



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Optimierung eines Expressionssystems
für die Synthese von Redox- und Membranproteinen
in *Rhodobacter capsulatus*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

René Bergmann

aus Merseburg

Düsseldorf, September 2011

aus dem Institut für Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jäger
Korreferent: Prof. Dr. Georg Groth

Tag der mündlichen Prüfung: 14. November 2011

..für Finnian

...für Geral

„Das eine steht in unserer Macht, das andere nicht.

In unserer Macht stehen: Annehmen und Auffassen, Handeln-Wollen, Begehren und Ablehnen

– alles, was wir selbst in Gang setzen und zu verantworten haben.

Nicht in unserer Macht stehen: unser Körper, unser Besitz, unser gesellschaftliches Ansehen, unsere Stellung

– alles, was wir selbst nicht in Gang setzen und zu verantworten haben.“

– Epiket, Handbüchlein der Moral, 1

Veröffentlichungen während der Promotion

Katzke, N., Bergmann R., Jaeger, K.-E., and Drepper, T. (2012).

Heterologous high-level gene expression in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*.

Methods in Molecular Biology

Katzke, N., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Markert, A., Svensson, V., Jaeger, K.-E., Heck, A., and Drepper, T. (2010)

A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*.

Protein Expression and Purification 69:137-146.

Drepper, T., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Heck, A., Jaeger, K.-E., Katzke, N., Markert, A., Svensson, V. (2008)

Expressing a heterologous gene comprises inserting a target gene into an expression vector and transforming a *Rhodobacter capsulatus* strain with the vector.

Patent Number: DE102008013304-A1

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger für die Überlassung des interessanten wissenschaftlichen Themas.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Georg Groth für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Thomas Drepper danke ich für die Betreuung während meiner Doktorarbeit, für viele wertvolle Ratschläge und lehrreiche Diskussionen.

Ich danke den Mitgliedern der AG Drepper: Franco Circolone, Stefan Endres, Hr. Dr. Achim Heck, Fr. Dr. Nadine Katzke, Anita Loeschcke, Janko Potzkei und Vera Svensson, sowie den früheren Mitgliedern: Fr. Dr. Solmaz Arvani, Jessica Bernds, Fr. Dr. Annette Markert und Miriam Kauss.

Ich danke Dr. Tino Polen für die Unterstützung bei der Durchführung der Microarray Experimente.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern des IMET für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Ich möchte mich bei meinen Eltern für ihre immerwährende Geduld und Unterstützung danken.

Ich danke meiner Freundin Geraldine Kolter für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Liebe.

Ich danke meinem Sohn Finnian einfach dafür, dass er da ist.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS I

ABKÜRZUNGEN V

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS VII

1. EINLEITUNG 1

1.1. Heterologe Expression 1

1.2. Expression in *Rhodobacter capsulatus* 3

 1.2.1. Bakterien der Gattung *Rhodobacter* 3

 1.2.2. Das phototrophe Bakterium *R. capsulatus* 3

 1.2.3. Das *R. capsulatus* basierte Expressionssystem 4

 1.2.4. Streptavidin- und Histidin-Tag basierte Affinitätschromatografie 5

1.3. Regulations- und Stoffwechsel-Prozesse in *Rhodobacter capsulatus* 6

 1.3.1. Anoxygene Photosynthese und der Photosyntheseapparat bei *R. capsulatus* 7

 1.3.2. Stickstofffixierung und Regulation des Nitrogenaseenzymkomplexes 12

 1.3.3. Das "photoactive yellow protein" 17

1.4. Zielsetzung 18

2. MATERIAL & METHODEN 19

2.1. Bakterienstämme 19

 2.1.1. *Escherichia coli* Stämme 19

 2.1.2. *Rhodobacter capsulatus* Stämme 19

2.2. Vektoren und rekombinante Plasmide 19

 2.2.1. Vektoren 19

 2.2.2. Rekombinante Plasmide 19

2.3. Oligonukleotide und Sequenzierungen 20

 2.3.1. Verwendete Oligonukleotide 20

2.4. Nährmedien und Zusätze 21

 2.4.1. Nährmedien 21

 2.4.2. Antibiotika 22

2.5. Antiseren, Enzyme und Chemikalien 23

 2.5.1. Verwendete Antiseren 23

 2.5.2. Verwendete Enzyme 23

 2.5.3. Verwendete Chemikalien 23

2.6. Puffer und Lösungen 25

 2.6.1. Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung 25

 2.6.2. Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese 25

 2.6.3. Puffer und Lösungen zur Transformation von Bakterien 26

 2.6.4. Puffer und Lösungen zur Proteinisolierung und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 26

2.6.5.	Puffer und Lösungen für das Immunoblotting (Western Blot)	27
2.6.6.	Puffer und Lösungen für die Strep-Tactin Affinitätschromatographie	27
2.7.	Reaktions- und Nachweis- "Kits"	28
2.8.	Sonstige Materialien und Geräte	28
2.9.	Mikrobiologische Methoden	30
2.9.1.	Anzucht von Bakterien	30
2.9.2.	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA (Hanahan, 1983)	31
2.9.3.	Konjugativer Plasmidtransfer mobilisierbarer Plasmide von <i>E. coli</i> nach <i>R. capsulatus</i> (Elhai & Wolk, 1988)	32
2.10.	DNA/RNA-Techniken	32
2.10.1.	Standard-Präparation von genomischer DNA	32
2.10.2.	Standard-Präparation von Plasmid-DNA (Birnboim & Doly, 1979)	33
2.10.3.	Präzipitation von DNA durch Isopropanolfällung	33
2.10.4.	DNA-Konzentrationsbestimmung	34
2.10.5.	Standard-Präparation von RNA	34
2.10.6.	RNA-Konzentrationsbestimmung	34
2.10.7.	cDNA-Synthese und Markierung	34
2.10.8.	DNA-Microarray	35
2.11.	<i>In vitro</i> Rekombination von DNA	36
2.11.1.	Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Smith & Birnstiel, 1976)	36
2.11.2.	Agarosegelelektrophorese (Sambrook & Russell, 2001)	36
2.11.3.	Elution von DNA aus Agarosegelen (Vogelstein & Gillespie, 1979)	37
2.11.4.	Ligation von Vektor- und Fragment-DNA (Dugaiczky et al., 1975)	37
2.11.5.	Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis & Faloona, 1987)	37
2.11.6.	Reinigung von PCR-Produkten	39
2.12.	Proteinchemische Methoden	40
2.12.1.	Gesamtproteinisolierung für SDS-PAGE	40
2.12.2.	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)	40
2.12.3.	Coomassie-Färbung zur Proteindetektion (Merril, 1990)	41
2.12.4.	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen	41
2.12.5.	Immunodetektion von Proteinen	41
2.12.6.	Färbung von PVDF-Membranen	42
2.12.7.	Proteinisolierung mittels "french-press"	42
2.12.8.	Proteinseparation mittels Strep II-Tag - Affinitätschromatographie	42
2.13.	Messung der Lichtintensität von 60 W Glühbirnen und des Leuchtdiodenfeldes der Firma INSTA ..	42
2.14.	Computerprogramme und Datenbanken	43
3.	ERGEBNISSE	44
3.1.	Verwendung von Leuchtdioden für die phototrophe Kultivierung und biotechnologische Nutzung von <i>Rhodobacter capsulatus</i>	44
3.1.1.	Bestimmung der Absorption der Photopigmente in <i>R. capsulatus</i> Zellen und Bestimmung der Emission der verwendeten Leuchtdioden	45

3.1.2.	Auswirkungen verschiedener Lichtquellen auf das Wachstum von <i>R. capsulatus</i>	51
3.1.3.	Auswirkungen verschiedener Lichtquellen auf die Pigmentakkumulation von <i>R. capsulatus</i>	54
3.1.4.	Auswirkungen verschiedener Lichtquellen auf die Bildung des Nitrogenaseenzymkomplexes.....	57
3.2.	Auswirkungen der verschiedenen Lichtbedingungen auf die Genexpression in <i>R. capsulatus</i>	60
3.2.1.	Einfluss von Stickstoffmangelbedingungen auf die Genexpression von <i>R. capsulatus</i>	60
3.2.2.	Transkriptanalyse von <i>Rhodobacter capsulatus</i> unter Leuchtdioden.....	64
3.2.3.	Das "photoactive yellow protein" PYP.....	76
3.3.	Expressionssystem auf der Basis des Nitrogenase Promotors P _{nif}	88
3.3.1.	Konstruktion des Vektors pRhoHi-2 mit P _{nif}	88
3.3.2.	Vergleich verschiedener Versionen des P _{nif} bei der Expression des Fluoreszenzreporters YFP.....	89
3.3.3.	Stickstoffabhängige Regulation des P _{nif}	91
3.3.4.	Vergleich der Promotoren P _{nif} mit P _{T7} und P _{aphII}	93
3.3.5.	Vergleich der Promotoren unter Leuchtdioden.....	95
3.4.	Expression des <i>fdxA</i> Gens aus <i>Rhodobacter capsulatus</i>	97
3.4.1.	Konstruktion der Vektoren pRhoS-2, pRhokS-2 und pRhoS-2.....	97
3.4.2.	Expression des FdII in <i>R. capsulatus</i> B10ST7 und Separation mittels Affinitätschromatographie.....	98
3.4.3.	Gelelektrophoretische Trennung und Absorption des Ferredoxin II aus <i>Rhodobacter capsulatus</i>	102
4.	DISKUSSION.....	106
4.1.	Die Verwendung von Leuchtdioden als Lichtquelle.....	106
4.1.1.	Der Einfluss von Infrarotstrahlung und Blaulicht auf das phototrophe Wachstum und die Proteinbiosynthese.....	107
4.1.2.	Der Einfluss von Infrarotstrahlung und Blaulicht auf die Expression der Photosynthesegene und die Akkumulation der Photopigmente.....	110
4.1.3.	Der Einfluss von Infrarotstrahlung und Blaulicht auf die Expression der Nitrogenase.....	112
4.1.4.	Der Einfluss von Infrarotstrahlung und Blaulicht auf Expression verschiedener Gene.....	114
4.1.5.	Untersuchung der <i>pyp</i> -Mutante unter Infrarot und Blaulichtdioden.....	115
4.2.	Erweiterung des pRho-Vektorensystems mit dem Strep II-Tag und Expression des Gens <i>fdxA</i> für das Ferredoxin II aus <i>R. capsulatus</i>	117
4.3.	Erweiterung des pRho-Vektorensystems mit dem Nitrogenase Promotor P _{nif} und Expression des Fluoreszenzreportes YFP.....	119
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	123
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	127
7.	ANHANG.....	143

 ABKÜRZUNGEN

p...	Pico
n...	Nano
μ...	Micro
m...	Milli
k...	Kilo
M...	Mega
°C	Grad Celcius
A	Ampere
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde(n)
L / l	Liter
min	Minute
m	Meter
m ²	Quadratmeter
Pa	Pascal
sec	Sekunde
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
W	Watt
bp	<i>"base pairs"</i>
Abb.	Abbildung
Kap.	Kapitel
Tab.	Tabelle
A. dest.	<i>"Aqua destillata"</i>
ADP	Adenindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenintriphosphat
Bchl	Bakteriochlorophyll
Bpheo	Bakteriopheophytin
ca.	circa
CM	Cytoplasmamembran
C-terminus	Carboxyterminus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-Trisphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G/C - Gehalt	Guanin- und Cytosingehalt einer DNA

Gm	Gentamycin
His ₆	6-fach Histidin
HRP	" <i>horseradish peroxidase</i> "
ICM	intracytoplasmatische Membran
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
Km	Kanamacin
LB	Luria-Bertani -Broth.
LHC	"light harvesting complex" / Lichtsammelkomplex
M	Molar (mol/Liter)
max.	maximal
MCS	" <i>multiple cloning site</i> "
mRNA	" <i>messenger RNA</i> "
N-terminus	Aminoterminus
OD ₅₈₀	optische Dichte bei 580 nm
OD ₆₆₀	optische Dichte bei 660 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P _{aphII}	Promotor des <i>aphII</i> Gens im pRhoK
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P _{nif}	Promotor des <i>nifHDK</i> - Operons im pRhoN
P _{T7}	T7-Promotor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q-Pool	Ubichinonpool
RC	" <i>reaction center</i> " / Reaktionszentrum
RCV	Rhodobacter definiertes Minimalmedium
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm	Streptomycin
Spc	Spectinomycin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	transport-RNA
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
UAS	" <i>upstream activating sequence</i> "
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
YFP	" <i>yellow fluorescent protein</i> "

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Tab.1.1.Eigenschaften der pRho-Vektoren	5
Abb.1.1 Schema des zyklischen Elektronentransports der anoxygenen Photosynthese (nach McEwan, 1994)	7
Abb.1.2 Aufbau der photosynthetischen Membran von <i>R. sphaeroides</i>	8
Abb.1.3 Schematische Darstellung des Photosynthese-genclusters von <i>R. capsulatus</i> .	9
Abb.1.4 Schematische Übersicht der Regulation von Expression und Aktivität des Nitrogenaseenzymkomplexes (nach Drepper et al., 2003)	15
Tab.1.2. Eigenschaften der Ferredoxine I-VI aus <i>Rhodobacter capsulatus</i> .	16
Tab.2.1 <i>E. coli</i> Stämme	19
Tab.2.2 <i>R. capsulatus</i> Stämme	19
Tab.2.3 Vektoren	19
Tab.2.4 Rekombinante Plasmide	19
Tab. 2.5 Verwendete Oligonukleotide	20
Tab.2.6 Verwendete Antibiotika	22
Tab.2.8 Materialien und Geräte	28
Abb.3.1 Bestimmung der Absorptionsmaxima der Photopigmente in <i>R. capsulatus</i> Zellen.	46
Abb.3.2 Aufbau der Leuchtdioden-Platinen.	47
Abb.3.3 Emission von 60 W Glühlampen, Infrarot- und Blaulichtdioden.	48
Abb.3.4 Unterschiede in der Lichtintensität der verschiedenen Lichtquellen im physiologisch relevanten Bereich.	49
Abb.3.5 Einfluss unterschiedlicher Lichtquellen auf das phototrophe Wachstum von <i>R. capsulatus</i> .	52
Abb.3.6 Einfluss verschiedener Lichtquellen auf die Pigmentakkumulation in <i>R. capsulatus</i> .	55
Abb.3.7 Einfluss verschiedener Lichtquellen auf die Pigmentakkumulation in <i>R. capsulatus</i> 2.	56
Abb.3.8 Einfluss verschiedener Lichtquellen auf die Synthese der Dinitrogenasereduktase in logarithmischer Wachstumsphase und stationärer Phase.	58
Abb.3.9 Einfluss der Stickstoffquelle auf die Expression stickstoffregulierter Gene in <i>R. capsulatus</i> .	62
Abb.3.10 Einfluss der Lichtquelle auf die Expression der Gene für die ribosomalen Proteine in <i>R. capsulatus</i> .	67
Abb.3.11 Einfluss der Lichtquelle auf die Expression der Gene für den Photosyntheseapparat in <i>R. capsulatus</i> .	69
Abb.3.12 Einfluss der Lichtquelle auf die Expression der Nitrogenasegene in <i>R. capsulatus</i> .	72

Abb.3.13 Einfluss der Lichtquelle auf die Expression verschiedener Gene in <i>R. capsulatus</i> .	74
Abb.3.14 Einfluss unterschiedlicher Lichtquellen auf das phototrophe Wachstum von <i>R. capsulatus</i> Wildtyp B10S und <i>pyp</i> -Mutante RB1.	77
Abb.3.15 Einfluss verschiedener Lichtquellen auf die Pigmentakkumulation von <i>R. capsulatus</i> Wildtyp B10S und <i>pyp</i> -Mutante RB1.	78
Abb.3.16 Einfluss verschiedener Lichtquellen auf die Synthese der Dinitrogenasereduktase in logarithmischer Wachstumsphase und stationärer Phase Wildtyp B10S und <i>pyp</i> -Mutante RB1.	80
Abb.3.17 Einfluss der Deletion des <i>pyp</i> -Gens auf die Expression der Gene für den Photosyntheseapparat in <i>R. capsulatus</i> .	82
Abb.3.18 Pigmentakkumulation von <i>R. capsulatus</i> Wildtyp B10S und <i>pyp</i> -Mutante RB1 unter Infrarot- und Blaulicht.	84
Abb.3.19 Einfluss der Deletion des <i>pyp</i> -Gens auf die Expression der Gene für den Photosyntheseapparat in <i>R. capsulatus</i> .	85
Abb.3.20 Einfluss der Deletion des <i>pyp</i> -Gens auf die Expression des Operons <i>flaAF-flbT-fla</i> in <i>R. capsulatus</i> .	87
Abb.3.21 Schematische Darstellung der Promotorsequenzen der Versionen P _{nif} -V1-V5.	88
Abb.3.22 Bestimmung der Promotoraktivität verschiedener Versionen des P _{nif}	90
Abb.3.23 Nachweis der stickstoffabhängigen Regulation des P _{nif}	92
Abb.3.24 Vergleich der Promotoraktivität der Promotoren P _{aphII} , P _{T7} und P _{nif}	94
Abb.3.25 Vergleich der Promotoraktivität der Promotoren P _{T7} und P _{nif}	96
Tab. 3.1 Protein- und DNA-Sequenz des Strep II-TAG und die Anpassung an <i>R. capsulatus</i> .	98
Tab.3.2 Anzuchtbedingungen für den <i>R. capsulatus</i> B10ST7-pRhotS-2- <i>fdxA</i> für die Expression des Gens <i>fdxA</i> .	99
Abb.3.26 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proben der Proteinseparation des Ferredoxin II.	100
Tab.3.3 Proteinmenge und Färbung der Proteinlösungen des FdII.	101
Abb.3.27 Gelelektrophoretische Trennung von gereinigten Proteinproben des FdII.	102
Abb.3.28 Absorption des Ferredoxin II aus <i>R. capsulatus</i> B10ST7-pRhotS-2- <i>fdxA</i> .	103
Tab. 3.4 Absorptionsverhältnisse der FdII-Proben aus <i>R. capsulatus</i> B10ST7 pRhotS- <i>fdxA</i> .	104
Abb.4.1 Vergleich der Expressionsänderung der stickstoffabhängig regulierten Gene	114
Abb.4.2 Verhältnis zwischen P _{nif} vermittelter Expression und Intensität der Infrarotstrahlung.	122

1. EINLEITUNG

Die Ziele der industriellen oder auch weißen Biotechnologie (Maury et al., 2005) sind die Herstellung von Chemikalien und Feinchemikalien (Gavrilescu & Chisti, 2005), die Produktion enzymatischer Biokatalysatoren (Otero & Nielsen, 2010) und Proteine für die Anwendung in Medizin, Molekularbiologie und Biotechnologie (Park et al., 2010; Schumann & Hertweck, 2006) oder auch die Biomasseproduktion für erneuerbare Brennstoffe (Park et al., 2011). Dabei werden z.B. durch das "*metabolic engineering*" bei der Ganzzellbiokatalyse der Metabolismus eines Mikroorganismus auf die Herstellung bestimmter Produkte angepasst (Keasling, 2010; Lopez-Gallego & Schmidt-Dannert, 2010; Wenzel & Muller, 2005), Metagenom- und Genomdatenbanken erforscht um neue Biokatalysatoren zu gewinnen (Fernandez-Arrojo et al., 2010) und Bioreaktoren genutzt, um die Biomasseproduktion und die Produktion von Enzymen und Chemikalien zu optimieren (Chen et al., 2011). Viele dieser Anwendungen nutzen den Transfer genetischen Materials von einem physiologisch interessanten Organismus mit biotechnologisch relevanten Stoffwechseleigenschaften in einen gut handhabbaren Wirtsorganismus, die heterologe Expression.

1.1. Heterologe Expression

Der Begriff 'heterologe Expression' bezeichnet die Expression eines wirtsfremden Gens in einem Expressionswirt (Gross & Hauser, 1995; Siest et al., 1993; Trueman, 1995; Waterman et al., 1995). Die heterologe Genexpression erlaubt die Expression eines Gens unabhängig davon, ob der Wirt aus dem dieses Gen stammt unter Laborbedingungen generell kultivierbar ist. Somit ist es möglich das Spektrum biotechnologisch nutzbarer Genprodukte von nicht oder nur schlecht kultivierbaren Organismen zu erweitern und die durch genomische und metagenomische Ansätze gefundenen putativen Gene zu exprimieren (Nacke et al., 2011; Simon & Daniel, 2009; Steele et al., 2009). Die heterologe Expression findet Anwendungen in der Medizin und in nahezu allen Bereichen der Biologie, vor allem aber in der Biotechnologie, mit dem Ziel z.B. der Produktion von Biokatalysatoren oder der Synthese von Enzymen zu deren Untersuchung und Anwendung (Beloqui et al., 2008).

Als Expressionswirte werden vornehmlich eben jene Bakterienstämme verwendet die unter Laborbedingungen gut handhabbar sind und meist eigens für diesen Zweck genetisch modifiziert wurden, wie z.B. bestimmte Stämme der Bakterien *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*, für die entsprechende Plasmidexpressionssysteme etabliert sind (Jana & Deb, 2005; Li et al., 2004; Peti & Page, 2007; Schallmeyer et al., 2004; Sorensen & Mortensen, 2005; Westers et al., 2004; Zweers et al., 2008).

Durch die Verwendung bakterieller Expressionssysteme konnte eine Vielzahl von Genen exprimiert und deren Protein- oder Stoffwechselprodukte gewonnen werden. Dennoch zeigen sich bei einer größeren Zahl von Proteinen Schwierigkeiten, diese funktionell zu gewinnen, wenn sich die Physiologie des Ursprungsorganismus als zu komplex oder verschiedenartig zum Expressionswirt erweist. Proteine, welche durch heterologe Expression synthetisiert werden, können für den Wirtsorganismus aus verschiedenen Gründen toxisch sein. Zum einen, indem das Protein z.B. selbst oder durch Metabolite in die Physiologie des Wirtes eingreift (Saida, 2007) und zum anderen, indem die Expression Stressantworten in der Zelle auslöst (Gill et al., 2000; Lesley et al., 2002; Xu & Link, 2009). Die heterologe Überexpression ist ein Prozess, der in hohem Maße Energie und Ressourcen verbraucht und somit zu Zellstress führen kann (Corchero & Villaverde, 1998; Glick, 1995; Hoffmann & Rinas, 2004). Eines der häufigsten Probleme der heterologen Expression ist die Bildung von Proteinaggregaten, den sogenannten "*inclusion bodies*" (Fahnert et al., 2004; Rinas & Bailey, 1993; Rinas et al., 2007; Villaverde & Carrio, 2003). Diese Aggregation des exprimierten Proteins kann durch eine Fehlfaltung, eine geringe Löslichkeit, die Proteingröße, zu hohe Expressionslevel und falsche Expressionsbedingungen ausgelöst werden (Baneyx & Mujacic, 2004; Murby et al., 1995; Sabate et al., 2010; Strandberg & Enfors, 1991; Wall & Pluckthun, 1995). Speziell Membranproteine weisen eine geringe Löslichkeit auf. Viele Proteine benötigen bestimmte Kofaktoren oder prosthetische Gruppen welche nicht in allen Wirtsorganismen synthetisiert werden können (Leonard et al., 2008; Schewe et al., 2008; Weickert et al., 1996).

Es gibt verschiedene Lösungsansätze für die Hindernisse bei der heterologen Expression. Die Toxizität der Genprodukte kann verringert werden, indem die Menge des gebildeten Proteins reduziert oder die Expression nach der Bildung von genügend Zellmasse induziert wird. Auch die Aggregation in "*inclusion bodies*" kann durch eine geringere Expressionsleistung verhindert werden (Georgiou & Valax, 1996; Wycuff & Matthews, 2000). Dies bedingt die Verwendung strikt regulierter, induzierbarer und verschieden starker Promotoren (Saida, 2007). In diesem Fall ist aber nicht die maximale Syntheseleistung der Zelle der limitierende Faktor, sondern die Toxizität des Produkts. Möglichkeiten die Syntheseleistung bei der heterologen Expression zu erhöhen bestehen darin, die Fehlfaltung der Proteine zu minimieren, indem z.B. molekulare Chaperone koexprimiert (Kolaj et al., 2009; Mansell et al., 2008; Rinas & Puhler, 2007; Vasseur-Godbillon et al., 2006) oder die Expressionsbedingungen entsprechend optimiert werden (Georgiou & Valax, 1996; Mansell et al., 2008; Strandberg & Enfors, 1991). Eine weitere Möglichkeit besteht darin den Expressionswirt an die Anforderungen der Proteine anzupassen, z.B. Stämme zu erzeugen die Membranproteine effektiver und funktionell exprimieren können (Miroux & Walker, 1996; Wagner et al., 2008). Kofaktoren oder prosthetische Gruppen können nachträglich zu den separierten Proteinen hinzugefügt werden, wobei hier Fehler auftreten können (Armengaud et al., 1995).

Die Erweiterung der Expressionswirte ist in diesem Zusammenhang ein lohnendes Ziel und das phototrophe Bakterium *Rhodobacter capsulatus* ist mit seiner physiologischen Diversität eine aussichtsreicher Kandidat.

1.2. Expression in *Rhodobacter capsulatus*

R. capsulatus verfügt über Eigenschaften, die den gängigen Expressionswirten *E. coli* und *B. subtilis* nicht zu eigen sind. Diese Eigenschaften umfassen die vergrößerte Membranoberfläche durch Ausbildung der intracytoplasmatischen Membran (ICM) und Vesikeln unter phototropen Bedingungen und die natürliche Generierung verschiedener Redox-Kofaktoren in erhöhtem Maße unter Stickstoffmangelbedingungen. Mit diesen Eigenschaften sollte *R. capsulatus* in der Lage sein für die Synthese von Membranproteinen und Proteinen mit Redox-Kofaktor als ein besserer Wirt zu dienen als z.B. *E. coli*.

1.2.1. Bakterien der Gattung *Rhodobacter*

Zu den physiologisch vielfältigsten und anpassungsfähigsten Bakterien gehören die schwefelfreien Purpurbakterien der Gattung *Rhodobacter* (Imhoff & Rodriguez-Valera, 1984). Man findet sie in Frischwasser, marinen und hypersalinen Lebensräumen. Sie gehören zu den *Rhodospirillaceae* und werden damit taxonomisch in die α -Untergruppe der Gram-negativen Bakterien eingeordnet (Woese et al., 1984). Bakterien der Gattung *Rhodobacter* sind in der Lage unter verschiedenen Bedingungen zu wachsen, z.B. photoautotroph, photoheterotroph, chemoorganotroph, chemoautotroph und chemolithotroph. *Rhodobacter* kann dabei eine Vielzahl von Kohlenstoffquellen nutzen, neben Kohlendioxid (CO₂) auch den Zucker D-Fructose, Polyole wie D-Mannit, D-Glucit, D-Arabit oder Xylit (Schneider et al., 1993) und organischen Säuren wie D-Malat (Stahl & Sojka, 1973).

1.2.2. Das phototrophe Bakterium *R. capsulatus*

Rhodobacter capsulatus ist ein einzelliges, frei lebendes, fakultativ anaerobes, nicht-Schwefel Purpurbakterium der Gattung *Rhodobacter*. Der Organismus, erstmals von Molisch (Molisch, 1907) beschrieben, ist Mitglied der Familie der *Rhodospirillaceae* und wird daher taxonomisch der α -Untergruppe der Proteobakterien zugeordnet (Imhoff & Rodriguez-Valera, 1984; Weaver et al., 1975). Das Genom von *R. capsulatus* besitzt eine Größe von 3,7 Mbp mit 3587 annotierten Genen und verfügt über ein 133 Kbp großes zirkuläres Plasmid mit 153 annotierten Genen, beide mit einem hohen GC-Anteil von ca. 66,6 % (Strnad et al., 2010). Lichtdurchdrungene Schichten

stehender oder langsam fließender Gewässer aber auch feuchter Böden und Schlämme dienen *R. capsulatus* als natürliche Habitate (Weaver et al., 1975). Die rötlich-braune Pigmentierung und die Ausbildung einer speziellen Polysaccharidkapsel sind die Grundlage der Bezeichnung, *Rhodobacter capsulatus* (Pfennig, 1967; Weckesser et al., 1972; Weckesser et al., 1972). Der anoxygene Photosyntheseapparat, in welchem die Photopigmente (Carotinoide und Bakteriochlorophylle) gebunden sind, und die rötliche Pigmentierung bewirken, befähigt *R. capsulatus* mit Hilfe eines Protonengradienten Energieäquivalente (ATP) zu bilden (McEwan, 1994; Reinbothe et al., 2010; Wu & Bauer, 2008). *R. capsulatus* bildet, wie die meisten Purpurbakterien, die zur anoxygenen Photosynthese fähig sind, zusätzlich zur Cytoplasmamembran (CM) intracytoplasmatische Membranvesikel (ICM) aus, die eine charakteristische und speziesspezifische Organisation haben (Collins et al., 1991; Oelze, 1981; Oelze & Drews, 1972). *R. capsulatus* ist in der Lage neben CO₂, weitere Kohlenstoffquellen, wie Carbonsäuren oder Polyole heterotroph zu nutzen (Stahl & Sojka, 1973).

Des Weiteren kann *R. capsulatus* Stickstoffquellen wie Ammonium, Aminosäuren, Purine, Harnstoff oder molekularen Stickstoff (N₂) verwerten. Da die N₂-Fixierung unter großem Energieaufwand und deshalb nur unter Verbrauch großer Energieäquivalente (ATP) möglich ist, wird angenommen, dass dieser Prozess energetisch und regulatorisch eng an die anoxygene Photosynthese gekoppelt ist (Elsen et al., 2003; Joshi & Tabita, 1996; Kern et al., 1998).

1.2.3. Das *R. capsulatus* basierte Expressionssystem

Um *R. capsulatus* für die heterologe Expression von Genen nutzen zu können, wurde ein einfaches und flexibles Plasmidexpressionssystem für *R. capsulatus* etabliert. Die *R. capsulatus* Stämme B10S und B10ST7 und die pRho bezeichneten Vektoren stellen die Grundlage des Expressionssystems dar. Die Vektoren der pRho-Serie besitzen eine gemeinsame Basis. Der Vektor pBBR1MCS5 (Kovach et al., 1994) verfügt über eine MOB-Kassette, welche den Plasmidtransfer mittels Konjugation zwischen einem Donorstamm (z.B. *E. coli* S17-1) und den *R. capsulatus* Stämmen ermöglicht. Der Vektor pBBR1MCS5 ist ein "broad-host-range" Vektor, der über den Replikationsursprung in vielen Bakterien repliziert werden kann. Dieser Vektor wurde mit der "multiple-cloning-site" des Vektors pET22b (Novagen) kombiniert, so wurde der Vektor pBBR22b (Rosenau & Jaeger, 2003) generiert. Der Vektor pBBR22b wurde durch das *aphII*-Gen, welches eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin vermittelt, aus dem Vektor pBSL15 (Alexeyev et al., 1995) erweitert und so die Basis der pRho-Vektoren erzeugt.

Die Vektoren unterscheiden sich durch die Promotorsequenz, welche bei einer Expression zum Einsatz kommt, und die Anitbiotikaresistenz, welche als Selektionsmarker vermittelt wird.

Die unterschiedlichen Promotorsequenzen sind zum einen der Promotor der dem *aphII*-Gen voranstehende Promotor, welcher die Ausprägung der Kanamycinresistenz kontrolliert. Dieser Promotor wird konstitutiv aber mit geringer Frequenz abgelesen. Zum anderen ein T7-RNA-Polymerase Promotor, welcher induziert werden kann und mit hoher Frequenz abgelesen wird. Für die Expression mittels des T7-RNA-Polymerase Promotors wird der Stamm B10ST7 verwendet. Im Stamm B10ST7 ist durch homologe Rekombination das Gen für die PhageT7-RNA-Polymerase eingebracht worden. So kann die Expression, ähnlich dem *E. coli* Stamm BL21(DE), induziert werden. Die Expression der T7-RNA-Polymerase wird durch die Promotorsequenz, die auch dem *R. capsulatus fruBKA*-Operon vorangestellt ist, gesteuert. Das *fruBKA*-Operon kodiert für die Proteine des Fructose-Phosphotransferase-Systems. Die Expression des *fruBKA*-Operon wird durch Fruktose induziert, so kann auch die Expression der PhageT7-RNA-Polymerase im Stamm B10ST7 durch Fruktose induziert werden.

Als Selektionsmarker vermitteln die Gene *aphII*, das für die Aminoglycosid-Phosphotransferase kodiert, eine Resistenz gegen Kanamycin, das Gen *cat*, das für die Chloramphenicol-Acetyltransferase kodiert, eine Resistenz gegen Chloramphenicol und das Gen *aadA-1a*, das für die Aminoglycosid-Adenyltransferase kodiert, eine Resistenz gegen Spectinomycin. Die Eigenschaften der Vektoren und deren Bezeichnung sind in Tab.1.1 dargestellt (Katzke et al., 2010).

Tab.1.1.Eigenschaften der pRho-Vektoren

Expressionsvektor	Promotor	Induzierung	Antibiotikaresistenz			Affinitäts-TAG
			Km ^R	Cm ^R	Sp ^R	His ₆
pRhokHi-2	P _{<i>aphII</i>}	konstitutiv	+	+	-	+
pRhokHi-6	P _{<i>aphII</i>}	konstitutiv	+	-	+	+
pRhotHi-2	P _{T7}	induzierbar	+	+	-	+
pRhotHi-6	P _{T7}	induzierbar	+	-	+	+

1.2.4. Streptavidin- und Histidin-Tag basierte Affinitätschromatografie

Bei der Separation von Proteinen kommen verschiedene chromatografische Methoden zum Einsatz. Eine der gängigsten ist die Affinitätschromatografie (Terpe, 2003). Bei einer Affinitätschromatografie wird die Bindungsaffinität eines Moleküls an ein Peptid ausgenutzt, dies können z.B. Poly-Arginin, Poly-Histidin, Streptavidin, Cellulose-bindende Peptide oder Antikörperpeptide sein (Bucher et al., 2001).

Im Falle des His₆-Peptids koordinieren sich die Imidazolringe des Poly-Histidin-Tags zu Metallionen wie z.B. Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ und bilden einen Chelat-Komplex. Die Chelat-Bindung des Proteins wird durch die Zugabe freien Imidazols verdrängt oder durch die Änderung des pH-Wertes der Proteinpufferlösung wieder aufgehoben (Hochuli et al., 1987). Durch die Bindungsaffinität des Histidin-Tags zu Metall-Ionen, ist dieser Tag für die Proteinseparation von Redox-Kofaktor-

Proteinen, die über eine Form von Eisenschwefel-Clustern verfügen, wie z.B. Ferredoxinen, nicht geeignet.

Im Falle des Streptavidin-Moleküls basiert die Affinität auf der Verbindung zwischen einem kurzen artifizialen Peptid (8-9 AS) dem Strep-Tag und der Biotin-Bindedomäne des Streptavidins. Die Bindung kann durch Zugabe von Biotinderivaten wieder aufgehoben werden (Schmidt et al., 1996). Der Strep-Tag findet in modifizierter Form unter der Bezeichnung Strep II-Tag Anwendung, wobei durch die Modifikationen des Peptids die Bindungsaffinität zu Streptavidin erhöht wurde. Weiterhin wurden im Streptavidin an spezifischen Stellen Mutationen eingefügt um die Bindungsaffinität zum Strep II-Tag Peptid zu erhöhen, diese Streptavidin-Variante wurde Strep-Tactin genannt (Korndorfer & Skerra, 2002).

Der Strep II-Tag eignet sich für Proteinreinigungen unter anaeroben Bedingungen (Hans et al., 2000; Juda et al., 2001), für metallhaltige Enzyme und kann bei Membranproteinen verwendet werden (Groß et al., 2002).

1.3. Regulations- und Stoffwechsel-Prozesse in *Rhodobacter capsulatus*

Das fakultativ photosynthetische Bakterium *R. capsulatus* zeigt eine beträchtliche metabolische Flexibilität und kann dadurch in einer Vielzahl unterschiedlicher Umweltbedingungen überleben. *R. capsulatus* besitzt die Fähigkeit zur Photosynthese (Wu & Bauer, 2008), der CO₂-Assimilation (Tabita et al., 1992) und der N₂-Fixierung (Klipp et al., 1988). Diese vielseitigen Stoffwechsellösungen und deren regulatorische Vernetzung machen *R. capsulatus* zu einem interessanten Organismus für die molekularbiologische Forschung und bietet ein beträchtliches Potential für biotechnologische Anwendungen. Unter anaeroben Bedingungen nutzt *R. capsulatus* ein Photosystem um Energie zu gewinnen, wohingegen unter aeroben Bedingungen die Synthese des Photosystems beinahe vollständig inhibiert wird und *R. capsulatus* stattdessen aerobe Atmung betreibt (Madigan & Gest, 1978). Zudem ist *R. capsulatus* in der Lage mit dem Nitrogenaseenzymkomplex molekularen Stickstoff zu fixieren (Masepohl & Hallenbeck, 2010).

Diese verschiedenen Systeme werden in Abhängigkeit von Redox-Zustand, der Sauerstoffkonzentration und des Licht- bzw. Energieniveaus reguliert. Dazu bedarf es spezifischer Regulatoren, welche die verschiedenen Umweltsignale, wie den Redox-Zustand der Elektronentransportsysteme, verschiedene Sauerstoffpegel, variierende Lichtverhältnisse und die Verfügbarkeit gebundenen Stickstoffs, sensorisch erfassen und auf Effektoren übertragen können. Diese unterschiedlichen Regulatoren und deren Eigenschaften von *R. capsulatus* werden, bezogen auf ihre Funktionen, in den folgenden Kapiteln beschrieben.

1.3.1. Anoxygene Photosynthese und der Photosyntheseapparat bei *R. capsulatus*

R. capsulatus betreibt anoxygene Photosynthese, hierbei werden die Elektronen nicht durch die Spaltung von Wasser in Protonen und Sauerstoff gewonnen, sondern durch den zyklischen Elektronentransport der anoxygenen Photosynthese dem System wieder zugeführt oder von externen Elektronendonoren wie organischen Säuren und Wasserstoff übertragen. Das Bakteriochlorophyll *a* des Photosystems wird durch Licht der Wellenlängen 800 nm und 850 nm angeregt und überträgt die Anregungszustände auf das "special pair" des Reaktionszentrums. Vom Reaktionszentrum werden Elektronen über Bakteriopheophytin und Chinon auf einen Chinonpool transferiert. Durch die Übertragung der Elektronen auf den Cytochrom *bc*₁ Komplex wird ein Protonengradient aufgebaut, der eine ATPase antreibt, welche Energieäquivalente in Form von ATP generiert (Drews et al., 1983; Jones, 2009; McEwan, 1994). Vom Cytochrom *bc*₁ Komplex werden die Elektronen über das Cytochrom *c*₂ wieder zum Reaktionszentrum transferiert (siehe Abb.1.1).

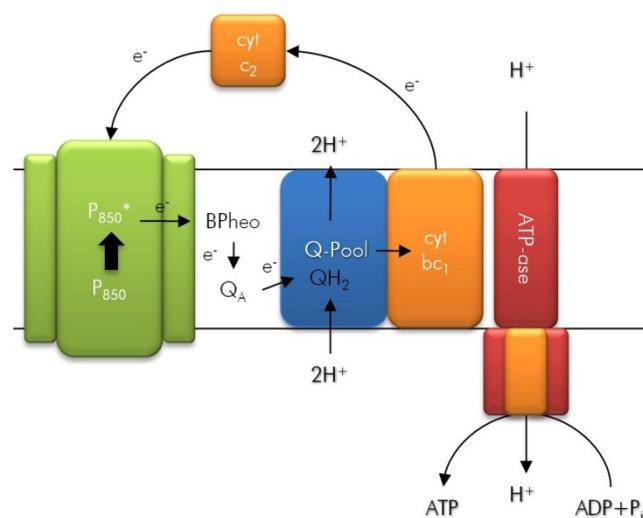


Abb.1.1 Schema des zyklischen Elektronentransports der anoxygenen Photosynthese (nach McEwan, 1994). Durch die Anregung des "special pair" werden Elektronen vom Reaktionszentrum (grün - P850) über Bakteriopheophytin (Bpheo) auf den Ubichinonpool (blau - Q-Pool) übertragen. Durch die asymmetrischen Reaktionen der Protonierung und Reduktion des Chinons auf der cytoplasmatischen Seite der Membran und der Deprotonierung und Oxidation des Chinons auf der periplasmatischen Seite der Membran findet eine Protonentranslokation statt, was zu einem Protonengradienten führt der die ATPase antreibt. Über das Cytochrom *c*₂ (cyt *c*₂) werden die Elektronen wieder an das Reaktionszentrum zurückgeführt (McEwan, 1994).

Die Synthese von Membranproteinen führt häufig zur Bildung von "inclusion bodies", wenn nicht genügend Membranoberfläche für die Proteine zur Verfügung steht (Tate, 2001). Die Anzucht von *Rhodobacter* unter photorophen Bedingungen führt zu einer Vergrößerung der Membranoberfläche durch die Ausbildung von intracytoplasmatischen Membranvesikeln (Kiley & Kaplan, 1988). Durch diese vergrößerte Membranoberfläche kann die funktionelle Synthese von Membranproteinen begünstigt werden. In der Cytoplasmamembran und in den Vesikeln der intracytoplasmatischen Membran von *R. capsulatus* ist der Photosyntheseapparat lokalisiert. Dort werden die Strukturen

der Lichtsammelkomplexe I/II und des Reaktionszentrums akkumuliert. Die Ausbildung der Vesikel ist eng an das phototrophe Wachstum und die Ausbildung der Lichtsammelkomplexe gebunden. Die Anordnung der Komplexe ist so strukturiert, dass die Lichtsammelkomplexe I um das Reaktionszentrum angeordnet sind. Die Lichtsammelkomplexe II sind wiederum um die dimerischen Lichtsammelkomplexe I/Reaktionszentren angeordnet (siehe Abb.1.2) (Sturgis et al., 2009). Die Lichtsammelkomplexe leiten die Energie des von ihnen absorbierten Lichts an die Reaktionszentren weiter. Dabei gibt es eine Anpassung des Verhältnisses von Reaktionszentren zu Lichtsammelkomplexen II je nach Lichtstärke, wobei unter Schwachlichtbedingungen ist die Anzahl der Lichtsammelkomplexe II im Verhältnis zu den Reaktionszentren höher (Cogdell et al., 2006; Sener et al., 2010).

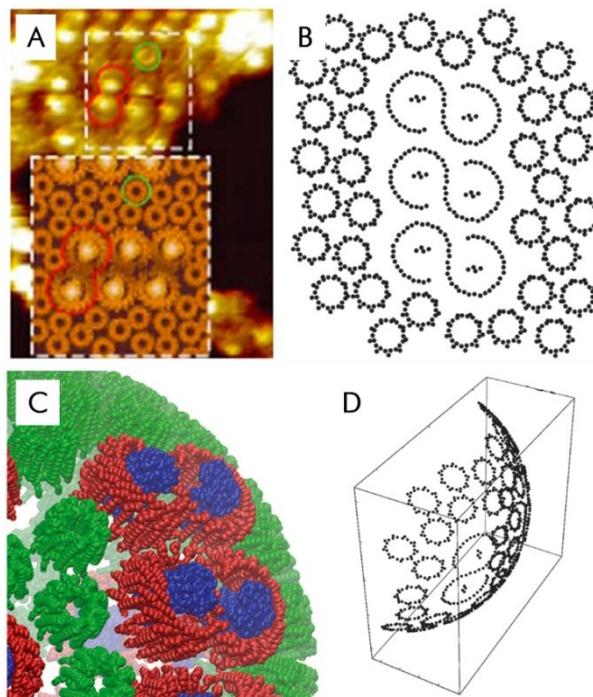


Abb.1.2 Aufbau der photosynthesischen Membran von *R. sphaeroides*. (A) "atomic force microscopy" (AFM) - Aufnahme der ICM von *R. sphaeroides* - Reaktionszentren ("reaction centre" - RC) und Lichtsammelkomplexe I ("light harvesting complex" LHC) (rote Umrandung) und der Lichtsammelkomplexe II (grüne Umrandung) (Sturgis et al., 2009). (B) Schematische Darstellung der LHCI/RC und LHC2 Anordnung. (C) Computermodell der Anordnung der LHCI/RC (rot/blau) und LHC2-Komplexe (grün) im Membranvesikel. (D) Schematische Darstellung der Anordnung der LHCI/RC und LHC2-Komplexe im Membranvesikel. B-D:(Sturgis & Niederman, 2008).

Die Gene für den Aufbau des Reaktionszentrums und des Lichtsammelkomplexes I, der Synthese des Bakteriochlorophyll *a* und der Carotinoide sind in einem ca. 46 kbp großen Bereich (s. Abb.1.3) zusammengefasst (Gregor & Klug, 1999; Young et al., 1989).

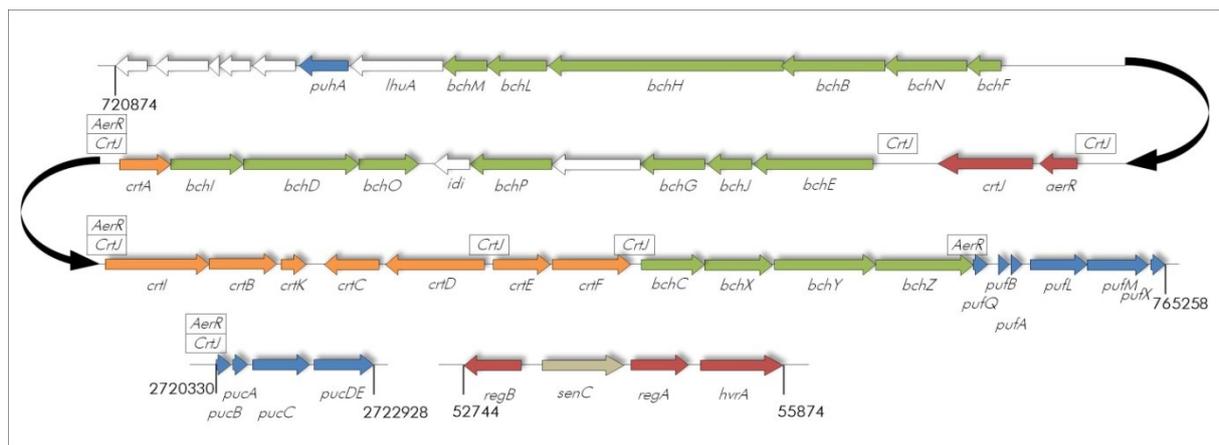


Abb.1.3 Schematische Darstellung des Photosyntheseclusters von *R. capsulatus*.

Schematische Darstellung der Gene für den Photosyntheseapparat, die Pfeile symbolisieren die Leserichtung, Größe und Anordnung der Gensequenzen: In Zeile 1 bis 3 ist die 46 kbp große Genregion dargestellt (die schwarzen Pfeile zeigen die Verknüpfung der Genregion an) in der die Gene der am Aufbau des Photosyntheseapparates beteiligten Proteine zusammengefasst sind. Die Gene deren Proteine an der Synthese des Bakteriochlorophylls beteiligt sind, sind grün dargestellt. Die Gene deren Proteine am Aufbau der Reaktionszentren oder der Lichtsammelkomplexe beteiligt sind, sind blau dargestellt. Die Gene für die Carotinoidebiosynthese sind orange dargestellt. Die Regulatoren der Photosynthesegene, wobei nur *crtJ* und *aerR* im Gencluster liegen, sind rot dargestellt. In Zeile 4 sind die Gene der Regulatoren RegA, RegB und HvrA, sowie das *pucBACDE* Operon dargestellt. Die Zahlen markieren die relative Position im Genom nach der Annotierung der NCBI-Datenbank für *R. capsulatus* SB1003. Zusätzlich sind jeweils die Operons markiert, welche durch die Repressoren AerR und CrtJ beeinflusst werden.

Die *pucBA*-Gene kodieren für die Proteine des Lichtsammelkomplexes II (Tichy et al., 1989; Youvan & Ismail, 1985; Youvan et al., 1985), die *pufBA*-Gene für die Apoproteine des Lichtsammelkomplexes I und die *pufLM*-Gene für die Apoproteine des Reaktionszentrums (Youvan et al., 1984; Youvan & Marrs, 1984). Die *bch*-Gene kodieren für Proteine, welche am Aufbau von Bakteriochlorophyll *a* (Willows, 2003), die *crt*-Gene für Proteine welche am Aufbau der Carotinoide beteiligt sind (Frank & Cogdell, 1996).

Die Expression der Gene des Photosyntheseapparates werden durch die Umweltsignale Licht, Sauerstoff sowie den Redoxzustand der Zelle von verschiedenen Regulatoren gesteuert. Im Folgenden werden die Regulationssysteme beschrieben, welche die Expression der Gene für den Photosyntheseapparat steuern.

1.3.1.1. Das Zwei-Komponenten-Regulationssystem RegB/A

Das Zweikomponenten-Regulationssystem RegB/A reguliert verschiedene energiegenerierende und -verbrauchende Systeme und ist das bestimmende Regulationssystem für die Photosynthese. Das entscheidende Signal ist der allgemeine Redoxzustand der Zelle, welcher von RegB durch ein redoxaktives Cystein, das unter oxidierenden Bedingungen eine intramolekulare Schwefelbindung ausbildet, über den Redoxzustand des Ubichinonpools und der Cytochrom-cbb₃-Oxidase

aufgenommen werden kann (Wu & Bauer, 2008). Wenn die Zelle unter phototrophen Bedingungen wächst, wird durch RegB/A die Ausbildung der entsprechenden Systeme forciert.

Bei dem Regulationssystem RegB/A handelt es sich um ein klassisches Zweikomponenten-Regulationssystem, wobei RegB die Sensor-Histidin-Kinase und RegA der Transkriptionsaktivator ist (Mosley et al., 1995). Das Gen *regA* kodiert für ein 20,4 kDa Protein (184 AS), welches durch RegB phosphoryliert werden kann und dann die Expression verschiedener Zielgene aktiviert. RegA kontrolliert die Expression der Photosynthesegene für die Proteine des Lichtsammelkomplexes I/II und des Reaktionszentrums (*puf*- und *puc*-Gene), die Proteine für die Bakteriochlorophyllbiosynthese (*bch*-Gene) und für die Carotinoidbiosynthese (*crt*-Gene) (Du et al., 1998; Hemschemeier et al., 2000). RegA kontrolliert weiterhin die Expression der Gene *nifA2* (Nitrogenasetranskriptionsaktivator), *hupSLC* (Hydrogenase) (Elsen et al., 2000), *petABC*, *cycA*, *cycY*, *cydAB*, *ccoNOPQ* (Cytochrome) (Swem et al., 2001), das *cbbI*- und *cbbII*-Operon (RubisCO) (Vichivanives et al., 2000) und das *che* Operon 2 (Chemosensoren) (Romagnoli et al., 2002). Zudem wird durch durch RegA und HvrA (Kap.1.3.1.3) das Gen *regB* und das Operon *senC-regA-hvrA* gesteuert (Du et al., 1999).

Das Gen *regB* kodiert für ein 50,1 kDa Protein (460 AS), mit einer N-terminalen Transmembran-Domäne und einer C-terminalen Transmitter-Domäne. Durch den Redoxzustand der Zelle wird dabei entweder die Kinaseaktivität von RegB inhibiert oder dessen Phosphataseaktivität gesteigert. Durch dieses System ist RegB indirekt Sauerstoff-sensitiv (Eraso & Kaplan, 1994; Happ et al., 2005; Wu & Bauer, 2010). Unter anaeroben Bedingungen ist RegB somit zur Autophosphorylierung befähigt und phosphoryliert RegA welches dadurch aktiviert wird. RegB autophosphorliert an einem konservierten Histidin-Rest, welches Teil der sogenannten H-Box ist (Inoue et al., 1995; Swem et al., 2003). RegA wird durch RegB an einem Aspartat-Rest phosphoryliert.

Als übergreifendes Regulationssystem ist RegB/A für die optimale Energieaufnahme der Zellen mittels Photosynthese verantwortlich. Durch die Ausbildung des Photosystems und der Lichtsammelkomplexe und Reaktionszentren wird damit auch die Ausbildung der ICM gefördert. Bedingungen, die die Expression der durch RegB/A gesteuerten Gene forcieren, sind entsprechend notwendig für die heterologe Expression unter phototrophen Bedingungen und die Synthese von Membranproteinen in *R. capsulatus*.

1.3.1.2. Redox-, Sauerstoff-abhängige Regulation vermittelt durch CrtJ, AerR

Das Gen *crtJ* kodiert für ein 51,4 kDa großes Repressorprotein (469 AS). CrtJ reprimiert die Expression verschiedener Gencluster, in dem es an eine palindromische Promotorsequenz (TGT-N₁₂-ACA) bindet, welche vor den Genclustern für die Bakteriochlorophyllsynthese (*bch*), der

Carotinoidsynthese (*crt*) und dem Lichtsammelkomplex II (*pvc*) lokalisiert ist (Bowman et al., 1999; Ponnampalam & Bauer, 1997). Die palindromische Sequenz, an welche CrtJ bindet, befindet sich ebenso vor dem *aerR-crtJ*-Operon, so dass das Gen *crtJ* autoreguliert ist (Masuda et al., 2002). CrtJ ist ebenso wie das RegB/A System Redox-abhängig wobei CrtJ im Gegensatz zu RegB/A direkt durch molekularen Sauerstoff beeinflusst wird. In Anwesenheit von Sauerstoff bildet CrtJ zwei intramolekulare Disulfidbrücken aus, wodurch die Bindungsaffinität von CrtJ zur DNA gesteigert wird (Bauer et al., 2003).

Das Gen *aerR* kodiert für ein 23,2 kDa großes Protein (218 AS), welches ebenso wie CrtJ die Expression verschiedener Gencluster reprimiert. AerR bindet an die Promotorregionen der Operons *pufQBALMX*, *crtAIDO* und *pucBAC2DE*. In einigen Fällen findet eine Koregulation der Repressoren AerR und CrtJ statt. Beide Proteine reprimieren die Operons *crtAIDO* und *pucBAC2DE*, das *puf*-Operon wird nur von AerR reprimiert (Dong et al., 2002).

Die sauerstoff- und redoxabhängigen Repressoren AerR und CrtJ kontrollieren die Carotinoidbiosynthese und in Teilen die Ausbildung des Photosystems. Für die Anwendung von *R. capsulatus* für die Ganzzellbiokatalyse von Carotinoiden und für die heterologe Expression ist es notwendig Bedingungen zu wählen, unter denen diese Repressoren nicht aktiv sind.

1.3.1.3. Lichtabhängige Regulation durch HvrA und AppA

Das Gen *hvrA* kodiert für ein 11,4 kDa großes Protein (102 AS), welches ein H-NS-ähnliches Protein ("*histone-like nucleoid structuring protein*") ist (Azam & Ishihama, 1999). H-NS-ähnliche Proteine binden an DNA-Stränge und verändern deren Topologie (Spurio et al., 1997). Ihre Funktion liegt in der Organisation des bakteriellen Chromosoms (Williams & Rimsky, 1997) und in der Regulation verschiedener Gene (Hommais et al., 2001). *R. capsulatus* besitzt ein H-NS-ähnliches Protein, das HvrA-Protein (Buggy et al., 1994). *R. capsulatus* zeigt unter Schwachlichtbedingungen (80 lux) eine erhöhte Menge an Photosystem im Gegensatz zu Starklichtbedingungen (6000 lux), bei einer Mutation des Gens HvrA gibt es keine Veränderung der Menge des Photosystems auf das Signal Schwachlicht (Buggy et al., 1994). HvrA reprimiert die die Transkription verschiedener *nif*-Operons unter Schwachlichtbedingungen in dem es an spezifische *nif*-Promotoren, wie z.B. den Promotor des Gens *nifA* und des Operons *nifHDK*, bindet (Kern et al., 1998; Raabe et al., 2002).

HvrA reguliert zudem die Operonstruktur der Gene *regB* und *senC-regA-hvrA* zusammen mit RegA (Du et al., 1999).

Im nah verwandten Bakterium *Rhodobacter sphaeroides* finden sich Homologe zu den Proteinen CrtJ (*R. sphaeroides*: PpsR) und AerR (*R. sphaeroides*: PpaA), welche die gleichen regulatorischen Aktivitäten zeigen. Zudem verfügt *R. sphaeroides* über einen weiteren Regulator, das Protein AppA

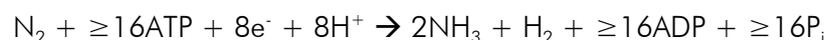
(48,7 kDa, 450 AS), welches in *R. capsulatus* nicht vorhanden ist. Die N-terminale BLUF-Domäne ("blue-light sensing using FAD") des AppA bindet nicht-kovalent ein Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und ist dadurch in der Lage, Blaulicht zu absorbieren (Gomelsky & Klug, 2002). Zudem wird durch einen Häm-Kofaktor, der an einer C-terminalen Domäne des AppA-Proteins bindet, ein Redox-Signal von AppA erfasst (Han et al., 2007).

AppA bildet mit PpsR einen Repressor-Antirepressor Komplex, wodurch PpsR nicht als Repressor agieren kann. In Anwesenheit von Sauerstoff ist AppA nicht mehr in der Lage den Komplex zu bilden und PpsR kann als Repressor fungieren. Unter mikroaeroben und anaeroben Bedingungen wird der Repressor-Antirepressor-Komplex gebildet und wird nur unter mikroaeroben Bedingungen durch die Bestrahlung mit Blaulicht gelöst, in diesem Fall ist PpsR als Repressor wieder aktiv. Unter strikt anaeroben Bedingungen hat das Blaulichtsignal keine Auswirkungen auf die Bildung des Komplexes (Bauer et al., 2003; Braatsch et al., 2002; Metz et al., 2009).

HvrA kann die Ausbildung des Photosystems steigern. Es ist dadurch eventuell möglich die Membranoberfläche mit der Ausbildung der ICM zu vergrößern. Die Schwachlichtbedingungen unter denen HvrA aktiv ist können jedoch zu Stress bei der heterologen Expression führen.

1.3.2. Stickstofffixierung und Regulation des Nitrogenaseenzymkomplexes

Rhodobacter capsulatus verfügt über eine Eisen-Molybdän-(FeMo)-Nitrogenase (Weaver et al., 1975), die von den *nif*-Genen ("nitrogen fixation") kodiert wird und eine Eisen-(Fe)-Nitrogenase welche von den *anf*-Genen ("alternative nitrogen fixation") kodiert wird (Schneider et al., 1991). Der Nitrogenaseenzymkomplex katalysiert die Umsetzung von molekularem Stickstoff zu Ammoniak. Die Fixierung molekularen Stickstoffs erfolgt unter Verbrauch von ATP und ist dementsprechend mit großem Energieaufwand verbunden:



Der Enzymkomplex der FeMo-Nitrogenase (*nif*) besteht aus 6 Untereinheiten. Die Gene für den Nitrogenaseenzymkomplex liegen in einem Operon vor (*nifHDK*) (Avtges et al., 1983). Die *R. capsulatus* Dinitrogenase hat ein Molekulargewicht von ca. 240 kDa und ist ein Heterotetramer mit dem Aufbau $\alpha_2\beta_2$. Das Enzym wird von den Genen *nifD*, für die α -Untereinheit, mit einem Molekulargewicht von 55,7 kDa und *nifK*, für die β -Untereinheit, mit einem Molekulargewicht von 56,3 kDa, kodiert (Willison et al., 1993). Die Dinitrogenase verfügt über zwei unterschiedliche Kofaktoren, den P-Cluster, einem Eisen-Schwefel-Komplex (8Fe-7S), und dem FeMoco, einem Eisen-Molybdän-Kofaktor (7Fe-9S-1Mo-Homocitrat) (Burgess et al., 1980; Chan et al., 1993; Hu et al., 2008). Beide Kofaktoren finden sich jeweils zweimal im Enzym. Der P-Cluster befindet sich an den Schnittstellen zwischen den α - und β -Untereinheiten und hat neben der Funktion als Redoxelement auch eine strukturgebende Funktion. Er überträgt die Elektronen von der

Dinitrogenasereduktase NifH an den FeMoco-Komplex. Am FeMoco, dem Eisen-Molybdän-Kofaktor, findet die eigentliche Reaktion, die Reduktion von molekularem Stickstoff zu Ammoniak statt (Chan et al., 1993).

Die Dinitrogenasereduktase ist ein Homodimer, mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa, und verfügt über einen [4Fe-4S] Eisen-Schwefel-Komplex an der Schnittstelle beider Untereinheiten. Dieser Eisen-Schwefel-Komplex bildet das redoxaktive Zentrum der Dinitrogenasereduktase. Beide Untereinheiten verfügen über zwei Mg-ATP Bindestellen (Georgiadis et al., 1992), an diesen Bindestellen kann ATP zu ADP + P_i hydrolysiert werden. Die Dinitrogenasereduktase überträgt Elektronen auf die Dinitrogenase (Emerich & Burris, 1976), dieser Vorgang ist ATP-abhängig.

Die Regulation der FeMo-Nitrogenase wird in den folgenden Kapiteln beschrieben.

