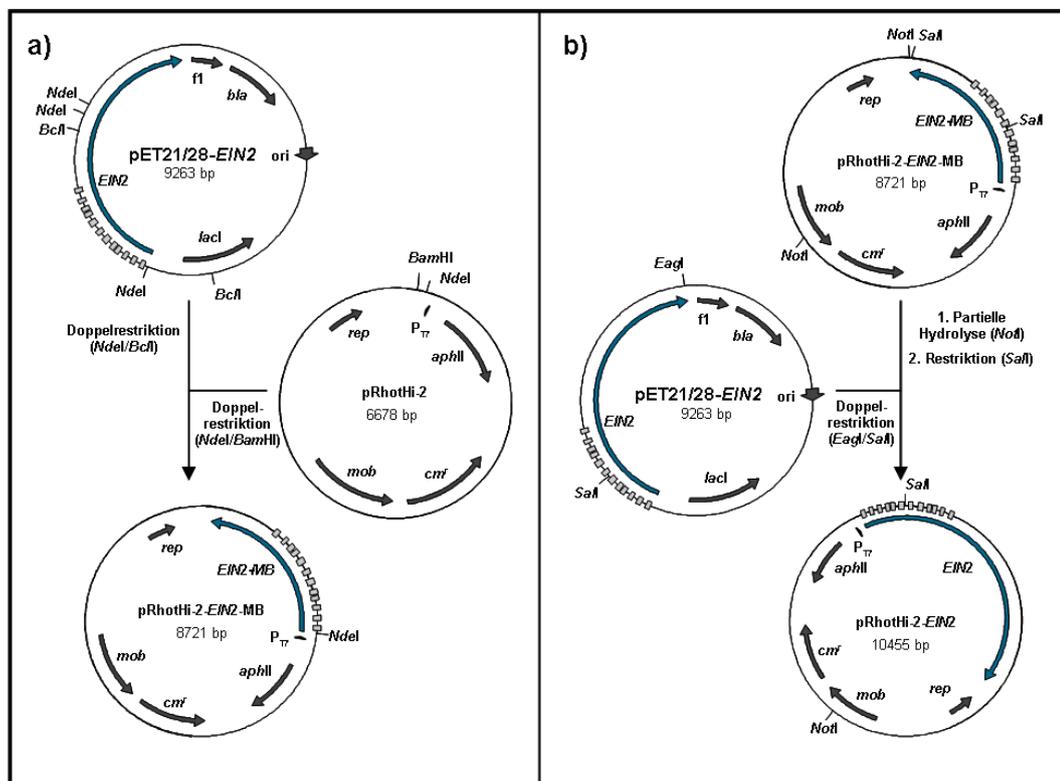


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die P_{T7} -abhängigen Expressionsvektoren pRhotHi-2-*EIN2* sowie pRhotHi-2-*EIN2*-MB. Die exakte Klonierungsstrategie ist im Text beschreiben. Sequenzen, die für Membranhelices kodieren, sind durch hellgraue Kästen symbolisiert.

1.4.3 Die Squalenepoxidase *Sqep* aus *Stigmatella aurantiaca*

Bei der Squalenepoxidase *Sqep* aus *Stigmatella aurantiaca* handelt es sich um ein myxobakterielles Protein, das an der Biosynthese des Sterols Cycloartenol beteiligt ist. Dabei katalysiert die Squalenepoxidase im ersten Schritt der Cycloartenolsynthese die Oxidation von Squalen zu (S)-2,3-Oxidosqualen (Abbildung 21). Das *sqep*-Genprodukt ist ein 468 Aminosäuren großes Protein mit einer Masse von 51 kDa (Tabelle 14).

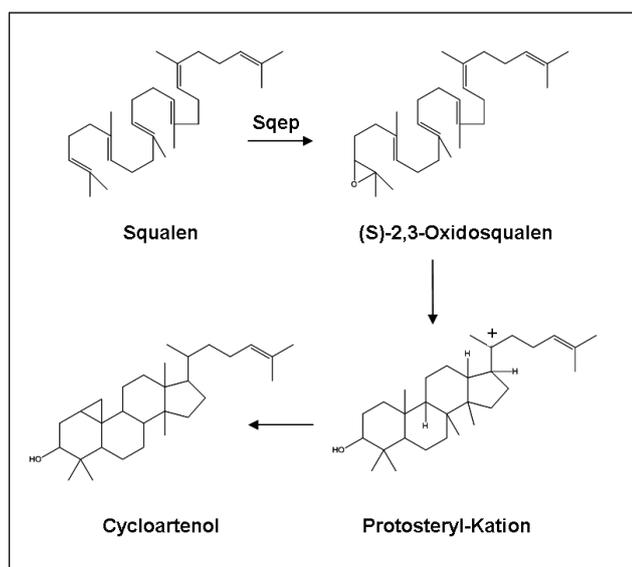


Abbildung 21: Steroidbiosynthese in *Stigmatella aurantiaca*. Ausgehend von dem linearen Molekül Squalen wird in *S. aurantiaca* das Steroid Cycloartenol synthetisiert. An der Synthese sind die Membranproteine Squalenepoxidase (Sqep) und Cycloartenolsynthase (Osc) beteiligt.

Tabelle 14: Proteine, deren Synthese im Rahmen dieser Arbeit in *R. capsulatus* untersucht wurde. Die Angaben beziehen sich auf die Anzahl der Basenpaare in jeweiligen P₁₇-abhängigen Expressionsplasmid pRhotHi-2 inklusive Hexahistidin-Sequenz und Stoppkodon. Die Angaben zur Aminosäuresequenz beziehen sich auf das Genprodukt der zuvor beschriebenen DNA-Sequenz und enthalten ebenfalls die Sequenz des Hexahistidin-Tag.^{a)} Die Anzahl der Transmembranhelices wurde mit den TMpred und TopPred (<http://www.expasy.ch/tools/>).

Name		Anzahl Basenpaare	Anzahl Aminosäuren	Protein-größe in kDa	Anzahl der Transmembranhelices	Ursprungsorganismus	Kooperationspartner
Squalenepoxidase	Sqep	1407	468	51	2 ^{a)}	<i>S. aurantiaca</i>	Prof. Müller, Universität Saarbrücken
Membrandomäne des Ethyleninsensitivproteins 2	EIN2-MB	2187	728	80	12	<i>A. thaliana</i>	Prof. Groth, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Ethyleninsensitivprotein 2	EIN2	3921	1306	144	12	<i>A. thaliana</i>	Prof. Groth, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Arabinofuranosyltransferase	AftA	2058	685	75	12-14	<i>C. glutamicum</i>	Dr. Eggeling, Jülich
Arabinofuranosyltransferase	Emb	3465	1154	127	15	<i>C. glutamicum</i>	Forschungszentrum

Da sich die Squalenepoxidase in bekannten Expressionssystemen bislang nur in geringsten Mengen in Einschlusskörpern exprimieren lässt (persönliche Mitteilung, Prof. Dr. Müller) sind über ihre Struktur bislang kaum Details bekannt. Anhand vergleichender Analysen der Aminosäuresequenz konnte lediglich gezeigt werden, dass die Squalenepoxidase aus *S. aurantiaca* Homologien zu anderen prokaryotischen aber auch eukaryotischen Monooxygenasen aufweist (Tabelle 15). Anhand dieses Vergleichs konnten jedoch keine

neuen Erkenntnisse über die Struktur der Squalenepoxidase aus *S. aurantiaca* gewonnen werden.

Tabelle 15: Ergebnisse des *basic local alignment search tools* für den Vergleich der Aminosäuresequenz (BLASTP) der Squalenepoxidase aus *S. aurantiaca* mit den Aminosäuresequenzen der Organismen in den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI). Dargestellt sind die ersten 15 Treffer der durchgeführten BLASTP-Suche.

Protein ID	Proteinfunktion	Organismus	Domäne	%-Identität
YP_115265	Monooxygenase	<i>Methylococcus capsulatus</i>	Bacteria	35
ZP_02731451	Monooxygenase	<i>Gemmata obscuriglobus</i>	Bacteria	32
ZP_01909458	Monooxygenase	<i>Plesiocystis pacifica</i>	Bacteria	32
XP_001881746	Monooxygenase	<i>Laccaria bicolor</i>	Eukaryota	29
XP_629022	Monooxygenase	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Eukaryota	28
XP_503994	Monooxygenase	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Eukaryota	28
XP_001390258	Unbekannte Funktion	<i>Aspergillus niger</i>	Eukaryota	32
XP_002145513	Squalen Monooxygenase	<i>Penicillium marneffei</i>	Eukaryota	31
XP_002114138	Unbekannte Funktion	<i>Trichoplax adhaerens</i>	Eukaryota	27
ABF94793	Squalen Monooxygenase	<i>Oryza sativa</i>	Eukaryota	26
AAO00686	Putative Squalen Monooxygenase	<i>Oryza sativa</i>	Eukaryota	26
NP_001049462	Putative Squalen Monooxygenase	<i>Oryza sativa</i>	Eukaryota	26
XP_001939911	Squalen Monooxygenase	<i>Pyrenophora tritici</i>	Eukaryota	28
XP_758545	Unbekannte Funktion	<i>Ustilago maydis</i>	Eukaryota	28
ACG45015	Unbekannte Funktion	<i>Zea mays</i>	Eukaryota	27

Aus diesem Grund wurde versucht, die Topologie der Squalenepoxidase aus *S. aurantiaca* computergestützt vorherzusagen. Dazu wurden u. a. die Computerprogramme DAS, HMMTOP, SOSUI, TMHMM, Tmpred und TopPred verwendet (<http://www.expasy.ch/tools/>), von denen lediglich die Algorithmen der Programme Tmpred und TopPred das Vorhandensein von drei Membranhelices vorhersagten (Tabelle 16).

Tabelle 16: Topologievorhersage für die Squalenepoxidase aus *S. aurantiaca* mit Hilfe der Computerprogramme Tmpred und TopPred. (<http://www.expasy.ch/tools/>)

	Tmpred	TopPred
Position der vorhergesagten Helices (von Aminosäure ... bis ...)	9 – 29 198 – 216 276 – 303	9 – 29 197 – 217 287 – 307
Position des N-Terminus	cytoplasmatisch	cytoplasmatisch

Da die Topologievorhersage einer Transmembranhelix unmittelbar am N-Terminus eines Proteins auf das Vorhandensein einer Signalsequenz hindeutet, wurde anschließend mit Hilfe des Computerprogramms SignalP (<http://www.expasy.ch/tools/>) untersucht, ob dies auch für die Squalenepoxidase zutrifft. Tatsächlich bestätigt SignalP die Vermutung, dass es sich um die vorhergesagte Transmembranhelix von Aminosäure 9 bis 29 mit einer Wahrscheinlichkeit von 90 % um eine Signalsequenz handelt. Somit würde das prozessierte Membranprotein Squalenepoxidase lediglich zwei Transmembranhelices enthalten.

Um die Vorhersage zu bestätigen, dass es sich bei der Squalenepoxidase aus *S. aurantiaca* tatsächlich um ein Membranprotein handelt, sollte die Expression des korrespondierenden Gens mit Hilfe des neuen P_{T7}-abhängigen Expressionsvektors pRhotHi-2 in den *E. coli* Expressionsstämmen BL21(DE3) und C43(DE3) sowie im neuen *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7 untersucht werden.

Dazu wurde das korrespondierende *sqep*-Gen über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* aus dem *E. coli* Expressionsplasmid pTYB1-*sqep* in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Expressionsplasmids pRhotHi-2 inkloniert (Kucz, 2005). Das entstandene rekombinante P_{T7}-abhängige Expressionsplasmid wurde als pRhotHi-2-*sqep* bezeichnet (Anhang).

1.4.4 Untersuchungen zur P_{T7}-abhängigen Synthese ausgewählter pro- und eukaryotischer Membranproteine in den *E. coli* Expressionsstämmen BL21(DE3) und C43(DE3)

Im Rahmen dieses Teilprojekts der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, in wie weit die ausgewählten heterologen Membranproteine mit dem neuen P_{T7}-abhängigen Expressionsvektor pRhotHi-2 in den bereits beschriebenen *E. coli* Expressionswirten BL21(DE3) und C43(DE3) synthetisiert werden können.

Somit sollte zum einen untersucht werden, ob die Synthese der ausgewählten heterologen Membranproteine durch Verwendung des P_{T7}-abhängigen Expressionsvektors in den *E. coli* Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3) erstmals in signifikanten Mengen erfolgt. Zum anderen sollten erneut zwei Referenzsysteme geschaffen werden, die den späteren Vergleich der Plasmidkopienzahl pro Zelle, der Transkriptionseffizienz bzw. der Transkriptausbeute sowie der Proteinlokalisierung mit dem neuen Expressionswirt *R. capsulatus* B10S-T7 ermöglichen. Außerdem ermöglichen sie den Vergleich mit den Syntheseleistungen des in dieser Arbeit bereits beschriebenen Expressionssystems für Bacterioopsin in *E. coli*.

1.4.4.1 Untersuchungen zu den Plasmidkopienzahlen der erzeugten rekombinanten P_{T7}-abhängigen Expressionsplasmide pro Zelle in den *E. coli* Expressionsstämmen BL21(DE3) und C43(DE3).

Zur Bestimmung der Plasmidkopienzahl der erzeugten rekombinanten Plasmide pRhotHi-2-*aftA*, pRhotHi-2-*emb*, pRhotHi-2-*EIN2*-MB, pRhotHi-2-*EIN2* und pRhotHi-2-*sqep* pro Zelle wurden zunächst Zellen der beiden *E. coli* Expressionsstämme BL21(DE3) und C43(DE3) mit diesen Vektoren transformiert und auf LB-Festmedium unter Selektionsdruck vermehrt. Von diesem LB-Festmedium wurden geeignete Kolonien geerntet und dazu verwendet, Vorkulturen in 5 ml LB-Flüssigmedium anzupfen. Diese Vorkulturen wurden nach Wachstum über Nacht bei 37 °C und Agitation (120 UpM) eingesetzt, um Hauptkulturen in 10 ml Autoinduktionsmedium mit einer Zellzahl, die einer optischen Dichte von 0,05 bei 580 nm entsprachen, zu inokulieren. Die weitere Anzucht verlief bei 37 °C und Agitation (120 UpM) über Nacht.

Bevor jedoch die Plasmidkopienzahl der Expressionsvektoren pro Zelle bestimmt wurde, wurde das Wachstum der Kulturen durch photometrische Trübungsmessung bei 580 nm in der stationären Wachstumsphase untersucht. Die Ergebnisse dieser Trübungsmessung sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Bestimmung der Zelldichten der transformierten *E. coli* Expressionskulturen BL21(DE3) und C43(DE3). Als Maß für die Zellzahlen in den transformierten Expressionsstämmen wurde die optische Dichte der Kulturen in der stationären Wachstumsphase durch photometrische Trübungsmessung bei 580 nm bestimmt (o.D.₅₈₀). Als Kontrolle wurde außerdem die optische Dichte von entsprechenden Kulturen bestimmt, die den Leervektor pRhotHi-2 trugen. Die Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen inklusive Standardabweichung.

	o.D. ₅₈₀ (<i>E. coli</i> BL21(DE3))	o.D. ₅₈₀ (<i>E. coli</i> C43(DE3))
pRhotHi-2- <i>aftA</i>	7,28 ± 0,03	4,87 ± 0,08
pRhotHi-2- <i>emb</i>	7,34 ± 0,33	5,76 ± 0,13
pRhotHi-2- <i>EIN2</i> -MB	9,82 ± 0,18	2,19 ± 0,10
pRhotHi-2- <i>EIN2</i>	0,12 ± 0,04	0,09 ± 0,02
pRhotHi-2- <i>sqep</i>	9,02 ± 0,08	5,08 ± 0,07
pRhotHi-2	9,14 ± 0,31	6,25 ± 0,12

Wie aus den Daten in Tabelle 17 hervorgeht, ist das Zellwachstum der transformierten *E. coli* BL21(DE3)-Kulturen deutlich besser als das der transformierten *E. coli* C43(DE3) Kulturen. Dies wurde im Vergleich der durch Trübungsmessung bei 580 nm bestimmten optischen

Dichten der *E. coli* Stämme, die mit dem Leervektor pRhotHi-2 transformiert wurden, deutlich. So erreichte *E. coli* BL21(DE3) pRhotHi-2 eine maximale optische Dichte von $9,14 \pm 0,31$, *E. coli* C43(DE3) hingegen nur eine maximale optische Dichte von $6,25 \pm 0,12$. Offensichtlich war das verwendete Autoinduktionsmedium also für *E. coli* C43(DE3) schneller wuchslimitierend als für die Zellen des *E. coli* Expressionsstamms BL21(DE3).

Ungeachtet dessen schien die Expression des *EIN2*-Gens im Expressionsvektor pRhotHi-2-*EIN2* sowohl auf Zellen des *E. coli* Stamms BL21(DE3) als auch auf Zellen von *E. coli* C43(DE3) einen letalen Effekt zu haben. In Kulturen beider Stämme konnten nach Wachstum über Nacht lediglich 1 bis 2 Zellteilungen beobachtet werden. Daher konnte für die beiden Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3) und C43(DE3) bereits nach der Transformation mit dem P_{T7}-abhängigen Expressionsplasmid pRhotHi-2-*EIN2* die Aussage getroffen werden, dass auf Grund toxischer Effekte des Genprodukts in den untersuchten Stämmen keine Akkumulation des korrespondierenden Proteins möglich ist.

Im weiteren Vergleich der optischen Dichten aller transformierten *E. coli* BL21(DE3) Kulturen mit der optischen Dichte der BL21(DE3) Kulturen, die den Leervektor pRhotHi-2 trugen, erkennt man, dass lediglich die Zellzahlen der Kulturen, die für die Arabinofuranosyltransferasen *aftA* bzw. *emb* kodierten, um etwa 20 % niedriger waren, als die Zellzahlen der Kulturen mit dem korrespondierenden Leervektor pRhotHi-2. Somit schien die Expression der Gene *aftA* und *emb* ebenfalls zellulären Stress zu verursachen, der das Zellwachstum der betreffenden Kulturen beeinflusste. Diese Beeinflussung war aber bei weitem nicht so stark, wie sie für die Expression des *EIN2*-Gens beobachtet wurde.

Vergleicht man die optischen Dichten aller transformierten *E. coli* C43(DE3) Kulturen mit der optischen Dichte der C43(DE3) Kulturen, die mit dem Leervektor pRhotHi-2 transformiert wurden, so wird deutlich, dass das Wachstum aller transformierten Expressionskulturen beeinträchtigt wurde. So sank die optische Dichte der *emb*-exprimierenden *E. coli* C43(DE3) Kulturen um 8 % im Vergleich zu den Kulturen, die mit dem Leervektor pRhotHi-2 transformiert wurden. Die optischen Dichten der Expressionskulturen für *aftA* und *sqep* sanken um jeweils 20 % und die optischen Dichte der Expressionskultur für das Gen der *EIN2*-Membrandomäne sogar um 65 %.

So macht dieses Ergebnis deutlich, dass die Expression heterologer Gene, die für Membranproteine kodieren, in *E. coli* C43(DE3) generell das Wachstum stärker limitieren, als im Expressionsstamm BL21(DE3), obwohl der *E. coli* Stamm C43(DE3) nach Literaturangaben besser geeignet ist, um toxische Proteine und Membranproteine zu synthetisieren.

Ob dieses Ergebnis einen Einfluss auf die Plasmidkopienzahlen der erzeugten rekombinanten P_{T7} -abhängigen Expressionsvektoren in den beiden getesteten *E. coli* Expressionstämmen hatte, wurde im Anschluss näher untersucht. Dazu wurde aus den oben beschriebenen Expressionskulturen jeweils ein Aliquot (1,5 ml) entnommen, aus dem die Gesamt-DNA quantitativ isoliert wurde. Mit geeigneten *Primern* und 150 ng der isolierten Gesamt-DNA wurde dann in einer quantitativen *real-time*-PCR unter Verwendung eines definierten Massenstandards die absolute Masse der gebildeten PCR-Produkte bestimmt. Anhand dieser Daten konnte anschließend die Plasmidkopienzahl der betreffenden Expressionsvektoren pro Zelle errechnet werden (Tabelle 18). Als Massenstandard wurde erneut gereinigte Plasmid-DNA des Leervektors pRhotHi-2 verwendet, die zuvor photometrisch quantifiziert wurde. Die Ergebnisse der *real-time*-PCR sind in Abbildung 22 dargestellt.

Tabelle 18: Plasmidkopienzahlen der verwendeten Expressions- und Kontrollvektoren in den *E. coli* Expressionstämmen BL21(DE3) und C43(DE3). Die angegebenen Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert aus drei unabhängigen Berechnungen inklusive Standardabweichung. Die Plasmidkopienzahlen der Vektoren pRhotHi-2 und pRhotHi-2-*bop* sind als Referenz ebenfalls aufgeführt.

	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> C43(DE3)
pRhotHi-2- <i>aftA</i>	5,3 ± 3,0	1,3 ± 0,6
pRhotHi-2- <i>emb</i>	1,0 ± 0,2	5,0 ± 0,7
pRhotHi-2- <i>EIN2</i> -MB	3,9 ± 1,5	3,9 ± 1,5
pRhotHi-2- <i>sqep</i>	4,4 ± 1,4	1,0 ± 0,6
pRhotHi-2	5,3 ± 0,6	2,5 ± 0,5
pRhotHi-2- <i>bop</i>	2,5 ± 0,5	2,4 ± 0,4

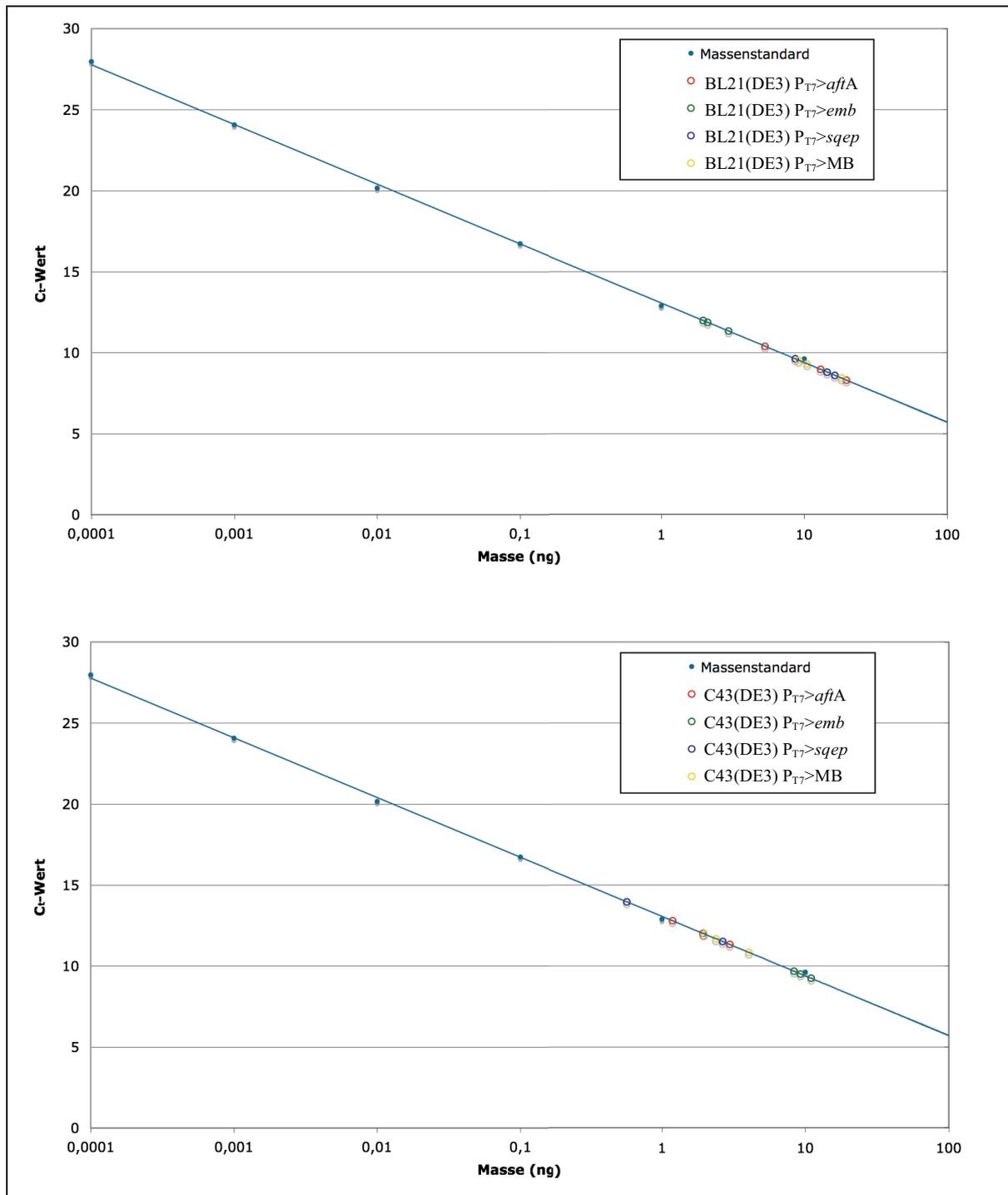


Abbildung 22: Graphische Darstellung der *real-time*-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Plasmidkopienzahlen der erzeugten rekombinanten Expressionsvektoren für *aftA*, *emb*, *sqep* und *EIN2-MB* pro Zelle in den Expressionswirten *E. coli* BL21(DE3) und C43(DE3). Erneut dargestellt sind die C_q-Werte der erzeugten PCR-Produkte in Abhängigkeit der Masse der erzeugten Produkte. Die C_q-Werte beschreiben den Schwellenwert-PCR-Zyklus (*threshold cycle*), bei dem im Verlauf der *real-time*-PCR die Fluoreszenzemission des verwendeten SYBR-Green-Farbstoffs das Hintergrundrauschen überschreitet. Durch den Einsatz eines Massenstandards kann an Hand dieser Daten die Kopienzahl der eingesetzten Vektoren pro Zelle berechnet werden. Weitere Informationen zu dieser Abbildung befinden sich im Text. Das Bestimmtheitsmaß des dargestellten Massenstandards betrug $R^2 = 0,9992$. BL21(DE3) P_{T7}>aftA: *E. coli* BL21(DE3) pRhotHi-2-aftA; BL21(DE3) P_{T7}>emb: *E. coli* BL21(DE3) pRhotHi-2-emb; BL21(DE3) P_{T7}>sqep: *E. coli* BL21(DE3) pRhotHi-2-sqep; BL21(DE3) P_{T7}>MB: *E. coli* BL21(DE3) pRhotHi-2-EIN2-MB; C43(DE3) P_{T7}>aftA: *E. coli* C43(DE3) pRhotHi-2-aftA; C43(DE3) P_{T7}>emb: *E. coli* C43(DE3) pRhotHi-2-emb; C43(DE3) P_{T7}>sqep: *E. coli* C43(DE3) pRhotHi-2-sqep; C43(DE3) P_{T7}>MB: *E. coli* C43(DE3) pRhotHi-2-EIN2-MB.

Wie aus den Plasmidkopienzahlen pro Zelle in Tab 8 zu erkennen ist, verhalten sich alle untersuchten rekombinanten Expressionsplasmide sowohl im *E. coli* Stamm BL21(DE3) als auch im *E. coli* Expressionsstamm C43(DE3) wie *low-copy*-Plasmide. Dabei entsprach die durchschnittliche Plasmidkopienzahl des Expressionsplasmids pRhotHi-2-*aftA* in *E. coli* BL21(DE3) pro Zelle der des Leervektors pRhotHi-2 mit $5,3 \pm 3,0$ bzw. $5,3 \pm 0,5$ Kopien pro Zelle. Mit $4,4 \pm 1,4$ bzw. $3,9 \pm 1,5$ Kopien pro Zelle erreichten die Expressionsplasmide pRhotHi-2-*sqep* bzw. pRhotHi-2-*EIN2*-MB etwas niedrigere Kopienzahlen in *E. coli* BL21(DE3), lagen damit aber noch über den $2,5 \pm 0,5$ Kopien pro Zelle, die der Bacterioopsin-Expressionsvektor pRhotHi-2-*bop* erreichte. Bei diesen rekombinanten Plasmiden schien die Expression der ausgewählten heterologen Gene also lediglich einen moderat negativen Einfluss auf die Plasmidkopienzahl pro Zelle zu haben. Im Gegensatz dazu hatte die Expression der Arabinofuranosyltransferase *emb* in *E. coli* BL21(DE3) einen stark negativen Einfluss auf die Kopienzahl des entsprechenden Expressionsplasmids pRhotHi-2-*emb*. So sank dessen Kopienzahl auf $1,0 \pm 0,2$ pro Zelle, was darauf schließen lässt, dass die Expression von *emb* einen derart negativen Einfluss auf den Metabolismus der Wirtszelle *E. coli* BL21(DE3) ausübt, dass diese aktiv versucht, die Kopienzahl des ursächlichen Plasmids so gering wie möglich zu halten. Ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich für die Kopienzahl des Squalenepoxidase-Expressionsvektors pRhotHi-2-*sqep* im *E. coli* Stamm C43(DE3). So betrug die Kopienzahl dieses rekombinanten Plasmids ebenfalls nur $1,0 \pm 0,6$ pro Zelle. Auch die Kopienzahl des P_{T7}-abhängigen Plasmids pRhotHi-2-*aftA* betrug in *E. coli* C43(DE3) nur $1,3 \pm 0,6$ Kopien pro Zelle. Mit $5,0 \pm 0,7$ bzw. $3,9 \pm 1,5$ Kopien pro Zelle lagen die Plasmidkopienzahlen der Vektoren pRhotHi-2-*emb* bzw. pRhotHi-2-*EIN2*-MB demgegenüber sogar höher, als die Kopienzahl des Kontrollvektors pRhotHi-2 mit $2,5 \pm 0,5$ pro Zelle.

Als generellen Trend lässt sich aus den Daten in Tabelle 18 festhalten, dass die Kopienzahlen der untersuchten Expressionsplasmide im *E. coli* Stamm BL21(DE3) etwas größer waren, als die Kopienzahlen der entsprechenden Vektoren im *E. coli* Stamm C43(DE3). Dies gilt insbesondere für die Expressionsplasmide pRhotHi-2-*aftA*, pRhotHi-2-*sqep*, pRhotHi-2-*bop* und pRhotHi-2 und korreliert mit der Beobachtung, dass auch die maximal erreichten Zellzahlen in *E. coli* BL21(DE3) höher waren als in *E. coli* C43(DE3).

Welche Auswirkungen diese Ergebnisse jedoch auf die Transkriptmenge der heterologen Gene in den verwendeten Expressionsvektoren in *E. coli* BL21(DE3) bzw. C43(DE3) hatte, wurde anschließend mittels quantitativer *real-time*-PCR untersucht.

1.4.4.2 Bestimmung der Transkriptmassen ausgewählter heterologer Gene im P_{T7}-abhängigen Expressionsplasmid pRhotHi-2 in den *E. coli* Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3)

Nachdem gezeigt wurde, dass die erzeugten rekombinanten P_{T7}-abhängigen Expressionsplasmide pRhotHi-2-*aftA*, pRhotHi-2-*emb*, pRhotHi-2-*sqep* und pRhotHi-2-*EIN2*-MB sowohl in *E. coli* BL21(DE3) als auch in *E. coli* C43(DE3) stabil als *low-copy*-Vektoren replizieren, sollte nun überprüft werden, ob die ausgewählten heterologen Gene in den beiden Expressionsstämmen auch transkribiert wurden und welchen Einfluss die Plasmidkopienzahl pro Zelle auf die Transkriptmasse der untersuchten Gene ausübte.

Um dies zu analysieren, wurden die Transkriptmassen der heterologen Gene *aftA*, *emb*, *sqep* sowie vom verkürzten *EIN2*-Gen *EIN2*-MB in ihren *E. coli* Expressionskulturen bestimmt. Dazu wurden *E. coli* BL21(DE3)- bzw. C43(DE3)-Kulturen, deren Zellen mit den P_{T7}-abhängigen Expressionsplasmiden der Gene *aftA*, *emb*, *sqep* bzw. *EIN2*-MB transformiert wurden, wie bereits beschrieben, in 10 ml Autoinduktionsmedium über Nacht bei 37 °C und Agitation (120 UpM) angezogen. Anschließend wurde aus jeweils 1,5 ml jeder Kultur die Gesamt-RNA quantitativ isoliert. Aus 150 ng dieser Gesamt RNA wurden die Transkripte der zu untersuchenden Gene mit Hilfe geeigneter *Primer* und reverser Transkriptase in cDNA transkribiert. Diese cDNA wurde anschließend als Matritze für die durchgeführten *real-time*-PCR verwendet und so die Masse der ursprünglichen Transkripte bestimmt. Als Massenstandard wurde dazu gereinigte Plasmid-DNA des Vektors pRhotHi-2 verwendet, dessen Masse zuvor photometrisch bestimmt wurde. Die gesamte Versuchsdurchführung erfolgte als Dreifachbestimmung. Die Ergebnisse der durchgeführten *real-time*-PCR zur Transkriptbestimmung in den *E. coli* Expressionsstämmen BL21(DE3) und C43(DE3) sind in Abbildung 23 dargestellt.

