



HEINRICH HEINE  
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**Bakterielle LOV-Blaulichtrezeptoren und deren  
Verwendung als Fluoreszenzreporter und  
Photosensibilisatoren**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Stephan Endres**

aus Düsseldorf

Düsseldorf, September 2013

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

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2013

Meinen Eltern und Kirsten

## Veröffentlichungen während der Promotion

Wingen, M., Potzkei, J., Endres, S., Casini, G., Rupprecht, R., Jaeger, K.-E., Drepper, T., Gensch T. **(2014)**. The photophysics of LOV-based fluorescent proteins - new tools for cell biology. *Photochemical & photobiological sciences*. DOI: 10.1039/c3pp50414j.

Circolone, F., Granzin, J., Stadler, A., Krauss, U., Drepper, T., Endres, S., Knieps-Grünhagen, E., Wirtz, A., Cousin, A., Tielen, P., Willbold, D., Jaeger, K.-E., Batra-Safferling, R. (In Vorbereitung). A superfast recovering LOV-protein from the marine phototrophic bacterium *Dinoroseobacter shibae*.

Endres, S., Wingen, M., Walter, J., Dihné, M., Polen, T., Gensch, T., Nonell, S., Drepper, T., Jaeger, K.-E. (In Vorbereitung). LOV-domain based photosensitizers for efficient cell-killing.

## Patentanmeldungen

Circolone F., Drepper T., Endres S., Heck A., Jaeger K.-E., Potzkei J. **(2010, 2012)**. Neue Biosensoren und deren Verwendung.

*Fluorescence resonance energy transfer donor acceptor pair, useful as biosensor, comprises at least two fluorescent proteins, where at least one fluorescent protein is stable and other is not stable that is detected by biosensor parameters.*

Patent Nummer: **DE 10 2010 037 001; WO 2012/022728 A2**

Drepper T., Endres S., Jaeger K.-E., Potzkei J. **(2010, 2012)**. LOV-Domänen Protein zur photosensiblen Desfunktionalisierung.

*Use of a fluorescent protein comprising a light-oxygen-voltage-domain for photosensitive defunctionalization of a target molecule.*

Patent Nummer: **DE 10 2010 036 997; WO 2012/022727 A1**

## Posterpräsentationen auf internationalen Tagungen

Potzkei, J., Kunze, M., Endres, S., Heck, A., Büchs, J., Jaeger, K.-E., Drepper, T. **(2011)**. A novel genetically encoded FRET biosensor for quantitative detection of oxygen in living cells. *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Karlsruhe.

Endres S., Walter J., Potzkei J., Heck A., Jaeger K.-E., Drepper T. **(2012)**. BlueTox: A LOV-domain dependent genetically encoded photosensitizer. *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Tübingen.

Endres S., Walter J., Dihné M., Jaeger K.-E., Drepper T. **(2013)**. BlueTox - A novel photosensitizer for efficient ROS-mediated cell killing. *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Bremen.

Drepper T., Potzkei J., Rupprecht C., Endres S., Wingen M., Jaeger, K.-E. **(2013)**. Novel fluorescent reporter proteins for the *in vivo* analysis of biological processes under O<sub>2</sub> limitation. *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Bremen.

#### **Vorträge während der Promotion**

Drepper T., Potzkei J., Endres S., Wingen M., Krauss U., Jaeger K.-E. **(2012)**. Novel fluorescent proteins for the *in vivo* analysis of biological processes. *Jülich Biotech Day, Forschungszentrum Jülich*, Jülich.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger für die Überlassung des interessanten wissenschaftlichen Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, die sehr guten Arbeitsbedingungen im Institut für Molekulare Enzymtechnologie und sein Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Georg Groth danke ich für die freundliche Übernahme der Korreferats.

Der NRW-Forschungsschule BioStruct danke ich für mein Promotionsstipendium und die einhergehende finanzielle Unterstützung des Projektes. Frau Dr. Cordula Kruse danke ich für die engagierte Koordination.

Ich danke Herrn Dr. Thomas Drepper und Herrn Dr. Achim Heck für die freundliche, aufmunternde und engagierte Betreuung sowie für die vielen wertvollen Diskussionen während meines Promotionsprojektes.

Ein weiterer Dank gilt meinen Kooperationspartnern, Herrn Dr. Thomas Gensch, Herrn PD Dr. Joachim Granzin, Frau PD Dr. Renu Batra-Safferling und Herrn Dr. Tino Polen vom Forschungszentrum Jülich, Prof. Dr. Santi Nonell von der Ramon Llull Universität Barcelona, Frau Dr. Janine Walter und Herrn Prof. Dr. Marcel Dihné vom Hertie Institut für klinische Hirnforschung in Tübingen sowie Herrn Dr. Ulrich Krauss vom Institut für Molekulare Enzymtechnologie der HHU Düsseldorf.

Des Weiteren gilt ein großes Dankeschön allen Mitarbeitern des IMET und ganz besonders den Mitgliedern der AG Drepper, für die Schaffung einer freundschaftlichen sowie produktiven Arbeitsatmosphäre. Für ihre herausragende Hilfsbereitschaft und Unterstützung möchte ich mich bei Frau Vera Svensson und Herrn Marcus Wingen bedanken.

Schließlich möchte ich mich ganz Besonders bei meiner Familie, meinen Freunden und meiner Frau Kirsten für ihr Verständnis, ihr Interesse, ihren Zuspruch und ihre Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit bedanken.

---

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungen.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Bakterielle Lichtrezeptoren.....	1
1.2 LOV-Photorezeptoren.....	2
1.3 Verwendung von Enzymen als Reporterproteine.....	5
1.4 Fluoreszenzproteine und deren Einsatz in den Lebenswissenschaften.....	6
1.4.1 Fluoreszenz.....	6
1.4.2 GFP - das „green fluorescent protein“ und seine Derivate.....	8
1.4.3 Limitierungen der GFP-basierten Fluoreszenzproteine bei <i>in vivo</i> Anwendungen.....	12
1.4.4 LOV-Protein basierte Fluoreszenzreporter.....	13
1.4.5 Anwendung von Fluoreszenzproteinen als Photosensibilisatoren.....	16
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Bakterienstämme.....	20
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> Stämme.....	20
2.1.2 <i>Dinoroseobacter shibae</i> Stämme.....	20
2.2 Vektoren und rekombinante Plasmide.....	20
2.3 Oligonukleotide und Sequenzierungen.....	23
2.3.1 Verwendete Oligonukleotide.....	23
2.3.2 Sequenzierungen.....	24
2.4 Nährmedien und Zusätze.....	24
2.4.1 Nährmedien.....	24
2.4.2 Antibiotika und Zusätze zur Selektion.....	25
2.5 Enzyme.....	26
2.6 Chemikalien.....	26
2.7 Antiseren.....	28

2.8	Puffer und Lösungen .....	28
2.8.1	Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese .....	28
2.8.2	Puffer und Lösungen zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	28
2.8.3	Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	29
2.8.4	Puffer und Lösungen für das Immunoblotting (Western Blot) .....	30
2.8.5	Puffer und Lösungen für die Proteinreinigung mittels eine Ni <sup>2+</sup> -NTA-Säule .....	30
2.8.6	Puffer und Lösungen für <i>in vivo</i> Fluoreszenzmessungen .....	31
2.8.7	Puffer und Lösungen für <i>in vivo</i> Viabiliätsassays.....	31
2.8.8	Puffer und Lösungen für die Proteinkonzentrationsbestimmung .....	31
2.8.9	Puffer und Lösungen für die pH-Sensitivitätsmessungen von Fluoreszenzproteinen ..	31
2.9	Reaktions- und Nachweis-"Kits" .....	32
2.10	Sonstige Materialien und Geräte .....	33
2.11	Mikrobiologische Methoden .....	34
2.11.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	34
2.11.2	Induzierte Genexpression bei Verwendung des T7-Expressionssystems in <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) .....	34
2.11.3	Anzucht von <i>Dinoroseobacter shibae</i> .....	35
2.11.4	Bestimmung der Zelldichte von Bakterien-Flüssigkulturen durch photometrische Trübungsmessung.....	35
2.11.5	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA .....	35
2.11.5.1	Herstellung chemisch-transformationskompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	35
2.11.5.2	Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i> Zellen mit Plasmid-DNA .....	36
2.11.5.3	Konjugativer Gentransfer mobilisierbarer Plasmide von <i>E. coli</i> nach <i>D. shibae</i> ...	36
2.11.6	Wachstumsanalyse Fluoreszenzprotein-exprimierender <i>E. coli</i> - Kulturen .....	37
2.11.7	Herstellung von <i>E. coli</i> Zellproben für die DNA-Microarray Analyse .....	37
2.11.8	Tropftest zur Toxizitätsbestimmung von Fluoreszenzproteinen in <i>E. coli</i> .....	38
2.11.9	Bestimmung der Lebendzellzahl von <i>E. coli</i> - Kulturen .....	39
2.11.10	Anzucht und Transfektion von Säugerzelllinien .....	39
2.11.11	Analyse der phototoxischen Wirkung von FbFPs auf Säugerzellen.....	39
2.12	RNA-Techniken .....	40
2.12.1	Standard Präparation von bakterieller Gesamt-RNA .....	40
2.12.2	Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration .....	40
2.12.3	Reverse Transkription von RNA in cDNA mit gleichzeitiger Fluoreszenzmarkierung....	40

---

2.13	DNA-Techniken.....	42
2.13.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	42
2.13.2	DNA-Konzentrationsbestimmung .....	42
2.13.3	Präparation von gesamt - DNA aus <i>Dinoroseobacter shibae</i> .....	42
2.13.4	Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen .....	42
2.13.5	Agarosegelelektrophorese .....	43
2.13.6	Elution von DNA aus Agarosegelen .....	43
2.13.7	Ligation von DNA-Fragmenten .....	43
2.13.8	Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	44
2.13.9	Amplifikation von DNA mittels <i>Colony</i> -PCR.....	45
2.13.10	Hybridisierung von DNA-Chips .....	45
2.13.11	Auswertung von DNA-Chip Fluoreszenzbildern .....	46
2.14	Protein Techniken .....	46
2.14.1	Gesamtproteinisolierung aus <i>E. coli</i> .....	46
2.14.2	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	47
2.14.3	Coomassie-Färbung zur Proteindetektion.....	47
2.14.4	Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran.....	47
2.14.5	Immunodetektion von Proteinen.....	48
2.14.6	Färbung von PVDF-Membranen.....	48
2.14.7	Reinigung Histidin-getagter Proteine mittels Ni <sup>2+</sup> -NTA-Matrix.....	48
2.15	Optische Methoden.....	49
2.15.1	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	49
2.15.2	Aufnahme von Carotinoidabsorptionsspektren.....	49
2.15.3	Photometrische Fluoreszenzmessung.....	50
2.15.4	Bestimmung der Quantenausbeute .....	50
2.15.5	Messung der Photostabilität von Fluoreszenzproteinen .....	50
2.15.6	<i>In vitro</i> pH-Sensitivitätsmessungen von Fluoreszenzproteinen.....	51
2.15.7	Fluoreszenzanalyse unter UV-Licht ( $\lambda$ 365 nm).....	51
2.15.8	Konfokale <i>laser-scanning</i> Mikroskopie .....	51
2.15.9	Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von FMN-bindenden Fluoreszenzproteine	51
2.15.10	Berechnung der Kofaktor-Beladung.....	52
2.15.11	Bestimmung der Rückkehrkinetiken von LOV-Proteinen.....	52
2.15.12	<i>In vitro</i> Quantifizierung von Wasserstoffperoxid .....	52
2.15.13	<i>In vitro</i> Quantifizierung von Singulett-sauerstoff .....	53

2.16	Computerprogramme und Datenbanken.....	54
3	Ergebnisse.....	55
3.1	Der LOV-basierte Blaulichtrezeptor DsLOV des marinen phototrophen Bakteriums <i>Dinoroseobacter shibae</i> .....	55
3.1.1	Die Proteinstruktur des putativen Blaulichtrezeptors DsLOV aus <i>D. shibae</i> .....	56
3.1.2	Photochemische Charakterisierung des LOV-Photorezeptors aus <i>D. shibae</i> .....	60
3.2	Untersuchungen zur regulatorischen Funktion des Photorezeptors DsLOV in <i>D. shibae</i> .....	67
3.2.1	Konstruktion einer DsLOV-Insertionsmutante .....	67
3.2.2	Einfluss des DsLOV auf die lichtabhängige Regulation der Photopigmentsynthese.....	71
3.3	Neuartige Flavinmononukleotid-bindende Fluoreszenzreporter .....	77
3.3.1	Konstruktion und Charakterisierung von DsFbFP und der Variante DsFbFP M49I .....	77
3.3.2	Konstruktion und Charakterisierung von Pp2FbFP L30M .....	82
3.4	LOV-basierte Fluoreszenzproteine und deren Eigenschaften als Photosensibilisatoren.....	85
3.4.1	Erzeugung von Vektoren für die konstitutive Expression von LOV-FP-Genen.....	85
3.4.2	Einfluss der LOV-FPs auf das Wachstum von <i>E. coli</i> unter Blaulichtbestrahlung.....	87
3.4.3	Erzeugung von Vektoren zur P <sub>T7</sub> -abhängigen Expression von LOV-FPs .....	91
3.4.4	Qualitative <i>in vivo</i> Analysen zur Blaulicht-induzierten Phototoxizität von LOV-FPs.....	92
3.4.5	Quantitative Analyse der Licht-induzierten Phototoxizität der LOV-FPs auf die Lebensfähigkeit von <i>E. coli</i> -Bakterienzellen .....	96
3.4.6	Anwendung der LOV-FPs als Photosensibilisatoren in Säugerzellen .....	99
3.4.7	<i>In vitro</i> Quantifizierung von Wasserstoffperoxid .....	106
3.4.8	<i>In vitro</i> Quantifizierung von Singulett-Sauerstoff .....	110
3.4.9	Genomweite Analyse der durch die Photosensibilisatoren ausgelösten Stressantwort in <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	114
4	Diskussion.....	120
4.1	Funktion des Photorezeptors DsLOV.....	120
4.1.1	DsLOV - Struktur .....	120
4.1.2	DsLOV - Photozyklus.....	121
4.1.3	DsLOV - Regulatorische Funktion .....	123
4.2	LOV-Rezeptoren in der Biotechnologie.....	126
4.2.1	LOV-Domänen in <i>Photoswitch</i> -Fusionsproteinen .....	127
4.2.2	LOV-basierte Fluoreszenzproteine .....	129
4.2.3	LOV-FPs als Photosensibilisatoren .....	132
5	Zusammenfassung.....	135

6	Summary.....	137
7	Literatur .....	138
8	Anhang.....	160

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Photozyklus von LOV-Proteinen .....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Elektronenzustände in einem fluoreszierenden Molekül. 7	
Abbildung 3: Dreidimensionale Proteinstruktur des GFP .....	9
Abbildung 4: Übersicht über das Farbspektrum der GFP-basierten und GFP-homologen Fluoreszenzproteine .....	11
Abbildung 5: Dreidimensionale Struktur des PpSB1-LOV Monomers aus <i>P. putida</i> .....	14
Abbildung 6: Jablonski-Diagramm zur schematischen Darstellung der Sauerstoffradikalproduktion durch den angeregten Photosensibilisator .....	17
Abbildung 7: Sequenz-Alignment der putativen LOV-Blaulichtrezeptoren aus <i>D. shibae</i> und bekannter LOV-Proteine .....	55
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Multidomänen-Architektur der drei putativen LOV- Proteine aus <i>D. shibae</i> .....	56
Abbildung 9: Die DsLOV-Proteinstruktur im Dunkelzustand.....	57
Abbildung 10: Messungen zur Photoadduktlebensdauer von DsLOV und dessen Varianten M49I und M49S.....	61
Abbildung 11: Schematische Darstellung der <i>overlap-extension</i> PCR zur Erzeugung des mutierten Gens <i>dslov m49i</i> .....	63
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Erzeugung des pEX18Ap <i>dslov::Gm<sup>r</sup></i> Suicide-Vektors....	68
Abbildung 13: PCR-Analysen zur Identifikation und Verifikation der <i>dslov</i> -Insertionsmutante und des Komplementationsstamms. ....	69
Abbildung 14: Normalisiertes Absorptionsspektrum der Photopigmente aus in Dunkelheit kultivierten <i>D. shibae</i> DFL 12 <sup>T</sup> Zellen .....	71
Abbildung 15: Wachstumsverhalten des <i>D. shibae</i> DFL-12 <sup>T</sup> Wildtyps und der <i>dslov</i> - Insertionsmutanten bei verschiedenen Belichtungsbedingungen .....	73
Abbildung 16: Akkumulation von Bakteriochlorophyll <i>a</i> und Spheroidenon in <i>D. shibae</i> , der <i>dslov</i> - Insertionsmutante und der komplementierten <i>dslov</i> -Mutante unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen.....	75
Abbildung 17: Grafische Darstellung der spektralen Eigenschaften und der pH-Stabilität des DsFbFP78	
Abbildung 18: Photostabilität der DsFbFP bzw. DsFbFP M49I - vermittelten Fluoreszenzaktivität .....	80
Abbildung 19: Photostabilität der Pp2FbFP bzw. Pp2FbFP L30M - vermittelten Fluoreszenzaktivität	84
Abbildung 20: Einfluss von Blaulicht auf das Wachstum von konstitutiv LOV-FP-exprimierenden <i>E. coli</i> DH5α Kulturen.....	88

Abbildung 21: Qualitative Analyse der Phototoxizität verschiedener LOV-FPs in Abhängigkeit der Belichtungsdauer.....	93
Abbildung 22: Quantifizierung der relativen Lebendzellzahlen der LOV-FP exprimierenden <i>E. coli</i> Kulturen unter Blaulichteinfluss.....	97
Abbildung 23: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Erzeugung von pcDNA3.1 basierten Plasmiden zur Expression von membranassoziierten FbFPs in Säugerzellen .....	100
Abbildung 24: Konfokale <i>laser-scanning</i> mikroskopische Visualisierung der Lokalisierung von eGFP, Pp2FbFP und deren Membran-assoziierten Varianten in HEK-Zellen.....	101
Abbildung 25: Hellfeld- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Membran-assoziierten FbFP-exprimierenden muriner HT22-Tumorzellen vor- und nach der Belichtung mit Blaulicht .....	103
Abbildung 26: Schematische Darstellung der Reaktion zur Bestimmung der von den LOV-FPs generierten Superoxidradikale durch Anwendung des Amplex Red Reaktionskits .....	107
Abbildung 27: Nachweis der von Pp2FbFP ausgelöste Singulett-sauerstoff ( $^1O_2$ )-Produktion .....	111
Abbildung 28: Darstellung der möglichen Anwendungen von LOV-FPs als Photosensibilisatoren und Fluoreszenzreporter .....	134
Abbildung 29: Übersicht der verwendeten Expressionsplasmide .....	160
Abbildung 30: <i>Suicide</i> -Vektor zur Erzeugung einer <i>dslov</i> Deletionsmutanten von <i>Dinoroseobacter shibae</i> .....	161
Abbildung 31: Aminosäuresequenzalignment des DsFbFP mit Pp2FbFP.....	164
Abbildung 32: <i>In vivo</i> Fluoreszenzspektren der P <sub>77</sub> -abhängigen LOV-FP-Expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	165
Abbildung 33: Ergebnisse der <i>in vitro</i> Quantifizierung des von FbFPs generierten Wasserstoffperoxids .....	166
Abbildung 34: Nachweis der von FbFPs ausgelöste Singulett-sauerstoff ( $^1O_2$ )-Produktion.....	167
Abbildung 35: <i>E. coli</i> Festmedienplatten zur Kontrolle auf Lebensfähigkeit nach der Blaulichtbestrahlung .....	168