1.3.2.1. Die Regulation der Stickstofffixierung durch NtrB/C

R. capsulatus ist in der Lage verschiedene Stickstoffquellen, wie Ammonium, Aminosäuren, Purine oder Harnstoff zu nutzen (Dobao et al., 1993; Keuntje et al., 1995; Leimkuhler et al., 1998). Unter Stickmangelbedingungen wird die Expression verschiedener Gene aktiviert, deren Protein entweder für den Ammoniumtransport verantwortlich sind (Borghese & Wall, 1995; Yakunin & Hallenbeck, 2002) oder an der Regulation und Synthese der FeMo-Nitrogenase oder Fe-Nitrogenase beteiligt sind (Masepohl et al., 2002) (s.Abb.1.4).

Das Zwei-Komponenten-Regulationssystem NtrB/NtrC reguliert unter anderem die Gene *glnB*, *glnA*, *glnK-amtB*, *amtY*, bei GlnB und GlnK handelt es sich um P_{II}-Protein (s.Kap.1.3.2.2), *glnA* kodiert für die Glutaminsynthetase, *amtB* und *amtY* kodieren für einen Ammoniumtransporter (Borghese & Wall, 1995; Yakunin & Hallenbeck, 2002). Desweiteren werden durch NtrB/NtrC die Gene *nifA1*, *nifA2*, *anfA*, *mopA-modABCD* und das *ure*-Operon (Masepohl et al., 2002) reguliert, *anfA* kodiert für den Transkriptionsaktivator der alternativen Nitrogenase, die Gene *modABCD* kodieren für einen Molybdentransporter und *mopA* für den Repressor dieses Operons (Wang et al., 1993) und das *ure*-Operon kodiert für die Urease (Masepohl et al., 2002).

Durch die Expression der Nitrogenase-Transkriptionsaktivatoren NifA1 und NifA2 wird auch indirekt die Transkription aller weiteren *nif*-Gene durch NtrB/NtrC reguliert (Jones & Haselkorn, 1989; Paschen et al., 2001). NtrB ist eine Sensor-Histidin-Kinase/Phosphatase und NtrC der zugehörige Transkriptionsaktivator und gehört zur Klasse der "enhancer-binding-proteins". Die Aktivität von NtrB wird von dem P_{II}-Signaltransduktions-Protein GlnB (s. Kap.1.3.2.2) reguliert.

Unter Stickstoff-Mangelbedingungen wird NtrC von NtrB phosphoryliert und somit aktiviert (Cullen et al., 1996). Bei einer hohen intrazellulären Konzentration an gebundenem Stickstoff katalysiert NtrB die entgegengesetzte Reaktion und dephosphoryliert NtrC.

Die stickstoffabhängigen Regulatoren NtrB/C aktivieren unter Stickstoffmangelbedingungen die Aufnahme von Stickstoff in Form von Ammonium oder die Generierung von Ammonium durch die Nitrogenase aus molekularem Stickstoff. Durch die Aktivierung der Nitrogenase werden vermehrt redoxaktive Proteine, wie z.B. Ferredoxine, gebildet sowie Proteine, welche die Eisen-Schwefel Kofaktoren für diese Ferredoxine und den Nitrogenaseenzymkomplex synthetisieren.

1.3.2.2. Die Regulation der Stickstofffixierung durch GlnB/K

GlnB und GlnK gehören zur Familie der P_{II}-Signaltransduktions-Proteine. P_{II}-Proteine spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation des Stickstoff- und Kohlenstoffmetabolismus von Bakterien und höheren Pflanzen (Arcondeguy et al., 2001; Ninfa & Atkinson, 2000). Das *glnB*-Gen ist Teil des *glnBA* Operons (*gln* - "glutamat-synthetase"). Das *glnK*-Gen wird zusammen mit dem *amtB*-Gen (*amt* - "methylammonium-transport") transkribiert. Die Aktivität der Proteine GlnB und GlnK wird durch das Uridylyl-Transferase/Uridylyl-entfernende Enzym GlnD reguliert, bei beiden Reaktionen ist die Bindung von ATP und 2-Ketoglutarat an den P_{II}-Signaltransduktionsproteinen notwendig. Die Uridylierung wird durch Glutamin inhibiert und die Deuridylierung verstärkt. Bei Stickstoffmangelbedingungen ist die Glutaminkonzentration niedrig und es erfolgt die Uridylierung von GlnB/K (Forchhammer, 2007; Jiang et al., 1998).

Die Synthese und Aktivität der Nitrogenase in *R. capsulatus* wird von GlnB/GlnK auf drei Ebenen reguliert (s.Abb.1.4). Erstens, die Regulation der Aktivität von NtrC durch Interaktion und Inaktivierung von NtrB, vermittelt durch GlnB (Cullen et al., 1996; Drepper et al., 2003; Kranz & Foster-Hartnett, 1990). So wird die Transkription von *nifA* inhibiert. Zweitens, die direkte Inaktivierung von NifA, vermittelt durch GlnB und GlnK, durch Protein-Protein-Interaktion (Drepper et al., 2003; Hübner et al., 1993; Paschen et al., 2001) und drittens durch eine ADP-Ribosylierung und damit Inaktivierung von NifH, der Dinitrogenasereduktase durch Interaktion und Aktivierung der Dinitrogenase-Reduktase-ADP-Ribosyltransferase DraT, vermittelt durch GlnB und GlnK (Drepper et al., 2003; Pawlowski et al., 2003).

1.3.2.3. Die Nitrogenase Transkriptionsaktivatoren NifA1 und NifA2

Der Transkriptionsaktivator der Gene der Dinitrogenase und Dinitrogenasereduktase ist NifA. Von NifA werden auch alle Gene der Proteine für die Kofaktorsynthese der Dinitrogenase und Dinitrogenasereduktase aktiviert (s.Abb.1.4). *Rhodobacter capsulatus* besitzt zwei Kopien des *nifA*-Gens, bezeichnet als *nifA1* und *nifA2* (Masepohl et al., 2002). Die Proteine sind zu über 95% identisch und unterscheiden sich nur in der Sequenz der N-terminalen 20 Aminosäuren (Paschen et al., 2001). Die NifA Proteine haben ein Molekulargewicht von 62 kDa und werden von dem

1737 bp großen *nifA1*-Gen bzw. dem 1746 bp großen *nifA2*-Gen kodiert. Beide Proteine binden an die "upstream activator sequence" (UAS) der Zielgene und rekrutieren RNA-Polymerasen mit alternativem Sigmafaktor (RpoN, σ^{54}) zu den Promotoren (Preker et al., 1992; Thony & Hennecke, 1989). Sowohl die Expression der *nifA*-Gene, reguliert durch NtrB/NtrC, als auch die Aktivität von NifA1 und NifA2 werden durch GlnB und das paraloge Protein GlnK reguliert (siehe Kap.1.3.2.1 und 1.3.2.1). Für die Transkription von *nifA1* und *nifA2* ist NtrC notwendig, die Transkription von *nifA2* kann aber zusätzlich durch RegA verstärkt werden (Elsen et al., 2000). RegA gehört zu dem in Kapitel 1.3.1.1 beschriebenen Zwei-Komponenten-Regulationssystem RegA/RegB, welches die Transkription des Photosyntheseapparates reguliert (Elsen et al., 2004; Mosley et al., 1994). Mutationsanalysen der *nifA*-Gene haben gezeigt, dass der Verlust einer der beiden Transkriptionsaktivatoren zu keinem erkennbaren Phänotyp führt, da beide Transkriptionsaktivatoren durch den jeweilig anderen substituiert werden können. Allerdings führt der Verlust beider Transkriptionsaktivatoren zu einem Nif-Phänotyp bei dem keine Stickstofffixierung möglich ist (Klipp et al., 1988).

Für die NifA1/NifA2 vermittelte Expression der Nitrogenasegene müssen anaerobe, stickstoff-limitierende Bedingungen vorherrschen, unter denen dann die Expression der Gene für den Nitrogenaseenzymkomplex und speziell des *nifHDK*-Operons sehr stark ist.

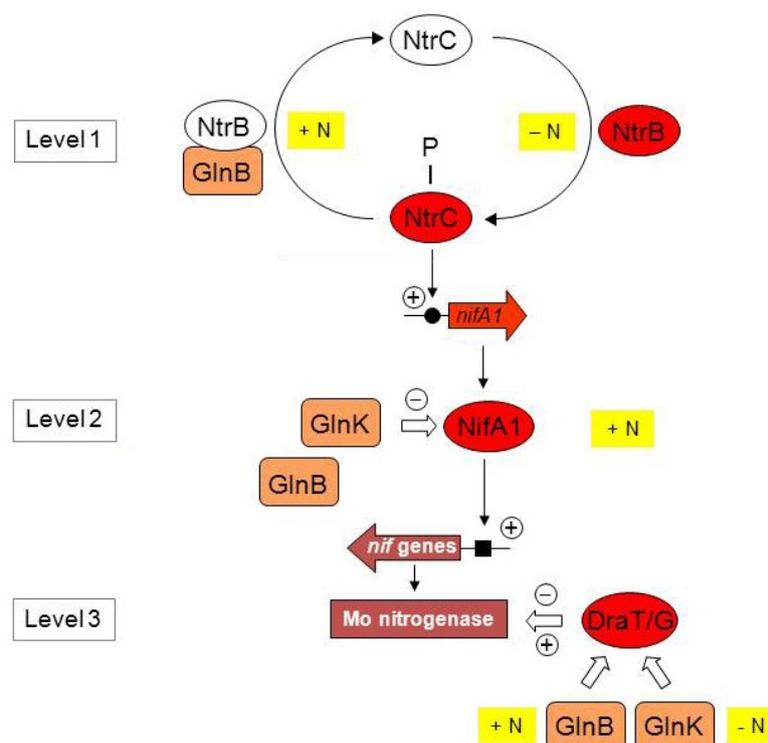


Abb.1.4 Schematische Übersicht der Regulation von Expression und Aktivität des Nitrogenaseenzymkomplexes nach (Drepper et al., 2003). Dargestellt sind: das Zweikomponenten-Regulationssystem NtrB/C (Kap.1.3.2.1), die P_{ii} -Signaltransduktions-Proteine GlnB/K (Kap.1.3.2.2), der Nitrogenasetranskriptionsaktivatoren NifA1 (Kap.1.3.2.3) und die Regulatoren DraT und DraG, die die Aktivität der Nitrogenase durch posttranslationale Modifikation regulieren können.

1.3.2.4. *Rhodobacter capsulatus* Ferredoxine

Die Bezeichnung Ferredoxin wurde erstmals auf das von Mortenson, Valentine und Carnahan aus *Clostridium pasteurianum* isolierte "Eisen-Protein" angewandt (Mortenson, 1963; Valentine, 1964). Als Ferredoxine werden die "Nicht-Häm Eisen Elektronentransfer Proteine" bezeichnet. Sie sind beteiligt am Elektronentransfer in der Atmungskette, der Photosynthese oder der Stickstoff-fixierung, dienen der Speicherung von Eisen oder des gesamten Fe-S Clusters (Arnon et al., 1963). Ferredoxine stellen die größte Gruppe mobiler biologischer Elektronentransporter dar. Sie verfügen über ein oder mehrere Fe-S Cluster der Konfiguration [2Fe-2S], [3Fe-4S] oder [4Fe-4S] (Bruschi & Guerlesquin, 1988; Johnson et al., 2005).

R. capsulatus verfügt über sechs Ferredoxine kodiert durch die Gene *fdxA* (Fd II), *fdxB* (Fd III), *fdxC* (Fd IV), *fdxD* (Fd V), *fdxE* (Fd VI) und *fdxN* (Fd I) (Saeki et al., 1991). Bei den Ferredoxinen FdIV, FdV und FdVI handelt es sich um sogenannte Pflanzentyp-Ferredoxine mit einem oder mehreren [2Fe-2S] Clustern, die Ferredoxine FdI, FdII und FdIII sind sogenannte bakterielle Ferredoxine mit einem oder mehreren [4Fe-4S] bzw. [3Fe-4S] Clustern.

Tab.1.2. Eigenschaften der Ferredoxine I-VI aus *Rhodobacter capsulatus*.

Ferredoxin	Gen	<i>nif</i> -Regulon	Fe-S Cluster
FdI	<i>fdxN</i>	+	2[4Fe-4S]
FdII	<i>fdxA</i>	-	[4Fe-4S][3Fe-4S]
FdIII	<i>fdxB</i>	+	4[4Fe-4S]
FdIV	<i>fdxC</i>	+	2 [2Fe-2S]
FdV	<i>fdxD</i>	+	2 [2Fe-2S]
FdVI	<i>fdxE</i>	-	1 [2Fe-2S]

Das Protein FdIII, kodiert durch das Gen *fdxA*, ist ein 12,7 kDa Protein (112 AS). Das FdIII hat je ein Fe-S Cluster vom Typ [3Fe-4S] und [4Fe-4S] (Duport et al., 1990). Ferredoxine mit zwei unterschiedlichen Fe-S Clustern konnten auch in *Azotobacter*, *Bacillus*, *Desulfovibrio*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Saccharo-polyspora*, *Streptomyces* und *Thermus* nachgewiesen werden. Keinem der Proteine konnte eine spezifische Funktion zugeordnet werden (Armengaud & Jouanneau, 1995).

Bei einer Expression des Gens *fdxA* aus *R. capsulatus* in *E. coli* konnte zwar das Apoprotein erhalten werden, durch Versuche Fe-S Cluster nachträglich einzufügen konnte nur FdIII Protein mit 2[4Fe-4S] Clustern generiert werden. Bei einer Expression in *R. capsulatus* konnte das Holoenzym generiert werden aber nur in geringem Maße (Armengaud et al., 1995; Jouanneau et al., 1992).

1.3.3. Das "photoactive yellow protein"

Das "photoactive-yellow-protein" (PYP) wurde zuerst 1985 von Meyer (Meyer, 1985) in *Ectothiorhodospira halophila*, als kleines, gelb gefärbtes, wasserlösliches Protein beschrieben. PYP-Homologe konnten neben *R. capsulatus* auch in anderen Purpurbakterien gefunden werden, wie z.B. *Rhodothallasium salexigens*, *Rhodobacter sphaeroides* und *Rhodocista centaria*. Das *R. capsulatus* PYP hat ein Molekulargewicht von 13,9 kDa und wird von dem 375 bp großen *pyp*-Gen kodiert. Das *R. capsulatus* PYP Chromophor absorbiert Licht mit charakteristischen Maxima bei 435 und 375 nm Wellenlänge (Kyndt et al., 2004; Kyndt et al., 2004), also im Bereich des sichtbaren blauen Lichts. Das Chromophor ist ein p-Hydroxyphenylpropensäurethioester, der an einem Cysteinrest (Cys69) gebunden ist (Borgstahl et al., 1995). Der Photozyklus des *R. capsulatus* PYP, wie das aus *E. halophila*, wird durch Licht der Wellenlänge 446 nm angeregt (Ihee et al., 2005; Larsen & van Grondelle, 2005; Schlichting & Berendzen, 1997; van der Horst et al., 2005). Die dreidimensionale Struktur des PYP-Proteins aus *E. halophila* wurde bereits 1989 mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt (McRee et al., 1989).

Es konnte gezeigt werden, dass *E. halophila* eine negative phototaktische Reaktion auf die Bestrahlung mit Blaulicht im Bereich der PYP Absorptionsmaxima zeigt (Sprenger et al., 1993). Es wird vermutet, dass PYP an der Regulation der Gasvesikelbildung in *R. capsulatus* beteiligt ist, da das *pyp*-Gen und die für die Chromophorbildung notwendigen Gene von den Genen für die Gasvesikelbildung flankiert werden (Kyndt et al., 2004). Der genaue Interaktionspartner oder die Gene welche durch PYP beeinflusst werden, sind für keinen Organismus, bei dem PYP-Homologe entdeckt wurden, bekannt.

Wie in Kapitel 1.3.1.3 beschrieben gibt es einen direkten Nachweis für die lichtabhängige Regulation der Genexpression in *R. sphaeroides* vermittelt durch AppA und sowohl in *R. sphaeroides* als auch in *R. capsulatus* eine lichtabhängig Regulation vermittelt durch HvrA. Für *R. capsulatus* ist ebenfalls ein "dark-switch-off" der Nitrogenase beschrieben, vermittelt durch DraG (Drepper et al., 2003; Masepohl & Hallenbeck, 2010). Das Gen für AppA ist in *R. capsulatus* nicht vorhanden und es findet auch keine entsprechende Regulation in *R. capsulatus* statt (Jäger et al., 2007). Die Proteine HvrA und DraG sind nicht in der Lage ein Lichtsignal aufzunehmen, so dass ein Interaktionspartner vermutet wird der die Aktivität dieser Proteine lichtabhängig reguliert. PYP als dem einzigen identifizierten Blaulichtrezeptor in *R. capsulatus* könnte die Rolle dieses Interaktionspartners zukommen.

1.4. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Optimierung des *Rhodobacter capsulatus* basierten Expressionssystems zur Expression schwer exprimierbarer Proteine wie z.B. Membranproteine oder Proteine mit Metall-Kofaktoren. Dabei sollten der Einfluss von Lichtqualität und -quantität auf die phototrophe Anzucht von *R. capsulatus* untersucht werden.

Für die Belichtung bei Anzucht von *R. capsulatus* werden bislang Glühbirnen verwendet, die im gesamten physiologisch relevanten Wellenlängenbereich und darüber hinaus emittieren. Durch die Änderung in Lichtintensität und Emissionsmaxima durch die Verwendung von Leuchtdioden sollte untersucht werden, welchen genregulatorischen und physiologischen Einfluss diese Lichtbedingungen auf *R. capsulatus* haben.

R. capsulatus eignet sich für die Expression von Membranproteinen durch die Ausbildung der ICM-Vesikel und Proteinen mit Metall-Kofaktoren durch die Ausbildung einer Vielzahl unterschiedlicher Typen dieser Kofaktoren, was unter phototrophen Bedingungen und dabei im Besonderen unter Stickstoffmangelbedingungen stattfindet.

Unter diesen Bedingungen ist der Promotor der Nitrogenasestrukturgene einer der stärksten natürlich vorkommenden Promotoren in *R. capsulatus*. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit sich der Promotor in das pRho-Vektorensystem übertragen lässt und überprüft werden ob die natürlichen Eigenschaften, also Promotorstärke und die strikte Regulation in Abhängigkeit von gebundenem Stickstoff, bei der plasmidkodierte Promotorsequenz, erhalten bleiben.

Der His₆-Tag eignet sich für nahezu alle löslichen Proteine für die Reinigung oder einen immunologischen Nachweis. Für Proteine mit Metall-Kofaktoren ist der His₆-Tag nicht geeignet. Sowohl für Proteine mit Metall-Kofaktoren als auch Membranproteine ist der Strep II-Tag besser geeignet. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit das pRho-Vektorensystem um die Sequenz für den Strep II-Tag erweitert werden, um die Expression und anschließende Reinigung von Proteinen mit Eisen-Schwefel Kofaktoren. Die Expression und Reinigung mit einem Strep II-Tag sollte am Ferredoxin II kodiert durch *fdxA* aus *R. capsulatus* getestet werden.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1. Bakterienstämme

2.1.1. *Escherichia coli* Stämme

Tab.2.1 *E. coli* Stämme

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
DH5a	F ⁻ , <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , [Φ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>], <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA</i> , (<i>res-</i> , <i>mod+</i>), <i>deoR</i>	(Hanahan, 1983)
S17-1	Ec294::[RP4-2(<i>Tc</i> ::Mu)(<i>Km</i> ::Tn λ)], <i>pro</i> , <i>res</i> , <i>recA</i> , Tpr, Smr	(Simon et al., 1983)
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)</i> λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	(Studier & Moffatt, 1986)

2.1.2. *Rhodobacter capsulatus* Stämme

Tab.2.2 *R. capsulatus* Stämme

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
B10S	spontane SmR Mutante des <i>R. capsulatus</i> B10	(Klipp et al., 1988)
B10ST7	<i>R. capsulatus</i> B10S mit PhageT7-RNA-Polymerase-Gen	(Katzke et al., 2010)
RB1	<i>pyp</i> -Mutante des <i>R. capsulatus</i> B10S	diese Arbeit

2.2. Vektoren und rekombinante Plasmide

2.2.1. Vektoren

Tab.2.3 Vektoren

Vektorplasmid	Relevante Eigenschaften
pRhokHi-2	Kan _R , Cm _R , ORI (pBBR22b), P _{<i>aphII</i>} , MCS (pBBR22b), MOB, His ₆ -Tag
pRhotHi-2	Kan _R , Cm _R , ORI (pBBR22b), P _{T7} , MCS (pBBR22b), MOB, His ₆ -Tag
pRhonHi-2	Kan _R , ORI (pBBR22b), P _{<i>nif</i>} , MCS (pBBR22b), MOB, His ₆ -Tag
pRhokS-2	Kan _R , Cm _R , ORI (pBBR22b), P _{<i>aphII</i>} , MCS (pBBR22b), MOB, Strep II-Tag
pRhotS-2	Kan _R , Cm _R , ORI (pBBR22b), P _{T7} , MCS (pBBR22b), MOB, Strep II-Tag
pRhonS-2	Kan _R , ORI (pBBR22b), P _{<i>nif</i>} , MCS (pBBR22b), MOB, Strep II-Tag

Die Herstellung der Vektoren pRhonS-2 und pRhonHi-2 ist im Anhang schematisch dargestellt.

2.2.2. Rekombinante Plasmide

Tab.2.4 Rekombinante Plasmide

Rekombinante Plasmide	Relevante Eigenschaften	Referenz
pRhokHi-YFP	726bp YFP-Gen	A. Heck
pRhotHi-YFP	726bp YFP-Gen	A. Heck
pRhonHi-YFP	726bp YFP-Gen, P _{nif} Promotor Version 5	diese Arbeit
pRhonHi-V1-YFP	726bp YFP-Gen, P _{nif} Promotor Version 1	N. Kucz
pRhonHi-V2-YFP	726bp YFP-Gen, P _{nif} Promotor Version 2	J. Bernds
pRhonHi-V3-YFP	726bp YFP-Gen, P _{nif} Promotor Version 3	J. Bernds
pRhotS-fdxA	338bp fdxA-Gen, Strep II-TAG	diese Arbeit

2.3. Oligonukleotide und Sequenzierungen

2.3.1. Verwendete Oligonukleotide

Tab. 2.5 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' > 3')	TM [°C]	Länge [bp]	Verwendung
Strep-Tag Up	ctgcagtggctgcacccgcagttcgaaaag tgagatccggctgctaacaaa	87,9	51	Primer 1 Strep-Tag PCR
Strep-Tag Down	tcacttttcgaactgcggatgcgaccactg cagctcgagtgccggccgcaag	93,0	51	Primer 2 Strep-Tag PCR
fdxA Up	catatgacctatgtcgtcac	51,3	20	Primer 1 fdxA PCR
fdxA Down	ctcgagtcgcccgtgccgggat	64,2	22	Primer 2 fdxA PCR
nifHPro up	ggatcctcccacagaggg	74	19	Primer 1 nifH Promoter PCR
nifHPro down	gtctagacggccaggtgca	71,9	19	Primer 2 nifH Promoter PCR
CmR up	ggatccagtacttcgcagaa	68,2	20	Primer 1 Chloramph. Res. PCR
CmR down	agatctaaattacgccccgc	68,2	20	Primer 2 Chloramph. Res. PCR
CmR-ex up	tgccctcattcagcatttgc	62,9	20	Primer 1 Cm _R Entfernung PCR
CmR-ex down	ttcgccaaaagtggcccag	66,0	20	Primer 2 Cm _R Entfernung PCR
SeqPrimNHP up	aatcatgcgaaacgatcctc	52,0	21	Sequenzier Primer für pRhonS-2

2.3.2. Sequenzierungen

Die Sequenzierung des Vektors pRhonS ist im Anhang dargestellt.

 2.4. Nährmedien und Zusätze

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Nährmedien 20 min bei 200 kPa und 120°C autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wurden sterilfiltriert (Millipore-Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 0,2 μm) und dem Medium nachträglich zugesetzt ($T < 60^\circ\text{C}$).

2.4.1. Nährmedien

2.4.1.1. *E. coli* LB-Medium (Sambrook & Russell, 2001)

Trypton	10,0 g
NaCl	5,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Agar (für LB-Festmedium)	15 g
A. dest.	ad 1000 ml

2.4.1.2. *R. capsulatus* PY-Medium (Sambrook & Russell, 2001)

BactoPepton	10,0 g
NaCl	0,5 g
Hefeextrakt	0,5 g
Agar (für PY-Festmedium)	15 g
1 M MgCl_2	2,0 ml
1 M CaCl_2	2,0 ml
0,5% (w/v) $\text{FeSO}_4 \cdot \text{HCl}$	2,4 ml
A. dest.	ad 1000 ml

Zur Herstellung der 0,5% (w/v) $\text{FeSO}_4 \cdot \text{HCl}$ -Lösung wurden 0,5% (w/v) FeSO_4 und 1 ml 32%-ige Salzsäure ad 200 ml A. dest. gegeben. Die Zusätze MgCl_2 , CaCl_2 und $\text{FeSO}_4 \cdot \text{HCl}$ wurden steril filtriert (Kap.2.4) und nach dem Autoklavieren dem Medium zugegeben.

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

10% (w/v) DL-Malat/Lactat, pH 6,8/pH 8,0	40,0 ml
20% (w/v) MgSO_4	1,0 ml
7,5% (w/v) CaCl_2	1,0 ml
1% (w/v) $\text{Na}_2\text{-EDTA}$	2,0 ml
0,5% (w/v) $\text{FeSO}_4 \cdot \text{HCl}$	2,4 ml
0,1% (w/v) Thiamin	1,0 ml
Spurenelement-Lösung	1,0 ml
1 M Phosphat-Puffer, pH 6,8/pH 8,0	9,6 ml
1 M Tris/HCl-Puffer, pH 6,8/pH 8,0	9,6 ml
A. dest.	ad 1000 ml

Der Phosphatpuffer (pH 6,8) wurde steril filtriert und dem Medium 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) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ *ad* 1000 ml RCV-Medium gegeben. Für serinhaltiges RCV-Medium (RCV+Serin) wurden 10 ml steriles 10%-iges (w/v) Serin *ad* 1000 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 •3 H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄ •7 H ₂ O	0,06 g
NaMoO ₄ •2 H ₂ O	0,02 g
A. dest.	<i>ad</i> 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.	<i>ad</i> 500 ml

Der Puffer wurde mit KOH auf pH 6,8 eingestellt und anschließend steril filtriert.

2.4.2. Antibiotika

Tab.2.6 Verwendete Antibiotika

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

2.5. Antiseren, Enzyme und Chemikalien

2.5.1. Verwendete Antiseren

Antiserum	Bezugsfirma
Ziege-Anti-Kaninchen-HRP-Konjugat	Amersham
Kaninchen-Anti-NifH-Antikörper	Eurogentec

2.5.2. Verwendete Enzyme

Enzym	Bezugsfirma
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP)	New England Biolabs
<i>Pfu</i> -Polymerase	Stratagen
Ribonuklease A	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH
T4-DNA-Ligase	Fermentas
Phusion Polymerase System	Finnzymes/Thermo Fisher Scientific

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen sowie deren zugehörige Enzypuffer wurden von den Firmen Fermentas GmbH und New England Biolabs GmbH bezogen.

2.5.3. Verwendete Chemikalien

	Chemikalie
Becton Dickinson	Pepton
Biomol	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid, IPTG Trishydroxymethylaminomethan, Tris
Calbiochem	Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat L-Serin Magnesiumchlorid-Hexahydrat
Fermentas	Adenosintriphosphat, ATP
Gibco BRL	Hefeextrakt Agar Agarose
Merck	Amidoschwarz Ammoniumsulfat Borat Borsäure

	Calciumchlorid Dinatriumcarbonat Dinatriummethylen-diamintetraacetat, Na ₂ -EDTA Eisen-(II)-sulfat-Heptahydrat Essigsäure Kaliumacetat Kaliumdihydrogenphosphat Kupfernitratt-Trihydrat Magnesiumsulfat-Heptahydrat Manganchlorid Mangansulfat-Hydrat Natriumformiat Natriumhydrogencarbonat Natriummolybdat-Dihydrat Zinksulfat-Heptahydrat
Riedel de Haën	Glycerol
Roth	Agarose Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)-Lösung Ammoniumperoxodisulphat, APS Ethanol Kaliumchlorid L-Glycin Methanol N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, TEMED Natriumdodecylsulfat, SDS Natriumhydroxid Polyethylenglycol, PEG Polyoxyethylensorbitolmonolaurat, Tween Salzsäure
Serva	Ampicillin Bromphenolblau, BPB Coomassie Brilliant Blau Kanamycin Tetracyclin
Sigma	β-Mercoaptoethanol 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid, X-Gal D-Glukose Dimethylformamid, DMF Dimethylsulfoxid, DMSO DL-Malat Ethidiumbromid

Rubidiumchlorid
Streptomycin
Thiamin
Trypton

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

2.6. Puffer und Lösungen

2.6.1. Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Tris-HCl

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

Mix I	
Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
Na ₂ -EDTA, pH 8,0	10 mM
Mix II	
NaOH	200 mM
SDS	1% (w/v)
Mix III	
Kaliumacetat	3 M
Natriumformiat	1,8 M
TE-Puffer	
Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
Na ₂ -EDTA, pH 8,0	1 mM

2.6.2. Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

TBE-Puffer	
Tris	89 mM
Borat	89 mM
Na ₂ -EDTA	2,5 mM
DNA-Probenpuffer	
Na ₂ -EDTA	100 mM
Glycerol	43% (v/v)
BPB	0,05% (w/v)

DNA-Molekulargewichtsstandard "O'RangeRuler 100 bp + 500 bp DNA Ladder" (Fermentas)

6000; 5500; 5000; 4500; 4000; 3500; 3000; 2500; 2000; 1500; 1400; 1300; 1200; 1100; 1000; 900; 800; 700; 600; 500; 400; 300; 200; 100 bp.

Zur besseren Orientierung heben sich die Banden bei 6000, 2000, 1500, 1000 und 500 bp im Agarosegel durch eine höhere DNA-Konzentration von den anderen Banden ab.

DNA-Molekulargewichtsstandard "*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*" (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.

2.6.3. Puffer und Lösungen zur Transformation von Bakterien

Magnesium-Mix	
MgCl ₂ 500 mM	500 mM
MgSO ₄ 500 mM	500 mM
Transformationspuffer (TMF)	
CaCl ₂ 100 mM	100 mM
RbCl ₂ 50 mM	50 mM
MnCl ₂ 40 mM	40 mM

2.6.4. Puffer und Lösungen zur Proteinisolierung und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

10-fach Elektrophorese-Puffer (pH 8,8)	
Tris-HCl	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1% (w/v)
A. dest.	ad 1000 ml
4-fach Sammelgelpuffer (pH 6,8)	
Tris-HCl	0,5 M
A. dest.	ad 200 ml
4-fach Trenngelpuffer (pH 8,8)	
Tris-HCl	1,5 M
A. dest.	ad 200 ml
SDS-Probenpuffer (pH 6,8)	
Tris-HCl	5 mM
Glycerol	10% (v/v)
SDS	4% (w/v)
β-Mercaptoethanol	2% (v/v)
BPB	0,03% (w/v)
A. dest.	ad 50 ml

15% (w/v) SDS-Trenngel	
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	5 ml
4-fach Trenngelpuffer	2,5 ml
A. dest.	2,3 ml
10% (w/v) SDS	100 μ l
10% (w/v) APS	100 μ l
TEMED	10 μ l
3% (w/v) SDS-Sammelgel	
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	830 μ l
4-fach Sammelgelpuffer	1,3 ml
A. dest.	2,7 ml
10% (w/v) SDS	50 μ l
10% (w/v) APS	50 μ l
TEMED	10 μ l

Protein-Molekulargewichtstandard "*PageRuler Prestained Protein Ladder*" Fermentas

170; 130; 100; 70; 55; 40; 35; 25; 15; 10 kDa.

Zur besseren Orientierung ist die 70 kDa Bande rot, die 10 kDa Bande grün eingefärbt.

Coomassie-Blau-Färbelösung	
Methanol	25% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)
Coomassie Brilliant Blue	0,2% (v/v)
Entfärbelösung	
Methanol	5% (v/v)
Essigsäure	7% (v/v)

2.6.5. Puffer und Lösungen für das Immunoblotting (Western Blot)

10-fach Dunn-Carbonat-Puffer	
NaHCO ₃	10 mM
Na ₂ CO ₃	3 mM
Methanol	20% (v/v)
20-fach TBS Puffer (pH 8,0)	
Tris-HCl	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)

2.6.6. Puffer und Lösungen für die Strep-Tactin Affinitätschromatographie

Equilibrierungspuffer	
Tris/HCl pH 8,0	100 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Waschpuffer	
Equilibrierungspuffer	
Desthiobiotin	0,1 mM
Elutionspuffer	
Equilibrierungspuffer	
Desthiobiotin	2,5 mM
Regenerationspuffer	
NaOH	500 mM

2.7. Reaktions- und Nachweis- "Kits"

Reaktions-/Nachweiskits	Bezugsfirma
ECL Western Blotting Detection System	GE Healthcare
HiSpeed Plasmid MiniKit	QIAGEN GmbH
HiSpeed Plasmid MidiKit	QIAGEN GmbH
Perfectprep Gel CleanUp Kit	Eppendorf AG
Phusion PCR System	Eppendorf AG
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH

2.8. Sonstige Materialien und Geräte

Tab.2.8 Materialien und Geräte

Gerät	Gerätename	Firma
Blotapparaturen	Mini-Transfer-Blot Cell	Bio-Rad
Brutroller	Eigenbau	
Elektrophoreseapparatur	i-Mupid Mini-PROTEAN Gelkammer II	Cosmo Bio Co. Bio-Rad
Feinwaage	2004MP	Sartorius
Fluoreszenzphotometer	Luminescence Spectrometer LS 50B	Perkin Elmer
Inkubationsschüttler	Infors HT	Infors
Luminograph	EG&G	Berthold
PCR-Automaten	ep gradient, ep gradient S	Eppendorf
pH-Meter	766 Calimatic	Knick
Spannungsgeber	PowerPAC 300	Bio-Rad
Spektralphotometer	Biochrom Ultraspec II	LKB
Thermoblock/Mixer	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Ultraschallgerät	Sonifier 250	Branson
Vakuumzentrifuge	Univapo 150H	Uniequip
Video-/Photodokumentation	Eagle Eye II Stella 2000	Stratagen RayTest
Zentrifugen	Mikro200	Hettich

	Biofuge pico Rotina 35R	Heraeus Hettich
Spektroradiometer	FieldSpec 3	ASD-Inc.
<i>"french-press"</i>	<i>"french press cell disruptor"</i> <i>"french press cell 40k"</i> (1'' Stempelquerschnitt)	Thermo Thermo
Microarray Lesegerät	GenePix 4000B Microarray Scanner	Molecular Devices
Schwingmühle	Silamat S6	ivorclar / vivadent
Leuchtdiodenplatinen	Blaulichtdioden NSSB100BT Infrarotdioden SFH 4257	INSTA Nischia Osram

2.9. Mikrobiologische Methoden

2.9.1. Anzucht von Bakterien

2.9.1.1. Anzucht von *Escherichia coli*

E. coli wurde, wenn nicht anders angegeben, auf LB-Agarplatten (Kap.2.4.1.2) oder in LB-Flüssigmedium (Kap.2.4.1.1) 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, Kap.2.8), größere Volumina in Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen max. 1/10 des Gefäßvolumens) auf einem Inkubationsschüttler (120 UpM, Kap. 2.8) 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 beimpft, die einer OD₅₈₀ von 0,05 entsprach. Die Zelldichte einer Kultur wurde durch Trübungsmessung mit Hilfe eines Spektralphotometers (Tab. 2.8) bei einer Wellenlänge von 580 nm gemessen (OD₅₈₀ = 1 entspricht ca. 2 × 10⁹ Zellen pro ml Kultur). Für Gefrierkulturen wurden 1,8 ml einer ÜK mit 138 µl DMSO vermischt und bei -80°C gelagert.

2.9.1.2. Phototrophe Anzucht von *Rhodobacter capsulatus* (Klipp et al., 1988)

R. capsulatus wurde vorzugsweise anaerob im Licht (photoheterotroph) angezogen. Die anaerobe Anzucht erfolgte als Einzelkolonieausstrich auf Festmedium (Kap.2.4.1.4) oder im Flüssigmedium (Kap.2.4.1.5) in Eppendorfreaktionsgefäßen (EPG) (bis 1,5 ml) in einem speziellen Anaerob-Inkubationstopf unter Verwendung des Gas-Pack Anaerobic-Systems (BD). Größere Kulturvolumina wurden in gasdicht verschließbaren Kulturgefäßen ("*hungates*"), die mit Hilfe eines im Deckel befindlichen Septums mit Argon bzw. Stickstoff begast werden konnten, angezogen. Unter diesen Wuchsbedingungen wurde *R. capsulatus* für mehrere Tage im Starklicht (sechs Glühbirnen a 60 W; entspricht 2500 lux) oder zwischen Dioden mit Emissionsmaxima bei den Wellenlängen 465 nm nach Herstellerangaben und 850 nm nach Herstellerangaben inkubiert.

2.9.1.3. Anzucht von *R. capsulatus* für Microarray-Analyse

Für die Anzucht von *R. capsulatus* für die Microarray-Analyse wurden die Kulturen in einem Volumen von 10 ml in gasdicht verschließbaren Kulturgefäßen unter anaeroben Bedingungen in RCV-Minimalmedium angezogen. Aus einer Vorkultur wurden Zellen entnommen, mit RCV-Minimalmedium gewaschen und mit einer OD₆₆₀ von 0,05 inokuliert. Im weiteren Verlauf wurde

bei einer OD_{660} von 1,4 bis 1,8 Zellmaterial entnommen, welches mit RCV-Minimalmedium gewaschen wurde und wiederum für die Inokulation, bei einer OD_{660} von 0,05, eines Kulturgefäßes genutzt wurde. Bei einer OD_{660} von 1,4 bis 1,8 wurden die Zellen geerntet. Dieses Verfahren sollte sicherstellen, dass die Zellen für ca. 8-10 Generationen ständig unter den entsprechenden Versuchsbedingungen und in der logarithmischen Wachstumsphase verblieben.

2.9.1.4. Induzierte Genexpression in *Rhodobacter capsulatus* (Katzke *et al.*, 2010)

Zur Expression T7-Promoter-kontrollierter Gene in Expressionsplasmiden in *R. capsulatus* B10ST7 wurden die Zellen bei 30°C unter Selektionsdruck in RCV-Minimalmedium (Kap.2.4.1.6) bis zu einer Zelldichte inkubiert, die einer OD_{660} von 1,0 entsprach. Die Induktion der Expression erfolgte dann durch Zugabe von Fructose in einer Endkonzentration von 10 mM.

2.9.2. Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA (Hanahan, 1983)

2.9.2.1. Herstellung chemisch-transformationskompetenter *Escherichia coli* Zellen

LB-Medium (Kap.2.4.1.1) wurde mit 0,04 Volumen Magnesium-Mix (Kap.2.6.3) versetzt und mit der Menge einer *E. coli*-ÜK auf eine Zelldichte entsprechend einer OD_{580} von 0,05 inokuliert. Die Kultur wurde bei 37°C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{580} = 0,5-0,8$) auf einem Schüttler (200 UpM, Kap.2.8) angezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 6000 UpM, Rotina R35, 4°C) geerntet. Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Sediment in ½ Volumen eiskaltem TMF-Puffer (Kap.2.6.3) resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min, 6000 UpM, Rotina R35, 4°C) wurde das Pellet in 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.

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

Zur Transformation wurden 200 µl transformationskompetente Zellen (Kap.2.9.2.1) mit dem Ansatz einer vorausgegangenen Ligation (Kap.2.11.5) oder ca. 100 ng isolierter Plasmid-DNA vermischt, mindestens 30 min auf Eis inkubiert, und anschließend für 90 s bis 120 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach direkter Zugabe von 700 µl LB-Medium (Kap.2.4.1.1) 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 aus-

plattiert. Der restliche Ansatz wurde zentrifugiert (3 min, 10000 UpM, TZ, RT), das Pellet in 100 μ l LB-Medium resuspendiert und auf einer weiteren Selektivagarplatte ausplattiert. Als Negativkontrolle wurden transformationskompetente Zellen ohne zugegebene Plasmid-DNA ausplattiert.

2.9.3. Konjugativer Plasmidtransfer mobilisierbarer Plasmide von *E. coli* nach *R. capsulatus* (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* erfolgte durch Konjugation (Filterkreuzung) mit dem Stamm *E. coli* S17/1 (Transferfunktion lokalisiert im Chromosom, *tra*-Gene). Mit Hilfe der Konjugation wurden Plasmide nach *R. capsulatus* transferiert, die stabil repliziert werden konnten. Für die Kreuzung wurde der Rezipient von einer frischen anaeroben Stammplatte in 5 ml RCV+N (Kap.2.4.1.6) überführt und über Nacht bei 30°C auf einem Brutroller resuspendiert. Der Donorstamm *E. coli* S17/1 wurde über Nacht selektiv bei 37°C auf Festmedium (Kap.2.4.1.2) angezogen. Anschließend wurden Einzelkolonien in der logarithmischen Wachstumsphase von der Donorplatte geerntet und in 2 ml PY-Medium (Kap.2.4.1.5, ohne FeSO₄) resuspendiert. Anschließend wurde 1 ml der *R. capsulatus* Rezipientenkultur in der stationären Wachstumsphase mit 0,5 ml *E. coli* S17/1 Kultur vorsichtig gemischt und in einem EPG durch Zentrifugation (10 min, 13000 UpM, TZ, RT) pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Sediment im Rücklauf vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Nitrozellulosefilter (Schleicher und Schuell, OE 66, Porendurchmesser 0,2 μ m) bei 30°C auf PY-Agarplatten inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Filter in 1 ml RCV+N gegeben und die Konjugation durch starkes Schütteln (Vortexer) beendet. Die Bakterien wurden in dieser Weise auch vom Kreuzungsfilter abgelöst, so dass die Bakteriensuspension auf Selektivagar-Platten aufgetragen und 3 bis 4 Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert werden konnte.

2.10. DNA/RNA-Techniken

2.10.1. Standard-Präparation von genomischer DNA

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 $\ddot{U}K$ wurden 2 ml entnommen und die Bakterienzellen durch Zentrifugation (3 min, 13000 UpM, TZ, RT) geerntet. Nach vollständigem Entfernen des Kulturüberstandes wurde das verbliebene Sediment in 300 μ l Mix I (Kap.2.6.1) resuspendiert und für 1 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Anschließend wurden 300 μl Mix II (Kap.2.6.1) hinzugegeben, das Gemisch vorsichtig mehrmals invertiert und für max. 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 μl Mix III (Kap.2.6.1) und 10 min Inkubation auf Eis wurden die entstandenen Protein-SDS-Präzipitate, die gefällte chromosomale DNA sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation (15 min, 13000 UpM, 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 (Kap.2.10.3) wurde die Plasmid-DNA in 30-50 μl A. dest. oder 0,1-fach TE-Puffer (Kap.2.6.1) 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.

2.10.2. Standard-Präparation von Plasmid-DNA (Birnboim & Doly, 1979)

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.

2.10.3. 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 (Kap.2.10.1) gewonnener Plasmid-DNA, wurde zur Reinigung eine Isopropanolfällung durchgeführt. Die DNA-haltige, wässrige oder salzige Lösung wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol (absolut) versetzt, gut durchmischt und dann zur Sedimentation der präzipitierten DNA zentrifugiert (30 min, 13000 UpM, TZ, RT). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Sediment mit 400 μl 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 13000 UpM, 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 (Kap.2.6.1) aufgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.10.4. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte in Agarosegelen (Kap.2.11.2) anhand der entsprechend gelagerten Banden des Molekulargewichtsstandards ("*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*", Fermentas). Alle Banden des Molekulargewichtsstandards enthalten eine vom Hersteller definierte Menge an DNA.

2.10.5. Standard-Präparation von RNA

Die RNA-Präparation wurden nach Anweisung des Herstellers mit dem "RNEasy Mini Kit" der Firma QIAGEN unter Verwendung der vom Hersteller mitgelieferten Puffer isoliert. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde der Zellaufschluss mit Glasperlen von 0,1 mm bis 0,25 mm Durchmesser mechanisch durchgeführt. Dazu wurde das Zellmaterial in 700 μ l RTL-Puffer aufgenommen und in 1,5 ml Eppendorfgefäßen mit 250 mg der Glasperlen gegeben und mit einem Silamat S6 fünf mal für jeweils 30 Sekunden geschüttelt. Zwischendurch wurden die Eppendorfgefäße auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Mischung zentrifugiert, der Überstand abgenommen, mit 500 μ l Ethanol versetzt und auf die Eppendorf RNeasy-Kit Säulchen gegeben. Im Folgenden wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen.

Nach der Elution wurde ein DNase-Verdau mit dem "RQ1 RNase-Free DNase" Kit der Firma Promega vorgenommen und die RNA erneut mit dem "RNeasy Mini Kit" der Firma QIAGEN gereinigt.

2.10.6. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA Konzentration wurde photometrisch mit einem Eppendorf Biophotometer bei einer Wellenlänge von λ 260 nm bestimmt, die Verunreinigung über das Verhältnis der Absorption λ 260/ λ 280 (Proteinverunreinigung) und λ 260/ λ 230 (Lösemittelverunreinigung).

2.10.7. cDNA-Synthese und Markierung

Die cDNA-Synthese wurde mit der Superscript II Reversen-Transkriptase der Firma Invitrogen vorgenommen. Für die Markierung wurden Cyaninfluoreszenzfarbstoff gekoppelte cUTP's der Firma GE Healthcare UK Limited verwendet, wobei die jeweils zwei zu vergleichenden Proben mit unterschiedlichen Cyaninfluoreszenzfarbstoffen markiert wurden. Die cDNA Reaktionsansätze wurden auf Eis pipettiert und anschließend bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Die Reaktionen wurden für 110 min bei 42°C vorgenommen und anschließend mit 10 μ l einer 0,1 M

NaOH Lösung, durch Inkubation bei 70°C für 10 min gestoppt. Die Neutralisierung erfolgte im Anschluss mit 10 μ l einer 0,1 M HCl Lösung.

cDNA Reaktionsansatz

Matrizen-RNA	14 μ l (20 μ g - 25 μ g)
Cy3- oder Cy5-dUTP's	3 μ l
Superscript II Reverse-Transkriptase	2 μ l
dNTP - Mix	0,6 μ l
0,1M DTT	3 μ l
5-fach FirstStrand-Puffer	6 μ l

dNTP-Mix

dATP	2 μ l
dCTP	2 μ l
dGTP	2 μ l
dTTP	0,8 μ l
H ₂ O	1,2 μ l

Im Anschluss an die cDNA-Synthese- und Markierungsreaktion erfolgte die Reinigung, Konzentration und Zusammenführung der cDNA-Proben (Cy3 und Cy5 markierte cDNA) mit Nanosep 30k OMEGA - Säulen der Firma PALL - Life Science.

2.10.8. DNA-Microarray

Bei den Microarray-Objektträgern handelte es sich um "Custom-Gen-Expression" Microarrays der Firma Agilent. Ein Microarray-Objektträger umfasst dabei vier Arrays mit jeweils 44000 Hybridisierungsfeldern. Auf den einzelnen Arrays befanden sich Oligonukleotide für die *R. capsulatus* Gene, wobei jeweils zwei Hybridisierungsfelder pro annotiertem *R. capsulatus* Gen vorhanden waren. Die Oligonukleotide wurden nach der Sequenz des *R. capsulatus* Stamms SB1003, welcher in der NCBI-Genomdatenbank hinterlegt ist, ausgewählt.

Die Cy3 und Cy5 markierte cDNA wurde mit 11 μ l 10-fach "Blocking Agent" der Firma Agilent versehen und der Ansatz mit Wasser auf ein Volumen von 55 μ l eingestellt. Anschließend wurden 55 μ l 2-fach Hybridisierungspuffer hinzugegeben und der Microarray mit der Lösung beladen. Der Microarray wurde für 17 Stunden bei 65°C und unter ständigem Rollen inkubiert und damit die cDNA an den entsprechenden Ziel-Oligonukleotiden hybridisiert.

Nach der Hybridisierung wurde der Microarray-Objektträger zunächst mit Wasser und zweimal mit einem Waschpuffer der Firma Agilent gewaschen. Anschließend wurde der Microarray-

Objektträger wiederum mit Wasser gewaschen und mittels Zentrifugation bei 500 Upm für 1 min getrocknet. Das Auslesen der Daten erfolgte an einem Microarray Lesegerät der Firma Molecular Devices („GenePix 4000B Microarray Scanner“), mit der Software GenePix Pro 7.0 der selben Firma.

2.11. *In vitro* Rekombination von DNA

2.11.1. Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (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 bei 37°C (Ausnahme: *Sma*I bei 30°C) inkubiert. Zur Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen vor Ligationsreaktionen (Kap.2.11.5) wurden die Ansätze für 20 min bei 65°C (Ausnahme bei *Bam*HI: 80°C) inkubiert. Nicht hitzeinaktivierbare Restriktionsenzyme wurden nach dieser Hitzebehandlung eingefroren und erneut hitzebehandelt oder durch Agarosegelelektion von der restringierten DNA separiert.

2.11.2. Agarosegelelektrophorese (Sambrook & Russell, 2001)

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Trennverfahren, das auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten verschieden großer, geladener Moleküle im elektrischen Feld beruht. Nukleinsäuren, die aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats ein konstantes Masse-Ladungsverhältnis besitzen, wandern durch ihre negative Ladung im elektrischen Feld zur Anode. Dabei hängt ihre Wanderungsgeschwindigkeit vom Molekulargewicht der DNA Fragmente, ihrer Konformation, der Konzentration des Agarosegels und der Stärke des elektrischen Feldes ab. Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA-Restriktionen (Kap.2.11.1) und PCR-Reaktionen (Kap.2.11.6), zur präparativen Isolierung bestimmter DNA-Fragmente (Kap.2.11.3) und bei der Mengenabschätzung von DNA (Kap.2.10.4) 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 (Kap.2.6.2) 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 ($\lambda = 254\text{-}366\text{ nm}$). 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 (Tab. 2.8).

2.11.3. Elution von DNA aus Agarosegelen (Vogelstein & Gillespie, 1979)

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen nach DNA-Restriktionen (Kap.2.11.2) wurde das "*Perfectprep Gel-Cleanup-Kit*" der Firma Eppendorf nach Herstellerangaben mit den mitgelieferten Puffern verwendet.

2.11.4. Ligation von Vektor- und Fragment-DNA (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 bis 50 μl wurden die Fragment-DNA und die Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von mindestens 3:1 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. Die Ligationsreaktion wurde dann 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 (Kap.2.9.2.2) wurden die Ligationsansätze im Verhältnis 1:10 mit TMF-Puffer (Kap.2.6.3) verdünnt, um die Konzentration des im Ligasepuffers befindlichen β -Mercaptoethanols herabzusetzen.

2.11.5. Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) (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 darauffolgenden 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 Oligonukleotidprimer (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 Amplifikation wurden die in (Kap.2.5.2) angegebenen Polymerasen verwendet, die mit Ausnahme der "MasterTaq"-Polymerase 5'→3' Exonuklease-Aktivität ("Proofreading") aufwiesen.

Standard-PCR Ansatz

Oligonukleotidprimer I	100 pmol
Oligonukleotidprimer II	100 pmol
Polymerasepuffer	1xPuffer
dNTP Mix	2,5 mM
DMSO	6% (v/v)
Matrizen-DNA	~50 ng
Polymerase	1,0-3,5 U
A. dest.	ad 20 µl

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

Standardprogramm für die PCR mit *Pfu*-Polymerase

Initiale Denaturierung	98°C, 10 min
Denaturierung	98°C, 1 min
Hybridisierung	T_M , 1 min
Elongation	72°C, 2 min/kb
Terminale Elongation	72°C, 10 min

Die Schritte Denaturierung, Hybridisierung und Elongation wurden zyklisch 35 mal durchlaufen. Die Hybridisierungstemperatur T_M (Richtwert: $[T_{M1} + T_{M2}]/2 - 5^\circ\text{C}$) richtete sich nach den Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotidprimer (T_{M1} und T_{M2}). Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge der verwendeten DNA-Matrize (2 min pro kb Matrizenlänge). Beim Einsatz der MasterTaq-Polymerase oder des TripleMaster-PCR-Systems (beide Eppendorf) wurde nach Herstellerangaben und mit den mitgelieferten Reagenzien verfahren. PCR-Produkte wurden mit Hilfe von Agarosegelelektrophoresen (Kap.2.11.2) analysiert.

2.11.6. Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte entweder direkt aus dem Ansatz oder mittels Agarosegelelektion (Kap.2.11.3), wenn das gewünschte PCR-Produkt zunächst von unerwünschten Artefakten separiert werden musste. In beiden Fällen wurde die Reinigung mittels *"Perfectprep Gel Cleanup Kit"* der Firma Eppendorf durchgeführt.

2.12. Proteinchemische Methoden

2.12.1. Gesamtproteinisolierung für SDS-PAGE

Zur Gewinnung eines zellfreien, denaturierten Proteinlysats wurde der zu untersuchende *Escherichia coli* Stamm in 5 ml LB-Selektivmedium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Von dieser Kultur wurden 1,5 ml nach Bestimmung der OD_{580} für 3 min zentrifugiert (13000 UpM, TZ, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 1-fach Sammelgelpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut 3 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 μ l SDS-Probenpuffer resuspendiert (Vortexer). Die Proteinproben wurden 10 min bei 99°C und 1400 UpM (Eppendorf Thermomixer) denaturiert. Zelltrümmer wurden durch anschließende Zentrifugation bei 13000 UpM sedimentiert und der Überstand in ein neues EPG überführt. Die Proteinextrakte konnten bei -20°C bis zur Verwendung gelagert werden.

Zur Gewinnung eines zellfreien, denaturierten Proteinlysats wurde der zu untersuchende *Rhodobacter capsulatus* Stamm je anaerob (Kap.2.9.1.3) in Flüssigkultur bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Nach Bestimmung der OD_{660} wurde analog zur Proteinisolierung aus *E. coli* (Kap.2.12.1) verfahren, lediglich die Zentrifugationszeiten wurde auf 10 min erhöht.

2.12.2. Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (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 und die Protein-SDS-Komplexe erhalten eine negative Ladung. Die Protein-SDS-Komplexe wurden während der Elektrophorese auf Grund ihres ähnlichen Masse-/Ladungsverhältnis nach ihrer Molekülgröße getrennt. Die Protein-SDS-Komplexe wurden in einem Sammelgel (4% (v/v) Acrylamid) fokussiert und anschließend in einem Trenngel (15% (v/v) Acrylamid) ihrer Molekülgröße nach aufgetrennt. Die Proteinproben (Kap.2.12.1) wurden 5-10 min bei 99°C inkubiert und auf ein 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.

2.12.3. Coomassie-Färbung zur Proteindetektion (Merril, 1990)

Die Färbung von SDS-PAGE-Gelen (Kap.2.12.2) in Coomassie Brilliant Blau-Färbelösung (Kap.2.6.4) 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. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage (Tab.2.8). 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.

2.12.4. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Die durch SDS-PAGE (Kap.2.12.2) 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 (Kap.2.6.5) 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.

2.12.5. 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 (Kap.2.5.1), das einen Komplex mit dem nachzuweisenden Protein bildete. Mit Hilfe eines Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten (HRP-Konjugat, Kap.2.5.1) sekundären Antiserums, das an den primären Antikörper bindet und unter Verwendung des *"Enhanced-Chemo-Luminescence-Western-Blotting-Detektionssystem"* (Kap.2.7) der Firma Amersham erfolgte die Visualisierung. Dabei wurde durch eine Peroxidase-katalysierte Reaktion Chemolumineszenz erzeugt, die lumino-graphisch (Tab.2.8) gemessen wurde. Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese für 1 h bei 30°C mit TBST-Puffer (Kap.2.6.5) mit 5% (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 primären Antikörper (Kaninchen-Anti-NifH $1/50000$ in TBST) bei 30°C leicht geschüttelt. Nach zweimaligem 25 min Waschen mit TBST-Puffer bei 30°C und Bewegung wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-HRP-Konjugat $1/5000$ in TBST) für eine Stunde unter Schütteln

inkubiert. Durch zweimaliges 25 min Waschen in TBST-Puffer wurde der nicht gebundene Zweitantikörper entfernt. Das auf der Membran gebundene Protein konnte anschließend indirekt über die an den Zweitantikörper gebundene HRP mit Hilfe des ECL Systems nachgewiesen werden. Dieses wurde nach den Herstellerangaben verwendet, wobei die Dokumentation mittels Stella3200 der Firma Raytest erfolgte.

Für den Nachweis von Strep II-Tag markierten Proteinen wurde das "Strep-Tactin HRP conjugate" Kit der Firma IBA verwendet und nach Herstellerprotokoll verfahren.

2.12.6. Färbung von PVDF-Membranen

Nach der luminographischen Detektion der Proteine wurden diese zusätzlich auf der PVDF-Membran angefärbt. Dazu wurde die Membran 15 min in TBST-Puffer gewaschen und 30 min in Amidoschwarz-Färbelösung (Kap.2.6.5) inkubiert. Die Membran wurde anschließend über Nacht an der Luft getrocknet.

2.12.7. Proteinisolierung mittels "french-press"

Die Zellen wurde für die Anwendung der "french-press" bei 5000 Upm für 20 min zentrifugiert und anschließend in 30 ml Tris/HCl Puffer aufgenommen. Der Zellaufschluss der 30 ml Zellsuspension per "french-press" erfolgte bei einem konstanten Druck von 600 psi.

2.12.8. Proteinseparation mittels Strep II-Tag - Affinitätschromatographie

Die Proteinseparation der Strep II-Tag markierten Proteine wurde mit dem Strep-Tactin Säulenmaterial und an Hand des Protokolls der Firma IBA durchgeführt. Dabei wurde die Strep-Tactin Säule zunächst mit 5 Säulenvolumen Equilibrierungspuffer (Kap.2.6.6) euilibiert. Danach wurde die Proteinlösung auf die Säule gegeben und anschließend mit 3 Säulenvolumen Waschpuffer (Kap.2.6.6) ungebundene Proteine von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte mit 12 ml Elutionspuffer (Kap.2.6.6). Das Eluat wurde zu je 2 ml in sechs 2 ml Eppendorfgefäßen aufgefangen. Anschließend wurde die Säule mit 3 Säulenvolumen Regenerationspuffer gewaschen und für die Lagerung bei 4°C mit 3 Säulenvolumen in 20 % Ethanol überführt.

2.13. Messung der Lichtintensität von 60 W Glühbirnen und des Leuchtdiodenfeldes der Firma INSTA

Die Messung der Lichtintensität wurde mit dem FieldSpec 3 Photoradiometer der Firma ASC Inc. vorgenommen. Als Messkopf wurde eine Si-Photoelektrode für den Wellenlängenbereich von 350 nm bis 1050 und InGaAs Photodioden für den Wellenlängenbereich von 1000 nm bis 2500 verwendet. Das FieldSpec 3 dabei eine Auflösung von max. 1,4 nm im Bereich von 350 nm -1050 nm und 2 nm im Bereich von 1000 nm – 2500 nm. Das Gerät gibt die Lichtintensität in W/cm² pro Wellenlänge wieder.

2.14. Computerprogramme und Datenbanken

Die Erstellung von Klonierungsstrategien und das Anpassen der Kodonverwendung modifizierter Gene erfolgte unter Verwendung des Programms Clone Manager 7.0 / 9.0 (Scientific & Educational Software). Die Auswertung tabellarischer Daten, wie photometrische Messungen oder Microarraydaten, erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2003/2007 (Microsoft). Für die Sequenz- und Datenbank-Recherchen im Internet wurden folgende Adressen verwendet:

National Center for Biotechnological Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
ExPASy Molecular Biology Server	http://www.expasy.org
Integrated Genomics ERGO™	http://www.ergo-light.com/

3. ERGEBNISSE

3.1. Verwendung von Leuchtdioden für die phototrophe Kultivierung und biotechnologische Nutzung von *Rhodobacter capsulatus*

R. capsulatus ist eines der am besten untersuchten phototrophen Bakterien im Bezug auf die Stickstofffixierung und deren Regulation (Drepper et al., 2003; Masepohl & Hallenbeck, 2010; Raabe et al., 2002), die Photosynthese und deren Regulation (Gregor & Klug, 1999; Wu & Bauer, 2010) und die Hydrogenaseaktivität (Elsen et al., 1996; Elsen et al., 2000; Elsen et al., 2003). Die Physiologie von *R. capsulatus* bietet ein großes Potential für die biotechnologische Anwendung zur Synthese bestimmter Proteine, die mit den gängigen Expressionssystemen nicht oder nicht vollständig möglich ist (Drepper et al., 2005; Pawlik et al., 2010; Roy et al., 2008; Wang et al., 2009) wie z.B. Membranproteine und Proteine mit Metall-Kofaktoren. Ebenso kann *R. capsulatus* in der Ganzzellbiokatalyse für die Herstellung von Chemikalien und Feinchemikalien, wie z.B. Carotinoiden, dienen (Hunter et al., 1994).