Mit Hilfe der in Abbildung 23 dargestellten Standardkurven konnte aus den Daten der quantitativen *real-time*-PCR die absolute Masse der ursprünglich für die reverse Transkription eingesetzten Transkripte berechnet werden. Ihre Massen sind in Tabelle 19 vergleichend dargestellt.

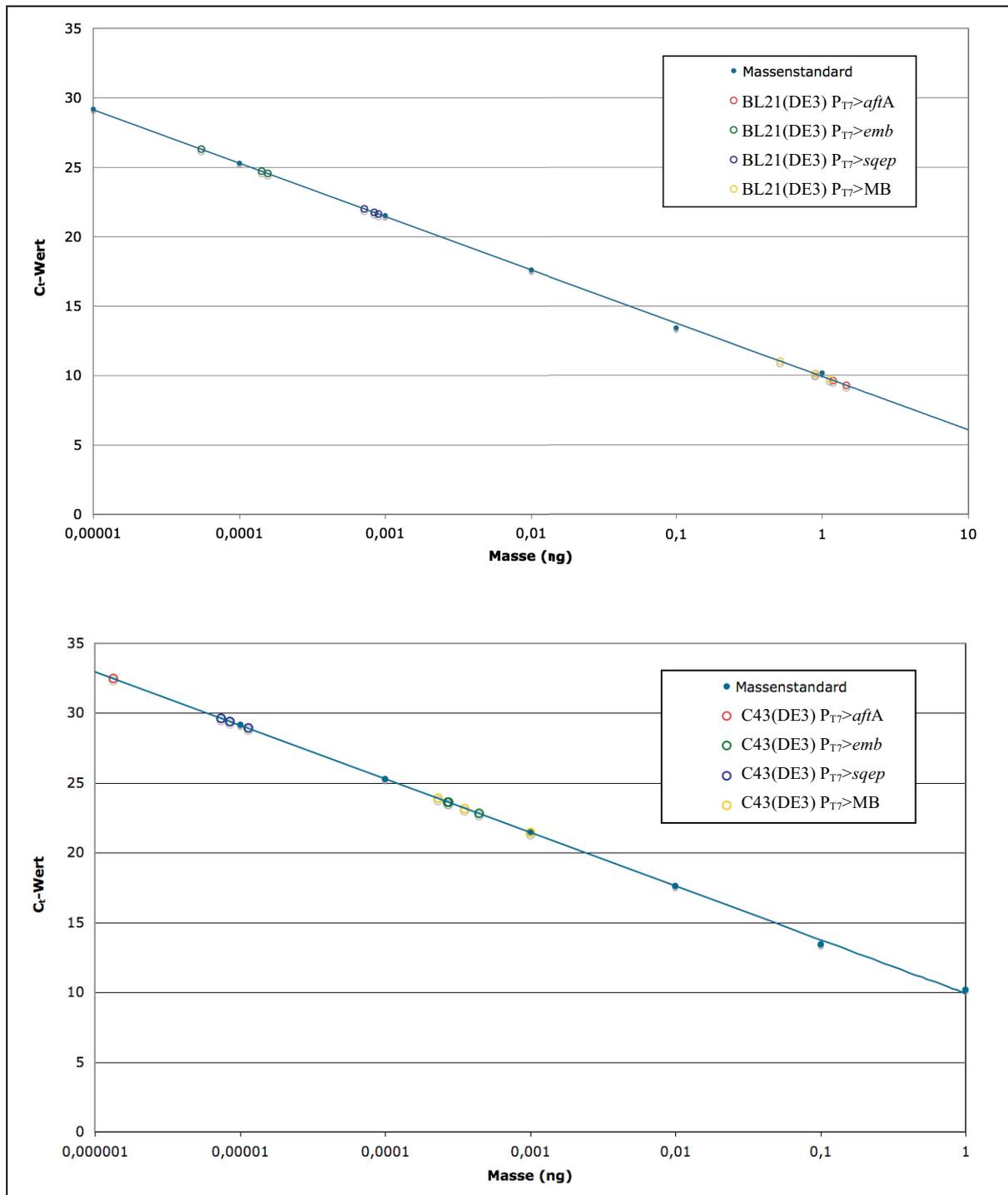


Abbildung 23: Graphische Darstellung der *real-time*-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Transkriptmassen für die Gene *aftA*, *emb*, *sqep* und *EIN2-MB* pro Zelle in den Expressionswirten *E. coli* BL21(DE3) und C43(DE3). Erneut dargestellt sind die C_t -Werte der erzeugten PCR-Produkte in Abhängigkeit der Masse der erzeugten Produkte. Die C_t -Werte beschreiben den Schwellenwert-PCR-Zyklus (*threshold cycle*), bei dem im Verlauf der *real-time*-PCR die Fluoreszenzemission des verwendeten SYBR-Green-Farbstoffs das Hintergrundrauschen überschreitet. Durch den Einsatz eines Massenstandards konnte Transkriptmasse der betreffenden Zielgene errechnet werden. Weitere Informationen zu dieser Abbildung befinden sich im Text. Das Bestimmtheitsmaß des dargestellten Massenstandards betrug $R^2 = 0,9993$. BL21(DE3) $P_{T7}>aftA$: *E. coli* BL21(DE3) pRhotHi-2-*aftA*; BL21(DE3) $P_{T7}>emb$: *E. coli* BL21(DE3) pRhotHi-2-*emb*; BL21(DE3) $P_{T7}>sqep$: *E. coli* BL21(DE3) pRhotHi-2-*sqep*; BL21(DE3) $P_{T7}>MB$: *E. coli* BL21(DE3) pRhotHi-2-*EIN2-MB*; C43(DE3) $P_{T7}>aftA$: *E. coli* C43(DE3) pRhotHi-2-*aftA*; C43(DE3) $P_{T7}>emb$: *E. coli* C43(DE3) pRhotHi-2-*emb*; C43(DE3) $P_{T7}>sqep$: *E. coli* C43(DE3) pRhotHi-2-*sqep*; C43(DE3) $P_{T7}>EIN2-MB$: *E. coli* C43(DE3) pRhotHi-2-*MB*.

Tabelle 19: Vergleich der Transkriptmassen der heterologen Gene *aftA*, *emb*, *sqep* und *EIN2-MB* in den *E. coli* Expressionsstämmen BL21(DE3) und C43(DE3). Die angegebenen Massen repräsentieren jeweils den Mittelwert aus drei unabhängigen Berechnungen inklusive Standardabweichung.

Transkript	Transkriptmasse (ng / 150 ng Gesamt-RNA) in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	Transkriptmasse (ng / 150 ng Gesamt-RNA) in <i>E. coli</i> C43(DE3)
<i>aftA</i>	$1,18 \pm 2,83 \cdot 10^{-1}$	$7,43 \cdot 10^{-7} \pm 5,29 \cdot 10^{-7}$
<i>emb</i>	$1,19 \cdot 10^{-4} \pm 5,50 \cdot 10^{-5}$	$3,30 \cdot 10^{-4} \pm 9,84 \cdot 10^{-5}$
<i>sqep</i>	$8,18 \cdot 10^{-4} \pm 9,06 \cdot 10^{-5}$	$9,13 \cdot 10^{-6} \pm 2,08 \cdot 10^{-6}$
<i>EIN2-MB</i>	$8,45 \cdot 10^{-1} \pm 3,09 \cdot 10^{-1}$	$5,28 \cdot 10^{-4} \pm 4,15 \cdot 10^{-4}$
<i>bop</i>	$4,10 \cdot 10^{-5} \pm 4,74 \cdot 10^{-5}$	$9,75 \cdot 10^{-4} \pm 7,44 \cdot 10^{-4}$

Der Vergleich der Transkriptmassen in Tabelle 19 zeigt, dass außer dem Transkript für Bacterioopsin und der Arabinofuranosyltransferase Emb alle anderen untersuchten Transkriptmassen im *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) größer waren, als im Stamm C43(DE3). So enthielt *E. coli* BL21(DE3) 90-mal mehr Squalenepoxidasetranskript, 1600-mal mehr Transkript für die verkürzte Variante des EIN2 (EIN2-MB) und sogar 1,6 Millionen-mal mehr Transkript für die Arabinofuranosyltransferase AftA als die korrespondierenden *E. coli* C43(DE3) Expressionskulturen. Demgegenüber wurde im Expressionsstamm *E. coli* C43(DE3) 1,7-mal mehr Transkript für Emb und fast 25-mal mehr Transkript für Bacterioopsin produziert, als in *E. coli* BL21(DE3).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Plasmidkopienzahl möglicherweise doch einen Einfluss auf die synthetisierte Transkriptmasse in den jeweiligen Expressionsstämmen hatte. So waren die Plasmidkopienzahlen der Expressionsplasmide pRhotHi-2-*aftA* und pRhotHi-2-*sqep* in *E. coli* BL21(DE3) größer als in *E. coli* C43(DE3), ebenso wie die errechneten Transkriptmassen. Umgekehrt verhielt es sich mit dem Expressionsplasmid pRhotHi-2-*emb*. Seine Plasmidkopienzahl war ebenso wie seine absolute Transkriptmasse im *E. coli* Stamm C43(DE3) größer. Trotz vergleichbarer Plasmidkopienzahl des Vektors pRhotHi-2-*EIN2-MB* akkumulierte der Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) mehr Transkript als *E. coli* C43(DE3). Ebenfalls anders hingegen verhielt sich der P_{T7}-Expressionsvektor pRhotHi-2-*bop*, der zwar in *E. coli* BL21(DE3) eine größere Plasmidkopienzahl pro Zelle erreichte, dennoch aber in *E. coli* C43(DE3) mehr Transkript produzierte.

Vergleicht man die errechneten Transkriptmassen der ausgewählten heterologen Gene innerhalb eines Expressionsstamms, so wird deutlich, dass in *E. coli* BL21(DE3) mehr

Transkript von *aftA* synthetisiert wird, als von *EIN2-MB*, *sqep*, *emb* und *bop*. Dies ist im *E. coli* Expressionsstamm C43(DE3) interessanterweise beinahe komplett konträr. Hier wird mehr Bacterioopsintranskript gebildet als Transkript von *EIN2-MB*, *emb*, *sqep* und *aftA*.

Welchen Einfluss dies auf die Translation und Akkumulation der gebildeten Transkripte hatte, und ob eine extrem hohe Transkriptmenge in Vergleich zum Bacterioopsintranskript zwangsläufig auch zu einer besseren Akkumulation des betreffenden Genprodukts führte, wurde anschließend mit Hilfe immunologischer Methoden untersucht.

1.4.4.3 Akkumulation und Lokalisation von AftA, Emb, Sqep und EIN2-MB in den *E. coli* Expressionsstämmen BL21(DE3) und C43(DE3)

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die zum Teil sehr unterschiedlichen Transkriptmassen der ausgewählten heterologen Gene *aftA*, *emb*, *sqep* und *EIN2-MB* in den *E. coli* Expressionsstämmen BL21(DE3) und C43(DE3) auf die Akkumulation und Lokalisation ihrer korrespondierenden Genprodukte hatte, wurden aus 1,5 ml der jeweiligen Expressionskulturen zellfreie Proteinextrakte hergestellt und fraktioniert. Die *E. coli* BL21(DE3) und C43(DE3) Expressionskulturen wurden dazu mit den entsprechenden P_{T7}-abhängigen Expressionsplasmiden pRhotHi-2-*aftA*, pRhotHi-2-*emb*, pRhotHi-2-*sqep* bzw. pRhotHi-2-*EIN2-MB* transformiert und unter Selektionsdruck in 10 ml Autoinduktionsmedium bei 37 °C und Agitation (120 UpM) über Nacht kultiviert.

In den fraktionierten Proteinextrakten aus Zellen, deren optische Dichte bei 580 nm eins betrug, wurden die Genprodukte AftA, Emb, Sqep und EIN2-MB mit Hilfe eines spezifischen Antiserums und Westernblotanalyse analysiert. Die photographische Dokumentation dieser Analyse ist in Abbildung 24 dargestellt.

Wie daraus ersichtlich ist, belegte der immunologische Nachweis mit spezifischen Antikörpern, dass die Genprodukte AftA, Emb und EIN2-MB weder im *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) noch in *E. coli* C43(DE3) akkumulierten (Abbildung 24b, c, d). Ungeachtet ihrer zum Teil hohen Transkriptmassen im Vergleich zu Bacterioopsin, welches in beiden untersuchten *E. coli* Expressionsstämmen akkumulierte, erfolgte die Synthese von AftA, Emb und EIN2-MB nicht. Mögliche Gründe dafür werden im Rahmen der Diskussion dieser Arbeit näher erläutert.

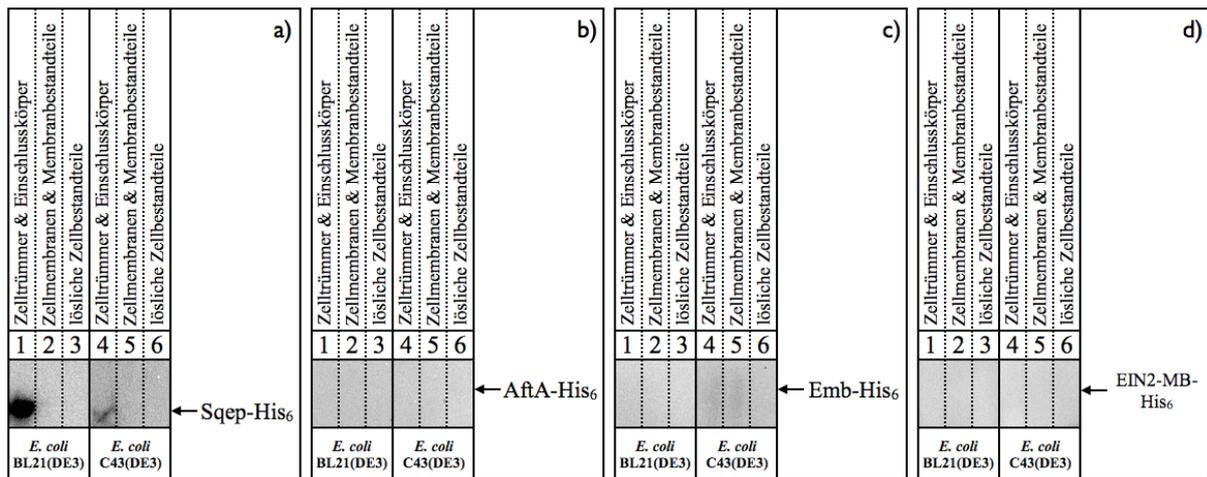


Abbildung 24: Akkumulation und Lokalisation von AftA, Emb, Sqp und EIN2-MB in *E. coli* BL21(DE3) und C43(DE3). Unter Verwendung gleicher Zellzahlen, deren optische Dichte bei 580 nm eins betrug, ist die Akkumulation und Lokalisation von Sqp (a), AftA (b), Emb (c) und EIN2-MB (d) als Fusionsprotein mit einem Hexahistidin-Tag am C-Terminus in den *E. coli* Expressionsstämmen BL21(DE3) und C43(DE3) dargestellt. Der immunologische Nachweis der Genprodukte erfolgte unter Verwendung von zellfreien, fraktionierten Extrakten und unter Verwendung eines spezifischen Antiserums. Für die Genprodukte AftA (b), Emb (c) und EIN2-MB (d) konnte weder in *E. coli* BL21(DE3) noch in *E. coli* C43(DE3) ein spezifisches Signal erhalten werden, sodass ihre Akkumulation in den untersuchten Expressionssystemen ausgeschlossen werden konnte. Demgegenüber akkumulierte Squalenepoxidase (a) in signifikanten Mengen in den Fraktionen der Zelltrümmer und Einschlusskörper beider untersuchter *E. coli* Expressionsstämme.

Demgegenüber akkumulierte das Genprodukt der Squalenepoxidase sowohl im *E. coli* Stamm BL21(DE3) als auch in *E. coli* C43(DE3). Entsprechend der deutlich höheren Transkriptmasse in *E. coli* BL21(DE3) akkumulierte in diesem Stamm auch deutlich mehr Protein, als in *E. coli* C43(DE3) (Abbildung 24a, Spuren 1 & 4).

Somit ist es erstmals in *E. coli* gelungen, signifikante Mengen der myxobakteriellen Squalenepoxidase aus *S. aurantiaca* heterolog zu synthetisieren. Da jedoch das gesamte Genprodukt der Squalenepoxidase in Einschlusskörpern akkumulierte, konnte mit Hilfe der *E. coli* Expressionssysteme nicht eindeutig geklärt werden, ob Squalenepoxidase tatsächlich ein Membranprotein ist.

Nachdem mit Hilfe des P_{T7} -abhängigen Expressionsplasmids pRhotHi-2-*bop* die Bacterioopsinakkumulation in den *E. coli* Expressionsstämme BL21(DE3) und C43(DE3) gelang und die 100 %-ige Insertion in die Cytoplasmamembran nachgewiesen wurde, wurde anschließend die Transkription, Akkumulation und Lokalisation weiterer heterologer Membranproteine in diesen Expressionssystemen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Expression des Rezeptorgens *EIN2* im Expressionsvektor pRhotHi-2-*EIN2* sowohl für Zellen des *E. coli* Stamms BL21(DE3) als auch C43(DE3) letal war. Demgegenüber konnten die Expressionsplasmide pRhotHi-2-*aftA* und pRhotHi-2-*emb* für die Expression der Arabinofuranosyltransferasen AftA und Emb als *low-copy*-Plasmide in den beiden Expressionsstämmen *E. coli* BL21(DE3) und C43(DE3) etabliert werden. Damit verhielten sie sich ähnlich wie das Expressionsplasmid für Bacterioopsin in diesen beiden Stämmen. Gleiches gilt auch für die Expressionsplasmide für Squalenepoxidase (pRhotHi-2-*sqep*) und die N-terminale Membrandomäne des EIN2 (pRhotHi-2-*EIN2*-MB). Auch sie wurden als *low-copy*-Plasmide in den beiden *E. coli* Systemen etabliert. Dabei wurde generell festgestellt, dass die maximal erreichten Zellzahlen der Expressionskulturen des *E. coli* Stamms BL21(DE3) höher waren als die des Stamms C43(DE3). Mehrheitlich enthielten die Zellen des *E. coli* Stamms BL21(DE3) auch eine höhere Plasmidkopienzahl der Expressionsvektoren pro Zelle. Weiterhin wurde festgestellt, dass diese Plasmidkopienzahl pro Zelle unmittelbar mit der absoluten Transkriptmasse korrelierte. Trotz der zum Teil sehr hohen Transkriptmassen der untersuchten heterologen Gene im Vergleich zu Bacterioopsin konnte trotzdem lediglich das Genprodukt der Squalenepoxidase akkumuliert werden. Dieses akkumulierte jedoch erstmals in signifikanten Mengen sowohl im *E. coli* Stamm BL21(DE3) als auch in *E. coli* C43(DE3). Entsprechend der höheren Transkriptmasse in *E. coli* BL21(DE3) akkumulierte auch deutlich mehr Squalenepoxidase in diesem Expressionsstamm als in *E. coli* C43(DE3). Da das Genprodukt in beiden Stämmen jedoch in Einschlusskörpern vorlag, konnte mit diesen Expressionssystemen noch nicht geklärt werden, ob es sich bei der Squalenepoxidase aus *S. aurantiaca*, wie vorhergesagt, um ein Membranprotein handelt.

1.4.5 Untersuchungen zur P_{T7}-abhängigen Synthese ausgewählter pro- und eukaryotischer Membranproteine im neuen *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7

Nachdem in den beiden *E. coli* Expressionsstämmen BL21(DE3) und C43(DE3) die Synthese der heterologen Membranproteine AftA, Emb, Sqep, EIN2 sowie der verkürzten Variante von EIN2 (EIN2-MB) mit dem Ergebnis untersucht wurde, dass die Transkription von EIN2 letal war und die Expression von *aftA*, *emb* und *EIN2-MB* kein Protein lieferte, sollte nun im neuen *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7 untersucht werden, in wie weit hier die Synthese der beschriebenen Membranproteine möglich ist. Außerdem sollten dabei die Syntheseleistungen des *R. capsulatus* B10S-T7 Expressionssystems in Bezug auf Plasmidkopienzahl pro Zelle, Transkriptmasse und Proteinakkumulation untersucht werden. Ferner sollte analysiert werden, ob die Synthese der Squalenepoxidase aus *S. aurantiaca* auch im *R. capsulatus* Stamm B10S-T7 möglich ist und ob das entsprechende Genprodukt in Einschlusskörpern, Membranbestandteilen oder als lösliches Protein akkumuliert. Dadurch sollte zusätzlich die computergestützte Hypothese untersucht werden, dass Squalenepoxidase möglicherweise ein Membranprotein ist.

1.4.5.1 Analyse der Plasmidkopienzahlen der erzeugten rekombinanten P_{T7}-abhängigen Expressionsplasmide pro Zelle im neuen *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7

Um die Plasmidkopienzahlen der rekombinanten P_{T7}-abhängigen Expressionsvektoren pRhotHi-2-*aftA*, pRhotHi-2-*emb*, pRhotHi-2-*sqep*, pRhotHi-2-*EIN2-MB* und pRhotHi-2-*EIN2* in *R. capsulatus* B10S-T7 untersuchen zu können, wurden die Plasmide zunächst durch konjugativen Transfer getrennt in den Expressionswirt mobilisiert. Dieser wurde auf PY-Festmedium unter Selektionsdruck vermehrt und dazu verwendet, um Vorkulturen in 10 ml RCV Flüssigmedium anzuimpfen. Nach dreitägigem photoheterotrophen Wachstum wurde diese Vorkulturen eingesetzt, um Hauptkulturen mit einer Zellzahl, die einer optischen Dichte von 0,02 bei 660 nm entsprach, in 1000 ml RCV-Flüssigmedium anzuimpfen. Die Anzucht erfolgte photoheterotroph für 24 Stunden. Zur Induktion der Zielgenexpression wurde dem verwendeten Flüssigmedium Fruktose in einer Endkonzentration von 8 mM als Induktor zugesetzt.

Bevor jedoch die Plasmidkopienzahl der Expressionsvektoren pro Zelle untersucht wurde, wurde das Wachstum der Kulturen durch photometrische Trübungsmessung bei 660 nm in der

stationären Wuchsphase analysiert. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 20 aufgelistet.

Tabelle 20: Bestimmung der Zellzahlen der erzeugten Expressionskulturen des *R. capsulatus* Expressionsstamms B10S-T7. Als Maß für die Zellzahlen in den konjugierten Expressionsstämmen wurde die optische Dichte der 1000 ml Kulturen in der stationären Wuchsphase durch photometrische Trübungsmessung bei 660 nm bestimmt (o.D.₆₆₀). Als Kontrolle wurde außerdem die optische Dichte von entsprechenden Kulturen bestimmt, die den Leervektor pRhotHi-2 trugen. Die Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen inklusive Standardabweichung.

	o.D. ₆₆₀ (<i>R. capsulatus</i> B10S-T7)
pRhotHi-2- <i>aftA</i>	1,09 ± 0,10
pRhotHi-2- <i>emb</i>	1,07 ± 0,08
pRhotHi-2- <i>EIN2</i> -MB	0,99 ± 0,04
pRhotHi-2- <i>EIN2</i>	0,05 ± 0,01
pRhotHi-2- <i>sqep</i>	1,22 ± 0,12
pRhotHi-2	1,22 ± 0,05

Wie aus Tabelle 20 ersichtlich ist, erreichten die *R. capsulatus* B10S-T7 Kulturen, die den Leervektor pRhotHi-2 trugen, erwartungsgemäß deutlich niedrigere Zellzahlen, als Kulturen der *E. coli* Expressionsstämme BL21(DE3) und C43(DE3), die mit dem Plasmid pRhotHi-2 transformiert wurden.

Der Vergleich der Zellzahlen der *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2 Kulturen mit den Zellzahlen der *R. capsulatus* B10S-T7 Expressionskulturen, welche die P_{T7}-abhängigen Plasmide pRhotHi-2-*aftA*, pRhotHi-2-*emb*, pRhotHi-2-*sqep* bzw. pRhotHi-2-*EIN2* trugen, zeigen, dass die Expression der korrespondierende Zielgene nur einen moderaten Einfluss auf die maximal erreichte Zellzahl hatte. So war das Zellwachstum der *sqep*-Expressionskultur vergleichbar mit dem der Leervektorkontrolle (pRhotHi-2; 1,22 ± 0,12 bzw. 1,22 ± 0,05) und auch die Zellzahlen der Expressionskulturen für die Zielgene *aftA* und *emb* gingen nur um 11 % bzw. 12 % zurück. Die Expression der verkürzten *EIN2*-Variante *EIN2*-MB verursachte in *R. capsulatus* B10S-T7 eine um 19 % geringere Zellzahl im Vergleich zur Leervektorkontrolle (pRhotHi-2), wohingegen die Transkription des Volllängengens *EIN2* für den Wirt stark toxisch war. Die Zellzahl der entsprechenden *R. capsulatus* Expressionskulturen B10S-T7 pRhotHi-2-*EIN2* wurde in 24 Stunden lediglich verdoppelt,

sodass man für diesen Expressionsstamm, wie bereits zuvor für *E. coli* Expressionsstämme BL21(DE3) und C43(DE3), feststellen kann, dass die Expression des EIN2 letal war.

In wie weit sich der zelluläre Stress der Expression heterologer Gene in *R. capsulatus* B10S-T7 nicht nur auf das Zellwachstum, sondern auch auf die Plasmidkopienzahlen der verwendeten P_{T7} -abhängigen Expressionsvektoren auswirkte, wurde anschließend untersucht. Dazu wurde aus den oben bereits beschriebenen *R. capsulatus* B10S-T7 Expressionskulturen jeweils ein Aliquot (1,5 ml) entnommen, aus dem die Gesamt-DNA quantitativ isoliert wurde. Anschließend wurde mit geeigneten Primern und 150 ng der isolierten Gesamt-DNA in einer quantitativen real-time-PCR unter Verwendung eines definierten Massenstandards die absolute Masse der gebildeten PCR-Produkte bestimmt. Mit Hilfe dieser Daten wurden anschließend die Plasmidkopienzahlen der betreffenden Expressionsplasmide pRhotHi-2-*aftA*, pRhotHi-2-*emb*, pRhotHi-2-*sqep* bzw. pRhotHi-2-*EIN2*-MB in *R. capsulatus* B10S-T7 errechnet (Tabelle 21). Als Massenstandard wurde gereinigte Plasmid-DNA des Kontrollvektors pRhotHi-2 verwendet, welche zuvor im Photometer quantifiziert wurde. Alle Untersuchungen zur Bestimmung der Plasmidkopienzahlen der verwendeten Expressionsvektoren pro Zelle wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse der durchgeführten *real-time*-PCR sind in Abbildung 25 dargestellt.

Tabelle 21: Plasmidkopienzahlen der verwendeten Expressions- und Kontrollvektoren im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7. Die angegebenen Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert aus drei unabhängigen Berechnungen inklusive Standardabweichung. Die Plasmidkopienzahlen der Vektoren pRhotHi-2 und pRhotHi-2-*bop* sind als Referenz ebenfalls aufgeführt.

	<i>R. capsulatus</i> B10S-T7
pRhotHi-2- <i>aftA</i>	90,6 ± 10,1
pRhotHi-2- <i>emb</i>	86,2 ± 7,2
pRhotHi-2- <i>EIN2</i> -MB	59,7 ± 4,2
pRhotHi-2- <i>sqep</i>	122,3 ± 11,3
pRhotHi-2	132,6 ± 5,5
pRhotHi-2- <i>bop</i>	48,0 ± 5,7

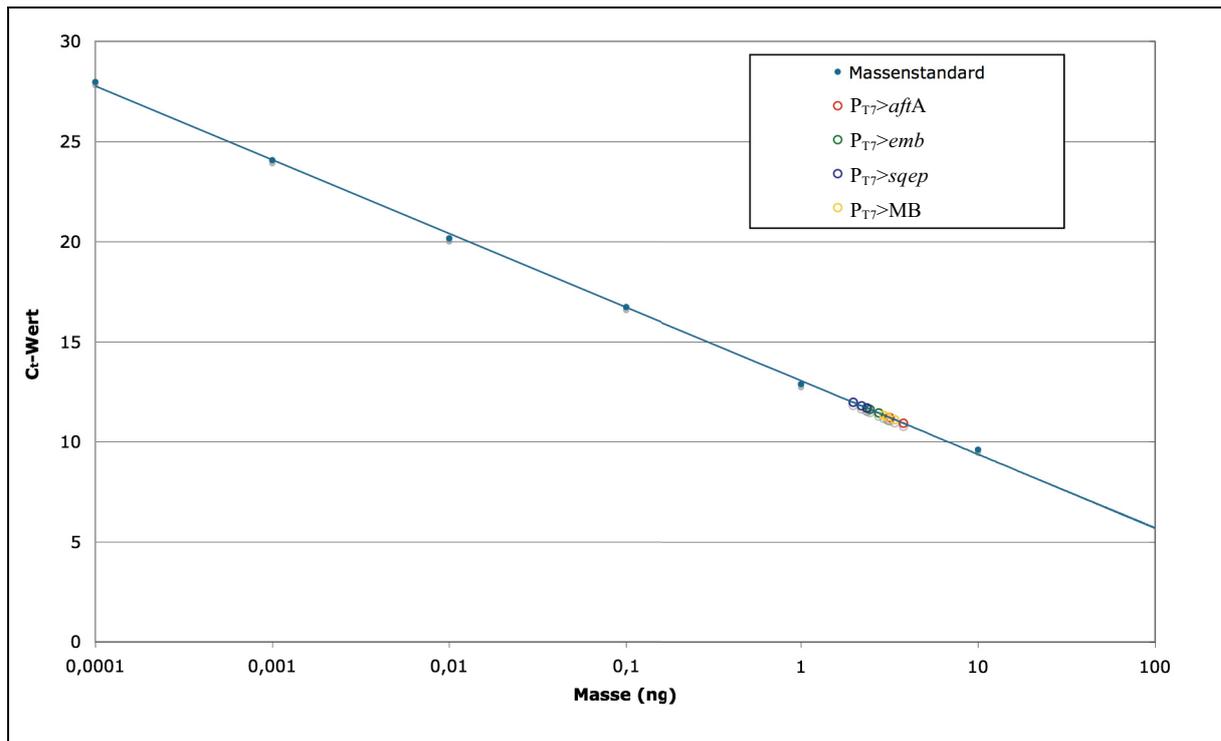


Abbildung 25: Graphische Darstellung der *real-time*-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Plasmidkopienzahlen der erzeugten rekombinanten Expressionsvektoren für *aftA*, *emb*, *sqep* und *EIN2-MB* pro Zelle in *R. capsulatus* B10S-T7. Erneut dargestellt sind die C_T-Werte der erzeugten PCR-Produkte in Abhängigkeit der Masse der erzeugten Produkte. Die C_T-Werte beschreiben den Schwellenwert-PCR-Zyklus (*threshold cycle*), bei dem im Verlauf der *real-time*-PCR die Fluoreszenzemission des verwendeten SYBR-Green-Farbstoffs das Hintergrundrauschen überschreitet. Durch den Einsatz eines Massenstandards kann an Hand dieser Daten die Kopienzahl der eingesetzten Vektoren pro Zelle berechnet werden. Weitere Informationen zu dieser Abbildung befinden sich im Text. Das Bestimmtheitsmaß des dargestellten Massenstandards betrug $R^2 = 0,9992$. P_{T7}>*aftA*: *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*aftA*; P_{T7}>*emb*: *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*emb*; P_{T7}>*sqep*: *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*sqep*; P_{T7}>MB: *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*EIN2-MB*.