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der fluoreszierenden Eigenschaften von aktuell publizierten LOV-basierten Fluoreszenzproteinen.....	15
Tabelle 2: Übersicht der Genotypen der verwendeten <i>Escherichia coli</i> Stämme.....	20
Tabelle 3: Übersicht der Genotypen der verwendeten <i>Dinoroseobacter shibae</i> Stämme .....	20
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Vektoren.....	20
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide .....	21
Tabelle 6: Übersicht der als PCR-Primer verwendeten Oligonukleotide .....	23
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Antibiotika und Selektionszusätze und deren empfohlene Konzentrationsangabe für die jeweilige Anzucht von Bakterienstämmen .....	25
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Enzyme .....	26
Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Chemikalien.....	26
Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Antiseren .....	28
Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Reaktions- und Nachweiskits .....	32
Tabelle 12: Übersicht sonstiger verwendeter Materialien und Geräte .....	33
Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Computerprogramme und Datenbanken.....	54
Tabelle 14: Photoadduktlebenszeiten und <i>Solvent-Isotop Effects</i> (SIE) von DsLOV, DsLOV M49I und DsLOV M49S.....	65
Tabelle 15: Photochemischen Eigenschaften des DsFbFP und des DsFbFP M49I.....	81
Tabelle 16: Photochemischen Eigenschaften der LOV-basierten Fluoreszenzreporter Pp2FbFP und dessen Variante Pp2FbFP L30M .....	83
Tabelle 17: Übersicht der von den verschiedenen LOV-FPs generierten H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Raten als Reaktion auf die Blaulichtbestrahlung.....	108
Tabelle 18: Übersicht der <i>in vitro</i> bestimmten Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten ( $\Phi_{\Delta}$ ) der LOV-FPs .....	112
Tabelle 19: Übersicht der durch transkriptomweite DNA-Microarray-Analyse identifizierten Gene einer Pp2FbFP-exprimierenden <i>E. coli</i> BL21(DE) Kultur die mit Blaulicht ( $\lambda = 462$ nm) bestrahlt wurde .....	116
Tabelle 20: Übersicht der durch transkriptomweite DNA-Microarray-Analyse identifizierten Gene einer DsFbFP M49I-exprimierenden <i>E. coli</i> BL21(DE) Kultur, die mit Blaulicht ( $\lambda = 462$ nm) bestrahlt wurde .....	118

## Abkürzungen

° C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff
A. dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
AIM	Autoinduktionsmedium
Ala	5-Aminolävulinsäure
Amp	Ampicillin
As	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C-Terminus	Carboxyterminus
D <sub>2</sub> O	Deuteriumoxid (schweres Wasser)
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EPG	Eppendorfgefäß
FAD	Flavin-Adenin-Diphosphat
FMN	Flavinmononukleotid
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
g	Gramm
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
His <sub>6</sub>	6-Histidin-Tag
HK	Hauptkultur
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IMET	Institut für Molekulare Enzymtechnologie
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
Kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton

---

Km	Kanamycin
L	Liter
LB	Luria-Bertani-Broth
LOV	Light Oxygen Voltage
LOV-FP	LOV-basierter Fluoreszenzprotein
M	Mol/Liter
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol/Liter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-Terminus	Aminoterminus
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid
o.D. <sub>450</sub>	optische Dichte bei 450 nm
o.D. <sub>580</sub>	optische Dichte bei 580 nm
o.D. <sub>660</sub>	optische Dichte bei 660 nm
orf	<i>open reading frame</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBF	Riboflavin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SIE	Lösungsmittelisotopeneffekt ( <i>solvent-isotope-effect</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TB	Teriffic-Broth
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TZ	Tischzentrifuge
U	Units
u. a.	unter anderem
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VK	Vorkultur
w/v	Gewicht pro Volumen
YFP	Gelb Fluoreszierendes Protein
λ	Wellenlänge

---

# 1 Einleitung

Für alle Lebewesen der Erde ist es für ein erfolgreiches Überleben unabdingbar, mit ihrer Umwelt zu interagieren und auf Veränderungen dieser möglichst schnell und effektiv zu reagieren. Die Wahrnehmung der vorliegenden Umweltbedingungen, wie z.B. Stressfaktoren, Nahrungsangebot oder Lichtintensität wird von einer Vielzahl verschiedener Rezeptoren und daran anschließende Signaltransduktionsprozesse sichergestellt, wobei eine Reaktion der Organismen auf die verschiedenen Reize auf unterschiedliche Weise erfolgen kann. Eine mögliche Reaktion auf Umweltveränderungen ist die Regulation der Expression von Genen, deren Produkte an der Anpassung auf den speziellen Umweltreiz beteiligt sind. Diese auf transkriptioneller Ebene erfolgende Regulation kann dabei zu stärkerer oder auch schwächerer Expression der entsprechenden Gene führen, wodurch schlussendlich die Menge der von diesen Genen kodierten Proteine reguliert wird. Des Weiteren ist eine Reaktion auf Umweltreize auf der Proteinebene möglich. Dabei beeinflusst die Umweltwahrnehmung über einen Rezeptor z. B. Interaktionen von Proteinen, die Signaltransduktion über Regulationskaskaden oder steuert die Aktivität bestimmter Enzyme.

## 1.1 Bakterielle Lichtrezeptoren

Da phototrophe Bakterien Lichtenergie mit Hilfe der bakteriellen Photosynthese in physiologisch nutzbare Energie wandeln können, ist der Umweltfaktor Licht für diese Organismen von besonderer Bedeutung. Die Wahrnehmung erfolgt dabei über Kofaktor-bindende Lichtrezeptoren, die in unterschiedliche Gruppen klassifiziert werden (van der Horst & Hellingwerf, 2004). Darunter befinden sich die Bilin-bindenden Phytochrome und Rhodopsine, die im roten Spektralbereich des sichtbaren Lichtspektrums absorbieren und daher als Rotlichtsensoren dienen. Die Gruppe der Blaulichtsensoren besteht aus dem *p*-Cumarsäure bindenden PYP (*photoactive yellow protein*), den FAD-abhängigen Cryptochromen und BLUF (*blue light sensing using FAD*)-Domänen sowie den LOV-Sensorproteinen, die FMN als Kofaktor benötigen. In den phototrophen Bakterien kontrollieren diese Rezeptoren die Produktion des Photosynthese-Apparates, organisieren die Zusammenstellung der Lichtsammelkomplexe oder lösen Phototaxis aus (Gomelsky & Hoff, 2011). Erstaunlicher Weise konnten in chemotrophen Bakterien ebenfalls derartige Lichtrezeptoren identifiziert werden (Davis *et al.*, 1999; Losi & Gärtner, 2008; Losi *et al.*, 2002), wonach sich die Fragestellung der genauen physiologischen Funktion dieser Protein in diesen Organismen ergab. Studien dieser Lichtrezeptoren haben gezeigt, dass sie u. a. an der Bildung von Biofilmen, der Regulation von Oberflächenadhäsion

sowie der Auslösung von Virulenz, Pathogenität und Phototaxis beteiligt sind (Gomelsky & Hoff, 2011; van der Horst *et al.*, 2007; Purcell & Crosson, 2008).

Die Gruppe der LOV-Lichtrezeptoren steht im Fokus der vorliegenden Arbeit, wobei neue bakterielle LOV-Proteine identifiziert und in Hinblick auf ihre strukturellen Eigenschaften und regulatorischen Funktionen charakterisiert werden. Des Weiteren wird deren Eignung als Reporterproteine und Photosensibilisatoren für biotechnologische Anwendungen analysiert. Daher wird diese Proteinfamilie im Folgenden genauer betrachtet.

## 1.2 LOV-Photorezeptoren

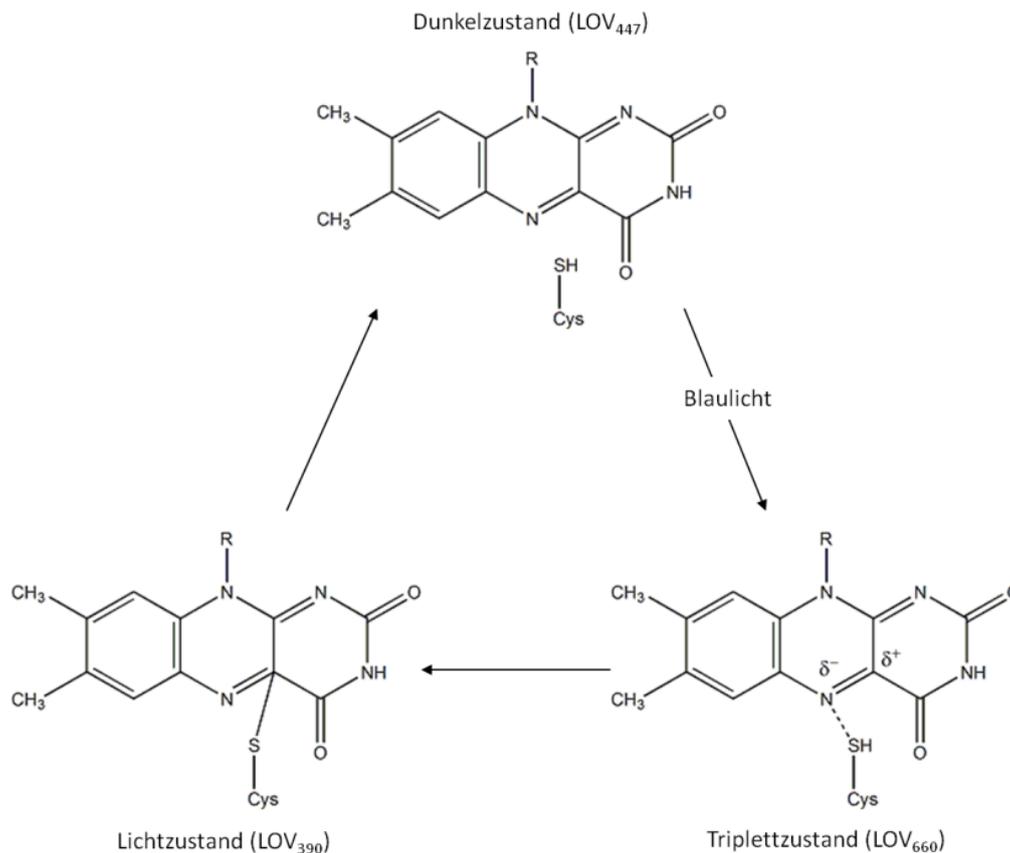
LOV (light, oxygen, voltage) - Proteine sind hochgradig konservierte Sensordomänen der PAS-Familie (Per-ARNT-Sim), welche auf äußerliche Impulse wie Licht, Sauerstoff und Redoxpotential reagieren (Huala, 1997; Taylor & Zhulin, 1999). Entdeckt wurden sie als Bestandteil des Blaulicht-Photorezeptors Phototropin durch Studien an einer Phototropismus-defizienten Mutante der Pflanze *Arabidopsis thaliana* (Christie, 1998). Im Pflanzenreich sind Phototropine als membrangebundene Sensorproteine weit verbreitet und besitzen wichtige Funktionen bei essentiellen zellulären Prozessen, wie z. B. der Regulation der Stomataöffnung (Kinoshita *et al.*, 2001), der Chloroplastenbewegung (Kagawa, 2003) sowie des Wachstums und der Blattstellung (Cho *et al.*, 2007). Typischerweise besitzen diese Lichtrezeptoren einen Aufbau aus zwei N-terminalen LOV-Domänen und einer C-terminalen Effektor-Kinasedomäne, die bei Belichtung mit blauem Licht autophosphoryliert wird (Christie *et al.*, 1999).

Durch genomweite Sequenzhomologievergleiche konnten Phototropin-ähnliche Rezeptorproteine wie z.B. YtvA aus *Bacillus subtilis* in Bakterien identifiziert werden (Losi *et al.*, 2002). Im Unterschied zu den pflanzlichen Phototropinen besteht YtvA aus nur einer N-terminalen LOV-Domäne und einer C-terminalen STAS-Domäne (Sulfat Transporter und anti-Sigmafaktor Antagonist), über die es an der generellen  $\sigma^B$ -vermittelten Stressantwort in *B. subtilis* involviert ist (Avila-Pérez *et al.*, 2006, 2009; Jurk *et al.*, 2013; van der Steen *et al.*, 2013). Des Weiteren konnten bakterielle LOV- Lichtrezeptoren identifiziert werden, die unterschiedliche Effektordomänen wie z. B. Histidinkinasen, DNA-bindende Transkriptionsregulatoren oder putative Phosphodiesterasen besitzen (Gomelsky & Hoff, 2011; Herrou & Crosson, 2011; Losi & Gärtner, 2012; Losi, 2004). Bemerkenswerter Weise konnten in Bakterien auch LOV-Proteine identifiziert werden, die keine Effektordomäne besitzen, wie die beiden Blaulichtrezeptoren PpSB1-LOV und PpSB2-LOV (Sensory-Box Protein 1 und 2) aus *Pseudomonas putida* (Jentsch *et al.*, 2009; Krauss *et al.*, 2005).

Die regulatorische Funktion der meisten identifizierten bakteriellen LOV-Rezeptoren ist derzeit noch unbekannt, doch konnte diese für wenige Beispiele beschrieben werden. So sind diese Lichtsensoren

z. B. an der generellen Stressantwort (YtvA aus *B. subtilis*), Pathogenität, Virulenz (LOV-HK aus *Brucella abortus* und Pst-LOV aus *Pseudomonas syringae*) und Motilität (LovR und LovK aus *Caulobacter crescentus* sowie SL2 aus *Synechococcus elongatus* beteiligt (Avila-Pérez *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2010; Herrou & Crosson, 2011; Moriconi *et al.*, 2013; Purcell *et al.*, 2007; van der Steen *et al.*, 2013; Swartz *et al.*, 2007).

Den pflanzlichen sowie den bakteriellen LOV-Domänen ist das Durchlaufen eines typischen Photozyklus gemeinsam, der als Reaktion auf den Lichtreiz ausgelöst wird und wie er in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist. Dabei führt die Absorption der Lichtenergie durch die sich im Grund- oder Dunkelzustand befindliche LOV-Domäne (LOV<sub>447</sub>) zur Bildung des angeregten Singulettzustands. Aus diesem Zustand kann die Energie in Form von Fluoreszenz emittiert werden, wodurch das Chromophor in den Grundzustand zurückkehrt. Alternativ kann der angeregten Singulettzustand auch durch *intersystem-crossing* (ISC) in den Triplettzustand überführt werden. Dieser Triplettzustand (LOV<sub>660</sub>) wird sehr schnell, durch Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem Isoalloxazinring des Kofaktors FMN und dem photoaktiven Cystein der LOV-Domäne, in einen fluoreszenzinaktiven Lichtzustand (LOV<sub>390</sub>) überführt. Dieser auch als Photoaddukt bezeichnete Zustand ist relativ stabil, so dass die Rückkehr in den ursprünglichen Dunkelzustand, je nach LOV-Photorezeptor, verschieden lange dauert und von Sekunden bis zu vielen Stunden benötigt (Crosson & Moffat, 2001; Kottke *et al.*, 2003; Swartz *et al.*, 2001). So betragen die Photoadduktlebenszeiten - die für die Dauer der Photozyklen die bestimmenden Faktoren sind - für z. B. PpSB1-LOV oder PpSB2-LOV ungefähr 41,2 Stunden bzw. 137 Sekunden (Jentsch *et al.*, 2009) und für YtvA ca. 45 Minuten (Losi *et al.*, 2003).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Photozyklus von LOV-Proteinen**

Im Grund- oder Dunkelzustand, der eine maximale Absorption bei  $\lambda = 447$  nm aufweist, ist der Kofaktor FMN nicht-kovalent gebunden. Durch Belichtung entsteht der angeregte Singulettzustand (nicht dargestellt), der die Energie in Form von Fluoreszenz emittieren kann oder durch *intersystem-crossing* in einen reaktiven Tripletzustand (LOV<sub>660</sub>) überführt wird. Dieser Zustand ist instabil und zerfällt in den nicht fluoreszierenden Lichtzustand (LOV<sub>390</sub>). Dieser besitzt ein Absorptionsmaximum von  $\lambda = 390$  nm und bindet das FMN kovalent an den Cysteinrest der LOV-Domäne. Anschließend zerfällt das Cysteinyl-FMN-Photoaddukt innerhalb einer Protein-spezifischen Zeit wieder in den Dunkelzustand.

Ein Bakterium, das aufgrund seiner Fähigkeit zur aeroben anoxygenen Photosynthese mit hoher Wahrscheinlichkeit über Lichtrezeptoren verfügt, ist das marine Bakterium *Dinoroseobacter shibae*, das zur Gattung *Roseobacter* zählt. Vertreter dieser Bakteriengattung sind in marinen Habitaten weltweit verbreitet und repräsentieren in manchen Regionen (Küsten- und Polarregionen) bis zu 25 % der bakteriellen Gemeinschaft (Bruhn *et al.*, 2005; Wagner-Döbler & Biebl, 2006). Darunter ist das Gram-negative  $\alpha$ -Proteobakterium *D. shibae*, das ursprünglich aus seinem symbiontischen Wirtsorganismus, dem Dinoflagellaten *Prorocentrum lima* isoliert wurde, den *D. shibae* mit Vitamin B2 und B12 versorgt (Biebl *et al.*, 2005; Wagner-Döbler *et al.*, 2010). Neben dem Carotinoid Spheroidenon konnten auch Bakteriochlorophyll *a* und das Vorhandensein des Lichtsammelkomplexes II nachgewiesen werden, wodurch *D. shibae* zur Energiegewinnung mittels aerober anoxygener Photosynthese fähig ist (Biebl *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu den verwandten phototrophen Purpurbakterien, die die Fähigkeit der anaeroben anoxygenen Photosynthese besitzen, produziert *D. shibae* - als aerobes anoxygenes photoheterotrophes Bakterium (aapB) -

Bakteriochlorophyll *a* ausschließlich in Gegenwart von Sauerstoff (Yurkov & Beatty, 1998). Dadurch entstehen allerdings negative Nebeneffekte. Zwar gewinnen die *aapB* bei Belichtung zusätzliche physiologische nutzbare Energie in Form von ATP, die zu einem verstärkten Wachstums führt (Yurkov & van Gemerden, 1993), doch reagiert angeregtes Bakteriochlorophyll *a* mit elementarem Sauerstoff zu Singulett-Sauerstoff (Borland *et al.*, 1989). Dieses Sauerstoffradikal ist für die Zellen stark toxisch und löst intrazellulären Stress aus, was wiederum zu einer Verminderung der Wachstums führt. Aus diesem Grund ist die Wahrnehmung von Licht, seiner Intensität sowie die regulatorische Antwort der Zellen auf diesen Umweltreiz für dieses Bakterium von besonderer Bedeutung (Tomasch *et al.*, 2011; Wagner-Döbler & Biebl, 2006). Folglich ist es ein Aspekt dieser Arbeit, LOV-Blaulichtrezeptoren im Genom von *D. shibae* zu identifizieren, diese zu charakterisieren und regulatorische Einflüsse aufzuklären.