Um bei wissenschaftlichen Untersuchungen grundsätzlich reproduzierbare Bedingungen zu gewährleisten, müssen die Bakterien unter definierten Bedingungen angezogen werden. Da *R. capsulatus* für die Expression von Membran- und Redoxproteinen vorrangig unter phototrophen Bedingungen angezogen wird, müssen die Lichtbedingungen ebenso definiert sein wie andere Faktoren, z.B. die Temperatur und das Medium. Um einen entsprechend hohen Ertrag bei der Produktion von Feinchemikalien zu erlangen, müssen optimale Bedingungen für Biomasseaufbau und heterologe Expression in *R. capsulatus* gerade unter phototrophen Bedingungen gewährleistet sein.

Die Verwendung von Glühbirnen bei der Anzucht von *R. capsulatus* ist bislang die gängige Methode bei der phototrophen Anzucht. Die Nachteile bei der Verwendung von Glühbirnen liegen in der geringen Lichtausbeute und Energieeffizienz, bei der Temperaturentwicklung und geringen Lebensdauer der Glühbirnen. Glühbirnen besitzen, entsprechend der verwendeten Materialien und ihrem Aufbau, ein bestimmtes Emissionsspektrum, es ist dennoch nicht möglich die Emission auf bestimmte Wellenlängenbereiche zu begrenzen, ohne durch die Verwendung von Filtern die Lichtintensität extrem herabzusetzen. Diese Nachteile können durch die Verwendung von Leuchtdioden umgangen werden. Leuchtdioden haben eine hohe Lichtausbeute und Energieeffizienz und die Temperaturentwicklung ist in erheblichem Maße geringer als bei Glühbirnen, bei längerer Lebensdauer. Zudem sind die Wellenlängen bei denen die Leuchtdioden emittieren genau definiert und über einen Bereich von ~250 nm bis ~1000 nm nahezu frei wählbar.

3.1.1. Bestimmung der Absorption der Photopigmente in *R. capsulatus* Zellen und Bestimmung der Emission der verwendeten Leuchtdioden

Die physikalischen Vorteile der Leuchtdioden sollten für die phototrophe Anzucht von *R. capsulatus* genutzt werden, zu diesem Zweck sollte bestimmt werden, welche Art der Leuchtdioden, in Bezug auf ihre Wellenlänge, und in welcher Weise zum Einsatz kommen. Dabei wurde zunächst die Absorption der Photopigmente des *R. capsulatus* B10S Zellen bestimmt, um anschließend die entsprechenden Leuchtdioden auswählen zu können.

R. capsulatus absorbiert durch das Carotinoid Sphaeroiden und durch Bakteriochlorophyll *a*, die Photopigmente der Lichtsammelkomplexe I/II und des Reaktionszentrums, Licht bestimmter Wellenlängen. Durch eine photometrische Absorptionsmessung sollten die Absorptionseigenschaften der Photopigmente *in vivo* bestimmt werden.

Der Versuch wurde mit dem *R. capsulatus* Wildtyp Stamm B10S (Kap.2.1.2) durchgeführt. Die Kulturen wurden in einem Volumen von 10 ml, in gasdicht verschließbaren Kultivierungsgefäßen, den sogenannten "hungates", unter anaeroben Bedingungen angezogen. Als Nährmedium wurde, in diesem wie auch in allen folgenden Versuchen mit *R. capsulatus*, RCV-Minimalmedium (Kap.2.4.1.3) verwendet. Das Minimalmedium eignet sich für die reproduzierbare phototrophe Anzucht von *R. capsulatus* da alle Inhaltstoffe genau definiert sind. Dem RCV-Minimalmedium wurde Malat als Kohlenstoffquelle und L-Serin als Stickstoffquelle zugegeben. Als Lichtquelle für die phototrophe Anzucht wurden handelsübliche 60 W Glühbirnen verwendet.

Die Kulturen wurden mit einer OD_{660} von 0,05 inokuliert und bei einer OD_{660} von 1,0 geerntet. Anschließend wurde die Absorption der Photopigmente in den lebenden Zellen einer 1 ml Zellsuspension bei einer Wellenlänge von 300 nm bis 900 nm in 1 nm Schritten im Photometer gemessen. Abb.3.1 zeigt die Messung einer Dreifachbestimmung im statistischen Mittel, die Standardabweichung lag unter 5% und ist im Diagramm nicht angegeben.

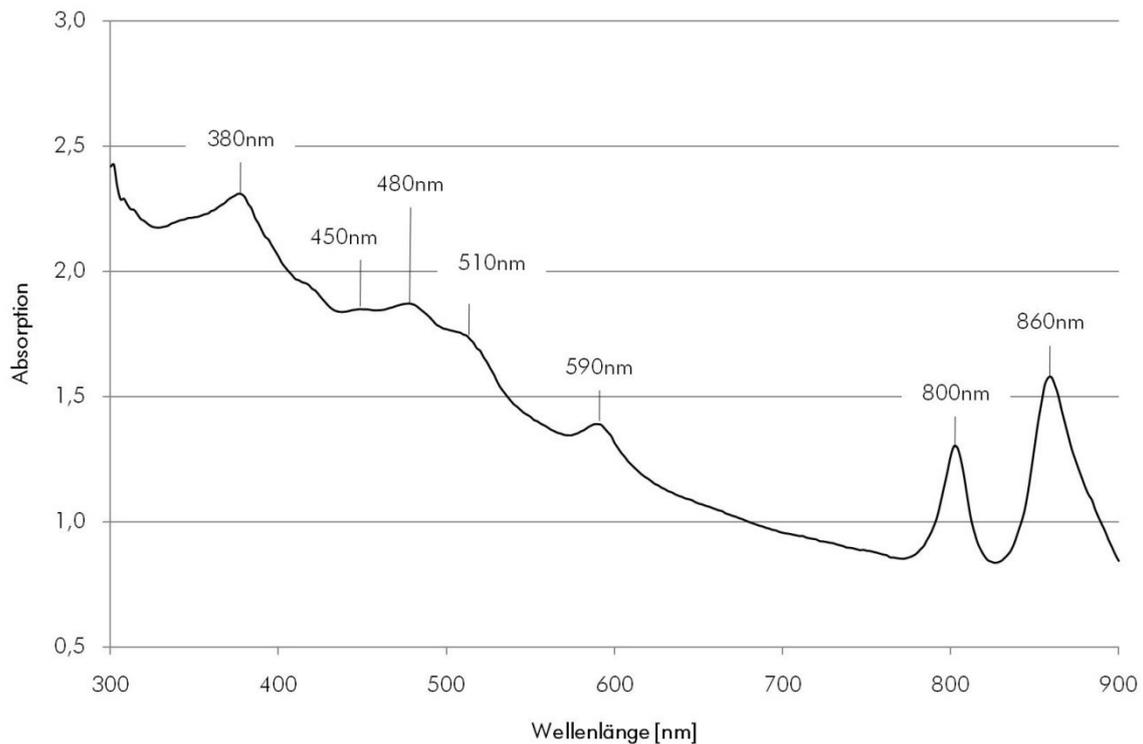


Abb.3.1 Bestimmung der Absorptionsmaxima der Photopigmente in *R. capsulatus* Zellen. Absorptionsspektrum lebender Zellen des *R. capsulatus* Wildtyp Stamms B10S in RCV-Minimalmedium unter photoheterotrophen Anzuchtbedingungen. Für die Messung wurde jeweils eine Zellsuspension mit einer OD₆₆₀ von 1,0 eingesetzt. Das Diagramm zeigt den Mittelwert einer Dreifachbestimmung. Die Standardabweichung lag unter 5%. Markiert sind bei 380 nm, 590 nm, 800 nm und 860 nm die einzelnen Absorptionsmaxima des Bakteriochlorophyll *a* und bei 450 nm, 480 nm und 510 nm die einzelnen Absorptionsmaxima des Sphaeroidens.

Die physiologisch relevanten Wellenlängen des Bakteriochlorophyll *a* liegen im Bereich zwischen 775 nm und 880 nm, die Absorptionsmaxima bei 860nm, 800nm, 590 nm und 380 nm resultieren aus den verschiedenen Anregungszuständen des Bakteriochlorophyll *a* sind aber nicht physiologisch relevant. Das Sphaeroiden absorbiert bei 450nm, 480 nm und 510 nm.

Strahlung, welche für *R. capsulatus* photosynthetisch nutzbar ist, liegt im Bereich der Wellenlängen 435-535 nm für die Carotinoide und im Bereich von 775-880 nm für das Bakteriochlorophyll *a* (Bauer et al., 2003; Cogdell et al., 2000). Es wurden entsprechende Leuchtdioden gewählt, die in diesen Bereichen emittieren.

Für die optimale Beleuchtung von *R. capsulatus* wurden 240 Leuchtdioden auf einer Platine mit einem Abstand von einem Zentimeter zwischen den Dioden angebracht (s. Abb.3.2). Dabei wurden alternierend Blaulichtdioden (465 nm n. Herst. Ang.) und Infrarotdioden (850 nm n. Herst. Ang.) verwendet, wobei jeweils separate Schaltkreise für die entsprechenden Wellenlängen verwendet wurden. Aufbau, Verschaltung und Herstellung der Dioden-Platinen wurde von der Firma INSTA vorgenommen. Der Aufbau der Dioden-Platinen dient der Erstellung eines großen Leuchtfeldes

(25 cm x 25 cm) für die phototrophe Anzucht von *R. capsulatus*. Durch die Verschaltung der Leuchtdioden ist es möglich *R. capsulatus* entweder separat mit Blaulicht (465 nm) oder Infrarotstrahlung (850 nm) oder beidem zu beleuchten.

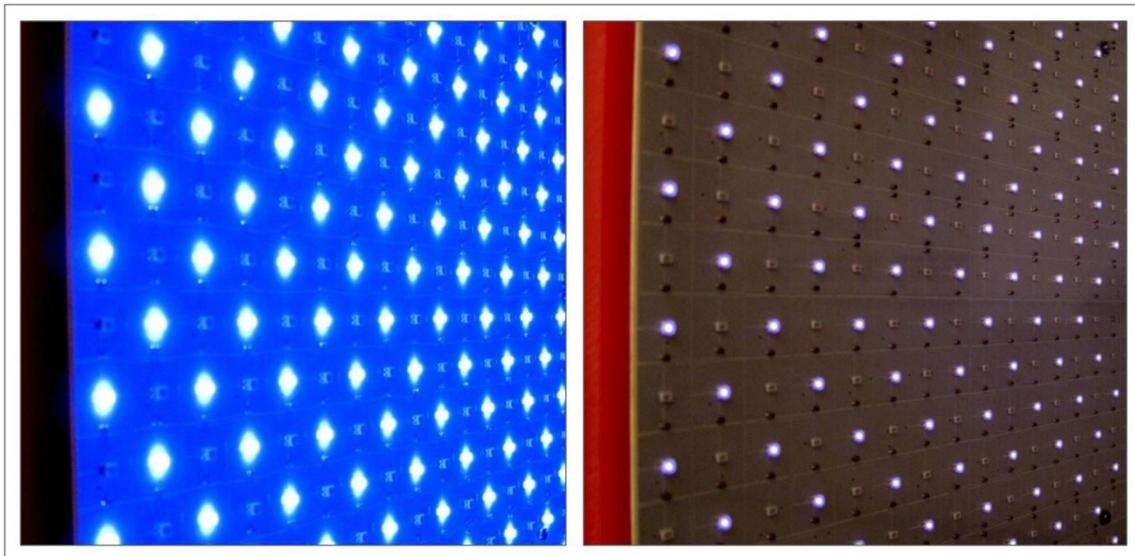


Abb.3.2 Aufbau der Leuchtdioden-Platinen. A. Aufnahme der Dioden-Platinen mit eingeschalteten Blaulichtdioden (465 nm). B. Aufnahme der Dioden-Platinen mit eingeschalteten Infrarotdioden (850 nm). Die Dioden wurden auf die Platinen alternierend und in geringen Abständen angebracht, um eine gleichmäßige Beleuchtung über das gesamte Platinenfeld von 25 x 25 cm zu erreichen. (Die Emission der Infrarotdioden als weiße Punkte sind nur auf Grund der Verwendung einer CCD-Kamera für die Aufnahme als solche sichtbar.)

Um die Unterschiede in den Lichtbedingungen zwischen Glühbirnen und Leuchtdioden-Platinen zu bestimmen, sollte die Emission der verwendeten Leuchtdioden-Platinen und die Emission der 60 W Glühbirnen mit einem FieldSpec 3 Spektroradiometer gemessen werden (Abb.3.3). Die Messung wurde in einem Bereich von 350 bis 900 nm Wellenlänge in 2 nm Schritten durchgeführt. Bei der Messung wurde jeweils im Abstand von 10 cm eine Leuchtdioden-Platine und im Abstand von 25 cm eine Glühbirnenhalterung gemessen, in der drei Glühbirnen im Abstand von 20 cm angebracht sind. Die Abstände, bei denen die Glühbirnen bzw. Leuchtdioden gemessen wurden entsprechen exakt denen, die auch unter Kultivierungsbedingungen gewählt wurden. Für die phototrophe Anzucht von *R. capsulatus* werden standardgemäß sechs Glühbirnen verwendet welche in zwei Halterungen angebracht sind. Die beiden Halterungen haben einen Abstand von ca. 50 cm zueinander und dementsprechend einen Abstand von ca. 25 cm zu den Kulturgefäßen. Durch die geringere Temperaturentwicklung beim Betrieb der Dioden ist es möglich einen geringeren Abstand (10 cm) zwischen Kulturgefäßen und der Lichtquelle zu wählen.

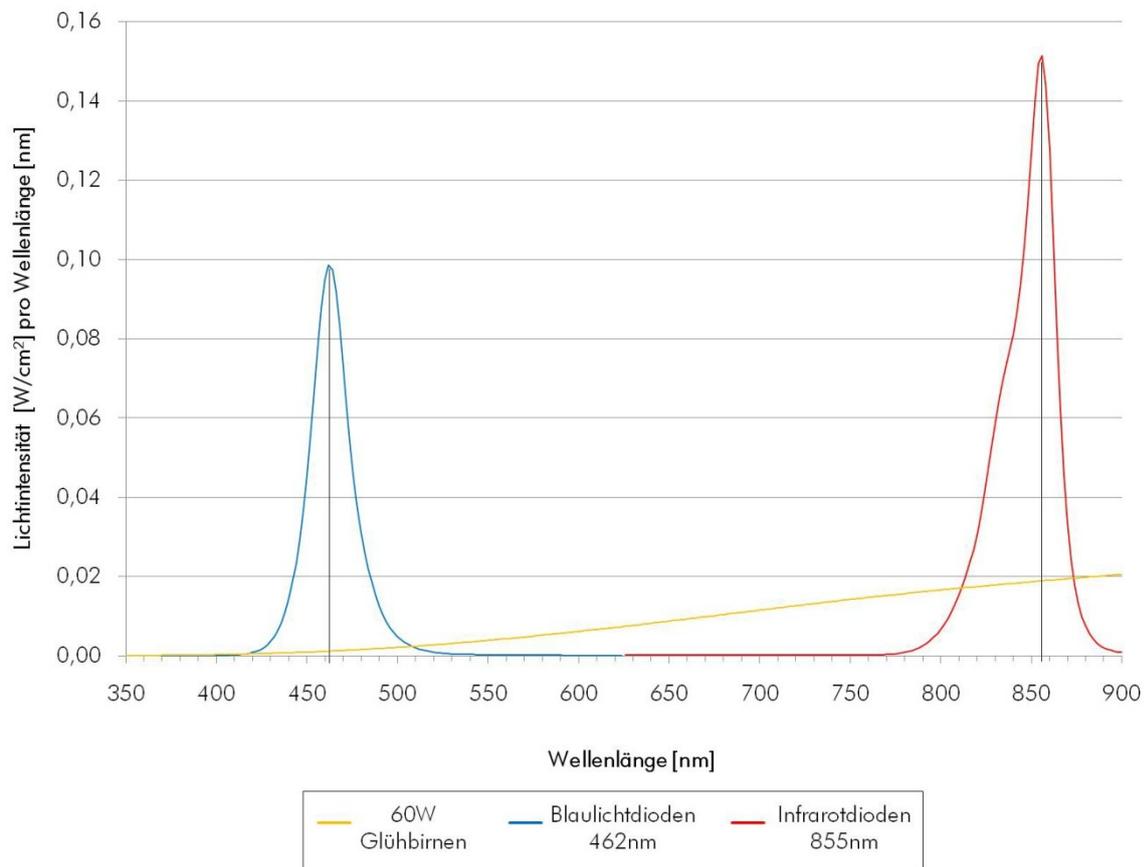


Abb.3.3 Emission von 60 W Glühbirnen, Infrarot- und Blaulichtdioden. Die Messung erfolgte mit einem FieldSpec 3 Spektrometer in einem Wellenlängenbereich von 350 nm bis 900 nm. Die Messung der Leuchtdioden erfolgte in einem Abstand von 10 cm. Die Messung der Glühbirnen erfolgte in einem Abstand von 25 cm. Die Messungen der Leuchtdioden beziehen sich auf die Emission einer Leuchtdioden-Platine mit je 120 Blaulichtdioden und 120 Infrarotdioden. Die Messungen der Glühbirnen beziehen sich auf die in den Versuchen verwendete Glühbirnenhalterung (3 Glühbirnen).

In Abb.3.3 ist die Lichtintensität der Leuchtmittel im Messbereich von 350-900 nm dargestellt. Die Emission der 60 W Glühbirnen erstreckt sich über den gesamten Messbereich von 350-900 nm, wobei die Emission im Rotlicht- (~680-740 nm) und Infrarotbereich (ab 740 nm) am höchsten ist. Die Emission der Dioden zeigt ein deutliches Maximum bei 462 nm für die Blaulichtdioden und bei 855 nm für die Infrarotdioden, bei denen zudem einen Schulter bei 830 nm zu erkennen ist. Die Messung zeigt, dass die Emissionsmaxima der Leuchtdioden leicht von den Angaben der Hersteller abweichen. Die maximale Intensität der von den Leuchtdioden abgegebenen Strahlung ist um den Faktor 5 (Blaulichtdioden) bzw. 7,5 (Infrarotdioden) höher als die der 60 W Glühbirnen. Diese hohe Lichtintensität ist allerdings auf einen sehr geringen Wellenlängenbereich begrenzt. Was aus dem Kurvendiagramm in Abb.3.3 nicht direkt hervorgeht, dass die Lichtintensität der Glühbirnen über den gesamten Wellenlängenbereich der Lichtintensität der Infrarotdioden gleich ist. Wenn man die Werte der Lichtintensität jeder gemessenen Wellenlänge addiert wird dies ersichtlich (siehe Abb.3.4).

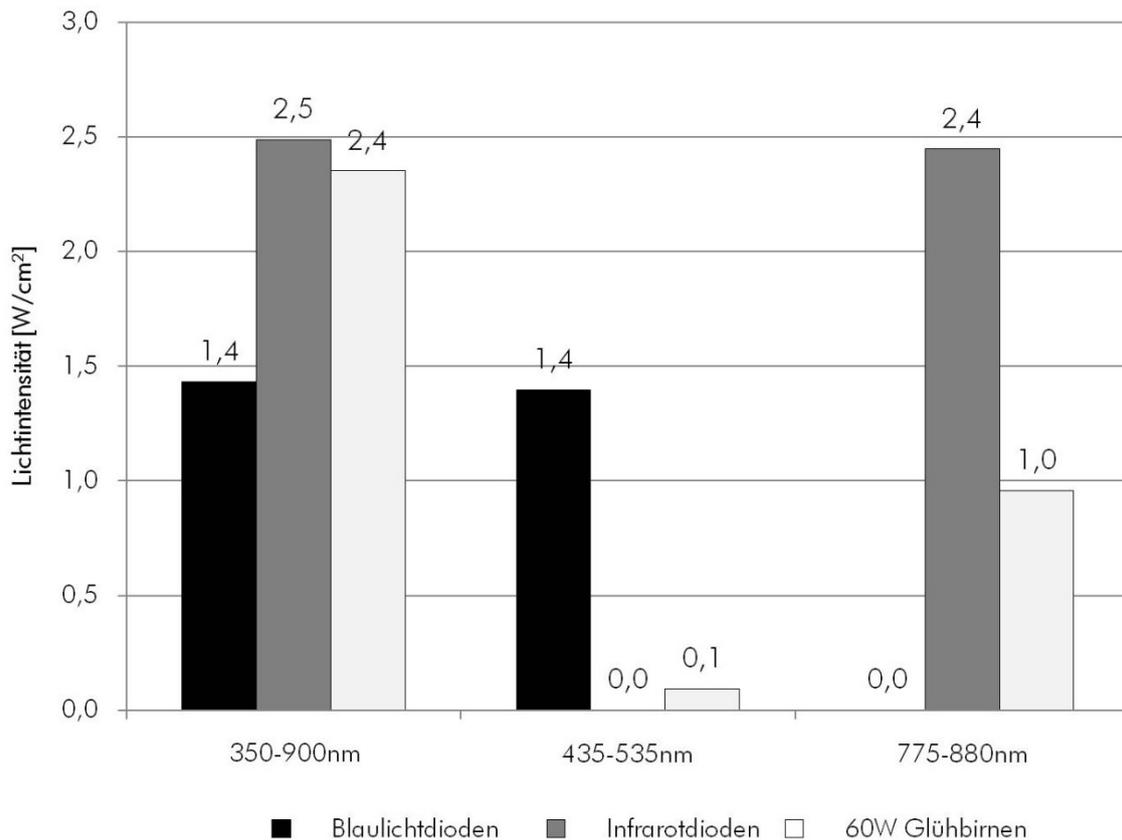


Abb.3.4 Unterschiede in der Lichtintensität der verschiedenen Lichtquellen im physiologisch relevanten Bereich. Lichtintensität von 60 W Glühbirnen, Infrarot- und Blaulichtdioden über den gesamten Messbereich von 350 nm - 900 nm, im Bereich der Carotinoïdabsorption 435 nm - 535 nm, im Bereich der Bakteriochlorophyllabsorption 775 nm - 880 nm. Für die Darstellung der Lichtintensitäten über die genannten Bereiche wurden die Werte der Messungen der einzelnen Wellenlängen addiert und die Summe als Balkendiagramm dargestellt.

In Abb.3.4 ist die Lichtintensität der Leuchtmittel über den gesamten Messbereich von 350 nm - 900 nm, den Absorptionsbereich der Carotinoide von 435 nm - 535 nm und den Absorptionsbereich des Bakteriochlorophylls von 775 nm - 880 nm dargestellt. Die Strahlungsintensität der 60 W Glühbirnen über den gesamten Messbereich von 350 nm - 900 nm ist mit denen der Dioden vergleichbar. Die Emission im Bereich der Absorption des Bakteriochlorophyll α (775 nm - 880 nm) der Infrarotdioden ist um den Faktor 2,6 höher als die der 60 W Glühbirnen (Abb.3.4). Im Absorptionsbereich der Carotinoide ist die Emission der Blaulichtdioden um den Faktor 14,7 höher als die der 60 W Glühbirnen (Abb.3.4).

Bei der Belichtung von *R. capsulatus* mit Leuchtdioden sind zwei unterschiedliche Größen zu betrachten; zum einen die Lichtqualität im Sinne der eingestrahelten Wellenlängen, zum anderen die Lichtquantität. Bei der Lichtquantität muss zudem zwischen der gesamten Lichtintensität und der Lichtintensität in Bereichen physiologisch relevanter Wellenlängen unterschieden werden. Auch wenn die 60 W Glühbirnen über den gesamten Messbereich von 350-900 nm eine ähnlichen

Energieleistung besitzen wie die Leuchtdioden, so haben sie doch in den physiologisch relevanten Bereichen, denen der Absorption der Photopigmente, eine sehr viel geringere Leistung.

3.1.2. Auswirkungen verschiedener Lichtquellen auf das Wachstum von *R. capsulatus*

Im Gegensatz zu den Glühbirnen war es mit den Leuchtdioden erstmals möglich die beiden Licht absorbierenden Pigmente des Photosystems separat anzuregen. Daher sollte zunächst untersucht werden ob *R. capsulatus* in der Lage ist photoheterotroph mit Licht spezifischer Wellenlängen zu wachsen. Anhand der Emission der Dioden und Absorption der *R. capsulatus* Photopigmente sollte durch die jeweiligen Dioden nur jeweils eines der beiden Photopigmente in den Lichtsammelkomplexen angeregt werden, bei Blaulicht das Sphaeroiden und bei Infrarotstrahlung das Bakteriochlorophyll *a*. Ob *R. capsulatus* unter diesen Bedingungen phototroph wachsen kann, sollte durch eine einfache Bestimmung des Wuchsverhaltens unter den verschiedenen Lichtbedingungen getestet werden. Gleichermaßen sollte die Wuchskurve einen ersten Hinweis auf physiologische Veränderungen des *R. capsulatus* unter Beleuchtung mit Infrarot- und Blaulichtdioden geben.

Der Versuch wurde mit dem *R. capsulatus* Wildtyp Stamm B10S (Kap.2.1.2) durchgeführt. Die Kulturen wurden in einem Volumen von 10 ml in gasdicht verschließbaren Kultivierungsgefäßen unter anaeroben Bedingungen angezogen. Als Medium wurde RCV-Minimalmedium (Kap.2.4.1.3) verwendet, welches Malat als Kohlenstoffquelle und L-Serin als Stickstoffquelle beinhaltet. Als Lichtquelle wurden handelsübliche 60 W Glühbirnen und Leuchtdioden verwendet. Dabei wurden die Kulturen zum einen mit 60 W Glühbirnen belichtet, zum anderen wurden die Leuchtdioden-Platinen verwendet. Bei den Leuchtdioden-Platinen erfolgte die Belichtung mit Infrarotdioden, mit Blaulichtdioden und mit Infrarot- und Blaulichtdioden.

Die Kulturen wurden mit einer OD_{660} von 0,05 inokuliert. Im weiteren Verlauf wurden über einen Zeitraum von 68 h Proben á 100 μ l für eine Trübungsmessung zur Bestimmung der Zelldichte entnommen.

Abbildung 3.5 zeigt die Entwicklung der Zelldichte der *R. capsulatus* Zellkulturen unter phototropher Anzucht unter Verwendung verschiedener Lichtquellen. Angegeben ist jeweils der Mittelwert einer Dreifachbestimmung, über einen Zeitverlauf von 68 h als Kurve. Die Standardabweichung ist im Diagramm nicht angegeben und lag im Mittel bei 0,04. Proben wurden nach 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 55, 58 und 68 h entnommen.

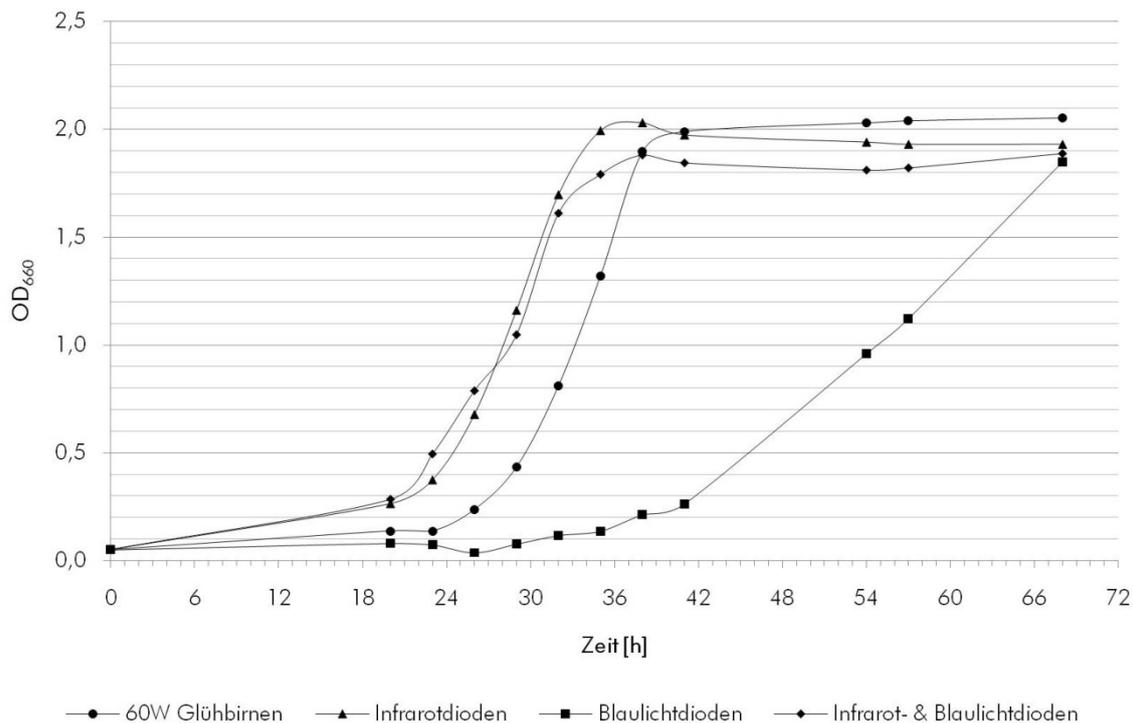


Abb.3.5 Einfluss unterschiedlicher Lichtquellen auf das phototrophe Wachstum von *R. capsulatus*. Zelldichte [OD₆₆₀] des *R. capsulatus* Wildtyps B10S in RCV-Minimalmedium im Zeitverlauf, in einem Kulturvolumen von 10 ml, unter Bestrahlung mit 60 W Glühbirnen, Infrarotdioden, Blaulichtdioden und Infrarot- & Blaulichtdioden. Den Kulturen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten eine Probe von 100 µl für eine Trübungsmessung bei 660 nm zur Bestimmung der Zelldichte entnommen.

In Abb.3.5 ist die Zelldichte [OD₆₆₀] der *R. capsulatus* B10S Wildtyp-Kultur unter verschiedenen Lichtbedingungen über einen Verlauf von 68 h gezeigt. Die Kulturen die mit Infrarotdioden (IR) angezogen wurden erreichten die logarithmische Wachstumsphase nach 18-20 h, während die Kulturen, die mit 60 W Glühbirnen (GB) angezogen wurden, erst nach 24-26 h die logarithmische Wachstumsphase erreichten. Die Generationszeiten betragen 5 h für die Kulturen unter 60 W Glühbirnen, 4,5 h für die Kulturen unter Infrarotdioden und 5 h für die Kulturen unter Infrarot- und Blaulichtdioden (IR+BL). Die stationäre Phase erreichten die *R. capsulatus* Kulturen nach 35 h unter Infrarotdioden und nach 38 h unter 60 W Glühbirnen, bei einer maximalen Zelldichte von OD₆₆₀ 1,99 (GB), 2,03 (IR) und 1,89 (IR+BL).

Die Kulturen, welche unter ausschließlicher Verwendung von Blaulichtdioden angezogen wurden erreichten erst nach 30-32 h die logarithmische Wachstumsphase, die Generationszeit betrug 15 h, die stationäre Phase wurde nach 68 h noch nicht erreicht, bei einer maximalen Zelldichte von OD₆₆₀ 1,85 (BL) zu diesem Zeitpunkt.

R. capsulatus ist in der Lage, unter Bestrahlung mit Leuchtdioden photoheterotroph zu wachsen. Unter Verwendung von Infrarotdioden verkürzt sich die initiale Lag-Phase im Vergleich zu Kulturen die unter 60 W Glühbirnen angezogen wurden um ca. 4-6 h. Der Verlauf bis zum Erreichen der stationären Phase und die Gesamtzellmasse nach Erreichen der stationären Phase ist denen der

anderen Kulturen gleich, wobei die Kulturen welche mit IR-Dioden beleuchtet wurden eine verkürzte Generationszeit hatten.

Unter ausschließlicher Verwendung von Blaulichtdioden verlängert sich die initiale Lag-Phase und das Wachstum ist deutlich verlangsamt. Die Gesamtzellmasse nach 68 h ist denen der anderen Kulturen gleich.

Die Unterschiede bei den verwendeten Lichtquellen lassen sich am besten durch die Intensität der Infrarotstrahlung klassifizieren. So waren die Kulturen die unter IR-Dioden und die unter IR- und BL-Dioden wuchsen in ihrem Wuchsverhalten nahezu gleich, die zusätzliche Beleuchtung mit den BL-Dioden hatte keinen Einfluss auf die Generationszeit oder die Gesamtzellmasse obwohl durch die Verwendung von Blaulichtdioden die Lichtintensität deutlich gesteigert ist.

Das Spektrum einer Glühbirne zeigt die höchste Emission im Rotlicht- und IR-Bereich, der Intensitätsunterschied im physiologisch relevanten IR-Bereich (775 nm - 880 nm) zwischen den Leuchtdioden und den Glühbirnen beträgt allerdings 2,6. Der Unterschied in der Wuchskurve zeigt, dass allein die Lag-Phase um ca. 6 h verlängert war und im Falle der IR-Dioden auch die Generationszeit um 10% kürzer war.

Der größte physiologische Effekt war bei dem Verlust von Infrarotlicht zu beobachten, wenn nur BL-Dioden verwendet wurden. Hier war die Lag-Phase verlängert und die Generationszeit deutlich erhöht.

Die Verwendung unterschiedlicher Lichtquellen zur phototrophen Anzucht von *R. capsulatus* zeigte, dass sowohl die Lichtintensität als auch die Lichtqualität einen Einfluss auf das Wachstum von *R. capsulatus* haben. Dabei hat Licht im infraroten Bereich den größten Einfluss auf das Wachstum. Je geringer die Lichtintensität im physiologisch relevanten Bereich von 775 nm - 880 nm ist, desto schlechter sind die Bedingungen für *R. capsulatus*. Die Verwendung von IR-Dioden führte bei *R. capsulatus* nicht zu mehr Biomasse im Gegensatz zu Glühbirnen, hat aber positive Effekte auf das Wachstum und ist daher relevant für die heterologe Expression.

Die physiologischen Veränderungen zeigen, dass die alleinige Beleuchtung mit BL-Dioden für die heterologe Expression ungeeignet ist, *R. capsulatus* aber dennoch in der Lage ist allein durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 462 nm phototroph zu wachsen, das heißt über das Sphaeroiden Licht zu absorbieren und an die Photosynthese Reaktionszentren weiterzuleiten.

3.1.3. Auswirkungen verschiedener Lichtquellen auf die Pigmentakkumulation von *R. capsulatus*

R. capsulatus ist in der Lage unter Beleuchtung mit Leuchtdioden photoheterotroph zu wachsen und zeigt deutliche Unterschiede im Wachstum je nach verwendeter Beleuchtung. Die Bildung der intracytoplasmatischen Membran (ICM) ist eng an die Ausbildung des Photosystems gekoppelt (Kiley & Kaplan, 1988). Die Akkumulation der Photopigmente ist also ein Indikator für die Ausbildung der ICM. Die Lichtintensität kann bei *R. capsulatus* einen Einfluss auf die gebildete Menge an Photopigmenten haben (Buggy et al., 1994). Ebenso ist für den nahen Verwandten *R. sphaeroides* eine Regulation durch Blaulicht beschrieben (Kap.1.3.1.3). Durch die verschiedenen Lichtquellen werden sowohl Intensität als Qualität stark verändert. Um zu untersuchen welche Auswirkungen dies auf die Pigmentakkumulation und Verteilung in den Lichtsammelkomplexen I/II und den Reaktionszentren hat, wurde die Menge der Photopigmente durch eine photometrische Messung bestimmt.

Die Anzucht der Kulturen erfolgte wie in Kap.3.1.2 beschrieben. Den Kulturen wurde bei einer OD_{660} von 1,0 eine Probe von 200 μ l für eine Absorptionmessung entnommen. Um die Pigmente aus den Zellen zu extrahieren, wurden die Zellen in Ethanol überführt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt. Die Messung über den gesamten Messbereich, von 300 bis 900 nm in Schritten von 1 nm, ist in Abb.3.6 als Kurve dargestellt, die Absorption des Sphaeroiden bei 450 nm und des Bakteriochlorophyll *a* bei 775 nm ist als Balkendiagramm dargestellt (Abb.3.7).

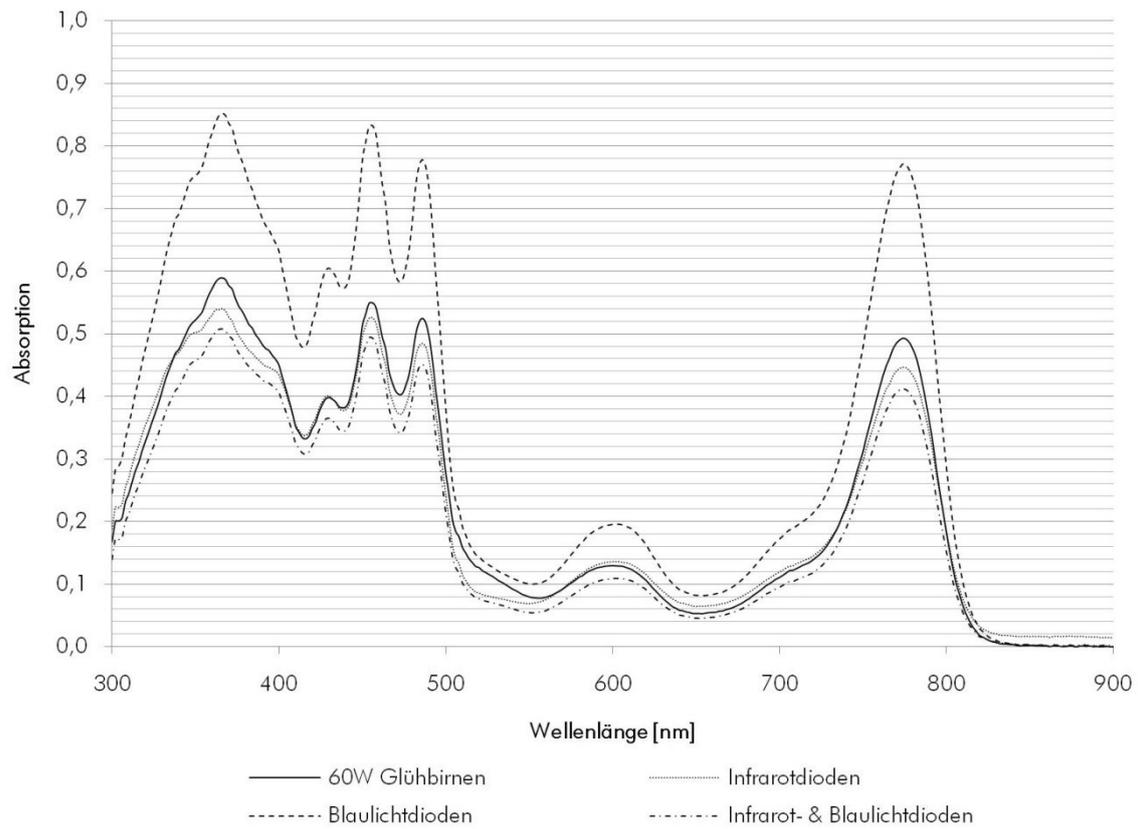


Abb.3.6 Einfluss verschiedener Lichtquellen auf die Pigmentakkumulation in *R. capsulatus*. Photometrische Messung des Absorptionsspektrums von *R. capsulatus* Wildtyps B10S. Der *R. capsulatus* Wildtyps B10S wurde in RCV-Minimalmedium, in einem Kulturvolumen von 10 ml, unter Beleuchtung mit 60 W Glühbirnen, Infrarotdioden, Blaulichtdioden und Infrarot- & Blaulichtdioden. Den Kulturen bei einer Zelldichte [OD₆₆₀] von 1,0 ein Probe von 200µl entnommen, die Pigmente in Ethanol extrahiert und photometrisch gemessen.

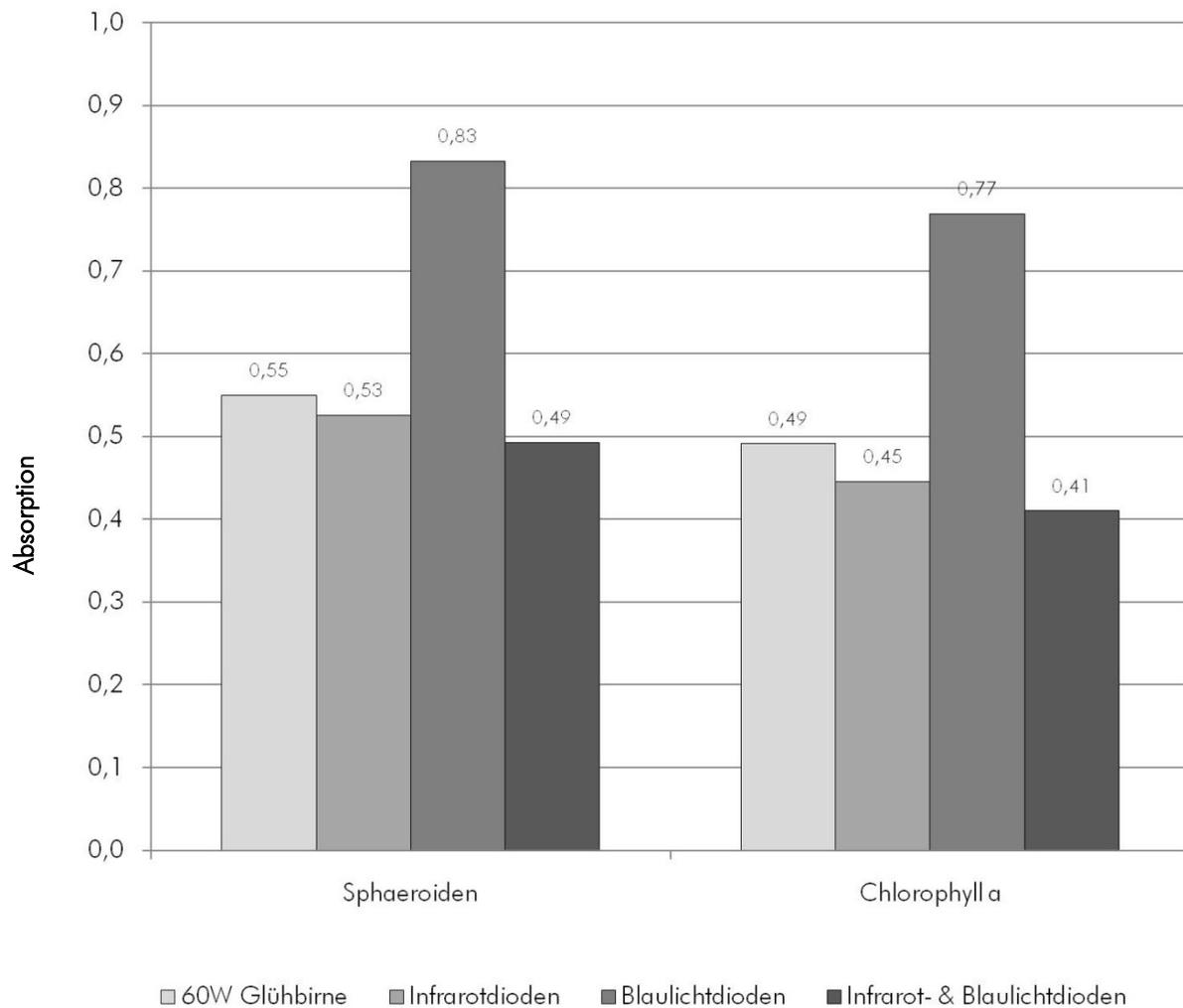


Abb.3.7 Einfluss verschiedener Lichtquellen auf die Pigmentakkumulation in *R. capsulatus* 2. Darstellung der Absorptionsmaxima des *R. capsulatus* Wildtyps B10S im physiologisch relevanten Spektrum als Balkendiagramm. Der *R. capsulatus* Wildtyp B10S wurde in RCV-Minimalmedium, in einem Kulturvolumen von 10 ml, unter Bestrahlung mit 60 W Glühbirnen, Infrarotdioden, Blaulichtdioden und Infrarot- & Blaulichtdioden angezogen. Den Kulturen wurde bei einer Zelldichte [OD₆₆₀] von 1,0 ein Probe von 200 µl entnommen, die Pigmente in Ethanol extrahiert und photometrisch gemessen.

Abb.3.6 zeigt die Absorption der Photopigmente des *R. capsulatus* Wildtyps unter den verschiedenen Lichtbedingungen. Die Absorption des Sphaeroiden und des Bakteriochlorophyll *a* verändert sich durch die Verwendung von Ethanol als Lösemittel. Das Sphaeroiden zeigt hierbei die charakteristischen Maxima bei 430, 450 und 485 nm. Das Bakteriochlorophyll *a* zeigt die charakteristischen Maxima bei 365, 605 und 775 nm. Für einen direkten Vergleich (Abb.3.7) wurden die Maxima bei 450 nm für das Sphaeroiden und 775 nm für das Bakteriochlorophyll *a* verwendet und in Abb.3.7 als Balkendiagramm dargestellt.

Die Kulturen, welche unter 60 W Glühbirnen und unter Verwendung von Infrarotdioden angezogen wurden, zeigen ähnliche Absorptionsspektren, wobei bei den Kulturen die unter Verwendung von Infrarotdioden angezogen wurden die Menge der Carotinoide (Abs. 450 nm: GB 0,55; IR 0,53; IR+BL 0,49) und des Bakteriochlorophylls (Abs. 775 nm: GB 0,49; IR 0,45; IR+BL 0,41) leicht

verringert sind. Die Kulturen, die ausschließlich mit Blaulichtdioden angezogen wurden, zeigen eine deutlich erhöhte Menge an Carotinoiden (Abs. 450 nm: IR 0,53; BL 0,83) und Bakteriochlorophyll *a* (Absorption bei 775 nm: IR 0,45; BL 0,77).

Die gesteigerte Menge an Carotinoiden und Bakteriochlorophyll *a* in den Kulturen, welche ausschließlich mit Blaulichtdioden bestrahlt wurden, kann zum einen eine Reaktion auf die geringere Intensität des Infraroten Lichts sein. Es ist bekannt das *R. capsulatus* über eine "Schwachlicht-Regulation" verfügt, die durch das Protein HvrA vermittelt wird und unter "Schwachlicht"-Bedingungen die Expression der Photosynthesegene positiv reguliert (Buggy et al., 1994) (Kap.1.3.1.3). Dieser Unterschied kann aber auch darauf zurückzuführen sein, dass zwischen den Probenentnahmen durch das verlangsamte Wachstum für die Kulturen unter Blaulichtdioden und denen unter Infrarotdioden ca. 22 h liegen und in dieser Zeit mehr Photopigmente akkumulieren, bzw. mehr Lichtsammelkomplexe und Reaktionszentren gebildet werden konnten. Das Verhältnis von Sphaeroiden zu Bakteriochlorophyll *a*, verglichen anhand der Absorption von 450 nm zu 775 nm war bei allen Kulturen ähnlich.

Zu den Veränderungen im Wachstum zeigt *R. capsulatus* auch Veränderungen in der Akkumulation der Photopigmente respektive der Lichtsammelkomplexe und Reaktionszentren. Die deutlichste Änderung ist wiederum durch die Lichtintensität im IR-Bereich auszumachen, wobei mit sinkender Intensität im IR-Bereich die Menge der Photopigmente zunimmt. Zusätzlich ist ein Unterschied zwischen den Kulturen zu beobachten, welche mit IR-Dioden und denen, welche mit IR- und BL-Dioden angezogen wurden, wobei unter IR- und BL-Dioden weniger Photopigmente akkumulierten. Für die Anwendung von *R. capsulatus* zur Herstellung von Carotinoiden bzw. bei der Expression von Membranproteinen scheint eine Verminderung der Infrarotstrahlung und der damit einhergehenden größeren Pigmentakkumulation bzw. der entsprechend vergrößerten Membranoberfläche durch die höhere Pigmentakkumulation von Vorteil zu sein.

3.1.4. Auswirkungen verschiedener Lichtquellen auf die Bildung des Nitrogenaseenzymkomplexes

Die unterschiedlichen Lichtbedingungen haben einen Einfluss auf das Wachstum und die Pigmentakkumulation in *R. capsulatus*. *R. capsulatus* ist in der Lage unter Stickstoffmangelbedingungen und bei phototrophem Wachstum mit Hilfe des Nitrogenaseenzymkomplexes molekularen Stickstoff (N₂) zu fixieren (Kap.1.3.2). Unter Stickstoffmangelbedingungen macht dieser Enzymkomplex einen großen Teil des Gesamtproteingehalts aus und ist dementsprechend ein guter Indikator für Stoffwechsel und Proteinsynthese und die Aktivität des Nitrogenase

Promotors P_{nif} der dem *nifHDK*-Operon voran gestellt ist. Weiterhin werden mit dem Nitrogenaseenzymkomplex weitere stickstoffabhängige Gene exprimiert welche für die Proteine kodieren die für die Eisen-Schwefel-Kofaktor Synthese der Nitrogenase und einiger Ferredoxine verantwortlich sind. Durch einen immunologischen Nachweis der Dinitrogenasereduktase sollte die Expression und Synthese des gesamten Enzymkomplexes nachgewiesen werden.

Die Anzucht der Kulturen erfolgte wie unter Kap.3.1.2 beschrieben. Den Kulturen wurde bei einer OD_{660} von 1,0 und 2,0 eine Probe von 500 μ l für einen immunologischen Nachweis der Dinitrogenasereduktase (NifH) entnommen (Abb.3.8).

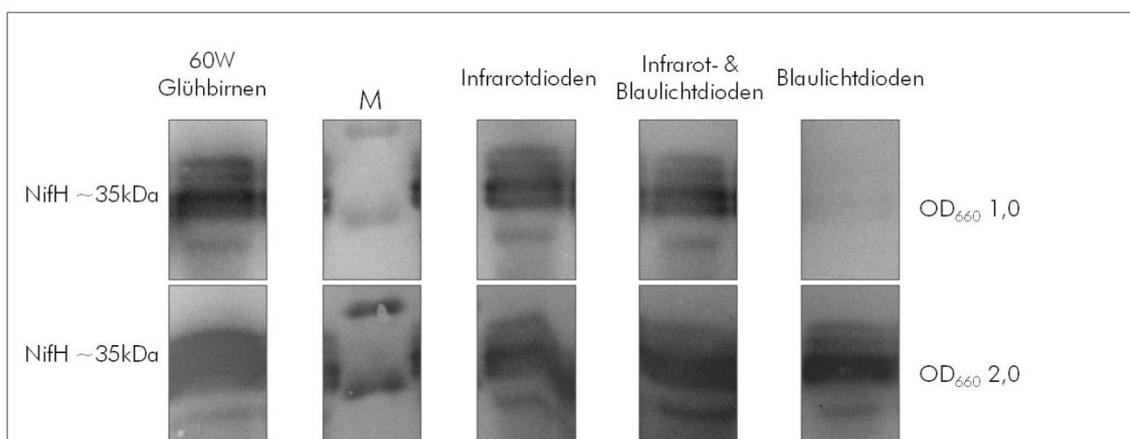


Abb.3.8 Einfluss verschiedener Lichtquellen auf die Synthese der Dinitrogenasereduktase in logarithmischer Wachstumsphase und stationärer Phase. Immunologischer Nachweis der Dinitrogenasereduktase des *R. capsulatus* Wildtyp B10S. Der Wildtyp *R. capsulatus* B10S wurde in RCV-Minimalmedium, in einem Kulturvolumen von 10 ml, unter Bestrahlung mit 60 W Glühbirnen, Infrarotdioden, Blaulichtdioden und Infrarot- & Blaulichtdioden angezogen. Proben von 500 μ l wurden bei einer OD_{660} von 1,0 und 2,0 entnommen, mittels SDS-Page separiert und mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Der immunologische Nachweis erfolgte durch einen NifH-spezifischen Antikörper. Die beiden prominenten Banden in den Spuren stellen die ADP-ribosylierte (oben) und nicht ADP-ribosylierte Form (unten) des NifH dar. M - Marker (40kDa/35kDa).

Abb.3.8 zeigt den immunologischen Nachweis der Dinitrogenasereduktase von *R. capsulatus* Kulturen unter verschiedenen Lichtbedingungen, bei einer OD_{660} von 1,0, entsprechend der logarithmischen Wachstumsphase, und 2,0, entsprechend der späten logarithmischen Wachstumsphase bzw. der frühen stationären Phase. Bei den Kulturen, welche unter Glühbirnen oder mit Infrarotdioden angezogen wurden, konnte durch den immunologischen Nachweis die Bildung der Dinitrogenasereduktase (NifH) in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD_{660} von 1,0 nachgewiesen werden. Bei den Kulturen, welche ausschließlich mit Blaulichtdioden angezogen wurden, konnte bei einer OD_{660} von 1,0 keine Dinitrogenasereduktase (NifH) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte in der späten logarithmischen Wachstumsphase, bzw. der frühen stationären Phase, in allen Kulturen NifH in gleichen Mengen nachgewiesen werden.

Bei der Akkumulation der Dinitrogenasereduktase (NifH) ist, wie schon in den vorangegangenen Versuchen, der deutlichste Effekt in den Kulturen erkennbar, welche ausschließlich mit Blaulichtdioden bzw. ohne Infrarotstrahlung angezogen wurden, hier ist die Proteinsynthese in der frühen logarithmischen Wachstumsphase beeinträchtigt. Die verminderte Proteinsynthese ist in der späten logarithmischen Wachstumsphase aufgehoben, da wie in Abb.3.7 gezeigt, gleiche Mengen NifH synthetisiert werden konnten wie unter allen anderen Bedingungen.

Zu den Veränderungen im Wachstum und bei der Akkumulation der Photopigmente zeigt *R. capsulatus* zudem Veränderungen in der Expression und Synthese des Nitrogenaseenzymkomplexes bei veränderten Lichtbedingungen. Durch den Verlust der Infrarotstrahlung ist *R. capsulatus* nicht in der Lage, in der logarithmischen Wachstumsphase den Nitrogenaseenzymkomplex zu bilden. Anders als in den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass in der späten logarithmischen Wachstumsphase bzw. der frühen stationären Phase die physiologischen Veränderungen durch den Verlust von Infrarotstrahlung in Bezug auf die Synthese des Nitrogenaseenzymkomplexes aufgehoben sind.

Wie schon durch das verlangsamte Wachstum vermutet, eignet sich die Beleuchtung mit Blaulichtdioden nicht für die heterologe Expression und hier im speziellen für die Expression von Proteinen mit Eisen-Schwefel Kofaktoren. Ebenso scheint die Expression mittels des Nitrogenase Promotors P_{nif} , welcher dem *nifHDK*-Operon voran steht in der logarithmischen Wachstumsphase reprimiert zu sein.

3.2. Auswirkungen der verschiedenen Lichtbedingungen auf die Genexpression in *R. capsulatus*

Es konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Beleuchtungsbedingungen einen Effekt auf das Wachstum, die Pigmentakkumulation und die Synthese des Nitrogenaseenzymkomplexes haben. Um einen detaillierteren Einblick in die physiologischen Veränderungen zu bekommen sollte die Genexpression des *R. capsulatus* im Vergleich Beleuchtung mit Infrarot- zu Blaulichtdioden mittels Microarray untersucht werden. Da die Methode der Microarrayanalyse für *R. capsulatus* noch nicht etabliert war, sollte durch die Transkriptionsanalyse unter Stickstoffmangelbedingungen, welche bereits gut untersucht ist, die Methode getestet werden.

3.2.1. Einfluss von Stickstoffmangelbedingungen auf die Genexpression von *R. capsulatus*

Die Regulation der Stickstofffixierungen ist für das Bakterium *R. capsulatus* ausführlich untersucht worden (Kap.1.3.2 ff.). Die Untersuchung des *R. capsulatus* mittels Microarray auf Stickstoffmangelbedingungen soll die Anwendbarkeit der Transkriptomuntersuchung mittels Microarray auf *R. capsulatus* verifizieren.

In diesem Versuch sollten die regulatorischen Anpassungen von *R. capsulatus* an die Anzucht mit Ammoniumsulfat (Nitrogenase reprimierend) und L-Serin (Nitrogenase dereprimierend) (s. Kap.1.3.2.2) im Medium mittels Microarray Analyse untersucht werden.

Der Versuch wurde mit dem Stamm *R. capsulatus* B10S durchgeführt. Die Kulturen wurden in einem Volumen von 10 ml in gasdicht verschließbaren Kulturgefäßen unter anaeroben Bedingungen angezogen. Das verwendete Medium war RCV-Minimalmedium, welches Malat als Kohlenstoffquelle, Ammoniumsulfat bzw. L-Serin als Stickstoffquelle beinhaltete. Als Lichtquelle wurden Infrarotdioden verwendet. Die Kulturen wurden mit einer OD_{660} von 0,05 inokuliert. Im weiteren Verlauf wurde bei einer OD_{660} von 1,4 bis 1,8 Zellmaterial entnommen, welches mit RCV-Minimalmedium gewaschen wurde und wiederum für die Inokulation (OD_{660} von 0,05) eines Kulturgefäßes genutzt wurde. Bei einer OD_{660} von 1,4 bis 1,8 wurden 2 der Kulturen á 10 ml vereinigt und die RNA aus den Zellen extrahiert, um mittels Microarray eine Bestimmung der Transkriptmenge vornehmen zu können. Die RNA wurde mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und durch die Verwendung von Cyaninfluoreszenzfarbstoff gekoppelten dUTP's markiert. Anschließend wurde die so markierte cDNA auf einem Microarraychip hybridisiert und die Fluoreszenz mittels Microarray "High-Resolution-Scanner" ausgelesen. Die so erhaltenen Fluoreszenzdaten wurden nach Smyth (Smyth et al., 2003) analysiert.

Insgesamt konnten 2582 Gene von 3488 annotierten Genen von *R. capsulatus* eindeutig nachgewiesen werden. Der Vergleich zeigt die Veränderung der Transkriptmenge der Kulturen

unter Nitrogenase dereprimierenden Bedingungen (-N) zu denen unter Nitrogenase reprimierenden Bedingungen (+N). Bei 28 Genen wurde eine eindeutig positive Regulation, das bedeutet das die Transkriptmenge der IR-Proben mindestens doppelt so hoch war wie die der BL-Proben, und bei 4 Genen eine eindeutig negative Regulation, das bedeutet das die Transkriptmenge der IR-Proben höchsten halb so hoch war wie die der BL-Proben, nachgewiesen. Von den 28 Genen, welche eindeutig positiv reguliert waren, sind 27 am Aufbau bzw. der Regulation des Nitrogenase-enzymkomplexes beteiligt, diese sind in Abb.3.8.2 dargestellt. Unter den 4 eindeutig negativ regulierten Genen findet sich kein Gen, welches am Aufbau bzw. der Regulation des Nitrogenase-enzymkomplexes beteiligt ist.

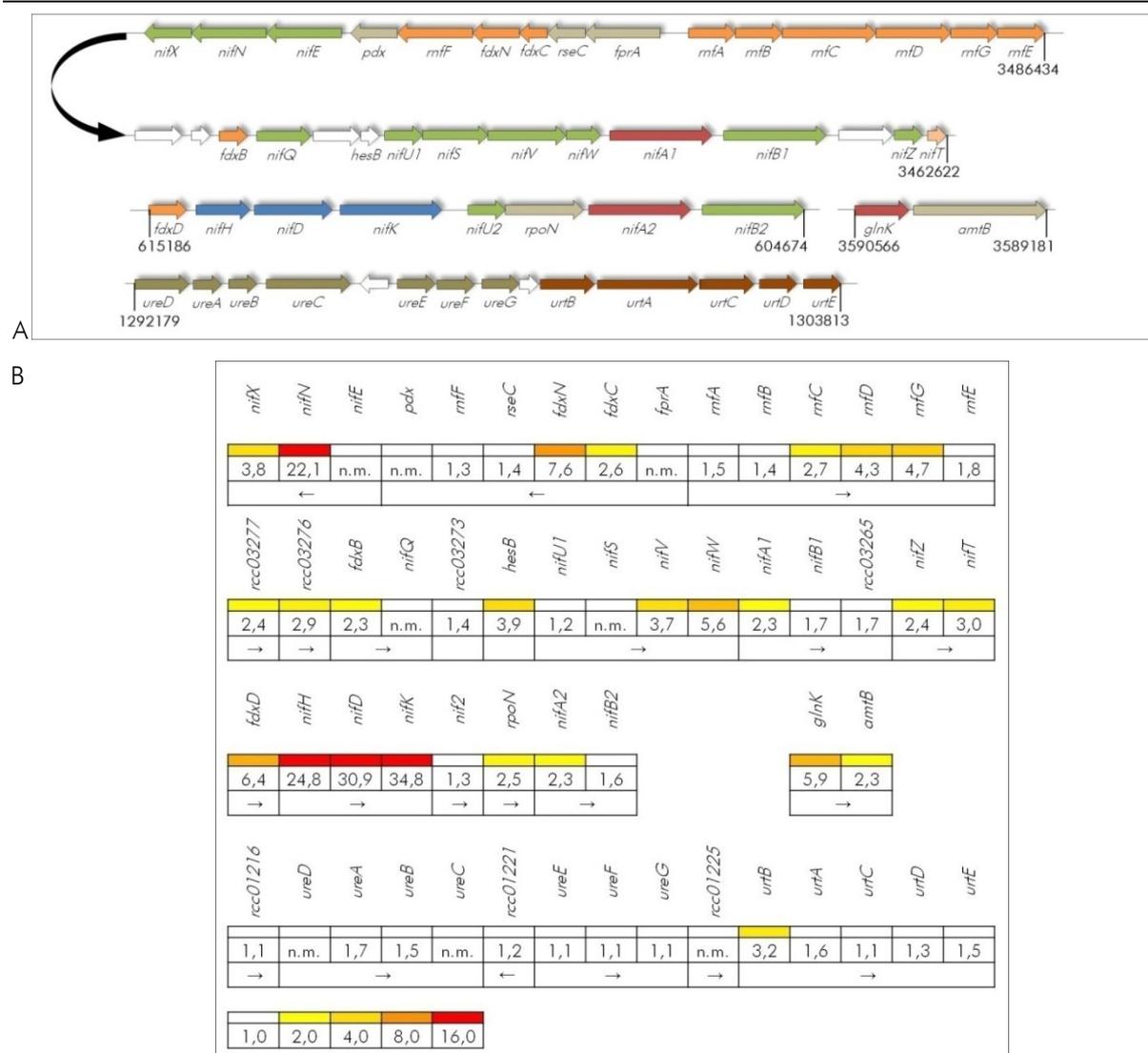


Abb.3.9 Einfluss der Stickstoffquelle auf die Expression stickstoffregulierter Gene in *R. capsulatus*. Der *R. capsulatus* Wildtyp B10S wurde in RCV-Minimalmedium, in einem Kulturvolumen von 10 ml, unter Nitrogenase reprimierenden (+N/Ammoniumsulfat) und Nitrogenase dereprimierenden (-N/L-Serin) angezogen, als Lichtquelle wurden Infrarotdioden verwendet.