Aus den in Tabelle 21 zusammengefassten Plasmidkopienzahlen der untersuchten Expressionsvektoren wird die bereits für den Bacterioopsin-Expressionsvektor pRhotHi-2-*bop* getroffene Aussage, dass sich die rekombinanten P_{T7}-abhängigen Expressionsvektoren in *R. capsulatus* B10S-T7 wie *mid-copy*-Plasmide verhalten, bestätigt. So betrug die Plasmidkopienzahl des Expressionsplamids pRhotHi-2-*sqep* in *R. capsulatus* B10S-T7 $122,3 \pm 11,3$ Kopien pro Zelle, und erreichte damit annähernd die Plasmidkopienzahl des Leervektors pRhotHi-2 mit $132,6 \pm 5,5$ Kopien pro Zelle. Dieses Ergebnis korrelierte damit mit den erzielten Zellzahlen der untersuchten Kulturen und zeigte, dass die Expression des *sqep*-Gens im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7 kaum zellulären Stress erzeugte, was auf die mögliche Akkumulation des Genprodukts bereits hindeuten könnte. Demgegenüber erreichten die Expressionsvektoren pRhotHi-2-*aftA*, pRhotHi-2-*emb* bzw. pRhotHi-2-*EIN2-MB* in *R. capsulatus* B10S-T7 um 30 %, 35 % bzw. 55 % geringere Kopienzahlen pro Zelle als der verwendete Leervektor pRhotHi-2. Dennoch war die Plasmidkopienzahl des Expressionsvektors pRhotHi-2-*EIN2-MB* mit $59,7 \pm 4,2$ Kopien pro

Zelle noch größer, als im Vektorplasmid pRhotHi-2-*bop* ($48,0 \pm 5,7$), das bereits verwendet wurde, um Bacterioopsin in *R. capsulatus* B10S-T7 erfolgreich in die Vesikel des ICM zu inserieren. Welchen Einfluss diese Plasmidkopienzahlen pro Zelle jedoch nun in *R. capsulatus* B10S-T7 auf die absolute Transkriptmasse hatten, wurde im Anschluss eingehend untersucht.

1.4.5.2 Bestimmung der Transkriptmassen der heterologen Gene *aftA*, *emb*, *sqep* und *EIN2-MB* im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7

Um zu analysieren, welchen Einfluss die unterschiedlichen Plasmidkopienzahlen der P_{T7}-abhängigen Expressionsvektoren pRhotHi-2-*aftA*, pRhotHi-2-*emb*, pRhotHi-2-*sqep* und pRhotHi-2-*EIN2-MB* auf deren Transkripte im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7 hatte, wurden die jeweiligen Transkriptmassen quantitativ bestimmt. Dazu wurde aus den entsprechenden 1000 ml Expressionskulturen (*R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-Zielgen; Zielgen: *aftA*, *emb*, *sqep*, bzw. *EIN2-MB*), die 24 Stunden photoheterotroph in RCV-Flüssigmedium (Induktorkonzentration: 8 mM Fructose) unter induzierenden Expressionsbedingungen angezogen wurden, die Gesamt-RNA in einer Dreifachbestimmung quantitativ isoliert. Aus jeweils 150 ng dieser Gesamt-RNA wurden die Zielgentranskripte mit Hilfe geeigneter Primer und reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde anschließend als Matritze für die quantitativen *real-time*-PCR eingesetzt, aus deren Ergebnissen die Masse der ursprünglichen Zielgentranskripte errechnet wurde (Tabelle 22). Als Massenstandard wurde erneut gereinigte und quantifizierte Plasmid-DNA des Leervektors pRhotHi-2 verwendet. Das Ergebnis der durchgeführten quantitativen Transkriptbestimmungen der Zielgene *aftA*, *emb*, *sqep* und *EIN2-MB* ist in Abbildung 26 dargestellt.

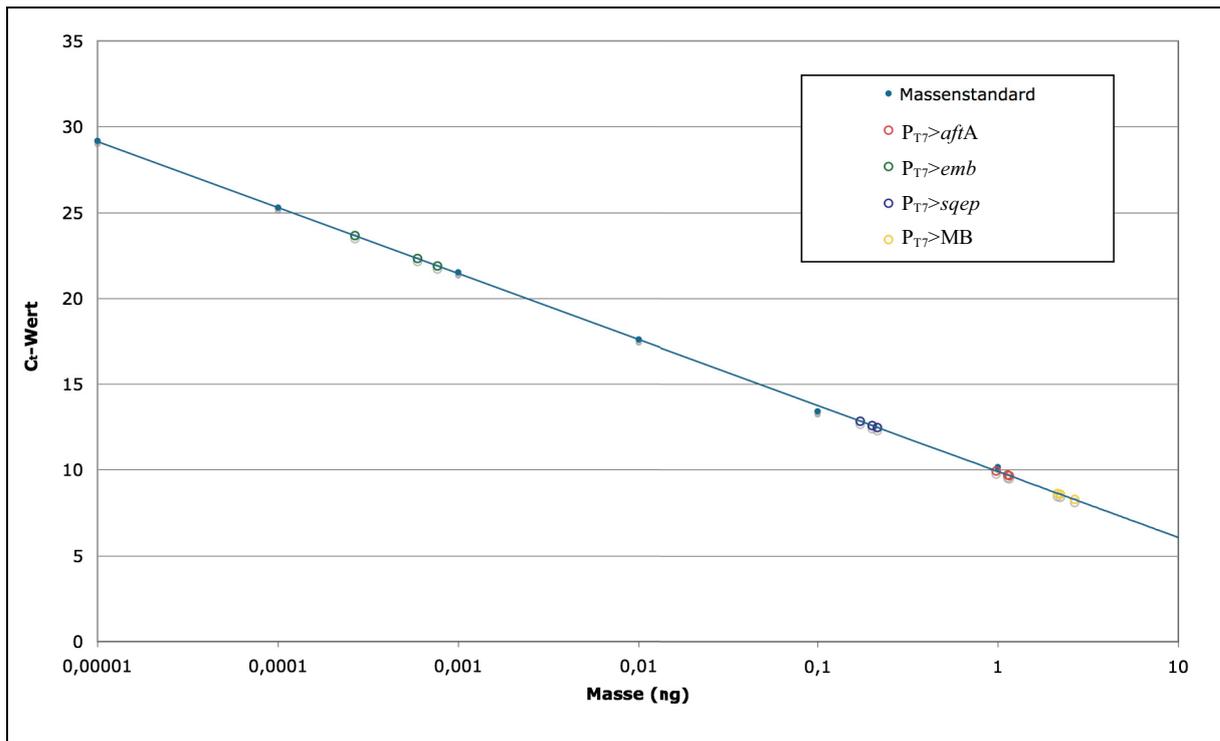


Abbildung 26: Graphische Darstellung der *real-time*-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Transkriptmassen für die Gene *aftA*, *emb*, *sqep* und *EIN2-MB* pro Zelle im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7. Dargestellt sind die C_t -Werte der erzeugten PCR-Produkte in Abhängigkeit der Masse der erzeugten Produkte. Die C_t -Werte beschreiben den Schwellenwert-PCR-Zyklus (*threshold cycle*), bei dem im Verlauf der *real-time*-PCR die Fluoreszenzemission des verwendeten SYBR-Green-Farbstoffs das Hintergrundrauschen überschreitet. Durch den Einsatz eines Massenstandards konnte die Transkriptmasse der betreffenden Zielgene errechnet werden. Weitere Informationen zu dieser Abbildung befinden sich im Text. Das Bestimmtheitsmaß des dargestellten Massenstandards betrug $R^2 = 0,9993$. P_{T7}>*aftA*: *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*aftA*; P_{T7}>*emb*: *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*emb*; P_{T7}>*sqep*: *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*sqep*; P_{T7}>MB: *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*EIN2-MB*.

Um auch für die hier getesteten Transkripte die gleich bleibende Qualität der isolierten RNA zu überprüfen und um ausschließen zu können, dass es sich bei den nachgewiesenen Transkripten um Kreuzreaktionen der verwendeten *Primer* oder DNA-Kontaminationen handelte, wurden geeignete Transkriptionskontrollen und Negativkontrollen, wie sie bereits für das Bacterioopsintranskript beschrieben wurden, durchgeführt. Analog dazu wurde als Transkriptionskontrolle das konstitutiv exprimierte *aphII*-Gen nachgewiesen. Als Negativkontrollen dienten zum einen Zielgen-transkribierende Proben, die keiner reversen Transkription unterzogen wurden und zum anderen Proben, die plasmidkodiert kein Zielgen trugen.

Zur Veranschaulichung sind die erzeugten PCR-Produkte der *real-time*-PCR gelelektrophoretisch analysiert worden (Abbildung 27). Analog zu den anderen im Rahmen dieser Arbeit bereits durchgeführten Transkriptnachweisen konnte für den Expressionsstamm *R. capsulatus* B10S-T7 an Hand der in Abbildung 27 visualisierten PCR-Produkte der durchgeführten *real-time*-PCR bestätigt werden, dass es sich bei dem nachgewiesenen

Zielgen-Transkripten tatsächlich um das spezifische Transkripte der Zielgene handelte. So wurden keine unspezifische Signale durch Kreuzreaktionen von *Primern* (kein PCR-Produkt in den Negativkontrollen 1) oder DNA-Kontamination der Probe (kein PCR-Produkt in den Negativkontrollen 2) erhalten. Auch die gleich bleibende Qualität der eingesetzten Transkripte konnte durch Verwendung des internen Standards bestätigt werden (deutliches PCR-Produkt sichtbar in den Transkriptionskontrollen).

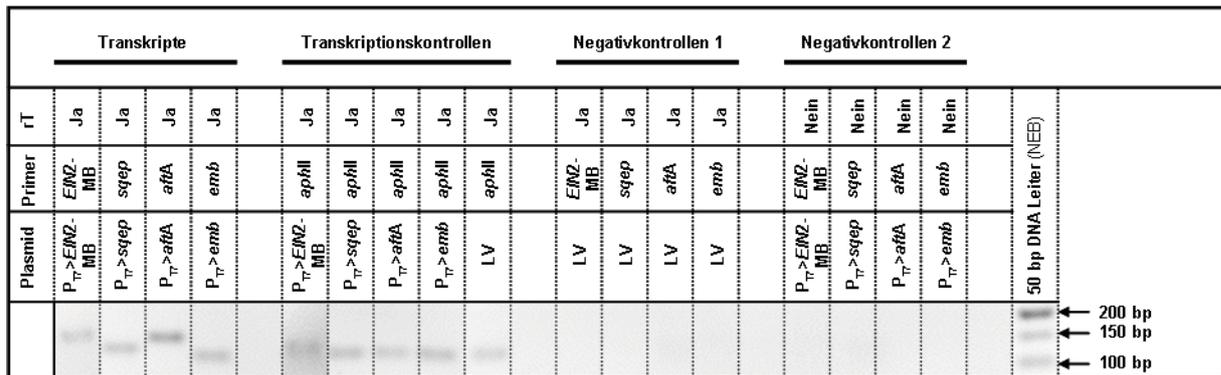


Abbildung 27: Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte der quantitativen *real-time-PCR* zur Bestimmung der Zielgen-Transkriptmassen von *aftA*, *emb*, *sqep* und *EIN2-MB* im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7. Dazu wurden jeweils 3 μ l der PCR-Produkte auf ein 3 %-iges Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe von Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert. Wie erkennbar ist, akkumulierten die PCR-Produkte der Zielgen-Transkripte deutlich (Transkripte). Ebenso akkumulierten die PCR-Produkte der *aphII*-Transkripte, welche als Transkriptionskontrolle eingesetzt wurden. Keine PCR-Produkte wurden sichtbar in den durchgeführten Negativkontrollen, was damit die Kontamination durch DNA ausschloss, ebenso wie die Bildung unspezifischen Produkts durch Kreuzreaktion der verwendeten *Primer*. $P_{T7}>EIN2-MB$: pRhotHi-2-*EIN2-MB*; $P_{T7}>sqep$: pRhotHi-2-*sqep*; $P_{T7}>aftA$: pRhotHi-2-*aftA*; $P_{T7}>emb$: pRhotHi-2-*emb*; LV: Leervektor (pRhotHi-2); rT: reverse Transkription.

Tabelle 22: Vergleich der Transkriptmassen der heterologen Gene *aftA*, *emb*, *sqep* und *EIN2-MB* im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7. Die angegebenen Massen repräsentieren jeweils den Mittelwert aus drei unabhängigen Berechnungen inklusive Standardabweichung.

Transkript	Transkriptmasse (ng / 150 ng Gesamt-RNA) in <i>R. capsulatus</i> B10S-T7
<i>aftA</i>	$1,09 \pm 9,70 \cdot 10^{-2}$
<i>emb</i>	$5,43 \cdot 10^{-4} \pm 2,53 \cdot 10^{-4}$
<i>sqep</i>	$1,96 \cdot 10^{-1} \pm 2,13 \cdot 10^{-2}$
<i>EIN2-MB</i>	$2,34 \pm 2,78 \cdot 10^{-1}$
<i>bop</i>	$5,89 \cdot 10^{-4} \pm 2,01 \cdot 10^{-4}$

Somit konnten an Hand der in Abbildung 26 dargestellten Standardgerade und aus den Daten der quantitativen *real-time-PCR* die absoluten Massen der ursprünglich eingesetzten

Zielgentranskripte aus *R. capsulatus* B10S-T7 errechnet werden. Diese Transkriptmassen sind in Tabelle 22 wiedergegeben.

Wie der Vergleich der Transkriptmassen der untersuchten Zielgene aus Tabelle 22 mit den Transkriptmassen der untersuchten *E. coli* Expressionssysteme (Tabelle 19) zeigt, bewegten sich die ermittelten Transkriptmassen für die Gene *aftA*, *emb* und *EIN2-MB* in der gleichen Größenordnung wie die Massen der Transkripte aus den entsprechenden *E. coli* BL21(DE3) Kulturen. Dennoch waren die Transkriptmassen aller untersuchten Zielgene in *R. capsulatus* B10S-T7 praktisch identisch mit den Transkriptmassen in *E. coli* BL21(DE3) (trifft zu für das *aftA*-Transkript) oder größer (trifft zu für die *bop*-, *emb*-, *sqep*- und *EIN2-MB*-Transkripte). Dies fällt besonders für das Transkript der Squalenepoxidase auf, deren Transkriptmasse in *R. capsulatus* B10S-T7 240-mal größer war, als in *E. coli* BL21(DE3). Im Vergleich der Zielgentranskriptmassen im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7 zum *E. coli* Expressionsstamm C43(DE3) wurde deutlich, dass sich lediglich die Transkriptmasse des Bacterioopsins ähnlich verhält. Die Transkriptmassen der anderen Zielgene *aftA*, *emb*, *sqep* und *EIN2-MB* waren in *E. coli* C43(DE3) bis zum Faktor 1500000 niedriger als in *R. capsulatus* B10S-T7.

Ob die Zielgentranskripte jedoch auch translatiert wurden und die korrespondierenden Genprodukte in *R. capsulatus* B10S-T7 akkumulierten, konnte erst die anschließende immunologische Untersuchung der Testkulturen nachweisen.

1.4.5.3 Akkumulation und Lokalisation der Genprodukte AftA, Emb, Sqep und EIN2-MB im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7

Um der Fragestellung nachzugehen, ob die unterschiedlich großen Transkriptmassen der Gene *aftA*, *emb*, *sqep* und *EIN2-MB* einen Einfluss auf die Proteinakkumulation in *R. capsulatus* B10S-T7 hatten und ob die entsprechenden Genprodukte überhaupt akkumulierten und, wenn ja, wo sie lokalisiert waren, wurden aus 1,5 ml der jeweiligen 1000 ml Expressionskulturen zellfreie Proteinextrakte hergestellt und fraktioniert. Die Anzucht der *R. capsulatus* B10S-T7 Zellen (mit Expressionsplasmid pRhotHi-2-*aftA*, pRhotHi-2-*emb*, pRhotHi-2-*sqep* bzw. pRhotHi-2-*EIN2-MB*) erfolgte für 24 Stunden photoheterotroph in 1000 ml RCV-Medium unter Selektionsdruck, mit 8 mM Fruktose als Induktor.

Anschließend wurden aus 1,5 ml dieser Kulturen zellfreie Proteinextrakte hergestellt und fraktioniert. Um diese in Bezug auf die Akkumulation und Lokalisation der Zielgenprodukte untersuchen zu können, wurden Extrakte aus Zellen, deren optische Dichte bei 660 nm drei

war, unter Verwendung eines spezifischen Antiserums mittels Westernblotanalyse untersucht (Abbildung 28).

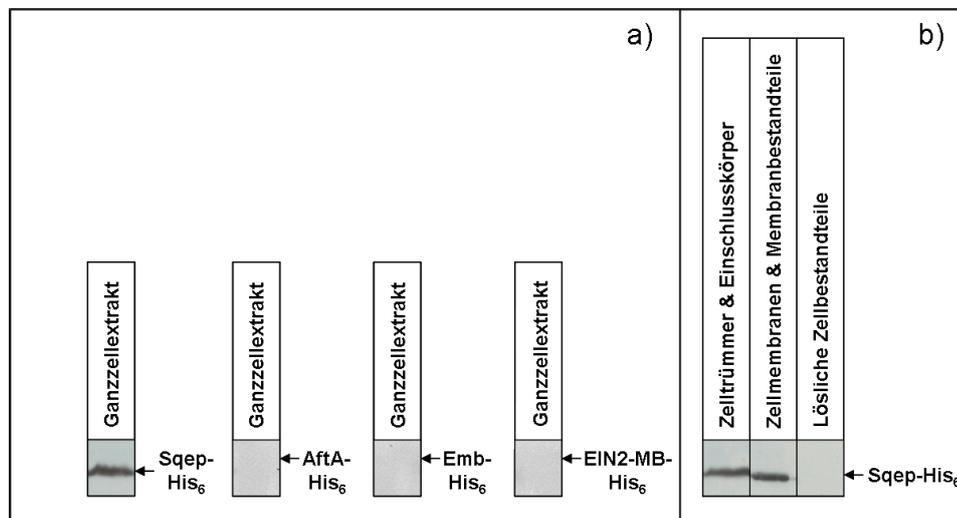


Abbildung 28: Akkumulation und Lokalisation von AftA, Emb, Sqep und EIN2-MB in *R. capsulatus* B10S-T7. Unter Verwendung gleicher Zellzahlen, deren optische Dichte bei 660 nm drei betrug, ist die Akkumulation der Ganzzellextrakte von Sqep, AftA, Emb, und EIN2-MB als Fusionsproteine mit Hexahistidin-Tag am C-Terminus im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7 dargestellt. Der immunologische Nachweis der Genprodukte erfolgte unter Verwendung eines spezifischen Antiserums. (a) Für die Genprodukte AftA, Emb und EIN2-MB konnte kein spezifisches Signal erhalten werden, sodass ihre Akkumulation in den untersuchten Expressionssystemen ausgeschlossen werden konnte. Demgegenüber akkumulierte Squalenepoxidase (a) in signifikanten Mengen. Das Genprodukt der Squalenepoxidase war dabei nicht nur in Einschlusskörpern nachweisbar, sondern ebenfalls in der Membranfraktion des Expressionswirts (b). Als Expressionssysteme wurde der *R. capsulatus* Stamm B10S-T7 mit den Expressionsplasmiden pRhotHi-2-*sqep*, pRhotHi-2-*aftA*, pRhotHi-2-*emb* bzw. pRhotHi-2-*EIN2-MB* verwendet.

Wie jedoch aus Abbildung 28a hervorgeht, konnte lediglich die Squalenepoxidase erfolgreich in *R. capsulatus* B10S-T7 akkumuliert werden. Demgegenüber war die Synthese der Genprodukte AftA, Emb und EIN2-MB, ungeachtet der zum Teil sehr hohen Transkriptmassen, nicht nachweisbar. Mögliche Gründe dafür werden im Rahmen der Diskussion dieser Arbeit noch erörtert.

Aus Abbildung 28b geht allerdings zusätzlich hervor, dass Squalenepoxidase im neuen *R. capsulatus* Expressionssystem, bestehend aus dem Expressionsstamm B10S-T7 und dem P_{T7}-abhängigen Expressionsplasmid pRhotHi-2-*sqep*, nicht nur in signifikanten Mengen akkumulierte, sondern zur Hälfte in die Membran des Wirtsorganismus inserierte. Somit konnte in *R. capsulatus* B10S-T7 erstmals bewiesen werden, dass die computergestützte Vorhersage, es handle sich bei der Squalenepoxidase aus *S. aurantiaca* um ein Membranprotein, zutraf.

Ausgehend davon sollte nun weiter untersucht werden, ob die Squalenepoxidase, ähnlich wie Bacterioopsin, in die Vesikel des intracytoplasmatischen Membransystems (ICM) von photoheterotroph angezogenen *R. capsulatus* B10S-T7 Zellen inseriert. Sollte dies der Fall

sein, könnten diese ICM-Vesikel, genau wie die Bacterioopsin-enthaltenden Vesikel, mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden und stünden dann unmittelbar für weitere Anwendungen in ihrer natürlichen Umgebung in einer Art Nanobioreaktor zur Verfügung.

Um dies zu überprüfen, wurden zunächst erneut 1000 ml Expressionskulturen von *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*sqep* unter induzierenden Wuchsbedingungen (8 mM Fruktose) photoheterotroph in RCV-Medium unter Selektionsdruck angezogen. Als Kontrollkulturen wurden vergleichbare Kulturen des *R. capsulatus* Expressionsstamms B10S-T7 verwendet, die den Leervektor pRhotHi-2 trugen.

Anschließend wurde aus 1 ml der Expressions- und Kontrollkulturen das Photopigment Bacteriochlorophyll a mit Ethanol extrahiert. Das Extrakt wurde danach bei 770 nm photometrisch vermessen und zur optischen Dichte der verwendeten Kulturen bei 600 nm sowie deren Volumen ins Verhältnis gesetzt und mit dem relativen Bacteriochlorophyll a Gehalt in den entsprechenden Kontrollkulturen verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 29 dargestellt.

Wie aus Abbildung 29 hervorgeht, unterschied sich der relative Bacteriochlorophyll a Gehalt in den Squalenepoxidase-Expressionskulturen sowie den Kontrollkulturen signifikant. So ging der relative Bacteriochlorophyll a Gehalt in den Expressionskulturen um 14 % zurück, was vermutlich auf die Verdrängung von Photosyntheseenzymkomplexen durch das heterologe Protein Squalenepoxidase zurückzuführen war. Auch wenn der Rückgang des normalisierten Bacteriochlorophyll a Gehalts in den *Sqep*-Expressionskulturen geringer ausfiel, als in den Bacterioopsin-exprimierenden Kulturen, so war dieses Ergebnis bereits ein guter Hinweis darauf, dass *Sqep* tatsächlich in das ICM des Expressionsstamms *R. capsulatus* B10S-T7 inserieren könnte.

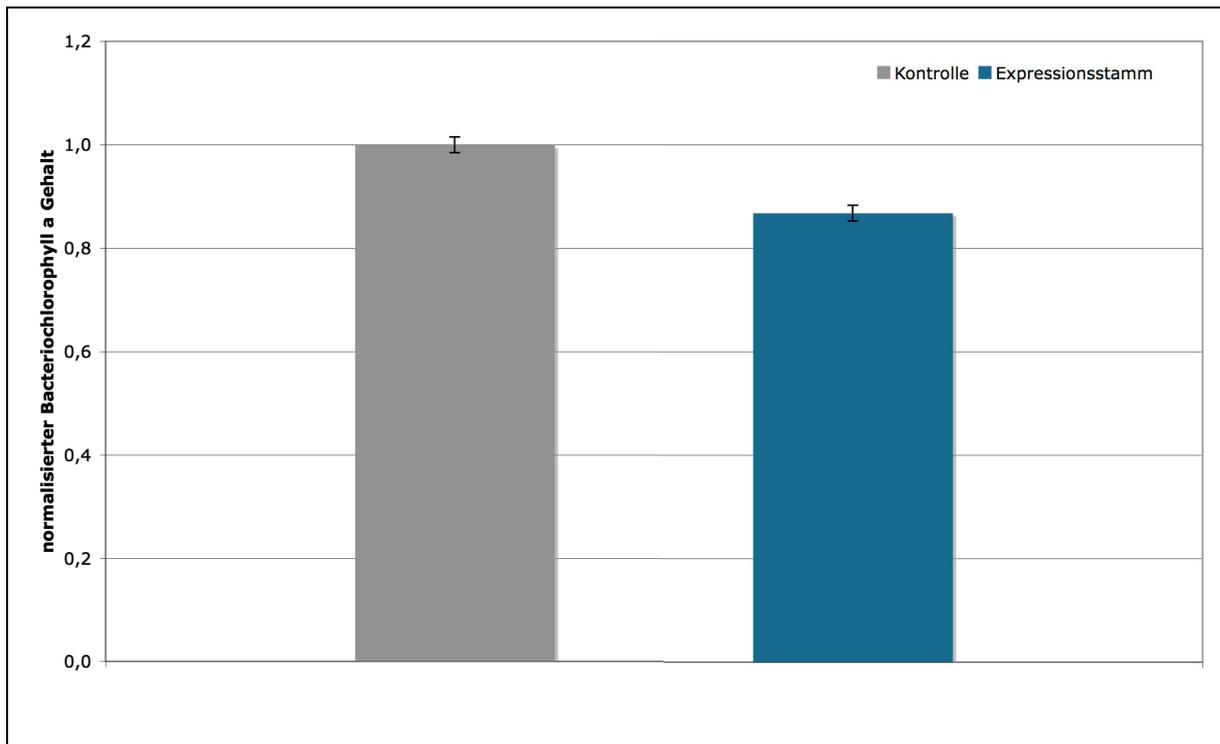


Abbildung 29: Photometrischer Test zum Nachweis des Squalenepoxidaseeinbaus in die ICM Vesikel des Expressionsstamms *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*sqep*. Zum Nachweis, dass Squalenepoxidase in die Vesikel des ICM der Zellen der verwendeten Expressionskultur eingebaut wurde, wurde das Photopigment Bacteriochlorophyll a mit Ethanol extrahiert und der Bacteriochlorophyll a Gehalt des Extrakts bei 770 nm photometrisch bestimmt. Er ist ein Maß für die Menge an photosynthetischen Enzymkomplexen in der ICM, da Bacteriochlorophyll a darin als Photopigment enthalten ist. Als Kontrolle wurde eine *R. capsulatus* B10S-T7 Kultur verwendet, in der kein heterologes Membranprotein synthetisiert wurde. Die Zellen dieser Kultur enthielten den Leervektor pRhotHi-2. Der Bacteriochlorophyll a Gehalt beider Kulturen wurden bezogen auf eine Zellzahl, die einer optischen Dichte von 1 bei 660 nm entsprach sowie auf ein Volumen von 1 ml. Außerdem wurde der Bacteriochlorophyll a Gehalt auf den Wert der Kontrollprobe normalisiert. Die gesamte Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die angegebenen Werte repräsentieren daher den Mittelwert dieser Messungen. Die Fehlerbalken geben die entsprechende Standardabweichung wieder. Kontrolle: *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2; Expressionsstamm: *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*sqep*.

Um dies zu überprüfen, wurde aus Zellen, die einer optischen Dichte von 500 bei 660 nm entsprachen, der oben beschriebenen Kulturen zellfreie Proteinextrakte fraktioniert. Zur anschließenden Isolierung der Vesikel des ICM wurden die gesamten Membranfraktionen mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Dazu wurde erneut ein kontinuierlicher Saccharosedichtegradient von 10 bis 60 Gew.-% Saccharose hergestellt und mit den zellfreien Membranbestandteilen für 17 Stunden bei $175000 \times g$ ultrazentrifugiert. Dadurch wurden die Bestandteile der Membranfraktion entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Während schwere Membranbestandteile sedimentiert werden, „schweben“ die ICM-Vesikel im Dichtegradienten. Da diese ICM-Vesikel Photosyntheseenzymkomplexe enthalten, sind sie durch die intensive Färbung ihre Pigmente im Gradienten leicht zu identifizieren. Ein Foto eines Saccharosedichtegradienten mit *Sqep*-haltigen ICM-Vesikeln ist in Abbildung 30 dargestellt.

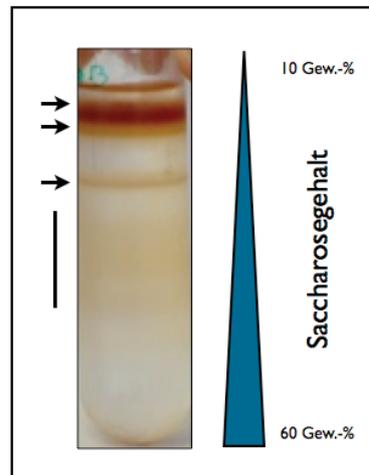


Abbildung 30: Auftrennung der Membranfraktion einer *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*sqep* Expressionskultur durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation. Dargestellt ist ein Saccharosedichtegradient von 10 – 60 Gew.-% Saccharose, der dazu verwendet wurde, die Vesikel des ICM der eingesetzten Membranfraktion auf Grund ihrer unterschiedlichen Dichte von größeren Membranbestandteilen durch Ultrazentrifugation zu trennen. Mit Pfeilen hervorgehoben sind drei definierte, gefärbte Banden im Dichtegradienten. Durch die schwarze Linie ist eine weitere breite, sehr schwach gefärbte Bande markiert. Die Färbung entsteht durch die Pigmente der Photosystemkomplexe der ICM Vesikel.

Vergleicht man das Foto des in Abbildung 30 dargestellten Dichtegradienten mit dem des Bacterioopsin-enthaltenden aus Abbildung 15 so wird deutlich, dass sich die Bandenmuster unterscheiden. Waren im Gradienten, der Bacterioopsin enthielt, zwei definierte Banden zu erkennen, enthielt der Gradient aus Abbildung 30 im oberen Bereich (niedrige Saccharosekonzentration) zwei unterschiedlich gefärbte Banden, sowie eine hellere Bande nach dem ersten Drittel des Gradienten, an die sich eine breite, sehr schwache Bande anschließt. Dies war bereits ein Indiz für die Akkumulation von Squalenepoxidase in die Vesikel des ICM, was offensichtlich eine Auswirkung auf die Dichte der Vesikel im Saccharosegradienten zu haben schien.

Um dies näher zu untersuchen, wurde der Saccharosedichtegradient in Fraktionen zu je 1 ml abgenommen. In den Fraktionen wurde anschließend der Saccharosegehalt mit Hilfe eines Refraktometers bestimmt, sowie der Proteingehalt mittels Bradfordanalyse. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 zusammengefasst.

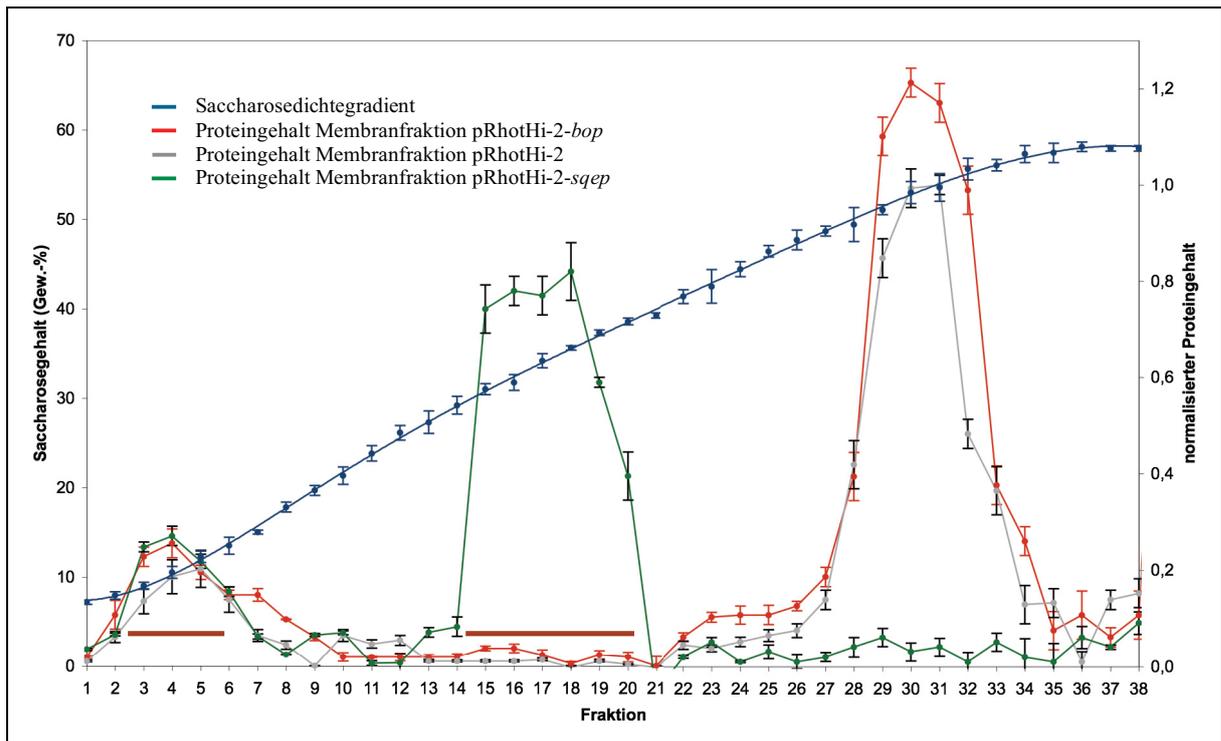


Abbildung 31: Isolierung der ICM Vesikel aus der photosynthetischen Membran von *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-*sqep*. Mit Hilfe analytischer Dichtegradientenzentrifugation im kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten wurden die Vesikel des ICM der untersuchten Membranfraktionen der *R. capsulatus* Expressionskultur B10S-T7 pRhotHi-2-*sqep* (grün) und der Kontrollkultur B10S-T7 pRhotHi-2 auf Grund ihrer Dichte von größeren Membranbestandteilen isoliert. Der Gradient wurde anschließend in Fraktionen zu je 1 ml abgetragen und der Proteingehalt in diesen Fraktionen mittels Bradford-Analyse ermittelt. Anschließend wurde der relative Proteingehalt aller Fraktionen auf den Proteingehalt der Fraktion 30 des Kontrollgradienten normalisiert und in Abhängigkeit zur Fraktionsnummer graphisch dargestellt. Dabei beschreibt die grüne Kurve den normalisierten Proteingehalt im Dichtegradienten, der Squalenepoxidase enthält und die graue Kurve den normalisierten Proteingehalt der verwendeten Kontrolle. Zum Vergleich stellt die rote Kurve den normalisierten Proteingehalt im bereits untersuchten Dichtegradienten, der Bacterioopsin enthielt, dar. Der Saccharosegehalt in den Fraktionen wurde mit Hilfe eines Refraktometers bestimmt (blaue Kurve). Die dargestellten Werte repräsentieren jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Die Fehlbalken repräsentieren die jeweilige Standardabweichung dieser Messungen. Die braunen Balken repräsentieren die Fraktionen der Dichtegradienten, die durch die Photopigmente der Photosystemkomplexe gefärbt waren.