LOV-Proteine sind nicht nur in Hinblick auf ihre sensorischen Eigenschaften sowie ihre regulatorischen Funktionen interessant, sondern können aufgrund ihrer fluoreszierenden Eigenschaften ebenfalls als Reporterproteine in der Biotechnologie eingesetzt werden. Dabei sind Reporterproteine im Allgemeinen ein sehr wichtiges Werkzeug für das Verständnis der variierenden Reaktions- und Regulationsprozesse, die in Organismen ablaufen. Die Nachverfolgung und Analyse dieser Prozesse ist daher von großem wissenschaftlichen Interesse, was besonders durch die große Anzahl der zur Verfügung stehenden Reportergene unterstrichen wird.

### **1.3 Verwendung von Enzymen als Reporterproteine**

Zur Analyse zellulärer Prozesse werden in vielen Bereichen der Lebenswissenschaften enzymatische Reporterproteine eingesetzt, die eine hohe und vor allem eine sehr spezifische Aktivität besitzen, um eine möglichst sensitive und eindeutige Messung zu ermöglichen (van Rossum *et al.*, 2013). Die enzymatische Aktivität dieser Proteine führt dabei meist zur Produktion einer farbigen Substanz oder zu Emission einer Lumineszenz, die nach der Reaktion relativ simpel photometrisch detektiert und quantifiziert werden kann. Ein oft angewandtes Reporterprotein mit enzymatischer Aktivität ist die  $\beta$ -Galaktosidase aus *Escherichia coli*, die in der Lage ist,  $\beta$ -glykosidische Bindungen hydrolytisch zu spalten (Fowler & Zabin, 1970). Diese Fähigkeit wird genutzt, um die nicht-nativen Substrate 5-bromo-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal) und *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (*o*-NPG) enzymatisch durch die  $\beta$ -Galaktosidase zu dem blau-gefärbten Produkt 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindol bzw. zu dem gelb-gefärbten *o*-Nitrophenol umzusetzen (An *et al.*, 1982; Buelow, 1964; Möckli & Auerbach, 2004). Weitere Beispiele für enzymatische Reporterproteine, die in der Forschung Anwendung finden, sind u.a. die sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP) (Berger *et al.*, 1988; McComb & Bowers, 1972), die Leuchtkäfer Luziferase

(de Wet *et al.*, 1987) und die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) (Gorman *et al.*, 1982; Shaw, 1975). Um ein unverfälschtes Messergebnis garantieren zu können, ist es von besonderer Bedeutung, dass das durch das Reporterprotein gebildete Produkt ausschließlich auf dessen Aktivität zurückzuführen ist und nicht als Reaktionsprodukt aus anderen, unabhängigen zellulären Prozessen hervorgegangen ist. Des Weiteren muss sichergestellt werden, dass weder das eingesetzte Enzym noch dessen Substrate oder Produkte für die Zellen toxisch oder gar letal wirken.

Alle bisher erwähnten Reporterproteine benötigen für ihre enzymatische Aktivität ein spezifisches Substrat, das oftmals nicht in den untersuchten Systemen, wie z.B. Zellen, vorhanden ist und erst zusätzlich zugegeben werden muss. Dadurch entstehen oft weitere Limitierungen, da diese Stoffe erst in die Zelle aufgenommen werden müssen, was wiederum weitere Eingriffe in die Zellphysiologie erfordert, um z. B. einen aktiven Stofftransport über die Zellgrenzen (Zellwand bzw. Zellmembran) zu gewährleisten. Häufig ist ein solcher Transport, wie im Falle des *o*-NPG allerdings nicht möglich, so dass die Zellen vor der enzymatischen Reaktion lysiert werden müssen.

Aus diesem Grund hat sich die Klasse der autofluoreszierenden Reporterproteine etabliert, die für ihre Aktivität kein zugegebenes Substrat benötigen, sondern das Fluorophor selbstständig bilden und bei ihrer Aktivität elektromagnetische Strahlung (Licht) emittieren.

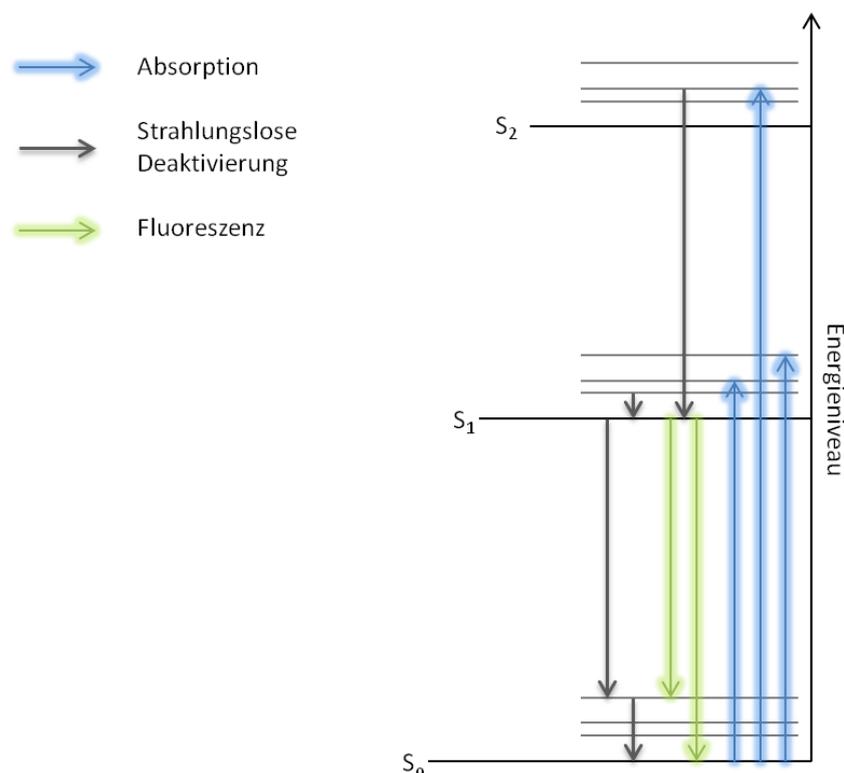
## **1.4 Fluoreszenzproteine und deren Einsatz in den Lebenswissenschaften**

### **1.4.1 Fluoreszenz**

Moleküle besitzen die Eigenschaft elektromagnetische Strahlung bestimmter Wellenlängen bzw. Energieniveaus zu absorbieren und die dabei zugeführte Energie zu transformieren, also in andere Energieformen umzuwandeln. Dabei hängt die Art der Wandlung grundsätzlich vom Energiegehalt der zugeführten Strahlung ab. Langwellige Strahlung, wie z. B. Infrarot- oder Mikrowellenstrahlung, besitzt einen nur geringen Energiewert und wird von den absorbierenden Molekülen in Rotations- bzw. Schwingungsenergie überführt, wodurch Wärme entsteht. - Dieser Effekt liegt den üblichen Haushaltsmikrowellengeräten zugrunde.

Besitzt die zugeführte elektromagnetische Strahlung jedoch ein höheres Energieniveau, wie es bei sichtbarem oder ultraviolettem Licht der Fall ist, reicht diese Energie dazu aus, um Elektronen aus ihren Grundorbitalen ( $S_0$ ) herauszulösen und in unbesetzte, energiereichere Orbitale zu heben ( $S_1, S_2, \dots$ ). Da diese Zustände jedoch energetisch ungünstig und daher nicht stabil sind, fallen die angeregten Elektronen sehr schnell ( $<10$  ns) in den Grundzustand zurück. Die „überschüssige“ Anregungsenergie wird dabei meist wieder als Schwingungsenergie oder Wärme freigesetzt. Einige Moleküle können die Anregungsenergie jedoch aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften nicht wie

bisher beschrieben umwandeln. Bei diesen Molekülen fallen die angeregten Elektronen wieder direkt aus dem energiereicheren Orbital in den ursprünglichen Grundzustand zurück, wodurch elektromagnetische Strahlung freigesetzt wird, die meist im sichtbaren Spektralbereich liegt und als Fluoreszenz bezeichnet wird. Dabei erfolgt die Emission des Fluoreszenzlichtes immer vom niedrigsten angeregten Zustand  $S_1$  aus (Kasha-Regel) und führt deshalb dazu, dass das emittierte Licht langwelliger als das Anregungslicht ist (Stokes-Verschiebung). Zur besseren Übersicht sind diese Prozesse in einem Jablonski-Diagramm in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Elektronenzustände in einem fluoreszierenden Molekül**

Das Diagramm, das nach Alexander Jablonski auch als Jablonski-Diagramm bezeichnet wird (Jablonski, 1935), demonstriert die verschiedenen Elektronenzustände und Energieniveaus in einem fluoreszenzaktiven Molekül nach Anregung mit Licht. Durch die Absorption werden Elektronen aus dem Singulettgrundzustand ( $S_0$ ) in höhere angeregte Zwischen- oder Singulettzustände ( $S_1, S_2, \dots$ ) überführt, die energetisch ungünstig und daher instabil sind. Bei der Rückkehr der sich im angeregten Zustand befindlichen Elektronen in den Grundzustand ( $S_0$ ) wird die Anregungsenergie strahlungsfrei in Form von Wärme- bzw. Schwingungsenergie oder in Form von elektromagnetischer Strahlung als Fluoreszenz freigesetzt.

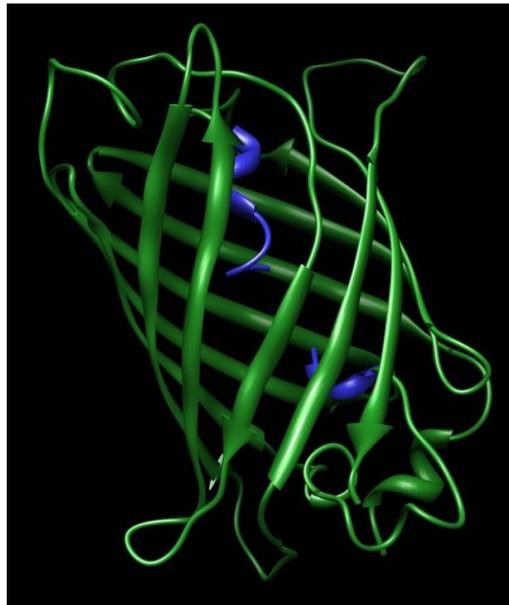
Die Eigenschaften der fluoreszenzaktiven Moleküle sind, in Hinblick auf die Effizienz der Lichtemission, von Molekül zu Molekül verschieden und werden von mehreren Parametern determiniert. Ein sehr wichtiges Charakterisierungsmerkmal stellt die Fluoreszenz-Quantenausbeute ( $\Phi_f$ ) dar. Sie beschreibt das Verhältnis von absorbierten zu emittierten Photonen und ist damit ein Maß für die Effizienz der Fluoreszenzemission eines Stoffes. Ein weiteres Charakteristikum ist die Fluoreszenzlebensdauer, die das Abklingverhalten der Fluoreszenzemission nach Beendigung der

Anregung (Absorption) beschreibt. Zusätzlich zur Fluoreszenzlebenszeit und der Quantenausbeute wird der Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) zur Beschreibung der fluoreszierenden Eigenschaften verschiedener Substanzen herangezogen. Dieser gibt ein Maß für die Fähigkeit einer Substanz an, elektromagnetische Strahlung einer bestimmten Wellenlänge durch Absorption und Streuung zu schwächen.

#### **1.4.2 GFP - das „green fluorescent protein“ und seine Derivate**

Die auf Fluoreszenz basierende Analyse von Prozessen oder Strukturen ist heutzutage in allen Lebenswissenschaften von besonderer Bedeutung und als molekularbiologisches Werkzeug unverzichtbar geworden. So werden z. B. katalytische Umsetzungen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Substraten photometrisch analysiert (Bandhuvula *et al.*, 2007) oder bestimmte Zellbestandteile wie DNA, Aktinfilamente oder Mikrotubuli mit Fluoreszenzfarbstoffen für mikroskopische Studien spezifisch gefärbt. Dabei findet eine Vielzahl verschiedener chemischer Verbindungen, wie z. B. DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) und Rhodamin-Phalloidin Anwendung. Diese Fluoreszenzfarbstoffe haben jedoch häufig den Nachteil, dass sie von außen in das lebende System eingebracht werden müssen und oftmals einen negativen Effekt auf die Zellphysiologie ausüben. Genetisch kodierte Fluoreszenzproteine, wie das *green fluorescent protein* (GFP), sind für solche Analysen besonders geeignet, da sie von den jeweiligen Organismen über die Proteinbiosynthese selbständig hergestellt werden können.

Das GFP wurde 1962 erstmals im Zusammenhang mit Aequorin als Teil eines Biolumineszenzsystems aus der Qualle *Aequorea victoria* beschrieben (Shimomura *et al.*, 1962). GFP absorbiert hierbei das blaue Licht (Chemolumineszenz), welches vom Aequorin nach Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen emittiert wird und emittiert dadurch selbst Licht im grünen Spektralbereich (Morise *et al.*, 1974; Shimomura *et al.*, 1974). Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von ungefähr 27 kDa und besteht aus 238 Aminosäuren (Prasher *et al.*, 1992) die zu elf  $\beta$ -Faltblattstrukturen und einer  $\alpha$ -Helix organisiert werden (Ormö *et al.*, 1996). Diese sind wiederum, wie in Abbildung 3 dargestellt ist, dreidimensional zu einer fassartigen Organisation der  $\beta$ -Faltblätter, dem sogenannten  $\beta$ -barrel, mit innenliegender  $\alpha$ -Helix strukturiert (Yang *et al.*, 1996). Der Oligomerisierungszustand des GFP hängt von der Protein- sowie der umgebenden Ionenkonzentration ab, wobei das Protein bei steigenden Konzentrationen zu einer stärkeren Dimerisierung neigt (Ward *et al.*, 1982).



**Abbildung 3: Dreidimensionale Proteinstruktur des GFP** (Ormö *et al.*, 1996)

Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) besteht aus 11  $\beta$ -Faltblattstrukturen (grün) die fassartig um die zentrale  $\alpha$ -Helix (blau) organisiert sind (PDB-ID:1EMA).

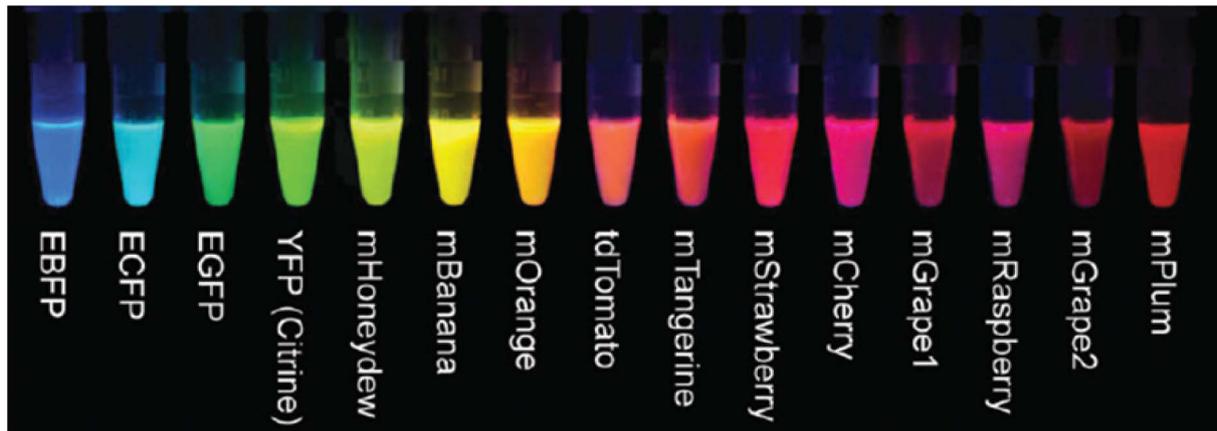
Die korrekte Faltung des GFP ist für die Funktion des Proteins von entscheidender Bedeutung, wobei die Ausbeute an funktionellem Protein von dem jeweiligen biologischen System abhängt und sich zwischen Pro- und Eukaryoten stark unterscheidet (Chang *et al.*, 2005; Sacchetti *et al.*, 2001). Nach der erfolgten Faltung des GFP zeigt dieses jedoch noch keine Fluoreszenzaktivität, sondern durchläuft noch einen weiteren Reifungsschritt. Dabei kommt es zur autokatalytischen Bildung des Chromophors, einem 4-(*p*-Hydroxybenzyliden)-Imidazolidin (Shimomura, 1979), durch Zyklisierung der drei Aminosäuren Serin, Tyrosin sowie Glycin an den Positionen 65-67. Anschließend folgt an der Hydroxybenzylseitenkette des Tyrosins 66 ein Oxidationsschritt, der für die Reifungsdauer des Chromophors bestimmend ist und bei Raumtemperatur zwei bis vier Stunden beträgt (Craggs, 2009; Heim *et al.*, 1994; Remington, 2006). Das auf diesem Wege gebildete Chromophor zeigt eine starke Sensitivität gegenüber dem pH-Wert und der vorliegenden Ionenkonzentration (Bizzarri *et al.*, 2009; Jayaraman, 2000). Bei neutralen pH-Verhältnissen kommt das Chromophor in zwei verschiedenen Protonierungszuständen vor, die durch ihre charakteristischen Absorptionsmaxima bei 395 nm bzw. 475 nm unterschieden werden können (Morise *et al.*, 1974; Ward *et al.*, 1982), wobei das Emissionsmaximum unabhängig von der Protonierung bei 508 nm liegt.