A Schematische Darstellung stickstoffregulierter Gene, die Pfeile symbolisieren Leserichtung, Größe und Anordnung der Gensequenzen. Die Gene und Transkriptionseinheiten, der in Zeile 1 und 2 dargestellten Genregion, der schwarze Pfeil zeigt die Verknüpfung der Genregion an, sind stickstoffregulierte Gene, wie z.B. die mit *mif* benannten Gene ("*rhodobacter nitrogen fixation*") die mit *nif* benannten Gene ("*nitrogen fixation*") und die mit *fdx* benannten Gene ("*ferredoxin*"); in Zeile 3 ist ein weiteres Nitrogenasegencluster abgebildet, dessen Gene und Transkriptionseinheiten stickstoffreguliert sind, sowie das Operon *glnK-amtB*, bei GlnK handelt es sich um ein P_{II}-Signaltransduktionsprotein (Kap.1.3.2.2) und bei AmtB um einen Ammoniumtransporter. Die Farben sind an die Funktion der Gene angelehnt: Rot: Regulatoren, Blau: Struktur, Grün: Kofaktorbiosynthese und Orange: Elektronentransport. In Zeile 4 ist eine weitere Genregion dargestellt, deren Gene und Transkriptionseinheiten zum größten Teil stickstoffreguliert sind; z.B. die mit *ure* bezeichneten Gene ("*urease*") und die mit *urt* bezeichneten Gene ("*urea ABC transporter*"). Die Zahlen markieren die relative Position im Genom nach der Annotierung der NCBI-Datenbank für *R. capsulatus* SB1003 (Strnad et al., 2010).

B Ergebnisse der Microarrayanalyse. Die Zahlen stellen die Expressionsveränderung unter dereprimierenden Bedingungen (-N) im Vergleich zu reprimierenden Bedingungen (+N) dar. Die Verlaufsfarbskala zeigt die Stärke der Expressionsveränderung an, wobei Änderungen im Bereich größer 0,5 und kleiner 2,0 nicht gefärbt sind. Die Verlaufsfarbskala wurde in den Werten 2 (gelb) bis maximal 16 (rot) angelegt, um diesen Bereich der Transkriptmengenänderung farblich unterscheiden zu können.

In Abb.3.8.A sind schematisch die Transkriptionseinheiten der Gene dargestellt die für Proteine kodieren die am Aufbau des Nitrogenaseenzymkomplexes und dessen Regulation beteiligt sind. In Abb.3.8.B sind farblich und numerisch die Unterschiede in der Expression der einzelnen Gene als Quotient dargestellt. Die farbliche Skala in Abb.3.8.B ist Werten von 2 bis 16 zugeordnet, bei Werten niedriger als zwei ist keine Färbung vorhanden. Die Werte bezeichnen immer die direkte Expressionsänderung unter dereprimierenden (-N) Bedingungen mit der Expression unter reprimierenden (+N) Bedingungen als Bezugspunkt. Werte von 0 bis 0,5 bezeichnen eine negative Veränderung der Expression, Werte von 0,5 bis 2 bezeichnen keine oder zu geringe Änderungen in der Expression und Werte über 2 zeigen eine positive Veränderung in der Expression unter dereprimierenden (-N) Bedingungen.

Die Expressionsdaten der Microarrayanalyse zeigten bei bestimmten Genen die erwartete positive Regulation der stickstoffabhängig regulierten Gene und Operons. In einigen Bereichen zeigten sich aber auch Unregelmäßigkeiten in den Transkriptmengen von Genen die zu einer Transkriptionseinheit gehören. Zudem ließen sich auch Gene und Transkriptionseinheiten nachweisen, welche zwar stickstoffabhängig reguliert werden, aber dennoch keine Expressionsveränderung zeigten.

Einigen der vermuteten bzw. bestätigten Transkriptionseinheiten, wie z.B. dem Operon *mfABCDGE* zeigten sich keine gleichmäßigen Steigerungen der Expression des Operons. Die Gene, welche zuerst abgelesen werden, sind kaum reguliert (*mfA* 1,5 | *mfB* 1,4) wohingegen die letzteren Gene deutlich reguliert sind (*mfC* 2,7 | *mfD* 4,3 | *mfE* 4,7). Die Unterschiede in der Transkriptmenge einer Transkriptionseinheit lassen sich hier am besten durch partielle Degradation oder Prozessierung der mRNA erklären.

Die Gene *ureDABC* und *ureEFG*, welche für die Urease kodieren, zeigten keine Veränderung in der Expression unter dereprimierenden Bedingungen, obwohl diese beide Operons stickstoffreguliert sind.

Erwartungsgemäß sind die Gene der Nitrogenasetranskriptionsaktivatoren *NifA1* und *NifA2* positiv reguliert. Die Transkriptmenge ist jeweils um den Faktor 2,3 erhöht (*nifA1* und *nifA2*). Ebenfalls sind erwartungsgemäß die Gene für den Nitrogenaseenzymkomplex *nifHDK*, welche zu einer Transkriptionseinheit gehören, im Mittel unter dereprimierenden Bedingungen um den Faktor 30,2 mal stärker exprimiert als unter reprimierenden Bedingungen.

Das Gen *nifN* (22,1), welches für ein Protein kodiert das am Aufbau des Eisen-Molybdän-Kofaktors für die Nitrogenase beteiligt ist, war stark positiv reguliert. Ebenso zeigten die stickstoffabhängig exprimierten Gene für die Ferredoxine *FdI* (*fdxN* 7,6), *FdIV* (*fdxC* 2,6) und *FdV* (*fdxD* 6,4) eine starke positive Expressionsänderung.

Die Analyse mittels Microarray zeigte eine positive Regulation der Gene welche unter Kontrolle der Transkriptionsaktivatoren *NifA1* und *NifA2* stehen, wie auch die positive Regulation der Transkriptionsaktivatoren selbst. Die Transkriptionssteigerungen entsprachen zu großen Teilen den

aus der Literatur erwarteten regulatorischen Effekten. Die Stickstoffmangelreaktion des *R. capsulatus* konnte durch die Analyse mittels Microarray nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung der Transkriptmenge des *R. capsulatus* unter Stickstoffmangelbedingungen zeigte sich bei vielen stickstoffregulierten Genen und Operons eine Erhöhung der Transkriptmenge, welche den in der Literatur beschriebenen regulatorischen Effekten entspricht. Die höchste Expressionsänderung wiesen dabei zum einen das Operon *nifHDK* auf, welche die stark erhöhte Expressionsaktivität am P_{nif} Promotor zeigt und zum anderen die Gene *fdxC*, *fdxD*, *fdxN* und *nifN*, was die erhöhte Aktivität bei der Synthese von Eisen-Schwefel-Kofaktoren und Proteinen mit Eisen-Schwefel-Kofaktor verdeutlicht.

Die Transkriptionsanalyse mittels Microarray lässt sich in dieser Form anwenden.

3.2.2. Transkriptanalyse von *Rhodobacter capsulatus* unter Leuchtdioden

R. capsulatus zeigt beträchtliche Veränderungen im Wachstum, bei der Photosynthese und der Stickstofffixierung wenn das Bakterium nicht der Strahlung im infraroten Bereich ausgesetzt ist. Die vorangegangenen Experimente lassen vermuten, dass die Änderungen der Lichtbedingungen bestimmte regulatorische Systeme in *R. capsulatus* positiv beeinflussen, wie z.B. die Nitrogenase-expression unter Infrarotdioden oder die Pigmentakkumulation unter Blaulichtdioden. Um optimale Bedingungen für die Expression von Membranproteinen oder Proteinen mit Metall-Kofaktor zu erhalten, sollte überprüft werden welchen Einfluss die Lichtbedingungen auf die entsprechenden Systeme auf Transkriptionsebene haben und ob sich die Leuchtdioden dahingehen nutzen lassen diese Bedingungen zu forcieren.

Der Versuch wurde mit dem Stamm *R. capsulatus* B10S durchgeführt. Die Kulturen wurden in einem Volumen von 10 ml in gasdicht verschließbaren "*hungates*" unter anaeroben Bedingungen angezogen. Das verwendete Medium war RCV-Minimalmedium, welches Malat als Kohlenstoffquelle und L-Serin als Stickstoffquelle beinhaltet. Als Lichtquelle wurden Infrarot- und Blaulichtdioden verwendet. Die Kulturen wurden mit einer OD_{660} von 0,05 inokuliert. Im weiteren Verlauf wurde bei einer OD_{660} von 1,4 bis 1,8 Zellmaterial entnommen, welches mit RCV-Minimalmedium gewaschen wurde und wiederum für die Inokulation (OD_{660} von 0,05) eines "*hungates*" genutzt wurde. Bei einer OD_{660} von 1,4 bis 1,8 wurden 2 der Kulturen á 10 ml vereinigt und die RNA aus den Zellen extrahiert, um mittels Microarray eine Bestimmung der Transkriptmenge vornehmen zu können.

Die RNA wurde mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und durch die Verwendung von Cyaninfluoreszenzfarbstoff gekoppelten dUTP's markiert. Anschließend wurde die so markierte

cDNA auf einem Microarraychip hybridisiert und die Fluoreszenzen anschließend mittels Microarray "High-Resolution-Scanner" ausgelesen. Die so erhaltenen Fluoreszenzdaten wurden nach Smyth (Smyth, 2002) analysiert.

Verglichen wurde die Genexpression des *R. capsulatus* B10S Wildtyps unter folgenden Bedingungen: Bestrahlung mit Infrarotdioden und Bestrahlung ausschließlich mit Blaulichtdioden. Die Werte bezeichnen immer die direkte Expressionsänderung unter Infrarotstrahlung mit der Expression unter Blaulicht als Bezugspunkt. Werte von 0 bis 0,5 bezeichnen eine negative Veränderung der Expression, Werte von 0,5 bis 2 bezeichnen keine oder zu geringe Änderungen in der Expression und Werte über 2 zeigen eine positive Veränderung in der Expression unter Infrarotstrahlung.

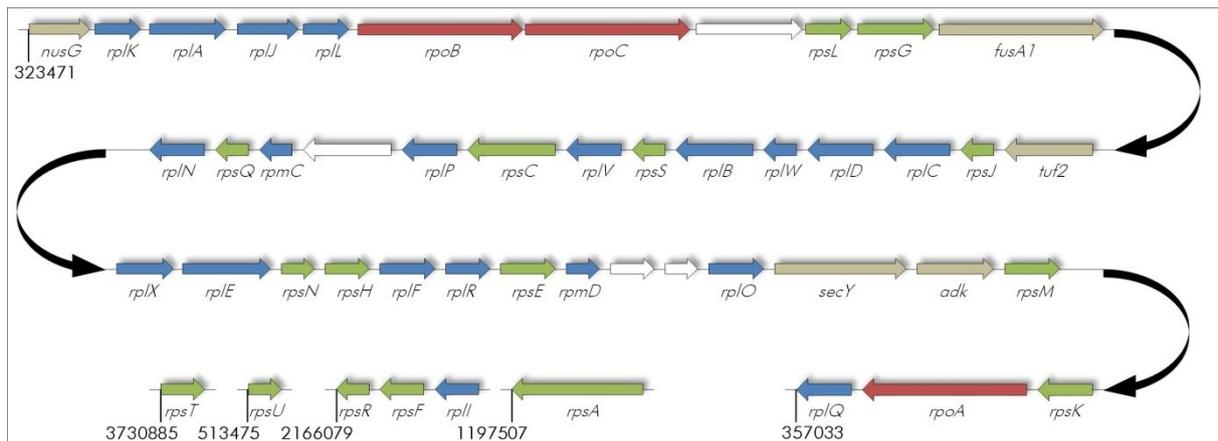
Insgesamt konnte eine Expressionsänderung von 3412 Genen der 3488 annotierten Gene bestimmt werden. Bei 255 Genen wurde eine eindeutige positive Regulation ($> 2,0$), bei 19 Genen eine eindeutig negative Regulation ($< 0,5$) nachgewiesen.

Von den 255 Genen, welche eindeutig positiv reguliert waren, sind 24 am Aufbau bzw. der Regulation des Nitrogenaseenzymkomplexes beteiligt. Weiterhin sind 22 der 255 Gene am Aufbau des Photosyntheseapparates bzw. der ATPase beteiligt, 33 der 255 Gene kodieren für ribosomale Proteine. Zusätzlich konnte in 4 Bereichen eine starke Expressionsänderung nachgewiesen werden, dabei handelte es sich um einen Phosphat-ABC-Transporter, kodiert durch die Gene *pstSCAB* und die Regulatoren *phoUB*, Flagelinproteine kodiert durch die Gene *flaAF* und den Regulator *flbT*, und zwei Bereiche putativer Proteine RCAP_rcc00608 – RCAP_rcc00610 und RCAP_rcc02888 – RCAP_rcc02892, sowie Gene für die Kälteschockproteine *cspA₁* und *cspA₃*, welche jeweils einem der Cluster zugehörig sind. In den folgenden Kapiteln 3.2.2.1 bis 3.2.2.4 sind jeweils einige der Gene und Transkriptionseinheiten aus *R. capsulatus* und deren Expressionsveränderung im Bezug zu den Beobachtungen aus den Versuchen 3.1.1 bis 3.1.4 zusammengefasst.

3.2.2.1. Auswirkungen der verschiedenen Lichtbedingungen auf die Transkription der Gene der 30S und 50S Untereinheiten der Ribosomen

In Kap.3.1.2 sind die Auswirkungen der Lichtveränderungen auf das Wachstum von *R. capsulatus* beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die ausschließliche Verwendung von Blaulichtdioden für das Wachstum von *R. capsulatus* einen negativen Effekt hatte. Die Lag-Phase war verlängert und die Generationszeit war ca. dreimal so hoch als unter Beleuchtung mit Infrarotdioden. Dieser Effekt zeigt eine deutliche Verschlechterung der allgemeinen Wuchsbedingungen. Bei der Untersuchung der Transkriptmengen zwischen Infrarotdioden und Blaulichtdioden fielen daher auch die deutlichen Unterschiede bei der Transkriptmenge der Gene für die ribosomalen Proteine auf. Die Gene, welche für die Proteine der 30S und 50S Untereinheiten der Ribosomen kodieren finden sich in verschiedenen Transkriptionseinheiten, wobei 33 der insgesamt 54 Gene in einem ca. 34 kbp großen Gencluster zusammengefasst sind (Abb.3.11.1). Unter den mit *rps* bezeichneten Genen finden sich die Gene die für die Proteine der 30S Untereinheit der Ribosomen kodieren. Mit *rpl* und *rpm* sind die für die Proteine der 50S Untereinheit der Ribosomen kodierenden Gene benannt. Die *rpo* Gene kodieren für Untereinheiten der RNA-Polymerase.

A



B

<i>nusG</i>	<i>rplK</i>	<i>rplA</i>	<i>rplJ</i>	<i>rplL</i>	<i>rpoB</i>	<i>rpoC</i>	<i>rcc00294</i>	<i>rpsL</i>	<i>rpsG</i>	<i>fusA1</i>			
2,5	2,2	2,7	3,2	n.m.	3,4	2,9	1,4	2,1	2,1	3,6			
<i>rplN</i>	<i>rpsQ</i>	<i>rpmC</i>	<i>rcc00308</i>	<i>rplP</i>	<i>rpsC</i>	<i>rplV</i>	<i>rpsS</i>	<i>rplB</i>	<i>rplW</i>	<i>rplD</i>	<i>rplC</i>	<i>rpsJ</i>	<i>tuf2</i>
2,4	3,0	3,2	1,6	1,2	4,3	3,6	2,8	3,3	3,2	3,2	2,6	2,1	2,3
<i>rplX</i>	<i>rplE</i>	<i>rpsN</i>	<i>rpsH</i>	<i>rplF</i>	<i>rplR</i>	<i>rpsE</i>	<i>rpmD</i>	<i>rcc00319</i>	<i>rcc00320</i>	<i>rplO</i>	<i>secY</i>	<i>adk</i>	<i>rpsM</i>
2,9	2,9	3,0	2,5	2,8	2,5	2,7	2,5	1,2	2,1	1,9	2,1	2,1	2,9
<i>rpsT</i>	<i>rpsU</i>	<i>rpsF</i>	<i>rpsR</i>	<i>rplI</i>	<i>rpsA</i>	<i>rplQ</i>	<i>rpoA</i>	<i>rpsK</i>					
2,9	2,2	2,1	2,4	1,9	3,0	3,6	3,4	3,0					

Abb.3.10 Einfluss der Lichtquelle auf die Expression der Gene für die ribosomalen Proteine in *R. capsulatus*.

Der *R. capsulatus* Wildtyp B10S wurde in RCV-Minimalmedium, in einem Kulturvolumen von 10 ml angezogen, als Lichtquelle wurden Infrarotdioden oder Blaulichtdioden verwendet.

A Schematische Darstellung der Gene für die ribosomalen Proteine, die Pfeile symbolisieren Leserichtung, Größe und Anordnung der Gensequenzen. Die Zeilen 1-4 stellen ein Gencluster dar, wobei die schwarzen Pfeile jeweils die Verknüpfung des Genclusters anzeigen. Die Gene, welche die 30S Untereinheit der Ribosomen kodieren, sind grün dargestellt. Die Gene, welche die 50S Untereinheit der Ribosomen kodieren, sind blau dargestellt. Die Gene, welche für die RNA-Polymerase kodieren, sind rot dargestellt. In Zeile 4 sind zusätzlich Gene dargestellt, welche für die 30S oder 50S Untereinheit der Ribosomen kodieren aber nicht in dem in Zeile 1-4 gezeigten Gencluster liegen und eine Änderung in der Transkriptmenge aufwiesen. Die Zahlen markieren die relative Position im Genom nach der Annotierung der NCBI-Datenbank für *R. capsulatus* SB1003 (Strnad et al., 2010).

B Ergebnisse der Microarrayanalyse. Die Zahlen stellen die Expressionsveränderung im Vergleich Infrarotdioden zu Blaulichtdioden dar. Die Verlaufsfarbskala zeigt die Stärke der Expressionsveränderung an, wobei Änderungen im Bereich größer 0,5 und kleiner 2,0 nicht gefärbt sind. Die Verlaufsfarbskala wurde in den Werten 2 (gelb) bis maximal 4 (rot) angelegt, um diesen Bereich der Transkriptmengenänderung farblich unterscheiden zu können.

In Abb.3.10.A sind die Gene dargestellt die für Proteine kodieren, die am Aufbau der Ribosomen beteiligt sind. In Abb.3.10.B sind farblich und numerisch die Unterschiede in der Expression der einzelnen Gene als Quotient dargestellt. Die farbliche Skala in Abb.3.11.B ist von 0 bis 8 gewählt, Werte kleiner zwei sind weiß dargestellt.

In Abb.3.10 sind alle Gene dargestellt, welche für ribosomale Proteine kodieren und eine Änderung der Transkriptmenge im Vergleich Infrarot- zu Blaulichtdioden aufweisen. Insgesamt sind dies 32 der 54 Gene für die ribosomalen Proteine. Die Änderung der Transkriptmengen lagen bei diesen Genen im Mittel bei 2,8.

Die Expressionsänderung, welche durch den Microarray bestimmt wurde, kann zweierlei bedeuten, entweder eine erhöhte Expression unter Infrarotdioden oder eine verminderte Expression unter Blaulichtdioden. Es ist anzunehmen, dass es sich bei dem hier gezeigten Effekt um eine Verminderung der Expression der Gene der ribosomalen Proteine unter Blaulichtdioden handelte und damit eine verminderte Proteinbiosynthese einherging. Diese Wachstumsraten korrelierte Verminderung der Expression der Gene für die ribosomalen Proteine ist bereits für *E. coli*, *M. tuberculosis* und *S. typhimurium* beschrieben (Betts et al., 2002; Grunberg-Manago et al., 1985; Reeve et al., 1984).

Die Unterschiede in der Expression der Gene für die ribosomalen Proteine zwischen Blaulichtdioden und Infrarotdioden zeigten eine Stressantwort auf die Lichtmangelbedingungen im Infrarotbereich.

3.2.2.2. Auswirkungen der verschiedenen Lichtbedingungen auf die Transkription der Gene für den Photosyntheseapparat

Bei der Untersuchung der Kulturen unter Infrarot- und Blaulichtdioden ergaben sich große Unterschiede in der Akkumulation der Photopigmente (Kap.3.1.3), wobei bei den Kulturen unter Blaulichtdioden eine um den Faktor 2 erhöhte Akkumulation der Photopigmente nachgewiesen werden konnte. Die Gene, welche für den Photosyntheseapparat kodieren, sind in einem 46 kbp großen Bereich auf dem Chromosom in verschiedenen Transkriptionseinheiten zusammengefasst (Abb.3.9.1). Die mit *bch* bezeichneten Gene kodieren für Proteine, welche für den Aufbau des Bakteriochlorophylls verantwortlich sind. Die Gene welche die Bezeichnung *crt* tragen kodieren für Proteine für die Carotinoidsynthese. Gene, welche für Strukturproteine des Photosystems kodieren, sind als *puf* (*pufLM* RZ, *pufAB* LSI), *puc* (*pucBA* LSII) und *puh* (*puhA* RZ) benannt. In dem 46 kbp großen Bereich finden sich auch die Gene für die Repressoren *CrtJ* und *AerR*, welche Redox-abhängig die Expression der Photosynthesegene reprimieren.

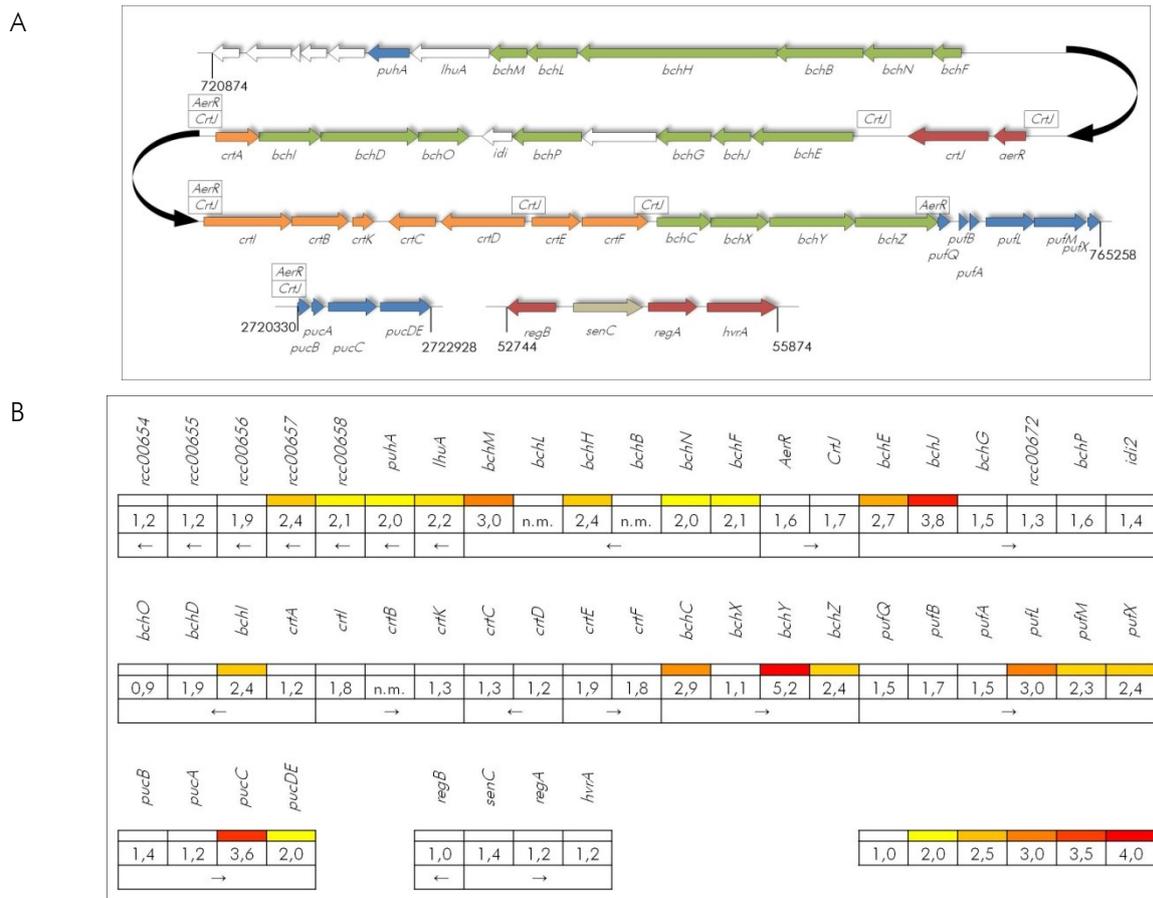


Abb.3.11 Einfluss der Lichtquelle auf die Expression der Gene für den Photosyntheseapparat in *R. capsulatus*. Der *R. capsulatus* Wildtyp B10S wurde in RCY-Minimalmedium, in einem Kulturvolumen von 10 ml, als Lichtquelle wurden Infrarotdioden oder Blaulichtdioden verwendet.

A Schematische Darstellung der Gene für den Photosyntheseapparat, die Pfeile symbolisieren Leserichtung, Größe und Anordnung der Gensequenzen. In Zeile 1 bis 3 ist die 46 kbp große Genregion dargestellt (die schwarzen Pfeile zeigen die Verknüpfung der Genregion an) in der die meisten Gene der am Aufbau des Photosyntheseapparates beteiligten Proteine zusammengefasst sind. Die Gene deren Proteine an der Synthese des Bakteriochlorophylls beteiligt sind, sind in grün dargestellt, Die Gene deren Proteine am Aufbau der Reaktionszentren oder der Lichtsammelkomplexe beteiligt sind, sind blau dargestellt. Die Gene für die Carotinoidbiosynthese sind in orange dargestellt. Die Regulatoren der Photosynthesegene, wobei nur *crtI* und *aerR* im Gencluster liegen, sind rot dargestellt. In Zeile 4 sind die Gene der Regulatoren RegA, RegB und HvrA, sowie das *pucBACDE* Operon dargestellt. Die Zahlen markieren die relative Position im Genom nach der Annotierung der NCBI-Datenbank für *R. capsulatus* SB1003 (Strnad et al., 2010). Zusätzlich sind die jeweils Operons markiert die durch die Repressoren AerR und CrtJ beeinflusst werden können.

B Ergebnisse der Mircoarrayanalyse. Die Zahlen stellen die Expressionsveränderung im Vergleich Infrarotdioden zu Blaulichtdioden dar. Die Verlaufsfarbskala zeigt die Stärke der Expressionsveränderung an, wobei Änderungen im Bereich größer 0,5 und kleiner 2,0 nicht gefärbt sind. Die Verlaufsfarbskala wurde in den Werten 2 (gelb) bis maximal 4 (rot) angelegt, um diesen Bereich der Transkriptmengenänderung farblich unterscheiden zu können.

In Abb.3.11.A sind die Operonstrukturen der Gene dargestellt, die für Proteine kodieren, die am Aufbau des Photosyntheseapparates beteiligt sind. In Abb.3.11.B sind farblich und numerisch die Unterschiede in der Expression der einzelnen Gene als Quotient dargestellt. Die farbliche Skala in Abb.3.11.B ist von 0 bis 4 gewählt um auch geringere Veränderungen in der Expression farblich darstellen zu können, Werte kleiner zwei sind weiß dargestellt.

Die Expressionsdaten der Microarrayanalyse zeigten in bestimmten Bereichen eine positive Regulation der Photosynthesegene. In einigen Bereichen zeigten sich aber auch Unregelmäßigkeiten in den Transkriptmengen von Genen einer Transkriptionseinheit.

Einigen der vermuteten bzw. bestätigten Transkriptionseinheiten wie z.B. das Operon *pufQBALMX* und das Operon *pucBACDE* zeigten keine gleichmäßige Steigerung der Expression über das gesamte Operon. In beiden Fällen zeigten die zuvorderst gelegenen Gene keine Änderung der Transkriptmenge (*pufQ* 1,5 | *pufA* 1,7 | *pufB* 1,5)(*pucB* 1,4 | *pucA* 1,2) wohingegen die letzteren Gene eine deutliche Änderung in der Transkriptmenge aufwiesen (*pufL* 3,0|*pufM* 2,3|*pufX* 2,4)(*pucC* 3,6 | *pucDE* 2,0). Die Unterschiede in der Transkriptmenge einer Transkriptionseinheit lassen sich hier am besten durch partielle Degradation oder Prozessierung der mRNA erklären.

Die Expression der Photosynthesegene kann durch die Lichtintensität beeinflusst werden. Allerdings war die Veränderungen in den Expressionsraten bei allen hier dargestellten Genen sehr gering und nur bei 19 der dargestellten 47 Gene war überhaupt eine Expressionsveränderung messbar. Ebenso konnte bei den Regulatoren der Photosynthesegene keine Änderung in der Transkriptmenge nachgewiesen werden. Gegensätzlich zu dem Befund (Kap.3.1.3), dass die Kulturen unter Blaulichtdioden mehr Photopigmente akkumulierten, zeigte die Microarrayanalyse zum einen geringe Unterschiede in der Expression der Gene für den Photosyntheseapparat und zum anderen, dass bei den Genen bei denen Unterschiede messbar waren die Kulturen, welche unter Infrarotdioden angezogen wurden, mehr Transkript aufwiesen.

Der in Kap.3.1.3 beschriebene Effekt, der erhöhten Pigmentakkumulation unter Blaulichtdioden, lässt sich anhand der Unterschiede in den Transkriptmengen nicht erklären. Für die Produktion von Membranproteinen in *R. capsulatus* unter phototrophen Bedingungen, wobei der Vorteil in der vergrößerten Membranoberfläche besteht, lässt sich an Hand der Beobachtungen aus Pigmentakkumulation und Microarraydaten nicht direkt festlegen, welche Beleuchtung hierfür die geeignetere ist.

Im Vergleich von *R. capsulatus* unter Infrarotdioden und Blaulichtdioden war der Unterschied in den Transkriptmengen gering. Gegensätzlich zu den Beobachtungen zur Pigmentakkumulation unter den verschiedenen Lichtbedingungen waren die Transkriptmengen der Gene, welche für den Photosyntheseapparat von *R. capsulatus* kodieren, in den Kulturen, welche unter Infrarotdioden angezogen wurden, höher als bei den Kulturen, die unter Blaulichtdioden angezogen wurden.

3.2.2.3. Auswirkungen der verschiedenen Lichtbedingungen auf die Transkription der Gene für den Nitrogenaseenzymkomplex und dessen Regulation

In Kap.3.1.4 konnte gezeigt werden, dass *R. capsulatus* bei phototropher Anzucht unter Blaulichtdioden nicht in der Lage ist, in der logarithmischen Wachstumsphase, den Nitrogenaseenzymkomplex zu synthetisieren. Die Microarrayanalyse kann hier zeigen, ob es sich dabei um einen Effekt handelt, welcher mit der verminderten Proteinbiosynthese (Kap.3.1.6.1) zusammenhängt oder um einen regulatorischen Effekt, durch den die Expression der Nitrogenasegene reprimiert wird.

Die Gene, welche für den Nitrogenaseenzymkomplex kodieren, sind in verschiedenen Transkriptionseinheiten zusammengefasst (Abb.3.10.1). Unter den mit *nif* bezeichneten Genen finden sich die Gene, die für den Nitrogenaseenzymkomplex selbst kodieren, ebenso wie die, welche für Proteine kodieren, die an der Kofaktorsynthese und Regulation der Nitrogenase beteiligt sind. Mit *fdx* sind die für Ferredoxine kodierenden Gene benannt. Unter *gln* sind die Gene der Glutaminsynthese zusammengefasst, wobei es sich bei GlnB und GlnK um zwei P_{ii} -Signaltransduktionsproteine handelt, die die Stickstofffixierungen in Bezug auf gebundenen Stickstoff kontrollieren. Das Gen *amtB* kodiert für einen Ammoniumtransporter. Die Gene *mfBC* kodieren für einen in der Membran verankerten Komplex der Elektronen von der Hydrogenasereaktion, der Wasserstoffspaltung, wieder an die Nitrogenase zurückführt. Die Gene *mfADG* und *mfE* kodieren für die Elektronentransporter dieses Systems (Jeong & Jouanneau, 2000).

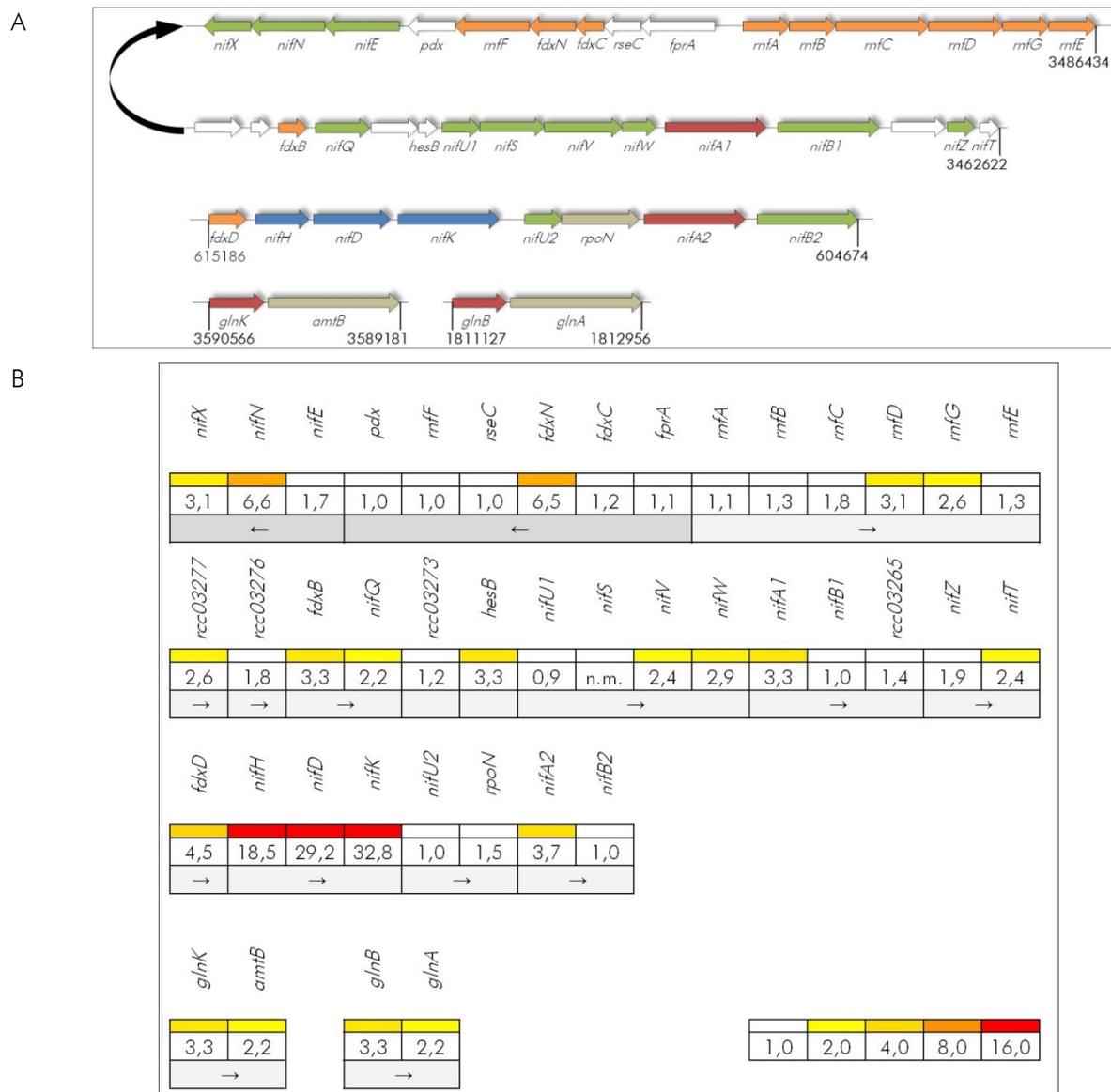


Abb.3.12 Einfluss der Lichtquelle auf die Expression der Nitrogenasegene in *R. capsulatus*. Der *R. capsulatus* Wildtyp B10S wurde in RCV-Minimalmedium, in einem Kulturvolumen von 10 ml, als Lichtquelle wurden Infrarotdioden oder Blaulichtdioden verwendet.

A Schematische Darstellung stickstoffregulierter Gene, die Pfeile symbolisieren Leserichtung, Größe und Anordnung der Gensequenzen. Die Gene und Transkriptionseinheiten, der in Zeile 1 und 2 dargestellten Genregion (der schwarze Pfeil zeigt die Verknüpfung der Genregion an) sind stickstoffregulierte Gene, wie z.B. die mit *mff* benannten Gene ("*rhodobacter nitrogen fixation*"), die mit *nif* benannten Gene ("*nitrogen fixation*") und die mit *fdx* benannten Gene ("*ferredoxin*"); in Zeile 3 ist ein weiteres Nitrogenasegencluster abgebildet, dessen Gene und Transkriptionseinheiten stickstoffreguliert sind, sowie in Zeile 4 das Operon *glnK-amtB*, bei GlnK handelt es sich um ein P_{II}-Signaltransduktionsprotein (Kap.1.3.2.2) und bei AmtB um einen Ammoniumtransporter, und das Operon *glnB-glnA*, GlnB handelt es sich um ein P_{II}-Signaltransduktionsprotein (Kap.1.3.2.2) und bei GlnA um die L-Glutaminsynthetase. Die Farben sind an die Funktion der Gene angelehnt: Rot: Regulatoren, Blau: Struktur, Grün: Kofaktorbiosynthese und Orange: Elektronentransport. Die Zahlen markieren die relative Position im Genom nach der Annotierung der NCBI-Datenbank für *R. capsulatus* SB1003 (Strnad et al., 2010).

B Ergebnisse der Microarrayanalyse. Die Zahlen stellen die Expressionsveränderung im Vergleich Infrarotdioden zu Blaulichtdioden dar. Die Verlaufsfarbskala zeigt die Stärke der Expressionsveränderung an, wobei Änderungen im Bereich größer 0,5 und kleiner 2,0 nicht gefärbt sind. Die Verlaufsfarbskala wurde in den Werten 2 (gelb) bis maximal 16 (rot) angelegt, um diesen Bereich der Transkriptmengenänderung farblich unterscheiden zu können.

In Abb.3.12.A sind die Transkriptionseinheiten der Gene dargestellt die für Proteine kodieren die am Aufbau des Nitrogenaseenzymkomplexes beteiligt sind. In Abb.3.12.B sind farblich und numerisch die Unterschiede in der Expression der einzelnen Gene als Quotient dargestellt. Die farbliche Skala in Abb.3.12.B ist von 0 bis 16 gewählt, Werte kleiner zwei sind weiß dargestellt.

Die Expressionsdaten der Microarrayanalyse zeigten in bestimmten Bereichen den positiven Einfluss der Infrarotdioden bzw. negativen Einfluss der Blaulichtdioden auf die Expression der Nitrogenasegene, wie sie aus den Beobachtungen in Kap.3.1.4 zu erwarten waren. In einigen Bereichen zeigten sich wiederum Unregelmäßigkeiten in den Transkriptmengen von Genen die zu einer Transkriptionseinheit gehören.

Wie schon bei dem Vergleich Nitrogenase dereprimierenden zu Nitrogenase reprimierenden Bedingungen (Kap.3.2.1) zeigten sich bei einigen der vermuteten bzw. bestätigten Transkriptionseinheiten, wie z.B. dem Operon *rnfABCDGE*, keine gleichmäßige Steigerung der Transkriptmenge im gesamten Operon. Bei den Gene, welche den Anfang des Operons markieren, wurden kaum Veränderungen in der Transkriptmenge nachgewiesen (*rnfA* 1,1 | *rnfB* 1,3) wohingegen die letzteren Gene eine Erhöhung der Transkriptmenge zeigten (*rnfD* 3,1 | *rnfE* 2,6). Die Unterschiede in der Transkriptmenge einer Transkriptionseinheit lassen sich hier am besten durch partielle Degradation oder Prozessierung der mRNA erklären.

Die Gene der Nitrogenasetranskriptionsaktivatoren *NifA1* und *NifA2* sind positiv reguliert. Die Transkriptmenge ist jeweils um den Faktor 3,3 (*nifA1*) bzw. 3,7 (*nifA2*) erhöht. Ebenfalls sind erwartungsgemäß die Gene für den Nitrogenaseenzymkomplex *nifHDK*, welche zu einer Transkriptionseinheit gehören, im Mittel unter Infrarotdioden um den Faktor 26,8 mal stärker exprimiert als unter Blaulichtdioden.

Das Gen *nifN* (6,6), welches für ein Protein kodiert das am Aufbau des Eisen-Molybdän-Kofaktors für die Nitrogenase beteiligt ist, war positiv reguliert. Ebenso zeigten die Gene für die Ferredoxine *FdI* (*fdxN* 6,5) und *FdV* (*fdxD* 4,5) eine positive Expressionsänderung unter Infrarotdioden.

Die Änderung der Transkriptmenge in dem Vergleich Infrarotdioden zu Blaulichtdioden weist eine hohe Ähnlichkeit zu der Veränderung unter Nitrogenase dereprimierenden zu Nitrogenase reprimierenden Bedingungen auf (Kap.3.2.1).

Für die Anwendung des *R. capsulatus* zu Expression von Proteinen mit Metall-Kofaktoren scheint die Verwendung von Blaulichtdioden zur Anzucht nicht eignet zu sein, da sich ähnliche Effekte zeigten wie unter Nitrogenase reprimierenden Bedingungen.

Die Microarrayanalyse zeigte eine Änderung der Transkriptmenge im Vergleich von Infrarotdioden zu Blaulichtdioden, die mit den Beobachtungen aus dem Versuch zur Synthese des Nitrogenaseenzymkomplex (Kap.3.1.4) korrelieren. Die Änderungen der Expression zeigten eine Stressantwort von *R. capsulatus* auf das Signal Blaulicht oder Lichtmangel-Stress hin.

3.2.2.4. Gene und Transkriptionseinheiten mit starker Änderung der Transkriptionsraten im Vergleich Infrarotdioden zu Blaulichtdioden

Bei der weiteren Auswertung der Microarraydaten zeigten sich vier weitere stark regulierte Bereiche, bei denen die Gene bereits untersucht und zu einer Transkriptionseinheit zusammengefasst wurden oder anhand der Microarraydaten eine solche Transkriptionseinheit zu vermuten ist. Dazu gehören die Gene *pstSCAB*, welche für einen Phosphat-ABC-Transporter kodieren und die Gene *phoUB* für die Regulatoren dieses Transporters, das Gen *flaA*, welches für ein Flagellinprotein kodiert, die Gene *flaF* und *flbT*, die für Regulatoren der Flagellensynthese kodieren und die *cspA* Gene, die für Kälteschockproteine kodieren und sich nahe der putativen Genen RCAP_rcc00608-00610 (*cpsA*₁) und RCAP_rcc02890-02892 (*cpsA*₃) befinden, welche möglicherweise zu je einer Transkriptionseinheit gehören.

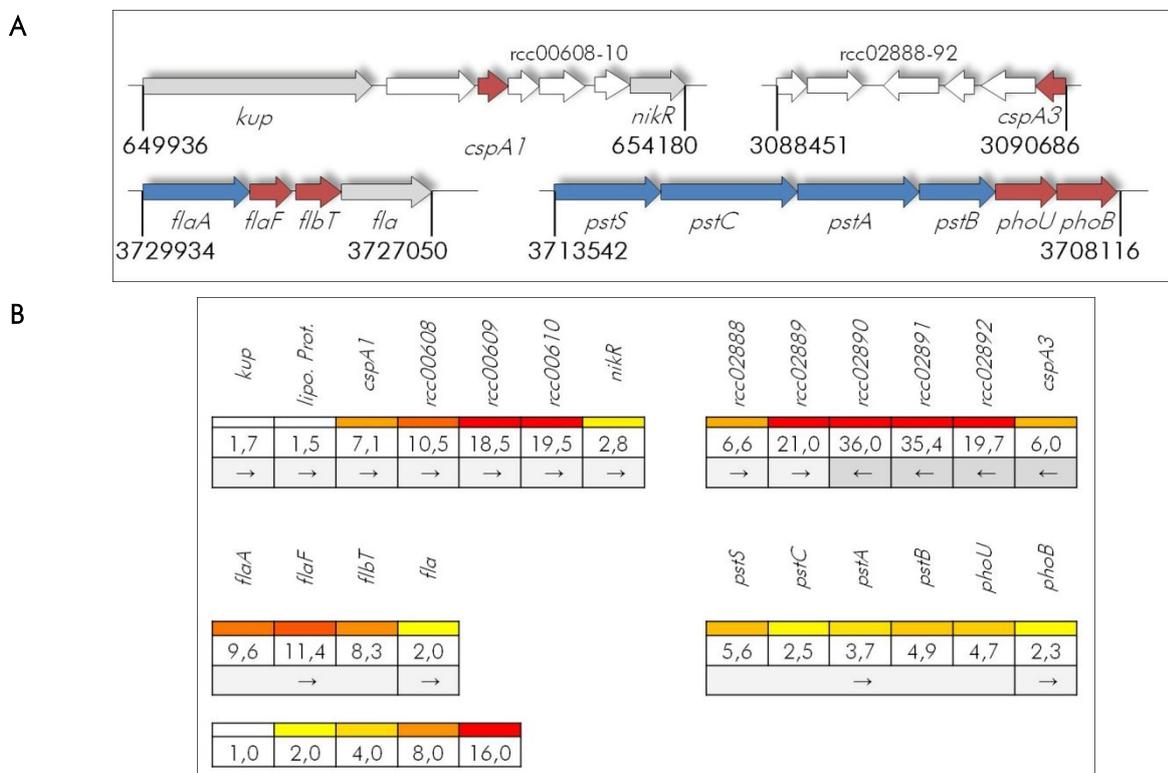


Abb.3.13 Einfluss der Lichtquelle auf die Expression verschiedener Gene in *R. capsulatus*. Der *R. capsulatus* Wildtyp B10S wurde in RCV-Minimalmedium, in einem Kulturvolumen von 10 ml, als Lichtquelle wurden Infrarotdioden oder Blaulichtdioden verwendet.

A Schematische Darstellung von Genen mit deutlicher Änderung der Transkriptmenge, die Pfeile symbolisieren Leserichtung, Größe und Anordnung der Gensequenzen. In Zeile 1 sind die möglichen Transkriptionseinheiten von putativen Genen dargestellt, die zudem von Genen für Kälteschockproteine flankiert werden. In Zeile 2 sind die Gene für ein Flagellinprotein bzw. für die Regulatoren der Flagellensynthese dargestellt und das Operon für einen Phosphat-ABC-Transporter. Die Zahlen markieren die relative Position im Genom nach der Annotierung der NCBI-Datenbank für *R. capsulatus* SB1003.

B Ergebnisse der Mircoarrayanalyse. Die Zahlen stellen die Expressionsveränderung im Vergleich Infrarotdioden zu Blaulichtdioden dar. Die Verlaufsfarbskala zeigt die Stärke der Expressionsveränderung an, wobei Änderungen im Bereich größer 0,5 und kleiner 2,0 nicht gefärbt sind. Die Verlaufsfarbskala wurde in den Werten 2 (gelb) bis maximal 16 (rot) angelegt, um diesen Bereich der Transkriptmengenänderung farblich unterscheiden zu können.

In Abb.3.13.A sind die Transkriptionseinheiten der Genebereiche dargestellt bei denen über den gesamten Bereich ein deutlicher Unterschied der Expression im Vergleich der Anzucht unter Infrarotdioden zur Anzucht unter Blaulichtdioden festzustellen war. In Abb.3.12.B sind farblich und numerisch die Unterschiede in der Expression der einzelnen Gene als Quotient dargestellt. Die farbliche Skala in Abb.3.12.B ist von 0 bis 16 gewählt, Werte kleiner zwei sind weiß dargestellt. Im Falle des *pstSCAB-phoU*-Operons ist die Expression im Mittel um den Faktor 4,0 gesteigert. Die *pst*-Gene kodieren für einen Phosphattransporter, die Gene *phoU* und *phoB* kodieren für die Regulatoren dieses Transporters. Im Falle des Operons *flaAF-flbT* ist die Expression im Mittel um den Faktor 9,8 gesteigert. Die Gene *flaA* kodiert für ein Flagellinprotein, die Gene *flbA* und *flbT* kodieren für Flagellinbiosynthese-Regulatoren.

Zwei Bereiche putativer Proteine waren im Mittel unter Infrarotdioden um den Faktor 13,9 (*cspA1*, RCAP_rcc00608-RCAP_rcc00610) und 23,6 (*cspA3*, RCAP_rcc02892-RCAP_rcc02890, RCAP_rcc02889) stärker exprimiert als unter Blaulichtdioden. Bei den angegebenen 'RCAP_rcc'-Nummern handelt es sich um Datenbankeinträge in der NCBI Genom-Datenbank für *R. capsulatus* SB1003 (Strnad et al., 2010). Die *cspA* Gene kodieren für Proteine welche bei der Kälteschock-Stressantwort exprimiert werden.

Bei dem Vergleich der Transkriptmengen zwischen Infrarotdioden und Blaulichtdioden zeigte sich für vier mögliche bzw. bereits annotierte Transkriptionseinheiten eine starke Änderung der Transkriptmengen. In Bezug auf die Anwendung von *R. capsulatus* als Expressionswirt und speziell zur Expression von Membranproteinen oder Proteinen mit Metall-Kofaktoren lässt sich hier zunächst keine Aussagen treffen, da entweder die Funktion der Proteine, für die die betroffenen Gene kodieren, nicht bekannt ist oder es keinen direkten Zusammenhang zu den untersuchten Bedingungen der Beleuchtung mit Infrarot- oder Blaulichtdioden gibt bzw. kein direkter Zusammenhang zur heterologen Expression herzustellen ist.

3.2.3. Das "photoactive yellow protein" PYP

Das "photoactive yellow protein" PYP ist ein Blaulichtrezeptor mit unbekannter Funktion. *Rhodobacter capsulatus* verfügt über das Protein PYP als einzigen bekannten Blaulichtrezeptor. Durch die starken Veränderungen von *R. capsulatus* unter Bestrahlung mit Blaulichtdioden, lag die Vermutung nahe, dass der Blaulichtrezeptor PYP bei der Regulation bestimmter Prozesse wie der Akkumulation von Photosystem- bzw. Photopigmenten oder der Synthese und Aktivität des Nitrogenaseenzymkomplexes eine Rolle spielt. Daher wurde in den unter Kap.3.1.2 - 3.1.4 beschriebenen Versuchen der *R. capsulatus* Stamm RB1, bei dem das *pyp*-Gen durch eine Insertionsmutation ausgeschaltet wurde, mitgeführt.

3.2.3.1. Auswirkungen verschiedener Lichtquellen auf das Wachstum des *R. capsulatus* Wildtyps B10S im Vergleich zur *pyp*-Mutante RB1

Wie in Kap.3.1.2 beschrieben, ergaben sich durch die Beleuchtung mit verschiedenen Lichtquellen Unterschiede im Wachstumsverhalten von *Rhodobacter capsulatus*. Um einen möglichen regulatorischen Effekt, der durch den Blaulichtrezeptor PYP vermittelt wird, nachzuweisen, sollte eine Wachstumskurve mit dem Stamm RB1, bei dem das *pyp* Gen durch eine Insertionmutation ausgeschaltet ist, erstellt und mit dem Wildtyp verglichen werden.

Der Versuch wurde mit dem *R. capsulatus* Wildtyp Stamm B10S (Kap.2.1.2) durchgeführt. Die Kulturen wurden in einem Volumen von 10 ml in gasdicht verschließbaren Kultivierungsgefäßen unter anaeroben Bedingungen angezogen. Als Medium wurde RCV-Minimalmedium (Kap.2.4.1.3) verwendet, welches Malat als Kohlenstoffquelle und L-Serin als Stickstoffquelle beinhaltet. Als Lichtquelle wurden handelsübliche 60 W Glühlampen und Leuchtdioden verwendet. Dabei wurden die Kulturen zum einen mit 60 W Glühlampen belichtet, zum anderen wurden die Leuchtdioden-Platinen verwendet. Bei den Leuchtdioden-Platinen erfolgte die Beleuchtung mit Infrarotdioden, mit Blaulichtdioden und mit Infrarot- und Blaulichtdioden. Die Kulturen wurden mit einer OD_{660} von 0,05 inokuliert. Im weiteren Verlauf wurden über einen Zeitraum von 68 h Proben á 100 µl für eine Trübungsmessung zur Bestimmung der Zelldichte entnommen.

Abbildung 3.14 zeigt die Entwicklung der Zelldichte der *R. capsulatus* Zellkulturen unter phototropher Anzucht unter Verwendung verschiedener Lichtquellen. Angegeben ist jeweils der Mittelwert einer Dreifachbestimmung, über einen Zeitverlauf von 68 h als Kurve. Die Standardabweichung ist im Diagramm nicht angegeben und lag im Mittel 0,04. Proben wurden nach 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 55, 58 und 68 h entnommen.

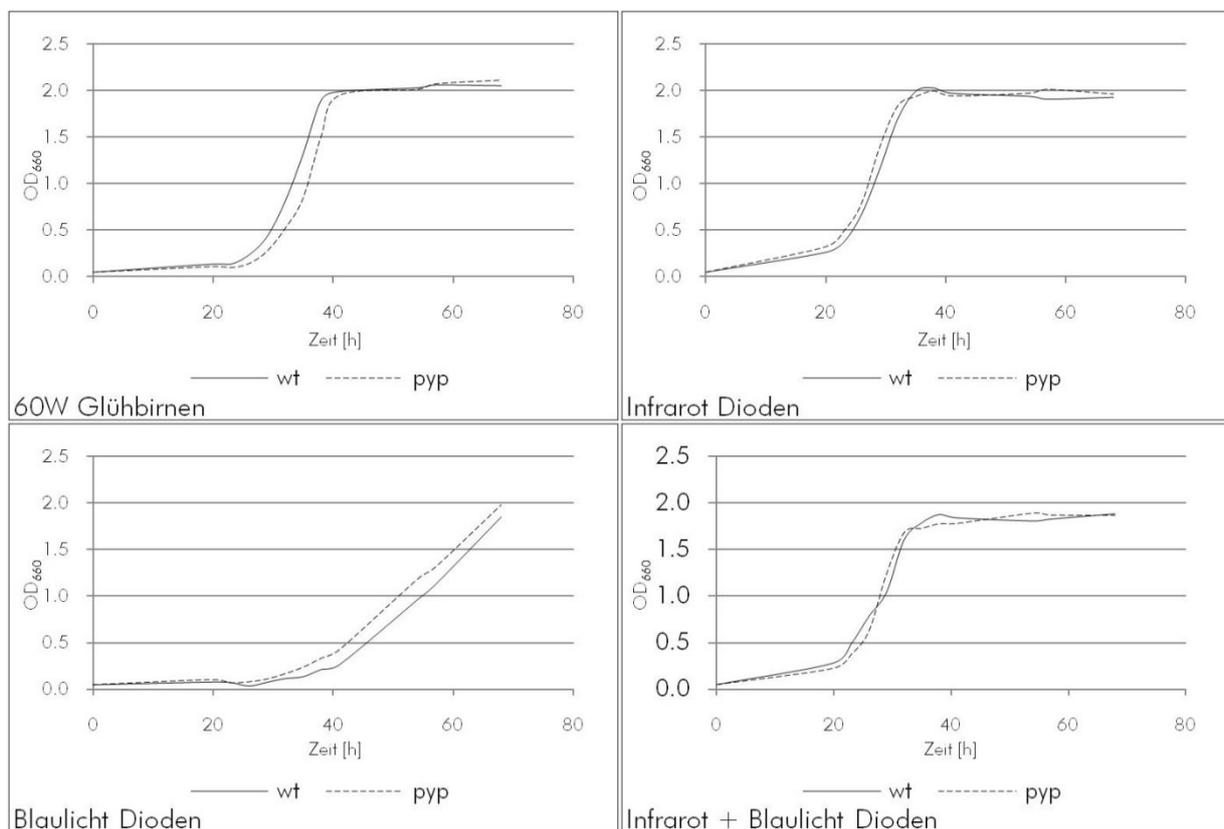


Abb.3.14 Einfluss unterschiedlicher Lichtquellen auf das phototrophe Wachstum von *R. capsulatus* Wildtyp B10S und *pyp*-Mutante RB1. Zelldichte [OD₆₆₀] des *R. capsulatus* Wildtyps B10S (wt) und der Mutante RB1 (*pyp*) in RCV-Minimalmedium im Zeitverlauf, in einem Kulturvolumen von 10 ml, unter Bestrahlung mit 60 W Glühbirnen, Infrarotdioden, Blaulichtdioden und Infrarot- & Blaulichtdioden, jeweils im direkten Vergleich der Stämme B10S (wt) und RB1 (*pyp*). Den Kulturen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten eine Probe von 100µl für eine Trübungsmessung bei 660 nm zur Bestimmung der Zelldichte entnommen.

Abb.3.14 zeigt die Zelldichte [OD₆₆₀] der *R. capsulatus* B10S- und RB1-Kulturen unter verschiedenen Strahlungsbedingungen über einen Verlauf von 68 h.

In Kap.3.1.2 ist die Auswirkung verschiedener Lichtquellen auf das Wachstum des *R. capsulatus* Wildtyps B10S beschrieben. Der Stamm RB1 zeigte unter den verschiedenen Bedingungen die gleichen Phänotypen wie der Wildtyp B10S. Die Generationszeiten betragen 5 h für die Kulturen unter 60 W Glühbirnen, 5 h für die Kulturen unter Infrarotdioden, 4,5h für die Kulturen unter Infrarot- und Blaulichtdioden. Wie der Wildtyp B10S zeigte auch die Mutante eine erhöhte Generationszeit unter Beleuchtung mit Blaulichtdioden. Die Generationszeit betrug hier 12 h.

Die Zellmasse nach Erreichen der stationären Phase war, wie beim Wildtyp, bei allen Kulturen gleich (OD₆₆₀ ca. 2). Da keine Veränderung auf das Wachstum von *R. capsulatus* unter den verschiedenen Bedingungen durch die Deletion des *pyp* Gens festzustellen war, konnte kein direkter regulatorischer Effekt durch den Blaulichtrezeptor PYP bzw. eines assoziierten Regulators festgestellt werden.

3.2.3.2. Auswirkungen verschiedener Lichtquellen auf die Pigmentakkumulation des *R. capsulatus* Wildtyps B10S im Vergleich zur *pyp*-Mutante RB1

Wie in Kap.3.1.3 beschrieben, ergaben sich durch die Beleuchtung mit verschiedenen Lichtquellen Unterschiede bei der Pigmentakkumulation von *Rhodobacter capsulatus*. Um einen möglichen regulatorischen Effekt, der durch den Blaulichtrezeptor PYP vermittelt wird, nachzuweisen, sollte die Pigmentakkumulation im Stamm RB1, bei dem das *pyp* Gen durch eine Insertionmutation ausgeschaltet ist, gemessen und mit dem Wildtyp verglichen werden.

Die Anzucht der Kulturen erfolgte wie unter Kap.3.1.2 beschrieben. Den Kulturen wurde bei einer OD₆₆₀ von 1,0 eine Probe von 200 µl für eine Absorptionsmessung entnommen. Um die Pigmente aus den Zellen zu extrahieren, wurden die Zellen in Ethanol überführt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt. Die Messung über einen Messbereich von 300 bis 900 nm in Schritten von 1 nm durchgeführt die Absorption des Sphaeroiden bei 450 nm und des Bakteriochlorophyll *a* bei 775 nm ist als Balkendiagramm dargestellt (Abb.3.15).