Wie im Vergleich der in Abbildung 31 dargestellten Saccharosedichtegradienten der Squalenepoxidase-enthaltenden Membranfraktion mit den Membranfraktionen der Bacterioopsin-exprimierenden *R. capsulatus* B10S-T7 Kultur sowie der Kontrollkultur (*R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2) zeigt, schien die Synthese von Squalenepoxidase in *R. capsulatus* B10S-T7 einen Einfluss auf die Dichte der ICM-Vesikel zu haben. So existierten zwar immer noch ICM-Vesikel mit unterschiedlichen Dichten, die Vesikel mit der höheren Dichte sind jedoch in Fraktionen mit geringerem Saccharosegehalt (Fraktion 15 – 20; Saccharosegehalt 29,20 – 38,56 Gew.-%) verschoben. Außerdem wurde deutlich, dass der normalisierte Proteingehalt in diesen Fraktionen geringer war, als in den Fraktionen der schweren Vesikel der Bacterioopsin-enthaltenden Membranfraktion sowie der Kontrolle. Möglicherweise wird in den Vesikeln der Membranfraktion der *sqep*-exprimierenden *R. capsulatus* B10S-T7 Kultur das Genprodukt *Sqep* in die Vesikel eingebaut. Wenn es dabei auf

Grund seiner Größe (51 kDa) mehr Photosystemkomplexe als die Bacterioopsin (27 kDa) verdrängt, könnte dies letztendlich zu einer niedrigeren Dichte der Vesikel führen und folglich zur Akkumulation in Fraktionen des Dichtegradienten mit niedrigerer Saccharosekonzentration, wie es in Abbildung 31 zu sehen ist.

Um zu beweisen, dass die beschriebenen Effekte auch tatsächlich auf den Einbau von Squalenepoxidase in die ICM-Vesikel zurückzuführen sind, wurden anschließend 0,5 ml der entsprechenden Fraktionen mit 1,5 ml SP-Puffer verdünnt und die Vesikel durch Zentrifugation sedimentiert. Aus dem Sediment wurden anschließend Proteinextrakte hergestellt, von denen 25 µl zur immunologischen Analyse mit spezifischen Antikörpern eingesetzt wurden. Die Dokumentation dieses Squalenepoxidase-Nachweises ist in Abbildung 32 dargestellt.

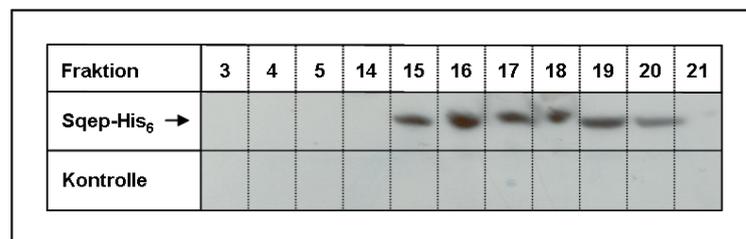


Abbildung 32: Immunologischer Nachweis von Squalenepoxidase in den Vesikeln des ICM von *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-sqep. Zunächst wurden die ICM Vesikel einer *R. capsulatus* B10S-T7 Squalenepoxidase-Expressionskultur mit P_{T7}-abhängigem Expressionsvektor pRhotHi-2-sqep durch analytische Saccharosedichtegradientenzentrifugation isoliert. Danach wurde Squalenepoxidase in den Protein-enhaltenden Fraktionen (nach Bradford-Analyse) des Dichtegradienten mit Hilfe eines spezifischen Antiserums immunologisch nachgewiesen. Dazu wurden jeweils 0,5 ml der betreffenden Fraktionen mit 1,5 ml SP-Puffer verdünnt und die Vesikel sedimentiert. Aus dem Sediment wurden Proteinextrakte hergestellt. Anschließend wurden 25 µl dieser Proteinextrakte mit einem spezifischen Antiserum immunologisch untersucht. Es wurde festgestellt, dass Squalenepoxidase in den Vesikeln in den Fraktionen 15 – 20 des analytischen Dichtegradienten akkumuliert. Als Kontrolle wurde eine *R. capsulatus* B10S-T7 Kultur mit Leervektor (pRhotHi-2) verwendet. Für die analytische Dichtegradientenzentrifugation wurde die Membranfraktion von Zellen mit einer Zellzahl verwendet, die einer optischen Dichte von 500 bei 660 nm entsprach.

Der in Abbildung 32 dargestellte immunologische Nachweis von Squalenepoxidase mit spezifischen Antikörpern zeigte, dass Squalenepoxidase ausschließlich in den Vesikeln größerer Dichte akkumuliert. Im Gegensatz zu Bacterioopsin, das sich in nach Abnahme des Saccharosedichtegradienten in nur einer Fraktion mit exakt definierter Dichte befand, akkumuliert die Squalenepoxidase in allen abgenommenen Fraktionen der ICM-Vesikel größerer Dichte (Fraktionen 15 – 20; 29,20 – 38,56 Gew.-% Saccharose).

Dennoch zeigte der immunologische Nachweis eindeutig, dass die Squalenepoxidase in *R. capsulatus* B10S-T7 pRhotHi-2-sqep in den Vesikeln des ICM akkumuliert und somit nach der Isolation mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation unmittelbar für weitere Anwendungen und Charakterisierungen zur Verfügung stand.

Nachdem mit Hilfe des P_{T7} -abhängigen Expressionsplasmids pRhotHi-2-*sqep* in *E. coli* BL21(DE3) und C43(DE3) erstmals die Akkumulation signifikanter Mengen Squalenepoxidase gelang, nicht jedoch die Akkumulation der Arabinofuranosyltransferasen AftA und Emb, des EIN2 und der N-terminalen Membrandomäne des EIN2 (EIN2-MB), sollte nun untersucht werden, in wie weit diese Proteine in *R. capsulatus* B10S-T7 synthetisiert werden konnten. Dazu wurde die Transkription der korrespondierenden Gene in *R. capsulatus* B10S-T7 ebenso analysiert, wie die Akkumulation und Lokalisation der Genprodukte. Dabei wurde festgestellt, dass die Expression des *EIN2*-Gens im *R. capsulatus* Expressionssystem, bestehend aus dem *R. capsulatus* Stamm B10S-T7 und dem P_{T7} -abhängigen Vektor pRhotHi-2-*EIN2*, wie in den bereits untersuchten Expressionsstämmen *E. coli* BL21(DE3) und C43(DE3) letal war. Im Gegensatz dazu wurden die Expressionsplasmide pRhotHi-2-*aftA*, pRhotHi-2-*emb*, pRhotHi-2-*sqep* und pRhotHi-2-*EIN2*-MB im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7 als *mid-copy*-Plasmide etabliert. Im Vergleich dazu wurden die beschriebenen Expressionsplasmide in den *E. coli* Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3) nur als *low-copy*-Plasmide etabliert. Aus diesem Grund war die Transkriptmasse der untersuchten Zielgene in *R. capsulatus* B10S-T7 auch generell größer, als in den vergleichbaren *E. coli* Stämmen. Lediglich für Bacterioopsin war die Transkriptmasse in *E. coli* C43(DE3) größer als in *R. capsulatus* B10S-T7. Trotz der zum Teil sehr großen Transkriptmassen der untersuchten Gene im Vergleich zu Bacterioopsin konnte auch in *R. capsulatus* B10S-T7 lediglich Squalenepoxidase akkumuliert werden. Diese akkumulierte jedoch nicht wie in *E. coli* vollständig in Einschlusskörpern, sondern zur Hälfte in der Membran des Expressionswirtes. Somit konnte durch Verwendung des neuen *R. capsulatus* Expressionssystems auch bestätigt werden, dass es sich bei der Squalenepoxidase aus *S. aurantiaca* tatsächlich um ein Membranprotein handelt. Mit Hilfe des für Bacterioopsin entwickelten photometrischen Tests zur Bestimmung des Bacteriochlorophyll a Gehalts der photosynthetischen Membranen, konnte für die Squalenepoxidase gezeigt werden, dass sie in das ICM von *R. capsulatus* B10S-T7 inseriert. Diese Vermutung wurde durch den immunologischen Nachweis in Vesikeln der ICM nach Dichtegradientenzentrifugation bestätigt. Somit war es außerdem möglich, die *Sqep*-enthaltenden Vesikel zu isolieren und für mögliche weiterführende Anwendungen bereitzustellen.

2 Untersuchungen zur Carotinoidsynthese in *R. capsulatus*

Carotinoide sind heutzutage aus vielen Bereichen des menschlichen Alltags nicht mehr wegzudenken. Sie finden Verwendung als Lebensmittelfarbstoff, werden als Zusatzstoff in Tierfutter eingesetzt oder dienen als Nahrungsergänzungsmittel und Kosmetikzusatz. Durch diese immer größer werdenden Märkte steigt auch die industrielle Bedeutung von Carotinoiden. Obwohl neben der chemischen Totalsynthese mittlerweile verschiedene Algen zur industriellen Carotinoidbiosynthese verwendet werden, besteht weiterhin großer Bedarf, alternative Synthesewege für die Carotinoidproduktion zu finden. Ein möglicher Weg ist die biotechnologische Produktion von Carotinoiden in Bakterien.

Ein Beispiel hierfür ist die Carotinoidproduktion in *Escherichia coli*. Da *E. coli* natürlicherweise jedoch keine Carotinoide synthetisiert, mussten alle heterologen Gene für die Carotinoidsynthese mit gentechnischen Methoden in die verwendeten Stämme eingebracht werden, wodurch ihre Syntheseleistung jedoch stark beeinflusst wurde. Somit betrug die Carotinoideausbeute in *E. coli* auch nur zwischen 10 und 820 µg pro g Trockenmasse (Nishizaki *et al.*, 2007; Ruther *et al.*, 1997; Schmidt-Dannert, 2000).

Die eigentlichen Engpässe bei der heterologen Synthese von Carotinoiden in nicht-carotinogenen Organismen sind jedoch die zumeist geringe Menge an Isoprenoid-Vorgängermolekülen (Abbildung 33), sowie der unzureichende Raum für die Speicherung lipophiler Substanzen (Lee & Schmidt-Dannert, 2002). Diese Limitierungen können jedoch überwunden werden, wenn für die Synthese von Carotinoiden phototrophe Organismen verwendet werden, die auf Grund ihrer Physiologie bereits in der Lage sind, größere Mengen Carotinoide zu synthetisieren und zu akkumulieren (Harker & Hirschberg, 1998).

Ein möglicher Synthesewirt in diesem Zusammenhang ist das fakultativ anaerobe Purpurbakterium *R. capsulatus*. Dieses ist in der Lage, sowohl photoheterotroph als auch photoautotroph zu wachsen. Dazu produziert es eine Vielzahl Carotinoide als Schutzpigmente sowie als akzessorische Pigmente der Photosynthese, wobei Spheroiden das Hauptcarotinoid von *R. capsulatus* darstellt (Abbildung 33).

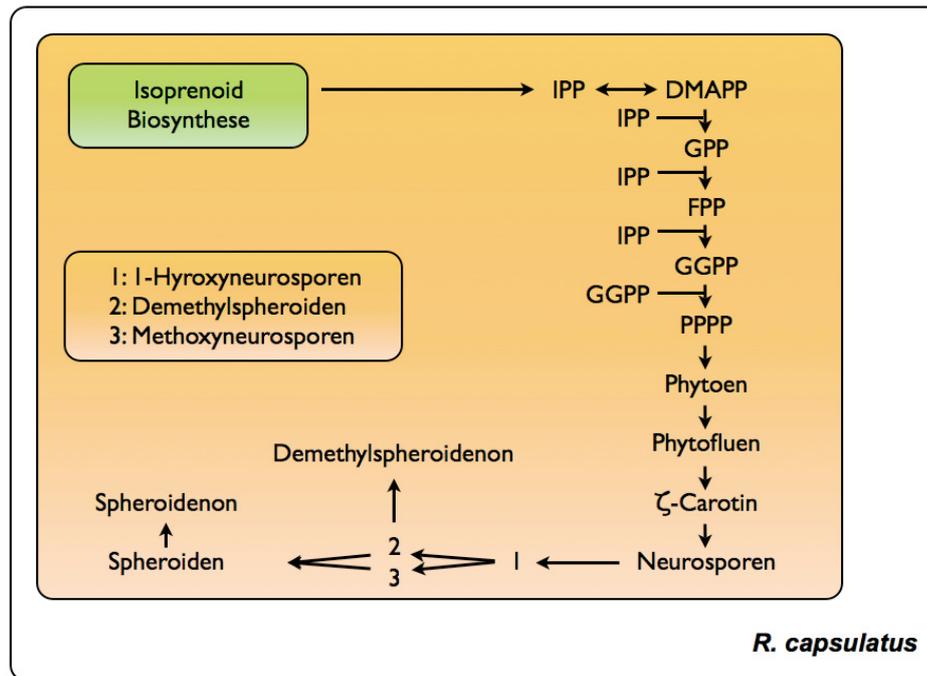


Abbildung 33: Carotinoidsynthese in *R. capsulatus*. Ausgehend von der Isoprenoidbiosynthese und dem Isopentenylpyrophosphat (IPP) wird über eine Vielzahl von Zwischenstufen in *R. capsulatus* dessen Hauptcarotinoid Spheroiden synthetisiert. DMAPP: Dimethylallylpyrophosphat; GPP: Geranylpyrophosphat; FPP: Farnesylpyrophosphat; GGPP: Geranylgeranylpyrophosphat; PPPP: Prephytyenpyrophosphat.

Um jedoch überhaupt photoheterotroph oder photoautotroph wachsen zu können, wandelt *R. capsulatus* mit Hilfe seiner Photosyntheseenzymkomplexe Lichtenergie in einem zyklischen Prozess in Energieäquivalente in Form von ATP um. Die dazu notwendige Energie wird durch Lichtabsorption der Photopigmente aufgenommen. Sie sind Teil der Lichtsammelkomplexe des Photosystems und daher im intracytoplasmatischen Membransystems (ICM) von *R. capsulatus* lokalisiert. Dabei beeinflussen die gewählten Lichtbedingungen die Zusammensetzung der photosynthetischen Membranen von *R. capsulatus* zum Teil erheblich, was sich zum einen in der Oberflächengröße der Membranen, und zum anderen in der Zusammensetzung der photosynthetischen Membranen widerspiegelt. So vergrößert sich die Oberfläche des ICM von *R. capsulatus* unter Schwachlichtbedingungen deutlich im Vergleich zu Zellen, die unter Starklichtbedingungen kultiviert wurden. Diese zusätzliche Membranoberfläche wird von dem phototrophen Bakterium zum Einbau weiterer Lichtsammelkomplexe verwendet, um der Wuchslimitierung durch fehlende Energie in Form von ATP entgegenzuwirken. In Bezug auf die Synthese von Carotinoiden bedeutet eine größere ICM-Oberfläche auch eine größere Carotinoidmenge pro Zelle.

Somit ist die Lichtquantität für die Biomasseproduktion und somit auch für die Carotinoidproduktion in *R. capsulatus* von großer Bedeutung. Welchen Einfluss hingegen die Lichtqualität, auf das Wachstum von *R. capsulatus* hat, wurde bislang in der Literatur nicht

beschrieben und sollte daher im Rahmen eines Teilprojekts der vorliegenden Arbeit qualitativ untersucht werden.

Konkret bedeutete das, der Fragestellung nachzugehen, mit Licht welcher Wellenlängen *R. capsulatus* kultiviert werden kann und welchen Einfluss dies sowohl auf das Zellwachstum als auch auf den Photopigmentgehalt, speziell auf den Gehalt der Carotinoide, hat.

Somit sollte analysiert und überprüft werden, welches biotechnologische Potential *R. capsulatus* nicht nur für die Synthese von heterologen Membranproteinen, sondern auch für die Synthese von Carotinoiden hat.

2.1 Einfluss der Lichtqualität auf das Wachstum und die Carotinoidsynthese von *R. capsulatus*: Das Standardbeleuchtungssystem für die photoheterotrophe Anzucht von *R. capsulatus* B10S

Um fundierte Aussagen über den Einfluss einer geänderten Lichtqualität auf das Wuchsverhalten und die Carotinoidsynthese von *R. capsulatus* treffen zu können, war es zunächst notwendig, ein Beleuchtungs- und Anzuchtssystem zu definieren, das für alle weiteren Versuche als Referenz diente. Dabei handelte es sich um das übliche Beleuchtungssystem, das im mikrobiologischen Alltag zur Kultivierung von *R. capsulatus* verwendet wird. Dieses Beleuchtungssystem besteht aus zwei L-förmigen Vorrichtungen, die jeweils mit drei handelsüblichen 60 W Glühlampen bestückt wurden (Abbildung 1c). Der Abstand der L-förmigen Glühlampenhalterungen zueinander betrug 50 cm. Das Emissionsspektrum dieser Beleuchtungsvorrichtung in Abhängigkeit von der Wellenlänge ist in Abbildung 38 dargestellt.

Wie daraus hervorgeht, ist die Lichtemission der verwendeten Glühlampen im kurzwelligen Bereich des sichtbaren Lichts sehr gering, wächst aber mit steigender Wellenlänge bis in den Infrarot-Bereich an.

In diesem definierten Referenzbeleuchtungssystem wurde *R. capsulatus* phototroph angezogen und sowohl das Wuchsverhalten, wie auch die Absorption der Photopigmente mit besonderem Augenmerk auf die Carotinoidsynthese untersucht. Somit sollten Daten generiert werden, die anschließend zum Vergleich mit *R. capsulatus* Kulturen verwendet werden können, die mit Licht anderer Wellenlängen kultiviert wurden.

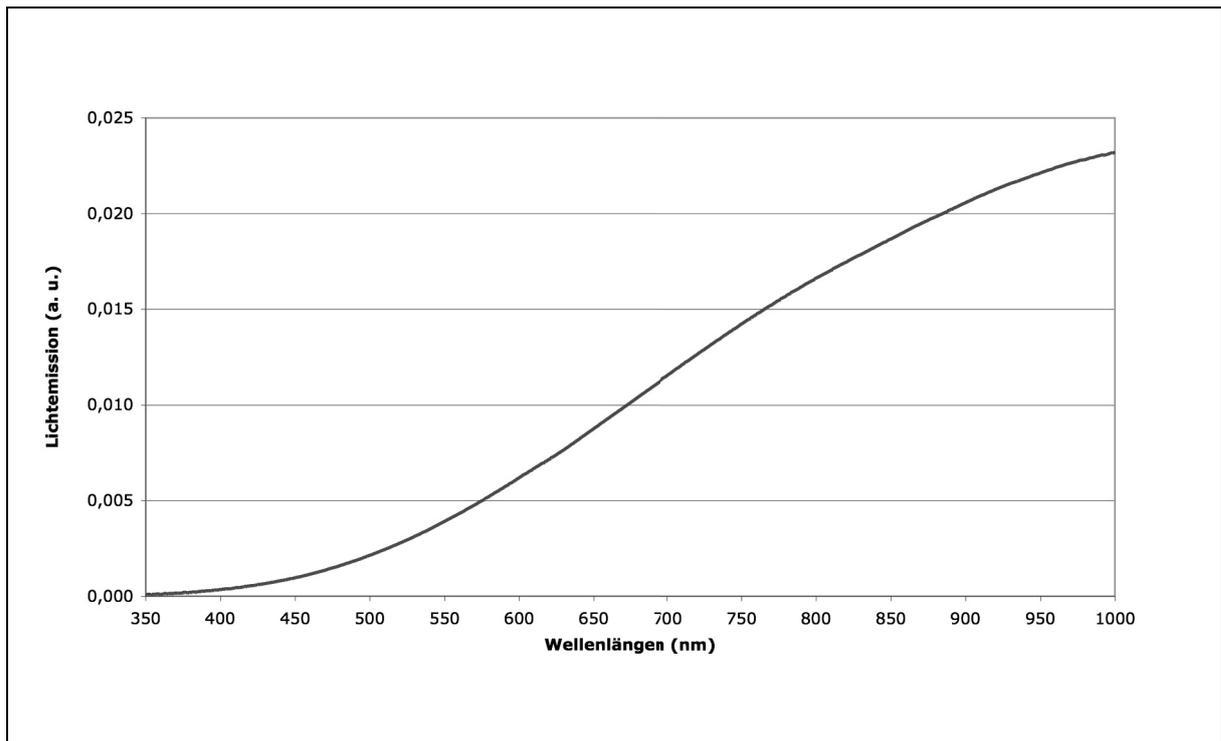


Abbildung 34: Lichtemission des Standardbeleuchtungssystems für die phototrophe Anzucht von *R. capsulatus* B10S. Dargestellt ist die Lichtemission der Glühlampen im Standardbeleuchtungssystem für die phototrophe Anzucht von *R. capsulatus* B10S in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Das Emissionsspektrum wurde mit einem ADS FieldSpec Spectroradiometer im Abstand von 25 cm zu den Glühlampen aufgezeichnet.

Zur Klärung der gestellten Fragestellungen wurde für alle folgenden Versuche festgelegt, dass ausschließlich Zellen des *R. capsulatus* Stamms B10S verwendet wurden, die photoheterotroph bei 30 °C angezogen wurden. Dazu wurden sie zunächst auf PY-Festmedium unter Selektionsdruck vermehrt. Anschließend wurden geeignete Kolonien geerntet und verwendet, um Vorkulturen in 5 ml RCV-Flüssigmedium anzupfen. Nach dreitägigem photoheterotrophen Wachstum im Referenzbeleuchtungssystem mit Glühlampen wurden diese Vorkulturen eingesetzt, um Hauptkulturen mit einer Zellzahl, die einer optischen Dichte von 0,02 bei 660 nm entsprach, in 10 ml RCV-Flüssigmedium unter Selektionsdruck anzupfen. Die Anzucht erfolgte photoheterotroph für mindestens drei Tage im Licht des gewählten Testsystems.

Unter diesen definierten Anzuchtbedingungen erreichten die Zellen des *R. capsulatus* Stamms B10S im Standardbeleuchtungssystem mit 6 Glühlampen nach drei Tagen ihre stationäre Wuchsphase (Abbildung 35). Dabei wurden Zellzahlen von $7,5 \cdot 10^8$ Zellen pro ml Kultur erreicht, was einer Absorption von 2,5 bei 660 nm entsprach. Außerdem geht aus Abbildung 35 hervor, dass die *lag*-Phase der untersuchten Zellen 24 Stunden betrug. In der stationären Wuchsphase, die nach 72 Stunden erreicht wurde, waren die Zellzahlen über drei weitere Tage annähernd konstant, bevor sie abnahmen.

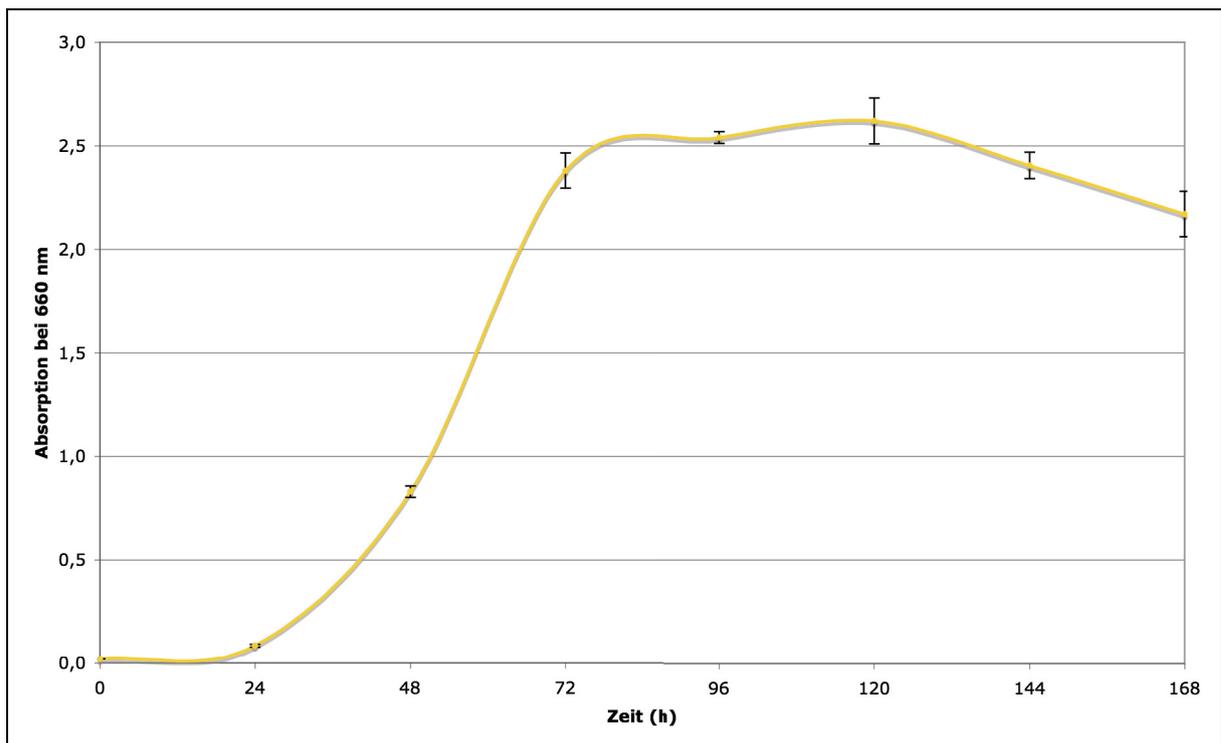


Abbildung 35: Wuchsverhalten von *R. capsulatus* im definierten Standardbeleuchtungssystem mit Glühlampen. Die Abbildung zeigt das Wuchsverhalten von *R. capsulatus* B10S im definierten Standardbeleuchtungssystem bestehend aus sechs Glühlampen. Weitere Details zur Anzucht und Verwendung des Systems sind im Text beschrieben. Hier dargestellt ist die Absorption der untersuchten Zellen bei 660 nm als Maß für die Zellzahl in Abhängigkeit von der Wuchsdauer. Die einzelnen Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert aus sechs unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken charakterisieren die Standardabweichung der jeweiligen Messpunkte.

Um den Photopigmentgehalt, also auch den Carotinoidgehalt, in den untersuchten *R. capsulatus* Kulturen näher zu analysieren, wurden zu den Messpunkten, zu denen das Wuchsverhalten von *R. capsulatus* in Abhängigkeit von der Zeit untersucht wurde, ebenfalls Zellen entnommen, deren optische Dichte bei 660 nm 0,2 entsprach. Aus diesen Aliquots wurden anschließend die Photopigmente isoliert. Dazu wurden die entnommenen Zellen pelletiert und das Sediment in 1 ml Ethanol (70 %) resuspendiert. Nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur und Agitation (Vortex) wurden die festen Zellbestandteile erneut sedimentiert und das ethanolische Pigmentextrakt im Photometer analysiert. Dabei war zu beachten, dass das Pigmentextrakt sowohl vor Lichteinstrahlung als auch vor Sauerstoff geschützt wurde.

Die so in Abhängigkeit von der Wuchsphase erhaltenen Absorptionsspektren der Photopigmente des *R. capsulatus* Referenzsystems sind in Abbildung 36 dargestellt.

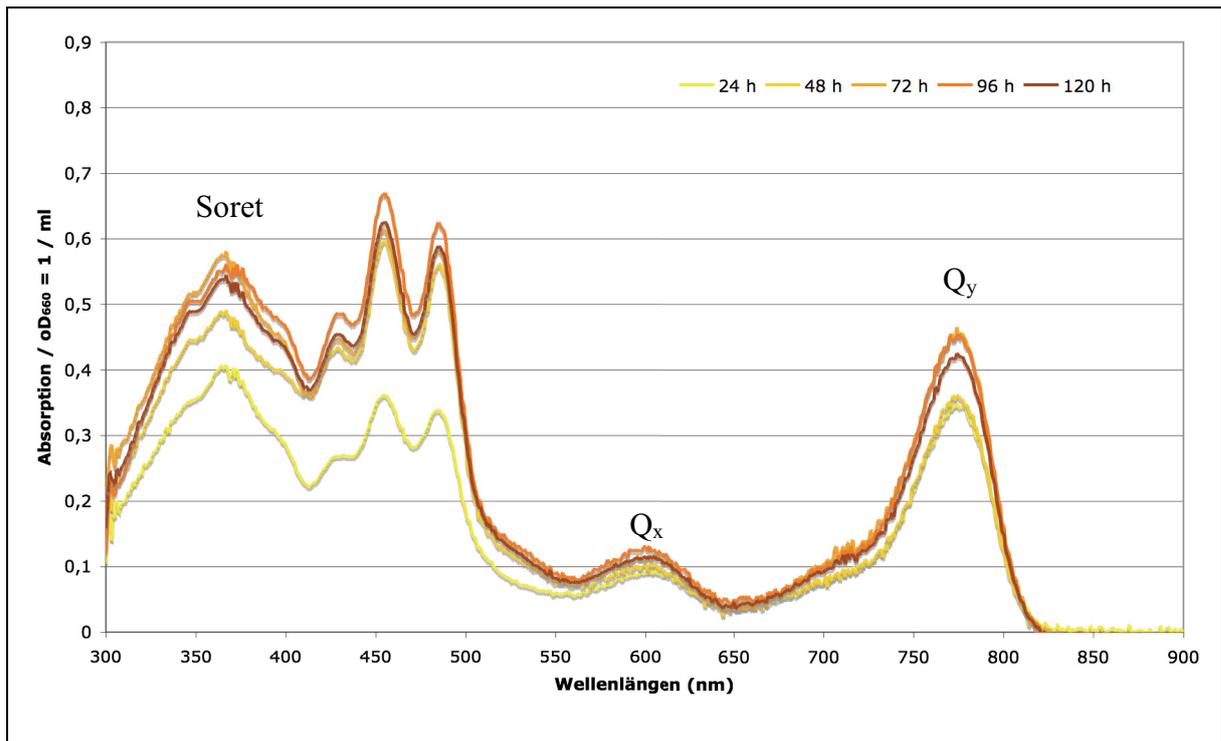


Abbildung 36: Absorptionsspektren der Photopigmente aus *R. capsulatus* B10S Kulturen, die im Standardbeleuchtungssystem mit Glühlampen kultiviert wurden. Dargestellt ist die Absorption der *R. capsulatus* B10S Photopigmente bezogen auf ein Volumen von 1 ml und auf eine Zellzahl, die einer optischen Dichte bei 660 nm von eins entsprach, in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Die Testkulturen wurden angezogen, wie im Text beschrieben. Alle 24 Stunden wurde aus Zellen, die einer optischen Dichte bei 660 nm von 0,2 entsprach, ein Pigmentextrakt isoliert, wie es ebenfalls im Text beschrieben ist. Die ethanolischen Pigmentextrakte wurden anschließend photometrisch vermessen. Die dargestellten Absorptionsspektren repräsentieren jeweils ein gemitteltetes Spektrum aus drei unabhängigen Einzelspektren.