Die Anwendbarkeit des GFP war in der Grundlagenforschung aufgrund seiner relativ geringen Helligkeit, der beiden Absorptionsmaxima, einer geringen Löslichkeit sowie der langen Reifungsdauer des Chromophors stark limitiert, was zu einer Suche nach verbesserten Proteinvarianten führte. Durch Methoden der gerichteten und ungerichteten Mutagenese wurden mehrere solcher Varianten erzeugt, wobei besonders die Substitutionen der Aminosäure Serin an Position 65 durch Threonin (S65T) zu einer Erhöhung des Extinktionskoeffizienten und einer vierfach beschleunigten

Chromophorreifung führte (Heim & Tsien, 1996; Heim *et al.*, 1994). Des Weiteren zeigte diese GFP-Mutante nur noch ein Absorptionsmaximum bei 488 nm. Durch das Einfügen eines weiteren Aminosäureaustauschs von Phenylalanin zu Leucin an Position 64 (F64L) und der Optimierung der Primärsequenz an eine humane *codon - usage* wurde das „*enhanced GFP*“ (eGFP) generiert (Cormack *et al.*, 1996), dessen *in vivo* Fluoreszenzemission verglichen zum Wildtyp - GFP um das 35-fache erhöht ist. Durch weitere Mutationen konnten die eGFP Eigenschaften in Hinblick auf seine Löslichkeit und Fehlfaltungen im Temperaturbereich von 30°C bis 37°C weiter optimiert werden (Lim *et al.*, 1995; Webb *et al.*, 1995). Außerdem wurde eine weitere Variante, das „*superfolder GFP*“ erzeugt, welches auch bei Proteinfusion mit gering löslichen Proteinen noch korrekt posttranslational prozessiert wird (Pédelaq *et al.*, 2006). Neben den bisher beschriebenen Optimierungen des GFP wurde ebenfalls eine Vielzahl an Varianten erzeugt, die eine Veränderung der spektralen Eigenschaften zeigten. So wurde durch Substitution der Aminosäure Tyrosin an Position 66 durch Histidin das Emissionsspektrum des Proteins in den blauen Spektralbereich verschoben ( $\lambda_{\text{Ex max}} = 382 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{Em max}} = 448 \text{ nm}$ ) wodurch das „*blue fluorescent protein*“ (BFP) entstand (Heim *et al.*, 1994). Weitere GFP-Varianten mit veränderten Spektraleigenschaften sind das „*cyan fluorescent protein*“ CFP ( $\lambda_{\text{Ex max}} = 458 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{Em max}} = 480 \text{ nm}$ ) (Heim *et al.*, 1994) und das „*yellow fluorescent protein*“ YFP ( $\lambda_{\text{Ex max}} = 513 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{Em max}} = 527 \text{ nm}$ ) (Ormö *et al.*, 1996).

Neben all diesen Varianten des *A. victoria* - GFP wurden weitere Fluoreszenzproteine aus marinen Organismen, vornehmlich aus der Klasse der *Anthozoa* beschrieben, die starke strukturelle Homologien zum GFP besitzen, wie z.B. das rotfluoreszierende dsRed aus *Discosoma spec.* (Matz *et al.*, 1999). Außerdem konnten ebenfalls aus der Klasse der *Anthozoa* stammende Chromoproteine, die keine natürliche Fluoreszenzaktivität besitzen, durch gerichtete Mutagenese in aktive Fluoreszenzproteine umgewandelt werden (Bulina *et al.*, 2002; Gurskaya *et al.*, 2001).

Wie es beispielhaft in Abbildung 4 dargestellt ist ergänzt die Gruppe der GFP-homologen die Palette der GFP-basierten Fluoreszenzproteine zu einem großem Repertoire verschiedener Fluoreszenzreporterproteine, deren Fluoreszenzeigenschaften das komplette sichtbare Lichtspektrum abbilden. Neben den dort dargestellten Varianten existiert heutzutage eine Vielzahl verschiedener GFP-artiger Proteine, deren spektrale Eigenschaften verändert oder deren Charakteristika in Bezug auf ihre Helligkeit, ihre Quartärstruktur oder ihrer Reifungsdauer optimiert wurden (Day & Davidson, 2009).



**Abbildung 4: Übersicht über das Farbspektrum der GFP-basierten und GFP-homologen Fluoreszenzproteine** (Tsien, 2009); Copyright © 2009 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Die dargestellten GFP-artigen und -homologen Proteine decken durch ihre spektralen Eigenschaften das gesamte sichtbare Lichtspektrum ab. (EBFP: *enhanced blue fluorescent protein*; ECFP: *enhanced cyan fluorescent protein*; EGFP: *enhanced green fluorescent protein*; YFP: *yellow fluorescent protein*; mmonomer; td: tandem dimer)

Diese vielfältigen Varianten werden in der biologischen und medizinischen Grundlagenforschung vielseitig eingesetzt, um unterschiedlichste Prozesse bzw. Strukturen zu analysieren. So werden Fluoreszenzproteine sehr häufig zur Bestimmung von Promotorstärken und der Überwachung von Genexpressionen verwendet. Dabei wird das Fluoreszenzprotein-kodierende Gen unter der Kontrolle des zu untersuchenden Promotors exprimiert, wobei die Höhe der emittierten Fluoreszenzintensität auf die Stärke der Promotoraktivität schließen lässt (Li *et al.*, 1998). Die wohl häufigste Art der Anwendung der Fluoreszenzproteine ist die Markierung von anderen Proteinen oder Zellkompartimenten durch Bildung von Fusionsproteinen. Dabei wird das Gen des Fluoreszenzreporters direkt *in frame* vor oder hinter das Zielgen kloniert und bildet nach Transkription und Translation eine Fusion mit dem Zielprotein. Über die fluoreszierenden Eigenschaften des Reporters kann dann z. B. die Lokalisierung des Zielproteins mittels mikroskopischer Verfahren verfolgt werden (Feilmeier *et al.*, 2000; Hampton *et al.*, 1996) oder die Translokation über die Sec- bzw. Tat-Mechanismen studiert werden (Meissner *et al.*, 2007; Pradel *et al.*, 2009). Ebenfalls konnten GFP-Fusionsproteine bereits erfolgreich zu Faltungsstudien bei z. B. Prionen eingesetzt werden (Vasiljevic *et al.*, 2006). Ein weiteres Anwendungsfeld der GFP-basierten Fluoreszenzproteine ist deren Einsatz als FRET-Sensoren (FRET: Förster-Resonanzenergietransfer) für Proteininteraktionen (Gau *et al.*, 2011), für den Nachweis bestimmter Meta- bzw. Katabolite wie z. B. Laktat (San Martín *et al.*, 2013), Glukose (Bermejo *et al.*, 2011; Veetil *et al.*, 2010) und 2-Oxoglutarat (Zhang *et al.*, 2013a) oder für die Detektion von Umweltbedingungen wie dem pH-Wert (Esposito *et al.*, 2008) oder der Kalziumionenkonzentration (Miyawaki *et al.*, 1999). Zusätzlich existieren FRET-Sensoren zur Detektion von mechanischen Stress (Meng & Sachs, 2012; Wang *et al.*, 2011) und Kinaseaktivität (Green & Alberola-Ila, 2005).

Bei FRET handelt es sich um einen strahlungsfreien Energietransfer von einem Donor- auf ein Akzeptorfluorophor, wenn sich deren Emissions- (Donor) und Absorptionsspektren (Akzeptor) überschneiden und die räumliche Distanz beider unter 10 nm liegt (Chudakov *et al.*, 2005). Ähnlich funktioniert die Analyse von Protein-Interaktionen mittels Split-Varianten von GFP bzw. YFP. Dabei wird das Fluoreszenzprotein in C- und N-terminalen Domänen getrennt voneinander an die Zielproteine fusioniert, die sich zum funktionellen Reporterprotein komplementieren, sobald sie in räumliche Nähe gelangen (Bracha-Drori *et al.*, 2004; Cabantous & Waldo, 2006; Magliery *et al.*, 2005).

Diese Beispiele zeigen die weite Verbreitung der GFP-artigen und -homologen Proteine als Fluoreszenzreporterproteine in der Grundlagenforschung, deren Bedeutung durch die Vergabe des Nobelpreises für Chemie im Jahr 2008 an Chalfie, Shimomura und Tsien honoriert wurde (Chalfie, 2009; Shimomura, 2009; Tsien, 2009).

#### **1.4.3 Limitierungen der GFP-basierten Fluoreszenzproteine bei *in vivo* Anwendungen**

Obwohl die GFP-basierten Fluoreszenzproteine inzwischen die am häufigsten verwendeten *in vivo* Reporterproteine in der Mikrobiologie, Zellbiologie und Biomedizin sind, ergeben sich aufgrund der Eigenschaften dieser Proteine Limitierungen ihrer Einsatzmöglichkeiten.

Proteine der GFP-Familie machen nach der Transkription und Translation einen Reifungsprozess durch, der in zwei grundlegende Schritte unterteilt wird. Zuerst wird das translatierte Protein in seine korrekte fassartige Struktur gefaltet, wobei schon bei diesem frühzeitigen Reifungsprozess Fehlfaltungen auftreten können. Diese sind besonders von den Expressionsbedingungen wie z. B. der Temperatur (Shaner *et al.*, 2005; Siemering *et al.*, 1996) und dem gewählten Wirtsorganismus (Chang *et al.*, 2005; Sacchetti *et al.*, 2001) abhängig und führen zur Bildung von nicht fluoreszenzaktiven *inclusion bodies* oder zur Degradation des Proteins (Cormack *et al.*, 1996; Heim *et al.*, 1994). Nach der korrekten Faltung des Proteins kommt es anschließend zu einem weiteren Reifungsprozess, indem das Chromophor durch Zyklisierung autokatalytisch gebildet wird (1.4.2). Im Verlauf dieses Prozesses kommt es bei GFP-artigen Fluoreszenzproteinen zu einem, bei DsRed-artigen zu zwei, obligatorischen Oxidationsschritten (Craggs, 2009), die für die spätere Fluoreszenzaktivität entscheidend sind. Des Weiteren ist dieser Schritt für die Dauer der Chromophorreifung zeitbestimmend, wobei es, in Abhängigkeit der eingesetzten Proteinvariante, zu starken Verzögerungen zwischen der Synthese und der Aktivität des Proteins kommt (Heim *et al.*, 1995). Daher ist der Einsatz von Fluoreszenzproteinen der GFP-Familie als *in vivo* Reporter für Expressionsanalysen in Echtzeit limitiert (Drepper *et al.*, 2010a). Neben dieser Einschränkung führt die sauerstoffabhängige Chromophorreifung dazu, dass diese Proteine in strikt anaeroben Zellen oder Geweben nicht funktionell einsetzbar sind. Doch auch in aeroben Systemen unterliegt die

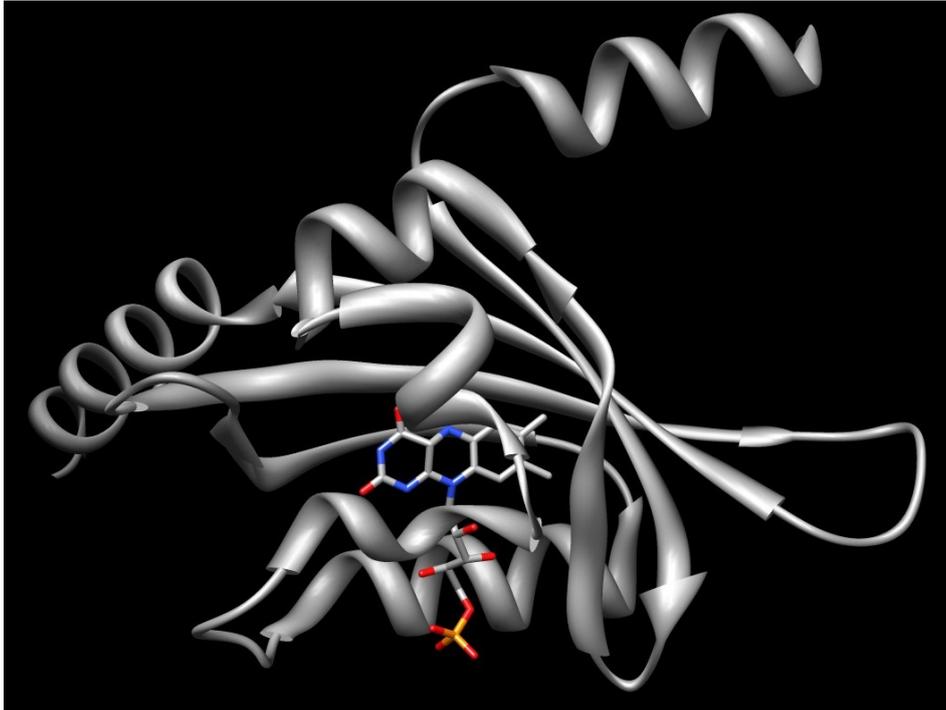
Anwendbarkeit dieser Fluoreszenzproteine weiterer Begrenzungen, die sich negativ auf die Helligkeiten der emittierten Fluoreszenzen auswirken. Dabei sind die GFP-artigen Proteine besonders sensitiv gegen saure pH-Werte und höhere Halidionen-Konzentrationen (Bizzarri *et al.*, 2009; Remington, 2011).

Als Konsequenz der beschriebenen Limitierung wurden mehrere alternative Kofaktor-bindende Fluoreszenzreporterproteine entwickelt. Darunter die Gruppe der NADPH-bindenden blau-fluoreszierenden Proteine (Chang *et al.*, 2004a, b; Hwang *et al.*, 2012; Kao *et al.*, 2011) und der Bilin-abhängigen rot-fluoreszierenden Reporter (Auldridge *et al.*, 2012; Fischer & Lagarias, 2004; Gärtner, 2010; Murphy & Lagarias, 1997; Oi *et al.*, 1982; Shu *et al.*, 2009). Eine weitere Gruppe bilden die grün-fluoreszierenden LOV-basierten Fluoreszenzreporter (LOV-FPs), die eine LOV-Domäne besitzen und Flavinmononukleotid (FMN) als Kofaktor binden.

#### **1.4.4 LOV-Protein basierte Fluoreszenzreporter**

Der Umstand, dass LOV-Domänen einen Photozyklus durchlaufen, in dessen Verlauf das fluoreszenz-inaktive Photoaddukt gebildet wird, machte deren Verwendung als Fluoreszenzreporterproteine nicht praktikabel. Durch Austausch des photoaktiven Cysteins der Phototropin LOV-Domäne aus *Avena sativa* in Alanin konnte die Bildung des Photoaddukts verhindert werden, wodurch die Domäne, auch bei andauernder Blaulichtbestrahlung, im fluoreszenz-aktivem Grundzustand fixiert wurde (Salomon *et al.*, 2000). Durch diese Erkenntnis wurden auf Grundlage von verschiedenen LOV-Proteinen unterschiedliche LOV-FPs entwickelt, wie z. B. die FMN-bindenden Fluoreszenzproteine (FbFPs) aus *P. putida* Pp2FbFP, basierend auf PpSB2-LOV) und *B. subtilis* BsFbFP und EcFbFP, basierend auf YtvA (Drepper *et al.*, 2007) sowie iLOV (basiert auf der LOV2-Domäne des Phototropin2 aus *A. thaliana*) (Chapman *et al.*, 2008; Christie *et al.*, 2012a). Wie in Abbildung 5 dargestellt ist, besteht die LOV-Domäne aus fünf antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen und vier Helices, die das als Chromophor gebundene FMN umschließen. Da FMN als Derivat von Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) als Kofaktor unterschiedlichster Enzyme in allen Organismen vorkommt, ist eine gleichzeitige verstärkte Biosynthese des Kofaktors nicht erforderlich (Drepper *et al.*, 2013). Das Molekulargewicht der LOV-FPs variiert zwischen den jeweiligen Vertretern dieser Proteinfamilie und liegt zwischen 11 und 16 kDa, wobei die FbFPs EcFbFP, Pp1FbFP und Pp2FbFP als Dimer und iLOV als Monomer vorliegen.

Die von den LOV-FPs emittierte Fluoreszenz besitzt ein typisches Spektrum mit einem Emissionsmaximum von 495 nm, während das Maximum der Absorption bei 450 nm im blauem Spektralbereich des sichtbaren Lichtes liegt.



**Abbildung 5: Dreidimensionale Struktur des PpSB1-LOV Monomers aus *P. putida*** (Circolone *et al.*, 2012)

Die typische dreidimensionale Struktur der LOV-Domäne, am Beispiel des Sensory-Box 1 Proteins aus *P. putida* (PDB-ID 3WS1), zeigt die Organisation der 5  $\beta$ -Faltblätter und 4  $\alpha$ -Helices um den nichtkovalent gebundenen Kofaktor FMN.

Im Vergleich zu den etablierten Fluoreszenzreportern der GFP-Familie, wie z. B. eGFP, das einen Extinktionskoeffizienten von ca.  $55.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und eine Quantenausbeute von 0,6 besitzt (Patterson *et al.*, 1997), sind die Fluoreszenzeigenschaften der LOV-FPs, vor allem bedingt durch den geringen Extinktionskoeffizienten von ungefähr  $12.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (van den Berg *et al.*, 2001; Drepper *et al.*, 2007; Losi *et al.*, 2002) und Quantenausbeuten von 0,17 (Pp2FbFP) bis 0,44 (iLOV), in Hinblick auf ihre Helligkeit benachteiligt - Die aktuell publizierten Fluoreszenzeigenschaften der beschriebenen LOV-basierten Fluoreszenzproteine sind in Tabelle 1 zusammengefasst. - Trotz dieser Nachteile bieten diese Proteine aufgrund ihrer Eigenschaften der geringen Größe, der sauerstoffunabhängigen Reifung sowie ihrer Stabilität im pH-Bereich von 4 - 11 (Mukherjee *et al.*, 2012) einzigartige Anwendungsmöglichkeiten in der Grundlagenforschung, weshalb die LOV-FPs in vielen unterschiedlichen Organismen für *in vivo* Studien genutzt wurden (Drepper *et al.*, 2013).

**Tabelle 1: Übersicht der fluoreszierenden Eigenschaften von aktuell publizierten LOV-basierten Fluoreszenzproteinen.**

Dargestellt sind die wichtigsten Eigenschaften von aktuell publizierten LOV-basierten Fluoreszenzproteinen.  $\lambda_{\text{Ex max}}/\lambda_{\text{Em max}}$  beschreibt die Wellenlänge der maximal Absorption bzw. Emission,  $\Phi_{\text{F}}$  die Fluoreszenzquantenausbeute und  $\epsilon_{450\text{ nm}}$  den molaren Extinktionskoeffizienten bei 450 nm.