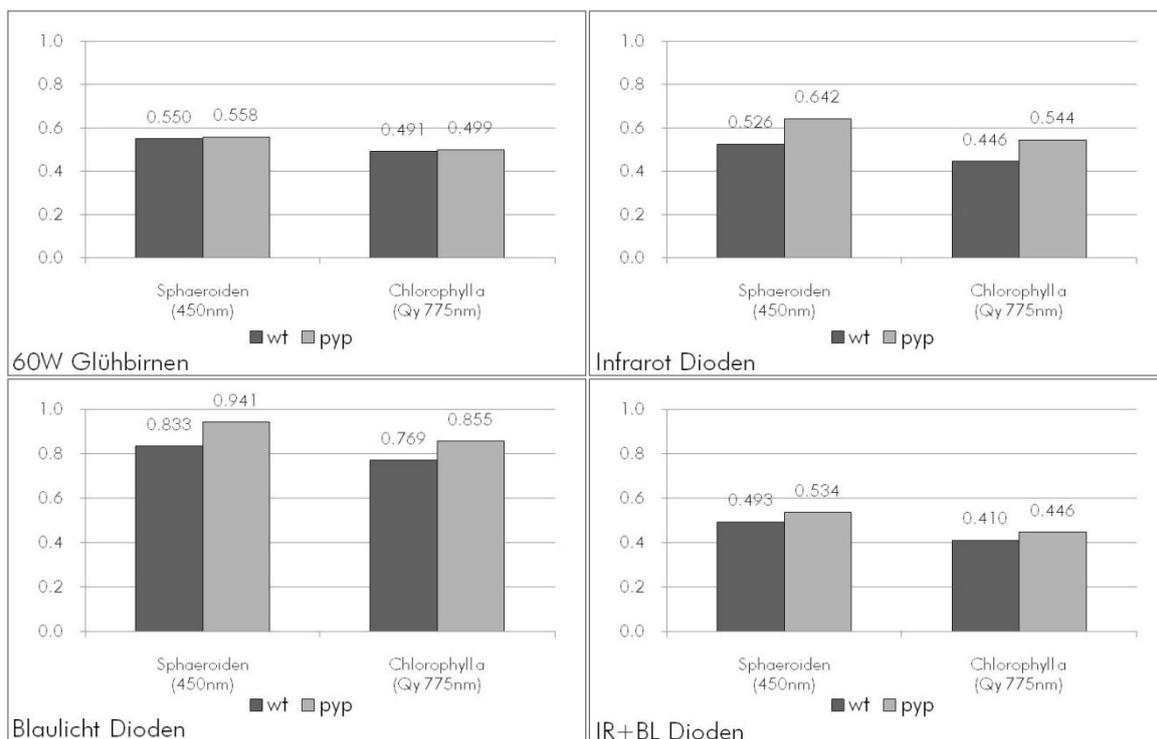


Abb.3.15 Einfluss verschiedener Lichtquellen auf die Pigmentakkumulation von *R. capsulatus* Wildtyp B10S und *pyp*-Mutante RB1. Darstellung der Absorptionsmaxima des *R. capsulatus* Wildtyps B10S und der *pyp*-Mutante RB1 im physiologisch relevanten Spektrum als Balkendiagramm, jeweils im direkten Vergleich der Stämme B10S und RB1. Der *R. capsulatus* Wildtyps B10S und die *pyp*-Mutante RB1 wurde in RCV-Minimalmedium, in einem Kulturvolumen von 10 ml, unter Bestrahlung mit 60 W Glühbirnen, Infrarotdioden, Blaulichtdioden und Infrarot- & Blaulichtdioden angezogen. Den Kulturen bei einer Zelldichte [OD₆₆₀] von 1,0 ein Probe von 200 µl entnommen, die Pigmente in Ethanol extrahiert und photometrisch gemessen.

Abbildung 3.15 zeigt die Absorption der Photopigmente bei 450 nm für das Sphaeroiden und bei 775 nm für das Bakteriochlorophyll a , in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD_{660} von 1,0. Die Unterschiede, die sich beim Wildtyp B10S unter den verschiedenen Lichtbedingungen ergaben, wurden bereits in Kap.3.1.3 beschrieben. Der Stamm RB1 zeigt nur eine minimale Erhöhung in der Akkumulation der Photopigmente gegenüber dem Wildtyp. Die geringen Unterschiede in der Pigmentakkumulation lassen keinen Rückschluss auf ein regulatorisches Phänomen zu, an dem der Blaulichtrezeptor PYP bzw. ein assoziierter Regulator beteiligt ist.

3.2.3.3. Auswirkungen verschiedener Lichtquellen auf die Bildung des Nitrogenaseenzymkomplexes des *R. capsulatus* Wildtyps B10S im Vergleich zur *pyp*-Mutante RB1

Rhodobacter capsulatus reguliert die Gene für die Stickstofffixierung durch die Regulatoren NifA1 und NifA2, sowie durch die übergeordneten Regulatoren GlnB/K und NtrB/C (Kap.1.3.2 ff). Ebenfalls besteht durch die Regulation des Nitrogenasetranskriptionsaktivators NifA2 vermittelt durch RegA eine Verbindung zum RegB/A Regulationssystem der Photosynthese. RegA ist in der Lage die Expression von NifA2 positiv zu beeinflussen. Die Stickstofffixierung ist energieintensiv und damit ein Kandidat für eine lichtabhängige Regulation. Durch einen Nachweis der Dinitrogenasereduktase NifH sollte ein regulatorischer Effekt von PYP auf die Expression der Nitrogenasegene untersucht werden.

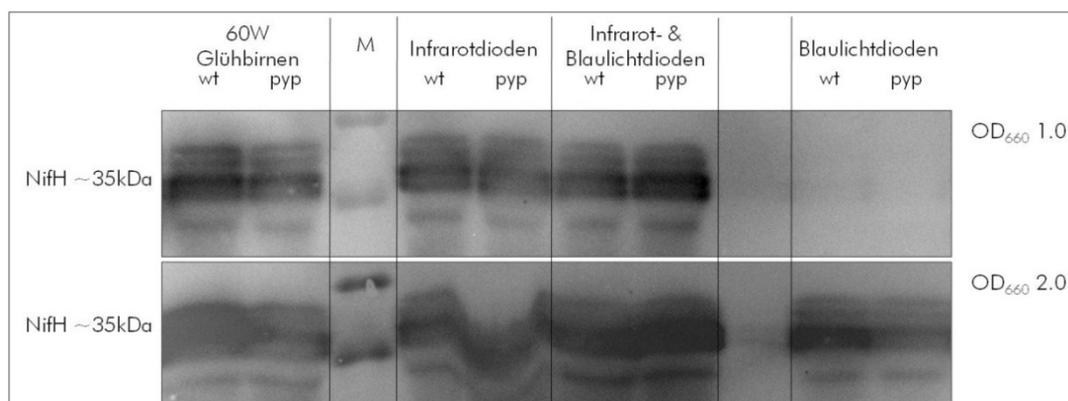


Abb.3.16 Einfluss verschiedener Lichtquellen auf die Synthese der Dinitrogenasereduktase in logarithmischer Wachstumsphase und stationärer Phase Wildtyp B10S und *pyp*-Mutante RB1. Immunologischer Nachweis der Dinitrogenasereduktase des *R. capsulatus* Wildtyp B10S und der *pyp*-Mutante RB1. Der Wildtyp *R. capsulatus* B10S wurde in RCV-Minimalmedium, in einem Kulturvolumen von 10 ml, unter Bestrahlung mit 60 W Glühbirnen, Infrarotdioden, Blaulichtdioden und Infrarot- & Blaulichtdioden angezogen. Proben von 500 μ l wurden bei einer OD_{660} von 1,0 und 2,0 entnommen, mittels SDS-Page separiert und mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Der immunologische Nachweis erfolgte durch einen NifH-spezifischen Antikörper. Die beiden prominenten Banden in den Spuren stellen die ADP-ribosylierte (oben) und nicht ADP-ribosylierte Form (unten) des NifH dar. M - Marker (40kDa/35kDa).

Abbildung 3.15 zeigt den immunologischen Nachweis der Dinitrogenasereduktase NifH. Unter Kap.3.1.4 sind die Auswirkungen verschiedener Lichtquellen auf die Akkumulation der Nitrogenasereduktase im *R. capsulatus* Wildtyp B10S beschrieben. Der Vergleich zwischen dem Wildtyp B10S und dem Stamm RB1 zeigte keinen Unterschied in der Akkumulation der Dinitrogenasereduktase unter den verschiedenen Bedingungen und zwischen Wildtyp und Mutante.

Die Untersuchungen des Stammes RB1, in den Versuchen Kap.3.2.3.1 - Kap.3.2.3.3, konnten keinen nachweisbaren Effekt, einer Deletion des *pyp*-Gens, auf Wachstum, Pigmentakkumulation oder Stickstofffixierung erbringen.

3.2.3.4. Auswirkungen verschiedener Lichtquellen auf die Transkription des *R. capsulatus* Wildtyps B10S im Vergleich zur *pyp*-Mutante

In den Kap.3.2.3.1 - Kap.3.2.3.3 wurde der Stamm RB1, mit einer Insertionsmutation des *pyp*-Gens, auf Effekte untersucht die sich aus der Beleuchtung mit verschiedenen Lichtquellen ergeben. Unter den gewählten Versuchsbedingungen und mit den gewählten Methoden konnte kein Effekt der Deletion des Blaulichtrezeptors PYP nachgewiesen werden. Die beträchtlichen Veränderungen im Wachstum, bei der Photosynthese und der Stickstofffixierung des *R. capsulatus* unter Blaulichtbedingungen machen eine Beteiligung des einzigen Blaulichtrezeptors PYP an diesen Effekten dennoch wahrscheinlich, da die vorangegangenen Experimente vermuten lassen, dass die Änderungen der Lichtbedingungen bestimmte regulatorische Systeme in *R. capsulatus* beeinflussen. Für eine genauere Untersuchung eines möglichen regulatorischen Effekts des "photoactive yellow proteins" sollte eine Transkriptionsanalyse mittels Microarray vorgenommen werden. Das Photosystem von *R. capsulatus* absorbiert Infrarotstrahlung bei 800 nm und 860 nm Wellenlänge, durch das Bacteriochlorophyll *a*, und sichtbares Licht bei einer Wellenlänge im Bereich von 435 nm bis 535 nm, durch das Carotenoid Sphaeroidin. Um regulatorische Veränderungen auszuschließen die sich durch Lichtmangel ergeben wurden der *R. capsulatus* Wildtyp B10S und die *pyp*-Mutante RB1 mit Infrarot- und Blaulicht beleuchtet. Weiterhin wurden die Proben bei einer Zelldichte OD₆₆₀ von ~2,0 entnommen also in der späten logarithmischen bzw. frühen stationären Phase, da in den vorherigen Versuchen keine Veränderungen in der logarithmischen Phase zu messen waren.

Der Versuch wurde mit dem Stämmen *R. capsulatus* B10S und RB1 durchgeführt. Die Kulturen wurden in einem Volumen von 20 ml in gasdicht verschließbaren "hungates" unter anaeroben Bedingungen angezogen. Das verwendete Medium war RCV-Minimalmedium, welches Malat als

Kohlenstoffquelle und L-Serin als Stickstoffquelle beinhaltete. Als Lichtquelle wurden Infrarot- und Blaulichtdioden verwendet. Die Kulturen wurden mit einer OD_{660} von 0,05 inokuliert. Im weiteren Verlauf wurde bei einer OD_{660} von 1,4 bis 1,8 Zellmaterial entnommen, welches mit RCV-Minimalmedium gewaschen wurde und wiederum für die Inokulation (OD_{660} von 0,05) eines "*hungates*" genutzt wurde. Bei einer OD_{660} von 1,9 bis 2,1 wurde die RNA aus den Zellen extrahiert, um mittels Microarray eine Bestimmung der Transkriptmenge vornehmen zu können.

Die RNA wurde mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und durch die Verwendung von Cyaninfluoreszenzfarbstoff gekoppelten dCTP's markiert. Anschließend wurde die so markierte cDNA auf einem Microarraychip hybridisiert und die Fluoreszenzen anschließend mittels Microarray "*High-Resolution-Scanner*" ausgelesen. Die so erhaltenen Fluoreszenzdaten wurden nach Smyth (Smyth, 2002) analysiert.

Verglichen wurde die Genexpression des *R. capsulatus* B10S Wildtyps unter Bestrahlung mit Infrarotdioden und Blaulichtdioden mit der Mutante RB1 unter den gleichen Bedingungen. Die Werte, geben die Änderung der Transkriptmenge der jeweiligen Gene der *pyp*-Mutante RB1 zu denen des Wildtyps an. Die Änderungen in der Transkriptmenge mit Werten von 0 bis 0,5 bezeichnen eine negative Veränderung der Expression, hierbei sind die reziproken Werte angegeben mit einem negativen Vorzeichen. Die Änderungen in der Transkriptmenge mit Werten von 0,5 bis 2 bezeichnen keine oder zu geringe Änderungen in der Expression und Werte über 2 zeigen eine positive Veränderung in der Expression der *pyp*-Mutante RB1.

In Abb.3.17.A sind die Operonstrukturen der Gene dargestellt, die für Proteine kodieren, die am Aufbau des Photosyntheseapparates beteiligt sind. In Abb.3.17.B sind farblich und numerisch die Unterschiede in der Expression der einzelnen Gene als Quotient dargestellt, wobei hier für die negative Regulation die reziproken Werte verwendet wurden, welche mit einem negativen Vorzeichen versehen wurden. Die farbliche Skala in Abb.3.17.B ist von -1 bis -8 gewählt um auch geringere Veränderungen in der Expression farblich darstellen zu können, Werte größer -2 sind weiß dargestellt.

Die Expressionsdaten der Microarrayanalyse zeigten nahezu über das gesamte Gencluster eine negative Regulation der Photosynthesegene in der *pyp*-Mutante RB1.

Die Operons für die Photosynthesekomplexe I (*pufQBA* | \emptyset -4,6) und das Reaktionszentrum (*pufLMX* | \emptyset -5,1) und den Photosynthesekomplex II (*pucBACDE* | \emptyset -4,4) zeigen eine starke negative Veränderung der Transkriptmenge. Von den Operons für die Synthese des Bacteriochlorophyll *a* [(*bchFNBHLM* | \emptyset -2,8) (*bchEJG*-hyp.Prot.-*bchP-idi* | \emptyset -5,8) (*crtA-bchIDO* | \emptyset -2,9) (*bchCXYZ* | \emptyset -5,3)], zeigen zwei eine ebenfalls starke negative Veränderung der Transkriptmenge und zwei eine weniger starke Veränderung. Bei den beiden Operons, welche eine stärkere Veränderung der Transkriptmenge aufwiesen, handelt es sich um die Operons, welche durch den Repressor CrtJ beeinflusst werden können. Die Operons für die Synthese des Carotenoids Sphaeroiden [(*crtIBK* | \emptyset -3,4) (*crtDC* | \emptyset -2,2) (*crtFE* | \emptyset -3,5)] zeigen eine weniger starke Veränderung der Transkriptmenge.

Die Transkriptmenge der Genen für die Regulatoren *RegB/A* und *HvrA* zeigen beim Operon *senC-regA-hvrA* (\emptyset -2,7) ebenfalls eine Veränderung.

Aus den Proben welche für die Microarrayanalysen verwendet wurden, wurde zusätzlich eine Probe von 100 μ l für einen Absorptionsmessung und Bestimmung der Pigmentakkumulation entnommen. Dabei wurden die 100 μ l Proben mit dH₂O auf ein Volumen von 1 ml eingestellt. Die Messung wurde über einen Messbereich von 300 bis 900 nm in Schritten von 1 nm vorgenommen. Die Absorption Bacteriochlorophyll *a* bei 800 nm und 860 nm ist als Balkendiagramm dargestellt (Abb.3.18).

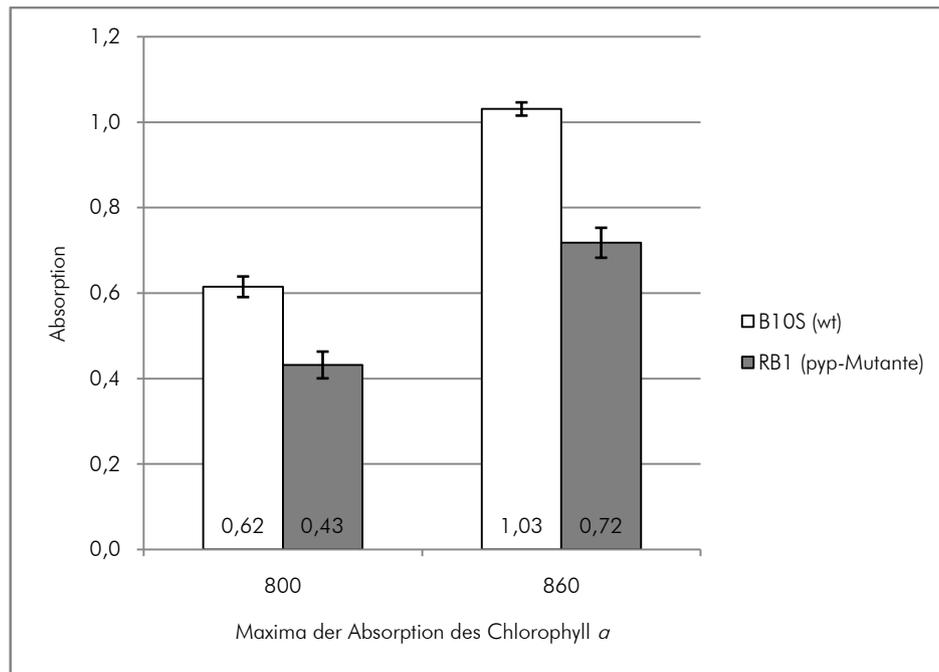


Abb.3.18 Pigmentakkumulation von *R. capsulatus* Wildtyp B10S und *pyp*-Mutante RB1 unter Infrarot- und Blaulicht. Darstellung der Absorptionsmaxima des Bakteriochlorophyll *a* des *R. capsulatus* Wildtyps B10S und der *pyp*-Mutante RB1 als Balkendiagramm, jeweils im direkten Vergleich der Stämme B10S und RB1. Der *R. capsulatus* Wildtyps B10S und die *pyp*-Mutante RB1 wurde in RCV-Minimalmedium, in einem Kulturvolumen von 20 ml, unter Bestrahlung mit Infrarot- & Blaulichtdioden angezogen. Den Kulturen bei einer Zelldichte [OD₆₆₀] von 2,0 ein Probe von 100 µl entnommen und die Absorption der Zellen photometrisch bestimmt.

Abb.3.18 zeigt die Absorption des Bakteriochlorophyll *a* des *R. capsulatus* Wildtyps B10S und der *pyp*-Mutante RB1 unter Infrarot- und Blaulicht in der später logarithmischen bzw. frühen stationären Phase. Für einen direkten Vergleich wurden die Maxima bei 800 nm und 860 nm für das Bakteriochlorophyll *a* verwendet und als Balkendiagramm dargestellt.

Die *pyp*-Mutante RB1 zeigt eine um ca. 30% (800 nm - 29,8% | 860 nm - 30,4%) geringere Akkumulation des Bakteriochlorophyll *a* im Vergleich zum Wildtyp. Dies bestätigt die Daten der Microarrayanalyse, welche eine verminderte Transkriptmenge der Gene für die Photosynthesekomplexe und die Bakteriochlorophyllsynthese gezeigt hatte.

Im Vergleich des Wildtyps B10S unter Infrarot- und Blaulicht und einer *pyp*-Mutante RB1 unter den gleichen Bedingungen, zeigt sich in der *pyp*-Mutante RB1 eine negative Änderung der Transkriptmengen der Gene für den Photosyntheseapparat und eine Verminderung der Akkumulation des Bakteriochlorophyll *a*. Man kann hierbei vermuten, daß im *R. capsulatus* Wildtyp B10S in der späten logarithmischen bzw. frühen stationären Phase unter Blaulicht eine positive Regulation der Gene für den Photosyntheseapparat und dessen Regulatoren stattfindet, welche in einer *pyp*-Mutante nicht vorgenommen werden können.

3.2.3.4.2. Auswirkungen der Deletion des *pyp*-Gens auf die Transkription der Gene für den für den Nitrogenaseenzymkomplex und dessen Regulation

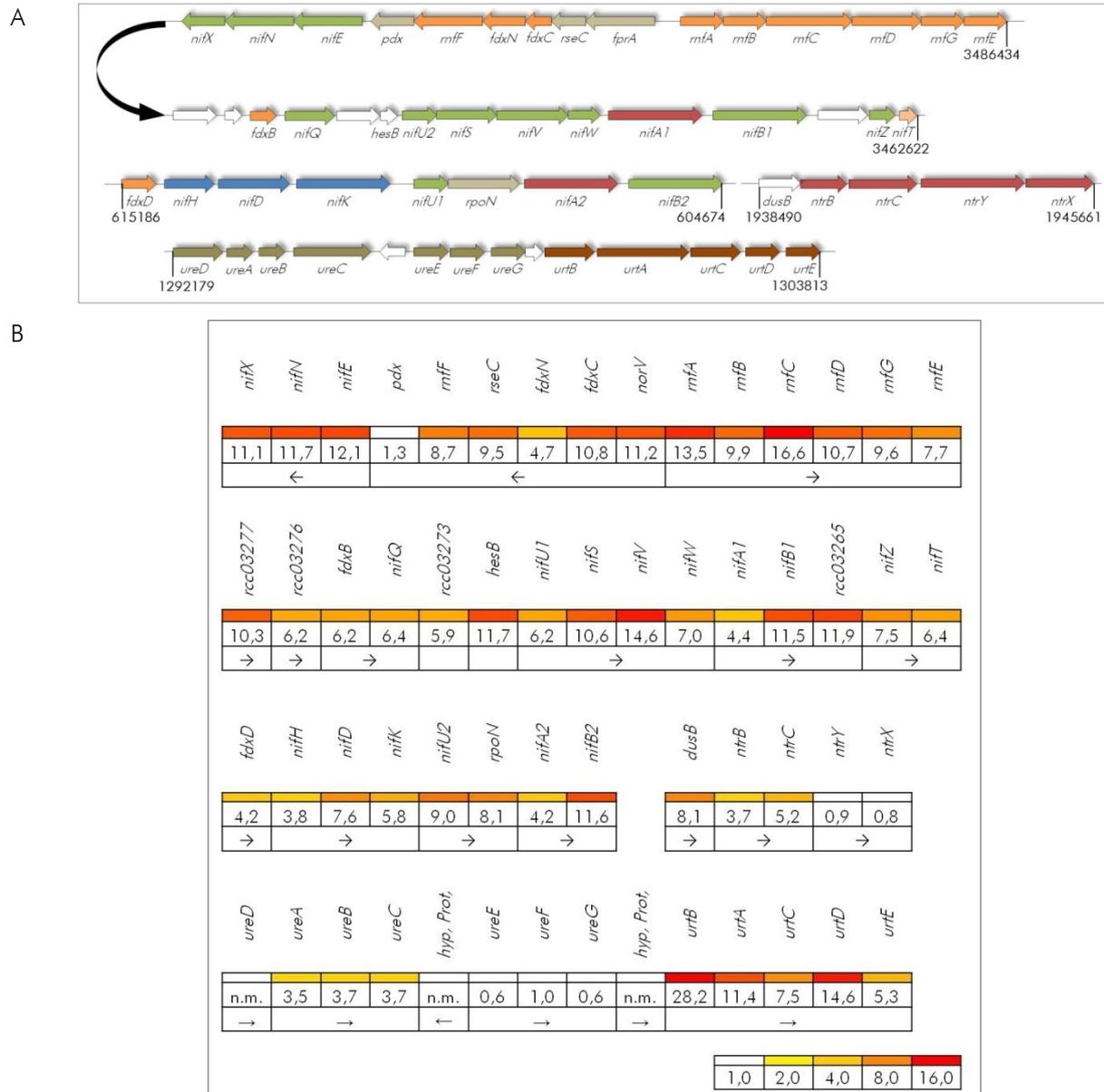


Abb.3.19 Einfluss der Deletion des *pyp*-Gens auf die Expression der Gene für den Photosyntheseapparat in *R. capsulatus*. Der *R. capsulatus* Wildtyp B10S und die *pyp*-Mutante RB1 wurden in RCV-Minimalmedium, in einem Kulturvolumen von 20 ml, als Lichtquelle wurden Infrarot- und Blaulichtdioden verwendet.

A Schematische Darstellung stickstoffregulierter Gene, die Pfeile symbolisieren Leserichtung, Größe und Anordnung der Gensequenzen. Die Gene und Transkriptionseinheiten, der in Zeile 1 und 2 dargestellten Genregion (der schwarze Pfeil zeigt die Verknüpfung der Genregion an) sind stickstoffregulierte Gene, wie z.B. die mit *rnf* benannten Gene ("*rhodobacter nitrogen fixation*"), die mit *nif* benannten Gene ("*nitrogen fixation*") und die mit *fdx* benannten Gene ("*ferredoxin*"); in Zeile 3 ist ein weiteres Nitrogenasegencluster abgebildet, dessen Gene und Transkriptionseinheiten stickstoffreguliert sind, sowie in Zeile 4 die Operons für die Urease (*ure*) und den Ureatransporter (*urt*). Die Farben sind an die Funktion der Gene angelehnt: Rot: Regulatoren, Blau: Struktur, Grün: Kofaktorbiosynthese und Orange: Elektronentransport. Die Zahlen markieren die relative Position im Genom nach der Annotierung der NCBI-Datenbank für *R. capsulatus* SB1003 (Strnad et al., 2010).

B Ergebnisse der Microarrayanalyse. Die Zahlen stellen die Expressionsveränderung im Vergleich Infrarotdioden zu Blaulichtdioden dar. Die Verlaufsfarbskala zeigt die Stärke der Expressionsveränderung an, wobei Änderungen im Bereich größer 0,5 und kleiner 2,0 nicht gefärbt sind. Die Verlaufsfarbskala wird in

den Werten 2 (gelb) bis maximal 16 (rot) angelegt, um diesen Bereich der Transkriptmengenänderung farblich unterscheiden zu können.

In Abb.3.18.A sind die Transkriptionseinheiten der Gene dargestellt die für Proteine kodieren die am Aufbau des Nitrogenaseenzymkomplexes, der Urease und dem Ureatransporter beteiligt sind. In Abb.3.18.B sind farblich und nummerisch die Unterschiede in der Expression der einzelnen Gene als Quotient dargestellt. Die farbliche Skala in Abb.3.18.B ist von 0 bis 16 gewählt, Werte kleiner zwei sind weiß dargestellt.

Die Expressionsdaten der Microarrayanalyse zeigten in allen Bereichen eine positiven Veränderung der Transkriptmenge der Nitrogenase-, Urease und Ureatransportergene, in der *pyp*-Mutante RB1. Das Operon mit den Genen die für die Nitrogenaseenzymkomplex kodieren (*nifHDK*) zeigt eine Erhöhung der Transkriptmenge im Mittel um den Faktor 5,7. Die Gene für die Transkriptionsaktivatoren der Nitrogenase Gene (*nif*) *nifA1* und *nifA2*, zeigen ebenfalls eine Erhöhung der Transkriptmenge im Mittel um den Faktor 4,3. Die weiteren durch diese Transkriptionsaktivatoren regulierten Gene und Operons zeigen eine starke positive Veränderung der Transkriptmenge [(*nifABCDGE* | Ø 11,3) (*norV-fdxCN-rseC-rnfF-pdx* | Ø 7,7) (*nifU1SVW* | Ø 9,6) (*nifENX* | Ø 11,6)].

Sowohl die Gene der Transkriptionsaktivatoren NifA1 und NifA2 als auch die Gene für die Urease und den Ureatransporter sind durch das zwei Komponentenregulationssystem NtrBC reguliert. Von den beiden Operons mit den Genen die für die Urease kodieren, zeigt eines eine positive Änderung der Transkriptmenge (*ureDABC* | Ø 3,6 - berechnet aus den Werten für *ureABC*), das andere zeigt keine oder zu geringe Änderung in der Treanskriptmenge (*ureEFG* | Ø 0,7). Das Operon für den Ureatransporter (*urtBACDE* | Ø 13,4) zeigt eine starke positive Änderung in der Transkriptmenge.

Die Gene für das Zweikomponentenregulationssystem NtrBC zeigen ebenfalls eine positive Änderung der Transkriptmenge in der *pyp*-Mutante RB1.

Wie auch bei den Genen für den Photosyntheseapparat zeigte sich sowohl bei den Genen selbst als auch bei deren Regulatoren eine entsprechende Änderung der Transkriptmenge.

Im Vergleich des Wildtyps B10S unter Infrarot- und Blaulicht und einer *pyp*-Mutante RB1 unter den gleichen Bedingungen, zeigt sich in der *pyp*-Mutante RB1 eine positive Änderung der Transkriptmengen der Gene für den Nitrogenaseenzymkomplex, die Urease und den Ureatransporter. Man kann hierbei vermuten, daß im *R. capsulatus* Wildtyp B10S in der späten logarithmischen bzw. frühen stationären Phase unter Blaulicht eine negative Regulation der Gene für den Nitrogenaseenzymkomplex, die Urease und den Ureatransporter und dessen Regulatoren stattfindet, welche in einer *pyp*-Mutante nicht vorgenommen werden können.

3.2.3.4.3. Auswirkungen der Deletion des *pyp*-Gens auf die Transkription der Gene für das Operon *flaAF-flbT-fla*

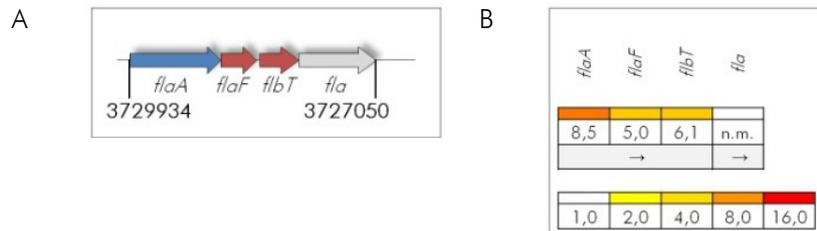


Abb.3.20 Einfluss der Deletion des *pyp*-Gens auf die Expression des Operons *flaAF-flbT-fla* in *R. capsulatus*. Der *R. capsulatus* Wildtyp B10S und die *pyp*-Mutante RB1 wurden in RCV-Minimalmedium, in einem Kulturvolumen von 20 ml, als Lichtquelle wurden Infrarot- und Blaulichtdioden verwendet.

A Schematische Darstellung des Operons *flaAF-flbT-fla*, die Pfeile symbolisieren Leserichtung, Größe und Anordnung der Gensequenzen der Gene für ein Flagellinprotein bzw. für die Regulatoren der Flagellensynthese dargestellt. Die Zahlen markieren die relative Position im Genom nach der Annotierung der NCBI-Datenbank für *R. capsulatus* SB1003.

B Ergebnisse der Microarrayanalyse. Die Zahlen stellen die Expressionsveränderung im Vergleich Infrarotdioden zu Blaulichtdioden dar. Die Verlaufsfarbskala zeigt die Stärke der Expressionsveränderung an, wobei Änderungen im Bereich größer 0,5 und kleiner 2,0 nicht gefärbt sind. Die Verlaufsfarbskala wurde in den Werten 2 (gelb) bis maximal 16 (rot) angelegt, um diesen Bereich der Transkriptmengenänderung farblich unterscheiden zu können.

In Abb.3.19.A ist die Transkriptionseinheit der Gene *flaA* welches für ein Flagellinprotein kodiert, der Gene *flbA* und *flbT*, welche für Flagellinbiosynthese-Regulatoren kodieren, dargestellt. In Abb.3.19.B sind farblich und nummerisch die Unterschiede in der Expression der einzelnen Gene als Quotient dargestellt. Die farbliche Skala in Abb.3.19.B ist von 0 bis 16 gewählt, Werte kleiner zwei sind weiß dargestellt.

Die Transkriptmenge der Gene des Operons *flaAF-flbT-fla* ist in der *pyp*-Mutante RB1 im Vergleich zum Wildtyp B10S im Mittel um den Faktor 6,5 erhöht. Von den Genen und vermuteten Transkriptionseinheiten (Kap.3.2.2.4), welche durch eine starke Veränderung der Transkriptmengen bei dem unter Kap.3.2.2. beschriebenen Versuch aufgefallen waren, konnte bei dem Operon *flaAF-flbT-fla* bei der Untersuchung der *pyp*-Mutante RB1 unter Infrarot- und Blaulicht erneut eine Änderung der Transkriptmenge nachgewiesen werden, bei den anderen Operons ergab sich keine Veränderung (Daten nicht gezeigt).

Im Vergleich des Wildtyps B10S unter Infrarot- und Blaulicht und einer *pyp*-Mutante RB1 unter den gleichen Bedingungen, zeigt sich in der *pyp*-Mutante RB1 eine positive Änderung der Transkriptmengen der Gene für das Operon *flaAF-flbT-fla*. Man kann hierbei vermuten, daß im *R. capsulatus* Wildtyp B10S in der späten logarithmischen bzw. frühen stationären Phase unter Blaulicht eine negative Regulation des Operons *flaAF-flbT-fla* stattfindet, welche in einer *pyp*-Mutante nicht vorgenommen werden können.

3.3. Expressionssystem auf der Basis des Nitrogenase Promotors P_{nif}

Für *Rhodobacter capsulatus* wurde das Expressionssystem auf Basis der pRho Vektoren etabliert, wobei bei den Vektoren zwei Promotoren zum Einsatz kommen. Dies ist zum einen der Promotor der dem *aphII*-Gen, welches zur Ausprägung der Kanamycinresistenz führt, vorgeschaltet ist im Vektor pRhokHi-2 und zum anderen der T7-RNA-Polymerase Promotor im Vektor pRhotHi-2. Der Vektor pRhotHi-2 wird mit dem Stamm *R. capsulatus* B10ST7, der das PhageT7-RNA-Polymerasegen unter Kontrolle des *fru*-Promotors im Genom kodiert, verwendet. Die Expression unter Kontrolle des P_{aphII} führt zu einer geringen Transkriptmenge bei konstitutiver Expression. Die Expression unter Kontrolle des P_{T7} führt zu einer hohen Transkriptmenge, wobei die Expression durch Zugabe von Fructose zum Medium induziert werden kann.

Dieses System sollte um den Promoter welcher, dem *nifHDK*-Operon vorgeschaltet ist, auch als P_{nif} bezeichnet, erweitert werden. Dieser Promotor kontrolliert die Expression des Nitrogenaseenzymkomplexes. Dieser Promotor wird unter den physiologischen Bedingungen phototrophes Wachstum und Stickstoffmangel mit hoher Frequenz abgelesen. Dies sind die Bedingungen welche in *R. capsulatus* die Ausbildung der ICM-Vesikel, also einer vergrößerten Membranoberfläche, und die Synthese von Metall-Kofaktoren forcieren.

3.3.1. Konstruktion des Vektors pRhonHi-2 mit P_{nif}

Zu Beginn dieser Arbeit existierten bereits verschiedene Versionen des P_{nif} . Diese ersten Versionen des P_{nif} basieren alle auf der dem *nifH* Gen vorgelagerten Sequenz, unterschieden sich aber in der Länge der Sequenz stromaufwärts des *nifH* Gens (siehe Abb.3.17).

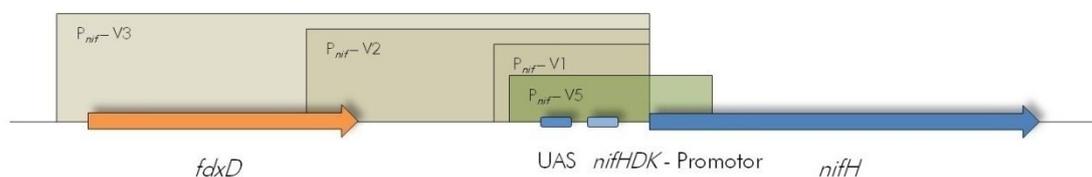


Abb.3.21 Schematische Darstellung der Promotorsequenzen der Versionen P_{nif} -V1-V5. Die farbigen Kästen symbolisieren die Sequenzlänge der verschiedenen *nif*-Promotor Versionen. Die Pfeile symbolisieren die Größe Länge und Ausrichtung der Gene *fdxD* und *nifH*. Zusätzlich sind die beiden Elemente, die "upstream-activating-sequence", kurz UAS, und die Promotorsequenz in ihrer relativen Position zu den Genen eingetragen.

Die Sequenz P_{nif} -V1 hat eine Größe von 266 bp, umfasst die regulatorischen Elemente der UAS ("upstream-activating-sequence") und der Promotorsequenz des *nifHDK* Operons und endet mit dem ATG-Startcodon des *nifH*-Gens. Die Sequenz P_{nif} -V2 hat eine Größe von 769 bp, umfasst

ebenfalls die regulatorischen Elemente der UAS und der Promotorsequenz und endet mit dem ATG-Startcodon des *nifH*-Translationsstarts. Bei der Sequenz P_{nif}-V2 wurde eine Region "upstream" der P_{nif}-V1 Sequenz erfasst da man vermutete, dass sich hier ein noch nicht identifiziertes regulatorisches Element eine sogenannte "enhancer"-Sequenz befindet. Die Sequenz P_{nif}-V3 hat eine Größe von 1228 bp, umfasst ebenfalls die regulatorischen Elemente der UAS und der Promotorsequenz und endet mit dem ATG-Startcodon des *nifH*-Translationsstarts. Diese Sequenz wurde, aus dem gleichen Grund wie P_{nif}-V2, nochmals in Richtung stromaufwärts erweitert. Es umfasst damit auch das komplette Gen *fdxD*, welches stromaufwärts vom *nifH*-Gen gelegen ist, die gleiche Leserichtung aufweist und ebenfalls stickstoffabhängig durch die Nitrogenasetranskriptionsaktivatoren NifA1 und NifA2 reguliert wird. Versuche mit beiden Sequenzen (P_{nif}-V2/V3) zeigten aber eine geringere Expression der Zielgene als unter Kontrolle des Promotors P_{nif}-V1. Die P_{nif} Version V4 wurde noch einmal um 200 bp in Richtung stromaufwärts erweitert. Diese Sequenz wurde nicht erneut getestet da sich auch hier keine Verbesserung zu den Versionen V1-V3 ergaben (J. Bernds / Dipl.Arb.).

Die Sequenz des P_{nif}-V5, mit einer Größe von 404 bp, umfasst wie die Sequenz P_{nif}-V1 die regulatorischen Elemente der UAS und des Promotors, endet aber nicht mit dem ATG-Startcodon des *nifH*-Translationsstarts, sondern enthält 190 bp der genkodierenden Sequenz des Gens *nifH*. Die Sequenz wurde erweitert, da man vermutete, dass sich die "enhancer"-Sequenz im genkodierenden Bereich des *nifH*-Gens befindet.

Die Sequenz des P_{nif} wurde von genomischer DNA des *R. capsulatus* Wildtyps mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pRhotHi-2 eingebracht, aus dem vorher die T7-RNA-Polymerase Promotorsequenz durch Restriktionsendonukleasen entfernt wurde, der so erhaltene Vektor wurde pRhonHi-2 benannt.

3.3.2. Vergleich verschiedener Versionen des P_{nif} bei der Expression des Fluoreszenzreporters YFP

Die Expression vermittelt durch P_{nif} in den Versionen P_{nif} V1-V3 konnte nachgewiesen werden, allein die Expressionsstärke der Promotoren war sehr gering im Vergleich zum *nifHDK*-Operon (J. Bernds / Dipl.Arb.). Um zu überprüfen ob die Erweiterung der Promotorsequenz, um einen Teil des genkodierenden Bereiches des Gens *nifH*, den gewünschten Effekt auf die Expressionsstärke hatte, sollte die Expression vermittelt durch die Promotoren P_{nif} V1-V3 und V5 miteinander verglichen werden. Dazu wurde das Gen für den Fluoreszenzreporter YFP ("yellow-fluorescing-protein") in die Vektoren mit den Promotoren P_{nif} V1-V3 und V5 eingefügt, um die Expressionsstärke der verschiedenen Promotoren zu untersuchen. Die so entstandenen Vektoren pRhonHi-2-YFP V1-V3

und V5 wurden durch Transformation und Konjugation über den *E. coli* Stamm S17-1, in den *R. capsulatus* Stamm B10S eingebracht. Die Fluoreszenz des unter der Kontrolle der verschiedenen Promotoren exprimierten YFP sollte einen Rückschluss auf die Menge des gebildeten Proteins und damit auf die Expressionsstärke der Promotoren geben. Der *R. capsulatus* Wildtyp B10S mit den Vektoren pRhonHi-2-YFP V1-V3 und V5 wurde in 10 ml RCV-Minimalmedium anaerob in gasdicht verschließbaren Kulturgefäßen angezogen. Als Kohlenstoffquelle wurde Malat, als Stickstoffquelle L-Serin verwendet. L-Serin kann von *R. capsulatus* als Stickstoffquelle genutzt werden, inhibiert aber nicht die Synthese des Nitrogenaseenzymkomplexes und damit auch nicht die Expression mittels des P_{nif} . Als Lichtquelle wurden 60 W Glühbirnen verwendet. Die Kulturen wurden mit einer OD_{660} von 0,5 inokuliert und bei einer OD_{660} von 1,0 geerntet. Die Zellen wurden auf eine OD_{660} 0,5 in 1 ml Tris/HCl-Puffer verdünnt und für 4 h, zum Zwecke der Chromophorreifung an der Luft inkubiert. Die Fluoreszenz des YFP wurde an einem Fluoreszenzphotometer bestimmt. In Abb.3.18 ist die Fluoreszenzmessung des YFP bei 530 nm einer Dreifachbestimmung im statistischen Mittel mit Standardabweichung in den verschiedenen *R. capsulatus* Stämmen als Balkendiagramm dargestellt.

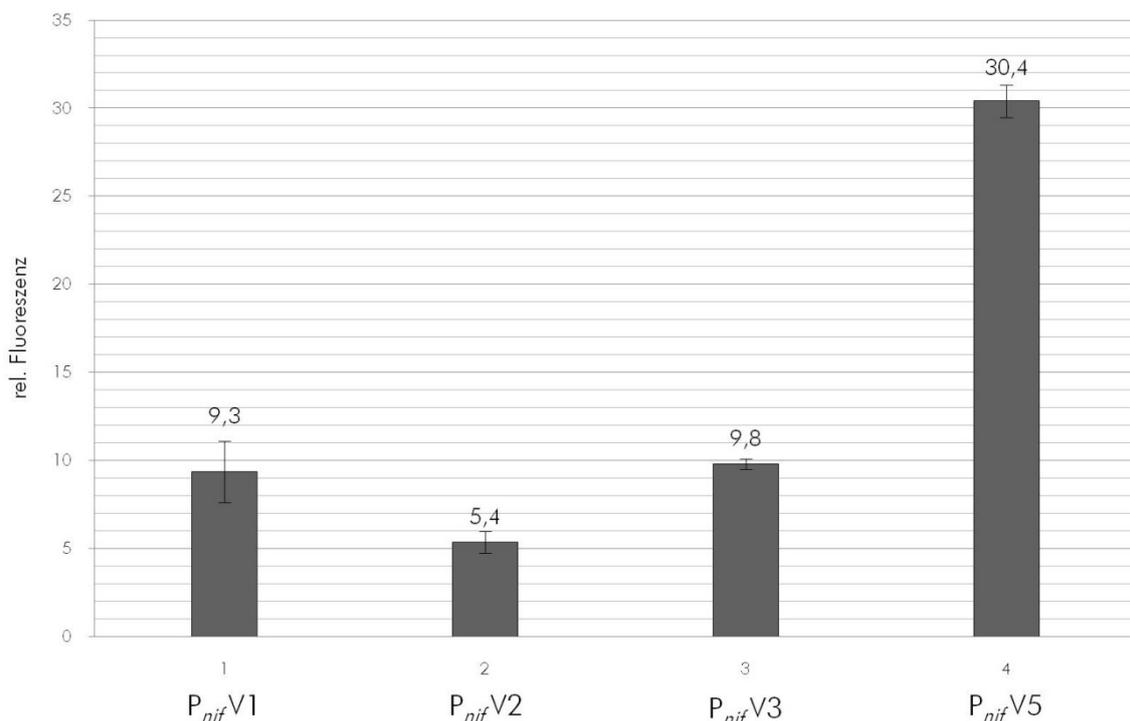


Abb.3.22 Bestimmung der Promotoraktivität verschiedener Versionen des P_{nif} , anhand der relativen Fluoreszenz von YFP in *R. capsulatus* B10S mit den Vektoren pRhonHi-2-YFP V1-5. Die *R. capsulatus* Stämme B10S pRhonHi-2-YFP V1-5 wurden in einem Volumen von 10 ml RCV-Minimalmedium, mit L-Serin als Stickstoffquelle, unter 60 W Glühbirnen angezogen. Die Kulturen wurden mit einer OD_{660} von 0,5 inokuliert und bei einer OD_{660} von 1,0 geerntet. Anschließend wurden die Proben in einen Tris-HCl Puffer überführt, auf eine OD_{660} von 0,5 eingestellt und nach 4 h Inkubation am Fluoreszenzphotometer gemessen.

Abb.3.18 zeigt die Messung der relativen Fluoreszenz in den Stämmen *R. capsulatus* B10S pRhonHi-2-YFP V1-5. Der Stamm B10S pRhonHi-2-YFP V2 zeigt eine um den Faktor 2,3

verminderte Fluoreszenz gegenüber dem Stamm B10S pRhonHi-2-YFP V1, es ist daher anzunehmen, dass das YFP-Gen unter Kontrolle des P_{nif} V2 mit einer geringeren Frequenz abgelesen wird als unter Kontrolle des P_{nif} V1. Bei dem Stamm B10S pRhonHi-2-YFP V3 gibt es keine Veränderung der Fluoreszenz des YFP, in diesem Falle scheint durch die Veränderung der Promotor Sequenz ein Ausgleich der Expressionsstärke im Vergleich zum B10S pRhonHi-2-YFP V2 erreicht. Im Falle des Stammes B10S pRhonHi-2-YFP V5 ist die relative Fluoreszenz um den Faktor 3,25 erhöht, es ist daher anzunehmen dass auch die Expression unter Kontrolle des *nif*- Promotors in der Version P_{nif} V5 gesteigert ist.

Die Expression vermittelt durch den P_{nif} V5 zeigt eine erhöhte Rate gegenüber den Versionen V1-V3. So ist zu vermuten, dass innerhalb der ersten 190 bp des *nifH* Gens ein regulatorisches Element vorhanden ist.

3.3.3. Stickstoffabhängige Regulation des P_{nif}

Im Versuch Kap.3.2.2 konnte gezeigt werden, dass die Expression des P_{nif} Promotors in der Version V5 die höchste Expressionsrate aufweisen konnte. In den folgenden Versuchen sollten die Eigenschaften des P_{nif} -V5 im Vektor pRhonHi-2 bestimmt werden.

Durch Zusatz von Ammoniumsulfat zum Medium kann die Expression der Nitrogenasegene und Aktivität des Nitrogenaseenzymkomplexes reprimiert werden (s. Kap.1.3.2.2). In diesem Versuch sollte geklärt werden ob der Promotor P_{nif} in der Version V5 auf dem Vektor pRhonHi-2 durch die Zugabe von Ammoniumsulfat zum Medium in *R. capsulatus* reprimiert werden kann. Damit wäre der P_{nif} durch Zugabe geringer Mengen Ammoniumsulfat indirekt induzierbar, da die Expression nach dem Abbau des Ammoniumsulfats autoinduziert werden würde. Für die Untersuchung der Regulation wurde Ammoniumsulfat in einer Menge hinzugegeben bei der dieser Effekt zum Messzeitpunkt nicht auftrat.

Der *R. capsulatus* Wildtyp B10S mit dem Vektor pRhonHi-2-YFP V5 wurde in 10 ml RCV-Minimalmedium anaerob in gasdicht verschließbaren Kulturgefäßen angezogen. Als Kohlenstoffquelle wurde Malat, als Stickstoffquelle L-Serin bzw. Ammoniumsulfat verwendet. Als Lichtquelle wurden 60 W Glühbirnen verwendet. Die Kulturen wurden mit einer OD_{660} von 0,5 inokuliert und bei einer OD_{660} von 1,0 geerntet. Die Zellen wurden in Tris/HCl-Puffer gewaschen und auf eine OD_{660} 0,5 in einem 1 ml Tris/HCl-Puffer verdünnt und für 4 h, zum Zwecke der Chromophoreifung an der Luft inkubiert. Die Fluoreszenz des YFP wurde an einem Fluoreszenzphotometer bestimmt. Abb.3.19 ist die Fluoreszenzmessung des YFP bei 530 nm einer dreifach Bestimmung im statistischen Mittel mit Standardabweichung unter den verschiedenen Bedingungen als Balkendiagramm dargestellt.

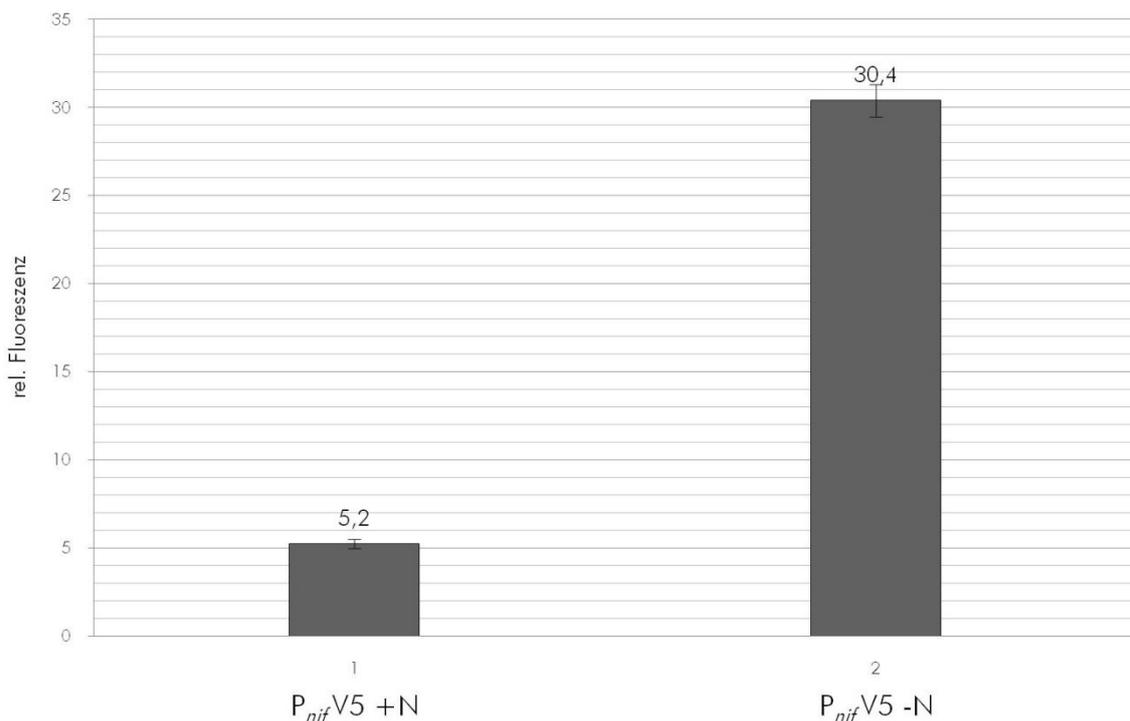


Abb.3.23 Nachweis der stickstoffabhängigen Regulation des P_{nif}, anhand der relativen Fluoreszenz von YFP in *R. capsulatus* B10S mit dem Vektor pRhonHi-2-YFP V5. Der *R. capsulatus* Stamm B10S pRhonHi-2-YFP V5 wurde in einem Volumen von 10 ml RCV-Minimalmedium, mit L-Serin bzw. Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle, unter 60 W Glühbirnen angezogen. Die Kulturen wurden mit einer OD₆₆₀ von 0,5 inokuliert und bei einer OD₆₆₀ von 1,0 geerntet. Anschließend wurden die Proben in einen Tris-HCl Puffer überführt, auf eine OD₆₆₀ von 0,5 eingestellt und nach 4 h Inkubation am Fluoreszenzphotometer gemessen.

Abb.3.19 zeigt die Messung der relativen Fluoreszenz in dem Stamm *R. capsulatus* B10S pRhonHi-2-YFP V5 in Abhängigkeit von Ammoniumsulfat im Medium.

Der Stamm B10S pRhonHi-2-YFP V5 zeigt unter Nitrogenase reprimierenden Bedingungen eine um den Faktor 5,9 verminderte Fluoreszenz gegenüber dem Stamm B10S pRhonHi-2-YFP V5 unter dereprimierenden Bedingungen. Es konnte damit gezeigt werden, dass P_{nif}V5 der natürlichen Stickstoffregulation unterliegt.

Die Stickstoff-abhängige Regulation des *nifHDK* Promotors bleibt bei der plasmidkodierte Version P_{nif}V5 erhalten. Die Expression vermittelt durch P_{nif}V5 lässt sich durch Ammoniumsulfat reprimieren bzw. durch die stete Aufnahme von Ammoniumsulfat der Zellen und damit sinkende Konzentration im Medium indirekt induzieren.

3.3.4. Vergleich der Promotoren P_{nif} mit P_{T7} und P_{aphII}

Für *Rhodobacter capsulatus* sind die Promotoren P_{T7} , der T7-RNA-Polymerase Promotor und P_{aphII} , der *aphII* Promotor in den Expressionvektoren pRhotHi-2 und pRhokHi-2 etabliert. Die Genexpression unter Kontrolle des P_{aphII} erfolgt konstitutiv und ergibt geringe Transkriptmengen. Die Expression unter Kontrolle des P_{T7} ergibt hohe Transkriptmengen und erfolgt im Stamm B10ST7, der die PhageT7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des *fru*-Promotors im Genom kodiert und kann durch Zugabe von Fructose ins Medium induziert werden.

In diesem Versuch sollte untersucht werden in welchem Verhältnis die Expression des P_{nif} auf dem Vektor pRhonHi-2 zu den bereits etablierten Systemen steht. Die Variation der Expressionsstärke bei der heterologen Expression kann einen Einfluss auf die Menge funktionellen Proteins haben. Durch die Herabsetzung der Expressionsstärke kann z.B. die Bildung von "inclusion-bodies" (Aggregate ungefalteten oder fehlgefalteten Proteins) verhindert werden, wenn es durch hohe Mengen synthetisierter Peptide zu Fehlfaltungen oder einer Überlastung der Chaperone in der Zelle kommt. Die Expressionsstärke eines Expressionssystems anpassen zu können ist hier von großem Nutzen.

Um die Expressionsstärke der verschiedenen Promotoren zu untersuchen wurden die Vektoren pRhokHi-2-YFP, pRhotHi-2-YFP und pRhonHi-2-YFP durch Transformation und Konjugation über den *E. coli* Stamm S17-1, in den *R. capsulatus* Stamm B10ST7 eingebracht.

Die *R. capsulatus* Stämme des B10ST7 mit den Vektoren pRhokHi-2-YFP, pRhotHi-2-YFP und pRhonHi-2-YFP wurden in 10 ml RCV-Minimalmedium, anaerob in gasdicht verschließbaren Kulturgefäßen angezogen. Als Kohlenstoffquelle wurde Malat, als Stickstoffquelle L-Serin verwendet. Als Lichtquelle wurden 60 W Glühbirnen verwendet. Die Kulturen wurden mit einer OD_{660} von 0,5 inokuliert und bei einer OD_{660} von 1,0 geerntet. Die Zellen wurden in Tris/HCl-Puffer gewaschen und auf eine OD_{660} 0,5 in einem 1 ml Tris/HCl-Puffer verdünnt und für 4 h, zum Zwecke der Chromophorreifung an der Luft inkubiert. Die Fluoreszenz des YFP wurde an einem Fluoreszenzphotometer bestimmt. In Abbildung 3.20 ist die Fluoreszenzmessung des YFP bei 530nm einer dreifach Bestimmung im statistischen Mittel mit Standardabweichung unter den verschiedenen Bedingungen als Balkendiagramm dargestellt.

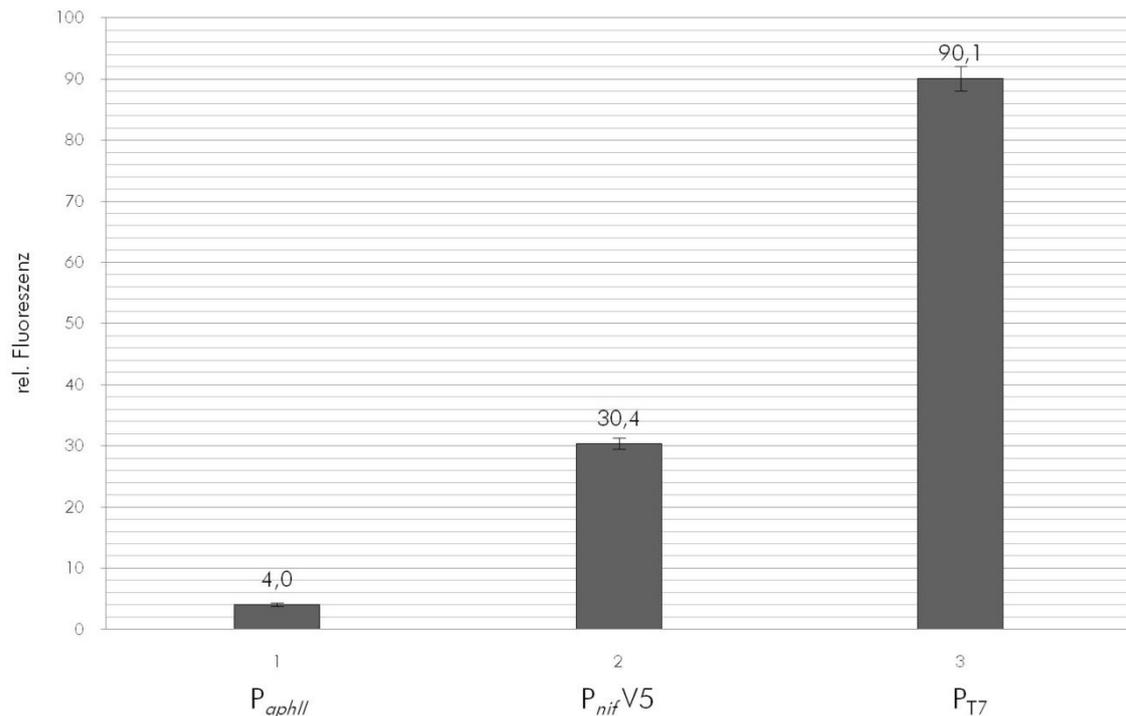


Abb.3.24 Vergleich der Promotoraktivität der Promotoren P_{aphII} , P_{T7} und P_{nif} , anhand der relativen Fluoreszenz von YFP in *R. capsulatus* B10ST7 mit den Vektoren pRhokHi-2-YFP, pRhonHi-2-YFP V5 und pRhotHi-2-YFP. Die *R. capsulatus* Stämme B10ST7 pRhokHi-2-YFP, B10ST7 pRhonHi-2-YFP V5 und B10ST7 pRhotHi-2-YFP wurden in einem Volumen von 10 ml RCV-Minimalmedium, mit L-Serin als Stickstoffquelle, unter 60 W Glühbirnen angezogen. Die Kulturen wurden mit einer OD_{660} von 0,5 inokuliert und bei einer OD_{660} von 1,0 geerntet. Anschließend wurden die Proben in einen Tris-HCl Puffer überführt, auf eine OD_{660} von 0,5 eingestellt und nach 4 h Inkubation am Fluoreszenzphotometer gemessen.

Abb.3.20 zeigt die Messung der relativen Fluoreszenz in den Stämmen *R. capsulatus* B10ST7 pRhokHi-2-YFP, pRhonHi-2-YFP V5 und pRhotHi-2-YFP.

Der Stamm B10ST7 pRhokHi-2-YFP zeigt eine sehr geringe Fluoreszenz. Die Fluoreszenz des B10ST7 pRhonHi-2 ist um den Faktor 7,4 und die des B10ST7 pRhotHi-2 um den Faktor 22,4 höher als die Fluoreszenz, die beim Stamm B10ST7 pRhokHi-2 gemessen werden konnte. Die Fluoreszenz des Stammes B10ST7 pRhotHi-2 ist um den Faktor 3,0 höher als die des B10ST7 pRhonHi-2.

Es ist eine deutliche Steigerung der Expression durch den P_{nif} gegenüber dem P_{aphII} festzustellen, im Vergleich zum P_{T7} war die Expression niedriger. Die Expressionsstärke durch die P_{nif} vermittelte Expression liegt zwischen der Expressionsstärke, der beiden etablierten Systemen.

Der Promotor $P_{nif} V5$ bietet für das pRho Expressionssystem eine Erweiterung um einen Promotor dessen Expressionsstärke zwischen dem konstitutiven *aphII*-Promotor und dem induzierbaren T7-RNA-Polymerase Promotor angesiedelt ist.