In Abbildung 36 erkennt man, dass es sich bei den dargestellten Absorptionsspektren um die Kombination der Spektren von Bacteriochlorophyll a und dem Carotinoid Spheroiden, welches in *R. capsulatus* das Hauptcarotinoid ausmacht, handelt. So sind die Absorptionsmaxima von Bacteriochlorophyll a in ethanolischer Lösung bei 368 nm, 600 nm und 770 nm deutlich erkennbar. Dabei beschreibt das Absorptionsmaximum bei 770 nm den Übergang des Bacteriochlorophylls a aus seinem elektronischen Grundzustand in den ersten angeregten Singulettzustand (Q_y) wohingegen das Absorptionsmaximum bei 600 nm den Übergang vom elektronischen Grundzustand in den zweiten angeregten Singulettzustand (Q_x) beschreibt. Der so genannte Soret-Peak bei 368 nm beschreibt den Übergang aus dem elektronischen Grundzustand des Bacteriochlorophylls a in den dritten angeregten Singulettzustand. Die drei weiteren lokalen Absorptionsmaxima bei 430 nm, 456 nm und 487 nm sind charakteristisch für den Übergang des Spheroidens aus seinem elektronischen Grundzustand in seinen zweiten angeregten Singulettzustand. Da die gemessenen Absorptionen der Photopigmente auf ein Volumen von 1 ml und eine Zellzahl bezogen wurde, die einer optischen Dichte von eins bei 660 nm entsprach, bedeutete so eine höhere

Absorption automatisch auch einen höheren Pigmentgehalt in der jeweiligen Probe und somit auch eine größere Fläche des ICM.

Wie aus den in Abbildung 36 dargestellten Absorptionsspektren der Photopigmente aus *R. capsulatus* B10S erkennbar ist, war der Photopigmentgehalt nach 24 Stunden Wachstum, also am Ende der *lag*-Phase erwartungsgemäß am niedrigsten. Erst durch den Eintritt in die logarithmische Wuchsphase stieg der Energiebedarf der untersuchten Zellen und so die Notwendigkeit mehr Lichtenergie in Energieäquivalente in Form von ATP umzuwandeln. Die sich dazu erhöhende Zahl an Lichtsammelkomplexen führte folglich auch zu einem steigenden Photopigmentgehalt, wie er in Abbildung 36 zu sehen ist. So stieg der Gehalt an Spheroïden deutlich an und erreichte bereits nach 48 Stunden, also noch während der logarithmischen Wuchsphase der Zellen, fast 90 % seines Maximalwertes. Demgegenüber erreichte der Bacteriochlorophyll a Gehalt nach 72 Stunden Wachstum, also zum Eintritt in die stationäre Wuchsphase, seinen maximalen Gehalt. Eine weitere signifikante Steigerung des Photopigmentgehalts in *R. capsulatus* B10S durch längeres photoheterotrophes Wachstum konnte nicht erzielt werden.

Um nun im Folgenden die Auswirkungen einer geänderten Lichtqualität auf das gerade charakterisierte *R. capsulatus* B10S Referenzsystem untersuchen zu können, musste zunächst festgelegt werden, mit Licht welcher Wellenlängen *R. capsulatus* als Alternative zu den Glühlampenbeleuchtungssystemen kultiviert werden kann.

2.2 Einsatz von Leuchtdioden als alternatives Beleuchtungssystem für *R. capsulatus* B10S

Wie bereits beschrieben emittieren die als Standardbeleuchtungssystem verwendeten Glühlampen Licht über den gesamten Bereich des sichtbaren Spektrums, wobei der Blaulichtanteil sehr gering ist und der Rot- bzw. Infrarotanteil die größten Bestrahlungsstärken erreicht. Tatsächlich kann *R. capsulatus* B10S jedoch nur das Licht zur Erzeugung von Energieäquivalenten verwenden, das zur Anregung seiner Photopigmente führt. Die *in vivo* Absorptionsmaxima der Photopigmente von *R. capsulatus* B10S sind daher in Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23: Wellenlängen der lokalen Absorptionsmaxima der Photopigmente in *R. capsulatus* B10S *in vivo*.

Wellenlänge (nm)	spezielle Bezeichnung	Photopigment
380	Soret	Bacteriochlorophyll a
590	Q _x	Bacteriochlorophyll a
800	Q _y (B800)	Bacteriochlorophyll a
850	Q _y (B850)	Bacteriochlorophyll a
454		Spheroiden
480		Spheroiden
513		Spheroiden

Aus den Daten in Tabelle 23 wird durch den Vergleich mit dem Emissionsspektrum des Glühlampenbeleuchtungssystems in Abhängigkeit der Wellenlänge (Abbildung 34) ersichtlich, dass beim Wachstum zwischen Glühlampen hauptsächlich die Lichtabsorption des Bacteriochlorophyll a bei 800 nm bzw. 860 nm zur Biomasseproduktion von *R. capsulatus* B10S ausgenutzt wurde.

Daher wurden als erste alternative Beleuchtungsquelle Leuchtdioden verwendet, die Licht mit einer Wellenlänge von 856 nm emittieren und somit optimal für die Anregung des Bacteriochlorophyll a vom elektronischen Grundzustand in den ersten Singulettzustand geeignet sind.

Zusätzlich wurden als zweite alternative Beleuchtungsquelle Leuchtdioden ausgewählt, die Licht mit einer Wellenlänge von 460 nm emittieren. Sie sind somit optimal geeignet zur Anregung der akzessorischen Photopigmente.

Dadurch sollte untersucht werden, welchen Einfluss die alleinige Anzucht im Infrarot- oder Blaulicht auf die *R. capsulatus* Testkulturen in Bezug auf Wachstum und Carotinoidsynthese hat. Außerdem sollte überprüft werden, welche Auswirkungen die Kombination beider Lichtqualitäten im Vergleich zum Standardbeleuchtungssystem mit Glühlampen hat.

Dazu wurden in Kooperation mit der Firma Insta Elektro GmbH (Lüdenscheid) spezielle, mit Leuchtdioden bestückte Beleuchtungsplatinen entwickelt, die die gezielte Anregung der Lichtsammelkomplexe des *R. capsulatus* Photosystems ermöglichten (Abbildung 37).

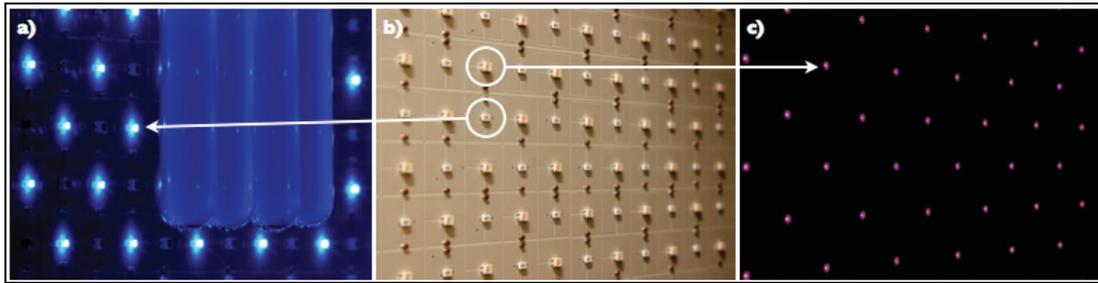


Abbildung 37: Neuartige LED-Beleuchtungsplatinen zur alternativen Beleuchtung von *R. capsulatus* B10S. Abgebildet sind in Kooperation mit der Firma Insta Elektro GmbH entwickelten LED-Beleuchtungsplatinen, mit denen die Anzucht von *R. capsulatus* bei definierten Wellenlängen im blauen Bereich des Lichtspektrums (a, 460 nm) und im infraroten Bereich des Spektrums (c, 856 nm) möglich ist. Dazu wurden pro Platine abwechselnd 120 infrarote sowie 120 blaue Leuchtdioden im Abstand von 1,5 cm montiert (b). Die weiteren Spezifikationen der LED-Beleuchtungsplatinen sind im Text näher beschrieben.

Diese Platinen erlaubten zum ersten Mal die definierte Illumination mit blauem Licht oder mit infrarotem Licht. Außerdem war die simultane Beleuchtung mit Licht beider Wellenlängen möglich. Dazu wurden pro Platine abwechselnd insgesamt 120 infrarote sowie 120 blaue Leuchtdioden im Abstand von 1,5 cm montiert, wobei beide LED-Typen getrennt voneinander durch Transformatoren mit Strom versorgt wurden. Zur Beleuchtung von *R. capsulatus* Kulturen wurden jeweils zwei Platinen im Abstand von 10 cm zu den Testkulturen verwendet.

Um zu überprüfen, ob die Emissionsspektren der verwendeten Leuchtdioden mit den Absorptionsspektren des *R. capsulatus* B10S Photosystems tatsächlich kompatibel waren, wurde die Lichtemission der verwendeten LED in Abhängigkeit der Wellenlänge mit einem ASD FieldSpec Spectroradiometer bestimmt (Abbildung 38).

Wie aus Abbildung 38 hervorgeht, besitzen die verwendeten blauen Leuchtdioden ihr Emissionsmaximum bei 462 nm, die infraroten hingegen bei 856 nm. Damit überlappen die Emissionsspektren der verwendeten Leuchtdioden optimal mit dem Absorptionsspektrum des B850-Zustands von Bacteriochlorophyll a sowie mit dem Absorptionsspektrum des Spheroidens.

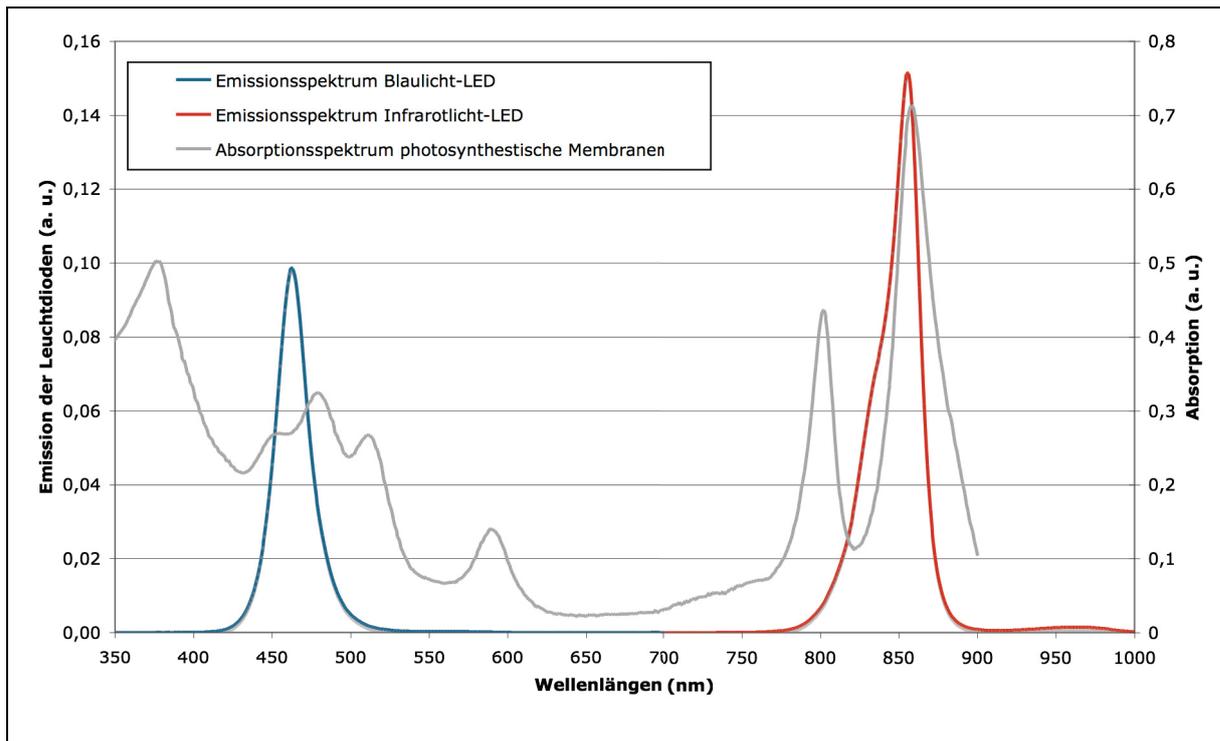


Abbildung 38: Lichtemissionsspektrum der für *R. capsulatus* entwickelten LED-Beleuchtungsplatinen. Dargestellt ist die Lichtemission der für *R. capsulatus* entwickelten LED-Beleuchtungsplatinen in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Zur Aufnahme dieser Spektren wurde ein ASD FieldSpec Spectroradiometer verwendet. Ebenfalls dargestellt ist das Absorptionsspektrum der photosynthetischen Membranen aus *R. capsulatus*. Dazu wurden *R. capsulatus* B10S Zellen photoheterotroph kultiviert, durch Scherung lysiert, fraktioniert und die Membranfraktion anschließend photometrisch untersucht. Aus der Abbildung wird deutlich, dass das Emissionsspektrum der Infrarotleuchtdioden das Absorptionsspektrum des B850 Bacteriochlorophyll a bei 860 nm nahezu perfekt überlagert. Ebenfalls wird deutlich, dass die Blaulichtemission der blauen LED im Bereich der Absorption des Spheroidens liegt. Dabei erreicht die Lichtintensität der Blaulicht-LED rund 66 % der Intensität der Infrarot-LED.

Um nachzuweisen, dass die für *R. capsulatus* entwickelten LED-basierten Beleuchtungssysteme tatsächlich dazu genutzt werden können, *R. capsulatus* photoheterotroph zu kultivieren und zu analysieren welchen Einfluss sie auf das Wuchsverhalten und die Pigmentakkumulation haben, wurden *R. capsulatus* B10S Testkulturen angezogen, wie für das Referenzbeleuchtungssystem mit Glühlampen beschrieben. Abweichend erfolgte die finale Anzucht jedoch nicht zwischen Glühlampen, sondern zwischen den neuen LED-basierten Beleuchtungssystemen. Der Abstand zwischen den LED-Platinen und den Testkulturen betrug dabei 10 cm. Das Wuchsverhalten der *R. capsulatus* B10S Testkulturen im Blaulicht, Infrarotlicht sowie in der Kombination beider Lichtqualitäten wurde anschließend getrennt voneinander über acht Tage hinweg untersucht und ist in Abbildung 39 dokumentiert.

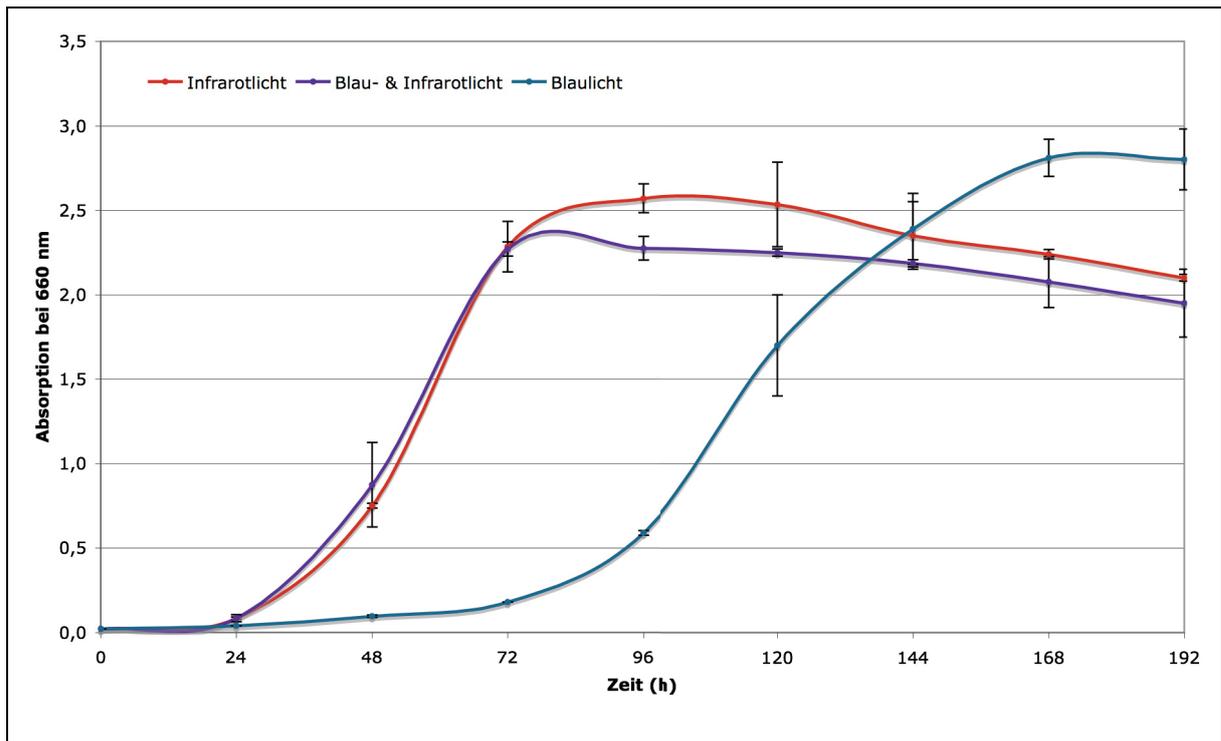


Abbildung 39: Wuchsverhalten von *R. capsulatus* B10S bei der Illumination mit LED-Beleuchtungssystemen. Die Abbildung zeigt das Wuchsverhalten von *R. capsulatus* B10S in den neu konstruierten LED-Beleuchtungssystemen im Blaulicht, Infrarotlicht, sowie in der Kombination beider Lichtqualitäten. Weitere Details zur Anzucht und Verwendung des Systems sind im Text beschrieben. Hier dargestellt ist die Absorption der untersuchten Zellen bei 660 nm als Maß für die Zellzahl in Abhängigkeit von der Wuchsdauer. Die einzelnen Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken charakterisieren die Standardabweichung der jeweiligen Messpunkte

Wie aus den Wuchskurven in Abbildung 39 hervorgeht, weisen sowohl die Zellen, die im Infrarotlicht kultiviert wurde, als auch die Zellen, die in der Kombination aus Blau- und Infrarotlicht kultiviert wurden ein beinahe identisches Wuchsverhalten auf. So betrug die *lag*-Phase in beiden Fällen, wie auch bei der Anzucht unter Verwendung des Standardbeleuchtungssystems mit Glühlampen, 24 Stunden. Ebenso wurde die stationäre Phase nach dreitägigem Wachstum erreicht. Die maximale Zellzahl der Kulturen, die im Infrarotlicht wuchsen, entsprach einer optischen Dichte von 2,57 bei 660 nm und war damit annähernd identisch mit den maximalen Zellzahlen, die bei der Kultivierung von *R. capsulatus* im Glühlampenlicht erreicht werden konnten. Demgegenüber war die maximal erreichte Zellzahl in den Kulturen, die in der Kombination aus Blau- und Infrarotlicht wuchsen 10 % niedriger.

Somit wurde erstmals gezeigt, dass Leuchtdioden, die ausschließlich infrarotes Licht der Wellenlänge 856 nm emittierten dazu verwendet werden können, *R. capsulatus* zu kultivieren. Dabei wurden Zellzahlen erreicht, die mit denen von Zellen vergleichbar waren, die im Referenzbeleuchtungssystem mit Glühlampen kultiviert wurde. Die zusätzliche Supplementierung durch blaues Licht führte jedoch zu keiner weiteren Steigerung der

Zellzahl, was zeigt, dass eine zusätzliche Energieaufnahme durch die akzessorischen Pigmente des Photosystems in Form der Carotinoide von *R. capsulatus* B10S nicht erfolgte, sondern im Gegenteil zu einem leichten Rückgang der maximal erreichten Zellzahlen führte.

Umso erstaunlicher ist daher, dass *R. capsulatus* ebenfalls in der Lage war, Biomasse zu produzieren, wenn es ausschließlich im Licht der blauen Leuchtdioden kultiviert wurde (Abbildung 39). Im Gegensatz zu den bereits getesteten Lichtbedingungen ist die *lag*-Phase im Blaulichtwachstum jedoch deutlich verlängert und beträgt 72 Stunden. Dennoch gehen die Zellen unter diesen Lichtbedingungen anschließend ebenfalls in eine logarithmische Wachstumsphase über, die nach drei weiteren Tagen zu einer maximalen Zellzahl führt, die im Vergleich zu den Zellzahlen im Glühlampenbeleuchtungssystem sogar um 10 % größer ist.

Um ausschließen zu können, dass es sich bei dieser Beobachtung um einen Effekt handelt, der durch Mutationen hervorgerufen wurde, wurden aus den Blaulichttestkulturen in der logarithmischen Wachstumsphase nach 120 Stunden Zellen entnommen, deren optische Dichte 0,02 bei 660 nm entsprach. Sie wurden dazu verwendet um neue Kulturen zu inokulieren, die anschließend unter Standardbedingungen im Glühlampenbeleuchtungssystem kultiviert wurden. Auch aus diesen Kulturen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase nach 2 Tagen Zellen entnommen, die einer optischen Dichte von 0,02 bei 660 nm entsprachen und dazu verwendet wurden, neue Kulturen zu inokulieren, die danach erneut unter Blaulichtbedingungen kultiviert wurden.

Sollte es sich beim Zellwachstum von *R. capsulatus* B10S in Blaulicht um einen durch Mutationen hervorgerufenen Effekt handeln, so müsste dieser bei der erneuten Anzucht im Blaulicht dafür sorgen, dass die *lag*-Phase verkürzt wird und die Zellen deutlich früher in die logarithmische Wachstumsphase eintreten. Während dieses *shift*-Versuchs wurde das Zellwachstum daher erneut in Abhängigkeit von der Zeit untersucht und ist in Abbildung 40 dargestellt.

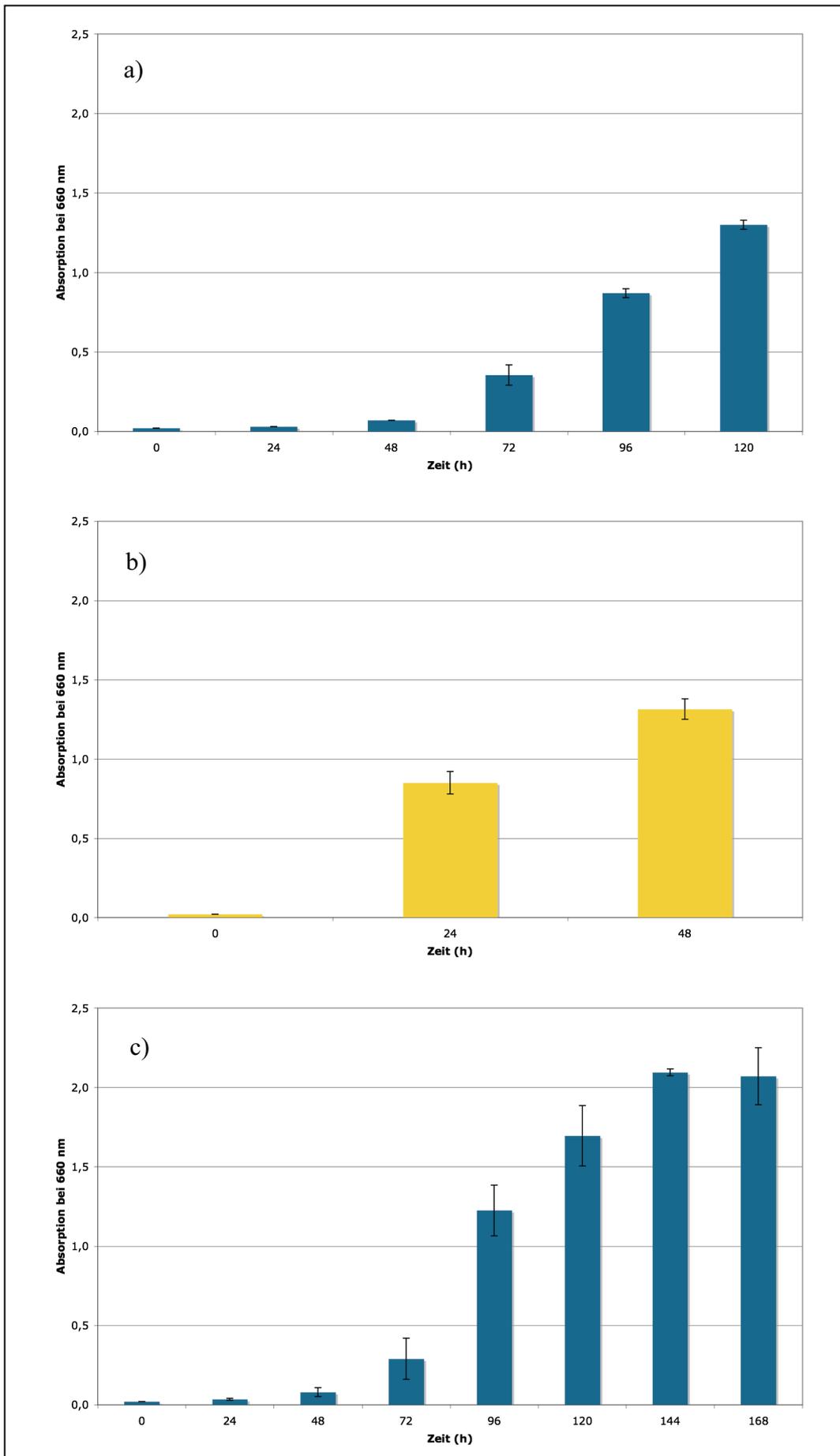


Abbildung 40: Untersuchung zur Blaulichtanpassung in *R. capsulatus* B10S. Fortsetzung s. nächste Seite.

Untersuchung zur Blaulichtanpassung in *R. capsulatus* B10S (Fortsetzung). Um ausschließen zu können, dass das Eintreten in die logarithmische Wachstumsphase von *R. capsulatus* B10S im Blaulicht nach der verlängerten lag-Phase nicht auf Grund von Mutationen des Teststamms erfolgte, wurden aus den Blaulichttestkulturen in der logarithmischen Wachstumsphase nach 120 Stunden Zellen entnommen (a), deren optischen Dichte 0,02 bei 660 nm entsprach. Sie wurden dazu verwendet um neue Kulturen zu inokulieren, die anschließend unter Standardbedingungen im Glühlampenbeleuchtungssystem kultiviert wurden (b). Auch aus diesen Kulturen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase nach 2 Tagen Zellen entnommen, die einer optischen Dichte von 0,02 bei 660 nm entsprachen und dazu verwendet wurden, neue Kulturen zu inokulieren, die danach erneut unter Blaulichtbedingungen kultiviert wurden (c). Das Auftreten der verlängerten lag-Phase während der zweiten Blaulichtwachstumsphase (c) macht deutlich, dass das Wachstum von *R. capsulatus* B10S im Blaulicht nicht auf eine Mutation zurückzuführen ist, sondern auf eine Anpassung auf diese Lichtbedingung.

Wie aus den Wuchskurven, die während des *shift*-Versuchs aufgenommen wurden, hervorgeht, ist die lag-Phase der *R. capsulatus* B10S Zellen, sowohl bei ihrer ersten Anzucht im Blaulicht, als auch nach dem *shift* von Glühbirnenlicht in die zweite Blaulichtanzucht unverändert drei Tage lang (Abbildung 40 c).

Mit diesem Experiment konnte somit gezeigt werden, dass es sich beim Blaulichtwachstum von *R. capsulatus* tatsächlich um eine Anpassung an die geänderten Lichtbedingungen handelt und nicht um einen durch Mutationen hervorgerufenen Effekt. Es wurde außerdem erstmalig gezeigt, dass *R. capsulatus* B10S überhaupt in der Lage ist, Biomasse zu produzieren, wenn die dazu notwendige Energie ausschließlich über die akzessorischen Pigmente des Photosystems, also durch Carotinoide gesammelt wird. Besonders hervorzuheben ist dabei, dass auch die Energiezufuhr durch blaues Licht nicht limitierend für das Wachstum in den gegebenen Testbedingungen war, da die maximale Zellzahl des Referenzsystems im Glühlampenlicht sogar um 10 % überschritten wurde.

Um daher anschließend zu überprüfen, ob die geänderten Lichtqualitäten einen Einfluss auf die Pigmentkomposition und -menge in *R. capsulatus* B10S hatten, wurden erneut Testkulturen im Blaulicht, Infrarotlicht und in Licht beider Wellenlängen kultiviert, wie für das Referenzsystem im Glühbirnenlicht beschrieben. Aus diesen Kulturen wurden während ihres Wachstums, nach Abschluss der lag-Phase, alle 24 Stunden Aliquots entnommen, deren Zellzahl einer optischen Dichte von 0,2 bei 660 nm entsprach. Diese wurden dazu verwendet, ethanolische Pigmentextrakte herzustellen, wie sie bereits für das Referenzsystem beschrieben wurden. Anschließend wurden diese Extrakte photometrisch analysiert. Die jeweiligen Absorptionsspektren der untersuchten Extrakte sind in Abhängigkeit von der Wachstumsphase in Abbildung 41 dargestellt.

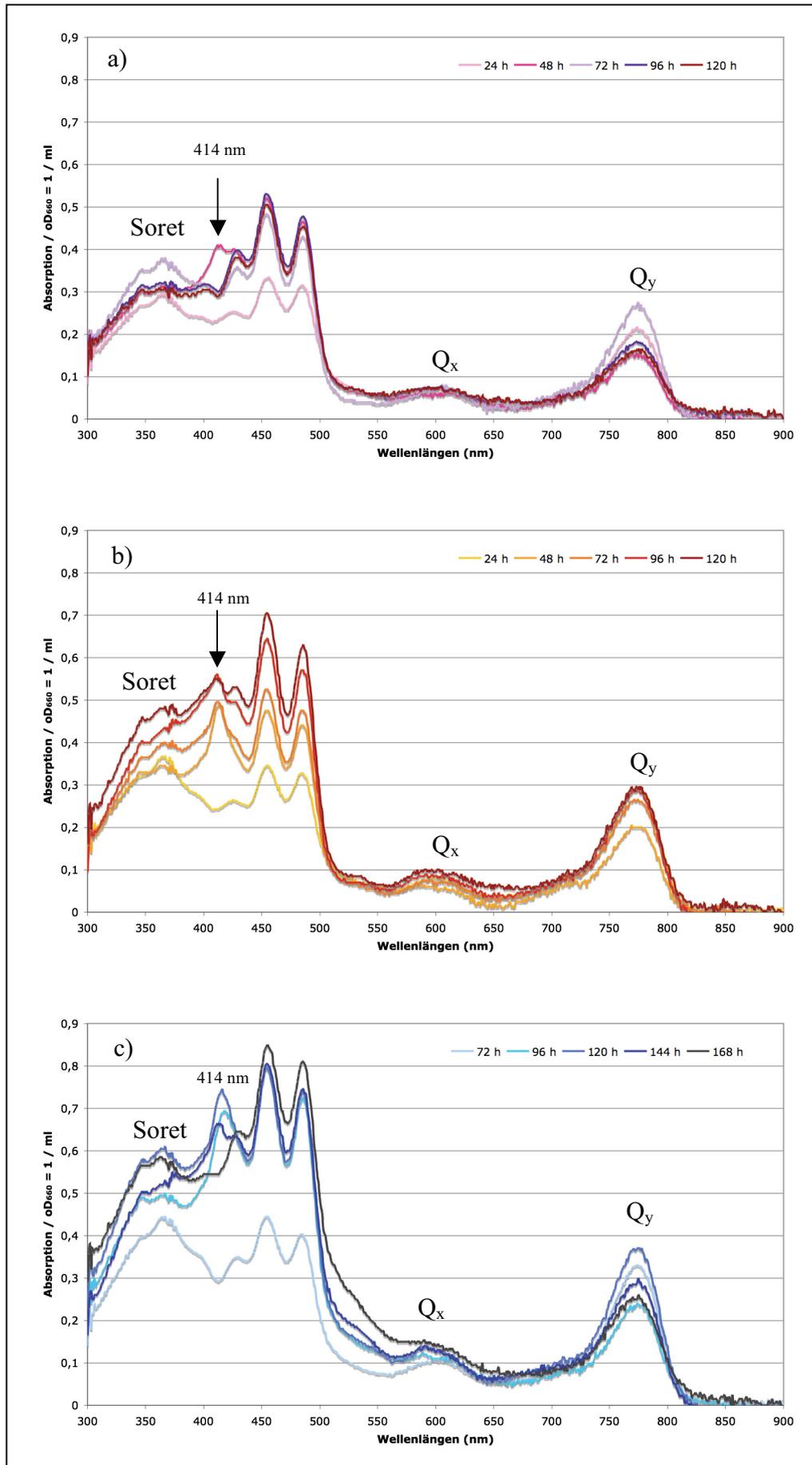


Abbildung 41: Beschriftung siehe nächste Seite.