LOV-FP	Herkunft	$\lambda_{\text{Ex max}}/\lambda_{\text{Em max}}$	$\Phi_{\text{F}}$	$\epsilon_{450\text{ nm}}$	Oligomer	Referenz
<b>BsFbFP</b>	<i>B. subtilis</i>	449 / 495	-	12.500	Monomer	(Drepper <i>et al.</i> , 2007)
<b>EcFbFP</b>	<i>B. subtilis</i>	449 / 495	0,39	12.500	Dimer	(Drepper <i>et al.</i> , 2007)
<b>iLOV</b>	<i>A. thaliana</i>	447 / 497	0,44	-	Monomer	(Chapman <i>et al.</i> , 2008)
<b>miniSOG</b>	<i>A. thaliana</i>	448 / 500, 528	0,37	16.700	Monomer	(Shu <i>et al.</i> , 2011)
<b>Pp2FbFP (PpFbFP)</b>	<i>P. putida</i>	449 / 495	0,17	12.500	Dimer	(Drepper <i>et al.</i> , 2007)
<b>Pp2FbFP F37S</b>	<i>P. putida</i>	-	0,30	-	Dimer	(Mukherjee <i>et al.</i> , 2012)
<b>Pp2FbFP F37T</b>	<i>P. putida</i>	-	0,24	-	Dimer	(Mukherjee <i>et al.</i> , 2012)

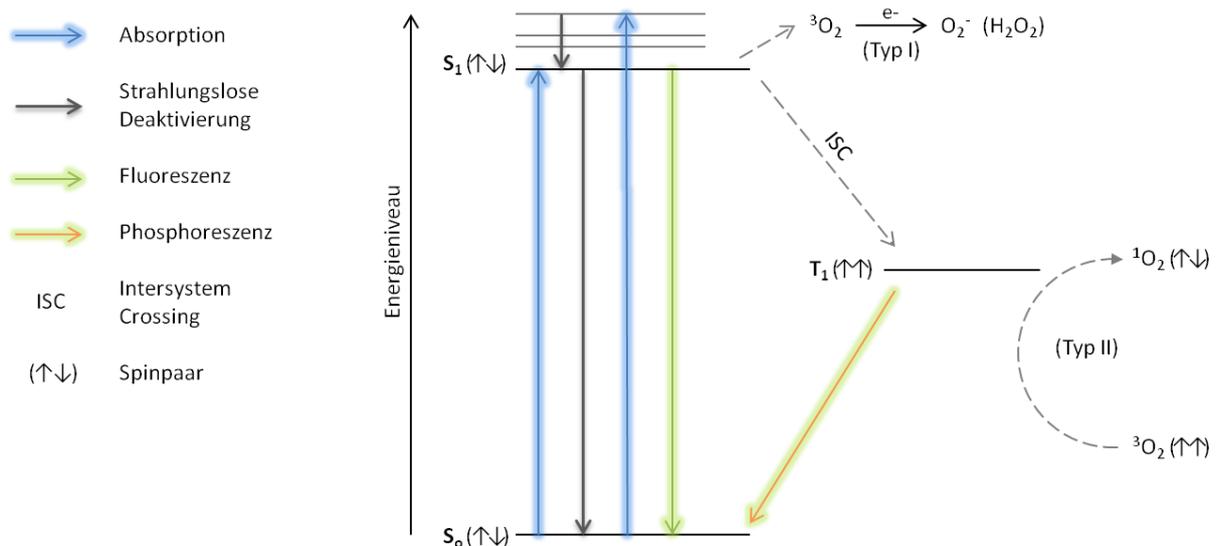
Besonders die sauerstoffunabhängige Fluoreszenzaktivität der LOV-FPs hat neue Möglichkeiten der *in vivo* Visualisierung von anaeroben Strukturen und Organismen ermöglicht. So wurden diese Fluoreszenzreporter bereits erfolgreich in anoxygenen phototroph kultivierten *Rhodobacter capsulatus* und *Roseobacter denitificans* Stämmen angewandt (Drepper *et al.*, 2007; Piekarski *et al.*, 2009), aber auch in den strikt anaeroben Organismen *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides fragilis* (Choi *et al.*, 2011; Lobo *et al.*, 2011) sowie den fakultativ anaeroben Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* (Tielker *et al.*, 2009) verwendet. Des Weiteren konnte mit Hilfe der LOV-FPs der konjugative Plasmidtransfer bei *E. coli* unter aeroben und anaeroben Bedingungen nachverfolgt werden (Król *et al.*, 2010). Vor kurzem konnte von Walter *et al.* durch die Anwendung der LOV-FPs in humanen Tumor- und neuralen murinen Stammzellen deren Funktionalität in Säugerzellen demonstriert werden (Walter *et al.*, 2012). Außerdem ermöglichen diese Fluoreszenzproteine aufgrund ihrer geringen Größe (ca. 11 - 16 kDa) Studien an zellulären Strukturen, die mit den Fluoreszenzproteinen der GFP-Familie (ca. 27 kDa) nicht möglich wären, so wie es bei der Infektion von Blättern der Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* mit dem Tabakmosaikvirus (Chapman *et al.*, 2008) oder bei periplasmatischen Translokationsstudien über den Tat-Sekretionsmechanismus (Zhang *et al.*, 2013b) demonstriert wurde. Ein zusätzliches Anwendungsfeld der LOV-FPs ist deren Verwendung als alternative Donordomäne in FRET-Fusionsproteinen mit YFP (*yellow fluorescent protein*, ein GFP-Derivat) zur intrazellulären Detektion und Quantifizierung von Sauerstoff (Pötzke *et al.*, 2012).

#### 1.4.5 Anwendung von Fluoreszenzproteinen als Photosensibilisatoren

Fluoreszenzaktive Proteine oder Farbstoffe (*dyes*) generieren als Nebenprodukt ihrer Aktivität Sauerstoffradikale, die einen negativen Einfluss auf die Zellphysiologie ausüben und sogar den Zelltod zur Folge haben können. Stoffe, die lichtinduziert große Mengen dieser Radikale produzieren, werden als Photosensibilisatoren (*photosensitizer*) klassifiziert und ermöglichen der biologischen bzw. medizinischen Forschung Analysen zum oxidativen Stress oder der photodynamischen Therapie. Die von den Photosensibilisatoren gebildeten Radikale können durch zwei unterschiedliche Prozesse generiert werden (Foote, 1991), wobei die Spezies der generierten Radikale vom jeweiligen Prozess abhängt, so wie es aus Abbildung 6 hervorgeht. Die erste Möglichkeit, die auch als Typ I-Reaktion bezeichnet wird, ist der Transfer von Elektronen vom ersten angeregten Singulett-Zustand ( $S_1$ ) des Chromophors auf elementaren Sauerstoff, wodurch primär Superoxid ( $O_2^-$ ) gebildet wird, welches jedoch pH-abhängig relativ schnell zu Wasserstoffperoxid weiterreagiert. Über den zweiten möglichen Prozess (Typ II-Reaktion) wird durch eine chemische Reaktion des Chromophors im Triplettzustand Energie auf elementaren Sauerstoff transferiert, wodurch der sehr reaktive aber nur kurzlebige Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) entsteht.

Die durch die beschriebenen Mechanismen erzeugten Sauerstoffradikale besitzen zwar nur eine geringe Lebensdauer (bei Singulett-Sauerstoff beträgt sie in Wasser nur 3  $\mu$ s und 65  $\mu$ s in schwerem Wasser (Wilkinson *et al.*, 1995)) doch sind diese Spezies sehr reaktiv und führen zu teilweise irreparablen Schäden an Proteinen, DNA, RNA und Lipiden (Jacobson *et al.*, 2008). Besonders Histidin, Tyrosin, Tryptophan, Methionin und Cystein-Seitenketten von Proteine sind Ziele von Singulett-Sauerstoff und werden durch diesen oxidiert, wodurch es sowohl zu intra-, als auch intermolekularem *crosslinking* der Proteine kommt, was wiederum deren Funktionsverlust zur Folge hat (Davies, 2003).

Lange Zeit begrenzte sich das zur Verfügung stehende Repertoire an Photosensibilisatoren auf chemische Verbindungen, wie z.B. ReAsH (Adams *et al.*, 2002) oder FIAsH (Griffin, 1998), die jedoch nur ungerichtet und zum Teil mit invasiven Methoden in die zu untersuchenden Zellen und Gewebe eingebracht werden müssen. Zwar wiesen mehrere Arbeiten eine durch Belichtung ausgelöste Sauerstoffradikalproduktion von GFP-artigen Fluoreszenzproteinen nach, die für Techniken der *chromophor-assisted light inactivation* (CALI) genutzt werden konnte (Rajfur *et al.*, 2002; Tanabe *et al.*, 2005), doch zeigten Studien am isolierten eGFP-Chromophor 4-Hydroxybenzyliden-1,2-Dimethylimidazolidin (HBDI) nur eine sehr geringe Singulett-Sauerstoff Produktion (Jiménez-Banzo *et al.*, 2008).



**Abbildung 6: Jablonski-Diagramm zur schematischen Darstellung der Sauerstoffradikalproduktion durch den angeregten Photosensibilisator**

Die Aufnahme von Energie durch Absorption von Photonen führt zur Anregung des Chromophors ( $S_0$ ) in den niedrigsten angeregten Singulettzustand ( $S_1$ ). Aus diesem Zustand kann die Energie strahlungsfrei an das umgebende Medium, durch Emission von elektromagnetischer Strahlung (Fluoreszenz) oder durch Elektronentransfer auf elementaren Sauerstoff abgegeben werden. Durch Spinumkehr (Intersystem Crossing) kann das Chromophor aus dem angeregten Singulettzustand ( $S_1$ ) in den angeregten Triplettzustand ( $T_1$ ) überführt werden, aus dem die Energie in Form von Phosphoreszenz oder durch chemische Reaktion mit elementarem Sauerstoff abgegeben werden kann.

Der erste beschriebene, genetisch kodierte Photosensibilisator ist das KillerRed, ein GFP-homologes Fluoreszenzprotein, das auf Grundlage des nicht-fluoreszierenden Chromoprotein anm2CP aus *Anthomedusae spec.* entwickelt wurde (Bulina *et al.*, 2006a). KillerRed absorbiert Licht im grün-orangen Spektralbereich ( $\lambda_{\text{Ex}} = 520$  bis  $590$  nm) woraufhin es neben der rötlichen Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{Em Max}} = 610$  nm) auch Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species*, ROS) in ausreichenden Mengen erzeugt, um Zellstrukturen zu schädigen oder ganze Zellen abzutöten (Bulina *et al.*, 2006b). Bei den generierten Radikalen handelt es sich vornehmlich um Superoxid und Wasserstoffperoxid, weshalb KillerRed als Typ I-Photosensibilisator klassifiziert ist (Shu *et al.*, 2011; Vegh *et al.*, 2011). Anhand von vergleichenden Strukturanalysen des KillerReds mit GFP konnte ein mit Wassermolekülen gefüllter Kanal identifiziert werden, der vom Äußeren des KillerRed-Moleküls bis zum Chromophor reicht und eine verstärkte Diffusion von molekularem Sauerstoff und Protonen ermöglicht (Carpentier *et al.*, 2009; Pletnev *et al.*, 2009). Des Weiteren ermöglicht dieser Kanal die schnelle Diffusion der kurzlebigen Sauerstoffradikale aus dem Protein heraus, wo diese mit den umgebenden Strukturen oder Proteinen reagieren können. Die Effektivität dieses Photosensibilisators konnte durch den Einsatz einer hochaufgelösten örtlichen- sowie zeitlichen Bestrahlung, durch lichtinduzierte Proteinfunktionsverlust-Analysen demonstriert werden (Destaing *et al.*, 2010; Matsunaga *et al.*, 2012). Ebenfalls konnten sowohl ganze KillerRed exprimierende Bakterien- (Mueller *et al.*, 2010; Waldeck *et al.*, 2012), Säuger- (Bulina *et al.*, 2006b) und sogar Tumorzellen (Serebrovskaya *et al.*,

2009; Shirmanova *et al.*, 2013) durch Bestrahlung mit Grün- bzw. Weißlicht abgetötet werden. Des Weiteren ermöglicht die Anwendung des KillerRed durch gezielte Bindung an bestimmte Zellkompartimente die Beeinflussung der Zellphysiologie oder des zellulären Verhaltens. Durch Fusionierung des Photosensibilisators an DNA-bindende Histone konnten lichtinduzierte Erbgutschäden, wie z. B. Degradierung der DNA durch Strangbrüche, ausgelöst werden (Waldeck *et al.*, 2011), wodurch es z. B. möglich ist, den Zellzyklus belichtungsabhängig zu unterbrechen (Serebrovskaya *et al.*, 2011). Außerdem konnte KillerRed als optogenetisches Werkzeug zur lichtinduzierten Ablation von markierten Zelllinien *in vivo* angewendet werden (Del Bene *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Teh *et al.*, 2010). Eine völlig andere Anwendung wurde durch das Einfügen einer *multiple cloning site* (MCS) in die Gensequenz des KillerReds und dessen Insertion in einen Klonierungsvektor ermöglicht. Durch Klonierung einer DNA-Sequenz (Gen) in die MCS des Vektors kommt es zur Inaktivierung des KillerReds wodurch eine einfache Selektion aufgrund der Zellfärbung (Liu *et al.*, 2010) oder der Lebensfähigkeit bei Belichtung der Bakterienkolonien (Liu *et al.*, 2011a) auf positive Klone möglich ist.

Erste Indizien auf einen phototoxischen Effekt der LOV-FPs konnten bereits in früheren eigenen Studien festgestellt werden (Endres, 2010), woraus ein Patent zur gezielten lichtgesteuerten Desfunktionalisierung von Molekülen hervorging (Drepper *et al.*, 2010b). Schließlich wurde das Repertoire an genetisch-kodierten Photosensibilisatoren durch miniSOG (*mini singlet oxygen generator*) ergänzt (Shu *et al.*, 2011). Dieses, aus 106 Aminosäuren bestehende LOV-Protein, wurde auf Grundlage der LOV2-Domäne des Phototropin 2 (*AtPhot2*) aus *A. thaliana* entwickelt. Wie alle LOV-Proteine bindet miniSOG den Kofaktor FMN als Chromophor, wonach es Licht im blauen Spektralbereich ( $\lambda_{\text{Ex max}} = 448 \text{ nm}$ ) absorbiert und eine grüne Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{Em max}} = 500 \text{ nm}$  und  $528 \text{ nm}$ ) mit einer Quantenausbeute von 0,37 emittiert (Shu *et al.*, 2011). Die Effektivität, mit der miniSOG Singulettsauerstoff durch Belichtung generiert, wurde ursprünglich mit einer Quantenausbeute von 0,47 angegeben. Allerdings ergaben neuere Studien eine deutlich geringere Quantenausbeute und korrigierten diesen Wert auf 0,03 (Pimenta *et al.*, 2013; Ruiz-González *et al.*, 2013). Trotz allem genügt die Menge der generierten Singulettsauerstoff-Radikalen zur lokalen Polymerisation von Diaminobenzidin (DAB) in einem Präzipitat, welches durch Osmium angefärbt werden kann und dadurch zur Illustration mittels Elektronenmikroskopie geeignet ist (Boassa *et al.*, 2013; Shu *et al.*, 2011). Neben dieser speziellen Anwendung konnte miniSOG aufgrund seiner phototoxischen Eigenschaften auch *in vivo* zur lichtinduzierten Zellablation in *Caenorhabditis elegans* eingesetzt werden (Qi *et al.*, 2012).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

LOV-Blaulichtrezeptoren regulieren viele lichtgesteuerte Prozesse in Pflanzen (Phototropismus, Stomataöffnung, Chloroplastenlokalisierung, etc.). Allerdings ist die Bedeutung von bakteriellen LOV-Proteinen weitestgehend unbekannt. Daher ist die Charakterisierung des regulatorischen Einflusses des putativen Blaulichtrezeptors DsLOV in dem aerob anoxygenen phototrophen Bakterium *Dinoroseobacter shibae* ein Ziel der vorliegenden Arbeit. Um dies zu erreichen, sollte eine entsprechende Insertionsmutante erzeugt und in Hinblick auf ihr Wachstumsverhalten unter verschiedenen Lichteinflüssen und eventuelle Unterschiede in ihrer Pigmentierung untersucht werden. Des Weiteren sollte der LOV-Photozyklus des DsLOV aus *D. shibae* charakterisiert und der Fragestellung nachgegangen werden, ob dieser Photozyklus durch Methoden der gerichteten Mutagenese beeinflusst werden kann.

Auf Grundlage von LOV-Proteinen ist es durch eine Aminosäuresubstitution des photoaktiven Cystein der LOV-Domäne durch Alanin möglich, Fluoreszenzreporterproteine zu generieren. Diese FMN-bindenden Fluoreszenzproteine (FbFPs bzw. LOV-FPs) haben sich in den Lebenswissenschaften bereits erfolgreich als Werkzeuge bei Expressions- und Lokalisationsstudien in Pro- und Eukaryoten, als *in vivo* Sauerstoff-Biosensor sowie als *Tag* für die Elektronenmikroskopie, in aeroben und anaeroben Systemen etabliert. Deshalb sollte das für diese Studien einsetzbare Repertoire von FbFPs durch die Konstruktion neuartiger Fluoreszenzreporterproteine sowie weiterer Mutanten bereits existierender Reporter ergänzt werden.

Frühere eigene Beobachtungen sowie neuere Studien haben allerdings gezeigt, dass diese Proteine Sauerstoffradikale als Nebenprodukt ihrer Fluoreszenzaktivität generieren. Diese Spezies können bedingt durch ihre starke Reaktivität und Wirkung als Oxidationsmittel zu irreparablen Schäden an Zellkompartimenten führen, wodurch im Extremfall der Zelltod ausgelöst wird. Das hauptsächliche Ziel der vorliegenden Arbeit war die eingehende Charakterisierung verschiedener LOV-FPs sowie der durch die Bestrahlung mit Blaulicht ausgelösten Produktion von Sauerstoffradikalen. Dazu sollten die Auswirkungen der gebildeten Radikale auf lebende Zellen (*in vivo*) der Modellorganismen *E. coli* und humanen Tumorzelllinien HT22 untersucht werden. Des Weiteren sollte die Art (Qualität) und Menge (Quantität) der vom jeweiligen LOV-FP generierten Radikale in zellfreien (*in vitro*) Systemen bestimmt werden, wodurch sich Rückschlüsse auf deren Effektivität als Photosensibilisator ergeben. Außerdem sollte anhand von Transkriptomsanalysen mittels DNA-Microarray-Studien untersucht werden, ob und in welcher Art *E. coli* Bakterienzellen auf die lichtinduzierte Zunahme an Sauerstoffradikalen reagieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme

#### 2.1.1 *Escherichia coli* Stämme

Tabelle 2: Übersicht der Genotypen der verwendeten *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\Delta lac169$ , 80lacZ $\Delta$ M15, <i>hsdR17</i> , <i>recA 1</i> , <i>endA 1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA</i> , ( <i>res<sup>-</sup></i> , <i>mod<sup>*</sup></i> ), <i>deoR</i>	(Hanahan, 1983)
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdSb</i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ), <i>gal</i> , <i>dem</i> , ( $\lambda$ ts857, <i>indl</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lacUV5-T7gene1</i> )	(Studier & Moffatt, 1986)
ST18	Ec294:: <i>[RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn79)]</i> , <i>pro</i> , <i>res</i> , <i>recA</i> , T <sub>p</sub> <sup>r</sup> , S <sub>m</sub> <sup>r</sup> , $\Delta$ <i>hemA</i>	(Thoma & Schobert, 2009)

#### 2.1.2 *Dinoroseobacter shibae* Stämme

Tabelle 3: Übersicht der Genotypen der verwendeten *Dinoroseobacter shibae* Stämme

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
DFL-12 <sup>T</sup>	Wildtyp	(Biebl <i>et al.</i> , 2005)
DFL-12 <sup>T</sup> <i>dslov::Gm<sup>r</sup></i>	Insertion der $\Omega$ -Gm <sup>r</sup> -Kassette in <i>dslov</i> (Dshi_2006)	diese Arbeit

### 2.2 Vektoren und rekombinante Plasmide

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Vektoren

Vektor	Relevante Eigenschaften	Referenz
pcDNA3.1	Amp <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> , pUC ori, SV40 ori, f1 ori, MCS, P <sub>CMV</sub>	Invitrogen, Darmstadt
pET28a(+)	P <sub>T7</sub> , His <sub>6</sub> -Tag, MCS, <i>lacI</i> , <i>bla</i> , Km <sup>r</sup> pBR322 ori, f1 ori	Novagen, Darmstadt
pEX18-Ap	Amp <sup>r</sup> , oriT+, sacB+, Genaustauschvektor mit pUC18 MCS	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pRhokHi-2	pBBR1mcs ( <i>rep</i> , <i>mob</i> , Cm <sup>r</sup> ), pET22b (MCS, <i>pelB</i> ), pBSL15 ( <i>aphII</i> ) Orientierung I, P <sub>T7</sub>	(Katzke <i>et al.</i> , 2010)
pRhotHi-2	pBBR1mcs ( <i>rep</i> , <i>mob</i> , Cm <sup>r</sup> ), pET22b (MCS, <i>pelB</i> ), pBSL15 ( <i>aphII</i> ) Orientierung II, P <sub>T7</sub>	(Katzke <i>et al.</i> , 2010)