3.3.5. Vergleich der Promotoren unter Leuchtdioden

Die Anzucht von *Rhodobacter capsulatus* unter Leuchtdioden geht mit einer Vielzahl von Veränderungen einher (Kap.3.1 ff). Die Veränderungen zeigten sich unter anderem auch in der Expression der Nitrogenasegene, also der Gene denen der P_{nif} vorangestellt ist. In diesem Versuch sollte untersucht werden, welche Veränderungen die Belichtungsbedingungen auf die durch den P_{nif} auf dem Vektor pRhonHi2 gesteuerten Gene haben. Wenn durch die Veränderung der Lichtbedingungen die P_{nif} vermittelte Expression beeinflusst werden kann, wäre ein weiteres, einfaches Steuerelement für die Expression in *R. capsulatus* gewonnen. Der Promotor P_{T7} wurde für einen Vergleich mitgeführt.

Die *R. capsulatus* Stämme B10ST7 mit dem Vektor pRhotHi-2-YFP und dem Vektor pRhonHi-2-YFP wurden in 10 ml RCV-Minimalmedium anaerob in gasdicht verschließbaren Kulturgefäßen angezogen. Als Kohlenstoffquelle wurde Malat, als Stickstoffquelle L-Serin verwendet. Als Lichtquelle wurden 60 W Glühbirnen, Infrarotdioden und Blaulichtdioden verwendet. Die Kulturen wurden mit einer OD_{660} von 0,5 inokuliert und bei einer OD_{660} von 1,0 geerntet. Die Zellen wurden in Tris/HCl-Puffer gewaschen und auf eine OD_{660} 0,5 in einem 1 ml Tris/HCl-Puffer verdünnt und für 4 h, zum Zwecke der Chromophorreifung an der Luft inkubiert. Die Fluoreszenz des YFP wurde an einem Fluoreszenzphotometer bestimmt. In Abb.3.21 ist die Fluoreszenzmessung des YFP bei 530 nm einer Dreifachbestimmung im statistischen Mittel mit Standardabweichung unter den verschiedenen Bedingungen als Balkendiagramm dargestellt.

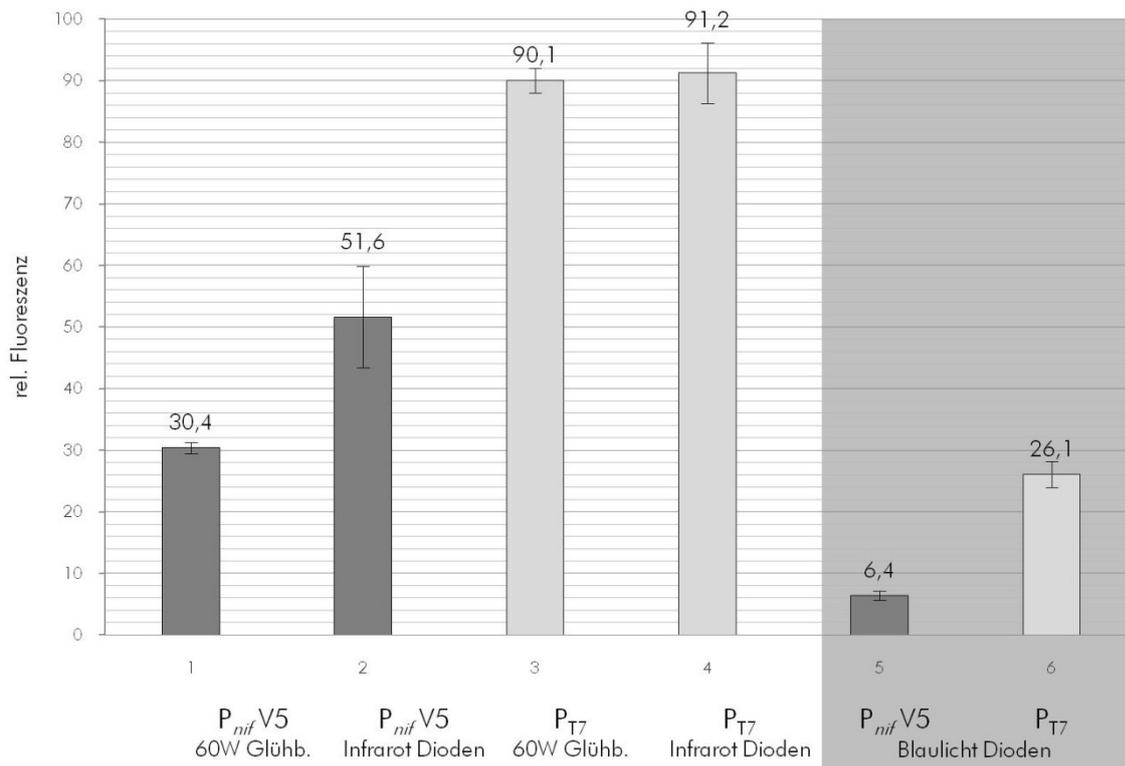


Abb.3.24 Vergleich der Promotoraktivität der Promotoren P_{T7} und P_{nif} , anhand der relativen Fluoreszenz von YFP in *R. capsulatus* B10ST7 mit den Vektoren pRhonHi-2-YFP V5 und pRhotHi-2-YFP. Die *R. capsulatus* Stämme B10ST7 pRhonHi-2-YFP V5 und B10ST7 pRhotHi-2-YFP wurden in einem Volumen von 10 ml RCV-Minimalmedium, mit L-Serin als Stickstoffquelle, unter 60 W Glühbirnen, Infrarotdioden oder Blaulichtdioden angezogen. Die Kulturen wurden mit einer OD_{660} von 0,5 inokuliert und bei einer OD_{660} von 1,0 geerntet. Anschließend wurden die Proben in einen Tris-HCl Puffer überführt, auf eine OD_{660} von 0,5 eingestellt und nach 4 h Inkubation am Fluoreszenzphotometer gemessen.

Abb.3.21 zeigt die Messung der relativen Fluoreszenz in den Stämmen *R. capsulatus* B10ST7 pRhonHi-2-YFP V5 und pRhotHi-2-YFP unter 60 W Glühbirnen, Infrarotdioden und Blaulichtdioden.

Wie in Abb.3.21 zu erkennen, war die Fluoreszenz im Stamm B10ST7 pRhonHi2-YFP unter Infrarotdioden gegenüber dem Stamm B10ST7 pRhonHi-2-YFP, welcher unter 60 W Glühbirnen angezogen wurde, um den Faktor 1,7 erhöht. Die P_{nif} vermittelte Expression konnte durch die einfache Veränderung der Lichtbedingungen erhöht werden.

Die Fluoreszenz der Stämme B10ST7-pRhotHi-2-YFP unter Infrarotdioden und unter 60 W Glühbirnen war gleich. Hier konnte keine Expressionsveränderung durch die Veränderung der Lichtbedingungen gemessen werden.

Unter Blaulichtdioden war die Fluoreszenz der Stämme B10ST7 pRhonHi-2-YFP um den Faktor 8,1 bzw. B10ST7 pRhotHi-2-YFP um den Faktor 3,5 verringert, gegenüber den Kulturen unter Beleuchtung mit Infrarotdioden. Die physiologischen und regulatorischen Veränderungen die sich bei der Anzucht von *R. capsulatus* unter Blaulichtdioden ergeben sind umfangreich (Kap.3.1 ff). Der direkte Schluss von relativer Fluoreszenz auf die Expressionsstärke der Promotoren kann daher nicht vorgenommen werden. Beide Stämme zeigten unter Blaulichtdioden das in Kap.3.1

beschriebene Wuchsverhalten, erreichten also nach ca. 32 h die logarithmische Wuchsphase (Daten nicht gezeigt). Der Stamm B10ST7 pRhotHi-2-YFP war in der Lage den Fluoreszenzreporter YFP wenn auch in geringem Maße zu exprimieren.

Durch die P_{nif} vermittelte Expression im Vektor pRhonHi-2 konnte das etablierte pRho-System um eine Promotorvariante erweitert werden, deren Expression durch Ammoniumsulfat reprimiert, durch Verwendung von Infrarotdioden statt 60 W Glühbirnen gesteigert und durch die ausschließliche Verwendung von Blaulicht inhibiert werden kann und deren Expressionsstärke zwischen den bereits etablierten P_{aphII} und P_{T7} anzuordnen ist.

3.4. Expression des *fdxA* Gens aus *Rhodobacter capsulatus*

Das Gen *fdxA* aus *R. capsulatus* kodiert für das Ferredoxin II, ein 12,7 kDa Protein (112 AS). Es ist eines von sechs Ferredoxinen in *R. capsulatus*. Das Ferredoxin II verfügt über zwei Eisen-Schwefel Kofaktoren, einen [3Fe-4S] und einen [4Fe-4S] Kofaktor (Duport et al., 1990). Ferredoxine mit zwei unterschiedlichen Fe-S Clustern konnten auch in *Azotobacter*, *Bacillus*, *Desulfovibrio*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Saccharo-polyspora*, *Streptomyces* und *Thermus* nachgewiesen werden. Keinem der Proteine konnte eine spezifische Funktion zugeordnet werden (Armengaud & Jouanneau, 1995). Bei der Expression des Gens *fdxA* aus *R. capsulatus* in *E. coli* konnte nur das Apoprotein erhalten werden. Die Versuche die Eisen-Schwefel Kofaktoren nachträglich einzufügen, führten dazu, dass nur FdII Protein mit 2[4Fe-4S] Kofaktoren generiert wurde (Armengaud et al., 1995; Jouanneau et al., 1992).

Die Expression von Proteinen mit Eisen-Schwefel-Kofaktoren in *R. capsulatus* sollte den Vorteil bieten das unter phototrophen und stickstofffixierenden Bedingungen die Ausbildung solchen Kofaktoren in *R. capsulatus* forciert und damit die FeS-Kofaktorbeladung eines heterolog exprimierten Proteins gewährleistet ist. Das Ferredoxin II aus *R. capsulatus* sollte dies belegen.

3.4.1. Konstruktion der Vektoren pRhotS-2, pRhokS-2 und pRhonS-2

Die Expression des *fdxA* Gens in *R. capsulatus* war mit den bestehenden Vektoren der pRho Serie nicht möglich, da für affinitätschromatographische Trennung des Proteins FdII nur ein His₆-Tag (s.Kap.1.2.4) zur Verfügung stand. Das Prinzip der Affinität des His₆-Tags beruht auf der Interaktion des Histidins mit zweifach positiv geladenen Ionen. Dieser kann daher auch mit den FeS Kofaktoren des FdII interagieren. Daher sollte das *fdxA*-Gen mit einem Strep II-Tag exprimiert werden, um so kann eine affinitätschromatographische Reinigung durchführen zu können und eine Interaktion mit dem Eisen-Schwefel Kofaktor zu vermeiden. Bei dem Strep II-Tag handelt es sich um

eine 24 bp lange Sequenz, die für ein artifizielles Peptid kodiert (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys), welches von Streptavidin gebunden werden kann.

Die Expression des *fdxA* Gens sollte in *R. capsulatus* erfolgen, daher wurde die Sequenz des Strep II-Tag an den Kodongebrauch von *R. capsulatus* angepasst (s.Tab.3.1).

Tab. 3.1 Protein- und DNA-Sequenz des Strep II-TAG und die Anpassung an *R. capsulatus*.

DNA-Sequenz des Strep II-Tag im pET51b(+)	tgg agc cac ccg cag ttc gaa aag
Aminosäuresequenz des Strep II-Tag	Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
DNA-Sequenz des Strep II-tag im pRhoTS2	tgg tcg cat ccg cag ttc gaa aag

Die Sequenzen der Vektoren pRhokHi-2, pRhotHi-2 und pRhonHi-2, die für den His₆-Tag kodieren, sollten gegen die modifizierte Strep II-Tag Sequenz ausgetauscht werden. Zu diesem Zweck wurde ein PCR-Primerpaar konstruiert welches die Sequenz für den Strep II-Tag enthielt, sowie eine Sequenz die an die Vektoren pRhokHi-2, pRhotHi-2 und pRhonHi-2 binden konnte. Die Bindung der Primer war so ausgelegt das der gesamte Vektor ohne den His₆-TAG amplifiziert wurde und über die Primer gegen den Strep II-Tag ausgetauscht wurde. Daraus entstanden die Vektoren pRhokS-2, pRhotS-2 und pRhonS-2.

Die Vektoren der pRho-Serie wurden durch eine Form der "quick-change"-PCR modifiziert so das für alle Versionen sowohl ein His₆-Tag als auch ein Strep II-Tag zur Verfügung steht.

3.4.2. Expression des FdII in *R. capsulatus* B10ST7 und Separation mittels Affinitätschromatographie

Das *fdxA*-Gen, welches für das *R. capsulatus* FdII Protein kodiert, wurde mittels Standardklonierungsverfahren in den Vektor pRhotS2 eingebracht. Der Stamm S17-1-pRhotS-2-*fdxA* wurde durch Transformation, der Stamm *R. capsulatus* B10ST7-pRhotS-2-*fdxA* im Anschluss durch Konjugation der Stämmen *R. capsulatus* B10ST7 und *E. coli* S17-1-pRhotS-2-*fdxA* erstellt.

Für eine Untersuchung der Expression und Synthese des FdII Proteins wurde eine Expression im Stamm *R. capsulatus* B10ST7-pRhotS-2-*fdxA* durchgeführt. Im Anschluss daran wurde das Protein mittels Strep II-Tag - Streptactin Affinitätschromatographie separiert. Für die Expression in *R. capsulatus* wurden verschiedene Versuchsbedingungen gewählt. Es sollten phototrophe und nicht phototrophe gleichermaßen wie Nitrogenase reprimierende und Nitrogenase

dereprimierende Bedingungen im Bezug auf die Expression und Kofaktorbeladung des FdII Proteins untersucht werden.

Der *R. capsulatus* Stamm B10ST7-pRhotS-2-*fdxA* wurde in 500 ml RCV-Minimalmedium anaerob, bei 30°C in gasdicht verschließbaren Platteninkubatoren, unter phototrophen Bedingungen und aerob, in 2 L Erlenmeyerkolben unter ständigem Schütteln mit 120 Upm angezogen.

Als Kohlenstoffquelle wurde Malat verwendet. Für die Nitrogenase dereprimierenden bzw. Nitrogenase reprimierenden Bedingungen wurden L-Serin (-N), bzw. Ammoniumsulfat (+N) als Stickstoffquelle verwendet. Als Lichtquelle wurden für die anaeroben Kulturen Infrarotdioden verwendet, die aeroben Kulturen wurden im Dunkeln angezogen.

Durch die Kombination der Bedingungen ergaben sich 4 verschiedene Anzuchtbedingungen für *R. capsulatus* B10ST7-pRhotS-2-*fdxA* (s.Tab.3.2).

Tab.3.2 Anzuchtbedingungen für den *R. capsulatus* B10ST7-pRhotS-2-*fdxA* für die Expression des Gens *fdxA*.

	phototroph	nicht phototroph
N ₂ -ase dereprimierende Bedingung	-O ₂ anaerob -N L-Serin	+O ₂ aerob -N L-Serin
N ₂ -ase reprimierende Bedingung	-O ₂ anaerob +N Ammoniumsulfat	+O ₂ aerob +N Ammoniumsulfat

Die Kulturen wurden mit einer OD₆₆₀ von 0,5 inokuliert und bei einer OD₆₆₀ von 1,0 mit 10 mM Fructose induziert. Die Zellen wurden nach 24 h geerntet. Anschließend wurden die Zellen mittels "french-press" in einem Volumen von 30 ml Tris/HCl Puffer aufgeschlossen. Wasserunlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation von der Proteinlösung getrennt. Die Proteinlösung wurde dann auf eine Streptactin-Affinitätschromatographie-Säule aufgetragen.

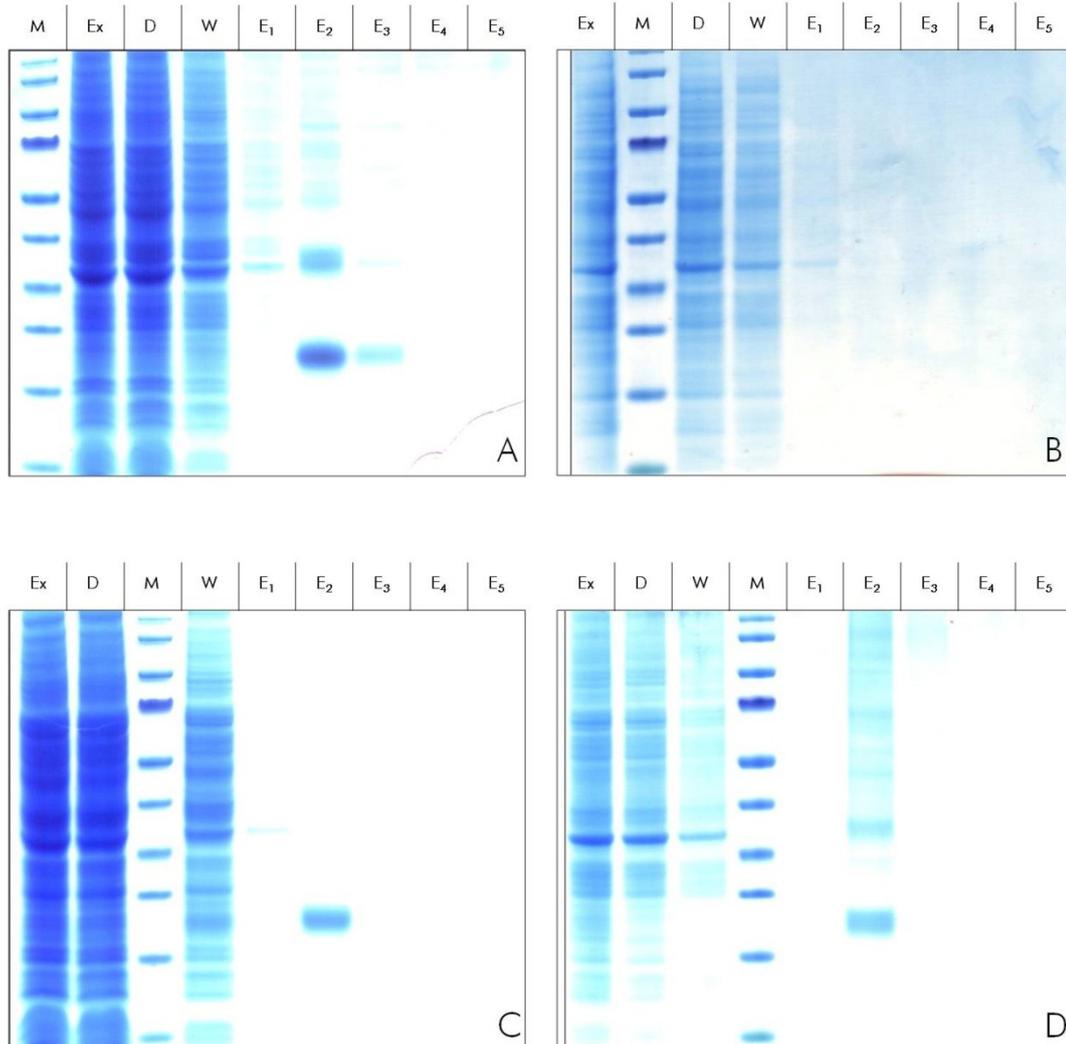


Abb.3.26 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proben der Proteinseparation des Ferredoxin II. Der *R. capsulatus* Stamm B10ST7-pRhotS-2-*fdxA* wurde in 500 ml RCV-Minimalmedium in 2 L Kolben, aerob, mit L-Serin **A**, bzw. Ammoniumsulfat **B** als Stickstoffquelle angezogen. Der *R. capsulatus* Stamm B10ST7-pRhotS-2-*fdxA* wurde in 500 ml RCV-Minimalmedium in Platteninkubatoren, anaerob, mit L-Serin **C** bzw. Ammoniumsulfat **D** als Stickstoffquelle angezogen. Bei der Reinigung des FdII Proteins wurde bei jedem Schritt der affinitätschromatographischen Auftrennung mittels Strep II-Tag/Streptactin Säule eine Probe für die Analyse im SDS-Polyacrylamidgel entnommen. Ex - Zellextrakt, D - Durchlauf, W - Waschfraktion, E1-5 Elutionsfraktionen, M - Proteingewichtsstandard (in kDa - 170, 130, 100, **70**, 55, 40, 35, 25, 15, 10).

In Abb.3.22 ist die gelelektrophoretische Trennung von Proben der einzelnen Schritte der Proteinreinigung zu sehen. Dabei wurde eine Probe des Extrakts nach Zellaufschluss und Zentrifugation aufgetragen (Ex: Extrakt), sowie die Proteine welche nach dem Auftragen nicht an der Matrix gebunden waren (D: Durchlauf). Weiterhin wurden durch eine Pufferlösung mit einer geringen Konzentration von Desthiobiotin alle unspezifisch gebunden Proteine von der Matrix gewaschen (W: Waschfraktion). Danach wurde durch eine Pufferlösung mit einer hohen Konzentration von Desthiobiotin das FdII Protein von der Matrix in einem Volumen von 5 mal je 2 ml eluiert (E₁₋₅: Elutionsfraktion 1-5).

Das Ferredoxin II hat eine berechnete Größe von 12,7 kDa und kann im Polyacrylamidgel auf einer Laufweite von zwischen 20 und 25 kDa nachgewiesen werden (Jouanneau et al., 1992). Die Kultur welche unter aeroben Bedingungen und mit L-Serin als Stickstoffquelle angezogen wurden enthielt kein FdII Protein (s. Abb.3.21.B). Die erhaltenen Proteinlösungen der übrigen Proben wiesen eine bräunliche Färbung unterschiedlicher Intensität auf, was einen ersten Hinweis auf eine Kofaktorbeladung des FdII Proteins gibt.

Die Elutionsfraktionen der verschiedenen FdII-Reinigungen wurden jeweils vereinigt und mittels Größenausschluß-Zentrifugation auf ein Volumen von 1 ml eingengt und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay bestimmt. Proteinkonzentration und Färbung der Proteinlösung sind in Tab.3.3 aufgetragen.

Tab.3.3 Proteinmenge und Färbung der Proteinlösungen des FdII

	aerob	anaerob	
	Ammoniumsulfat	Ammoniumsulfat	L-Serin
Proteinmenge [mg/L]	1,9	0,5	1,5
Färbung	++	+	+++

Das Ferredoxin II konnte in geringen Menge exprimiert und separiert werden, durch die Färbung konnte ein erster Hinweis auf die FeS-Cluster des Proteins gewonnen werden. Von den Kulturen bei denen das FdII Protein gereinigt werden konnte, zeigte die Kultur welche anaerob mit Ammoniumsulfat angezogen wurde die geringste Proteinmenge und analog dazu auch die geringste Färbung der Proteinlösung. In der FdII-Probe der Kultur, die aerob mit Ammoniumsulfat angezogen wurde, konnte die höchste Menge Protein gewonnen werden, diese Probe wies aber eine geringere Färbung auf als die Probe der Kultur die anaerob mit L-Serin angezogen wurde.

Das Ferredoxin FdII aus *R. capsulatus* konnte im Stamm B10ST7-pRhotHi-2-*fdxA* unter drei der vier gewählten Bedingungen (+O/+N; -O/+N; -O/-N; s. Tab.3.2) exprimiert und gereinigt werden. Die Proben der gereinigten Proteine wiesen unterschiedliche Konzentration und Färbungen auf.

3.4.3. Gelelektrophoretische Trennung und Absorption des Ferredoxin II aus *Rhodobacter capsulatus*

Das Ferredoxin II aus *R. capsulatus* konnte im Stamm B10ST7-pRhotHi-2-*fdxA* in geringen Mengen exprimiert werden. Die bräunliche Färbung der Proteinlösungen gab einen ersten Hinweis auf die Beladung des Proteins mit den entsprechenden FeS-Clustern ([3Fe-4S]/[4Fe-4S]). In diesem Versuch sollte die Art der FeS-Cluster näher untersucht werden. Für einen Vergleich der allgemeinen Kofaktorbeladung wurde das FdII-Protein im Stamm *E. coli* BL21(DE3)-pRhotHi-2-*fdxA* exprimiert und anschließend mittels Strep II-Tag - Streptactin Affinitätschromatographie gereinigt (Daten nicht gezeigt). Der Vergleich der Proteinproben aus *R. capsulatus* und *E. coli* sollte den Unterschied in der FeS-Kofaktorbeladung verdeutlichen. Erwartungsgemäß findet in *E. coli* keine Kofaktorbeladung statt, was durch Separation mittels Polyacrylamid-Gel durch eine geringere Laufweite nachzuweisen ist (Armengaud & Jouanneau, 1995).

Der *E. coli* Stamm BL21(DE3)-pRhotS-2-*fdxA* wurde in 500 ml LB-Medium in 2 L Erlenmeyerkolben bei 37°C auf 120 UpM geschüttelt. Die Kulturen wurden mit einer OD₅₈₀ von 0,05 inokuliert und bei einer OD₅₈₀ von 0,5 mit 0,4 mM IPTG induziert. Nach 4 h wurden die Zellen geerntet und das Medium durch Tris/HCl Puffer ausgetauscht. Die Reinigung des FdII Proteins erfolgte wie unter Kap.3.3.2 für die *R. capsulatus* Proben beschrieben.

Bei einer gelelektrophoretischen Trennung unter denaturierenden Bedingungen werden durch β-Mercaptoethanol die Schwefelverbindungen aufgespalten, bei diesem Vorgang lösen sich die FeS-Cluster aus dem Protein. Um eine Analyse der FeS-Cluster vorzunehmen wurden 20 µl der Proben des Ferredoxins II aus B10ST7-pRhotS-*fdxA* und BL21(DE3)-pRhotS-2-*fdxA*, mit einem Probenpuffer ohne β-Mercaptoethanol behandelt und dann auf ein SDS-PA Gel aufgetragen.

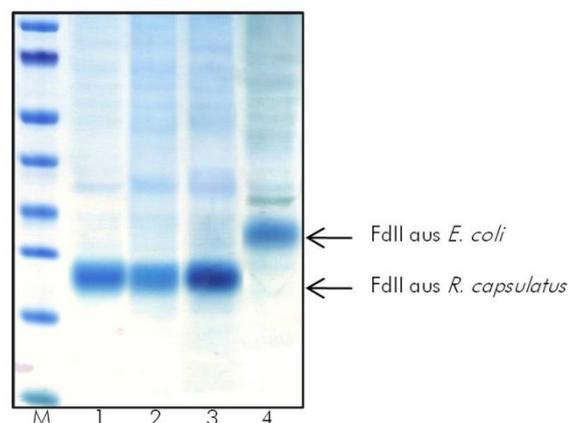


Abb.3.27 Gelelektrophoretische Trennung von gereinigten Proteinproben des FdII aus *R. capsulatus* B10ST7 pRhotS-2-*fdxA* und *E. coli* BL21(DE3) pRhotS-2-*fdxA*. Nach der Reinigung des FdII Proteins aus den verschiedenen Ansätzen mit *R. capsulatus* B10ST7 pRhotS-2-*fdxA* und der Expression im *E. coli* BL21(DE3) wurden Proben von 50 µg des FdII Proteins für eine Analyse mittels SDS-Polyacrylamidelektrophorese verwendet. **1-3** *R. capsulatus* B10ST7 pRhotS-2-*fdxA*; **1** aerob / Ammoniumsulfat, **2** anaerob / Ammoniumsulfat, **3** anaerob/L-Serin und **4** *E. coli* BL21(DE3) pRhotS-2-*fdxA*. **M** - Proteingewichtsstandard (in kDa - 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10)

In Abb.3.23 sind die verschiedenen Proben des Ferredoxin II der Proteinreinigung aus *R. capsulatus* und *E. coli* dargestellt. Das Ferredoxin II, welches aus *E. coli* erhalten wurde, zeigte eine geringere Laufweite als die Proteinproben welche aus *R. capsulatus* extrahiert wurden. Dies bestätigt das es sich bei dem aus *E. coli* gewonnenen Protein um das Apoprotein des FdII handelt, welches im Gegensatz zu Ferredoxin II mit Kofaktoren eine geringere Laufweite im Polyacrylamid-Gel besitzt (Armengaud & Jouanneau, 1995). Bei den *R. capsulatus* Proben scheint es sich um FdII mit Kofaktorbeladung zu handeln, welches sich in SDS-PA Gelen bei einer Größe zwischen 20 und 25 kDa findet (Jouanneau et al., 1992).

Bei den *R. capsulatus* Proben sind durch die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen keine Unterschiede in der Zusammensetzung der FeS-Cluster entstanden, die man im Polyacrylamid-Gel nachweisen kann. Um einen Unterschied zwischen den Proteinen der verschiedenen *R. capsulatus* Anzuchten und deren Eisen-Schwefel Kofaktor auszumachen wurde eine Absorptionskurve der Proben aufgenommen. Dazu wurden 100 µg Protein in 1 ml Elutionspuffer aufgenommen und die Absorption photometrisch im Bereich von 300-450 nm in Schritten von 1 nm bestimmt.

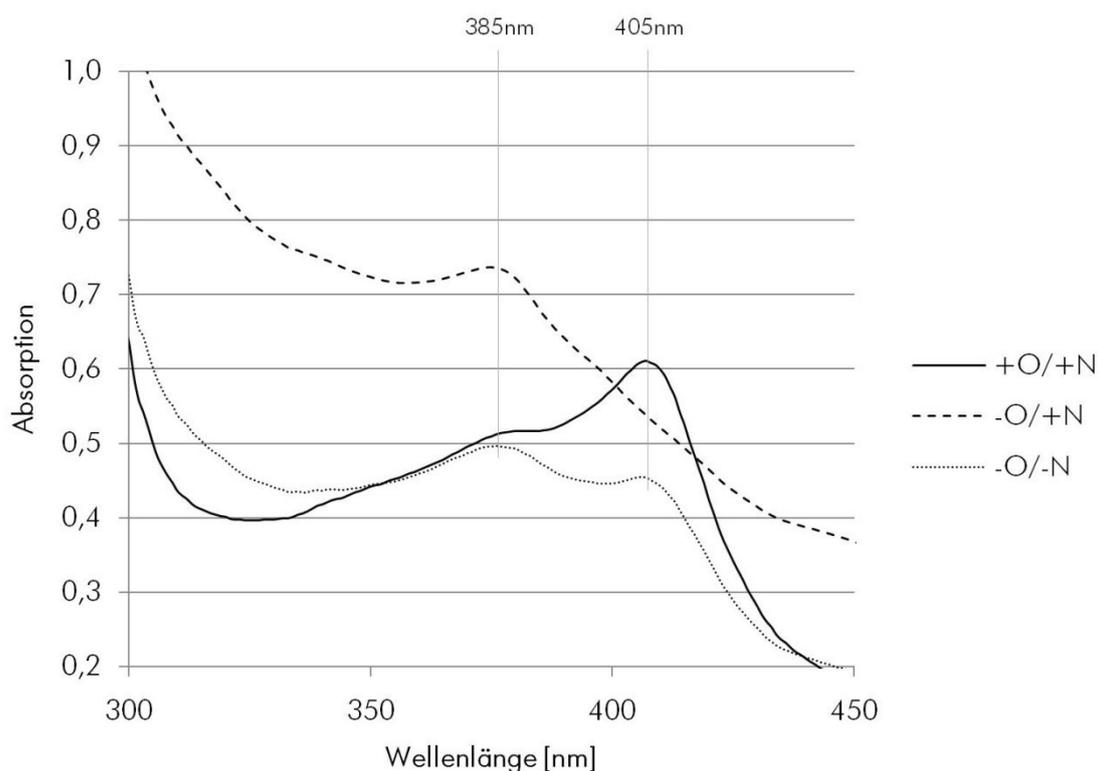


Abb.3.28 Absorption des Ferredoxin II aus *R. capsulatus* B10ST7-pRhotS-2-fdxA. 100 µg FdII Protein der Proben wurden in 1 ml Elutionspuffer (Kap.2.12.8) aufgenommen und deren Absorption im Bereich 300 nm - 450 nm bestimmt. Die Anzucht und Expression erfolgte im Stamm B10ST7-pRhotS-2-fdxA in RCV-Minimalmedium unter den Bedingungen aerob/Ammoniumsulfat (+O/+N), anaerob/Ammoniumsulfat (-O/+N) und anaerob/L-Serin (-O/-N).

In Abb.3.23 sind die Absorptionsspektren der Proben des Ferredoxin II dargestellt. Alle drei Proben besitzen ein Maximum bei 385 nm Wellenlänge, dieses Maximum ist charakteristisch für einen Eisen-Schwefel Kofaktor der Konfiguration [4Fe-4S]. Zwei der Proben und zwar die bei denen die Kulturen aerob und mit Ammoniumsulfat und die bei denen die Kulturen anaerob und mit L-Serin angezogen wurden, zeigen ein weiteres Maximum bei 405 nm, dieses Maximum ist typisch für einen Eisen-Schwefel Kofaktor der Konfiguration [3Fe-4S] (Armengaud et al., 1995). Die Proteinmenge und die Färbung der beiden Proben, deren Kulturen anaerob angezogen wurden (+O), korreliert mit den Absorptionsspektren und Maxima. Die stärkere Verfärbung der Proben (s.Tab.3.3) deren Kulturen mit L-Serin angezogen wurden lässt sich anhand des Absorptionsspektrums auf die Bildung des nativen Proteins und die höhere Absorption durch die erhöhte Proteinmenge zurückführen. Die Probe, deren Kultur aerob und mit Ammoniumsulfat angezogen wurde, zeigt hohe Absorptionsmaxima die mit der Proteinmenge, nicht aber mit der geringeren Verfärbung dieser korrelieren.

Für die entsprechenden Formen sind Absorptionsverhältnisse im Bezug zur Absorption bei 280 nm bekannt, für das native Protein ($\lambda_{400}/\lambda_{280}$) ein Wert von 0,55, für die $2x[4Fe-4S]$ - Form ($\lambda_{385}/\lambda_{280}$) ein Wert von 0,42 (Armengaud et al., 1995).

Tab.3.4 Absorptionsverhältnisse der FdII-Proben aus *R. capsulatus* B10ST7 pRhotS-*fdxA*.

		$\lambda_{385} / \lambda_{280}$ [4Fe-4S][4Fe-4S]	$\lambda_{400} / \lambda_{280}$ [3Fe-4S][4Fe-4S]
(Armengaud et al., 1995)		0,42	0,55
		$\lambda_{385} / \lambda_{280}$	$\lambda_{405} / \lambda_{280}$
aerob Ammoniumsulfat	+O/+N	0,51	0,61
anaerob Ammoniumsulfat	-O/-N	0,74	kein Maximum
anaerob L-Serin	-O/-N	0,50	0,46

Bei den gemessenen Absorptionsspektren zeigt keine Probe die in der Literatur vorgegebenen Verhältnisse in der Absorption $\lambda_{400}/\lambda_{280}$ und $\lambda_{385}/\lambda_{280}$. Es ist zu vermuten, dass sich in den Proben das Ferredoxin II befindet mit verschiedenen Zusammensetzungen der Eisen-Schwefel-Kofaktoren. Aus den Messungen kann entnommen werden, dass sich in der Probe, die anaerob und mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle angezogen wurde, kein natives Protein befand, da bei der Kurve kein Maximum im Bereich von 405 nm für den [3Fe-4S] Eisen-Schwefel Kofaktor gemessen wurde.

Für die Expression des Ferredoxin FdII waren die Bedingungen phototrophes Wachstum und Nitrogenase dereprimierende Bedingungen am besten. Unter diesen Bedingungen konnte im Stamm B10ST7-pRhotS-2-*fdxA* eine geringe Menge des Proteins exprimiert und mittels

Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die gereinigten Proben wiesen eine entsprechend starke bräunlich Verfärbung auf, die Laufweite des FdII im SDS-Polyacrylamidgel entsprach den Literaturangaben und die gemessene Absorption der Proben bei 385 nm und 405 nm war den in der Literatur beschriebenen Absorptionscharakteristika des nativen FdII ähnlich.

Das Ferredoxin FdII aus *R. capsulatus* konnte im Stamm B10ST7-pRhotS-2-*fdxA* exprimiert werden. Das Protein konnte mittels Strep II-Tag - Streptactin Affinitätschromatographie gereinigt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Proteine, die in *R. capsulatus* unter verschiedenen Bedingungen exprimiert wurden, über Eisen-Schwefel Kofaktoren verfügten.

4. DISKUSSION

4.1. Die Verwendung von Leuchtdioden als Lichtquelle

Grundsätzlich lassen sich handelsübliche Leuchtmittel in drei Gruppen unterteilen. Als erste Gruppe sind dabei die Wärmestrahler zu nennen, zu denen die klassischen Glühbirnen in unterschiedlicher Wattstärke, Kohlebogenlampen aber auch Kerzen und Öllampen gezählt werden. Bei den Temperaturstrahlern wird Licht durch das Prinzip der Wärmestrahlung erzeugt wobei jedes Objekt entsprechend seiner Temperatur elektromagnetische Strahlung emittiert, die je höher die Temperatur umso stärker und kurzwelliger ist. Temperaturstrahler haben eine geringe Lebensdauer, einen hohen Energiebedarf und eine sehr geringe Lichtausbeute.

Die zweite Gruppe sind die Gasentladungslampen zu denen Leuchtröhren und Leuchtstofflampen ebenso gehören wie Quecksilberdampflampen, Kryptonbogenlampen und Xenon-Kurzbogenlampen. Das Prinzip der Gasentladungslampen beruht auf der Lichtemission eines Gases, welches unter elektrischer Spannung zur Entladung gebracht wird. Dabei wird die Emission durch das verwendete Gas und die Bauart der Gasentladungslampe bestimmt. Gasentladungslampen besitzen eine hohe Lebensdauer und Lichtausbeute, haben einen geringeren Energiebedarf als die Temperaturstrahler.

Die letzte Gruppe ist die der Halbleiterleuchtmittel, zu denen sowohl die Leuchtdioden als auch die "Elektro-Lumineszenz" Leuchtfolien gehören. Hierbei wird das Licht durch den Übergang von Elektronen von der Kathode zur Anode eines Halbleitermaterials erzeugt. Die Emission lässt sich durch das verwendete Halbleitermaterial und dessen Beschichtung festlegen. Sie haben eine hohe Lichtausbeute und Lebensdauer, einen noch geringeren Energiebedarf als die Gasentladungslampen und lassen sich aufgrund ihrer geringen Größe, die Leuchtdioden sind nur wenige Millimeter groß bzw. hohen Flexibilität, im Falle der Leuchtfolien, sehr gut an entsprechende Versuchsaufbauten anpassen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Emission von Glühbirnen und von Leuchtdioden, welche im Infraroten- bzw. im Blaulichtbereich emittieren, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Glühbirnen und das angefertigte Leuchtdiodenfeld (Kap.3.1.1) eine ähnliche Lichtleistung im Wellenlängenbereich von 350 bis 900 nm erbringen. Die beiden Leuchtmittel unterscheiden sich aber bei der Emission im physiologisch relevanten Spektrum (Kap.3.1.1) für die Photosynthese von *R. capsulatus*. Die Leistungsaufnahme einer der verwendeten Glühbirnen beträgt nach Herstellerangaben 60 Watt. Im Standardversuchsaufbau kamen 6 Glühbirnen zum Einsatz, somit ergibt sich eine Leistungsaufnahme von insgesamt 360 Watt pro Stunde. Die Leuchtdioden besitzen nach Herstellerangaben eine Leistungsaufnahme von 0,12 Watt für eine Blaulichtdiode und 0,07 W für eine Infrarotdiode. Der Versuchsaufbau mit den Leuchtdioden verwendete 2

Leuchtdiodenplatinen, die wiederum mit je 120 Infrarotdioden und 120 Blaulichtdioden bestückt waren, somit besitzen die Blaulichtdioden auf zwei Leuchtdioden-Platinen eine Leistungsaufnahme von 28,8 Watt pro Stunde und die Infrarotdioden eine Leistungsaufnahme von 16,8 Watt pro Stunde, bzw. 45,6 Watt pro Stunde wenn beide Leuchtdiodenarten verwendet wurden. Zu der um den Faktor 14,7 (BL-Dioden) bzw. 2,6 (IR-Dioden) erhöhten Lichtintensität im physiologisch relevanten Spektrum kommt ein um den Faktor 12,5 (BL) bzw. 21,4 (IR) oder 7,9-fach (IR+BL) gesenkter Energieverbrauch bei der Verwendung von Leuchtdioden. Die Wärmeentwicklung und die Größe der Glühbirnen sind ein weiterer Nachteil bei der Applikation als Lichtquelle. Die Leuchtdioden geben nur in geringem Maße Wärme ab, so dass der Abstand der Kulturgefäße zu den Leuchtdioden und damit auch die Lichtintensität frei eingestellt werden konnte. Die Glühbirnen geben in so hohem Maße Wärme ab, dass ein Abstand von mindestens 25 cm zu den Kulturgefäßen eingehalten werden musste.

Die Verwendung von Leuchtdioden sichert somit eine konstante Beleuchtung in Bezug auf Lichtquantität und Lichtqualität, wie sie unter Verwendung von Glühbirnen oder anderen Leuchtmitteln nicht gewährleistet ist. So emittieren bestimmte Gasentladungslampen und Kaltkathodenröhren UV-Strahlung oder Temperaturstrahler in hohem Maße Infrarot-Licht. Unter Verwendung von Leuchtdioden sind diese beiden Lichtparameter gleichermaßen festgelegt, wie auch die Parameter welche sonst durch das Medium (pH-Wert, Nähr- und Zusatzstoffe) oder durch den experimentellen Aufbau festgelegt sind (Temperatur, Volumina und Inkubationszeit).

4.1.1. Der Einfluss von Infrarotstrahlung und Blaulicht auf das phototrophe Wachstum und die Proteinbiosynthese

Die Verwendung von Leuchtdioden bei der Anzucht phototropher Bakterien hat Vorteile gegenüber anderen Leuchtmitteln allein durch ihre physikalischen Eigenschaft (s. Kap.4.1). Die Emission der Leuchtdioden-Platinen wurde durch die Verwendung entsprechender Infrarot- bzw. Blaulichtdioden auf die physiologisch relevanten Wellenlängen der Absorption des Bakteriochlorophylls *a* und des Sphaeroidens aus *R. capsulatus* festgelegt. Die Untersuchungen des phototrophen Bakteriums *R. capsulatus* zielten zum einen darauf ab festzustellen, ob sich die Leuchtdioden für eine Anzucht verwenden lassen, zum anderen aber auch darauf zu prüfen, welche Vorteile sich durch dieses System zusätzlich gewinnen lassen. Die ausreichende Erzeugung von Biomasse für die heterologe Expression ist notwendig um auch eine entsprechend hohe Proteinausbeute zu erzielen. Für eine erste Untersuchung wurde daher zunächst eine Wachstumskurve von *R. capsulatus* Kulturen unter den verschiedenen Lichtbedingungen erstellt.

R. capsulatus war in der Lage unter allen Lichtbedingungen zu wachsen, unabhängig davon ob nur Infrarotdioden, Blaulichtdioden oder eine Kombination von beidem verwendet wurde. Unter allen Bedingungen erreichten die verwendeten Stämme mindestens eine OD_{660} von 2,0 und zeigten die für *R. capsulatus* typische rötlich, bräunliche Färbung die auf die Ausbildung des Photosyntheseapparates und der intracytoplasmatischen Membran hindeutet.

Bei der Anzucht von *R. capsulatus* unter den Leuchtdioden ergaben sich aber deutliche Unterschiede je nachdem ob Infrarot-, Blaulichtdioden oder eine Kombination beider verwendet wurden. Aus der Wuchskurve ging hervor, dass die geringsten Veränderungen bei den Kulturen zu sehen waren, welche infraroter Strahlung ausgesetzt wurden, also den Kulturen, die unter Infrarotdioden, Infrarot- und Blaulichtdioden und unter Glühbirnen angezogen wurden. Bei der Anzucht von *R. capsulatus* unter Infrarotdioden und Infrarot- und Blaulichtdioden war, im Vergleich zu Glühbirnen, lediglich die initiale Lag-Phase um sechs Stunden verkürzt. Die Zellzahlen nach Erreichen der stationären Phase waren gleich. Die Generationszeiten unterschieden sich im Falle der Verwendung von Infrarotdioden, mit einer Generationszeit von 4,5 h, zu denen unter Glühbirnen und Infrarot- und Blaulichtdioden, mit einer Generationszeit von 5 h.

Die Beleuchtung von *R. capsulatus* ausschließlich mit Blaulichtdioden hatte den größten Einfluss auf das Wachstum. Die initiale Lag-Phase war um 12 h und die Generationszeiten um den Faktor 3 (5 h > 15 h) verlängert. Aus den Untersuchungen mittels DNA-Microarray ergab sich, dass die Expression von 16 der 21 Gene für die 30S und 17 der 33 Gene für die 50S Untereinheiten der Ribosomen unter Infrarotdioden höher war als unter Blaulichtdioden, im Mittel um den Faktor 2,7 (30 S) bzw. 2,9 (50 S). Die verringerte Proteinbiosynthese bzw. die verminderte Expression der Gene für die ribosomalen Proteine konnte für *E. coli* und *M. tuberculosis* unter Stressbedingungen gezeigt werden. Bei *E. coli* Zellen sinkt die Proteinbiosynthese auf 20% wenn die Zellen Kohlenstoffmangelbedingungen ausgesetzt sind (Reeve et al., 1984). In *M. tuberculosis* sinkt die Expression der Gene für die ribosomalen Proteine unter Nährstoffmangelbedingungen (Betts et al., 2002). Bei der Anzucht von *R. capsulatus* allein unter Blaulichtdioden handelt es sich daher vermutlich um einen durch Nährstoffmangel, in diesem Falle einen durch Lichtmangel induzierten Zellstress. Dies bedeutet, dass die Zellen nicht in der Lage waren ausreichend ATP durch die ATPase zu generieren, da der Protonengradient durch das Photosystem nur unzureichend aufgebaut werden konnte.

Der Vergleich der Lichtbedingungen Infrarotdioden und Infrarot-/Blaulichtdioden zeigt, dass das Blaulicht, also Licht im Bereich der Absorption des Sphaeroids, kaum einen Einfluss auf das Wachstum von *R. capsulatus* hatte. Der Vergleich der Lichtbedingungen Infrarotdioden und Blaulichtdioden zeigte, dass die infrarote Strahlung im Absorptionsbereich des Bakteriochlorophyll a entscheidend für die Photosyntheseleistung ist, dass allein durch Blaulicht die Infrarotstrahlung nicht kompensiert werden und dies zu Lichtmangelstress führt. Dennoch waren die *R. capsulatus*

Zellen in der Lage unter diesen Mangelbedingungen phototroph zu wachsen. Die Regulation der Photosynthesegene durch das Zweikomponenten-Regulationsystem RegB/A erfolgt durch die Aktivierung von RegA durch RegB (Swem et al., 2001). Dabei wird die Aktivität der membrangebundenen Sensorikine RegB durch den Redoxzustand der *cbb₃*-Oxidase und des Ubichinonpools beeinflusst, welche Teil der photosynthetischen Elektronentransportkette sind (Hu et al., 2008). Die Expression der Photosynthesegene wird unter phototrophen Bedingungen und bei photosynthetischer Aktivität durch RegB/A verstärkt. Durch das gewählte Licht der Wellenlänge 462 nm kann *R. capsulatus* nur Photonen über das Carotinoid Sphaeroiden absorbieren. Das Sphaeroiden ist in den Photosynthesekomplexen zusammen mit den Bakteriochlorophyllen angeordnet, welche die in den Lichtsammelkomplexen absorbierte Lichtenergie auf das Reaktionszentrum übertragen (Fyfe & Cogdell, 1996; Isaacs et al., 1995). Die phänotypischen Veränderungen von *R. capsulatus* bei der Anzucht unter Blaulichtdioden zeigen, dass *R. capsulatus* nicht in der Lage ist Licht der Wellenlänge 462 nm in dem Maße photosynthetisch zu nutzen wie Licht der Wellenlänge 880 nm. Carotinoide erfüllen zwei wesentliche Funktionen in phototrophen Organismen. Zum einen verhindern sie die Photooxidation, bei der Sauerstoffradikale gebildet werden die das Photosystem beschädigen können (Cogdell et al., 1981; Glaeser & Klug, 2005; Hideg et al., 2007; Nishiyama et al., 2006). Zum anderen sind die Carotinoide akzessorische Pigmente in den Lichtsammelkomplexen und Reaktionszentren, die Lichtenergie an die Chlorophylle übertragen. Die Übertragung ist dabei abhängig vom Carotinoidtyp, dem Aufbau und der Stabilität der Photokomplexe und der Dauer der Anregungszustände der Carotinoide im Bezug zum Energietransfer zwischen Carotinoid und Chlorophyll. Die Effizienz der Energieübertragung kann dabei von 30% - 90% variieren (Cogdell & Frank, 1987; Goedheer, 1959; Pan et al., 2011). Im Falle der Bestrahlung mit Blaulichtdioden scheint die Übertragung der Lichtenergie vom *R. capsulatus* Sphaeroiden zum Bakteriochlorophyll *a* ineffizient zu sein, so dass daraus der beschriebene Phänotyp resultiert.

Mit Blick auf die heterologe Expression bleibt festzuhalten, dass unter keiner der Lichtbedingungen die maximale Zellmasse gesteigert wurde, sondern dass mit höherer Strahlungsintensität im infraroten Bereich die maximale Zellmasse schneller erreicht wird. Die ausschließliche Beleuchtung mit Blaulicht scheint, durch den Zellstress, den die Zellen unter diesen Bedingungen erfahren, nicht für die heterologe Überexpression geeignet zu sein.

4.1.2. Der Einfluss von Infrarotstrahlung und Blaulicht auf die Expression der Photosynthesegene und die Akkumulation der Photopigmente

Die Ausbildung des intracytoplasmatischen Membransystems kann einer der entscheidenden Vorteile von *Rhodobacter* bei der heterologen Expression von Membranproteinen sein (Tate, 2001; Wang et al., 2009). Die Ausbildung des Membransystems ist dabei eng an die Ausbildung des Photosystems von *R. capsulatus* gekoppelt (Kiley & Kaplan, 1988), wobei die Akkumulation der Photopigmente durch die Lichtintensität reguliert ist (Buggy et al., 1994). Durch die Verwendung von Leuchtdioden ergeben sich bei der phototrophen Anzucht von *R. capsulatus* Änderungen in der Lichtintensität im Vergleich zu Glühbirnen. Die Intensität, im Bereich der Absorption des Bakteriochlorophyll *a*, ist durch die Infrarotdioden um den Faktor 2,6 und durch die Blaulichtdioden, im Bereich der Absorption des Sphaeroiden, um den Faktor 14,7 gegenüber den Glühbirnen gesteigert, bei gleichzeitig geringerem Energieverbrauch.

Bei Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{660} von 1,0) zeigten sich Unterschiede in der Pigmentakkumulation abhängig von den Lichteigenschaften der Leuchtmittel. Wiederrum zeigten die Kulturen, die ohne Infrarotstrahlung, also nur mit Blaulichtdioden, angezogen wurden die größte Veränderung. Diese Kulturen zeigten eine um den Faktor 1,7 höhere Absorption des Bakteriochlorophyll *a* und eine um den Faktor 1,6 höhere Absorption des Sphaeroidens und dementsprechend eine gesteigerte Akkumulation der Photopigmente. Demgegenüber konnte, anhand der Microarraydaten, eine erhöhte Expression der Photosynthesegene in den Kulturen unter Infrarotdioden, im Mittel um den Faktor 2,0, gegenüber denen unter Blaulichtdioden festgestellt werden (Kap.3.1.7.2).

Es ist bekannt das durch den Regulator HrvA bei geringer Lichtintensität die Expression der Nitrogenasegene inhibiert (Raabe et al., 2002) und ebenfalls bei geringer Lichtintensität eine erhöhte Pigmentakkumulation nachgewiesen werden konnte (Buggy et al., 1994). Bei der Bestrahlung mit Infrarotdioden, was eine deutliche Steigerung der Strahlungsintensität gegenüber den Glühbirnen darstellt, sollte daher entweder eine höhere Pigmentakkumulation unter Glühbirnen oder eine Verringerung der Pigmentakkumulation unter Infrarotdioden zu messen sein, wenn die Veränderungen der Lichtintensität zwischen diesen beiden Lichtquellen ausreichend ist um einen Effekt des Regulators HrvA hervorzurufen. Die Pigmentakkumulation unterschied sich in diesen Fällen aber nur geringfügig, daher ist zu vermuten, dass die Änderung der Lichtintensität, im Vergleich zwischen Glühbirnen und Infrarotdioden, keinen Effekt auf die Expression der durch HrvA regulierten Gene hat.

Ein großer Teil der Proteine in Eukaryoten und Prokaryoten (20% - 30%) sind Membranproteine (Wagner et al., 2006). Die geringe Anzahl der Membranproteine deren Struktur mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt wurden, zeigt die Schwierigkeiten Membranproteine in

ausreichender Menge und Reinheit für diesen Prozess zu gewinnen (Grisshammer & Tate, 1995; White, 2004). Dabei sind die korrekte Faltung der Proteine und die effiziente Insertion der Proteine in die Membran die größten Hindernisse bei der heterologen Expression. Bis auf wenige Ausnahmen (Unger et al., 1999), muss daher auf die homologe Expression zurückgegriffen werden, die wiederum nur geringe Ausbeuten ergibt und eine aufwendige Reinigung und Isolierung der Membranproteine nach sich zieht (Tate, 2001). Durch die Verwendung speziell selektierter *E. coli* Stämme konnte die heterologe Expression von Membranproteinen verbessert werden, dennoch waren die Membranproteine entweder in "inclusion bodies" aggregiert oder konnten nativ nur in geringen Mengen synthetisiert werden (Miroux & Walker, 1996). Die Verwendung von *Rhodobacter* und *Rhodospirillum* zur Expression von Membranproteinen, unter Nutzung der vergrößerten Membranoberfläche durch die Ausbildung der ICM bei phototrophem Wachstum (Kiley & Kaplan, 1988) und der effizienten Faltungs- und Integrationsmaschinerie (Freigassner et al., 2009) konnte bereits demonstriert werden (Butzin et al., 2010; Laible et al., 2004). Dabei kann die Renaturierung von in "inclusion bodies" aggregierten Membranproteinen umgangen werden. Es konnte sogar ein Expressionssystem etabliert werden, dass es erlaubt die Proteinsynthese mit dem Methioninanalogselenomethionin vorzunehmen, was die Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie erleichtert (Laible et al., 2005).

Durch die Messungen der Pigmentakkumulation in *R. capsulatus* konnte gezeigt werden dass sich die Ausbildung der ICM, durch die Verwendung von Blaulichtdioden zur Anzucht, noch weiter steigern lässt als dies unter Belichtung mit Glühbirnen der Fall ist. Da aber Expression und Zellwachstum, also die Bildung von Biomasse und die Proteinbiosynthese, durch den Lichtmangelstress herab gesetzt sind, scheint einer Kombination beider Elemente, also Blaulichtdioden und Infrarotdioden, für diesen Zweck ratsam. So könnte durch die anfängliche Beleuchtung ausschließlich mit Blaulichtdioden die Membranoberfläche vergrößert werden, um anschließend die Proteinexpression durch das Zuschalten der Infrarotdioden zu fördern.

Durch seine Stoffwechselvielfalt ist *R. capsulatus* ein interessanter Kandidat für die Ganzzellbiokatalyse von Feinchemikalien wie z.B. Carotinoiden. Bei der Synthese von Carotinoiden ist die Verfügbarkeit von Vorstufen das größte Hindernis für nicht-carotinogene Organismen (Ruther et al., 1997) und muss durch verschiedene Methoden gesteigert werden (Farmer & Liao, 2000; Wang et al., 2000). Die Nutzung von *R. capsulatus* als carotinogenem Organismus kann dabei ein entscheidender Vorteil sein (Harker & Hirschberg, 1998; Lee & Schmidt-Dannert, 2002). Für die Ganzzellbiokatalyse von Carotinoiden scheint die Beleuchtung ausschließlich mit Blaulichtdioden einen Vorteil zu ergeben, da hier das carotinogene Bakterium *R. capsulatus* noch zusätzlich mehr Pigmente, also auch Carotinoidvorstufen, für die Carotinoidbiosynthese bildet.

4.1.3. Der Einfluss von Infrarotstrahlung und Blaulicht auf die Expression der Nitrogenase

R. capsulatus bildet unter Stickstoffmangelbedingungen, welche durch die Zugabe von L-Serin als Stickstoffquelle im Medium simuliert werden können (s.Kap.1.3.2.2), nicht nur den Nitrogenaseenzymkomplex aus, der *R. capsulatus* befähigt molekularen Stickstoff zu fixieren, sondern auch eine Vielzahl unterschiedlicher Metall-Kofaktoren. Durch die Ausbildung dieser Metall-Kofaktoren ist *R. capsulatus* ein interessanter Wirtsorganismus für die heterologe Expression von Proteinen mit ebensolchen Kofaktoren. Desweiteren wird die Expression des *nifHDK*-Operons stark positiv reguliert, so dass sich der *nifHDK*-Promotor für die heterologe Expression verwenden lässt (s. Kap.4.3). Der Einfluss der Lichtbedingungen auf diese Eigenschaften sollte durch einen Nachweis der Dinitrogenasereduktase NifH erfolgen.

Es konnte gezeigt werden, dass bei der Akkumulation des Nitrogenaseenzymkomplexes, bestimmt durch einen immunologischen Nachweis der Dinitrogenasereduktase NifH, kein Unterschied zwischen der Beleuchtung mit Glühbirnen, Infrarotdioden sowie Infrarot- und Blaulichtdioden bestand. Unter diesen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass die Dinitrogenasereduktase bei einer OD_{660} 1,0, also in der logarithmischen Wachstumsphase, in gleichen Mengen gebildet wird. Unter Bestrahlung mit Blaulichtdioden dagegen konnte keine Dinitrogenasereduktase in der logarithmischen Wachstumsphase, bei einer OD_{660} von 1,0, nachgewiesen werden. In der späten logarithmischen Wachstumsphase bzw. der frühen stationären Phase, bei einer OD_{660} von 2,0, konnte in allen Kulturen die Dinitrogenasereduktase in gleichen Mengen nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen mittels DNA-Microarray, im Vergleich der Bedingungen Infrarotlicht zu Blaulicht, konnten dieses Ergebnis bestätigen. Die Expression der Dinitrogenasereduktase war in der logarithmischen Wachstumsphase in den Kulturen, welche mit Blaulichtdioden angezogen wurden, um den Faktor 19 geringer als bei den Kulturen die unter Infrarotdioden angezogen wurden. Auch die Gene *nifDK*, welche mit *nifH* eine Transkriptionseinheit bilden, wurden unter Blaulichtdioden um den Faktor 29 *nifD* und 33 *nifK* geringer exprimiert als unter Infrarotdioden. Die Gene der beiden Nitrogenasetranskriptionsaktivatoren NifA1 und NifA2 wurden unter Blaulichtdioden, bei einer OD_{660} von 1,0, ebenfalls geringer exprimiert als unter Infrarotdioden (*nifA1* 3,3, *nifA2* 3,7).

R. capsulatus generiert unterschiedliche Metall-Kofaktoren, wie z.B. die [2Fe-2S], [3Fe-4S] und [4Fe-4S] Cluster der Ferredoxine und c-Typ Cytochrome, die [Ni-Fe] Cluster der Hydrogenase und den FeMoCo [7Fe-9S-1Mo] und P-Cluster [8Fe-7S] der Nitrogenase (Armengaud & Jouanneau, 1995; Armengaud et al., 1997; Elsen et al., 2003; Jouanneau et al., 2000; Jouanneau et al., 1993; Pawlik et al., 2010; Siemann et al., 2001). Die Expression von Metall-Kofaktor Proteinen in *E. coli* kann in bestimmten Fällen schwierig, da nur das Apoprotein gebildet wird (Armengaud et al., 1995; Guerrini et al., 2008) oder unmöglich sein (De Smet et al., 2001). Systeme für die Expression von Metall-Kofaktor Proteinen sind bereits für *Rhodobacter* beschrieben (De Smet et al.,

2001; Kappler & McEwan, 2002). Die erhöhte Expression der durch das *nif*-Regulon gesteuerten Gene *nifN* und der Ferredoxine, *fdxN*, *fdxC* und *fdxD* unter Infrarotdioden im Vergleich zu Blaulichtdioden zeigt, dass die heterologe Expression von Proteinen mit Eisen-Schwefel-Kofaktoren unter diesen Bedingungen begünstigt zu sein scheint.