Abbildung 41: Absorptionsspektren der Photopigmente aus *R. capsulatus* B10S Kulturen, die im Blau- und Infrarotlicht, Infrarotlicht bzw. Blaulicht kultiviert wurden. Dargestellt ist die Absorption der *R. capsulatus* B10S Photopigmente bezogen auf ein Volumen von 1 ml und auf eine Zellzahl, die einer optischen Dichte bei 660 nm von eins entsprach, in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Die Testkulturen wurden angezogen, wie im Text beschrieben. Alle 24 Stunden nach Beendigung der *lag*-Phase wurde aus Zellen, die einer optischen Dichte bei 660 nm von 0,2 entsprach, ein Pigmentextrakt hergestellt, wie es ebenfalls im Text beschrieben ist. Die ethanolischen Pigmentextrakte wurden anschließend photometrisch vermessen. Die dargestellten Absorptionsspektren repräsentieren jeweils ein gemittelttes Spektrum aus drei unabhängigen Einzelspektren. (a) Absorptionsspektren der Pigmentextrakte aus Zellen, die in der Kombination von Blaulicht- und Infrarotlicht kultiviert wurden. Entsprechende Spektren sind auch für Zellen gezeigt, die ausschließlich im Infrarotlicht (b) bzw. Blaulicht (c) kultiviert wurden.

Wie aus den in Abbildung 41a dargestellten Photopigmentabsorptionsspektren der im Blau- und Infrarot-Licht kultivierten *R. capsulatus* B10S Zellen zu erkennen ist, war die Akkumulation der Carotinoide unter diesen Lichtbedingungen nach 24 Stunden annähernd identisch mit der Akkumulation in Kulturen, die im Glühlampenlicht kultiviert wurden (Abbildung 36). Ebenso war eine deutliche Steigerung der Carotinoidmenge während der logarithmischen Wuchsphase zu beobachten. Diese fiel unter Blau- und Infrarotlichtbedingungen jedoch weniger stark aus, als unter Standardanzuchtbedingungen mit Glühlampen. So erreichte das Absorptionsmaximum von Spheroiden bei 480 nm unter Standardlichtbedingungen bereits während der logarithmischen Wuchsphase nach 48 Stunden einen Wert von 0,59 pro 1 ml Volumen und einer Zellzahl, die einer optischen Dichte von eins bei 660 nm entsprach ($oD_{660} = 1$). Demgegenüber lag das entsprechende Absorptionsmaximum bei der Anzucht in Blau- und Infrarotlicht lediglich bei einem Wert von 0,51 pro $oD_{660} = 1$ und ml, der im weiteren Verlauf der Anzucht auch nicht signifikant gesteigert werden konnte. Interessant ist außerdem das Auftauchen eines weiteren lokalen Absorptionsmaximums bei 414 nm während der logarithmischen Wuchsphase in Blau- und Infrarotlicht nach 48 Stunden. Dieses ist charakteristisch für das Carotinoid Neurosporen, welches im Carotinoidbiosyntheseweg von *R. capsulatus* B10S eine Vorstufe des Hauptcarotinoids Spheroiden darstellt. Die weiteren Absorptionsmaxima von Neurosporen bei 440 nm und 469 nm werden jedoch durch die Absorptionsbanden von Spheroiden überlagert. Zu allen weiteren Testzeitpunkten, war dieses lokale Absorptionsmaximum jedoch nicht zu detektieren. Möglicherweise hat die verwendete Lichtwellenlänge also tatsächlich einen Einfluss auf die Carotinoidzusammensetzung in den photosynthetischen Membranen von *R. capsulatus* oder sorgt im Biosyntheseweg für eine Lichtregulation, die dazu führt, dass die Spheroiden-Vorstufe Neurosporen in *R. capsulatus* akkumuliert.

Der Einfluss der verwendeten Lichtwellenlänge zeigt sich ebenfalls eindeutig im Vergleich der maximalen Absorptionen von Bacteriochlorophyll a. So ist auffällig, dass die lokalen Absorptionsmaxima des Bacteriochlorophyll a während der gesamten Biomasseproduktion

von *R. capsulatus* im Blau- und Infrarotlicht deutlich niedrigere Werte erreicht, als bei Zellen, die mit Standardbeleuchtung angezogen wurden.

Möglicherweise war die geringere Menge an Bacteriochlorophyll a in diesem Testsystem bereits wuchslimitierend und kann so die um 10 % niedrigere Maximalzellzahl erklären, die während des photoheterotrophen Wachstums im Vergleich zum Standardbeleuchtungssystem mit Glühlampen erreicht wurde.

Welchen Einfluss die alleinige Anzucht in Infrarotlicht auf die Zellen des *R. capsulatus* B10S Testsystem hatte, ist in Abbildung 41b dargestellt. Aus den Absorptionsspektren der Photopigmente, die in dieser Abbildung dargestellt sind, wird deutlich, dass die Bacteriochlorophyll a Menge auch in diesem Testsystem niedriger war, als im Referenzsystem mit Glühlampenbeleuchtung. Dennoch führte dies zu keiner Limitierung des Wachstums, da die Zellen dieses Testsystems Zellzahlen erreichten, die mit dem Referenzsystem vergleichbar waren. Besonders auffällig an den Pigmentabsorptionsspektren der Testkulturen aus dem Infrarotlicht ist jedoch die Änderung der Carotinoidkomposition. Obwohl sich die Pigmentkomposition und -menge bis zum Eintritt in die logarithmische Wachstumsphase nach 24 Stunden annähernd wie die im vergleichbaren Testsystem mit Glühlampenbeleuchtung verhielt, kam es bereits während der logarithmischen Wachstumsphase nach 48 Stunden zu einer klaren Änderung der Pigmentkomposition.

So konnte erneut das für das Carotinoid Neurosporen charakteristische Absorptionsmaximum bei 414 nm detektiert werden. Besonders auffällig dabei war, dass dieses Absorptionsmaximum mit 0,459 pro $OD_{660} = 1$ und ml größere Werte erreichte, als die des Spheroidens bei 456 nm und 487 nm mit 0,48 $OD_{660} = 1$ und ml bzw. 0,43 $OD_{660} = 1$ und ml. Ebenfalls auffällig ist, dass, im Gegensatz zum Testsystem, welches Blau- und Infrarotlicht zur Biomasseproduktion verwendete, das zusätzliche lokale Absorptionsmaximum bei 414 nm in allen weiteren Wachstumsphasen des Infrarottestsystems beobachtet wurde.

Somit führt die alleinige Verwendung von Infrarotlicht nicht nur zur Akkumulation von Spheroiden als akzessorisches Pigment, sondern auch zur signifikanten Akkumulation eines weiteren Carotinoids, vermutlich des Neurosporens.

Auch für dieses Testsystem lässt sich also festhalten, dass die Lichtwellenlänge einen deutlichen Einfluss auf die Komposition der Photopigmente des Photosystems von *R. capsulatus* B10S hat.

Dieser Effekt wird noch deutlicher, wenn man die Absorptionsspektren der Photopigmentextrakte aus *R. capsulatus* B10S Zellen betrachtet, die ausschließlich in blauem Licht kultiviert wurden (Abbildung 41c). So weist *R. capsulatus* unter diesen

Anzuchtbedingungen nicht nur, wie bereits beschrieben, eine verlängerte *lag*-Phase auf, sondern akkumuliert auch nach dem Eintritt in die logarithmische Wachstumsphase nach 96 Stunden deutlich mehr Carotinoide, als dies im Referenzsystem mit Glühlampenlicht und in den bereits analysierten Testsystemen, die in Infrarot- bzw. Infrarot- und Blaulicht kultiviert wurden, der Fall war.

Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass *R. capsulatus* B10S im Blaulichttestsystem ausschließlich die akzessorischen Pigmente zur Energieaufnahme zur Verfügung stehen, nicht jedoch das Lichtsammelpigment Bacteriochlorophyll a, welches im Wellenlängenbereich um 460 nm nicht absorbiert. Um so erstaunlicher ist, dass die Energieaufnahme durch die Carotinoide zwar zu einer verlängerten *lag*-Phase der Zellen führt, das Wachstum aber letztendlich nicht limitiert, da maximale Zellzahlen erreicht wurden, die sogar um 10 % größer waren, als die des Testsystems im Glühlampenlicht.

Ähnlich wie bei der Anzucht in Infrarotlicht, akkumuliert in *R. capsulatus* B10S im Blaulicht ebenfalls ein weiteres Carotinoid, erneut vermutlich Neurosporen, mit einem charakteristischen Absorptionsmaximum bei 414 nm. Dieses verschwindet jedoch bei Erreichen der stationären Wachstumsphase, wie im Testsystem, das in Blau- und Infrarotlicht angezogen wurde.

Offensichtlich scheint Infrarotlicht somit den stärkeren Einfluss auf die Carotinoidkomposition in *R. capsulatus* auszuüben, wohingegen blaues Licht einen größeren Einfluss auf die Carotinoidmenge zu haben scheint.

Welches Regulationssystem jedoch auf genetischer und Transkriptionsebene für die Blaulicht- und Infrarotlichtregulation in *R. capsulatus* B10S verantwortlich ist und wie die Steuerung dieses Regulationssystems auch in Bezug auf die verwendeten Lichtintensitäten abläuft, ist bislang nicht bekannt und wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit auch nicht untersucht. Dies aufzuklären ist jedoch derzeit Bestandteil einer weiteren wissenschaftlichen Arbeit, die im Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von Herrn Dipl.-Biol. René Bergmann durchgeführt wird.

Zur Untersuchung der Carotinoidsynthese in dem phototrophen Bakterium *R. capsulatus* B10S wurde zunächst ein Standardbeleuchtungssystem, bestehend aus 6 Glühlampen zu je 60 W etabliert. In diesem System wurde das Wuchsverhalten von *R. capsulatus* B10S, sowie dessen Photopigmentkomposition und –menge in ethanolischen Pigmentextrakten photometrisch untersucht. Anschließend wurden die Auswirkungen untersucht, die Licht eines anderen Beleuchtungssystems auf das Wachstum sowie die Photopigmentkomposition und –menge in *R. capsulatus* B10S hat. Dazu wurde ein eigens für *R. capsulatus*, in Kooperation mit der Firma Insta Elektro GmbH, konstruiertes Leuchtdioden-basiertes Beleuchtungssystem entwickelt und verwendet. Dieses Beleuchtungssystem ermöglichte die Illumination von *R. capsulatus* mit Licht der Wellenlänge 462 nm oder 856 nm sowie der Kombination beider Wellenlängen. Dabei wurde festgestellt, dass *R. capsulatus* B10S in der Lage ist, allein im Blaulicht, Infrarotlicht oder in der Kombination beider Lichtqualitäten zu wachsen. Dabei erreicht *R. capsulatus* B10S im Infrarotlicht maximale Zellzahlen, wie sie auch im Standardbeleuchtungssystem mit Glühlampen erreicht werden. Bei Wachstum in Blau- und Infrarotlicht erreichte *R. capsulatus* B10S maximale Zellzahlen, die 10 % geringer waren. Im Blaulicht waren die maximalen Zellzahlen jedoch 10 % höher als im Referenzsystem.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass es durch Einsatz von Infrarotlicht, Blaulicht, aber der Kombination von Blau- und Infrarotlicht ein weiteres Pigment, vermutlich das Carotinoid Neurosporen, akkumuliert. Während der Anzucht in Blaulicht wurde außerdem beobachtet, dass die Carotinoidmenge in den untersuchten ethanolische Extrakten deutlich größer war, als im Referenzsystem mit Glühlampenbeleuchtung. Zusammenfassend scheint Infrarotlicht einen stärkeren Einfluss auf die Carotinoidkomposition in *R. capsulatus* B10S auszuüben, wohingegen blaues Licht einen größeren Einfluss auf die Carotinoidmenge zu haben scheint.

IV Diskussion

1 Synthese heterologer Membranproteine

Membranproteine erfüllen wichtige Aufgaben in nahezu sämtlichen zellulären Prozessen, so auch bei der Signal-, Energie- und Reizweiterleitung (Elofsson & von Heijne, 2007). Zusätzlich haben die zahlreichen Genomprojekte der letzten Jahre gezeigt, dass ungefähr 20 – 30 % aller bislang sequenzierten offenen Leserahmen für Membranproteine kodieren. Außerdem interagieren heutzutage 60 – 70 % aller neuen pharmazeutischen Wirkstoffe mit Membranproteinen (Yin, 2008). Aus diesem Grund beschäftigt die Aufklärung von Struktur und Funktion vieler Membranproteine nicht nur die biologische Grundlagenforschung, sondern auch die Biotechnologie, Medizin und Pharmazie.

Die einfachste und kostengünstigste Methode, größere Mengen von Membranproteinen für wissenschaftliche und kommerzielle Zwecke zu erzeugen, ist die heterologe Expression der korrespondierenden Gene in einem anspruchslosen, genetisch und technisch gut handhabbaren Mikroorganismus.

Neben den allgemeinen Problemen bei der heterologen Synthese von Proteinen, die bereits in der Einleitung angesprochen wurden, tritt bei der Synthese von heterologen Membranproteinen jedoch ein weiteres schwerwiegendes Problem auf: Auf Grund ihrer Topologie, die große hydrophobe Bereiche aufweist, kommt es bei der Synthese heterologer Membranproteine in der Regel zur Bildung unlöslicher Proteineinschlusskörper, aus denen die Rückfaltung in die native Form des Membranproteins nur selten gelingt. Proteine, bei denen diese Rückfaltung gelang sind u. a. das Bacteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarum*, einige Porine aus *Rhodospseudomonas blastica* (Schmid *et al.*, 1996), das Rezeptorprotein OptM der äußeren Zellmembran aus *Pseudomonas aeruginosa* (Charbonnier *et al.*, 2001) und der Lichtsammelkomplex II aus Chloroplasten höherer Pflanzen (Rogl *et al.*, 1998). Gründe für die Bildung von unlöslichen Membranproteineinschlusskörpern sind zum einen die limitierte Membranoberfläche vieler Expressionswirte (Arechaga *et al.*, 2000; Drew *et al.*, 2003), zum anderen die rasche Absättigung des Sekretionsapparates, sodass die Translation der gebildeten Transkripte schneller erfolgt, als der Einbau der Genprodukte in die Membran des Expressionswirts.

Aus diesen Gründen eignet sich das fakultativ anaerobe α -Proteobacterium *R. capsulatus* besonders als Wirt für die Synthese heterologer Membranproteine. So bildet es unter phototrophen Wuchsbedingungen ein zusätzliches, so genanntes intracytoplasmatisches Membransystem aus (ICM) (Drews & Golecki, 1995; Oelze & Drews, 1972), welches die Membranoberfläche von *R. capsulatus* deutlich vergrößert. In dieses ICM werden mit Hilfe hocheffizienter wirtseigener Mechanismen die Enzymkomplexe des *Rhodobacter*-Photosystems inseriert.

Der dieser Arbeit zugrunde liegenden Hypothese zu Folge, müsste *R. capsulatus* in der Lage sein, heterolog synthetisierte Membranproteine unter phototrophen Wuchsbedingungen, in Konkurrenz zu den Enzymkomplexen des Photosystems, in sein ICM einzubauen.

Dazu wurde ein neuartiges *R. capsulatus* Expressionssystem verwendet (Drepper *et al.*, 2008). Es besteht zum einem aus dem Expressionsvektor pRhotHi-2, der die starke Expression der heterologen Zielgene unter der Kontrolle des Promotors der T7-RNA-Polymerase aus dem T7-Phagen zulässt. Zum anderen besteht das System aus dem *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7, welcher das T7-RNA-Polymerasegen als stabile chromosomale Integration unter der Kontrolle des Promotors des induzierbaren Fruktoseoperons (P_{fru}) trägt.

Die Synthese heterologer Membranproteine in diesem System in Abbildung 42 schematisch dargestellt.

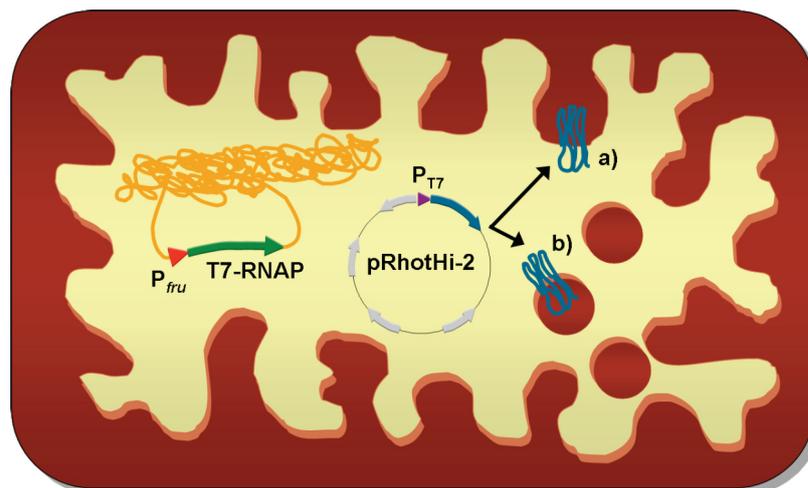


Abbildung 42: Schematische Darstellung zur Synthese heterologer Membranproteine in *R. capsulatus* B10S-T7 mit dem P_{T7} -abhängigen Expressionsplasmid pRhotHi-2. Nach der Mobilisierung des rekombinanten Expressionsplasmids pRhotHi-2 in den Expressionswirt *R. capsulatus* B10S-T7 erfolgt die P_{T7} -abhängige Expression des Zielgens (P_{T7} : lila, Zielgen: blau) durch die chromosomal kodierte T7-RNA-Polymerase (T7-RNAP, grün) nach Induktion des Fruktosepromotors (P_{fru} , rot). Das Zielgenprodukt wird dann in Konkurrenz zu den Enzymkomplexen des Photosystems von *R. capsulatus* B10S-T7 (a) in das intracytoplasmatische Membransystem (ICM) eingebaut oder (b) in die Vesikel des ICM.

1.1 Synthese heterologer Membranproteine in dem phototrophen Organismus *R. capsulatus*

Um zu überprüfen, ob *R. capsulatus* tatsächlich als Expressionswirt für die Synthese heterologer Membranproteine geeignet ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Synthese verschiedener heterologer Membranproteine unterschiedlicher Topologie und Herkunft sowohl auf Transkriptebene als auch auf Proteinebene analysiert.

Bei den untersuchten Membranproteinen handelte es sich um die Arabinofuranosyltransferasen AftA und Emb aus *Corynebacterium glutamicum*, um die Squalenepoxidase (Sqep) aus *Stigmatella aurantiaca*, das Ethyleninsensitivprotein 2 (EIN2) sowie einer verkürzten Variante, die nur die N-terminale Membrandomäne des EIN2 umfasste (EIN2-MB), aus *Arabidopsis thaliana* und das Bacterioopsin (Bop) aus *Halobacterium salinarum*.

Bereits nach dem konjugativen Transfer der P_{T7}-abhängigen Expressionsvektoren pRhotHi-2-*aftA*, pRhotHi-2-*emb*, pRhotHi-2-*sqep*, pRhotHi-2-*EIN2*-MB, pRhotHi-2-*EIN2* bzw. pRhotHi-2-*bop* nach *R. capsulatus* B10S-T7 zeigte sich, dass die Transkription des Gens *EIN2* einen stark toxischen Effekt auf die Wirtszelle hatte. So erreichten die entsprechenden Expressionskulturen Zellteilungsraten von nur 2 bis 3 Teilungen in 24 Stunden, was dazu führte, dass nicht einmal die Bestimmung der Plasmidkopienzahl des entsprechenden Expressionsvektors pro Zelle mit Hilfe quantitativer *real-time*-PCR erfolgen konnte.

Im Gegensatz dazu konnten die Expressionsvektoren der anderen ausgewählten Gene in *R. capsulatus* B10S-T7 erfolgreich etabliert werden. Dabei erreichten sie Plasmidkopienzahlen, vergleichbar mit *mid-copy*-Vektoren. Es fiel jedoch auf, dass die Spanne der Plasmidkopienzahlen pro Zelle innerhalb der Gruppe der untersuchten Gene sehr groß war. So wurden z. B. für den Leervektor (pRhotHi-2) Plasmidkopienzahlen von $132,6 \pm 5,5$ Kopien pro Zelle erreicht, für den Bacterioopsin-Expressionsvektor hingegen nur $48,0 \pm 5,7$. Auch wenn die Plasmidkopienzahlen der anderen untersuchten Expressionsvektoren pro Zelle während der Expression der heterologen Zielgene nicht so stark zurückgingen, wie im Fall des Bacterioopsins, zeigte sich deutlich, dass die Expression der ausgewählten Gene einen negativen Effekt auf die Stabilität der Expressionsplasmide hatte.

Zur Überprüfung, ob die ausgewählten Gene *aftA*, *emb*, *sqep*, *EIN2-MB* und *bop* im *R. capsulatus* Expressionssystem auch tatsächlich transkribiert werden, wurden ihre Transkripte mit Hilfe quantitativer *real-time*-PCR zum einen nachgewiesen und zum anderen quantifiziert. Dabei wurde deutlich, dass die Transkriptmassen von *emb* und *bop* mit $5,43 \cdot 10^{-4} \pm 2,53 \cdot 10^{-4}$ ng bzw. $5,89 \cdot 10^{-4} \pm 2,01 \cdot 10^{-4}$ ng pro 150 ng Gesamt-RNA sehr gering waren. Ihr Anteil an der Gesamt-RNA-Masse lag dadurch bei nur $3,62 \cdot 10^{-4}$ % (*emb*) bzw. $3,90 \cdot 10^{-4}$ % (*bop*). Im Vergleich dazu liegt der Transkriptanteil von Bacterioopsin bei der Expression in *Halobacterium halobium* bei 0,2 % bezogen auf die Gesamt-RNA (DasSarma *et al.*, 1984). Im Gegensatz zu *emb* und *bop* erreichten die Transkripte von *EIN2-MB*, *aftA* und *sqep* hingegen Anteile von 0,13 %, 0,72 % bzw. 1,56 % bezogen auf die Gesamt-RNA und lagen damit im Rahmen der relativen Transkriptmenge von Bacterioopsin in *H. halobium* bzw. deutlich darüber. Auch das Transkript des konstitutiv exprimierten *aphII*-Gens, welches in allen durchgeführten *real-time*-PCR als Transkriptionskontrolle mituntersucht wurde, erzielte im *emb*- und *bop*-Expressionssystem in *R. capsulatus* B10S-T7 einen Anteil von 0,25 % bezogen auf die Gesamt-RNA. Somit scheint die Transkriptstabilität heterologer Transkripte im *R. capsulatus* Expressionssystem kein generelles Problem zu sein, sondern nur ein spezifisches Problem für die Transkripte von *emb* und *bop*.

Besonders auffällig im Zusammenhang mit der Transkriptbestimmung sind die zum Teil sehr großen Standardabweichungen von bis zu ± 45 % für das Transkript von *emb*. Im Vergleich dazu waren die Standardabweichungen für die Plasmidkopienzahlen pro Zelle deutlich geringer (maximal ± 12 %). Dadurch wird ersichtlich, dass die gemessenen Werte tatsächlich durch Varianzen in den lebenden Zelle hervorgerufen wurden und nicht durch methodische Fehler während der Versuchsdurchführung. So ist es möglich auch kleinste Veränderungen der Transkriptmengen in den Testsystemen mit Hilfe der sehr sensitiven Methode der *real-time*-PCR zu detektieren, sodass die Schwankungen in den Transkriptmengen letztendlich auf die unterschiedliche Induktion der Promotoren in den Testsystemen zurückzuführen ist.

Trotz der geringen Transkriptmenge konnte für das *R. capsulatus* B10S-T7 Expressionssystem gezeigt werden, dass das Genprodukt Bacterioopsin in signifikanten Mengen akkumuliert wurde. Auch das Genprodukt Squalenepoxidase konnte im *R. capsulatus* B10S-T7 Expressionssystem akkumuliert werden. Demgegenüber fand keine Akkumulation der Genprodukte von *aftA*, *emb* und *EIN2-MB*, trotz ausreichender Transkriptmengen, statt. Ein möglicher Grund dafür ist die unterschiedliche *codon bias* zwischen dem homologen Wirt der untersuchten Gene und dem Expressionswirt *R. capsulatus* B10S-T7. So beschreibt die *codon bias* das Phänomen, das der degenerierte universelle genetische Code von

verschiedenen Spezies unterschiedlich verwendet wird. So werden bestimmte Kodons des degenerierten Codes bevorzugt benutzt, was meist damit einher geht, dass die spezifischen tRNA-Moleküle für diese Kodons im tRNA-*Pool* der Zelle deutlich stärker vertreten sind als die tRNA-Moleküle, die seltene Kodons erkennen. Enthält ein Gen nun viele solcher seltener Kodons, wird der Vorrat der kognitiven tRNA-Spezies für diese Kodons rasch erschöpft (Gustafsson *et al.*, 2004; Smith, 1996). Die Folge davon können, wie in der Einleitung schon beschrieben, Leserasterverschiebungen (McNulty *et al.*, 2003), translationale „Sprünge“ (Kane *et al.*, 1992) oder fehlerhafter Einbau anderer Aminosäuren (Calderone *et al.*, 1996; Forman *et al.*, 1998; McNulty *et al.*, 2003) sein. Die Folge ist letztendlich, dass das gewünschte Genprodukt nicht akkumuliert.

Genau diese *codon bias* ist höchstwahrscheinlich auch der Grund, warum die Genprodukte *AftA*, *Emb* und *EIN2-MB* im *R. capsulatus* B10S-T7 Expressionssystem nicht akkumulieren. So enthält *aftA* 172 Kodons, deren kognitive tRNA-Spezies in *R. capsulatus* B10S-T7 in weniger als 10 % aller Fälle verwendet wird. Für *emb* sind dies 231 Kodons und für die verkürzte Variante von *EIN2* (*EIN2-MB*) sogar 232 Kodons. Durch diese hohe Anzahl an Kodons, die in *R. capsulatus* B10S-T7 in der Regel nicht verwendet werden, wird der tRNA-*Pool* für die entsprechenden kognitiven t-RNA-Spezies sehr schnell erschöpft und die Akkumulation der betreffenden Genprodukte bleibt aus. Im Gegensatz dazu enthalten die Gene von Bacterioopsin und Squalenepoxidase lediglich 35 bzw. 66 Kodons, die in *R. capsulatus* in weniger als 10 % aller Fälle erkannt werden.

Durch die Akkumulation der Genprodukte Bacterioopsin und Squalenepoxidase im *R. capsulatus* Expressionsstamm B10S-T7 unter Verwendung der P_{T7}-abhängigen Expressionsvektoren pRhotHi-2-*bop* bzw. pRhotHi-2-*sqep* konnte erstmals gezeigt werden, dass *R. capsulatus* in der Lage ist, heterologe Membranproteine in signifikanten Mengen zu akkumulieren. Durch Fraktionierung wurde nachgewiesen, dass 85,3 % des Genprodukts Bacterioopsin in die Membran des heterologen Wirtes *R. capsulatus* inserieren. Zwar wurde für *E. coli* BL21(DE3) mit einem modifizierten pET27b-Expressionsvektor bereits gezeigt, dass Bacterioopsin zu 100 % in die Cytoplasmamembran eingebaut werden kann, jedoch wurde in diesem System lediglich Ausbeuten von 84 µg/l erzielt. Im neuen *R. capsulatus* Expressionssystem liegt die Ausbeute an Bacterioopsin in der Membran jedoch, vorsichtig abgeschätzt an Hand von durchgeführten Proteinkonzentrationsbestimmungen nach der Bradford-Methode, bei 2,2 mg/l Kultur. Ferner wurde gezeigt, dass Bacterioopsin in *R. capsulatus* nicht willkürlich in die Membran inseriert, sondern ausschließlich im

intracytoplasmatischen Membransystem zu finden ist und darin ausschließlich in Vesikeln. Durch Dichtegradientenzentrifugation war es sogar möglich, die Vesikel aus der Membranfraktion von *R. capsulatus* zu isolieren und unmittelbar für weitere Anwendungen zur Verfügung zu stellen.

Ähnliches gilt für die Akkumulation von Squalenepoxidase im neuen *R. capsulatus* Expressionssystem. Sie wurde erstmals überhaupt in signifikanten Mengen akkumuliert und in die Membran des Wirts inseriert. Obwohl nur rund 50 % des Genprodukts in die Membran von *R. capsulatus* inserierte, wurde damit eindeutig gezeigt, dass es sich bei der Squalenepoxidase um ein Membranprotein handelte. Dies wurde bislang nur aufgrund computergestützter Berechnungen vermutet. Wie im Fall von Bacterioopsin, akkumulierte die Squalenepoxidase in der Membran ausschließlich in den Vesikeln des ICM, welche mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation ebenfalls aus der Membranfraktion von *R. capsulatus* B10S-T7 isoliert werden konnten.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich durch den Einbau von Squalenepoxidase die Dichte der ICM Vesikel ändert. Im Vergleich zu ICM Vesikeln, die Bacterioopsin enthielten, sowie zu ICM Vesikeln, die keine heterologes Membranprotein trugen, zeigte sich, dass sich die Dichte der Vesikel mit Squalenepoxidase verringerte.

Dieser Einfluss von heterologen Membranproteinen auf die dreidimensionale Struktur der ICM Vesikel wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals in *R. capsulatus* beobachtet. Ein derartiger Einfluss war bislang nur von den Enzymkomplexen des Photosystems bekannt. So wurde für *R. sphaeroides* gezeigt, dass die Dimerisierung von Lichtsammelkomplex I-Reaktionszentrum-PufX Komplexen zur Ausbildung von helicalen Röhren innerhalb des ICM führt, die nicht stattfindet, wenn die Dimerisierung der beschriebenen Komplexe unterbunden wird (Siebert *et al.*, 2004).

1.2 Synthese heterologer Membranproteine in *E. coli*

In *E. coli* ist die Synthese heterologer Membranproteine in der Regel problematisch, da zum einen die Fläche der Cytoplasmamembran nicht ausreichend ist, um größere Mengen heterologen Membranproteins zu inserieren und zum anderen das Sekretionssystem von *E. coli* durch zuviel bereitgestelltes Genprodukt austitriert wird, was schließlich zu Bildung unlöslicher Einschlusskörper führt. Die *E. coli* Expressionsstämme C41(DE3) und C43(DE3),

die von Miroux und Walker durch *Screening*-Methoden aus dem *E. coli* Stamm BL21(DE3) generiert wurde (Miroux & Walker, 1996), zeichnen sich hingegen durch eine deutlich größere Membranoberfläche im Vergleich zu *E. coli* BL21(DE3) aus. Miroux und Walker konnten ebenfalls zeigen, dass die *E. coli* Stämme C41(DE3) und C43(DE3) einige lösliche sowie einige Membranproteine wesentlich besser akkumulieren können, als ihr Elternstamm. Arechaga und Kollegen konnten außerdem zeigen, dass die Expression einiger Gene, wie zum Beispiel die der Untereinheit b der F₁F₀-ATP-Synthase aus *E. coli* in den Miroux-und-Walker-Stämmen die Bildung zusätzlicher innerer Membranstrukturen induziert. Diese Strukturen sind in *E. coli* C43(DE3) vesikulär, in *E. coli* C43(DE3) werden jedoch tubuläre Membranstrukturen gebildet. Da bislang jedoch nur wenige Proteine in der Lage waren, die Ausbildung dieser zusätzlichen Membranstrukturen zu induzieren (Dumon-Seignovert *et al.*, 2004), eignen sich diese Systeme nicht generell für die Synthese von heterologen Membranproteinen.

Ungeachtet dessen wurde der *E. coli* Stamm C43(DE3) im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet, um zu überprüfen, inwieweit er dazu verwendet werden kann AftA, Emb, Sqep, Bop, EIN2 bzw. die verkürzte Variante von EIN2 (EIN2-MB) zu synthetisieren. Dazu wurden, wie für das *R. capsulatus* Expressionssystem die P_{T7}-abhängigen Expressionsvektoren pRhotHi-2-*aftA*, pRhotHi-2-*emb*, pRhotHi-2-*sqep*, pRhotHi-2-*EIN2-MB*, pRhotHi-2-*EIN2* bzw. pRhotHi-2-*bop* verwendet. Dabei wurde zunächst festgestellt, dass sich der Expressionsvektor pRhotHi-2 sowie seine rekombinanten Derivate in *E. coli* wie ein *low-copy*-Vektor verhielt. Dennoch konnte die Transkription der untersuchten Zielgene in *E. coli* C43(DE3) nachgewiesen werden. Lediglich die Expression des EIN2-Gens war in *E. coli* C43(DE3), wie in *R. capsulatus* B10S-T7, letal. In *E. coli* C43(DE3) fielen die Transkriptmengen der untersuchten Zielgene jedoch deutlich geringer aus, als in *R. capsulatus* B10S-T7. Einzige Ausnahme bildet hier das Transkript des Bacterioopsins, dessen Transkriptmenge in *E. coli* C43(DE3) um den Faktor 1,6 größer war, als in *R. capsulatus*.