**Tabelle 5: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide**

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz
pcDNA3.1 memDsFbFP	Amp <sup>r</sup> ; <i>dsfbfp</i> mit N-terminaler Kozak- und Membran-Adhäsionssequenz unter Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors	diese Arbeit
pcDNA3.1 memEcFbFP	Amp <sup>r</sup> ; <i>ecfbfp</i> mit N-terminaler Kozak- und Membran-Adhäsionssequenz unter Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors	diese Arbeit
pcDNA3.1 memPp2FbFP	Amp <sup>r</sup> ; <i>pp2fbfp</i> mit N-terminaler Kozak- und Membran-Adhäsionssequenz unter Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors	diese Arbeit
pET28a DsFbFP	Km <sup>r</sup> ; <i>dsfbfp</i> unter Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors; N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	diese Arbeit
pET28a DsFbFP M49I	Km <sup>r</sup> ; <i>dsfbfp m49i</i> unter Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors; N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	diese Arbeit
pET28a EcFbFP	Km <sup>r</sup> ; <i>ecfbfp</i> unter Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors; N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	Wingen, unveröffentlicht
pET28a miniSOG	Km <sup>r</sup> ; <i>minisog</i> unter Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors; N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	diese Arbeit
pET28a phiLOV 2.1	Km <sup>r</sup> ; <i>philov 2.1</i> unter Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors; N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	Wingen, unveröffentlicht
pET28a Pp1FbFP	Km <sup>r</sup> ; <i>pp1fbfp</i> unter Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors; N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	Circolone, unveröffentlicht
pET28a Pp2FbFP	Km <sup>r</sup> ; <i>pp2fbfp</i> unter Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors; N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	Potzkei, unveröffentlicht
pET28a Pp2FbFP L30M	Km <sup>r</sup> ; <i>pp2fbfp l30m</i> unter Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors; N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	diese Arbeit

pEX18-Ap <i>dslov</i> ::Gm <sup>r</sup>	Amp <sup>r</sup> ; Genaustauschvektor zur Insertion der $\Omega$ -Gm <sup>r</sup> -Kassette in den <i>dslov</i> -Lokus ( <i>Dshi_2006</i> )	diese Arbeit
pRhokHi-2 DsFbFP	Km <sup>r</sup> ; <i>dsfbfp</i> unter Kontrolle des konstitutiven <i>aphII</i> -Promotors; C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	diese Arbeit
pRhokHi-2 DsLov	Km <sup>r</sup> ; <i>dslov</i> unter Kontrolle des konstitutiven <i>aphII</i> -Promotors; C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	diese Arbeit
pRhokHi-2 EcFbFP	Km <sup>r</sup> ; <i>ecfbfp</i> unter Kontrolle des konstitutiven <i>aphII</i> -Promotors; C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	(Drepper <i>et al.</i> , 2010a)
pRhokHi-2 miniSOG	Km <sup>r</sup> ; <i>minisog</i> unter Kontrolle des konstitutiven <i>aphII</i> -Promotors; C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	diese Arbeit
pRhokHi-2 phiLOV 2.1	Km <sup>r</sup> ; <i>philov 2.1</i> unter Kontrolle des konstitutiven <i>aphII</i> -Promotors; C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	Wingen, unveröffentlicht
pRhokHi-2 Pp1FbFP	Km <sup>r</sup> ; <i>pp1fbfp</i> unter Kontrolle des konstitutiven <i>aphII</i> -Promotors; C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	diese Arbeit
pRhokHi-2 Pp2FbFP	Km <sup>r</sup> ; <i>pp2fbfp</i> unter Kontrolle des konstitutiven <i>aphII</i> -Promotors; C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	Heck, unveröffentlicht
pRhotHi-2 DsLov	Km <sup>r</sup> ; <i>dslov</i> unter Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors; C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	Circolone, unveröffentlicht
pRhotHi-2 DsLov M49I	Km <sup>r</sup> ; <i>dslov m49i</i> unter Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors; C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	diese Arbeit
pRhotHi-2 DsLov M49S	Km <sup>r</sup> ; <i>dslov m49s</i> unter Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors; C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	diese Arbeit
pRhotHi-2 miniSOG	Km <sup>r</sup> ; <i>minisog</i> unter Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors; C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	diese Arbeit
pRhotHi-2 phiLOV 2.1	Km <sup>r</sup> ; <i>philov 2.1</i> unter Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors; C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	Wingen, unveröffentlicht
pWKR202	pACYC177-Derivat, Gm <sup>r</sup>	W. Klipp, Bochum

## 2.3 Oligonukleotide und Sequenzierungen

### 2.3.1 Verwendete Oligonukleotide

Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendete Startermoleküle (Primer) sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Diese wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

**Tabelle 6: Übersicht der als PCR-Primer verwendeten Oligonukleotide**

Name	Sequenz (5' > 3')	Tm (°C)	Länge (Bp)	Verwendung
DEL_dslov ver up	GATCATCAGGGTCTCGCCGGGATGG AC	71,0	27	Analyse auf positive Insertion der $\Omega$ -Gm <sup>r</sup> - Kassette in das <i>D. shibae</i> Genom
DEL_dslov ver dn	CGACCCGGATCGCCCCGGTGGGT	73,1	23	
DsFbFP M49I mut dn	GCAGGAAACGCGCGTTGCGGCCAG	72,8	25	Substitution des Cys 49 durch Ala in <i>dslov</i> ( <i>m49i</i> ) mittels <i>overlap-extension</i> PCR
DsFbFP M49I mut up	CTGGGCCGCAACGCGGTTTCTGC	72,8	25	
DsLOV + <i>Nde</i> I- up	GAGTCGCATATGCGCAGACA TTATCGCGACCTGAT	71,8	35	Amplifizierung des <i>dslov</i> Anfügen flankierender Schnittstellen für <i>Nde</i> I und <i>Xho</i> I und Entfernen des Translationsstopps
DsLOV + <i>Xho</i> I- Stop-dn	AATAATCTCGAGGACCGGCT TCTGGGCGCCTGCGAAGAA	75,8	39	
DsLOV M49I- mut-dn	ACATAGATAATCGGGTTGTC	53,2	20	Substitution des Met 49 durch Ile in <i>dslov</i> mittels <i>overlap-extension</i> PCR
DsLOV M49I- mut-up	GACAACCCGATTATCTATGT	53,2	20	
DsLOV M49S- mut-dn	ACATAGATGCTCGGGTTGTC	57,3	20	Substitution des Met 49 durch Ser in <i>dslov</i> mittels <i>overlap-extension</i> PCR
DsLOV M49S- mut-up	GACAACCCGAGCATCTATGT	57,3	20	
DsLOV+Ext 5' <i>Sac</i> I	GAGCTCTCGGTCAGGTCCGGATATG	67,9	25	Amplifizierung des <i>dslov</i> mit flankierenden Bereichen zu je ca. 600 Bp
DsLOV+Ext 3' <i>Hind</i> III	AAGCTTGGAAGAGCACCGTGAAGTCTC	64,6	25	
Pp1FbFP <i>Nde</i> I up	CCGATACATATGATCAACGCGC	60,3	22	Amplifizierung des <i>pp1fbfp</i> Anfügen flankierender Schnittstellen für <i>Nde</i> I und <i>Xho</i> I und Entfernen des Translationsstopps
Pp1FbFP <i>Xho</i> I down -St	GTGCTCGAGGGCGGTTCTG	65,5	20	

Pp2FbFP <i>Nde</i> I up	CATATGATCAACGCAAACTCCTGC	61,3	25	Amplifizierung des <i>pp2fbfp</i> Anfügen flankierender Schnittstellen für <i>Nde</i> I und <i>Xho</i> I
Pp2FbFP <i>Xho</i> I dn	CTCGAGTCAGTGCTTGGCCTGGCCCT	71,1	26	
Pp2FbFP L30M mut up	TGAGAGCATCATGATCTACGTCAAC	61,3	25	Substitution des Leu 49 durch Met in <i>pp2fbfp</i> <i>l30m</i> mittels <i>overlap-</i> <i>extension</i> PCR
Pp2FbFP L30M mut dn	GTTGACGTAGATCATGATGCTCTCA	61,3	25	

### 2.3.2 Sequenzierungen

Die für diese Arbeit nötigen Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeit von den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

## 2.4 Nährmedien und Zusätze

Wenn nicht anders angegeben wurden alle Nährmedien und deren Zusätze für 20 Minuten bei 200 kPa und 121°C sterilisiert. Hitzelabile Komponenten wurden dabei separat durch einen Filter mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm steril filtriert und den autoklavierten Medien zugesetzt.

### 2.4.1 Nährmedien

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

LB-Medium (Fertigmischung Carl Roth)	25 g
A. dest.	ad 1000 ml

#### *E. coli* LB-Agar Festmedium

Agar	15 g
LB-Flüssigmedium	ad 1000 ml

#### *E. coli* Autoinduktionsmedium

TB-Medium (Fertigmischung Carl Roth)	50,8 g
Glycerin	4 ml
A. dest.	ad 890 ml

Nach dem Autoklavieren beigegebene Zusätze:

10 %ige Glukose-Lösung	10 ml
2 %ige Laktose-Lösung	100 ml

*D. shibae* MB-Flüssigmedium

Marine-Bouillon	40,1 g
A. dest.	ad 1000 ml

*D. shibae* MB-Agar Festmedium

Select-Agar	20,0 g
MB-Flüssigmedium	ad 1000 ml

#### 2.4.2 Antibiotika und Zusätze zur Selektion

**Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Antibiotika und Selektionszusätze und deren empfohlene Konzentrationsangabe für die jeweilige Anzucht von Bakterienstämmen**

Antibiotikum	Konzentration in <i>E. coli</i> - Medien [µg/ml]	Konzentration in <i>D. shibae</i> Medien [µg/ml]
5-Aminolävulinsäure	50	
Ampicillin (Amp)	100	100
Gentamycin (Gm)	100	100
Kanamycin (Km)	50	

## 2.5 Enzyme

**Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Enzyme**

Enzym	Bezugsquelle
<i>Bam</i> HI	Thermo Scientific (Darmstadt)
Bovine Superoxiddismutase	Sigma (Taufkirchen)
<i>eco</i> RI	Thermo Scientific (Darmstadt)
<i>Hind</i> III	Thermo Scientific (Darmstadt)
<i>Nde</i> I	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Scientific (Darmstadt)
<i>Sac</i> I	Thermo Scientific (Darmstadt)
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen (Darmstadt)
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific (Darmstadt)
<i>Xag</i> I	Thermo Scientific (Darmstadt)
<i>Xho</i> I	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)

## 2.6 Chemikalien

**Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Chemikalien**

Chemikalie	Bezugsquelle
5-Aminolävulinsäure	Sigma
Agar	Carl Roth
Agarose	Carl Roth
Amidoschwarz	Carl Roth
Ampicillin	Gerbu
Borsäure	Carl Roth
Bromphenolblau	Serva
Calciumchlorid	Merck
Coomassie Brilliant Blau	Serva
D-Glukose	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth
Dinatriummethyldiamintetraacetat (Na <sub>2</sub> -EDTA)	Carl Roth
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth

Ethidiumbromid	Sigma
Glycerol	Carl Roth
Imidazol	Carl Roth
Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid (IPTG)	Gerbu
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Kanamycin	Gerbu
LB-Medium	Carl Roth
Magermilchpulver	Carl Roth
Magnesiumchlorid	Carl Roth
Magnesiumsulfat	Carl Roth
Manganchlorid	Merck
Marine-Boullion	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumhydroxid	Carl Roth
NuPAGE SDS Running Buffer	Invitrogen
NuPAGE Transfer Buffer	Invitrogen
Phosphorsäure	Carl Roth
Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat (Tween 20)	Carl Roth
Rubidiumchlorid	Sigma
Salzsäure	Carl Roth
Select-Agar	Gibco
Terrific-Broth-Medium	Carl Roth
Trishyroxymethylaminomethan (Tris)	Carl Roth

Alle aufgeführten Chemikalien wurden in für molekularbiologische Arbeiten ausreichender Reinheit von der angegeben Quellen bezogen. Nicht aufgelistete, allgemeine Verbrauchsmaterialien wurden in entsprechender Reinheit von den Firmen Carl Roth, Merck, Fluka oder Sigma bezogen.

## 2.7 Antiseren

**Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Antiseren**

Antiserum	Bezugsquelle
Monoklonaler Maus-Anti-Penta-Histidin	Life Technologies (Darmstadt)
Anti-His(C-term)-HRP Antibody	Life Technologies (Darmstadt)
Ziege-Anti-Kaninchen-HRP-Konjugat	Bio-Rad (München)

## 2.8 Puffer und Lösungen

### 2.8.1 Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

#### TBE-Puffer

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
Na <sub>2</sub> -EDTA	2,5 mM

#### 5-fach DNA-Probenpuffer

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

#### DNA-Molekulargewichtsstandart "GeneRuler 1kb DNA Ladder" (Thermo Scientific)

Zur Größenbestimmung der im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente wurde die "GeneRuler 1kb DNA Ladder" der Firma Thermo Scientific (Darmstadt) als Standard eingesetzt. Zur besseren Orientierung heben sich die Banden bei 1.000, 3.000 sowie 6.000 Bp durch eine höhere Konzentration von den übrigen ab.

### 2.8.2 Puffer und Lösungen zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

#### Magnesium-Mix

MgCl <sub>2</sub>	500 mM
MgSO <sub>4</sub>	500 mM

Transformationspuffer (TMF)

CaCl <sub>2</sub>	100 mM
RbCl <sub>2</sub>	50 mM
MnCl <sub>2</sub>	40 mM

**2.8.3 Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**NuPAGE SDS Laufpuffer

20-fach NuPAGE SDS Running Buffer	50 ml
A. dest.	ad 1000 ml

SDS-Probenpuffer

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

Protein-Größenstandard "PageRuler Prestained Protein Ladder" (Thermo Scientific)

Zur Größenbestimmung der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurde die "PageRuler Prestained Protein Ladder" der Firma Thermo Scientific (Darmstadt) als Standard eingesetzt. Zur besseren Orientierung ist die 70 kDa Bande rot, die 10 kDa Band grün eingefärbt.

Coomassie-Blau-Färbelösung

Ethanol	25 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blau	0,2 % (w/v)

Entfärber-Lösung

Ethanol	20 % (v/v)
Essigsäure	7 % (v/v)

## 2.8.4 Puffer und Lösungen für das Immunoblotting (Western Blot)

### NuPAGE Transferpuffer

20-fach NuPAGE Transfer Buffer	50 ml
A. dest.	ad 1000 ml

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

Tris	25 mM
NaCl	150 mM
KCl	3 mM

### TBST-Puffer

Tween 20	0,2 % (v/v)
20-fach TBS-Puffer (pH 8,0)	50 ml
A. dest.	ad 1000 ml

### Färbelösung für die PVDF-Membran

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

## 2.8.5 Puffer und Lösungen für die Proteinreinigung mittels eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule

### Lysepuffer (pH 8,0)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM

### Waschpuffer (pH 8,0)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM

### Elutionspuffer (pH 8,0)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM

Proteinlagerpuffer (pH 8,0)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
NaCl	300 mM

**2.8.6 Puffer und Lösungen für *in vivo* Fluoreszenzmessungen**Tris-Puffer (pH 8,0)

Tris	100 mM
A. dest.	ad 250 ml

**2.8.7 Puffer und Lösungen für *in vivo* Viabilitätsassays**PBS-Puffer (pH 7,4)

NaCl	8,01 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,78 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,27 g
A. dest.	ad 1000 ml

**2.8.8 Puffer und Lösungen für die Proteinkonzentrationsbestimmung**Bradford-Reagenz

Coomassie-Brillant-Blau G-250	100 mg
Methanol	50 ml
Phosphorsäure 85 % (v/v)	100 ml
A. dest.	ad 1000 ml

**2.8.9 Puffer und Lösungen für die pH-Sensitivitätsmessungen von Fluoreszenzproteinen**Universalpuffer (pH 2 bis 12) (Östling & Virtama, 1946)

Natriumhydroxid (1M)	100 ml
Zitronensäure (1M)	100 ml
Phosphorsäure (1M)	100 ml
Borsäure	3,54 g
A. dest.	ad 1000 ml

## 2.9 Reaktions- und Nachweis-"Kits"

**Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Reaktions- und Nachweiskits**

Bezeichnung	Bezugsquelle
Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit	Molecular Probes (Darmstadt)
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen (Hilden)
ECL Western Blotting Detection System	GE Healthcare (Solingen)
High-Capacity RNA-to-cDNA Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
innuPREP DOUBLEpure Kit	Analytik Jena (Jena)
innuPREP Plasmid Mini Kit	Analytik Jena (Jena)
RNase-Free DNase	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Turbo DNA-free Kit	Ambion (Darmstadt)

## 2.10 Sonstige Materialien und Geräte

**Tabelle 12: Übersicht sonstiger verwendeter Materialien und Geräte**

Bezeichnung	Hersteller
Agarosegel Fotodokumentation Eagle Eye II	Stratagene (Santa Clara, USA)
Blaulichtapparatur Vilber Lourmat CN-6	Vilber Lourmat GmbH (Eberhardzell)
Blaulicht-LED LUXEON Rebel LXML PR01 0425	Philips Lumileds (Aachen)
Brutroller (Eigenbau)	Ruhr-Universität Bochum
ep gradient S realplex4	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Fluoreszenzmikroskop AxioPlan 2	Zeiss (Jena)
Fluoreszenzspektrometer Cary Eclipse	Varian Medical Systems (Darmstadt)
GenePix 4000B Laser Scanner	Molecular Devices (Darmstadt)
Hybridisierungs-ofen	Agilent (Santa Clara, USA)
Leuchtdioden Platinen (Blaulicht $\lambda$ 462 nm; Infrarotlicht $\lambda$ 855 nm)	Insta Elektro GmbH (Lüdenscheid)
Mehrstellenmagnetrührer Ro5	IKA-Werke (Staufen)
Mikrotiterplatten-Leser Infinite M1000 Pro	Tecan (Crailsheim)
NanoDrop 2000c	Thermo Scientific (Darmstadt)
Novex SDS und Blotapparatur	Invitrogen (Darmstadt)
Orbitalschüttler VKS-75 control	Edmund Bühler (Hechingen)
PCR-Cycler T-Professional Basic Gradient	Biometra (Göttingen)
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG (Berlin)
Rundschüttler KS260 Basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
SDS-PAGE und Immunoblotting-Detektion Fotodokumentation Stella	Raytest (Straubenhardt)
Temperierbare Inkubationshauben TH30	Edmund Bühler (Hechingen)
Tischzentrifuge 2524	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin (Berlin)
Ultraschallgerät Sonopuls HD2070	Bandelin (Berlin)

## 2.11 Mikrobiologische Methoden

### 2.11.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* Stämmen (2.1.1) erfolgte, sofern nicht anders beschrieben, auf LB-Agarplatten oder in LB-Flüssigmedium (2.4.1) bei 37 °C. Zur Stabilisierung und Selektion von mit Plasmid-DNA transformierten Stämmen wurde das entsprechende Antibiotikum (2.4.2) zugegeben. Übernachtkulturen (ÜK) wurden für mindestens 16 Stunden inkubiert. Kulturvolumen von bis zu 5 ml wurden in Reagenzgläsern angesetzt und auf Brutrollern inkubiert. Größere Anzuchten wurden in entsprechenden Erlenmeyerkolben mit einem Kulturvolumina von maximal 1/5 des Gefäßvolumens angesetzt und auf Inkubationsschüttlern bei 130 UpM inkubiert. Alle Gefäße für die Flüssigkulturen wurden vorher für mindestens acht Stunden bei 180 °C sterilisiert.