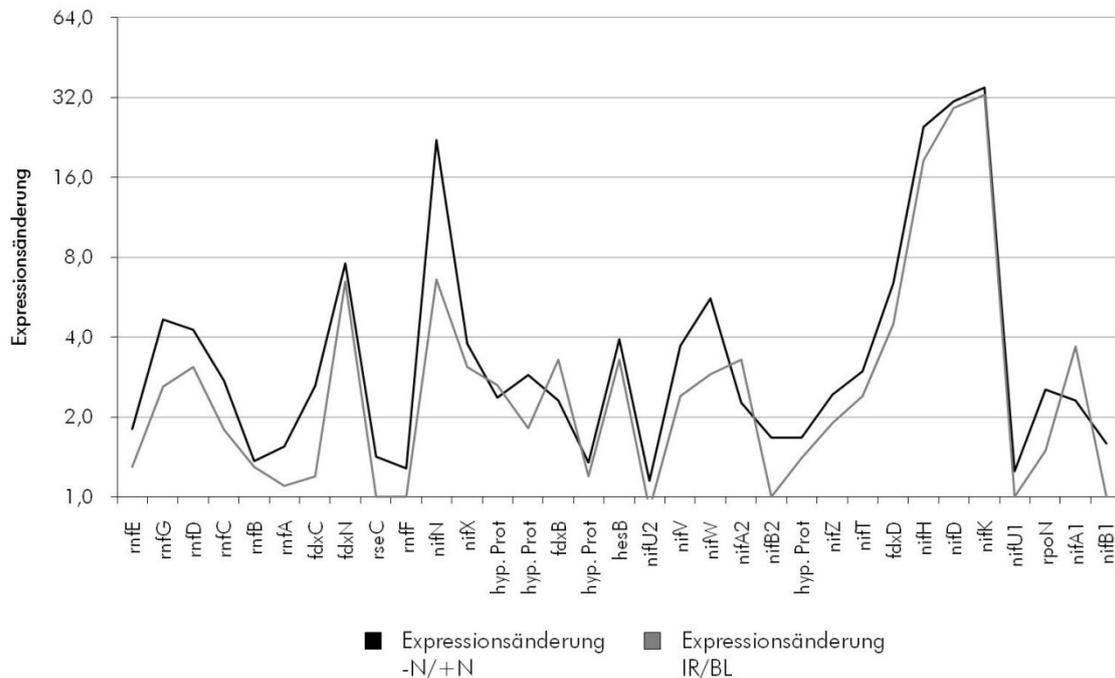


Abb.4.1 Vergleich der Expressionsänderung der stickstoffabhängig regulierten Gene, im Vergleich von Nitrogenase dereprimierende (-N) zu reprimierenden (+N) Bedingungen und im Vergleich Infrarot- (IR) zu Blaulichtdioden (BL).

Bei einem Vergleich der Expressionsänderung, zwischen Infrarot- (IR) zu Blaulichtdioden (BL) und Nitrogenase dereprimierenden (-N) zu reprimierenden (+N) Bedingungen zeigte sich, dass die Muster der Expressionsänderung Ähnlichkeiten aufwiesen (s. Abb.4.1). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass der Regulationsmechanismus bei Nitrogenase reprimierenden Bedingungen, die Expression der stickstoffabhängig regulierten Gene inhibiert, gleichermaßen die Expression dieser Gene auch bei Lichtmangelbedingungen inhibiert. Dies wäre ein weiterer Hinweis darauf, dass die Regulation der Nitrogenase eng an die Photosynthese gekoppelt ist. Die Kopplung beider Systeme ist durch das RegB/A System, welches die Expression des Nitrogenasetranskriptionsaktivators NifA2 reguliert, bereits beschrieben (Elsen et al., 2004). Der hier vorliegende Regulationsmechanismus betrifft aber beide Nitrogenasetranskriptionsaktivatoren gleichermaßen, sowohl NifA1 als auch NifA2, weshalb die Effekte von einem übergeordneten System hervorgerufen werden müssen. Die hier in Frage kommenden Regulatoren sind das NtrB/C Zweikomponenten-Regulationssystem (Cullen et al., 1996), das NtrY/X Zweikomponenten-Regulationssystem (Drepper et al., 2006) oder die P_{II} -Signaltransduktions-Proteine GlnB/K (Drepper et al., 2003), wobei das direkte Signal und der entsprechende Effektor sich aus den

vorhandenen Daten nicht ableiten lassen. Für das NtrY/X Zweikomponenten-Regulationssystem ist eine Interaktion mit dem Zweikomponenten-Regulationssystem RegB/A durch direkte Interaktion der Proteine RegA und NtrX, beschrieben (Gregor et al., 2007). Dies und die funktionelle Ähnlichkeit des Proteins NtrY mit NtrB, welche beide in der Lage sind den Regulator NtrC zu phosphorylieren und zu aktivieren bzw. zu dephosphorylieren und zu deaktivieren (Drepper et al., 2006), ist ein Hinweis darauf, dass das Zweikomponenten-Regulationssystem NtrY/X die direkte Verbindung der Stickstofffixierung zur Photosynthese darstellen kann.

4.1.4. Der Einfluss von Infrarotstrahlung und Blaulicht auf Expression verschiedener Gene

Bei der Analyse mittels DNA-Microarray ergaben sich bei vier weiteren annotierten oder vermuteten Transkriptionseinheiten erhöhte Transkriptmengen unter Infrarotdioden gegenüber Blaulichtdioden. Die Transkriptionseinheit *pstSCAB-phoU* zeigte eine im Mittel um den Faktor 4,3 erhöhte Expression unter Infrarotdioden gegenüber Blaulichtdioden. Untersuchungen in *R. sphaeroides* zeigten, dass die Gene *pstSCAB* für einen Phosphat-ABC-Transporter und die Gene *phoUB* für die Regulatoren dieses Transporters kodieren. Die Expression der Gene des Phosphat-ABC-Transporters, kodiert durch *pstSCAB*, wird unter Phosphat-Mangelbedingungen induziert (Matsuzaki et al., 2003).

Die Transkriptionseinheit *flaAF-flbT* hat eine im Mittel um den Faktor 9,8 erhöhte Expression unter Infrarotdioden gegenüber Blaulichtdioden. Das Gen *flaA* kodiert für ein Flagellinprotein, die Gene *flaF* und *flbT* kodieren für einen Flagellen-Biosynthese-Regulator und einen Flagellin-Synthese-Repressor. Untersuchungen in *Caulobacter centenum* zeigen, dass beide Proteine FlaA und FlbT post-transkriptionale Regulatoren sind welche die 5'UTR Region der *fliK* mRNA binden und entweder für deren Stabilität (FlaA) oder Degradation (FlbT) verantwortlich sind (Anderson & Gober, 2000; Llewellyn et al., 2005).

Bei den ORFs RCAP_rcc00608 bis RCAP_rcc00610 und RCAP_rcc02888 bis RCAP_rcc0892 handelt es sich wahrscheinlich um weitere Transkriptionseinheiten. Die Expression dieser Transkriptionseinheiten war im Mittel um den Faktor 13,9 (RCAP_rcc00608-00610) und 20,8 (RCAP_rcc02888-02892) unter Infrarotdioden gegenüber Blaulichtdioden erhöht. Assoziiert zu diesen ORFs sind die Gene *cspA1* und *cspA3*, welche für Kälteschockproteine kodieren. Untersuchungen in *E. coli* zeigen, dass die Expression von *cspA* bei Temperaturen von 30°C und niedriger induziert wird (Jones & Inouye, 1994).

Für keines dieser Proteine ist ein lichtabhängiger oder lichtmangelabhängiger Regulationsmechanismus bekannt. Zudem waren die Zellen bei der Anzucht unter Infrarotdioden weder Phosphatmangel ausgesetzt, was die Regulation des *pstSCAB*-Operons erklären würde, noch waren die Temperaturen unter den Standardbedingungen von 30°C, was die erhöhte Expression

der Kälteschockproteine unter Infrarotdioden erklären würde. Die Regulationsmechanismen, welche als Antwort auf verschiedene Stressbedingungen ausgelöst werden, sind in vielen Fällen noch nicht genau untersucht, es lassen sich keine Homologien zu den entsprechend bekannten Systemen finden (de Vries et al., 2001) oder es gibt eine mögliche Quervernetzung verschiedener metabolischer Systeme und deren Regulatoren (Drepper et al., 2006; Gregor et al., 2007). Eine weitere Untersuchung mittels Microarrayanalyse unter verschiedenen Lichtbedingungen, z.B. ein Vergleich zwischen den Anzuchtbedingungen Infrarotdioden und Infrarot-/Blaulichtdioden, kann für die vier verschiedenen Transkriptionseinheiten aufklären ob es sich hierbei um einen Effekt handelt, der durch die Lichtmangelbedingungen hervorgerufen wird oder um eine direkte Blaulicht induzierte Regulation.

4.1.5. Untersuchung der *pyp*-Mutante unter Infrarot- und Blaulichtdioden

Bei den Veränderungen, welche sich durch die Verwendung verschiedener Lichtquellen, bei der Anzucht von *R. capsulatus* ergaben, lag die Vermutung nahe, dass eines oder mehrere dieser Systeme durch den Blaulichtrezeptor PYP, dem einzigen bekannten Blaulichtrezeptor in *R. capsulatus*, beeinflusst werden. Bei den Phänotypen, welche sich durch die unterschiedlichen Lichtbedingungen von phototroph wachsenden *R. capsulatus* Kulturen ergaben, konnte bei der Untersuchung des Wachstumsverhaltens, der Pigmentakkumulation und beim Nachweis des Nitrogenaseenzymkomplexes in dem Stamm RB1, mit einer Insertionsmutation im *pyp*-Gen, kein Unterschied zum Wildtyp Stamm B10S festgestellt werden. Der Stamm RB1 zeigte unter Bestrahlung mit Infrarotlichtdioden, Blaulichtdioden und einer Kombination aus beiden das entsprechend gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp Stamm B10S. Da keine Unterschiede zwischen Infrarotdioden und Infrarot-/Blaulichtdioden gemessen werden konnten, war ein Blaulicht induzierter regulatorischer Effekt vermittelt durch PYP auf das Wachstum nicht zu vermuten. Die Akkumulation von Photopigmenten war unter den verschiedenen Lichtbedingungen im Stamm RB1 dem Wildtyp B10S gleich. Auch beim Stamm RB1 konnte eine erhöhte Akkumulation der Photopigmente unter Blaulichtdioden nachgewiesen werden. Der Nachweis eines direkten lichtabhängigen Effekts auf die Pigmentakkumulation konnte nicht erbracht werden. Der immunologische Nachweis der Nitrogenasereduktase in den Stämmen *R. capsulatus* B10S und RB1 erbrachte ebenfalls keine Unterschiede.

Die Analyse der Transkriptmenge der *pyp*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp B10S mittels Microarray zeigte allerdings eine deutliche Veränderung. Die Gene, welche für den Photosyntheseapparat und die Proteine der Bakteriochlorophyll- und Carotinoidsynthese kodieren, zeigte sich bei der Microarrayanalyse eine negative Änderung der Transkriptmenge bei der *pyp*-Mutante RB1. Dies bedeutet, daß die Expression der Photosynthesegene im Wildtyp B10S einem

regulatorischen Effekt unterliegen an dem Blaulichtrezeptor PYP beteiligt ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Änderung der Transkriptmengen auch zu einer verminderten Akkumulation der Photopigmente führte (Kap.3.2.3.4.1). Diese Änderung der Pigmentakkumulation konnte bei dem vorangegangenen Versuch, bei einem Vergleich des Wildtyps B10S zur *pyp*-Mutante RB1 nicht nachgewiesen werden (Kap.3.2.3.3). Der Unterschied bei dem Nachweises der Pigmentakkumulation in Kap.3.2.3.2 und Kap.3.2.3.4.1 war der Zeitpunkt bzw. die Wuchsphase bei der die Proben für die Versuche entnommen wurden. Dies war zum einen in der logarithmischen Wuchsphase, einer optischen Dichte von OD_{660} 1,0, und am Ende der logarithmischen Wuchsphase bzw. zu Beginn der stationären Wuchsphase, bei einer optischen Dichte von OD_{660} 2,0. Eine Regulation durch den Blaulichtrezeptor PYP ist demnach nur in der späten logarithmischen bzw. frühen stationären Wuchsphase nachzuweisen.

Die Gene für den Nitrogenaseenzymkomplex, sowie die Gene für die Urease und den Ureatransporter zeigte im Vergleich der *pyp*-Mutante RB1 unter Infrarot- und Blaulicht zum Wildtyp B10S unter den gleichen Bedingungen eine starke positive Veränderung der Transkriptmenge. Dies bedeutet, dass die Repression der Gene für den Nitrogenaseenzymkomplex, die Urease und den Ureatransporter ebenfalls einem regulatorischen Effekt unterliegen an dem der Blaulichtrezeptor PYP beteiligt ist. Die Detektion der Dinitrogenasereduktase mittels immunologischem Nachweis (Kap.3.2.3.3) erfolgte zu zwei unterschiedlichen Wuchsphasen, in der logarithmischen und in der späten logarithmischen bzw. frühen stationären Wuchsphase, bei einer OD_{660} von 1,0 respektive 2,0. In beiden Fällen ist kein Unterschied in der Akkumulation der Dinitrogenasereduktase zu erkennen. Der Nitrogenaseenzymkomplex, der FeMo-Nitrogenase, aus *Azotobacter vinelandii* zeigt eine hohe Enzymstabilität, wobei selbst nach Inhibierung der Expression der Nitrogeansegene nach zwei Stunden keine Verminderung der Enzymmenge nachgewiesen werden konnte (Dingler *et al.*, 1988). Da der Zeitraum zwischen den einzelnen Wuchsphasen bzw. dem Erreichen einer OD_{660} von 1,0 und dem Erreichen einer OD_{660} von 2,0 unter Infrarot- und Blaulichtbedingungen 5 Stunden beträgt, kann dies eine mögliche Erklärung dafür sein, daß zwar die RNA-Transkriptmengen unterschiedlich sind, sich aber keine Veränderung der Proteinmengen nachweisen läßt.

Das Zweikomponenten-Regulationssystem RegB/A, welches für die Redox-abhängige Regulation verschiedener Gene (*puf*, *puc*, *bch*, *crt*, ...) verantwortlich ist (Kap.1.3.1.1), und das Zweikomponenten-Regulationssystem NtrB/C, welches für die Stickstoff-abhängige Regulation verschiedener Gene (*nif*, *anf*, *ure*, *urt*,...) verantwortlich ist (Kap.1.3.2.1), zeigten, wie die von diesen Systemen regulierten Gene, eine jeweilige Änderung (*regA* negativ, *ntrBC* positiv) in der Transkriptmenge, im Vergleich der *pyp*-Mutante RB1 unter Infrarot- und Blaulicht zum Wildtyp B10S unter den gleichen Bedingungen. Eine Interaktion von PYP mit jeweils beiden Zweikomponenten Regulationssystemen RegB/A und NtrB/C scheint hierbei sehr wahrscheinlich. Für beide Regulationssysteme ist eine

Autoregulation der Operons beschrieben. Im Falle des Gens *regB* und des Operons *senC-regA-hvrA* wird die Expression durch die im Operon kodierten Regulatoren RegB/A und HvrA gesteuert (Du et al., 1999). Im Falle des *nifR3-ntrB-ntrC* Operons kann die Expression des Operons ebenfalls durch die im Operon kodierten Regulatoren NtrB/C beeinflusst werden (Cullen et al., 1998). Die Aktivierung bzw. Repression der Zweikomponenten Regulationssysteme hat dementsprechend einen sich verstärkenden Effekt, in dem die Expression der von den Regulatoren beeinflussten Gene gesteuert würde und zusätzlich die Expression bzw. Repression der Regulatoren selbst.

Von den im Versuch Kap.3.2.2ff, im Vergleich des *R. capsulatus* Wildtyp B10S unter Infrarotlicht zum Wildtyp B10S unter Blaulicht, beschriebenen Genen, vermuteten Operons oder Genclustern, mit einer starken Änderung in den Transkriptmengen, konnte allein für das *flaAF-flbT-fla* Operon eine Veränderung der Transkriptmenge, im Vergleich der *pyp*-Mutante RB1 unter Infrarot- und Blaulicht zum Wildtyp B10S unter den gleichen Bedingungen, nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß die Änderungen in den Transkriptmengen der Gene für die ribosomalen Proteine (Kap.3.2.2.1), die beiden Gencluster mit den Genen für die Kälteschockproteine CspA1 und CspA3 sowie des Phosphat-ABC-Transporters kodiert durch das Operon *pstSCAB-phoU* (Kap.3.2.2.4), durch einen Lichtmangelstress bedingt sind, der durch das Ausbleiben infraroter Strahlung für die Anregung der Photosysteme auftrat.

Für das Operon *flaAF-flbT-fla* ist keine Licht-abhängige Regulation beschrieben, noch gibt es einen Hinweis auf eine Regulation, welche durch die Zweikomponenten Regulationssysteme RegB/A oder NtrB/C vermittelt wird.

4.2. Erweiterung des pRho-Vektorensystems mit dem Strep II-Tag und Expression des Gens *fdxA* für das Ferredoxin II aus *R. capsulatus*

Die Anwendung von *R. capsulatus* für heterologe Expression von Proteinen mit Metall-Kofaktoren ließ sich nicht mit dem für *R. capsulatus* bestehenden pRho-Vektorensystem vornehmen, da nur eine His₆-Tag für die affinitätschromatographische Separation bei den Vektoren pRhokHi-2 und pRhotHi-2 zur Verfügung stand. Der His₆-Tag kann eine Chelatbindung mit Ionen wie Co²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ aber auch Fe²⁺ und Mg²⁺ ausbilden und somit Kofaktoren die diese Ionen tragen aus den Proteinen herauslösen. Das pRho-Vektorensystem wurde erweitert, damit für eine affinitätschromatographische Separation von Proteinen mit Metall-Kofaktoren ein C-terminaler Strep II-Tag verwendet werden kann. Die Gensequenz welche im Vektor pET51b(+) für den Strep II-Tag kodiert, wurde an den Kodongebrauch von *R. capsulatus* angepasst und die Sequenz des His₆-Tags in den Vektoren pRhokHi-2 und pRhotHi-2 gegen die des Strep II-Tags ausgetauscht. Die so entstandenen Vektoren wurde pRhokS-2 und pRhotS-2 benannt. Die Expression des Ferredoxins II

aus *R. capsulatus* sollte mit dem Vektor pRhotS-*fdxA* vorgenommen werden und Reinigung im Anschluss mit dem angepassten Strep II-Tag durchgeführt werden.

R. capsulatus verfügt über sechs Ferredoxine, drei sogenannte Pflanzentyp Ferredoxine, die über einen oder mehrere [2Fe-2S] Komplexe verfügen und drei sogenannte Bakterientyp Ferredoxine, die einen oder mehrere [4Fe-4S] Komplexe besitzen. Von den drei Bakterientyp Ferredoxinen stellt das Ferredoxin II, welches einen [3Fe-4S] und einen [4Fe-4S] Komplex besitzt, eine Besonderheit dar. Ferredoxine mit dieser Konfiguration an Eisen-Schwefel Komplexen wurden auch in *Azotobacter*, *Bacillus*, *Desulfovibrio*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Saccharo-polyspora*, *Streptomyces* und *Thermus* nachgewiesen, wobei die genaue Funktion dieser Ferredoxine nicht geklärt werden konnte.

Die Expression des Gens *fdxA* wurde unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, um den Einfluss dieser Bedingungen auf die Kofaktorsynthese und deren Insertion in das Apoprotein zu untersuchen. Die gewählten Bedingungen waren zum einen Wachstum unter anaeroben (-O₂) und aeroben (+O₂) Bedingungen und zum anderen unter Nitrogenase dereprimierenden (-N) und reprimierenden Bedingungen (+N). Unter den verschiedenen Bedingungen konnten Mengen von 0,52 mg/L [+N/-O₂]; 1,45 mg/L [-N/-O₂]; 1,87 mg/L [+N/+O₂] des FdII Proteins exprimiert und gereinigt werden.

Das Gen *fdxA* wurde gleichermaßen in *R. capsulatus* unter den verschiedenen Bedingungen exprimiert, als auch in *E. coli*, um die Kofaktorbeladung des Proteins in zwei unterschiedlichen Organismen zu testen. Bei diesem Vergleich zeigte sich, durch die Laufweite im nativen Polyacrylamidgel, dass alle in *R. capsulatus* exprimierten FdII Proteine über Eisen-Schwefel-Kofaktoren verfügten, bei dem FdII Protein, welches in *E. coli* exprimiert wurde, war dies erwartungsgemäß nicht der Fall (Armengaud & Jouanneau, 1995).

Durch eine Absorptionmessung im Bereich von 300 nm – 450 nm sollte die Art der Kofaktoren in den in *R. capsulatus* exprimierten FdII Proteinen ermittelt werden (Armengaud et al., 1995). Die Absorptionmessung der Proteinproben lässt vermuten, dass die Proteine über unterschiedliche Eisen-Schwefel Kofaktoren verfügten und sich die Absorption dieser verschiedenen Kofaktoren überschneidet. Eine direkte Aussage über die Art der Kofaktoren lässt sich anhand der Absorptionsdaten nicht treffen. Die Bedingungen unter denen das *fdxA* in *R. capsulatus* exprimiert wurde, zeigten dass bei der Expression unter den zwei gegensätzlichsten Bedingungen, also aerob mit Ammoniumsulfat und anaerob mit L-Serin als Stickstoffquelle, die höchste Menge an Protein erhalten wurde und lässt daher zunächst keinen Schluss auf die optimalen Bedingungen zu.

Die Proteine Dihydroxysäure-Dehydratase (Imlay, 2003) und BchH (Sirijovski et al., 2007), eine Untereinheit der Magnesium-Chelatase, verfügen über einen Eisen-Schwefel Kofaktor der Konfiguration [4Fe-4S]. Dieser Kofaktor wird im Falle der katalytischen Aktivität der Dihydroxysäure-Dehydratase oder unter Sauerstoff oxidiert und dabei zu einem [3Fe-4S] Kofaktor.

Bei BchH dient der Kofaktor als Sauerstoffsensoren, der in Anwesenheit von Sauerstoff oxidiert, wobei ein Eisenatom aus dem Kofaktor entlassen wird (Imlay, 2003; Johnson et al., 2005; Py & Barras, 2010; Sirijovski et al., 2007). Die photometrischen Messungen zeigten Absorptionsmaxima die jeweils unterschiedlichen Kofaktoren zu zuordnen waren. Man kann daher auch bei dem Protein FdII vermuten, dass es sich um ein sauerstoffsensitives Ferredoxin handelt bei dem die Kofaktoren beide Konfigurationen annehmen können.

Eine Anpassung der Expressionsbedingungen wie zum Beispiel die Verwendung des Promotors P_{nif} im Vektor pRhonS-2 oder die Expression unter Infrarotdioden und Blaulichtdioden könnte die Synthese des FdII in *R. capsulatus* verbessern, so dass mehr Protein, mit der vermuteten korrekten Kofaktorbeladung von je einem [3Fe-4S] und einem [4Fe-4S] Komplex gewonnen werden kann.

4.3. Erweiterung des pRho-Vektorensystems mit dem Nitrogenase Promotor P_{nif} und Expression des Fluoreszenzreporters YFP

Das Expressionssystem für das Bakterium *Rhodobacter capsulatus* umfasst ein Set an Vektoren, welche bei einem gemeinsamen Grundgerüst (pRho) (s. Kap. 1.2.3), unterschiedliche Möglichkeiten für die heterologe Expression bieten. Die Expression kann über einen konstitutiven Promotor (P_{aphII}) erfolgen, welcher gleichermaßen die Expression des *aphII*-Gens, einem Antibiotikaselektionsmarker, und auch die Expression der Zielgene kontrolliert (pRhok). Alternativ steht die heterologe Expression unter Kontrolle des Promotors (P_{T7}), welcher von der T7-RNA-Polymerase erkannt wird (pRhot). Diese Variante verwendet den *R. capsulatus* Stamm B10ST7, der das Gen für die T7-RNA-Polymerase im Genom trägt (Katzke et al., 2010). Dieses System wurde um eine Variante erweitert, bei der die Expression durch den *R. capsulatus* eigenen *nif*-Promotor (P_{nif}) kontrolliert wird (pRhon), einer Sequenz die dem *nifHDK*-Operon vorgeschaltet ist.

Da *R. capsulatus* eine Vielzahl von Redox-Kofaktoren synthetisiert, eignet sich *R. capsulatus* für die funktionelle Expression von Enzymkomplexen, welche über Redox-Kofaktoren verfügen (Armengaud et al., 1995; Elsen et al., 2003; Jouanneau et al., 2000; Pawlik et al., 2010). Zudem eignet sich *R. capsulatus* für die Expression von Membranproteinen, da *R. capsulatus*, durch die Ausbildung von intracytoplasmatischen Membranvesikeln unter phototrophen Bedingungen, über eine vergrößerte Membranoberfläche verfügt (Kiley & Kaplan, 1988).

Die Expression mittels P_{nif} ist an strikte Bedingungen geknüpft, sie erfolgt nur unter phototrophen Bedingungen und Nitrogenase dereprimierenden Bedingungen (Elsen et al., 2004; Masepohl & Hallenbeck, 2010).

Die Versuche mit den Versionen V1-V3 des Promotors P_{nif} zeigten das innerhalb der Sequenz des Gens *nifH* ein regulatorisches Element, welches die Expressionsstärke des Promotors P_{nif} reguliert, zu finden ist. Dabei kann es sich um eine so genannte "enhancer" Sequenz handeln. Diese

"*enhancer*" Sequenzen finden sich 80 bp - 150 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts und aktivieren RNA-Polymerasen, die mit dem Sigmafaktor σ^{54} assoziiert sind (Ghosh et al., 2010; Rappas et al., 2005). Ungewöhnlich ist hierbei, dass diese "*enhancer*" Sequenz innerhalb des genkodierenden Bereichs des Gens *nifH* liegt. Regulatorische Sequenzen innerhalb des genkodierenden Bereichs sind bisher nur für die bakterielle Transkription mit Promotor-ähnlichen Sequenzen beschrieben. Diese befinden sich innerhalb des zu transkribierenden Bereich und führen durch die Bindung des Sigmafaktors zu einer stabileren Komplexierung mit der RNA-Polymerase (Deighan et al., 2011). In diesem Fall ist der Effekt der regulatorischen Sequenz ein Pausieren des Elongationsprozesses.

Durch den Versuch mit L-Serin bzw. Ammoniumsulfat als alternative Stickstoffquellen konnte gezeigt werden, dass der P_{nif} durch die Zugabe von Ammoniumsulfat zum Medium reprimiert werden kann. An Limitierungen, wie phototrophes Wachstum, Anaerobiose oder Stickstoffmangelbedingungen ist eine Expression unter Kontrolle des P_{T7} nicht gebunden. Jedoch ist die Expression der Gene für die Redox-Kofaktorsynthese, für die eingangs erwähnten Enzyme und Enzymkomplexe, gleichermaßen durch den *nif*-Promotor reguliert. Es ist daher mittels P_{nif} möglich eine "Koinduktion" der heterologen Expression sowie der Kofaktorsynthese vorzunehmen.

Der Vergleich der beiden Promotoren P_{nif} und P_{T7} ergab ein Verhältnis von $\sim 1:3$ in der Expressionsstärke unter Beleuchtung mit Glühbirnen. Bei der Beleuchtung mit Infrarotdioden war die Expressionsrate des P_{T7} nicht erhöht, die Expressionsrate des P_{nif} wurde um den Faktor 1,7 gesteigert. Das Verhältnis der Expressionsrate zwischen P_{nif} und P_{T7} betrug unter Infrarotdioden nur noch $\sim 1:2$. Unter Blaulichtdioden war nur eine sehr geringe Fluoreszenz des Reporters YFP zu messen. Die Gründe hierfür lagen wahrscheinlich in der verminderten Proteinbiosynthese, für die Expression des YFP unter der Kontrolle beider Promotoren, und der verminderten Expression der *nif*-Gene, für die Expression unter Kontrolle des P_{nif} unter Beleuchtung mit Blaulichtdioden.

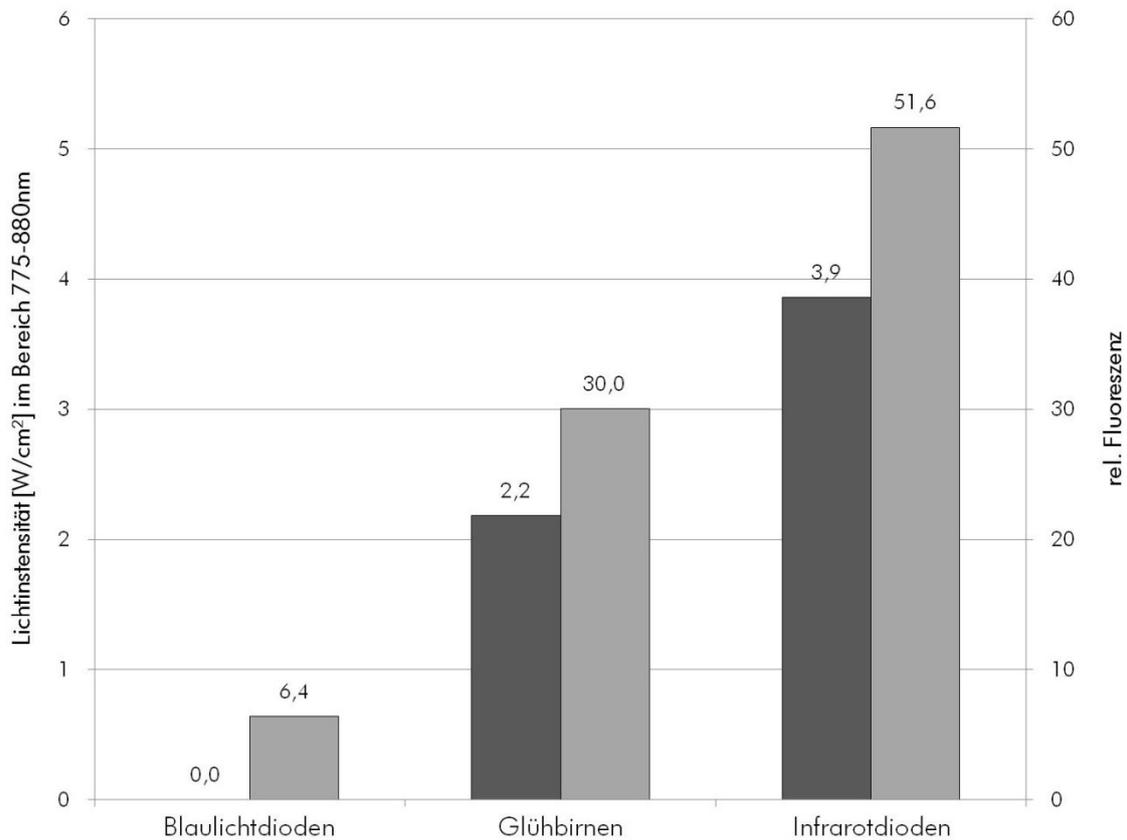


Abb.4.2 Verhältnis zwischen P_{nif} vermittelter Expression und Intensität der Infrarotstrahlung. Dargestellt sind die Lichtintensität im Bereich 775 - 880 nm (dunkelgrau), dem Bereich der Absorption des Bakteriochlorophyll a , und die relative Fluoreszenz des Reporters YFP in *R. capsulatus* B10S pRhonHi-2-YFP Kulturen (hellgrau).

Bei der Expression schwierig zu exprimierender Proteine sind strikt und einfach zu regulierende Promotoren eine der wichtigsten Komponenten eines Expressionssystems (Saida, 2007; Samuelson, 2011). Die Verwendung des Promotors P_{nif} im Expressionssystem der pRho-Vektoren lässt sich, im Gegensatz zum T7-RNA-Polymerase System, welches bereits in unterschiedliche bakterielle Systeme übertragen werden konnte (Katzke et al., 2010), im besten Falle in den nahen Verwandten *R. sphaeroides* übertragen (Jäger et al., 2007). Die regulatorischen Möglichkeiten des P_{nif} in *R. capsulatus* lassen sich dagegen nicht durch den P_{T7} erreichen. Die Expressionsstärke des P_{nif} in *R. capsulatus* ist im Vergleich zu P_{T7} ausreichend für die heterologe Expression. Zudem lässt sich der Promotor auf einfache Weise durch hohe Konzentrationen von Ammoniumsulfat strikt inhibieren, oder mit einer bestimmten Konzentration von Ammoniumsulfat im Medium eine Autoinduktion vornehmen. Ebenfalls kann der Promotor durch die ausschließliche Verwendung von Blaulichtdioden inhibiert werden und die Promotorstärke durch die Intensität infraroter Strahlung reguliert werden (s.Abb.4.2).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Synthese von Proteinen mit Metall-Kofaktoren oder Membranproteinen mittels heterologer Expression ist in bakteriellen Expressionssystemen oft durch die physiologischen Eigenschaften der Expressionswirte limitiert. Um die Expression solcher Zielproteine dennoch zu ermöglichen, können Standardexpressionswirte, wie z.B. das Enterobakterium *Escherichia coli* genetisch modifiziert werden. In vielen Fällen stellt jedoch die Verwendung alternativer Expressionswirte grundsätzlich eine interessante Option dar. So scheinen z.B. phototrophe Bakterien, wie *Rhodobacter capsulatus*, aufgrund ihrer besonderen physiologischen Eigenschaften für die funktionelle Expression von Membranproteinen und Proteinen mit Metall-Kofaktor im besonderen Maße geeignet zu sein: Die phototrophe Anzucht von *R. capsulatus* geht mit der Ausbildung eines intracytoplasmatischen Membransystems (ICM) einher, wobei zudem effiziente Faltungs- und Integrationssysteme für Membranproteine zur Verfügung stehen. *R. capsulatus* generiert als phototropher und Stickstoff-fixierender Organismus außerdem eine Reihe von Redox-Kofaktoren, sodass auch die Synthese von Proteinen mit solchen Kofaktoren begünstigt ist. Im Rahmen der Arbeit wurde daher zunächst untersucht, inwieweit die Verwendung von LEDs, die ausschließlich im physiologisch relevanten Wellenlängenbereich Licht emittieren, die phototrophe Anzucht von *R. capsulatus*, sowie die Synthese der Photosynthesemembran und der Kofaktoren beeinflusst. Durch die Belichtung mit Infrarotdioden wurde zunächst ausschließlich das Bakteriochlorophyll des Photosystems angeregt, was zu verkürzten Generationszeiten, erhöhter Proteinbiosynthese und vermehrter Ausbildung von Metall-Kofaktoren führte. Bei der Verwendung von Blaulichtdioden (Anregung der Carotinoide des Photosystems), zeigte sich hingegen überraschend ein Phänotyp der vermutlich durch Lichtmangel induziert wird. Zunächst wurden bei diesen Lichtbedingungen das Wachstum und die Proteinbiosynthese beeinträchtigt. Darüber hinaus zeigte sich jedoch, dass *R. capsulatus* bei Blaulicht eine deutlich erhöhte Menge an Photopigmenten bildete, was ein Indikator für die erhöhte ICM-Synthese ist. Es ist dementsprechend möglich, bei der phototrophen Anzucht von *R. capsulatus* durch die Wahl der Lichtquellen physiologische Veränderungen herbeizuführen, die der funktionellen Synthese bestimmter Zielproteine, wie etwa Membranproteinen dienlich sind. Zur näheren Charakterisierung der Licht-abhängigen Phänotypen wurde eine Mutante von *R. capsulatus* erzeugt, die das "photoactive yellow protein", dem einzigen bekannten Blaulichtrezeptor in *R. capsulatus*, nicht mehr ausbilden kann. Bei dem Vergleich des *R. capsulatus* Wildtyps mit der *pyp*-Mutante unter Infrarot- und Blaulichtbeleuchtung, konnte erstmals gezeigt werden, dass die Expression der Photosynthese- und Nitrogenasegene in Abhängigkeit von PYP reguliert ist. Weiterhin wurden die schon bestehenden *R. capsulatus* pRho-Expressionsvektoren so optimiert, dass sie für die Reinigung von Membranproteinen und Proteinen mit Metall-Kofaktoren besser geeignet sind. Dazu wurde zum einen der *R. capsulatus* P_{nif} Promotor in den *Rhodobacter*

Expressionsvektor kloniert. Dieser Promotor erlaubt die Koinduktion der heterologen Genexpression mit der Ausbildung des ICM und der Eisen-Schwefel-Kofaktoren. Darüber hinaus wurde der His₆-Affinitätstag durch den Strep II Affinitätstag ersetzt, um die Metallbindungseigenschaften rekombinanter Metalloproteine nicht zu beeinflussen. Die Expressionsstärke und Regulierbarkeit des Promotors P_{nif} wurden zunächst durch die Expression des Fluoreszenzreporters YFP getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Promotor P_{nif} durch Ammonium und überraschender Weise auch durch Blaulicht strikt inhibiert werden kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich die Expressionsstärke durch eine einfache Änderung der Strahlungsintensität im infraroten Bereich moduliert werden kann. Diese Expressionsvektoren wurden anschließend zur Überexpression des Ferredoxins FdII, einem Redoxprotein mit einem [3Fe-4S] und einem [4Fe-4S] Eisen-Schwefel Kofaktor in *R. capsulatus* eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass *R. capsulatus* im Gegensatz zu *E. coli* in der Lage ist, dieses Protein mit den entsprechenden Metall-Kofaktoren zu synthetisieren.

SUMMARY

The synthesis of proteins which are carrying a metal-cofactor or are localized within the membrane is often limited because of unfavorable physiological properties of the expression hosts. Standard expression hosts like the enterobacterium *Escherichia coli* can genetically be modified, to enable expression of such proteins anyhow. In most cases the use of alternative expression hosts is in principle an interesting option. For example, phototrophic bacteria, such as *Rhodobacter capsulatus*, seem to be well suited for the functional expression of membrane proteins and proteins with metal-cofactors, due to their special physiological properties. Phototrophic growth of *R. capsulatus* leads to the formation of an intracytoplasmic membrane system, whereat an efficient folding and integration system for membrane proteins is provided. *R. capsulatus* generates as phototrophic and nitrogen fixing organism a variety of redox cofactors, so that the organism is also well suited for the synthesis of redox proteins.

Within this work the use of LEDs, which only emit light at the physiological relevant wavelengths, in photosynthetic growth of *R. capsulatus* was studied, as well as their influence on the generation of photosynthetic membrane and metal-cofactors. By using infrared light diodes only bacteriochlorophyll was excited leading to shorter generation times, a higher level of protein biosynthesis and enhanced metal-cofactor synthesis. Under illumination with blue light diodes (excitation of carotenoids) *R. capsulatus* showed a surprising phenotype, which was probably due to concomitant low-light conditions, in which cell growth and protein biosynthesis were impaired due to low photosynthesis efficiency. However, under these conditions *R. capsulatus* showed higher quantities of photopigments, which indicates increased ICM-synthesis. Thus, the use of different light sources allows to control certain physiological characteristics which are helpful for the functional expression of "difficult-to-express" proteins, as membrane and redox proteins, during phototrophic growth of *R. capsulatus*.

For a closer characterization of the light dependent phenotypes a mutant was generated, which is not able to express the photoactive yellow protein (PYP), which is the only known blue-light receptor in *R. capsulatus*. In comparison of the *R. capsulatus* Wildtyp to the *pyp*-mutant under infrared and bluelight illumination for the first time it could be shown that the expression of photosynthesis and nitrogenase genes is regulated by PYP.

Furthermore, the existing *R. capsulatus* pRho expression vectors were optimized in order to be better applicable for the expression and purification of membrane proteins and proteins with metal-cofactors. For that purpose, the *R. capsulatus* P_{nif} promoter was cloned into the *Rhodobacter* expression vector. This promoter allows coinduction of heterologous target gene expression and formation of the ICM as well as metal-cofactors. In addition, the His₆-affinity tag was substituted by

the Strep II affinity tag, to avoid any impairment which might occur due to the metal binding properties of the His₆ tag..

The level of expression and the regulation of the P_{nif} promoter were tested using the fluorescence reporter YFP. It could be shown that the promoter P_{nif} is strictly repressed by ammonium sulfate and surprisingly also by blue light. Furthermore, I demonstrated that the level of P_{nif}-dependent expression can be modulated by simple alterations in the intensity of infrared radiation. The novel expression vectors were finally used for the expression of the ferredoxin FdII, which is a redox protein harbouring a [3Fe-4S] and a [4Fe-4S] iron-sulfur cofactor. It could be shown, that in contrast to *E. coli R. capsulatus* is capable of synthesizing the FdII protein with the correct metal cofactors.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N. and Croughan, T. P. (1995) Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160:63-7
- Anderson, P. E. and Gober, J. W. (2000) FlbT, the post-transcriptional regulator of flagellin synthesis in *Caulobacter crescentus*, interacts with the 5' untranslated region of flagellin mRNA. *Molecular Microbiology* 38:41-52
- Arcondeguy, T., Jack, R. and Merrick, M. (2001) P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65:80-105
- Armengaud, J., Gaillard, J., Forest, E. and Jouanneau, Y. (1995) Characterization of a 2[4Fe-4S] ferredoxin obtained by chemical insertion of the Fe-S clusters into the apoferreredoxin II from *Rhodobacter capsulatus*. *European Journal of Biochemistry* 231:396-404
- Armengaud, J. and Jouanneau, Y. (1995) Overexpression in *Escherichia coli* of the *fdxA* gene encoding *Rhodobacter capsulatus* ferredoxin II. *Protein Expression and Purification* 6:176-84
- Armengaud, J., Meyer, C. and Jouanneau, Y. (1997) A [2Fe-2S] ferredoxin (FdVI) is essential for growth of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology* 179:3304-9
- Arnon, D. I., Tagawa, K. and Tsujimoto, H. Y. (1963) Role of Ferredoxin in the Energy Conversion Process of Photosynthesis. *Science* 140:378
- Avtges, P., Scolnik, P. A. and Haselkorn, R. (1983) Genetic and physical map of the structural genes (*nifH, D, K*) coding for the nitrogenase complex of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Journal of Bacteriology* 156:251-6
- Azam, T. A. and Ishihama, A. (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *Journal of Biological Chemistry* 274:33105-13
- Baneyx, F. and Mujacic, M. (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 22:1399-408
- Bauer, C., Elsen, S., Swem, L. R., Swem, D. L. and Masuda, S. (2003) Redox and light regulation of gene expression in photosynthetic prokaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 358:147-53; discussion 53-4
- Beloqui, A., De Maria, P. D., Golyshin, P. N. and Ferrer, M. (2008) Recent trends in industrial microbiology. *Current Opinion in Microbiology* 11:240-8
- Bernds J. (2006) Etablierung eines neuen Systems zur heterologen Expression von Membranproteinen in *Rhodobacter capsulatus* Diplomarbeit Ruhr-Universität Bochum
- Betts, J. C., Lukey, P. T., Robb, L. C., Mcadam, R. A. and Duncan, K. (2002) Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Molecular Microbiology* 43:717-31
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7:1513-23
- Borghese, R. and Wall, J. D. (1995) Regulation of the *glnBA* operon of *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology* 177:4549-52

- Borgstahl, G. E., Williams, D. R. and Getzoff, E. D. (1995) 1.4 A structure of photoactive yellow protein, a cytosolic photoreceptor: unusual fold, active site, and chromophore. **Biochemistry** 34:6278-87
- Bowman, W. C., Du, S., Bauer, C. E. and Kranz, R. G. (1999) In vitro activation and repression of photosynthesis gene transcription in *Rhodobacter capsulatus*. **Molecular Microbiology** 33:429-37
- Braatsch, S., Gomelsky, M., Kuphal, S. and Klug, G. (2002) A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*. **Molecular Microbiology** 45:827-36
- Braatsch, S., Moskvina, O. V., Klug, G. and Gomelsky, M. (2004) Responses of the *Rhodobacter sphaeroides* transcriptome to blue light under semiaerobic conditions. **Journal of Bacteriology** 186:7726-35
- Bruschi, M. and Guerlesquin, F. (1988) Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins. **FEMS Microbiology Reviews** 4:155-75
- Bucher, C., Zimmerman, R. S., Lynch, V., Kral, V. and Sessler, J. L. (2001) Synthesis of novel expanded calixphyrins: anion binding properties of a calix[6]phyrin with a deep cavity. **Journal of the American Chemical Society** 123:2099-100
- Buggy, J. J., Sganga, M. W. and Bauer, C. E. (1994) Characterization of a light-responding trans-activator responsible for differentially controlling reaction center and light-harvesting-I gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology** 176:6936-43
- Burgess, B. K., Stiefel, E. I. and Newton, W. E. (1980) Oxidation-reduction properties and complexation reactions of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. **Journal of Biological Chemistry** 255:353-6
- Butzin, N. C., Owen, H. A. and Collins, M. L. (2010) A new system for heterologous expression of membrane proteins: *Rhodospirillum rubrum*. **Protein Expression and Purification** 70:88-94
- Chan, M. K., Kim, J. and Rees, D. C. (1993) The nitrogenase FeMo-cofactor and P-cluster pair: 2.2 A resolution structures. **Science** 260:792-4
- Chen, C. Y., Yeh, K. L., Aisyah, R., Lee, D. J. and Chang, J. S. (2011) Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource Technology** 102:71-81
- Cogdell, R. J. and Frank, H. A. (1987) How carotenoids function in photosynthetic bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta** 895:63-79
- Cogdell, R. J., Gall, A. and Kohler, J. (2006) The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to in vivo membranes. **Quarterly Reviews of Biophysics** 39:227-324
- Cogdell, R. J., Hipkins, M. F., Macdonald, W. and Truscott, T. G. (1981) Energy transfer between the carotenoid and the bacteriochlorophyll within the B-800-850 light-harvesting pigment-protein complex of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. **Biochimica et Biophysica Acta** 634:191-202
- Cogdell, R. J., Howard, T. D., Bittl, R., Schlodder, E., Geisenheimer, I. and Lubitz, W. (2000) How carotenoids protect bacterial photosynthesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences** 355:1345-9
- Collins, M. L., Buchholz, L. A. and Remsen, C. C. (1991) Effect of Copper on *Methylomonas albus* BG8. **Applied and Environmental Microbiology** 57:1261-4
- Corchero, J. L. and Villaverde, A. (1998) Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. **Biotechnology and Bioengineering** 58:625-32

- Cullen, P. J., Bowman, W. C. and Kranz, R. G. (1996) In vitro reconstitution and characterization of the *Rhodobacter capsulatus* NtrB and NtrC two-component system. **Journal of Biological Chemistry** 271:6530-6
- De Smet, L., Kostanjevecki, V., Guisez, Y. and Van Beeumen, J. (2001) A novel system for heterologous expression of flavocytochrome c in phototrophic bacteria using the *Allochroamatium vinosum rbcA* promoter. **Archives of Microbiology** 176:19-28
- De Vries, N., Van Vliet, A. H. M. and Kusters, J. G. (2001) Gene Regulation.
- Deighan, P., Pukhrambam, C., Nickels, B. E. and Hochschild, A. (2011) Initial transcribed region sequences influence the composition and functional properties of the bacterial elongation complex. **Genes and Development** 25:77-88
- Dingler, C., Kuhla, J., Wassink, H. and Oelze, J. (1988) Levels and activities of nitrogenase proteins in *Azotobacter vinelandii* grown at different dissolved oxygen concentrations. **Journal of Bacteriology** 170:2148-2152
- Dobao, M. D. M., Castillo, F. and Pineda, M. (1993) Characterization of urease from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*; E1F1. **Current Microbiology** 27:119-23
- Dong, C., Elsen, S., Swem, L. R. and Bauer, C. E. (2002) AerR, a second aerobic repressor of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology** 184:2805-14
- Drepper, T., Arvani, S., Rosenau, F., Wilhelm, S. and Jaeger, K. E. (2005) High-level transcription of large gene regions: a novel T(7) RNA-polymerase-based system for expression of functional hydrogenases in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Biochemical Society Transactions** 33:56-8
- Drepper, T., Gross, S., Yakunin, A. F., Hallenbeck, P. C., Masepohl, B. and Klipp, W. (2003) Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Microbiology** 149:2203-12
- Drepper, T., Wiethaus, J., Giaourakis, D., Gross, S., Schubert, B., Vogt, M., Wiencek, Y., Mcewan, A. G. and Masepohl, B. (2006) Cross-talk towards the response regulator NtrC controlling nitrogen metabolism in *Rhodobacter capsulatus*. **FEMS Microbiology Letters** 258:250-6
- Drews, G., Peters, J. and Dierstein, R. (1983) Molecular-organization and biosynthesis of pigment-protein complexes of *Rhodospseudomonas capsulata*. **Annales de Microbiologie** 134B:151-8
- Du, S., Bird, T. H. and Bauer, C. E. (1998) DNA binding characteristics of RegA. A constitutively active anaerobic activator of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Biological Chemistry** 273:18509-13
- Du, S., Kouadio, J. L. and Bauer, C. E. (1999) Regulated expression of a highly conserved regulatory gene cluster is necessary for controlling photosynthesis gene expression in response to anaerobiosis in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology** 181:4334-41
- Dugaiczky, A., Boyer, H. W. and Goodman, H. M. (1975) Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. **Journal of Molecular Biology** 96:171-84
- Duport, C., Jouanneau, Y. and Vignais, P. M. (1990) Nucleotide sequence of *fdxA* encoding a 7Fe ferredoxin of *Rhodobacter capsulatus*. **Nucleic Acids Research** 18:4618
- Elhai, J. and Wolk, C. P. (1988) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. **Methods in Enzymology** 167:747-54

-
- Elsen, S., Colbeau, A., Chabert, J. and Vignais, P. M. (1996) The *hupTUV* operon is involved in negative control of hydrogenase synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology** 178:5174-81
- Elsen, S., Dischert, W., Colbeau, A. and Bauer, C. E. (2000) Expression of uptake hydrogenase and molybdenum nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is coregulated by the RegB-RegA two-component regulatory system. **Journal of Bacteriology** 182:2831-7
- Elsen, S., Duche, O. and Colbeau, A. (2003) Interaction between the H2 sensor HupUV and the histidine kinase HupT controls HupSL hydrogenase synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology** 185:7111-9
- Elsen, S., Swem, L. R., Swem, D. L. and Bauer, C. E. (2004) RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 68:263-79
- Emerich, D. W. and Burris, R. H. (1976) Interactions of heterologous nitrogenase components that generate catalytically inactive complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 73:4369-73
- Eraso, J. M. and Kaplan, S. (1994) *prrA*, a putative response regulator involved in oxygen regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of Bacteriology** 176:32-43
- Fahnert, B., Lilie, H. and Neubauer, P. (2004) Inclusion bodies: formation and utilisation. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology** 89:93-142
- Farmer, W. R. and Liao, J. C. (2000) Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control. **Nature Biotechnology** 18:533-7
- Fernandez-Arrojo, L., Guazzaroni, M. E., Lopez-Cortes, N., Beloqui, A. and Ferrer, M. (2010) Metagenomic era for biocatalyst identification. **Current Opinion in Biotechnology** 21:725-33
- Forchhammer, K. (2007) Glutamine signalling in bacteria. **Frontiers in Bioscience** 12:358-70
- Frank, H. A. and Cogdell, R. J. (1996) Carotenoids in photosynthesis. **Photochemistry and Photobiology** 63:257-64
- Freigassner, M., Pichler, H. and Glieder, A. (2009) Tuning microbial hosts for membrane protein production. **Microbial Cell Factories** 8:69
- Fyfe, P. K. and Cogdell, R. J. (1996) Purple bacterial antenna complexes. **Current Opinion in Structural Biology** 6:467-72
- Gavrilescu, M. and Chisti, Y. (2005) Biotechnology-a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances** 23:471-99
- Georgiadis, M. M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J. J. and Rees, D. C. (1992) Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. **Science** 257:1653-9
- Georgiou, G. and Valax, P. (1996) Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology** 7:190-7
- Ghosh, T., Bose, D. and Zhang, X. (2010) Mechanisms for activating bacterial RNA polymerase. **FEMS Microbiology Reviews** 34:611-27
- Gill, R. T., Valdes, J. J. and Bentley, W. E. (2000) A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering** 2:178-89

-
- Gläser, J. and Klug, G. (2005) Photo-oxidative stress in *Rhodobacter sphaeroides*: protective role of carotenoids and expression of selected genes. **Microbiology** 151:1927-38
- Glick, B. R. (1995) Metabolic load and heterologous gene expression. **Biotechnology Advances** 13:247-61
- Goedheer, J. C. (1959) Energy transfer between carotenoids and bacteriochlorophyll in chromatophores of purple bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta** 35:1-8
- Gomelsky, M. and Klug, G. (2002) BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. **Trends in Biochemical Sciences** 27:497-500
- Gregor, J. and Klug, G. (1999) Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light. **FEMS Microbiology Letters** 179:1-9
- Gregor, J., Zeller, T., Balzer, A., Habertzell, K. and Klug, G. (2007) Bacterial regulatory networks include direct contact of response regulator proteins: interaction of RegA and NtrX in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology** 13:126-39
- Grishammer, R. and Tate, C. G. (1995) Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. **Quarterly Reviews of Biophysics** 28:315-422
- Gross, G. and Hauser, H. (1995) Heterologous expression as a tool for gene identification and analysis. **Journal of Biotechnology** 41:91-110
- Grunberg-Manago, M., Hershey, J. B., Plumbridge, J. A., Sacerdot, C., Springer, M., Fayat, G., Lestienne, P., Mayaux, J. F. and Blanquet, S. (1985) Regulation of gene expression of translation components in *Escherichia coli*: initiation factors and aminoacyl tRNA synthetases. **Current Topics in Cellular Regulation** 26:503-20
- Guerrini, O., Burlat, B., Leger, C., Guigliarelli, B., Soucaille, P. and Girbal, L. (2008) Characterization of two [2Fe-2S] ferredoxins from *Clostridium acetobutylicum*. **Current Microbiology** 56:261-7
- Han, Y., Meyer, M. H., Keusgen, M. and Klug, G. (2007) A haem cofactor is required for redox and light signalling by the AppA protein of *Rhodobacter sphaeroides*. **Molecular Microbiology** 64:1090-104
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology** 166:557-80
- Hans, M., Buckel, W. and Bill, E. (2000) The iron-sulfur clusters in 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. Biochemical and spectroscopic investigations. **European Journal of Biochemistry** 267:7082-93
- Happ, H. N., Braatsch, S., Broschek, V., Osterloh, L. and Klug, G. (2005) Light-dependent regulation of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 is coordinately controlled by photosynthetic electron transport via the PrrBA two-component system and the photoreceptor AppA. **Molecular Microbiology** 58:903-14
- Harker, M. and Hirschberg, J. 1998 [17] Molecular biology of carotenoid biosynthesis in photosynthetic organisms. **Methods in Enzymology Academic Press**
- Hemschemeier, S. K., Kirndorfer, M., Hebermehl, M. and Klug, G. (2000) DNA binding of wild type RegA protein and its differential effect on the expression of pigment binding proteins in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology** 2:235-43
- Heck A. (2005) Etablierung eines neuen Systems zur heterologen Expression von Membranproteinen in *Rhodobacter capsulatus* Diplomarbeit Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

-
- Hideg, E., Kos, P. B. and Vass, I. (2007) Photosystem II damage induced by chemically generated singlet oxygen in tobacco leaves. *Physiologia Plantarum* 131:33-40
- Hochuli, E., Dobeli, H. and Schacher, A. (1987) New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of Chromatography* 411:177-84
- Hoffmann, F. and Rinas, U. (2004) Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 89:73-92
- Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J. P., Danchin, A. and Bertin, P. (2001) Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Molecular Microbiology* 40:20-36
- Hu, M., Yao, J., Carroll, D. K., Weremowicz, S., Chen, H., Carrasco, D., Richardson, A., Violette, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Bauerlein, E. L., Hahn, W. C., Gelman, R. S., Allred, C., Bissell, M. J., Schnitt, S. and Polyak, K. (2008) Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. *Cancer Cell* 13:394-406
- Hu, Y., Fay, A. W., Lee, C. C., Yoshizawa, J. and Ribbe, M. W. (2008) Assembly of nitrogenase MoFe protein. *Biochemistry* 47:3973-81
- Hübner, P., Masepohl, B., Klipp, W. and Bickle, T. A. (1993) *nif* gene expression studies in *Rhodobacter capsulatus*: *ntnC*-independent repression by high ammonium concentrations. *Molecular Microbiology* 10:123-32
- Hunter, C. N., Hundle, B. S., Hearst, J. E., Lang, H. P., Gardiner, A. T., Takaichi, S. and Cogdell, R. J. (1994) Introduction of new carotenoids into the bacterial photosynthetic apparatus by combining the carotenoid biosynthetic pathways of *Erwinia herbicola* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology* 176:3692-7
- Ihee, H., Rajagopal, S., Srajer, V., Pahl, R., Anderson, S., Schmidt, M., Schotte, F., Anfinrud, P. A., Wulff, M. and Moffat, K. (2005) Visualizing reaction pathways in photoactive yellow protein from nanoseconds to seconds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:7145-50
- Imhoff, J. F. and Rodriguez-Valera, F. (1984) Betaine is the main compatible solute of halophilic eubacteria. *Journal of Bacteriology* 160:478-9
- Imlay, J. A. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology* 57:395-418
- Inoue, K., Kouadio, J. L., Mosley, C. S. and Bauer, C. E. (1995) Isolation and in vitro phosphorylation of sensory transduction components controlling anaerobic induction of light harvesting and reaction center gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry* 34:391-6
- Isaacs, N. W., Cogdell, R. J., Freer, A. A. and Prince, S. M. (1995) Light-harvesting mechanisms in purple photosynthetic bacteria. *Current Opinion in Structural Biology* 5:794-7
- Jäger, A., Braatsch, S., Habertzell, K., Metz, S., Osterloh, L., Han, Y. and Klug, G. (2007) The AppA and PpsR proteins from *Rhodobacter sphaeroides* can establish a redox-dependent signal chain but fail to transmit blue-light signals in other bacteria. *Journal of Bacteriology* 189:2274-82
- Jana, S. and Deb, J. K. (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67:289-98
- Jeong, H. S. and Jouanneau, Y. (2000) Enhanced nitrogenase activity in strains of *Rhodobacter capsulatus* that overexpress the *rnf* genes. *Journal of Bacteriology* 182:1208-14
-

- Jiang, P., Peliska, J. A. and Ninfa, A. J. (1998) The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: role of 2-ketoglutarate in the regulation of glutamine synthetase adenylation state. **Biochemistry** 37:12802-10
- Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D. and Johnson, M. K. (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. **Annual Review of Biochemistry** 74:247-81
- Jones, M. R. (2009) The petite purple photosynthetic powerpack. **Biochemical Society Transactions** 37:400-7
- Jones, P. G. and Inouye, M. (1994) The cold-shock response--a hot topic. **Molecular Microbiology** 11:811-8
- Jones, R. and Haselkorn, R. (1989) The DNA sequence of the *Rhodobacter capsulatus* *ntrA*, *ntrB* and *ntrC* gene analogues required for nitrogen fixation. **Molecular and General Genetics** 215:507-16
- Joshi, H. M. and Tabita, F. R. (1996) A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation, and nitrogen fixation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 93:14515-20
- Jouanneau, Y., Duport, C., Meyer, C. and Gaillard, J. (1992) Expression in *Escherichia coli* and characterization of a recombinant 7Fe ferredoxin of *Rhodobacter capsulatus*. **Biochemical Journal** 286 (Pt 1):269-73
- Jouanneau, Y., Meyer, C., Asso, M., Guigliarelli, B. and Willison, J. C. (2000) Characterization of a nif-regulated flavoprotein (FprA) from *Rhodobacter capsulatus*. Redox properties and molecular interaction with a [2Fe-2S] ferredoxin. **European Journal of Biochemistry** 267:780-7
- Jouanneau, Y., Meyer, C., Gaillard, J., Forest, E. and Gagnon, J. (1993) Purification and characterization of a novel dimeric ferredoxin (FdIII) from *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Biological Chemistry** 268:10636-44
- Juda, G. A., Bollinger, J. A. and Dooley, D. M. (2001) Construction, overexpression, and purification of *Arthrobacter globiformis* amine oxidase-Strep-tag II fusion protein. **Protein Expression and Purification** 22:455-61
- Kappler, U. and 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 Letters** 529:208-14
- Katzke, N., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Markert, A., Svensson, V., Jaeger, K. E., Heck, A. and Drepper, T. (2010) A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Protein Expression and Purification** 69:137-46
- Keasling, J. D. (2010) Manufacturing molecules through metabolic engineering. **Science** 330:1355-8
- Kern, M., Kamp, P. B., Paschen, A., Masepohl, B. and Klipp, W. (1998) Evidence for a regulatory link of nitrogen fixation and photosynthesis in *Rhodobacter capsulatus* via HvrA. **Journal of Bacteriology** 180:1965-9
- Keuntje, B., Masepohl, B. and Klipp, W. (1995) Expression of the *putA* gene encoding proline dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus* is independent of NtrC regulation but requires an Lrp-like activator protein. **Journal of Bacteriology** 177:6432-9
- Kiley, P. J. and Kaplan, S. (1988) Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. **Microbiological Reviews** 52:50-69