Wie in *R. capsulatus* B10S-T7 konnten auch in *E. coli* C43(DE3) von den untersuchten Zielproteinen lediglich das Bacterioopsin sowie die Squalenepoxidase akkumuliert werden. Dabei akkumulierte die Squalenepoxidase in Einschlusskörpern, wohingegen das Bacterioopsin erstmals in die Membran von *E. coli* C43(DE3) inseriert werden konnte. Ob dies jedoch auf Grund einer Induktion des zusätzlichen Membransystems erfolgte, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Der Grund für die ausbleibende Akkumulation der anderen Zielgene scheint auch in *E. coli* C43(DE3) die *codon bias* zu sein. So enthalten die Gene von Bacterioopsin und Squalenepoxidase 66 bzw. 141 Kodons, die in *E. coli* weniger als 20 % verwendet werden. Die Gene *emb* und *EIN2-MB* enthalten demgegenüber 253 bzw. 218 Kodons, die in *E. coli* weniger als 20 % verwendet werden. Obwohl *aftA* „nur“ 128 Kodons enthält, die in *E. coli* weniger als 20 % verwendet werden, wurde kein Genprodukt akkumuliert. Somit schien für das *aftA* ein weiterer Grund vorzuliegen, warum die Akkumulation ausblieb. Dieser ist möglicherweise die extrem niedrige Transkriptmenge, die nur einen Anteil von $4,95 \cdot 10^{-7}$ % bezogen auf die Gesamt-RNA ausmacht.

1.3 Synthese heterologer Membranproteine in *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis ist ein Gram-positives Milchsäurebakterium, welches zur Familie der Streptococcaceae gehört. Es zeichnet sich durch kurze Generationszeiten von nur einer Stunde aus. Die Generationszeit von *R. capsulatus* hingegen beträgt 3 Stunden. Daher können mit *L. lactis* bereits nach kurzen Inkubationszeiten hohe Zelldichten erreicht werden (Kunji *et al.*, 2005). Da es, wie alle Gram-Positiven, lediglich eine Zellmembran besitzt, die im Gegensatz zu *R. capsulatus* keine Lipopolysaccharidschicht besitzt, sind sowohl Translokation und Insertion heterologer Proteine, sowie die Fraktionierung der Zellen stark vereinfacht (Kunji *et al.*, 2005). Für die Synthese von heterologen Membranproteinen wird in *L. lactis* das so genannte NICE-System verwendet. Die Abkürzung NICE steht dabei für Nisin controlled gene expression system. Es nutzt den strikt regulierten starken Nisin-A-Promotor, welcher durch Nisin induziert wird (de Ruyter *et al.*, 1996). Auf Grund seiner strikten Regulation ermöglicht er die hoch reproduzierbare Genexpression, auch von toxischen Proteinen (de Ruyter *et al.*, 1996; Kunji *et al.*, 2003).

Das Milchsäurebakterium *L. lactis* wurde erstmals von Kunji als Wirt für die heterologe Synthese eukaryotischer Membranproteine verwendet (Kunji *et al.*, 2003). Mit Hilfe des NICE-Systems gelang es, den human KDEL-Rezeptor, der für die Rückfaltung löslicher Proteine des endoplasmatischen Retikulums verantwortlich ist, den hydrogenosomalen ADT/ATP-Transporter und verschiedene weitere mitochondriale Transporter aus Hefen funktionell bei hohen Expressionsraten zu synthetisieren. Außerdem wurde der humane ABC-Transporter funktionell exprimiert (Janvilisri *et al.*, 2005).

Die Genprodukte akkumulierten in *L. lactis* ausschließlich in der Membran. Die Bildung von Proteineinschlusskörpern wurde nicht beobachtet (Kunji *et al.*, 2005; Monné *et al.*, 2005).

Wegen der geringen proteolytischen Aktivität von *L. lactis* wurde keine signifikante Degradation der isolierten Membranproteine beobachtet. Zur Optimierung des *R. capsulatus* Expressionssystem wäre daher die Herabsetzung der proteolytischen Aktivität durch Deletion starker Proteasen, wie im *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) geschehen, eine mögliche Option, falls die Degradation von heterologem Membranprotein beobachtet werden sollte.

Im Gegensatz zu *R. capsulatus* können in *L. lactis* funktionelle Studien mit den heterolog synthetisierten Membranproteinen in ganzen Zellen durchgeführt werden, da viele Substrate, Inhibitoren und Liganden die Zellwand ungehindert passieren können (Kunji *et al.*, 2005). In *R. capsulatus* hingegen ist es möglich, die Vesikel des ICM, die nachweislich das heterolog synthetisierte Membranprotein aufnehmen, mittels Dichtegradientenzentrifugation zu isolieren und diese für funktionelle Studien zu verwenden. Dies hat gegenüber der Methode in *L. lactis* den großen Vorteil, dass störende Einflüsse durch andere Proteine oder zelleigene Substanzen weitestgehend ausgeschlossen werden können, da die Vesikel außer dem heterologen Membranprotein ausschließlich Enzyme des Photosyntheseapparates enthalten.

Das Hauptstoffwechselprodukt von *L. lactis* ist Lactat. In undissoziierter Form hat dieses Produkt jedoch einen toxischen Effekt auf *L. lactis* (Kashket, 1987), der mit steigendem pH-Wert zunimmt und schließlich wuchslimitierend wird (Mierau *et al.*, 2005). Daher ist für die effiziente Kultivierung von *L. lactis* die ständige Regulierung des pH-Wertes unerlässlich.

Eine solche Regulierung war bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *R. capsulatus* Kulturen nicht erforderlich. Dennoch haben erste Testläufe in 1,4 l-Fermentern gezeigt, dass der pH-Wert von *R. capsulatus* in Abhängigkeit von der Wachstumsphase variieren kann und so einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum haben kann. Auch die Verstoffwechslung des für das *R. capsulatus* Expressionssystem verwendeten Induktors Fruktose führt zu Schwankungen im pH-Wert, die während einer längeren Fermentation ohne pH-Regelung einen negativen Einfluss auf das Wuchsverhalten von *R. capsulatus* haben können. Obwohl der Induktor Fruktose in *R. capsulatus* verstoffwechselt wird, konnte nachgewiesen werden, dass diese Abnahme der Fruktosekonzentration im Medium keinen Einfluss auf die Geninduktion hat, wenn der entsprechenden Kultur eine Anfangskonzentration von 8 mM Fruktose zugegeben wurde (Katzke *et al.*, in Vorbereitung).

Der chromosomale AT-Gehalt von *L. lactis* ist mit ca. 65 % relativ hoch (Fuglsang, 2003). Aus diesem Grund eignet sich *L. lactis* vorrangig für die Expression von Genen AT-reicher Organismen. Mit einem GC-Gehalt von 68 % eignet sich *R. capsulatus* hingegen besonders gut für die Expression GC-reicher Gene.

1.4 Synthese heterologer Membranproteine in *Saccharomyces cerevisiae*

Hefe-basierte Expressionssysteme für die heterologe Synthese von Membranproteinen sind eine Alternative zur den bereits beschriebenen Expressionssystemen, insbesondere wenn es darum geht, eukaryotische Membranproteine zu synthetisieren (Grisshammer & Tate, 1995). So sind Hefen in der Lage, bestimmte post-translationale Modifikationen vorzunehmen, die für die Synthese funktioneller eukaryotischer Membranproteine notwendig sind (Grisshammer & Tate, 1995).

Ein neues Hefe-basiertes Expressionssystem verwendet dazu die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Griffith *et al.*, 2003). Unter Ausnutzung des *unfolded protein response pathway* (UPR) von *S. cerevisiae* ermöglicht es besonders die Synthese heterologer Membranproteine, die nach ihrer Synthese sekretiert werden. Die Funktionalität dieses Systems wurde unter anderem durch die Synthese eines P2 Adenosintransporters sowie zwei humanen *G protein-coupled receptors* (GPCRs) unter Beweis gestellt (Griffith *et al.*, 2003).

1.5 *R. capsulatus* B10SS-T7 – Ein Expressionswirt für die heterologe Synthese von *G protein-coupled receptors*?

G protein-coupled receptors (GPCRs) sind Membranproteine, die Signale über GTP-bindende Proteine, kurz G-Proteine, durch die Membran weiterleiten und stellen die größte und vielseitigste Gruppe von Membranrezeptoren dar. Die Signalweiterleitung kann dabei durch eine Vielzahl von Molekülen ausgelöst werden, so z. B. von Hormonen wie Adrenalin oder Glucagon, Neurotransmittern wie Serotonin oder Acetylcholin, aber auch Licht. GPCRs spielen eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung von Licht-, Geruchs- und Geschmacksreizen, sowie bei Entzündungsprozessen, der Chemotaxis, der Endo- und Exocytose, beim Zellwachstum und der Zelldifferenzierung (Lundstrom, 2005). So spielen die Aktivierung oder Inhibierung von GPCRs außerdem eine entscheidende Rolle bei neurologischen Erkrankungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Stoffwechselerkrankungen sowie Krebserkrankungen (Hamm, 1998). Ebenso ist bekannt, dass das HI-Virus G Protein-gekoppelte Chemokinrezeptoren für den Zelleintritt verwendet (Feng *et al.*, 1996). Daher besteht ein enormes Interesse, sowohl aus biologischer wie auch aus pharmazeutischer Sicht, GPCRs funktionell in heterologen Systemen in großen Mengen synthetisieren zu können (Lundstrom, 2005).

Trotz der geringen Sequenzhomologien untereinander besitzen alle GPCRs sieben transmembrane α -Helices, wobei der C-Terminus intrazellulär lokalisiert ist. So zählen auch

die Rhodopsine zur Gruppe der GPCRs, die wiederum eng verwandt sind mit Bacterioopsin, welches sich im Rahmen dieser Arbeit in großen Mengen im neuen *R. capsulatus* Expressionssystem in den ICM Vesikeln akkumulieren lässt. Somit könnte dieses System potentiell auch zur heterologen Synthese von GPCRs eingesetzt werden.

2 Carotinoidbiosynthese in *R. capsulatus*

2.1 Carotinoidsynthese in Algen als mögliche Alternative zur industriellen Synthese

Die chemische Totalsynthese von Carotinoiden ist ein zeitaufwendiger und umweltbelastender Prozess, dem viel Energie zugeführt werden muss. Um dem wachsenden Bedarf an industriell hergestellten Carotinoiden gerecht zu werden, müssen neuartige Syntheserouten gefunden werden.

Eine Möglichkeit für die alternative Synthese von Carotinoiden, die zudem das Spektrum der industriell hergestellten Carotinoide enorm erweitert, ist die Biosynthese in Algenfarmen. Bei diesen Algenfarmen handelt es sich um große Becken oder Tanks, in denen Mikroalgen gezüchtet werden. Dadurch ist es möglich, sämtliche Carotinoide, die diese Algen produzieren, zu isolieren. Dazu werden sie phototroph angezogen, geerntet und ihre Carotinoide chemisch extrahiert. In derartigen Algenfarmen werden unter anderem die Grünalgen *Haematococcus pluvialis* (für die Synthese von Astaxanthin) und *Chlamydomonas reinhardtii* gezüchtet (Abbildung 43).



Abbildung 43: Kommerzielle Biosynthese von Carotinoiden. Mehr als $\frac{3}{4}$ der industriellen Carotinoidweltproduktion wird in Werken der BASF AG und DSM durchgeführt. Da die chemische Totalsynthese (a, Foto: BASF AG) von Carotinoiden aufwendig und teuer ist, wird für die Synthese weiterer Carotinoide nach alternativen Synthesewegen gesucht. Eine Möglichkeit, die zudem das Spektrum der industriell hergestellten Carotinoide enorm erweitert, ist die Biosynthese in Algenfarmen (b, Reaktor mit *Haematococcus pluvialis*, Foto: www.algatech.com). In derartigen Algenfarmen werden die Grünalgen u. a. für die Synthese von Astaxanthin gezüchtet. Die Firma Solix Biofuels (c, Foto: Solix Biofuels) unterhält ähnliche Algenfarmen in Colorado, USA, setzt diese allerdings zur Biodieselproduktion ein. Ein weiterer Lösungsansatz zur Synthese von Carotinoiden in Mikroorganismen ist die biotechnologische Produktion in leicht kontrollier- und regelbaren Bioreaktoren (d, Foto: Jörg Ullmann).

Da diese Algen Photosynthese betreiben, somit im Licht angezogen werden müssen und eine bestimmte Wuchstemperatur benötigen, können derartige Farmen nur in sonnigen, warmen Gebieten kosteneffizient betrieben werden. Hier kann auf künstliche Beleuchtung verzichtet werden, da die Sonne sowohl als Licht- als auch Wärmequelle dient. So findet man *H. pluvialis* Farmen z. B. in Australien. Auch die Firma Cognis Nutrition and Health unterhält Algenfarmen in Australien. In diesen Farmen wird die Alge *Dunaliella salina* zur Carotinoidbiosynthese eingesetzt. Da es sich bei *D. salina* um einen halophilen Organismus handelt, kann dessen Kultivierung unmittelbar in Meerwasser erfolgen. Die Firma *Solix Biofuels* betreibt eine große Algenfarm in Colorado, USA. Diese Anlage wird jedoch nicht zur Carotinoidproduktion sondern zur Herstellung von Biodiesel verwendet.

Die geographischen Notwendigkeiten zur effizienten Nutzung von Algenfarmen wie Licht und Wärme verursachen gleichzeitig jedoch ein Problem: In offenen Algenfarmen verdunstet ständig Wasser aus den Tanks, was zur Änderung der Salzkonzentrationen im Wasser führt. Diesen Konzentrationsschwankungen muss durch Wasserzufluss gegengesteuert werden, um ein optimales Algenwachstum gewährleisten zu können. In Gebieten, die auf Grund der geographischen Lage für Algenfarmen geeignet wären, ist Wasser meist ein kostbares und teures Gut, welches zudem noch entsalzt werden muss, wenn es zum Konzentrationsausgleich in die Algentanks gegeben wird. Außerdem muss die Temperatur in den riesigen Algentanks konstant gehalten werden. Ein weiteres Problem ist es, genügend Algenbiomasse zu produzieren, um große Mengen Carotinoide isolieren zu können. Die Teilungsrate der Grünalge *H. pluvialis* liegt zum Beispiel bei nur 0,7 pro Tag.

Daher ist ein weiterer Lösungsansatz die bakterielle Carotinoidproduktion in Bioreaktoren. Diese sind leicht kontrollier- und regelbar, deutlich kleiner als Algenfarmen und unabhängig von geographischen Faktoren einsetzbar. Außerdem produzieren Bakterien auf Grund ihrer hohen Zellteilungsraten sofort carotinoidhaltige Biomasse, sind genetisch leicht charakterisierbar und manipulierbar und haben kurze Generationszeiten.

2.2 Bakterielle Carotinoidsynthese in *R. capsulatus*

Ein Beispiel für die bakterielle Produktion von Carotinoiden ist das bekannte Bakterium *E. coli*. So wurden *E. coli* Stämme dahingehend gentechnisch verändert, dass sie in der Lage sind, bestimmte Carotinoide, wie zum Beispiel Zeaxanthin zu produzieren (0,3 mg/g Zelltrockenmasse).

Die Schwierigkeit bei der Carotinoidsynthese in *E. coli* ist jedoch, dass es sich um ein nicht-

carotinogenes Bakterium handelt. Daher müssen alle Gene des Carotinoidsynthesewegs von der Isoprenoidsynthese an gentechnisch in das Bakterium eingebracht werden, was bei der anschließenden Expression zu erheblichem Zellstress und niedrigen Carotinoidausbeuten führt. Außerdem sind die meisten Carotinoide nicht wasserlöslich und müssen in die Zellmembran eingebaut werden (in photosynthetischen Organismen in Komplexe des Photosystems). Dies ist in *E. coli* nicht möglich und senkt zusätzlich die Syntheseausbeute.

Diese Limitierungen können überwunden werden, wenn statt *E. coli* ein carotinogenes Bakterium als Synthesewirt verwendet wird. So wurden bereits Cyanobakterien zur Synthese von Carotinoiden verwendet (Liang *et al.*, 2006) und auch das Bakterium *R. sphaeroides* (Garcia-Asua *et al.*, 2002), welches der nächste Verwandte von *R. capsulatus* ist.

Somit stellt auch das phototrophe Bakterium *R. capsulatus* mit seinen bereits beschriebenen physiologischen Besonderheiten eine potente Alternative zu den bislang etablierten Mikroorganismen für die Carotinoidbiosynthese dar.

Um *R. capsulatus* für die Synthese von Carotinoiden zu etablieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkung von Licht verschiedener Wellenlängen auf das Wachstum von *R. capsulatus* sowie die Pigmentkomposition und -menge untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sowohl infrarotes Licht, als auch blaues Licht dazu verwendet werden kann, um *R. capsulatus* zu kultivieren, ohne dass die Lichtqualität wuchslimitierend ist.

Außerdem wurde nachgewiesen, dass durch den Einsatz von Infrarotlicht, Blaulicht, aber auch der Kombination von Blau- und Infrarotlicht ein zusätzliches Pigment, bei dem es sich wahrscheinlich um Neurosporen handelt, akkumuliert. Für die allgemeine Carotinoidsynthese ist jedoch vor allem der Blaulichtphänotyp von *R. capsulatus* interessant. So wurde gezeigt, dass die Carotinoidmenge in *R. capsulatus* allein durch Bestrahlung mit Blaulicht deutlich gesteigert werden konnte. Eine derartige Lichtregulation ist für *R. capsulatus* in der Literatur nicht beschrieben, wohl aber für *R. sphaeroides*.

2.3 Ist *R. capsulatus* blaulichtreguliert?

Bislang ist für *R. capsulatus* in der Literatur kein Blaulichtphänotyp beschrieben. Im Gegensatz dazu ist der Einfluss von blauem Licht auf das Bakterium *R. sphaeroides* seit Jahren bekannt und Gegenstand von Untersuchungen (Braatsch *et al.*, 2004). So wurde gezeigt, dass die Anzucht von *R. sphaeroides* im Blaulicht zur Reprimierung der Gene des

puc- und *puf*-Operons führt, die beide für die Bildung der Photosystemkomplexe entscheidend sind. Im *puc*-Operon werden die Gene für den Lichtsammelkomplex II des Photosystems von *R. sphaeroides* kodiert, im *puf*-Operon die Gene des Lichtsammelkomplex I und des Reaktionszentrums. Es wird angenommen, dass die Reprimierung dieser Gene *R. sphaeroides* vor Photooxidation schützen soll, wenn das Photosystem des Bakteriums gleichzeitig Sauerstoff und hohen Lichtintensitäten ausgesetzt ist. Dabei steuert der Photorezeptor AppA, der zur Familie der BLUF-Domänen gehört, zusammen mit PpsR in einem Antirepressor-Repressor System die Reprimierung der genannten Genregionen. Zwar findet man in *R. capsulatus* mit dem CrtJ ein Homolog zum PpsR, jedoch nicht zum AppA. Der einzig bekannte putative Blaulichtrezeptor in *R. capsulatus* ist das *photo active yellow protein* (PYP), dessen Funktion jedoch bislang nicht geklärt werden konnte (Kyndt *et al.*, 2004). Möglicherweise steht die Funktion dieses Photorezeptors in Zusammenhang mit dem neuen für *R. capsulatus* beschriebenen Blaulichtphänotyp. Dies zu klären ist daher derzeit Gegenstand einer weiteren wissenschaftlichen Arbeit im Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

V Zusammenfassung

Die funktionelle Expression heterologer Membranproteine ist für viele wissenschaftliche und biotechnologische Anwendungen von besonderem Interesse. Leider ist jedoch die Synthese von Membranproteinen in Standardexpressionswirten wie z.B. *E. coli* nicht ohne weiteres möglich. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die Verwendung eines alternativen Expressionssystems, das auf dem phototrophen Bakterium *R. capsulatus* basiert, für die Expression solcher Problemproteine besonders geeignet ist. Im Gegensatz zu *E. coli* weist *R. capsulatus* unter phototrophen Bedingungen eine stark vergrößerte Cytoplasmamembran auf, die eine große Anzahl verschiedener Photosyntheseproteine beherbergt und somit grundsätzlich großen Mengen an Membranproteinen synthetisieren und akkumulieren kann. Voraussetzung für die Synthese heterologer Membranproteine in *R. capsulatus* ist ein etabliertes Expressionssystem, das die heterologe Überexpression beliebiger Zielgene unter phototrophen Wuchsbedingungen erlaubt. Ein solches Expressionssystem wurde mit dem Expressionsvektor pRhotHi-2, der die Zielgenexpression unter der Kontrolle des T7-Promotors aus dem T7-Phagen erlaubt, und dem Expressionsstamm *R. capsulatus* B10S-T7 realisiert. Dieser Expressionsstamm trägt das T7-RNA-Polymerasegen als stabile chromosomale Integration unter der Kontrolle eines Fruktose-induzierbaren Promotors (P_{fru}). Mit Hilfe dieses Expressionssystems wurde untersucht, inwieweit *R. capsulatus* in der Lage ist, unter photoheterotrophen Anzuchtbedingungen heterologe Membranproteine wie z.B. das Bacterioopsin und die Squalenepoxidase zu synthetisieren. Als Referenzsysteme wurden die beiden *E. coli* Expressionsstämme BL21(DE3) und C43(DE3) verwendet. Mit Hilfe quantitativer *real-time*-PCR Methoden konnte gezeigt werden, dass sowohl das Transkript des Squalenepoxidase-Gens *sqep* als auch des Bacterioopsin-Gens *bop* in *R. capsulatus* in deutlich größeren Menge akkumuliert als in den entsprechenden *E. coli* Expressionsstämmen. Anhand immunologischer Nachweismethoden konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass in *R. capsulatus* beide heterologen Membranproteine in der Zellmembran akkumulieren, während sich *E. coli* lediglich Bacterioopsin in geringen Mengen funktionell exprimieren ließ. Mit einer analytischen Dichtegradientenzentrifugation konnte außerdem nachgewiesen werden, dass sowohl die Squalenepoxidase als auch das Bacterioopsin ausschließlich in den Photosynthese-Vesikeln der *R. capsulatus* Membran in großen Mengen (> 2mg) akkumulierten und so sehr einfach isoliert für weiter Anwendungen charakterisiert werden können. Aufgrund der besonderen physiologischen Eigenschaften von *R. capsulatus* kann

dieser Organismus außerdem zur Produktion von Carotinoiden eingesetzt werden. Daher wurde untersucht, inwieweit die Carotinoid-Ausbeute in *R. capsulatus* durch eine Veränderung der Belichtungsbedingungen gesteigert werden kann. Dabei stellte sich heraus, dass durch eine gezielte Beleuchtung der Zellen mit blauem und/oder infrarotem Licht die Carotinoidkomposition und Carotinoidmenge beeinflusst wird. Insbesondere führt die Einstrahlung von blauem Licht zu einer deutlichen Steigerung der Carotinoidmenge im untersuchten Testsystem.

VI Summary

The functional expression of heterologous membrane proteins is of enormous scientific and biotechnological interest. Unfortunately, the synthesis of membrane proteins in standard expression hosts such as *E. coli* is not possible without further ado. Therefore, the application of an alternative expression system that bases on the phototrophic bacteria *R. capsulatus* was analyzed with respect to synthesis of heterologous membrane proteins. This expression system exhibits a strongly enlarged membrane system when cultivated under phototrophic growth conditions that harbours a huge number of photosystem proteins. This membrane system is also potentially able to incorporate heterologous membrane proteins. However, prerequisite for the synthesis of heterologous membrane proteins in *R. capsulatus* is an expression, allowing the heterologous over-expression of any target gene under phototrophic growth conditions. Such a system was realized by developing the expression vector pRhotHi-2, allowing the target gene expression under the control of the T7 promoter, and the expression strain *R. capsulatus* B10S-T7. This expression strain carries the T7-RNA-polymerase gene under the control of a promoter that can be induced by fructose (P_{fru}).

Using this expression system, it has been analyzed if *R. capsulatus* can be used to express the heterologous membrane proteins Bacterioopsin and Squalenepoxidase under phototrophic growth conditions. In addition, standard *E. coli* expression strains have been used as an appropriate reference system. First, transcript accumulation in the different expression hosts was analyzed. Quantitative real-time PCR revealed that in *R. capsulatus* both the transcript of the Bacterioopsin gene *bop* as well as the Squalenepoxidase gene *sqep* accumulated in much higher amounts in comparison to the *E. coli* strains. Furthermore, protein localization studies demonstrated that *R. capsulatus* was able to insert both membrane proteins into the membrane whereas in *E. coli*, only Bacterioopsin was detectable in the membrane fraction in low amounts. Finally, by using Saccharose gradient ultracentrifugation, membrane vesicles, containing the heterologous membrane proteins with a yield of more than 2 mg could easily be separated from other membrane components helping to further characterize those proteins, subsequently. Because of its unique physiological properties, *R. capsulatus* can also be used to produce different Carotinoids. Therefore, it has been analyzed if changes of the illumination conditions result in an enhanced synthesis of these photo pigments. By using different LEDs, emitting light in the blue and/or infrared range, a change of the composition and amount of Carotinoids could be observed in *R. capsulatus*. Remarkably, phototrophic

growth under blue light led to a significant increase of Carotinoid accumulation in the used test system.

VII Literatur

- Ahram, M., Litou, Z. I., Fang, R. & Al-Tawallbeh, G. (2006). Estimation of membrane proteins in the human proteome. *In Silico Biol* **6**: 379-386.
- Alderwick, L. J., Seidel, M., Sahm, H., Besra, G. S. & Eggeling, L. (2006). Identification of a novel arabinofuranosyltransferase (AftA) involved in cell wall arabinan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **281**: 15653-15661.
- Allread, R. M., Nicholls, D. J., Sundaram, T. K., Scawen, M. D. & Atkinson, T. (1992). Overexpression of the *Thermus aquaticus* B malate dehydrogenase-encoding gene in *Escherichia coli*. *Gene* **114**: 139-143.
- Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. & Ecker, J. R. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* **284**: 2148-2152.
- Amrein, K. E., Takacs, B., Stieger, M., Molnos, J., Flint, N. A. & Burn, P. (1995). Purification and characterization of recombinant human p50csk protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1048-1052.
- Andersson, L., Yang, S., Neubauer, P. & Enfors, S. O. (1996). Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **46**: 255-263.
- Arechaga, I., Miroux, B., Karrasch, S., Huijbregts, R., de Kruijff, B., Runswick, M. J. & Walker, J. E. (2000). Characterisation of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale over-production of the b subunit of F₁F₀ ATP synthase. *FEBS Lett* **482**: 215-219.
- Arié, J. P., Sassoon, N. & Betton, J. M. (2001). Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **39**: 199-210.
- Armstrong, G. A. (1997). Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: A colorful tale. *Annu Rev Microbiol* **51**: 629-659.
- Arnold, W. & Pühler, A. (1988). A family of high-copy-number plasmid vectors with single end-label sites for rapid nucleotide sequencing. *Gene* **70**: 171-179.
- Bachmann, B. J. (1990). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol Rev* **54**: 130-197.
- Baneyx, F. & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **22**: 1399-1408.
- Bartley, G. E., Schmidhauser, T. J., Yanofsky, C. & Scolnik, P. A. (1990). Carotenoid desaturases from *Rhodobacter capsulatus* and *Neurospora crassa* are structurally and functionally conserved and contain domains homologous to flavoprotein disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem* **265**: 16020-16024.
- Bauer, C., Elsen, S., Swem, L. R., Swem, D. L. & Masuda, S. (2003). Redox and light regulation of gene expression in photosynthetic prokaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**: 147-154.
- Bernds, J. (2006). Etablierung eines neuen Systems zur heterologen Expression von Membranproteinen in *Rhodobacter capsulatus*. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität.
- Bernhard, K. (1990). Synthetic astaxanthin. The route of a carotenoid from research to commercialisation. In *Carotenoids: Chemistry and Biology*. Edited by N. I. Krinsky, M. M. Mathews-Roth & R. F. Taylor. New York: Plenum Press.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.

- Braatsch, S., Moskvina, O. V., Klug, G. & Gomelsky, M. (2004). Responses of the *Rhodobacter sphaeroides* transcriptome to blue light under semiaerobic conditions. *J Bacteriol* **186**: 7726-7735.
- Calderone, T. L., Stevens, R. D. & Oas, T. G. (1996). High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **262**: 407-412.
- Carbone, A., Zinovyev, A. & Képès, F. (2003). Codon adaptation index as a measure of dominating codon bias. *Bioinformatics* **19**: 2005-2015.
- Chang, S.-W., Lee, G.-C. & Shaw, J.-F. (2006). Codon optimization of *Candida rugosa lip1* gene for improving expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified recombinant LIP1 lipase. *J Agric Food Chem* **54**: 815-822.
- Charbonnier, F., Kohler, T., Pechere, J. C. & Ducruix, A. (2001). Overexpression, refolding, and purification of the histidine-tagged outer membrane efflux protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Expr Purif* **23**: 121-127.
- Chen, C., Snedecor, B., Nishihara, J. C., Joly, J. C., McFarland, N., Andersen, D. C. *et al.* (2004). High-level accumulation of a recombinant antibody fragment in the periplasm of *Escherichia coli* requires a triple-mutant (*degP prc spr*) host strain. *Biotechnol Bioeng* **85**: 463-474.
- Chevallet, M., Dupuis, A., Issartel, J. P., Lunardi, J., van Belzen, R. & Albracht, S. P. (2003). Two EPR-detectable [4Fe-4S] clusters, N2a and N2b, are bound to the NuoI (TYKY) subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochim Biophys Acta* **1557**: 51-66.
- Chory, J., Donohue, T. J., Varga, A. R., Staehelin, L. A. & Kaplan, S. (1984). Induction of the photosynthetic membranes of *Rhodospirillum rubrum*: biochemical and morphological studies. *J Bacteriol* **159**: 540-554.
- Collins, M. L., Buchholz, L. A. & Remsen, C. C. (1991). Effect of Copper on *Methylomonas albus* BG8. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1261-1264.
- Corchero, J. L., Viaplana, E., Benito, A. & Villaverde, A. (1996). The position of the heterologous domain can influence the solubility and proteolysis of β -galactosidase fusion proteins in *E. coli*. *J Biotechnol* **48**: 191-200.
- Corchero, J. L. & Villaverde, A. (1998). Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol Bioeng* **58**: 625-632.
- DasSarma, S., RajBhandary, U. L. & Khorana, H. G. (1984). Bacterio-opsin mRNA in wild-type and bacterio-opsin-deficient *Halobacterium halobium* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 125-129.
- de Ruyter, P. G., Kuipers, O. P. & de Vos, W. M. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3662-3667.
- De Smet, L., Kostanjevecki, V., Guisez, Y. & Van Beeumen, J. (2001a). A novel system for heterologous expression of flavocytochrome c in phototrophic bacteria using the *Allochrocatium vinosum rbcA* promoter. *Arch Microbiol* **176**: 19-28.
- De Smet, L., Pettigrew, G. W. & Van Beeumen, J. J. (2001b). Cloning, overproduction and characterization of cytochrome c peroxidase from the purple phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Eur J Biochem* **268**: 6559-6568.
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A. M. & Adams 3rd, W. W. (1996). Carotenoids 3: *In vivo* function of carotenoids in higher plants. *Faseb J* **10**: 403-412.
- Deng, T. (1997). Bacterial expression and purification of biologically active mouse c-Fos proteins by selective codon optimization. *FEBS Lett* **409**: 269-272.
- Doherty, A. J., Connolly, B. A. & Worrall, A. F. (1993). Overproduction of the toxic protein, bovine pancreatic DNaseI, in *Escherichia coli* using a tightly controlled T7-promoter-based vector. *Gene* **136**: 337-340.