Vorkulturen (VK) wurden mittels Zugabe einer Einzelkolonie von einer Stamm- bzw. Transformationsplatte oder mit 1/500 Volumen aus Gefrierkulturen beimpft. Hauptkulturen (HK) wurden aus entsprechenden VK auf eine Zelldichte entsprechend einer optischen Dichte bei 580 nm ( $OD_{580}$ ) von 0,05 eingestellt.

### 2.11.2 Induzierte Genexpression bei Verwendung des T7-Expressionssystems in *Escherichia coli* BL21(DE3)

Der T7-Promotor des T7-Bakteriophagen besitzt eine sehr hohe Aktivität, weshalb Gene, die unter seiner Kontrolle stehen, sehr häufig transkribiert werden, wodurch eine große Menge an mRNA und folglich auch an Protein gebildet wird (Studier & Moffatt, 1986). Allerdings wird dieser Promotor ausschließlich von der T7-RNA-Polymerase erkannt, die wildtypisch nicht in *E. coli* Stämmen vorkommt. Einige Expressionsstämme, wie z. B. der *E. coli* Stamm BL21(DE3) (2.1.1), tragen das Gen der T7-RNA-Polymerase im Genom integriert und sind somit in der Lage, diese Polymerase zu bilden. Bei diesem Stamm liegt die Transkription des Polymerase-Gens unter Kontrolle des *lac*-Operons, welches wiederum durch den *lac*-Repressor kontrolliert bzw. reprimiert wird. Der Repressor wird durch dessen Bindung mit Laktose bzw. dem nicht verstoffwechselbaren Ersatzstoff IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) inaktiviert, wodurch es zur Produktion der T7-Polymerase und damit auch zur Expression der unter  $P_{T7}$ -Kontrolle stehenden Gene kommt. Die Aufnahme von Laktose in die Zelle wird durch Glukose gehemmt, wodurch der *lac*-Repressor aktiv bleibt. Autoinduktionsmedium enthält neben Laktose auch Glukose als Kohlenstoffquelle, welche vor der Laktose von der exponentiell wachsenden Zellkultur verstoffwechselt wird. Erst wenn die "günstigere" Kohlenstoffquelle Glukose verbraucht ist, wird Laktose in die Zellen aufgenommen, woraufhin der *lac*-Repressor inaktiviert wird und die Transkription der T7-Promotor kontrollierten Gene beginnt.

Für die  $P_{T7}$ -abhängige Expression von Zielgenen in *E. coli* wurden chemisch kompetente BL21(DE3) Zellen mit dem entsprechenden Expressionsplasmid (2.2) transformiert. Am Vortag der Expression wurde eine VK durch Zugabe eines transformierten Klons angesetzt und diese über Nacht unter Selektionsdruck inkubiert. Aus dieser wurde die Expressionskultur auf eine  $oD_{580}$  von 0,05 eingestellt und ebenfalls unter Selektionsdruck bei 37 °C inkubiert. Bei Verwendung von LB-Medium (2.4.1) wurde die Expression des Zielgens durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,4 mM während der exponentiellen Wachstumsphase ( $oD_{580}$  von ungefähr 0,7) induziert. Bei der Verwendung von Autoinduktionsmedium (2.4.1) wird die Expression des Zielgens automatisch durch den Verbrauch der im Medium vorhandenen Glukose induziert. Die Ernte der Kulturen erfolgte nach einer Expressionsdauer von 4 oder 16 Stunden durch Zentrifugation.

### **2.11.3 Anzucht von *Dinoroseobacter shibae***

*D. shibae* Stämme (2.1.2) wurden auf MB-Agarplatten oder MB-Flüssigmedium (2.4.1) bei 33 °C für mindestens 48 Stunden angezogen. Flüssigkulturen wurden in entsprechenden Erlenmeyerkolben mit einem Maximalvolumen von 1/10 des Gefäßvolumens angesetzt und auf Rundschüttlern bei 200 UpM inkubiert.

### **2.11.4 Bestimmung der Zelldichte von Bakterien-Flüssigkulturen durch photometrische Trübungsmessung**

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde durch Trübungsmessung mit Hilfe eines Spektralphotometers (2.10) bei einer Wellenlänge von 580 nm (*E. coli*) bzw. 660 nm (*D. shibae*) bestimmt. Eine optische Dichte von 1 bei 580 nm entspricht bei *E. coli* Zellkulturen einer Zellzahl von ungefähr  $5 \times 10^8$  Zellen pro ml. Für *D. shibae* ist dieser Wert noch nicht bestimmt und daher unbekannt.

### **2.11.5 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA (Hanahan, 1983)**

#### **2.11.5.1 Herstellung chemisch-transformationskompetenter *E. coli* Zellen**

Eine *E. coli* LB-Flüssigkultur wurde aus einer über Nacht VK auf eine  $oD_{580}$  von 0,05 beimpft, mit 0,04 Volumen Magnesium-Mix versetzt und anschließend bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ( $oD_{580}$  0,5 bis 0,7) inkubiert (130 UpM, 37 °C). Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 Min., 5.000 UpM, 4 °C) pelletiert und anschließend in 1/5 des Ursprungsvolumens TMF-Puffer (2.8.2) resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation der Zellsuspension auf Eis wurde diese erneut zentrifugiert (10 Min., 5.000 UpM, 4 °C) und das Pellet in 1/10 Volumen TMF-Puffer mit 20 %

Glycerol (v/v) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl in EPG aliquotiert und diese bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **2.11.5.2 Hitzeschock-Transformation von *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA**

Zur Transformation von *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA wurden chemisch-transformationskompetente Zellen (2.11.5.1) auf Eis aufgetaut, mit 10 µl eines Ligationsansatzes (2.13.7) bzw. 2 µl gereinigter Plasmid-DNA (2.13.1) vermischt, mindestens für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 90 Sekunden einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen. Nach Zugabe von 700 µl LB-Flüssigmedium (2.4.1) erfolgte die phänische Expression bei 37 °C auf einem Inkubationsroller, wobei die Dauer der Inkubation von der Art der plasmidkodierten Antibiotikaresistenz abhing, die zwischen 1,5 und 3 Stunden betrug. Transformationsansätzen mit isolierter Plasmid-DNA wurden 100 µl entnommen und auf selektiven LB-Festmediumplatten (2.4.1) ausplattiert. Ligations-Transformationsansätze wurden nach der phänischen Expression zentrifugiert (1 Min., 13.000 UpM, TZ), das Pellet in 100 µl LB-Flüssigmedium aufgenommen und ebenfalls auf LB-Festmediumplatten ausgestrichen.

#### **2.11.5.3 Konjugativer Gentransfer mobilisierbarer Plasmide von *E. coli* nach *D. shibae* (Elhai & Wolk, 1988)**

*D. shibae* ist nicht chemisch-transformierbar (Piekarski *et al.*, 2009), weshalb Plasmide aus geeigneten *E. coli* Stämmen mittels biparentaler Konjugation eingebracht werden müssen. Der Transfer von rekombinanten Plasmiden erfolgte durch Konjugation (Filterkreuzung) mit dem *E. coli* Stamm ST18 (2.1.1). Wie der Stamm S17-1 trägt dieser Stamm die für die Transferfunktion wichtigen *tra*-Gene im Chromosom lokalisiert, besitzt jedoch zusätzlich eine Deletion des *hemaA* Gens, wodurch eine Selektion ermöglicht wird (Thoma & Schobert, 2009).

Für die Kreuzung wurde der Rezipient (*D. shibae*) von einer frischen Stammplatte in 5 ml Marine-Bouillon Flüssigmedium (2.4.1) überführt und resuspendiert. Der transformierte Donorstamm *E. coli* ST18 wurde selektiv auf LB-Festmedium (2.4.1) mit 50 µg pro ml 5-Aminolävulinsäure (Ala) (2.4.2) angezogen. Von dieser Donorstamm-Platte wurden 6-8 Kolonien gepickt und in 1 ml 1/2 MB-Flüssigmedium + 50 µg pro ml Ala resuspendiert. 1 ml der Rezipientenkultur wurde mit 0,5 ml der Donorkultur vorsichtig gemischt und anschließend in einem EPG durch Zentrifugation (5 Min., 10.000 x g, RT, TZ) sedimentiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 1/2 MB + Ala (50 µg/ml) resuspendiert und auf einen Nitrozellulosefilter (Schleicher und Schüll, OE 66, Porendurchmesser 0,2 µm) bei 30 °C über Nacht auf 1/2 MB-Festmedium + Ala (50 µg/ml) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Filter in 2 ml EPG überführt und 1 ml MB-Flüssigmedium zugegeben. Durch vortexen wurde die

Konjugation beendet und die Bakterien vom Filter gewaschen, die im Anschluss daran durch Zentrifugation (5 Min., 10.000 x g, RT, TZ) pelletiert wurden. Das Zellpellet wurde in 100 µl MB-Flüssigmedium resuspendiert, die Zellsuspension auf MB-Selektivagarplatten ausplattiert und diese bei 30 °C für mindestens 48 Stunden inkubiert.

#### **2.11.6 Wachstumsanalyse Fluoreszenzprotein-exprimierender *E. coli* - Kulturen**

Zur Untersuchung auf eventuelle Einflüsse, ausgelöst durch die intrazelluläre Biosynthese von Fluoreszenzproteinen bei gleichzeitiger Bestrahlung mit Blaulicht ( $\lambda$  462 nm), auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* -Kulturen, wurden transformationskompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen (2.1.1) mit entsprechenden pRhokHi-2 Expressionsvektoren (2.2) transformiert. Bei diesen Vektoren befindet sich das zu exprimierende Gen unter Kontrolle des *aphII*-Promotors, der eine konstitutive Expression des Zielgens bewirkt. Ausgehend von jeweils einem transformierten Klon wurden über Nacht Vorkulturen in 5 ml LB-Km-Flüssigmedium (2.4.1) angesetzt. Am Versuchstag wurden 50 ml LB-Km-Hauptkulturen (250 ml Erlenmeyerkolben mit einem Magnetrührfisch) durch Transfer von Zellmaterial aus den Vorkulturen auf eine  $oD_{580}$  von 0,05 inokuliert und auf Mehrstellenmagnetrührer (Geräteeinstellung Stufe 3) bei 37 °C in temperierbaren Inkubationshauben (2.10) bebrütet. Dabei wurden die Kolben mit Hilfe von LED-Platinen (2.10) beidseitig mit Blaulicht ( $\lambda$  462 nm) bestrahlt. Diese LED-Platinen besaßen bei dieser Wellenlänge in einem Abstand von 10 cm eine Strahlungsintensität von 100 mW cm<sup>-2</sup> (Bergmann, 2011). Für die Belichtung der Kulturen wurden zwei dieser Paneele in Abstand von 15 cm zueinander ausgerichtet und die AnzuchtKolben in deren Mitte platziert. Zur Kontrolle wurde parallel eine gleiche Kultur in Dunkelheit bebrütet. Über einen Zeitraum von 6 Stunden wurden den Kulturen Proben in bestimmten Intervallen entnommen und deren Zelldichte durch photometrische Trübungsmessung (2.11.4) bestimmt. Zur statistischen Absicherung der Experimentaldaten wurden die Messungen in mindestens 3 voneinander unabhängigen Versuchen mit biologischen Replikaten durchgeführt.

#### **2.11.7 Herstellung von *E. coli* Zellproben für die DNA-Microarray Analyse**

Zur Analyse, ob die Bestrahlung mit Blaulicht ( $\lambda$  462 nm) einen Einfluss auf das Expressionsmuster von Fluoreszenzprotein-exprimierenden *E. coli* Zellen besitzt, wurden transformationskompetente Zellen (2.11.5.1) mit den entsprechenden Expressionsvektoren (pET28a) (2.2) transformiert und ausgehend von jeweils einem Klon über Nacht Vorkulturen in LB-Flüssigmedium unter Selektionsdruck (Km) bei 37 °C und Rotation angezogen. Am Versuchstag wurden aus den Vorkulturen Hauptkulturen in 25 ml LB-Flüssigmedium (2.4.1) mit Km (2.4.2) auf eine  $oD_{580}$  von 0,05 angeimpft und diese bis zur Induzierung der Genexpression durch Zugabe von 0,4 mM IPTG 3

Stunden inkubiert (130 UpM, 37 °C). Die Expressionsdauer betrug 3 Stunden (130 UpM, 37 °C) wonach die Expressionskulturen auf zwei neue 25 ml LB-Km-Flüssigkulturen mit einer  $OD_{580}$  von 0,5 aufgeteilt, und auf Mehrstellenmagnetrührern (Geräteeinstellung Stufe 3) bei 37 °C in temperierbaren Inkubationshauben (2.10) bebrütet wurden. Dabei wurde einer der Kolben mit Hilfe von LED-Platinen (2.10) beidseitig mit Blaulicht ( $\lambda$  462 nm, 100 mW cm<sup>-2</sup> in einem Messabstand von 10 cm) bestrahlt, der andere diente zur Kontrolle und wurde parallel in Dunkelheit bebrütet. Für die gleichmäßige Bestrahlung der Anzuchtgefäße wurden LED-Platinen der Firma Insta eingesetzt, die aus jeweils 120 blauen LEDs (NSSb100BT, Nichia, Japan) bestanden. Die Platinen wurden in einem definierten Abstand von 15 cm aufgestellt, wobei die Zellkulturen in deren Mitte platziert wurden. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden den *E. coli* Flüssigkulturen eine Zellmenge entsprechend einer  $OD_{580}$  von 3 entnommen, direkt durch Zentrifugation sedimentiert (1 Min., 13.000 UpM, 4 °C, TZ) und nach Entfernung des Überstands in Flüssigstickstoff schockgefroren. Bis zur Präparation der RNA aus den gewonnenen Pellets (2.12.1) wurden diese bei -80 °C gelagert.

#### **2.11.8 Tropftest zur Toxizitätsbestimmung von Fluoreszenzproteinen in *E. coli***

Zur schnellen und einfachen Analyse auf toxische Effekte von verschiedenen Fluoreszenzproteinen wurden diese in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Dazu wurden transformationskompetente Zellen (2.11.5.1) mit den entsprechenden Expressionsvektoren (pET28a) (2.2) transformiert und ausgehend von jeweils einem Klon über Nacht Vorkulturen in LB-Flüssigmedium (2.4.1) unter Selektionsdruck (Km) bei 37 °C und Rotation angezogen. Am Versuchstag wurden aus den Vorkulturen Hauptkulturen in 10 ml LB-Flüssigmedium mit Km auf eine  $OD_{580}$  von 0,05 angeimpft und diese bis zur Induzierung der Genexpression durch Zugabe von 0,4 mM IPTG 3 Stunden inkubiert (130 UpM, 37 °C). Die Expressionsdauer betrug wiederum 3 Stunden (130 UpM, 37 °C), wonach den Expressionskulturen eine Zellmenge entsprechend einer  $OD_{580}$  von 0,01 entnommen und in 1 ml PBS-Puffer (2.8.7) überführt wurde. Die Zellsuspension wurde in eine Halbmikroküvette überführt, die direkt auf eine Blaulicht-LED ( $\lambda$  440 nm, 180 mW cm<sup>-2</sup>) platziert wurde. Nach Starten der Beleuchtung der Zellsuspension wurde in bestimmten Zeitintervallen während einer Versuchsdauer von 5 Minuten den Zellsuspensionen 3  $\mu$ l entnommen und auf eine LB-Festmediumplatte (2.4.1) getropft. Die Festmediumplatten wurden bis zu ihrer fotografischen Dokumentation über Nacht bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Zur statistischen Absicherung der Experimentaldaten wurden die Messungen in mindestens 3 voneinander unabhängigen Versuchen mit biologischen Replikaten durchgeführt.

### **2.11.9 Bestimmung der Lebendzellzahl von *E. coli* - Kulturen**

Zur Quantifizierung von lebenden *E. coli* Zellen in Zellkulturen wurde die Methode der Zählung von "colony forming units" (CFU) genutzt. Dazu wurden transformationskompetente *E. coli* BL21(DE3) Zellen (2.11.5.1) mit den entsprechenden Expressionsvektoren (pET28a) (2.2) transformiert (2.11.5.2) und ausgehend von jeweils einem Klon über Nacht Vorkulturen in LB-Flüssigmedium (2.4.1) unter Selektionsdruck (Km) bei 37 °C und Rotation angezogen. Am Versuchstag wurden aus den Vorkulturen Hauptkulturen in 10 ml LB-Flüssigmedium mit Km auf eine  $OD_{580}$  von 0,05 angeimpft und diese bis zur Induzierung der Genexpression durch Zugabe von 0,4 mM IPTG 3 Stunden inkubiert (130 UpM, 37 °C). Die Expressionsdauer betrug wiederum 3 Stunden (130 UpM, 37 °C), wonach den Expressionskulturen eine Zellmenge entsprechend einer  $OD_{580}$  von 0,01 entnommen und in 1 ml PBS-Puffer (2.8.7) überführt wurde. Die Zellsuspension wurde in eine Halbmikroküvette pipettiert, die direkt auf eine Blaulicht-LED ( $\lambda$  440 nm, 180 mW cm<sup>-2</sup>) platziert wurde. Nach Starten der Beleuchtung der Zellsuspension wurde in bestimmten Zeitintervallen während einer Versuchsdauer von 30 Sekunden den Zellsuspensionen 100  $\mu$ l entnommen, die in drei seriellen Schritten im Verhältnis 1/10 in LB-Flüssigmedium verdünnt und anschließend auf LB-Festmedienplatten ausplattiert wurden. Bis zur Bestimmung der Anzahl an Kolonien, die jeweils auf eine lebende Zelle zurückzuführen sind, wurden die Platten über Nacht bei 37 °C im Dunkeln bebrütet. Für die Auszählung der Lebendzellzahlen wurden nur Platten mit einer maximalen Anzahl von 200 Kolonien berücksichtigt. Zur statistischen Absicherung der Experimentaldaten wurden die Messungen in drei voneinander unabhängigen Versuchen mit biologischen Replikaten durchgeführt.