-
- Klipp, W., Masepohl, B. and Puhler, A. (1988) Identification and mapping of nitrogen fixation genes of *Rhodobacter capsulatus*: duplication of a *nifA-nifB* region. **Journal of Bacteriology** 170:693-9
- Klug, G. and Drews, G. (1984) Construction of a gene bank of *Rhodospseudomonas capsulata* using a broad host range DNA cloning system. **Archives of Microbiology** 139:319-25
- Kolaj, O., Spada, S., Robin, S. and Wall, J. G. (2009) Use of folding modulators to improve heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories** 8:9
- Korndorfer, I. P. and Skerra, A. (2002) Improved affinity of engineered streptavidin for the Strep-tag II peptide is due to a fixed open conformation of the lid-like loop at the binding site. **Protein Science** 11:883-93
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., 2nd and Peterson, K. M. (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. **BioTechniques** 16:800-2
- Kranz, R. G. and Foster-Hartnett, D. (1990) Transcriptional regulatory cascade of nitrogen-fixation genes in anoxygenic photosynthetic bacteria: oxygen- and nitrogen-responsive factors. **Molecular Microbiology** 4:1793-800
- Kucz N. (2005) Erzeugung eines *nif*-Promotor basierten Expressionssystems in *Rhodobacter capsulatus*. Ruhr-Universität Bochum
- Kyndt, J. A., Hurley, J. K., Devreese, B., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A., Tollin, G. and Van Beeumen, J. J. (2004) *Rhodobacter capsulatus* photoactive yellow protein: genetic context, spectral and kinetics characterization, and mutagenesis. **Biochemistry** 43:1809-20
- Kyndt, J. A., Meyer, T. E. and Cusanovich, M. A. (2004) Photoactive yellow protein, bacteriophytochrome, and sensory rhodopsin in purple phototrophic bacteria. **Photochemical and Photobiological Sciences** 3:519-30
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680-5
- Laible, P. D., Hata, A. N., Crawford, A. E. and Hanson, D. K. (2005) Incorporation of selenomethionine into induced intracytoplasmic membrane proteins of *Rhodobacter* species. **Journal of Structural and Functional Genomics** 6:95-102
- Laible, P. D., Scott, H. N., Henry, L. and Hanson, D. K. (2004) Towards higher-throughput membrane protein production for structural genomics initiatives. **Journal of Structural and Functional Genomics** 5:167-72
- Larsen, D. S. and Van Grondelle, R. (2005) Initial photoinduced dynamics of the photoactive yellow protein. **ChemPhysChem** 6:828-37
- Lee, P. C. and Schmidt-Dannert, C. (2002) Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology** 60:1-11
- Leimkuhler, S., Kern, M., Solomon, P. S., Mcewan, A. G., Schwarz, G., Mendel, R. R. and Klipp, W. (1998) Xanthine dehydrogenase from the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* is more similar to its eukaryotic counterparts than to prokaryotic molybdenum enzymes. **Molecular Microbiology** 27:853-69
- Leonard, E., Yan, Y., Fowler, Z. L., Li, Z., Lim, C. G., Lim, K. H. and Koffas, M. A. (2008) Strain improvement of recombinant *Escherichia coli* for efficient production of plant flavonoids. **Molecular Pharmaceutics** 5:257-65
-

-
- Lesley, S. A., Graziano, J., Cho, C. Y., Knuth, M. W. and Klock, H. E. (2002) Gene expression response to misfolded protein as a screen for soluble recombinant protein. **Protein Engineering** 15:153-60
- Li, W., Zhou, X. and Lu, P. (2004) Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. **Research in Microbiology** 155:605-10
- Llewellyn, M., Dutton, R. J., Easter, J., O'donnol, D. and Gober, J. W. (2005) The conserved *flaF* gene has a critical role in coupling flagellin translation and assembly in *Caulobacter crescentus*. **Molecular Microbiology** 57:1127-42
- Loeschcke A. (2008) Bakterielle Produktions von Carotinoiden unter Verwendung des IVAC-Systems
Diplomarbeit - Universität zu Köln
- Lopez-Gallego, F. and Schmidt-Dannert, C. (2010) Multi-enzymatic synthesis. **Current Opinion in Chemical Biology** 14:174-83
- Madigan, M. T. and Gest, H. (1978) Growth of a photosynthetic bacterium anaerobically in darkness, supported by "oxidant-dependent" sugar fermentation. **Archives of Microbiology** 117:119-22
- Mansell, T. J., Fisher, A. C. and Delisa, M. P. (2008) Engineering the protein folding landscape in gram-negative bacteria. **Current Protein and Peptide Science** 9:138-49
- Masepohl, B., Drepper, T., Paschen, A., Gross, S., Pawlowski, A., Raabe, K., Riedel, K. U. and Klipp, W. (2002) Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology** 4:243-8
- Masepohl, B. and Hallenbeck, P. C. (2010) Nitrogen and molybdenum control of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Advances in Experimental Medicine and Biology** 675:49-70
- Masuda, S., Dong, C., Swem, D., Setterdahl, A. T., Knaff, D. B. and Bauer, C. E. (2002) Repression of photosynthesis gene expression by formation of a disulfide bond in CrtJ. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 99:7078-83
- Matsuzaki, M., Abe, M., Hara, S., Iwasaki, Y., Yamamoto, I. and Satoh, T. (2003) An abundant periplasmic protein of the denitrifying phototroph *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. denitrificans is PstS, a component of an ABC phosphate transport system. **Plant and Cell Physiology** 44:212-6
- Maury, J., Asadollahi, M. A., Moller, K., Clark, A. and Nielsen, J. (2005) Microbial isoprenoid production: an example of green chemistry through metabolic engineering. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology** 100:19-51
- Mcewan, A. G. (1994) Photosynthetic electron transport and anaerobic metabolism in purple non-sulfur phototrophic bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek** 66:151-64
- Mcree, D. E., Tainer, J. A., Meyer, T. E., Van Beeumen, J., Cusanovich, M. A. and Getzoff, E. D. (1989) Crystallographic structure of a photoreceptor protein at 2.4 Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 86:6533-7
- Merril, C. R. (1990) Gel-staining techniques. **Methods in Enzymology** 182:477-88
- Metz, S., Jager, A. and Klug, G. (2009) In vivo sensitivity of blue-light-dependent signaling mediated by AppA/PpsR or PrrB/PrrA in *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of Bacteriology** 191:4473-7
- Meyer, T. E. (1985) Isolation and characterization of soluble cytochromes, ferredoxins and other chromophoric proteins from the halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halophila*. **Biochimica et Biophysica Acta** 806:175-83

- Miroux, B. and 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. **Journal of Molecular Biology** 260:289-98
- Molisch, H. 1907 Die Purpurbakterien nach neuen Untersuchungen : eine mikrobiologische Studie. **Fischer**
- Mortenson, L. E. (1963) Nitrogen Fixation: Role of Ferredoxin in Anaerobic Metabolism. **Annual Review of Microbiology** 17:115-38
- Mosley, C. S., Suzuki, J. Y. and Bauer, C. E. (1994) Identification and molecular genetic characterization of a sensor kinase responsible for coordinately regulating light harvesting and reaction center gene expression in response to anaerobiosis. **Journal of Bacteriology** 176:7566-73
- Mosley, C. S., Suzuki, J. Y. and Bauer, C. E. (1995) Identification and molecular genetic characterization of a sensor kinase responsible for coordinately regulating light harvesting and reaction center gene expression in response to anaerobiosis. **Journal of Bacteriology** 177:3359
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology** 155:335-50
- Murby, M., Samuelsson, E., Nguyen, T. N., Mignard, L., Power, U., Binz, H., Uhlen, M. and Stahl, S. (1995) Hydrophobicity engineering to increase solubility and stability of a recombinant protein from respiratory syncytial virus. **European Journal of Biochemistry** 230:38-44
- Nacke, H., Will, C., Herzog, S., Nowka, B., Engelhaupt, M. and Daniel, R. (2011) Identification of novel lipolytic genes and gene families by screening of metagenomic libraries derived from soil samples of the German Biodiversity Exploratories. **FEMS Microbiology Ecology**
- Ninfa, A. J. and Atkinson, M. R. (2000) PII signal transduction proteins. **Trends in Microbiology** 8:172-9
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I. and Murata, N. (2006) A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta** 1757:742-9
- Oelze, J. (1981) Composition and development of the bacterial photosynthetic apparatus. **Subcellular Biochemistry** 8:1-73
- Oelze, J. and Drews, G. (1972) Membranes of photosynthetic bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta** 265:209-39
- Otero, J. M. and Nielsen, J. (2010) Industrial systems biology. **Biotechnology and Bioengineering** 105:439-60
- Pan, J., Lin, S., Allen, J. P., Williams, J. C., Frank, H. A. and Woodbury, N. W. (2011) Carotenoid Excited-State Properties in Photosynthetic Purple Bacterial Reaction Centers: Effects of the Protein Environment. **Journal of Physical Chemistry. B**
- Park, J. B., Craggs, R. J. and Shilton, A. N. (2011) Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology** 102:35-42
- Park, S. R., Han, A. R., Ban, Y. H., Yoo, Y. J., Kim, E. J. and Yoon, Y. J. (2010) Genetic engineering of macrolide biosynthesis: past advances, current state, and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology** 85:1227-39
- Paschen, A., Drepper, T., Masepohl, B. and Klipp, W. (2001) *Rhodobacter capsulatus nifA* mutants mediating nif gene expression in the presence of ammonium. **FEMS Microbiology Letters** 200:207-13

- Pawlik, G., Kulajta, C., Sachelaru, I., Schroder, S., Waidner, B., Hellwig, P., Daldal, F. and Koch, H. G. (2010) The putative assembly factor CcoH is stably associated with the *cbb3*-type cytochrome oxidase. *Journal of Bacteriology* 192:6378-89
- Pawlowski, A., Riedel, K. U., Klipp, W., Dreiskemper, P., Gross, S., Bierhoff, H., Drepper, T. and Masepohl, B. (2003) Yeast two-hybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology* 185:5240-7
- Peti, W. and Page, R. (2007) Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expression and Purification* 51:1-10
- Pfennig, N. (1967) Photosynthetic bacteria. *Annual Review of Microbiology* 21:285-324
- Ponnampalam, S. N. and Bauer, C. E. (1997) DNA binding characteristics of CrtJ. A redox-responding repressor of bacteriochlorophyll, carotenoid, and light harvesting-II gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Biological Chemistry* 272:18391-6
- Preker, P., Hubner, P., Schmehl, M., Klipp, W. and Bickle, T. A. (1992) Mapping and characterization of the promoter elements of the regulatory *nif* genes *rpoN*, *nifA1* and *nifA2* in *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular Microbiology* 6:1035-47
- Py, B. and Barras, F. (2010) Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Nature Reviews. Microbiology* 8:436-46
- Raabe, K., Drepper, T., Riedel, K. U., Masepohl, B. and Klipp, W. (2002) The H-NS-like protein HvrA modulates expression of nitrogen fixation genes in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* by binding to selected *nif* promoters. *FEMS Microbiology Letters* 216:151-8
- Rappas, M., Schumacher, J., Beuron, F., Niwa, H., Bordes, P., Wigneshweraraj, S., Keetch, C. A., Robinson, C. V., Buck, M. and Zhang, X. (2005) Structural insights into the activity of enhancer-binding proteins. *Science* 307:1972-5
- Reeve, C. A., Amy, P. S. and Matin, A. (1984) Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 160:1041-6
- Reinbothe, C., El Bakkouri, M., Buhr, F., Muraki, N., Nomata, J., Kurisu, G., Fujita, Y. and Reinbothe, S. (2010) Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction. *Trends in Plant Science* 15:614-24
- Rinas, U. and Bailey, J. E. (1993) Overexpression of bacterial hemoglobin causes incorporation of pre-beta-lactamase into cytoplasmic inclusion bodies. *Applied and Environmental Microbiology* 59:561-6
- Rinas, U., Hoffmann, F., Betiku, E., Estape, D. and Marten, S. (2007) Inclusion body anatomy and functioning of chaperone-mediated in vivo inclusion body disassembly during high-level recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 127:244-57
- Rinas, U. and Puhler, A. (2007) Merging process engineering and systems biology. *Journal of Biotechnology* 132:341
- Romagnoli, S., Packer, H. L. and Armitage, J. P. (2002) Tactic responses to oxygen in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* WS8N. *Journal of Bacteriology* 184:5590-8
- Rosenau, F. and Jaeger, K.-E. 2003 Overexpression and Secretion of Biocatalysts in Pseudomonas. *Enzyme Functionality* CRC Press
- Roy, A., Shukla, A. K., Haase, W. and Michel, H. (2008) Employing *Rhodobacter sphaeroides* to functionally express and purify human G protein-coupled receptors. *Biological Chemistry* 389:69-78

- Ruther, A., Misawa, N., Boger, P. and Sandmann, G. (1997) Production of zeaxanthin in *Escherichia coli* transformed with different carotenogenic plasmids. **Applied Microbiology and Biotechnology** 48:162-7
- Sabate, R., De Groot, N. S. and Ventura, S. (2010) Protein folding and aggregation in bacteria. **Cellular and Molecular Life Sciences** 67:2695-715
- Saeki, K., Suetsugu, Y., Tokuda, K., Miyatake, Y., Young, D. A., Marrs, B. L. and Matsubara, H. (1991) Genetic analysis of functional differences among distinct ferredoxins in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Biological Chemistry** 266:12889-95
- Saida, F. (2007) Overview on the expression of toxic gene products in *Escherichia coli*. **Current Protocols in Protein Science Chapter 5:Unit 5** 19
- Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001 *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Samuelson, J. C. (2011) Recent developments in difficult protein expression: a guide to *E. coli* strains, promoters, and relevant host mutations. **Methods in Molecular Biology** 705:195-209
- Schallmeyer, M., Singh, A. and Ward, O. P. (2004) Developments in the use of Bacillus species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology** 50:1-17
- Schewe, H., Kaup, B. A. and Schrader, J. (2008) Improvement of P450(BM-3) whole-cell biocatalysis by integrating heterologous cofactor regeneration combining glucose facilitator and dehydrogenase in *E. coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 78:55-65
- Schlichting, I. and Berendzen, J. (1997) Out of the blue: the photocycle of the photoactive yellow protein. **Structure** 5:735-9
- Schmidt, T. G., Koepke, J., Frank, R. and Skerra, A. (1996) Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. **Journal of Molecular Biology** 255:753-66
- Schneider, K., Muller, A., Schramm, U. and Klipp, W. (1991) Demonstration of a molybdenum- and vanadium-independent nitrogenase in a *nifHDK*-deletion mutant of *Rhodobacter capsulatus*. **European Journal of Biochemistry** 195:653-61
- Schneider, K. H., Giffhorn, F. and Kaplan, S. (1993) Cloning, nucleotide sequence and characterization of the mannitol dehydrogenase gene from *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of General Microbiology** 139:2475-84
- Schumann, J. and Hertweck, C. (2006) Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. **Journal of Biotechnology** 124:690-703
- Sener, M., Strumpfer, J., Timney, J. A., Freiberg, A., Hunter, C. N. and Schulten, K. (2010) Photosynthetic vesicle architecture and constraints on efficient energy harvesting. **Biophysical Journal** 99:67-75
- Siemann, S., Schneider, K., Behrens, K., Knochel, A., Klipp, W. and Muller, A. (2001) FeMo cofactor biosynthesis in a *nifE*- mutant of *Rhodobacter capsulatus*. **European Journal of Biochemistry** 268:1940-52
- Siest, G., Oster, T., Visvikis, A., Thioudellet, C., Angele, C., Schiele, F. and Wellman, M. (1993) Application of gene transfer technologies to the production of enzyme reference materials: example of gamma-glutamyltransferase. **Clinical Chemistry** 39:1573-89
- Simon, C. and Daniel, R. (2009) Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology** 85:265-76

-
- Simon, R., Priefer, U. and Puhler, A. (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat Biotech* 1:784-91
- Sirijovski, N., Mamedov, F., Olsson, U., Styring, S. and Hansson, M. (2007) *Rhodobacter capsulatus* magnesium chelatase subunit BchH contains an oxygen sensitive iron-sulfur cluster. *Archives of Microbiology* 188:599-608
- Smith, H. O. and Birnstiel, M. L. (1976) A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic Acids Research* 3:2387-98
- Smyth, G. K., Yang, Y. H. and Speed, T. (2003) Statistical issues in cDNA microarray data analysis. *Methods in Molecular Biology* 224:111-36
- Sorensen, H. P. and Mortensen, K. K. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 115:113-28
- Sprenger, W. W., Hoff, W. D., Armitage, J. P. and Hellingwerf, K. J. (1993) The eubacterium *Ectothiorhodospira halophila* is negatively phototactic, with a wavelength dependence that fits the absorption spectrum of the photoactive yellow protein. *Journal of Bacteriology* 175:3096-104
- Spurio, R., Falconi, M., Brandi, A., Pon, C. L. and Gualerzi, C. O. (1997) The oligomeric structure of nucleoid protein H-NS is necessary for recognition of intrinsically curved DNA and for DNA bending. *EMBO Journal* 16:1795-805
- Stahl, C. L. and Sojka, G. A. (1973) Growth of *Rhodopseudomonas capsulata* on L- and D-malic acid. *Biochimica et Biophysica Acta* 297:241-5
- Steele, H. L., Jaeger, K. E., Daniel, R. and Streit, W. R. (2009) Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 16:25-37
- Strandberg, L. and Enfors, S. O. (1991) Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 57:1669-74
- Strnad, H., Lapidus, A., Paces, J., Ulbrich, P., Vlcek, C., Paces, V. and Haselkorn, R. (2010) Complete genome sequence of the photosynthetic purple nonsulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus* SB 1003. *Journal of Bacteriology* 192:3545-6
- Studier, F. W. and Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* 189:113-30
- Sturgis, J. N. and Niederman, R. A. (2008) Atomic force microscopy reveals multiple patterns of antenna organization in purple bacteria: implications for energy transduction mechanisms and membrane modeling. *Photosynthesis Research* 95:269-78
- Sturgis, J. N., Tucker, J. D., Olsen, J. D., Hunter, C. N. and Niederman, R. A. (2009) Atomic force microscopy studies of native photosynthetic membranes. *Biochemistry* 48:3679-98
- Swem, L. R., Elsen, S., Bird, T. H., Swem, D. L., Koch, H. G., Myllykallio, H., Daldal, F. and Bauer, C. E. (2001) The RegB/RegA two-component regulatory system controls synthesis of photosynthesis and respiratory electron transfer components in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Molecular Biology* 309:121-38
- Swem, L. R., Kraft, B. J., Swem, D. L., Setterdahl, A. T., Masuda, S., Knaff, D. B., Zaleski, J. M. and Bauer, C. E. (2003) Signal transduction by the global regulator RegB is mediated by a redox-active cysteine. *EMBO Journal* 22:4699-708

-
- Tabita, F. R., Gibson, J. L., Bowien, B., Dijkhuizen, L. and Meijer, W. G. (1992) Uniform designation for genes of the Calvin-Benson-Bassham reductive pentose phosphate pathway of bacteria. **FEMS Microbiology Letters** 78:107-10
- Tate, C. G. (2001) Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. **FEBS Letters** 504:94-8
- Terpe, K. (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology** 60:523-33
- Thony, B. and Hennecke, H. (1989) The -24/-12 promoter comes of age. **FEMS Microbiology Reviews** 5:341-57
- Tichy, H. V., Oberle, B., Stiehle, H., Schiltz, E. and Drews, G. (1989) Genes downstream from *pucB* and *pucA* are essential for formation of the B800-850 complex of *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology** 171:4914-22
- Trueman, L. J. (1995) Heterologous expression in yeast. **Methods in Molecular Biology** 49:341-54
- Unger, V. M., Kumar, N. M., Gilula, N. B. and Yeager, M. (1999) Expression, two-dimensional crystallization, and electron cryo-crystallography of recombinant gap junction membrane channels. **Journal of Structural Biology** 128:98-105
- Valentine, R. C. (1964) Bacterial Ferredoxin. **Bacteriological Reviews** 28:497-517
- Van Der Horst, M. A., Laan, W., Yeremenko, S., Wende, A., Palm, P., Oesterhelt, D. and Hellingwerf, K. J. (2005) From primary photochemistry to biological function in the blue-light photoreceptors PYP and AppA. **Photochemical and Photobiological Sciences** 4:688-93
- Vasseur-Godbillon, C., Hamdane, D., Marden, M. C. and Baudin-Creuzat, V. (2006) High-yield expression in *Escherichia coli* of soluble human alpha-hemoglobin complexed with its molecular chaperone. **Protein Engineering Design & Selection** 19:91-7
- Vichivanives, P., Bird, T. H., Bauer, C. E. and Robert Tabita, F. (2000) Multiple regulators and their interactions in vivo and in vitro with the *cbb* regulons of *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Molecular Biology** 300:1079-99
- Villaverde, A. and Carrio, M. M. (2003) Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. **Biotechnology Letters** 25:1385-95
- Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 76:615-9
- Wagner, S., Bader, M. L., Drew, D. and De Gier, J. W. (2006) Rationalizing membrane protein overexpression. **Trends in Biotechnology** 24:364-71
- Wagner, S., Klepsch, M. M., Schlegel, S., Appel, A., Draheim, R., Tarry, M., Högbohm, M., Van Wijk, K. J., Slotboom, D. J., Persson, J. O. and De Gier, J. W. (2008) Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 105:14371-6
- Wall, J. G. and Pluckthun, A. (1995) Effects of overexpressing folding modulators on the in vivo folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology** 6:507-16
- Wang, C., Oh, M. K. and Liao, J. C. (2000) Directed evolution of metabolically engineered *Escherichia coli* for carotenoid production. **Biotechnology Progress** 16:922-6
-

-
- Wang, G., Angermuller, S. and Klipp, W. (1993) Characterization of *Rhodobacter capsulatus* genes encoding a molybdenum transport system and putative molybdenum-pterin-binding proteins. **Journal of Bacteriology** 175:3031-42
- Wang, W., Hu, Z., Chen, X., Zhao, Z., Li, J. and Chen, G. (2009) Heterologous synthesis and assembly of functional LHII antenna complexes from *Rhodovulum sulfidophilum* in *Rhodobacter sphaeroides* mutant. **Molecular Biology Reports** 36:1695-702
- Waterman, M. R., Jenkins, C. M. and Pikuleva, I. (1995) Genetically engineered bacterial cells and applications. **Toxicology Letters** 82-83:807-13
- Weaver, P. F., Wall, J. D. and Gest, H. (1975) Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. **Archives of Microbiology** 105:207-16
- Weckesser, J., Drews, G. and Fromme, I. (1972) Chemical analysis of and degradation studies on the cell wall lipopolysaccharide of *Rhodopseudomonas capsulata*. **Journal of Bacteriology** 109:1106-13
- Weckesser, J., Drews, G. and Ladwig, R. (1972) Localization and biological and physicochemical properties of the cell wall lipopolysaccharide of *Rhodopseudomonas capsulata*. **Journal of Bacteriology** 110:346-53
- Weickert, M. J., Doherty, D. H., Best, E. A. and Olins, P. O. (1996) Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology** 7:494-9
- Wenzel, S. C. and Muller, R. (2005) Recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathways. **Current Opinion in Biotechnology** 16:594-606
- Westers, L., Westers, H. and Quax, W. J. (2004) *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. **Biochimica et Biophysica Acta** 1694:299-310
- White, S. H. (2004) The progress of membrane protein structure determination. **Protein Science** 13:1948-9
- Williams, R. M. and Rimsky, S. (1997) Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks. **FEMS Microbiology Letters** 156:175-85
- Willison, J. C., Pierrard, J. and Hubner, P. (1993) Sequence and transcript analysis of the nitrogenase structural gene operon (*nifHDK*) of *Rhodobacter capsulatus*: evidence for intramolecular processing of *nifHDK* mRNA. **Gene** 133:39-46
- Willows, R. D. (2003) Biosynthesis of chlorophylls from protoporphyrin IX. **Natural Product Reports** 20:327-41
- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Madigan, M. T., Fowler, V. J., Hahn, C. M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K. H. and Fox, G. E. (1984) The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. **Systematic and Applied Microbiology** 5:315-26
- Wu, J. and Bauer, C. E. (2008) RegB/RegA, a global redox-responding two-component system. **Advances in Experimental Medicine and Biology** 631:131-48
- Wu, J. and Bauer, C. E. (2010) RegB Kinase Activity Is Controlled in Part by Monitoring the Ratio of Oxidized to Reduced Ubiquinones in the Ubiquinone Pool. **MBio** 1:272-310
- Wycuff, D. R. and Matthews, K. S. (2000) Generation of an AraC-*araBAD* promoter-regulated T7 expression system. **Analytical Biochemistry** 277:67-73
- Xu, L. Y. and Link, A. J. (2009) Stress responses to heterologous membrane protein expression in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters** 31:1775-82

-
- Yakunin, A. F. and Hallenbeck, P. C. (2002) AmtB is necessary for NH₄(+)-induced nitrogenase switch-off and ADP-ribosylation in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology** 184:4081-8
- Young, D. A., Bauer, C. E., Williams, J. C. and Marrs, B. L. (1989) Genetic evidence for superoperonal organization of genes for photosynthetic pigments and pigment-binding proteins in *Rhodobacter capsulatus*. **Molecular and General Genetics** 218:1-12
- Youvan, D. C., Alberti, M., Begusch, H., Bylina, E. J. and Hearst, J. E. (1984) Reaction center and light-harvesting I genes from *Rhodospseudomonas capsulata*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 81:189-92
- Youvan, D. C. and Ismail, S. (1985) Light-harvesting II (B800-B850 complex) structural genes from *Rhodospseudomonas capsulata*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 82:58-62
- Youvan, D. C., Ismail, S. and Bylina, E. J. (1985) Chromosomal deletion and plasmid complementation of the photosynthetic reaction center and light-harvesting genes from *Rhodospseudomonas capsulata*. **Gene** 38:19-30
- Youvan, D. C. and Marrs, B. L. (1984) Molecular genetics and the light reactions of photosynthesis. **Cell** 39:1-3
- Zweers, J. C., Barak, I., Becher, D., Driessen, A. J., Hecker, M., Kontinen, V. P., Saller, M. J., Vavrova, L. and Van Dijk, J. M. (2008) Towards the development of *Bacillus subtilis* as a cell factory for membrane proteins and protein complexes. **Microbial Cell Factories** 7:10

7. ANHANG

7.1. Microarraydaten

7.1.1. Microarraydaten des Vergleichs Infrarot- und Blaulichtdioden.

Tab.7.1 Daten der Microarrayanalyse des Vergleichs *R. capsulatus* B10S unter Infrarot- und Blaulichtdioden. Gezeigt sind die Messwerte und Annotationen aller Gene, bei denen ein Unterschied in der Transkriptmenge nachgewiesen werden konnte, der mehr als dem Faktor 2,0 oder weniger als dem Faktor 0,5 entsprach. Die Gene sind nach ihrer relativen Position auf dem *R. capsulatus* Chromosom angeordnet.

Gen-ID nach NCBI	Verhältnis d. Expr.	Annotation nach NCBI
RCAP_rcc00007	3.3	flagellar hook protein FlgE
RCAP_rcc00014	2.1	xylose isomerase
RCAP_rcc00042	3.0	PAS/PAC sensor domain-containing protein
RCAP_rcc00054	2.3	inositol monophosphatase family protein
RCAP_rcc00060	2.3	chromosome-partitioning protein ParB
RCAP_rcc00065	2.5	transcription termination factor Rho
RCAP_rcc00078	2.0	hypothetical protein RCAP_rcc00078
RCAP_rcc00128	2.0	ABC transporter permease
RCAP_rcc00147	2.2	translation elongation factor Tu-1
RCAP_rcc00162	2.0	hypothetical protein RCAP_rcc00162
RCAP_rcc00166	2.1	sulfotransferase family protein
RCAP_rcc00167	2.5	family 2 glycosyl transferase
RCAP_rcc00173	2.2	glucose-1-phosphate thymidyltransferase
RCAP_rcc00174	2.1	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase
RCAP_rcc00203	0.5	hypothetical protein RCAP_rcc00203
RCAP_rcc00207	2.5	saccharopine dehydrogenase (NAD ⁺ , L-lysine-forming)
RCAP_rcc00212	3.7	hypothetical protein RCAP_rcc00212
RCAP_rcc00214	2.2	hypothetical protein RCAP_rcc00214
RCAP_rcc00216	2.8	hypothetical protein RCAP_rcc00216
RCAP_rcc00286	2.5	transcription antitermination protein NusG
RCAP_rcc00287	2.2	50S ribosomal protein L11
RCAP_rcc00288	2.7	50S ribosomal protein L1
RCAP_rcc00289	3.2	50S ribosomal protein L10
RCAP_rcc00291	3.4	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
RCAP_rcc00292	2.9	DNA-directed RNA polymerase beta subunit
RCAP_rcc00294	2.1	30S ribosomal protein S12
RCAP_rcc00295	2.1	30S ribosomal protein S7
RCAP_rcc00296	3.6	translation elongation factor G-1
RCAP_rcc00297	2.3	translation elongation factor Tu-2
RCAP_rcc00298	2.1	30S ribosomal protein S10
RCAP_rcc00299	2.6	50S ribosomal protein L3
RCAP_rcc00300	3.2	50S ribosomal protein L4
RCAP_rcc00301	3.2	50S ribosomal protein L23
RCAP_rcc00302	3.3	50S ribosomal protein L2
RCAP_rcc00303	2.8	30S ribosomal protein S19
RCAP_rcc00304	3.6	50S ribosomal protein L22

RCAP_rcc00305	4.3	30S ribosomal protein S3
RCAP_rcc00308	3.2	50S ribosomal protein L29
RCAP_rcc00309	3.0	30S ribosomal protein S17
RCAP_rcc00310	2.4	50S ribosomal protein L14
RCAP_rcc00311	2.9	50S ribosomal protein L24
RCAP_rcc00312	2.9	50S ribosomal protein L5
RCAP_rcc00313	3.0	30S ribosomal protein S14
RCAP_rcc00314	2.5	30S ribosomal protein S8
RCAP_rcc00315	2.8	50S ribosomal protein L6
RCAP_rcc00316	2.5	50S ribosomal protein L18
RCAP_rcc00317	2.7	30S ribosomal protein S5
RCAP_rcc00318	2.5	50S ribosomal protein L30
RCAP_rcc00320	2.1	hypothetical protein RCAP_rcc00320
RCAP_rcc00322	2.1	preprotein translocase subunit SecY
RCAP_rcc00323	2.1	adenylate kinase
RCAP_rcc00324	2.9	30S ribosomal protein S13
RCAP_rcc00325	3.0	30S ribosomal protein S11
RCAP_rcc00326	3.4	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha
RCAP_rcc00327	3.6	50S ribosomal protein L17
RCAP_rcc00337	2.4	glutamate/aspartate ABC transporter permease BztC
RCAP_rcc00338	3.2	glutamate/aspartate ABC transporter ATP-binding protein BztD
RCAP_rcc00369	2.2	GNAT family acetyltransferase
RCAP_rcc00484	0.4	alanine dehydrogenase
RCAP_rcc00490	0.3	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
RCAP_rcc00496	3.5	valyl-tRNA synthetase
RCAP_rcc00499	3.4	hypothetical protein RCAP_rcc00499
RCAP_rcc00500	4.5	hypothetical protein RCAP_rcc00500
RCAP_rcc00531	2.2	carbamoyl-phosphate synthase large subunit
RCAP_rcc00537	2.4	response regulator receiver protein
RCAP_rcc00550	2.6	LysR family transcriptional regulator
RCAP_rcc00567	3.7	Nif-specific regulatory protein-1
RCAP_rcc00570	32.8	nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain
RCAP_rcc00571	29.2	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain
RCAP_rcc00572	18.5	nitrogenase iron protein-1
RCAP_rcc00573	4.5	ferredoxin V
RCAP_rcc00574	2.2	Crp/Fnr family transcriptional regulator
RCAP_rcc00575	3.8	hypothetical protein RCAP_rcc00575
RCAP_rcc00597	2.8	hypothetical protein RCAP_rcc00597
RCAP_rcc00604	2.6	integral membrane protein, TerC family
RCAP_rcc00607	7.1	cold shock protein CspA-1
RCAP_rcc00608	10.5	hypothetical protein RCAP_rcc00608
RCAP_rcc00609	18.5	hypothetical protein RCAP_rcc00609
RCAP_rcc00610	19.5	hypothetical protein RCAP_rcc00610
RCAP_rcc00611	2.9	nickel-responsive regulator NikR
RCAP_rcc00612	3.5	hypothetical protein RCAP_rcc00612
RCAP_rcc00613	2.7	TetR family transcriptional regulator

RCAP_rcc00657	2.4	hypothetical protein RCAP_rcc00657
RCAP_rcc00658	2.1	hypothetical protein RCAP_rcc00658
RCAP_rcc00659	2.0	photosynthetic reaction center H subunit
RCAP_rcc00660	2.2	protein PucC-1
RCAP_rcc00661	3.0	magnesium-protoporphyrin O-methyltransferase
RCAP_rcc00663	2.4	magnesium chelatase H subunit
RCAP_rcc00665	2.0	light-independent protochlorophyllide reductase N subunit
RCAP_rcc00666	2.1	2-vinyl bacteriochlorophyllide hydratase
RCAP_rcc00669	2.7	magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester anaerobic oxidative cyclase
RCAP_rcc00670	3.8	bacteriochlorophyll 4-vinyl reductase
RCAP_rcc00677	2.4	magnesium chelatase ATPase subunit I
RCAP_rcc00686	2.9	2-desacetyl-2-hydroxyethyl bacteriochlorophyllide A dehydrogenase
RCAP_rcc00688	5.2	chlorophyllide reductase subunit BchY
RCAP_rcc00689	2.4	chlorophyllide reductase subunit BchZ
RCAP_rcc00693	3.0	photosynthetic reaction center L subunit
RCAP_rcc00694	2.3	photosynthetic reaction center M subunit
RCAP_rcc00695	2.4	intrinsic membrane protein PufX
RCAP_rcc00704	2.1	oligopeptide ABC transporter permease OppC-1
RCAP_rcc00716	2.7	pyridine nucleotide transhydrogenase subunit beta
RCAP_rcc00720	0.4	succinyl-CoA synthetase (ADP-forming) subunit beta
RCAP_rcc00721	0.4	succinyl-CoA synthetase (ADP-forming) subunit alpha
RCAP_rcc00722	0.4	lipoprotein
RCAP_rcc00734	2.2	lipoprotein
RCAP_rcc00737	2.1	hypothetical protein RCAP_rcc00737
RCAP_rcc00742	3.1	ATP synthase F0 subunit C
RCAP_rcc00743	2.5	ATP synthase F0 subunit B
RCAP_rcc00744	2.0	ATP synthase F0 subunit B
RCAP_rcc00754	2.0	lipoprotein
RCAP_rcc00787	2.3	monosaccharide ABC transporter permease
RCAP_rcc00810	2.3	polyphosphate kinase
RCAP_rcc00834	2.8	aminopeptidase P
RCAP_rcc00842	2.7	hypothetical protein RCAP_rcc00842
RCAP_rcc00845	3.9	hypothetical protein RCAP_rcc00845
RCAP_rcc00852	2.1	ATP-dependent RNA helicase SrmB
RCAP_rcc00952	2.1	type I restriction-modification system RcaSBIP subunit M
RCAP_rcc00954	2.4	type I restriction-modification system RcaSBIP subunit S
RCAP_rcc00974	0.5	phage hypothetical protein
RCAP_rcc01120	3.5	methionine adenosyltransferase
RCAP_rcc01125	3.0	30S ribosomal protein S1
RCAP_rcc01143	3.7	glycine cleavage system H protein
RCAP_rcc01144	3.5	glycine dehydrogenase (decarboxylating)
RCAP_rcc01171	2.6	ATP-dependent RNA helicase DbpA
RCAP_rcc01226	2.6	urea ABC transporter urea binding protein UrtB
RCAP_rcc01233	2.2	hypothetical protein RCAP_rcc01233
RCAP_rcc01243	2.6	polyamine ABC transporter ATP binding protein PotA-1
RCAP_rcc01244	2.0	polyamine ABC transporter periplasmic polyamine-binding protein PotD-1

RCAP_rcc01245	2.6	polyamine ABC transporter permease PotB-1
RCAP_rcc01246	2.7	polyamine ABC transporter permease PotI-1
RCAP_rcc01307	0.4	hypothetical protein RCAP_rcc01307
RCAP_rcc01329	2.2	hypothetical protein RCAP_rcc01329
RCAP_rcc01354	2.0	chemotaxis protein CheW-1
RCAP_rcc01369	2.2	ABC transporter periplasmic substrate-binding protein
RCAP_rcc01378	2.0	aldehyde dehydrogenase family protein
RCAP_rcc01379	2.3	iron-containing alcohol dehydrogenase
RCAP_rcc01415	2.5	serine/threonine-protein kinase
RCAP_rcc01423	2.1	hypothetical protein RCAP_rcc01423
RCAP_rcc01463	2.8	hypothetical protein RCAP_rcc01463
RCAP_rcc01464	2.2	hypothetical protein RCAP_rcc01464
RCAP_rcc01491	2.8	DNA helicase II
RCAP_rcc01524	2.2	hypothetical protein RCAP_rcc01524
RCAP_rcc01531	2.0	NADH-quinone oxidoreductase subunit I
RCAP_rcc01542	2.0	acetolactate synthase small subunit
RCAP_rcc01543	2.0	acetolactate synthase large subunit
RCAP_rcc01572	2.1	ABC transporter ATP-binding protein
RCAP_rcc01586	2.4	GSCFA family protein
RCAP_rcc01596	0.3	uroporphyrinogen-III C-methyltransferase-1
RCAP_rcc01632	2.5	outer membrane protein assembly factor YaeT
RCAP_rcc01663	2.4	cell cycle transcriptional regulator CtrA
RCAP_rcc01666	0.4	hypothetical protein RCAP_rcc01666
RCAP_rcc01674	2.7	glutamine synthetase-3
RCAP_rcc01738	0.3	catalase/peroxidase
RCAP_rcc01739	2.4	hypothetical protein RCAP_rcc01739
RCAP_rcc01762	2.6	chemotaxis protein CheY-2
RCAP_rcc01763	2.6	chemotaxis protein methyltransferase CheR-3
RCAP_rcc01764	2.0	chemotaxis protein CheW-2
RCAP_rcc01766	2.5	chemotaxis protein CheY-3
RCAP_rcc01771	0.5	alpha-glucoside ABC transporter substrate-binding protein
RCAP_rcc01783	2.1	protein-export membrane protein SecF
RCAP_rcc01798	2.2	nitrogen assimilation regulatory protein NtrC
RCAP_rcc01822	2.9	translation elongation factor Ts
RCAP_rcc01827	2.1	AhpC/TSA family protein
RCAP_rcc01829	2.6	ribulose bisphosphate carboxylase large subunit
RCAP_rcc01841	4.6	1,4-alpha-glucan branching enzyme
RCAP_rcc01881	2.0	FeS assembly protein SufB
RCAP_rcc01958	2.1	tyrosine-protein kinase Wzc
RCAP_rcc01963	3.0	hypothetical protein RCAP_rcc01963
RCAP_rcc02008	3.4	trigger factor
RCAP_rcc02010	2.4	30S ribosomal protein S18
RCAP_rcc02011	2.1	30S ribosomal protein S6
RCAP_rcc02036	3.1	cobalt transport protein CbiN
RCAP_rcc02037	2.2	CbiM family cobalamin biosynthesis protein
RCAP_rcc02078	2.1	hypothetical protein RCAP_rcc02078

RCAP_rcc02153	2.4	SCP-like extracellular protein family
RCAP_rcc02165	3.0	ribonuclease E
RCAP_rcc02186	2.0	polyamine ABC transporter periplasmic polyamine-binding protein PotF
RCAP_rcc02248	0.4	oxidoreductase, aldo/keto reductase family
RCAP_rcc02268	2.0	polyamine ABC transporter periplasmic polyamine-binding protein PotD-3
RCAP_rcc02300	2.2	50S ribosomal protein L21
RCAP_rcc02343	4.7	phage hypothetical protein
RCAP_rcc02344	6.5	hypothetical protein RCAP_rcc02344
RCAP_rcc02345	2.1	hypothetical protein RCAP_rcc02345
RCAP_rcc02346	2.6	hypothetical protein RCAP_rcc02346
RCAP_rcc02383	2.4	protein MraZ
RCAP_rcc02437	2.9	cytochrome P450 family protein
RCAP_rcc02438	4.2	AMP-dependent synthetase and ligase family protein
RCAP_rcc02459	4.8	XRE family transcriptional regulator
RCAP_rcc02460	2.5	cold shock protein CspA-2
RCAP_rcc02477	2.1	chaperonin GroS
RCAP_rcc02478	2.5	chaperonin GroL
RCAP_rcc02506	2.5	ribosomal large subunit pseudouridine synthase B
RCAP_rcc02515	3.9	ATP-dependent RNA helicase RhlE
RCAP_rcc02516	3.4	thymidine kinase
RCAP_rcc02521	2.1	pyrimidine ABC transporter periplasmic pyrimidine-binding protein
RCAP_rcc02532	3.6	protein PucC-2
RCAP_rcc02533	2.0	light-harvesting protein B-800/850 subunit gamma
RCAP_rcc02568	0.4	hypothetical protein RCAP_rcc02568
RCAP_rcc02613	2.4	chitin deacetylase
RCAP_rcc02614	2.1	cupin domain-containing protein
RCAP_rcc02634	2.2	response regulator receiver modulated diguanylate cyclase/phosphodiesterase
RCAP_rcc02638	0.5	calcium-binding EF-hand domain-containing protein
RCAP_rcc02659	2.5	monosaccharide ABC transporter ATP-binding protein
RCAP_rcc02702	2.5	cytochrome c/b561 family protein
RCAP_rcc02715	3.5	hypothetical protein RCAP_rcc02715
RCAP_rcc02724	0.4	ECF family RNA polymerase sigma factor
RCAP_rcc02736	0.4	hypothetical protein RCAP_rcc02736
RCAP_rcc02740	0.4	ParB domain-containing protein nuclease
RCAP_rcc02742	0.5	cytosine-specific DNA-methyltransferase
RCAP_rcc02768	2.6	ubiquinol--cytochrome-c reductase, iron-sulfur subunit
RCAP_rcc02770	2.4	ubiquinol--cytochrome-c reductase, cytochrome c1 subunit
RCAP_rcc02776	3.6	polar amino acid ABC transporter permease HisM
RCAP_rcc02790	3.3	CarD family transcriptional regulator
RCAP_rcc02888	6.6	hypothetical protein RCAP_rcc02888
RCAP_rcc02889	21.0	hypothetical protein RCAP_rcc02889
RCAP_rcc02890	36.0	hypothetical protein RCAP_rcc02890
RCAP_rcc02891	35.4	hypothetical protein RCAP_rcc02891
RCAP_rcc02892	19.8	hypothetical protein RCAP_rcc02892
RCAP_rcc02893	6.1	cold shock protein CspA-3
RCAP_rcc02894	4.4	multidrug resistance protein MdtE

RCAP_rcc02921	0.5	phage hypothetical protein
RCAP_rcc02959	2.2	polyamine ABC transporter periplasmic polyamine-binding protein-5
RCAP_rcc02971	2.8	ATP synthase F1 subunit beta
RCAP_rcc02972	2.8	ATP synthase F1 subunit gamma
RCAP_rcc02973	2.3	ATP synthase F1 subunit alpha
RCAP_rcc03000	2.1	hypothetical protein RCAP_rcc03000
RCAP_rcc03008	0.4	hypothetical protein RCAP_rcc03008
RCAP_rcc03022	2.1	TRAP C4-dicarboxylate transport system permease subunit DctM
RCAP_rcc03023	2.5	TRAP C4-dicarboxylate transport system permease subunit DctQ
RCAP_rcc03024	2.3	TRAP C4-dicarboxylate transport system permease subunit DctP
RCAP_rcc03052	2.4	hypothetical protein RCAP_rcc03052
RCAP_rcc03141	2.3	cold shock-like protein CspD
RCAP_rcc03152	2.6	hypothetical protein RCAP_rcc03152
RCAP_rcc03204	3.4	isoleucyl-tRNA synthetase
RCAP_rcc03261	2.1	TOBE domain-containing protein
RCAP_rcc03263	2.4	NifT/FixU family protein
RCAP_rcc03267	3.3	Nif-specific regulatory protein-2
RCAP_rcc03268	2.9	nitrogen fixation protein NifW
RCAP_rcc03269	2.4	homocitrate synthase
RCAP_rcc03272	3.4	HesB/YadR/YfhF family protein
RCAP_rcc03274	2.2	NifQ family protein
RCAP_rcc03275	3.3	ferredoxin III
RCAP_rcc03277	2.6	hypothetical protein RCAP_rcc03277
RCAP_rcc03278	3.1	nitrogen fixation protein NifX
RCAP_rcc03279	6.6	nitrogenase molybdenum-iron cofactor biosynthesis protein NifN
RCAP_rcc03284	6.5	ferredoxin I
RCAP_rcc03290	3.2	electron transport complex protein RnfD
RCAP_rcc03291	2.6	electron transport complex protein RnfG
RCAP_rcc03293	2.1	hypothetical protein RCAP_rcc03293
RCAP_rcc03318	2.5	DNA-directed RNA polymerase omega subunit
RCAP_rcc03342	3.4	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase
RCAP_rcc03344	2.1	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase activating protein
RCAP_rcc03356	2.2	hypothetical protein RCAP_rcc03356
RCAP_rcc03357	4.7	hypothetical protein RCAP_rcc03357
RCAP_rcc03358	5.8	TonB-dependent receptor
RCAP_rcc03359	2.8	iron siderophore/cobalamin ABC transporter
RCAP_rcc03382	2.1	aromatic-amino-acid aminotransferase
RCAP_rcc03386	4.0	ammonium transporter
RCAP_rcc03387	14.4	nitrogen regulatory protein P-II-2
RCAP_rcc03446	2.2	phosphoserine aminotransferase
RCAP_rcc03483	2.4	flagellar basal body-associated protein FlIL-1
RCAP_rcc03498	2.4	phosphate regulon transcriptional regulatory protein PhoB
RCAP_rcc03499	4.8	phosphate transport system regulatory protein PhoU
RCAP_rcc03500	5.0	phosphate ABC transporter ATP-binding protein
RCAP_rcc03501	3.7	phosphate ABC transporter permease PstA
RCAP_rcc03502	2.5	phosphate ABC transporter permease PstC

RCAP_rcc03503	5.6	phosphate ABC transporter periplasmic phosphate-binding protein
RCAP_rcc03511	2.9	HemY domain-containing protein
RCAP_rcc03518	2.0	flagellar hook-basal body complex protein FlhE
RCAP_rcc03520	2.6	flagellar basal-body rod protein; FlgB
RCAP_rcc03522	2.1	flagellar protein, putative
RCAP_rcc03523	8.2	flagellin synthesis repressor protein FlbT, putative
RCAP_rcc03524	11.4	flagellar FlaF family protein
RCAP_rcc03525	9.6	flagellin protein
RCAP_rcc03528	2.6	hypothetical protein RCAP_rcc03528
RCAP_rcc03534	2.9	30S ribosomal protein S20

7.1.2. Microarraydaten des Vergleichs Nitrogenase reprimierende Bedingungen zu dereprimierenden Bedingungen.

Tab.7.2 Daten der Microarrayanalyse des Vergleichs *R. capsulatus* B10S unter Nitrogenase reprimierenden Bedingungen zu dereprimierenden Bedingungen. Gezeigt sind die Messwerte und Annotationen aller Gene, bei denen ein Unterschied in der Transkriptmenge nachgewiesen werden konnte, der mehr als dem Faktor 2,0 oder weniger als dem Faktor 0,5 entsprach. Die Gene sind nach ihrer relativen Position auf dem *R. capsulatus* Chromosom angeordnet.

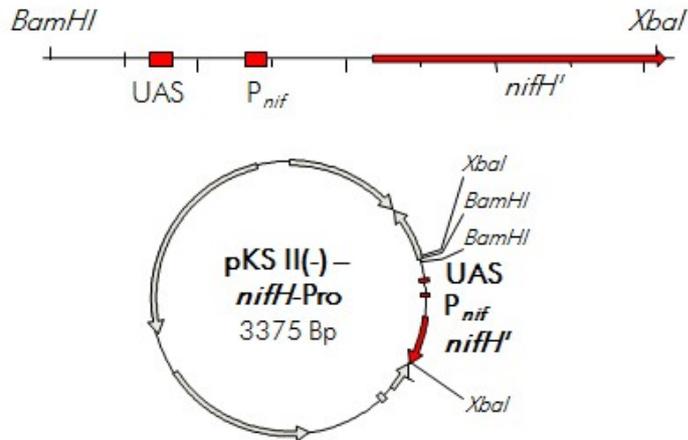
RCAP_rcc00484	0.323	alanine dehydrogenase
RCAP_rcc00567	2.309	Nif-specific regulatory protein-1
RCAP_rcc00568	2.536	RNA polymerase sigma-54 factor
RCAP_rcc00570	34.756	nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain
RCAP_rcc00571	30.928	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain
RCAP_rcc00572	24.826	nitrogenase iron protein-1
RCAP_rcc00573	6.458	ferredoxin V
RCAP_rcc00574	2.430	Crp/Fnr family transcriptional regulator
RCAP_rcc00575	5.088	hypothetical protein RCAP_rcc00575
RCAP_rcc01067	0.417	hypothetical protein RCAP_rcc01067
RCAP_rcc01226	3.196	urea ABC transporter urea binding protein UrtB
RCAP_rcc03125	0.318	heavy metal transport/detoxification protein family
RCAP_rcc03211	0.342	primosomal protein N'
RCAP_rcc03263	2.975	NifT/FixU family protein
RCAP_rcc03264	2.429	NifZ family protein
RCAP_rcc03267	2.272	Nif-specific regulatory protein-2
RCAP_rcc03268	5.592	nitrogen fixation protein NifW
RCAP_rcc03269	3.714	homocitrate synthase
RCAP_rcc03272	3.925	HesB/YadR/YfhF family protein
RCAP_rcc03275	2.314	ferredoxin III
RCAP_rcc03276	2.371	hypothetical protein RCAP_rcc03276
RCAP_rcc03277	2.877	hypothetical protein RCAP_rcc03277
RCAP_rcc03278	3.783	nitrogen fixation protein NifX
RCAP_rcc03279	22.114	nitrogenase molybdenum-iron cofactor biosynthesis protein NifN
RCAP_rcc03284	7.568	ferredoxin I
RCAP_rcc03285	2.624	ferredoxin IV
RCAP_rcc03289	2.749	electron transport complex protein RnfC

RCAP_rcc03290	4.265	electron transport complex protein RnfD
RCAP_rcc03291	4.657	electron transport complex protein RnfG
RCAP_rcc03386	2.251	ammonium transporter
RCAP_rcc03387	5.928	nitrogen regulatory protein P-II-2
RCAP_rcc03503	2.010	phosphate ABC transporter periplasmic phosphate-binding protein

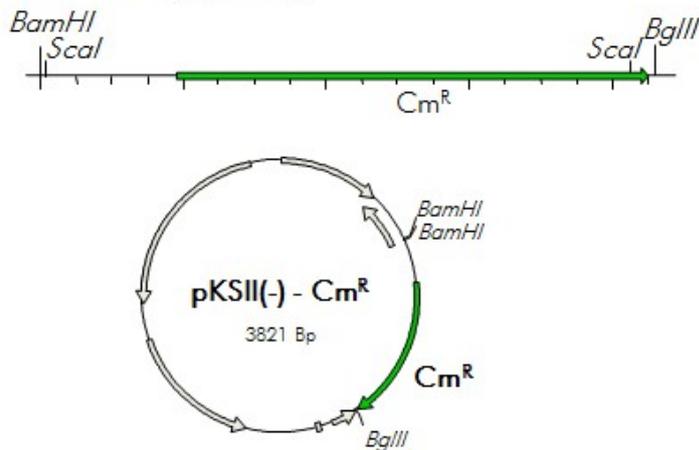
7.2. Erstellung der Vektoren pRhonS und pRhonHi

PCR *nifH* –Promoter

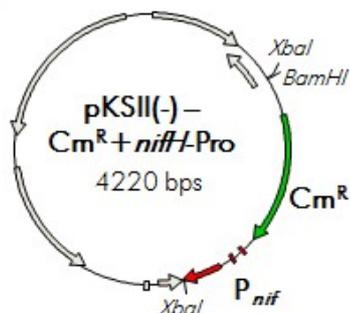
von *R. capsulatus* genomischer DNA / (414 Bp)



PCR Chloramphenicol Resistenz aus pSUP202 / (860 Bp)



Einbringung des Cm^R Fragments in den pKSII(-) – *nifH*Pro aus pKSII(-) – Cm^R

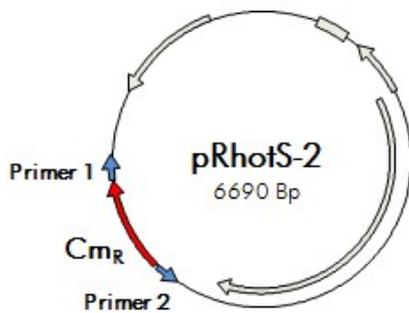


- Amplifikation der *nifH*-Promotor Sequenz mit einem genkodierenden Bereich des *nifH*-Gens per PCR
- für die Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen wurde über die Primer die Schnittstellen für die Enzyme *Bam*HI und *Xba*I eingefügt
- anschließend wurde das PCR-Produkt in den Vektor pKSII(-) Bluescript eingebracht, welcher zuvor mit der Restriktionsendonuklease *Sma*I behandelt wurde

- Amplifikation der Sequenz, welche eine Resistenz gegen das Antibiotikum Chloramphenicol vermittelt per PCR aus dem Vektor pSUB202
- für die Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen wurde über die Primer die Schnittstellen für die Enzyme *Bam*HI und *Bgl*II eingefügt
- anschließend wurde das PCR-Produkt in den Vektor pKSII(-)-Bluescript eingebracht, welcher zuvor mit der Restriktionsendonuklease *Sma*I behandelt wurde

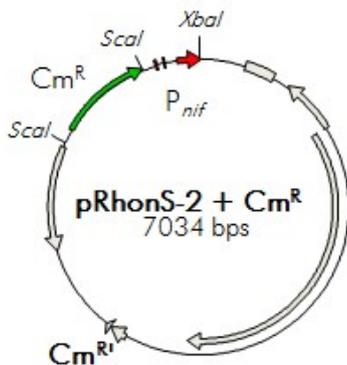
- Einbringung der Cm^R-Sequenz in den Vektor pKSII(-)-*nifH*-Pro
- der Vektor pKSII(-)-Cm^R wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bgl*II und *Bam*HI hydrolysiert
- der Vektor pKSII(-)-*nifH*-Pro wurde mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI hydrolysiert

PCR zur Entfernung der Chloramphenicol Resistenz aus pRhotS / (5389 Bp)



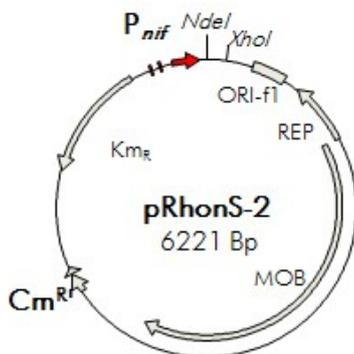
- um die nifH-Promoter mit dem Chloramphenicol-Selektionsmarker in den pRhotS-2 einfügen zukönnen mußte die bestehende Sequenz für eine Chloramphenicolresistenz entfernt werden
- das Chloramphenicolresistenzgen wurden durch eine PCR entfernt bei der durch die Auswahl der Primer der Vektor ohne die Cm^R amplifiziert wird.

Einbringung des Cm^R-P_{nif} Fragments in den pRhotS-2 -Cm^R aus pKSII(-) - CmR + nifH-Pro



- Einbringung der Cm^R+*nifH*-Pro-Sequenz in den Vektor pRhotS-2 -Cm^R
- der Vektor pRhotS-2 -Cm^R wurde mit den Restriktionsendonukleasen *BglIII* und *BamHI* hydrolysiert
- der Vektor pKSII(-)-Cm^R+*nifH*-Pro wurde mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *XbaI* hydrolysiert

Entfernung des Cm^R Fragments aus pRhonS-2 + Cm^R



- der Vektor pRhonS-2+Cm^R wurde mit der Restriktionsendonuklease *Scal* hydrolysiert um die Cm^R-Sequenz zu entfernen

7.3. Sequenzierung des pRhonS-2

Die Sequenz des Vektors pRhonS-2 wurde Sequenzierung verifiziert. Die obere Reihe zeigt die Basenabfolge der Sequenzierung des pRhonS-2. Die untere Reihe zeigt den Teil der Sequenz des pRhonS-2 der der Sequenzierung entspricht. In rot ist der Bereich markiert in dem sich "upstream activating sequence", P_{nif} und der *nifH*-Genteil befinden.

Sequenzierung_pRhonS-2	-----AATCATGCGAAACGATCCTCATCCTGTCT	29
pRhonS-2	TGCGTGCAATCCATCTTGTTCATCATGCGAAACGATCCTCATCCTGTCT	4100

Sequenzierung_pRhonS-2	CTTGATCAGATCCAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAATTTAG	79
pRhonS-2	CTTGATCAGATCCAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAATTTAG	4150

Sequenzierung_pRhonS-2	ATCCTCCGACAGAGGGCCCGACAAAACCCGCCGACACCGCAGGCCCT	129
pRhonS-2	ATCCTCCGACAGAGGGCCCGACAAAACCCGCCGACACCGCAGGCCCT	4200

Sequenzierung_pRhonS-2	ACAATTTGTCGGCCTTGTTCATTTCGAACAAAACCTTCAACACCATGAT	179
pRhonS-2	ACAATTTGTCGGCCTTGTTCATTTCGAACAAAACCTTCAACACCATGAT	4250

Sequenzierung_pRhonS-2	TTTCGCGTCATATTTTGCGAAAATTCGGTTGGCACGATGGCTGCTGTAGA	229
pRhonS-2	TTTCGCGTCATATTTTGCGAAAATTCGGTTGGCACGATGGCTGCTGTAGA	4300

Sequenzierung_pRhonS-2	AGCTGTGAGCCCGGTTAGGAACCGTCTCGATATTCGTGAAGCACCACCC	279
pRhonS-2	AGCTGTGAGCCCGGTTAGGAACCGTCTCGATATTCGTGAAGCACCACCC	4350

Sequenzierung_pRhonS-2	CCAAGGGAGCCACACATGGGCAAACCTCCGTCAGATCGCCTTCTACGGCAA	329
pRhonS-2	CCAAGGGAGCCACACATGGGCAAACCTCCGTCAGATCGCCTTCTACGGCAA	4400

Sequenzierung_pRhonS-2	AGGTGGTATCGGCAAGTCGACCACCTCGCAGAACCCTCGCCGCGCTGG	379
pRhonS-2	AGGTGGTATCGGCAAGTCGACCACCTCGCAGAACCCTCGCCGCGCTGG	4450

Sequenzierung_pRhonS-2	TCGAGATGGGTCAGAAGATCCTCATCGTCGGCTGCGACCCCAAGGCTGAC	429
pRhonS-2	TCGAGATGGGTCAGAAGATCCTCATCGTCGGCTGCGACCCCAAGGCTGAC	4500

Sequenzierung_pRhonS-2	AGCACCCGCTGATCCTGAACACCAAGCTGCAGGACCCGTGCTGCACCT	479
pRhonS-2	AGCACCCGCTGATCCTGAACACCAAGCTGCAGGACCCGTGCTGCACCT	4550

Sequenzierung_pRhonS-2	GGCCGCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG	529
pRhonS-2	GGCCGCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG	4600

Sequenzierung_pRhonS-2	AAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGTGCCCA	579
pRhonS-2	AAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGTGCCCA	4650

Sequenzierung_pRhonS-2	GCCGGCGATGGCCATGGATATCGGAATTAATTCGGATCCGAATTCGAGCT	629
pRhonS-2	GCCGGCGATGGCCATGGATATCGGAATTAATTCGGATCCGAATTCGAGCT	4700

Sequenzierung_pRhonS-2	CCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCGAGCTGCAGTGGTCGCATCCGCAG	679
pRhonS-2	CCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCGAGCTGCAGTGGTCGCATCCGCAG	4750

Sequenzierung_pRhonS-2	TTCGAAAAGTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAG-----	718
pRhonS-2	TTCGAAAAGTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTT	4800

LEBENS LAUF

PROMOTION

seit Februar 2007

Promotionsarbeit
 "Optimierung eines Expressionssystems für die Synthese von Redox- und Membranproteinen in *Rhodobacter capsulatus*."
 Institut für Molekulare Enzymtechnologie
 im Forschungszentrum Jülich

DIPLOM

April 2006 – Dezember 2006

Diplomarbeit
 "Produktion von Biowasserstoff im phototrophen Bakterium *Rhodobacter capsulatus*."
 Institut für Molekulare Enzymtechnologie
 im Forschungszentrum Jülich

STUDIUM

Oktober 1999 – April 2006

Studienfach Biologie
 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

ZIVILDIENTST

August 1998 – August 1999

Freizeitgemeinschaft
 Behinderte und nicht Behinderte Hilden e.V.

ABITUR

Juni 1998

Allgemeine Hochschulreife
 Dietrich Bonhoeffer Gymnasium Hilden

SCHULLAUFBAHN

Oktober 1989 – Juni 1998

September 1989 – Oktober 1989

August 1985 – Juli 1989

Dietrich Bonhoeffer Gymnasium Hilden
 Gymnasium am Neandertal Erkrath
 Viktor Koenen Oberschule Merseburg

Düsseldorf, den 26. September 2011

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 26. September 2011

René Bergmann