- Dong, H., Nilsson, L. & Kurland, C. G. (1995). Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J Bacteriol* **177**: 1497-1504.
- Drepper, T., Groß, S., Yakunin, A. F., Hallenbeck, P. C., Masepohl, B. & Klipp, W. (2003). Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology* **149**: 2203-2212.
- Drepper, T., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Heck, A., Jaeger, K.-E. et al. (2008). Verfahren und Vektor zur heterologen Genexpression. DE 10 2008 013 304.3.
- Drew, D., Froderberg, L., Baars, L. & de Gier, J. W. (2003). Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1610**: 3-10.
- Drews, G. & Golecki, J. R. (1995). Structure, molecular organization and biosynthesis of membranes of purple bacteria. In *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Edited by R. E. Blankenship, M. T. Madigan & C. E. Bauer. Dordrecht, NL: Kluwer Academic Publishers.
- Dugaiczuk, A., Boyer, H. W. & Goodman, H. M. (1975). Ligation of *EcoRI* endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol* **96**: 171-184.
- Dumon-Seignovert, L., Cariot, G. & Vuillard, L. (2004). The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr Purif* **37**: 203-206.
- Dunn, R., McCoy, J., Simsek, M., Majumdar, A., Chang, S. H., Rajbhandary, U. L. & Khorana, H. G. (1981). The bacteriorhodopsin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 6744-6748.
- Dunn, S. D. (1986). Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal Biochem* **157**: 144-153.
- Duport, C., Meyer, C., Naud, I. & Jouanneau, Y. (1994). A new gene expression system based on a fructose-dependent promoter from *Rhodobacter capsulatus*. *Gene* **145**: 103-108.
- Dyczmons, N. G. (2006). Expression und Regulation von Membranproteinen am Beispiel der Cytochrom bd-Oxidase aus *Synechocystis sp.* PCC 6803. Bochum: Ruhr-Universität.
- Elhai, J. & Wolk, C. P. (1988). Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol* **167**: 747-754.
- Elofsson, A. & von Heijne, G. (2007). Membrane protein structure: prediction versus reality. *Annu Rev Biochem* **76**: 125-140.
- Feng, L., Chan, W. W., Roderick, S. L. & Cohen, D. E. (2000). High-level expression and mutagenesis of recombinant human phosphatidylcholine transfer protein using a synthetic gene: evidence for a C-terminal membrane binding domain. *Biochemistry* **39**: 15399-15409.
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. & Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**: 872-877.
- Fonstein, M. & Haselkorn, R. (1993). Chromosomal structure of *Rhodobacter capsulatus* strain SB1003: cosmid encyclopedia and high-resolution physical and genetic map. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2522-2526.
- Forman, M. D., Stack, R. F., Masters, P. S., Hauer, C. R. & Baxter, S. M. (1998). High level, context dependent misincorporation of lysine for arginine in *Saccharomyces cerevisiae* a1 homeodomain expressed in *Escherichia coli*. *Protein Sci* **7**: 500-503.
- Fuglsang, A. (2003). Lactic acid bacteria as prime candidates for codon optimization. *Biochem Biophys Res Commun* **312**: 285-291.
- Garcia-Asua, G., Cogdell, R. J. & Hunter, C. N. (2002). Functional assembly of the foreign carotenoid lycopene into the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*, achieved by replacement of the native 3-step phytoene desaturase with its 4-step counterpart from *Erwinia herbicola*. *Mol Microbiol* **44**: 233-244.

- Georgiou, G. & Valax, P. (1996). Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **7**: 190-197.
- Gill, R. T., Valdes, J. J. & Bentley, W. E. (2000). A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Metab Eng* **2**: 178-189.
- Giovannucci, E. (1999). Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst* **91**: 317-331.
- Gläser, J. & Klug, G. (2005). Photo-oxidative stress in *Rhodobacter sphaeroides*: protective role of carotenoids and expression of selected genes. *Microbiology* **151**: 1927-1938.
- Glick, B. R. (1995). Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnol Adv* **13**: 247-261.
- Goff, S. A. & Goldberg, A. L. (1985). Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell* **41**: 587-595.
- Gregor, J. & Klug, G. (1999). Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light. *FEMS Microbiol Lett* **179**: 1-9.
- Griffith, D. A., Delipala, C., Leadsham, J., Jarvis, S. M. & Oesterhelt, D. (2003). A novel yeast expression system for the overproduction of quality-controlled membrane proteins. *FEBS Lett* **553**: 45-50.
- Grisshammer, R. & Tate, C. G. (1995). Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q Rev Biophys* **28**: 315-422.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* **22**: 346-353.
- Gutman, G. A. & Hatfield, G. W. (1989). Nonrandom utilization of codon pairs in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 3699-3703.
- Häder, D.-P. (1999). *Photosynthese*. Stuttgart: Thieme.
- Hahn, F. M., Baker, J. A. & Poulter, C. D. (1996). Open reading frame 176 in the photosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus* encodes *idi*, a gene for isopentenyl diphosphate isomerase. *J Bacteriol* **178**: 619-624.
- Hamm, H. E. (1998). The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* **273**: 669-672.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Harcum, S. W. & Bentley, W. E. (1999). Heat-shock and stringent responses have overlapping protease activity in *Escherichia coli*. Implications for heterologous protein yield. *Appl Biochem Biotechnol* **80**: 23-37.
- Harding, R. W. & Shropshire Jr., W. (1980). Photocontrol of carotenoid biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol* **31**: 217-238.
- Harker, M. & Hirschberg, J. (1998). Molecular biology of carotenoid biosynthesis in phototrophic organisms. *Methods Enzymol* **279**: 244-263.
- Haselkorn, R., Lapidus, A., Kogan, Y., Vlcek, C., Paces, J., Paces, V. *et al.* (2001). The *Rhodobacter capsulatus* genome. *Photosynth Res* **70**: 43-52.
- Hoffmann, F. & Rinas, U. (2001). On-line estimation of the metabolic burden resulting from the synthesis of plasmid-encoded and heat-shock proteins by monitoring respiratory energy generation. *Biotechnol Bioeng* **76**: 333-340.
- Hohenfeld, I. P., Wegener, A. A. & Engelhard, M. (1999). Purification of histidine tagged bacteriorhodopsin, pharaonis halorhodopsin and pharaonis sensory rhodopsin II functionally expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **442**: 198-202.

- Imhoff, J. F., Trüper, H. G. & Pfening, N. (1984). Rearrangements of the species and genera of the phototrophic purple nonsulfur bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **34**: 340-343.
- Janvilisri, T., Shahi, S., Venter, H., Balakrishnan, L. & van Veen, H. W. (2005). Arginine-482 is not essential for transport of antibiotics, primary bile acids and unconjugated sterols by the human breast cancer resistance protein (ABCG2). *Biochem J* **385**: 419-426.
- Jeong, H.-S. & Jouanneau, Y. (2000). Enhanced nitrogenase activity in strains of *Rhodobacter capsulatus* that overexpress the *rnf* genes. *J Bacteriol* **182**: 1208-1214.
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P. A. & Ståhl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem* **35**: 91-105.
- Kane, J. F., Violand, B. N., Curran, D. F., Staten, N. R., Duffin, K. L. & Bogosian, G. (1992). Novel in-frame two codon translational hop during synthesis of bovine placental lactogen in a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **20**: 6707-6712.
- Kappler, U. & McEwan, A. G. (2002). A system for the heterologous expression of complex redox proteins in *Rhodobacter capsulatus*: characterisation of recombinant sulphite:cytochrome c oxidoreductase from *Starkeya novella*. *FEBS Lett* **529**: 208-214.
- Kashket, E. R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol Lett* **46**: 233-244.
- Katzke, N., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Heck, A., Markert, A. *et al.* (in Vorbereitung). A novel T7-polymerase dependent broad host range expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*.
- Klipp, W., Masepohl, B. & Pühler, A. (1988). Identification and mapping of nitrogen fixation genes of *Rhodobacter capsulatus*: duplication of a *nifA-nifB* region. *J Bacteriol* **170**: 693-699.
- Klug, G. & Drews, G. (1984). Construction of a gene bank of *Rhodospseudomonas capsulata* using a broad host range DNA cloning system. *Arch Microbiol* **139**: 319-325.
- Kochetkov, S. N., Rusakova, E. E. & Tunitskaya, V. L. (1998). Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism. *FEBS Lett* **440**: 264-267.
- Kouyama, T., Kouyama, A. N. & Ikegami, A. (1987). Bacteriorhodopsin is a powerful light-driven proton pump. *Biophys J* **51**: 839-841.
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1994). pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**: 800-802.
- Kucz, N. (2005). Erzeugung eines *nif*-Promotor basierten Expressionssystems in *Rhodobacter capsulatus*. Bochum: Ruhr-Universität.
- Kunji, E. R., Slotboom, D. J. & Poolman, B. (2003). *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **1610**: 97-108.
- Kunji, E. R., Chan, K. W., Slotboom, D. J., Floyd, S., O'Connor, R. & Monne, M. (2005). Eukaryotic membrane protein overproduction in *Lactococcus lactis*. *Curr Opin Biotechnol* **16**: 546-551.
- 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**: 1809-1820.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lampe, H. H., Oelze, J. & Drews, G. (1972). Die Fraktionierung des Membransystems von *Rhodospseudomonas capsulata* und seine Morphogenese. *Arch Mikrobiol* **83**: 78-94.

- Landrum, J. T., Bone, R. A. & Kilburn, M. D. (1997). The macular pigment: a possible role in protection from age-related macular degeneration. *Adv Pharmacol* **38**: 537-556.
- Lang, S. E., Jenney Jr., F. E. & Daldal, F. (1996). *Rhodobacter capsulatus* CycH: a bipartite gene product with pleiotropic effects on the biogenesis of structurally different c-type cytochromes. *J Bacteriol* **178**: 5279-5290.
- Lanyi, J. K. (2004). Bacteriorhodopsin. *Annu Rev Physiol* **66**: 665-688.
- Lee, P. & Schmidt-Dannert, C. (2002). Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 1-11.
- Lesley, S. A., Graziano, J., Cho, C. Y., Knuth, M. W. & Klock, H. E. (2002). Gene expression response to misfolded protein as a screen for soluble recombinant protein. *Protein Eng* **15**: 153-160.
- LeThanh, H., Neubauer, P. & Hoffmann, F. (2005). The small heat-shock proteins IbpA and IbpB reduce the stress load of recombinant *Escherichia coli* and delay degradation of inclusion bodies. *Microb Cell Fact* **4**: 6.
- Liang, C., Zhao, F., Wei, W., Wen, Z. & Qin, S. (2006). Carotenoid biosynthesis in cyanobacteria: structural and evolutionary scenarios based on comparative genomics. *Int J Biol Sci* **2**: 197-207.
- Lundstrom, K. (2005). Structural genomics of GPCRs. *Trends Biotechnol* **23**: 103-108.
- Makrides, S. C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **60**: 512-538.
- Martinez, A., Knappskog, P. M., Olafsdottir, S., Døskeland, A. P., Eiken, H. G., Svebak, R. M. *et al.* (1995). Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme. *Biochem J* **306**: 589-597.
- Masepohl, B., Drepper, T., Paschen, A., Gross, S., Pawlowski, A., Raabe, K. *et al.* (2002). Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 243-248.
- Matsumoto, H. & Yoshizawa, T. (2008). Rhodopsin regeneration is accelerated via noncovalent 11-*cis* retinal-opsin complex - a role of retinal binding pocket of opsin. *Photochem Photobiol* **84**: 985-989.
- McNulty, D. E., Claffee, B. A., Huddleston, M. J., Porter, M. L., Cavnar, K. M. & Kane, J. F. (2003). Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **27**: 365-374.
- Merril, C. R. (1990). Gel-staining techniques. *Methods Enzymol* **182**: 477-488.
- Meyer, K. (2002). Carotinoide - Bedeutung und technische Synthesen: Farbenfrohe Antioxidantien. *ChiuZ* **36**: 178-192.
- Mierau, I., Olieman, K., Mond, J. & Smid, E. J. (2005). Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications. *Microb Cell Fact* **4**: 16.
- Miroux, B. & Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**: 289-298.
- Molisch, H. (1907). *Die Purpurbakterien nach neuen Untersuchungen*. Jena: Gustav Fischer.
- Monné, M., Chan, K. W., Slotboom, D.-J. & Kunji, E. R. S. (2005). Functional expression of eukaryotic membrane proteins in *Lactococcus lactis*. *Protein Sci* **14**: 3048-3056.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.

- Murby, M., Samuelsson, E., Nguyen, T. N., Mignard, L., Power, U., Binz, H. *et al.* (1995). Hydrophobicity engineering to increase solubility and stability of a recombinant protein from respiratory syncytial virus. *Eur J Biochem* **230**: 38-44.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H. & Yura, T. (1998). Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1694-1699.
- Nishizaki, T., Tsuge, K., Itaya, M., Doi, N. & Yanagawa, H. (2007). Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in *Escherichia coli* by ordered gene assembly in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 1355-1361.
- Oelze, J. & Drews, G. (1972). Membranes of photosynthetic bacteria. *Biochim Biophys Acta* **265**: 209-239.
- Ohtsu, T. (2005). Überwindung des weltweiten Mangels an Vitamin A: Der Weg aus dem Schatten ins Licht. *BASF AG Presse-Information: Journalisten und Wissenschaftler im Gespräch - Innovation für unsere Ernährung*.
- Opekarová, M. & Tanner, W. (2003). Specific lipid requirements of membrane proteins - a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim Biophys Acta* **1610**: 11-22.
- Pan, W., Ravot, E., Tolle, R., Frank, R., Mosbach, R., Türbachova, I. & Bujard, H. (1999). Vaccine candidate MSP-1 from *Plasmodium falciparum*: a redesigned 4917 bp polynucleotide enables synthesis and isolation of full-length protein from *Escherichia coli* and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **27**: 1094-1103.
- Patterson, S. S., Dionisi, H. M., Gupta, R. K. & Saylor, G. S. (2005). Codon optimization of bacterial luciferase (*lux*) for expression in mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol* **32**: 115-123.
- Pucheu, N. L., Kerber, N. L., Rivas, E. A., Cortez, N. & Garcia, A. F. (1997). Association of LHI α (B870) polypeptide with phospholipids during insertion in the photosynthetic membrane of an LHII- mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *Curr Microbiol* **34**: 155-161.
- Ramírez, D. M. & Bentley, W. E. (1999). Characterization of stress and protein turnover from protein overexpression in fed-batch *E. coli* cultures. *J Biotechnol* **71**: 39-58.
- Rao, A. V. & Agarwal, S. (2000). Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J Am Coll Nutr* **19**: 563-569.
- RCSB-ProteinDataBank (Stand Oktober 2008). PDB current holdings breakdown. <http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do>.
- Rinas, U. & Bailey, J. E. (1993). Overexpression of bacterial hemoglobin causes incorporation of pre-beta-lactamase into cytoplasmic inclusion bodies. *Appl Environ Microbiol* **59**: 561-566.
- Rinas, U. (1996). Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* **12**: 196-200.
- Rogl, H., Kosemund, K., Kuhlbrandt, W. & Collinson, I. (1998). Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Lett* **432**: 21-26.
- Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2004). Overexpression and secretion of biocatalysts. In *Enzyme functionality: design, engineering and screening*. Edited by A. Svendsen. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Rossi, F. M. & Blau, H. M. (1998). Recent advances in inducible gene expression systems. *Curr Opin Biotechnol* **9**: 451-456.
- Russell, N. J. & Harwood, J. L. (1979). Changes in the acyl lipid composition of photosynthetic bacteria grown under photosynthetic and non-photosynthetic conditions. *Biochem J* **181**: 339-345.
- Ruther, A., Misawa, N., Boger, P. & Sandmann, G. (1997). Production of zeaxanthin in *Escherichia coli* transformed with different carotenogenic plasmids. *Appl Microbiol Biotechnol* **48**: 162-167.

- Saier Jr., M. H. (1995). Differential codon usage: a safeguard against inappropriate expression of specialized genes? *FEBS Lett* **362**: 1-4.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, M. A., Moura, G., Massey, S. E. & Tuite, M. F. (2004). Driving change: the evolution of alternative genetic codes. *Trends Genet* **20**: 95-102.
- Schlieker, C., Bukau, B. & Mogk, A. (2002). Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J Biotechnol* **96**: 13-21.
- Schmid, B., Kromer, M. & Schulz, G. E. (1996). Expression of porin from *Rhodopseudomonas blastica* in *Escherichia coli* inclusion bodies and folding into exact native structure. *FEBS Lett* **381**: 111-114.
- Schmidt-Dannert, C. (2000). Engineering novel carotenoids in microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* **11**: 255-261.
- Schulz, A. (2008). Identifizierung und Struktur-basierte Optimierung biokatalytisch relevanter Alkohol-Dehydrogenasen. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität.
- Seidel, M., Alderwick, L. J., Birch, H. L., Sahn, H., Eggeling, L. & Besra, G. S. (2007a). Identification of a novel arabinofuranosyltransferase AftB involved in a terminal step of cell wall arabinan biosynthesis in Corynebacteriaceae, such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **282**: 14729-14740.
- Seidel, M., Alderwick, L. J., Sahn, H., Besra, G. S. & Eggeling, L. (2007b). Topology and mutational analysis of the single Emb arabinofuranosyltransferase of *Corynebacterium glutamicum* as a model of Emb proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology* **17**: 210-219.
- Siebert, C. A., Qian, P., Fotiadis, D., Engel, A., Hunter, C. N. & Bullough, P. A. (2004). Molecular architecture of photosynthetic membranes in *Rhodobacter sphaeroides*: the role of PufX. *EMBO J* **23**: 690-700.
- Simon, R., O'Connell, M., Labes, M. & Pühler, A. (1986). Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol* **118**: 640-659.
- Singh, H. & Cama, H. R. (1975). Metabolism of carotenoids. *J Sci Ind Res* **34**: 219-230.
- Skosyrev, V. S., Kuleskiy, E. A., Yakhnin, A. V., Temirov, Y. V. & Vinokurov, L. M. (2003). Expression of the recombinant antibacterial peptide sarcotoxin IA in *Escherichia coli* cells. *Protein Expr Purif* **28**: 350-356.
- Smart, J. L., Willett, J. W. & Bauer, C. E. (2004). Regulation of *hem* gene expression in *Rhodobacter capsulatus* by redox and photosystem regulators RegA, CrtJ, FnrL, and AerR. *J Mol Biol* **342**: 1171-1186.
- Smith, D. W. (1996). Problems of translating heterologous genes in expression systems: the role of tRNA. *Biotechnol Prog* **12**: 417-422.
- Smith, H. O. & Birnstiel, M. L. (1976). A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic Acids Res* **3**: 2387-2398.
- Solomon, P. S., Shaw, A. L., Lane, I., Hanson, G. R., Palmer, T. & McEwan, A. G. (1999). Characterization of a molybdenum cofactor biosynthetic gene cluster in *Rhodobacter capsulatus* which is specific for the biogenesis of dimethylsulfoxide reductase. *Microbiology* **145**: 1421-1429.
- Sørensen, H. P., Sperling-Petersen, H. U. & Mortensen, K. K. (2003). Production of recombinant thermostable proteins expressed in *Escherichia coli*: completion of protein synthesis is the bottleneck. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **786**: 207-214.
- Sørensen, H. P. & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **115**: 113-128.

- Strandberg, L. & Enfors, S.-O. (1991). Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1669-1674.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.
- Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* **219**: 37-44.
- Tabita, F. R. (1995). The biochemistry and metabolic regulation of carbon metabolism and CO₂ fixation in purple bacteria. In *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Edited by R. E. Blankenship, M. T. Madigan & C. E. Bauer. Dordrecht, NL: Kluwer Academic Publishers.
- Tabor, S. & Richardson, C. C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 1074-1078.
- Vignais, P. M., Dimon, B., Zorin, N. A., Tomiyama, M. & Colbeau, A. (2000). Characterization of the hydrogen-deuterium exchange activities of the energy-transducing HupSL hydrogenase and H₂-signaling HupUV hydrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **182**: 5997-6004.
- Villaverde, A. & Carrió, M. M. (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett* **25**: 1385-1395.
- Voet van Vormizeele, J. H. (2006). Funktionelle und molekulare Charakterisierung des Ethylenrezeptorproteins ETR1 aus *A. thaliana*. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität.
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 615-619.
- Wagner, K. H. & Elmadfa, I. (2003). Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. *Ann Nutr Metab* **47**: 95-106.
- Wagner, S., Bader, M. L., Drew, D. & de Gier, J.-W. (2006). Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends Biotechnol* **24**: 364-371.
- Wald, G. & Brown, P. K. (1958). Human rhodopsin. *Science* **127**: 222-249.
- Wall, J. G. & Plückthun, A. (1995). Effects of overexpressing folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **6**: 507-516.
- Wang, G., Angermüller, S. & Klipp, W. (1993). Characterization of *Rhodobacter capsulatus* genes encoding a molybdenum transport system and putative molybdenum-pterin-binding proteins. *J Bacteriol* **175**: 3031-3042.
- Weaver, P. F., Wall, J. D. & Gest, H. (1975). Characterization of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Arch Microbiol* **105**: 207-216.
- Weickert, M. J., Doherty, D. H., Best, E. A. & Olins, P. O. (1996). Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **7**: 494-499.
- Wenzel, S. C. & Müller, R. (2005). Recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathways. *Curr Opin Biotechnol* **16**: 594-606.
- White, S. (Stand Oktober 2008). Membrane proteins of known 3D structure. http://blancobiomoluciedu/Membrane_Proteins_xtalhtml.
- Wilson, K. J. & Juan, P. M. (1989). Protein and peptide purification. In *Protein sequencing, a practical approach*. Edited by J. B. C. Findley & M. L. Geisow. Oxford: IRL Press.
- Wycuff, D. R. & Matthews, K. S. (2000). Generation of an AraC-*araBAD* promoter-regulated T7 expression system. *Anal Biochem* **277**: 67-73.

Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Maekawa, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T. & Ishii, S. (1995). Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J Biol Chem* **270**: 25328-25331.

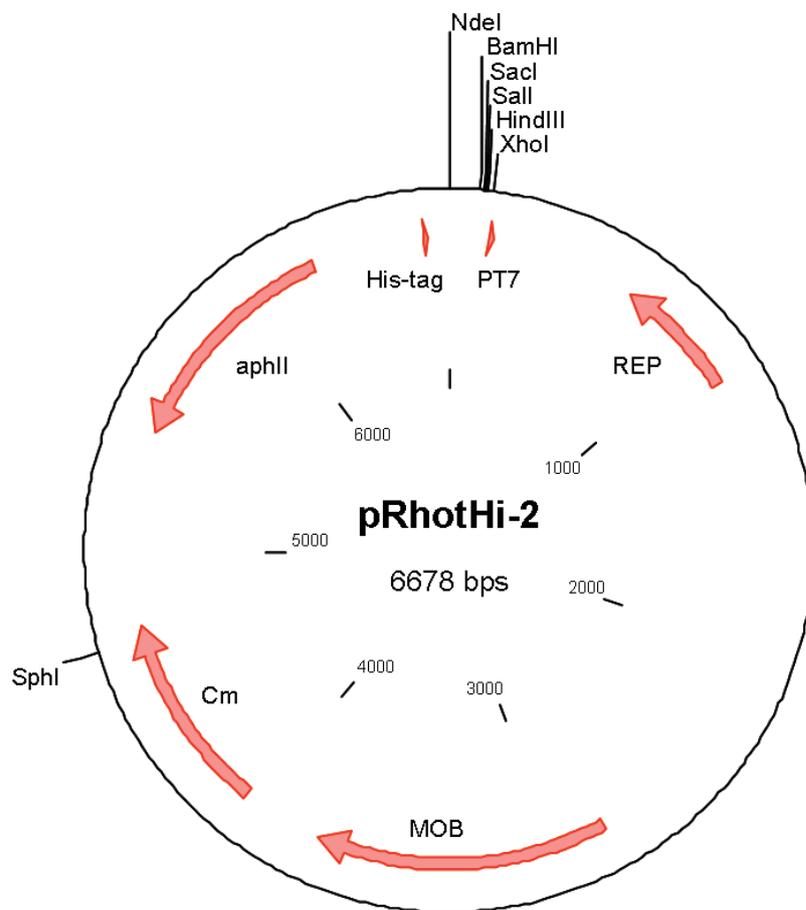
Yin, H. (2008). Exogenous agents that target transmembrane domains of proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**: 2744-2752.

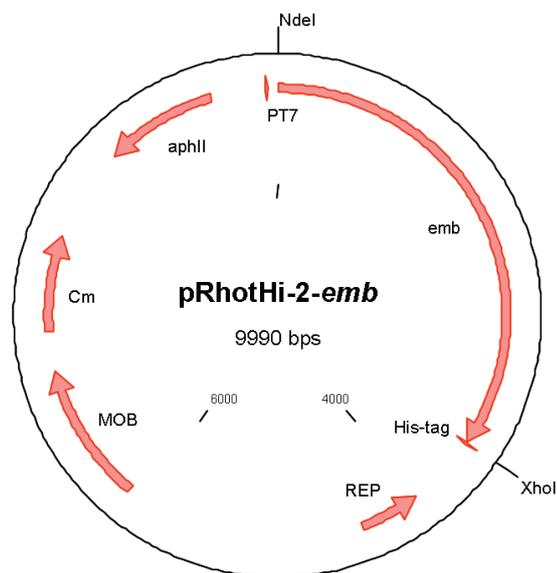
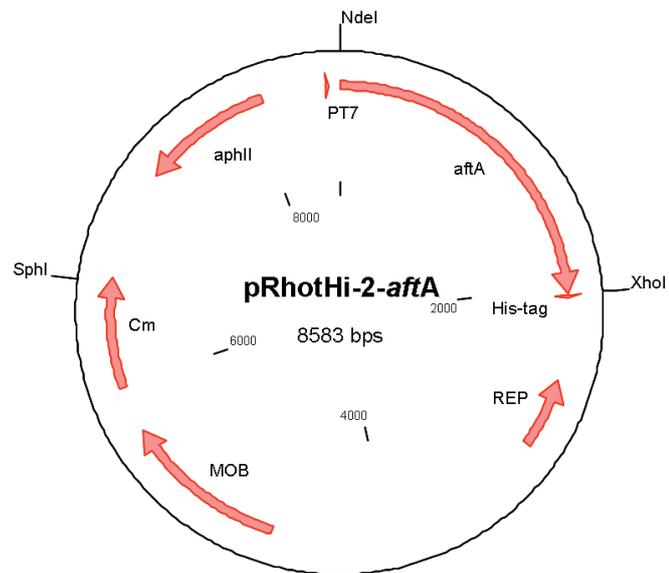
Zahn, K. (1996). Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. *J Bacteriol* **178**: 2926-2933.

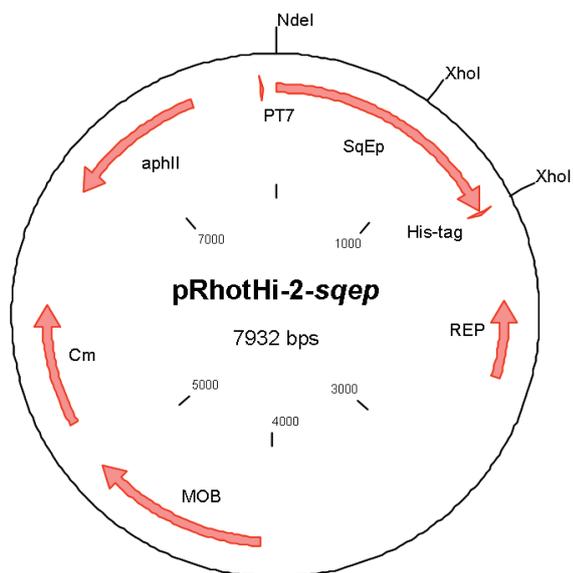
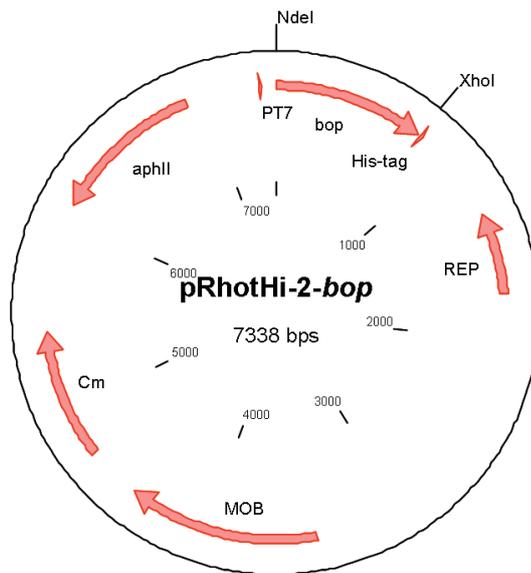
Zannoni, D. (1995). Aerobic and anaerobic electron transport chains in anoxygenic phototrophic bacteria. In *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Edited by R. E. Blankenship, M. T. Madigan & C. E. Bauer. Dordrecht, NL: Kluwer Academic Publishers.

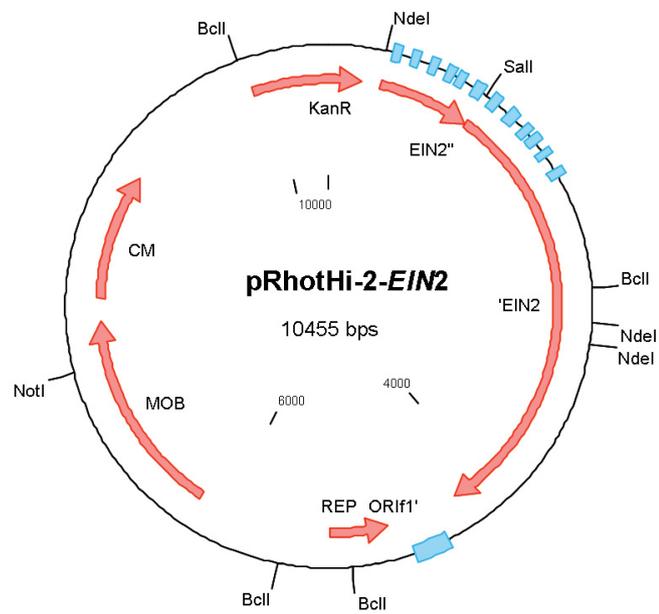
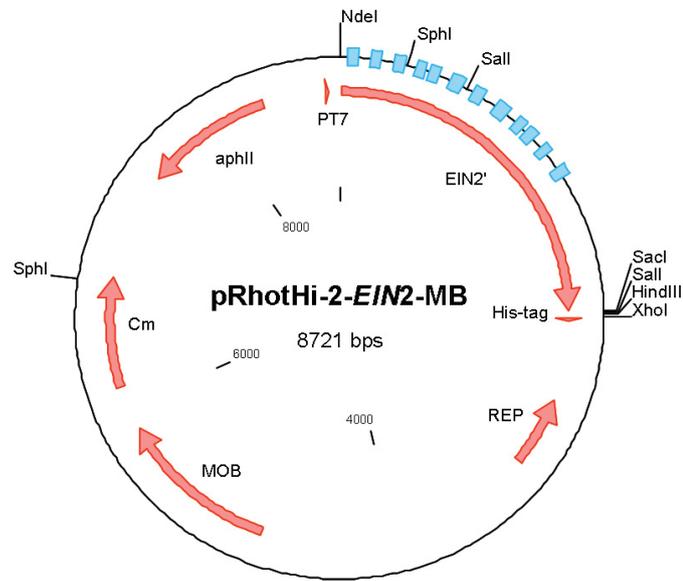
VIII Anhang

Plasmidkarten der verwendeten Expressionsvektoren









Lebenslauf

Achim Heck

Diplom – Chemiker

*23. August 1978
ledig, keine Kinder

Schulbildung

08/1985 – 06/1989

Gemeinschaftsgrundschule Friesenstraße in Mönchengladbach

08/1989 – 06/1998

Franz-Meyers-Gymnasium in Mönchengladbach

Abschluss: Abitur

07/1998 – 08/1998

Orientierungsphase und Betriebspraktikum bei der Bayer AG in Monheim

Grundwehrdienst

09/1998 – 10/1998

Allgemeine Grundausbildung beim 13.

Luftwaffenausbildungsregiment 3 in Germersheim

11/1998 – 06/1999

Kommandierung in den Stabszug des

Luftwaffenführungsdienstkommandos in Köln-Wahn und Ausbildung zum Stabsdienstsoldaten. Letzter Dienstgrad: Obergefreiter

07/1999 – 09/1999

Werksstudent bei der Bayer AG in Monheim

Hochschulbildung

10/1999 – 03/2005

Studium der Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Währenddessen (08/2002 – 07/2003) **Stipendium des DAAD** und Aufenthalt an der **University of North Carolina at Chapel Hill, NC, USA** als Full Time Graduate Student.

Teaching Assistant bis 05/2003, danach Research Assistant bei Prof. Dr. Linda. L. Spremulli, Dept. of Chemistry, Division of Chemical Biology

Thema: “Expression and Characterization of Mammalian Mitochondrial Methionyl-t-RNA Synthetase”.

03/2005

Abschluss des Diplomstudiengangs Chemie

Thema der Diplomarbeit: „Etablierung eines Fluoreszenzprotein-basierten *in vivo* Reportergensystems in dem phototrophen Bakterium *Rhodobacter capsulatus*“.

04/2005 – 07/2005

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Zentrum für Mikrobielle Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich

Seit 08/2005

Promotionsstudium am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Zentrum für Mikrobielle Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich, sowie am Virtuellen Institut für Biologische Strukturforschung der Helmholtz-Gemeinschaft.

Thema der Dissertation: „Synthese heterologer Membranproteine und Carotinoide in dem phototrophen Bakterium *Rhodobacter capsulatus*“.

Sprachkenntnisse

Englisch (fließend), Schwedisch (A2), Lateinisch (Latinum)

Private Interessen

Badminton, Ski fahren

Musical, Fotografie

Sonstiges

Mitglied der GDCh e.V. und der GBM e.V.

Führerschein Klasse 3

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 12. Dezember 2008

Achim Heck