### **2.11.10 Anzucht und Transfektion von Säugerzelllinien**

Studien an Säugerzelllinien wurden im Rahmen eines Kooperationsprojekts in den Labors der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marcel Dihné vom Hertie-Institut für klinische Hirnforschung in Tübingen durchgeführt. Die Kultivierung und Transfektion von humanen embryonalen Nieren- (HEK) und murinen hippokampalen Tumorzelllinien (HT22) erfolgte nach der Beschreibung von Walter *et al.* (Walter *et al.*, 2012).

### **2.11.11 Analyse der phototoxischen Wirkung von FbFPs auf Säugerzellen**

Zur Analyse der durch die Bestrahlung mit Blaulicht induzierten Toxizität der FbFPs in Säugerzellen wurden murine Tumorzellen (HT22) mit Plasmiden von Typ pcDNA 3.1 transfiziert, die die Expression der FbFPs unter Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors ermöglichen. Nach erfolgter Transfektion wurden jeweils 150.000 bis 200.000 Zellen in 6-Well-Platten überführt, mit HBSS-Puffer gewaschen und wiederum in 1 ml HBSS-Puffer aufgenommen. Die Belichtung der Zellen erfolgte von

oben durch direkte Auflage einer Blaulicht-LED ( $\lambda = 440 \text{ nm}$ ,  $180 \text{ mW cm}^{-2}$ ) auf den Plattendeckel für 15 Min. Vor und nach der Belichtung wurden Zellen mit Hilfe des inversen Mikroskops IX51 der Firma Olympus abgebildet (Walter *et al.*, 2012). Fluoreszenzaufnahmen erfolgten unter Einsatz von Fluoreszenzfiltern. Für die Detektion der FbFP-vermittelten Fluoreszenz wurde ein Filterset mit einem Anregungsbereich von 460 bis 490 nm und Emissionsbereich von 510 bis 550 nm (Olympus, Hamburg), für die FbFP-vermittelte Fluoreszenz wurde ein Filterpaar mit einem Anregungsbereich von 450-500 nm und einem Emissionsbereich von 510 bis 560 nm (Chroma, Bellows Falls, USA) genutzt.

## 2.12 RNA-Techniken

### 2.12.1 Standard Präparation von bakterieller Gesamt-RNA

Zur Isolation bakterieller Gesamt-RNA wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen (2.9) nach Herstellerangaben (RNeasy Mini Handbuch 04/2002) verwendet. Zusätzlich wurde während der Isolation ein DNase Verdau mit dem "RNase-Free DNase-Set" der Firma Qiagen (2.9) durchgeführt. Die isolierte RNA wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung bei  $-80 \text{ °C}$  gelagert.

### 2.12.2 Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch mit einem NanoDrop 2000c der Firma Thermo Scientific (2.10) nach Herstellerangaben bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Verunreinigungen konnten über das Verhältnis der Absorptionen bei  $\lambda = 260 \text{ nm} / 280 \text{ nm}$  (Proteinverunreinigung) und  $\lambda = 260 \text{ nm} / 230 \text{ nm}$  (Lösemittelverunreinigung) kontrolliert werden.

### 2.12.3 Reverse Transkription von RNA in cDNA mit gleichzeitiger Fluoreszenzmarkierung

Für den Vergleich von genomweiten Genexpressionsmustern wurden äquivalente Mengen fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden der zu vergleichenden RNA-Proben synthetisiert (Wendisch *et al.*, 2001). Die cDNA-Synthese wurde mit der "Superscript II Reversen Transkriptase" der Firma Invitrogen (2.5) durch Umschreibung präparierter RNA vorgenommen. Für die Markierung der cDNA wurden Cyaninfluoreszenzfarbstoff- (Cy3;  $\lambda_{\text{Ex max}} = 550 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em max}} = 570 \text{ nm}$  und Cy5;  $\lambda_{\text{Ex max}} = 649 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em max}} = 670 \text{ nm}$ ) gekoppelte dUTP-Analoga der Firma GE Healthcare verwendet, wobei die zu vergleichenden Proben mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert wurden. Die Reaktionsansätze wurden auf Eis pipettiert und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die reverse Transkription erfolgte bei  $42 \text{ °C}$  für 110 Minuten und wurde im Anschluss daran durch die

Zugabe von 10 µl einer 0,1 M Natronlauge und 10 minütiger Inkubation bei 70 °C gestoppt sowie die RNA hydrolysiert. Darauf folgte die Neutralisation des Reaktionsansatzes durch Zugabe von 10 µl einer 0,1 M Salzsäure.

#### cDNA Reaktionsansatz

Matrizen-RNA	12,5 µl (20 - 25 µg)
Zufalls-Hexamer-Primer	2,5 µl
Cy3- oder Cy5-dUTP's	3 µl
dNTP-Mix	0,6 µl
DTT (0,1 M)	3 µl
FirstStrand Buffer (5-fach)	6 µl
Superscript II Reverse Transkriptase	2 µl

#### dNTP-Mix

dATP	2 µl (25 mM)
dCTP	2 µl (25 mM)
dGTP	2 µl (25 mM)
dTTP	0,8 µl (10 mM)
H <sub>2</sub> O	1,2 µl

Im Anschluss an die cDNA-Synthese und die Markierungsreaktion wurden die Reaktionsansätze mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 500 µl verdünnt und in Zentrifugationsfilter "Amicon Ultra - 0,5 ml 30K" der Firma Milipore überführt. Durch zwei Zentrifugationsschritte (10 Min., 13.000 UpM, TZ, RT) und dazwischenliegenden Auffüllen mit Nuklease-freiem Wasser wurden die Sonden gewaschen und durch Größenausschuss eingengt, bevor diese vereinigt wurden. Die vereinigten Sonden wurden erneut zweimal mit Nuklease-freiem Wasser gewaschen und mit Hilfe der Zentrifugationsfilter konzentriert. Die so erhaltenen Cy3- und Cy5-markierten cDNA-Sonden wurden sofort in Hybridisierungsexperimente (2.13.10) eingesetzt.

## 2.13 DNA-Techniken

### 2.13.1 Präparation von Plasmid-DNA

Kleinere Mengen an Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des "innuPREP Plasmid Mini Kit" der Firma Analytik Jena (2.9) nach Herstellerangaben unter Verwendung der vom Hersteller mitgelieferten Puffer isoliert. Isolierte Plasmid-DNA wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.13.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte in Agarosegelen (2.13.5) anhand der entsprechenden Banden des Molekulargewichtsstandards ("GeneRuler 1kb DNA Ladder", Thermo Scientific). Alle Banden des Molekulargewichtsstandards enthielten eine definierte Menge an DNA, anhand derer die DNA-Konzentration der Probe abgeschätzt wurde.

Alternativ wurde die DNA-Konzentration photometrisch mit Hilfe des "NanoDrop 2000c" der Firma Thermo Scientific (2.10) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Verunreinigungen konnten über das Verhältnis der Absorptionen bei  $\lambda$  260 / 280 (Proteinverunreinigung) und  $\lambda$  260 / 230 (Lösemittelverunreinigung) kontrolliert werden.

### 2.13.3 Präparation von gesamt - DNA aus *Dinoroseobacter shibae*

Gesamt - DNA aus *D. shibae* wurde mit Hilfe des "DNeasy Blood & Tissue Kit" der Firma Qiagen (2.9) nach Herstellerangaben und unter Verwendung der vom Hersteller mitgelieferten Puffer und Lösungen isoliert. Die isolierte genomische DNA wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.13.4 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Smith & Birnstiel, 1976)

Die hydrolytische Spaltung von Plasmid-DNA erfolgte unter Einsatz von Restriktionsendonukleasen vom Typ II (2.5). Diese Enzyme binden an eine spezifische Nukleotidsequenz der DNA und spalten diese innerhalb dieser Erkennungssequenz. Für den enzymatischen Verdau der DNA wurden die vom Hersteller empfohlenen Bedingungen mit den jeweiligen optimalen Reaktionspuffern gewählt. Pro  $\mu$ g DNA wurden 5 bis 10 U der jeweiligen Restriktionsendonukleasen verwendet und die Reaktionsansätze für 1 - 2 Stunden bei den optimalen Temperaturbedingungen inkubiert. Die Reaktionen wurden durch thermische Inaktivierung nach Herstellerangaben beendet.

### **2.13.5 Agarosegelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989)**

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren zum Auftrennen von elektrisch geladenen Molekülen im elektrischen Feld. Nukleinsäuren besitzen aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats ein konstantes Masse-zu-Ladungsverhältnis und wandern durch ihre negative Ladung im elektrischen Feld zur Anode. Dabei hängt die Geschwindigkeit, in der sich die Nukleinsäuren durch das Gel bewegen, von der angelegten Spannung, der Konzentration des Agarosegels, der Konformation der DNA-Fragmente und deren Molekulargewicht ab. Sind die Konzentration des Gels und die angelegte Spannung gleich, trennen sich die DNA-Fragmente aufgrund ihres Molekulargewichtes bzw. ihrer Größe auf. Dadurch ist die Agarosegelelektrophorese ein probates Mittel zur Analyse von PCR-Produkten und Restriktionsverdauen, zur Isolierung von DNA-Fragmenten sowie zur Konzentrationsbestimmung von DNA. Für diese Analysen wurden Agarosegele mit einer Agarosekonzentration von 1 % in 0,5-fachen TBE-Puffer genutzt (2.8.1). Zum Nachweis der DNA in der Gelmatrix wurden pro ml der aufgekochten Agaroselösung 0,1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) zugesetzt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die helikale Struktur der DNA-Doppelhelix einlagert und so die Detektion der DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda$  254 - 366 nm) ermöglicht.

Den Proben wurde vor dem Auftragen auf das Agarosegel 1/5 Volumen DNA-Probenpuffer zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelkammern in 0,5-fachen TBE-Puffer (Laufpuffer) bei einer Spannung von bis zu 11 V pro cm Elektrodenabstand.

Die Dokumentation der mit UV-Licht bestrahlten Gele wurde mit Hilfe der Videodokumentationsanlage "Eagle Eye II" der Firma Stratagene (2.10) durchgeführt.

### **2.13.6 Elution von DNA aus Agarosegelen (Vogelstein & Gillespie, 1979)**

Die Elution von im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmenten nach Verdau mit Restriktionsendonukleasen oder zur Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem "innoPREP DOUBLEpure Kit" der Firma Analytik Jena. Dabei wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer und Lösungen nach Herstellerangaben verwendet.

### **2.13.7 Ligation von DNA-Fragmenten (Dugaiczky *et al.*, 1975)**

Für die Verknüpfung von DNA-Fragmenten, wie es z. B. bei der Klonierung eines Gens in einen Vektor geschieht, wurden beide DNA-Fragmente durch Restriktionsendonukleasen (2.5) kompatibel hydrolytisch gespalten, gereinigt und anschließend in einem 20 µl Reaktionsansatz durch die T4-DNA-Ligase (2.5) verknüpft. Das molare Verhältnis zwischen Insert- und Vektor-DNA betrug dabei

mindesten 3:1. Der Ligationsansatz wurde 1 Stunde bei 22 °C inkubiert und anschließend thermisch bei 65 °C für 10 Minuten inaktiviert.

### 2.13.8 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. Für die erfolgreiche Amplifikation des gewünschten spezifischen DNA-Fragments wird eine thermostabile DNA-Polymerase, geringe Mengen Ausgangsmaterial (DNA-Matrize), zwei Oligonukleotidprimer die größtenteils komplementär zu den Enden der zu amplifizierenden Sequenz sind, sowie Reaktionspuffer und ein Nukleotidmix (dNTP) im Reaktionsansatz benötigt. Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion beruht auf einer sich wiederholenden Abfolge von drei Schritten: Zuerst wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen denaturiert, also in ihre Einzelstränge gespalten. Im zweiten Schritt erfolgt die Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die komplementäre Sequenz woraufhin im dritten Reaktionsschritt die Elongation ausgehend der Primer-Moleküle in 5' nach 3' Richtung geschieht. Die Hybridisierung erfolgt an beiden Matrizensträngen gleichzeitig wodurch sich die Menge an DNA in einem Reaktionsdurchlauf verdoppelt, so dass nach 30 - 40 Reaktionen eine ausreichende Menge des gewünschten DNA-Fragments gebildet wird. Zur Amplifizierung wurde entweder die Pfu (hauseigene Produktion)- oder die "Phusion High-Fidelity" (Life Technologies)-DNA Polymerase (2.5) eingesetzt. Beide Polymerase besitzen eine 5' nach 3' Exonukleaseaktivität (*Proofreading*).

#### Standard PCR-Ansatz

Oligonukleotidprimer I	0,5 µM
Oligonukleotidprimer II	0,5 µM
Polymerase-Reaktionspuffer	1-fache Konzentration
dNTP-Mix	2,5 mM
DMSO	3 % (v/v)
Matrizen-DNA	10- 50 ng
Polymerase	1 U
A. dest.	ad 20 µl

Standardprogramm für die PCR

1. Initiale Denaturierung	98 °C	1 - 3 Min.
2. Denaturierung	98 °C	30 Sek.
3. Hybridisierung	$T_m$	10 - 30 Sek.
4. Elongation	72 °C	30 - 120 Sek. pro kB
5. Terminale Elongation	72 °C	5 Min.

Die Reaktionsschritte 2 bis 4 wurden zyklisch 35-mal durchlaufen. Die Hybridisierungstemperatur ( $T_m$ ) richtete sich nach den verwendeten Oligonukleotidprimern (2.3.1) ( $T_{m1}$ ) und ( $T_{m2}$ ). Sie errechnet sich nach  $([(T_{m1} + T_{m2}) / 2] - 5^\circ \text{C})$ , wobei die Differenz der Schmelztemperaturen der in einer Reaktion eingesetzten Oligonukleotidprimer  $4^\circ \text{C}$  nicht überschritt. Die Analyse der gebildeten PCR-Produkte erfolgte mittels der Agarosegelelektrophorese.

**2.13.9 Amplifikation von DNA mittels *Colony*-PCR**

Die *Colony*-PCR unterscheidet sich im Prinzip nicht von der bereits beschriebenen PCR (2.13.8). Allerdings wurde als Matrize nicht isolierte DNA eingesetzt, sondern einzelne Bakterienkolonien von einer Festmediumplatte gepickt und diese in  $20 \mu\text{l}$  nukleasenfreiem Wasser resuspendiert. Die Freisetzung der DNA erfolgte durch Kochen der Zellsuspension für 10 Minuten bei  $99^\circ \text{C}$ , wonach  $10 \mu\text{l}$  dieser Suspension als Matrize in die PCR-Reaktion eingesetzt wurden.

**2.13.10 Hybridisierung von DNA-Chips**

Für DNA-Microarray-Experimente wurden DNA-Chips vom Typ "Custom-Gene-Expression" der Firma Agilent eingesetzt die jeweils vier Arrays zu je 44000 Hybridisierungsfelder (Spots) besaßen. Auf den einzelnen Arrays befanden sich unter anderem Spots für die ungefähr 4000 Gene des *E. coli* Stammes MG1655 der in der NCBI-Datenbank hinterlegt ist.

Zur Quantifizierung der relativen RNA-Spiegel wurden die aus den zu vergleichenden RNA-Proben hergestellten fluoreszenzmarkierten cDNA-Sonden (2.12.3) in äquivalenten Mengen gleichzeitig auf einen DNA-Chip hybridisiert. Dazu wurden die vereinigten Sonden mit nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von  $44 \mu\text{l}$  aufgefüllt und anschließend mit dem "Gene Expression Hybridization Kit" der Firma Agilent (2.9) nach Herstellerangaben behandelt. Vor dem Beladen des DNA-Chips wurden die Sonden 1 Minuten bei  $13.000 \text{ UpM}$  zentrifugiert um evtl. Luftblasen aus der Lösung zu entfernen. Die mit den Sonden beladenen DNA-Microarrays wurden mit Hilfe der "Backing Slides" und der "Microarray Hybridization Chamber" der Firma Agilent verschlossen und unter ständiger Rotation bei  $65^\circ \text{C}$  für 17 Stunden hybridisiert.

Nach der erfolgten Hybridisierung wurde der Microarray-Objektträger mit Hilfe des Agilent "Wash Buffer Kit" nach Herstellerangaben gewaschen. Die Fluoreszenz der hybridisierten cDNA-Sonden wurde bei 532 nm (Cy3-dUTP) und 635 nm (Cy5-dUTP) mit einer Auflösung von 5 µm mit Hilfe des "GenePix 4000B Laser Scanner" (2.10) sowie der Analysesoftware "GenePix Pro 6.0" der Firma Molecular Devices (2.16) detektiert, wobei die Intensitäten der Cy-3 bzw. Cy-5 vermittelten Floreszenzen mit dem Verhältnis der jeweiligen mRNA-Molekülen korreliert und daher ein Maß für den relativen mRNA-Gehalt darstellt (Shalon *et al.*, 1996). Die dabei erhaltenen Rohdaten der Fluoreszenzbilder wurden im TIFF-Format gespeichert.

#### **2.13.11 Auswertung von DNA-Chip Fluoreszenzbildern**

Die quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten der im TIFF-Format gespeicherten Fluoreszenzbilder wurde mit Hilfe der "GenePix Pro 7.0" Software der Firma Molecular Devices (2.16) durchgeführt und die Ergebnisse als GPR-Datei gespeichert. Die dort gespeicherten Informationen wurden in Bezug auf eine Hintergrundfluoreszenz-Korrektur, sowie der Berechnung und Normalisierung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten ( $\lambda$  532 nm,  $\lambda$  635 nm) mit Hilfe des BioConductor R-Softwarepakets „limma & marray“ (<http://www.bioconductor.org>) prozessiert. Die Normalisierung der Rohdaten dient der Angleichung der Cy-3 und Cy-5 Fluoreszenzverhältnisse wodurch eine Vergleichbarkeit der Resultate über mehrere Experimente hinweg ermöglicht wird (Eisen *et al.*, 1998). Für die weitere Analyse der prozessierten Experimentaldaten wurden diese gemäß MIAME (Brazma, 2009) in der „DNA Microarray Database“ des Instituts für Bio- und Geowissenschaften 1 (IBG-1) des Forschungszentrums Jülich gespeichert (Polen & Wendisch, 2004). Für die Analyse des Transkriptoms wurden nur Fluoreszenzdaten betrachtet, die automatisch erkannt wurden (Flags  $\geq 0$ ) und deren Spotintensitäten ein Signal zu Hintergrundverhältnis von mindestens 3 zeigten (Khodursky *et al.*, 2000; Wendisch *et al.*, 2001). Die Microarray-Experimente wurden in jeweils drei unabhängigen Messungen basierend auf eigenständigen biologische Replikaten wiederholt, wobei die statistische Signifikanz der Experimente durch die Berechnung des  $p$ -Wertes ( $p \leq 0,05$ ) mittels t-Test überprüft wurde.

## **2.14 Protein Techniken**

### **2.14.1 Gesamtproteinisolierung aus *E. coli***

Zur Gewinnung eines zellfreien, denaturierten Proteinlysats wurde die Zellzahl der zu untersuchenden *E. coli* Zellkultur durch photometrische Trübungsmessung (2.11.4) bestimmt und eine Zellmenge entsprechend einer  $OD_{580}$  von 2 entnommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation

(1 Min., 13.000 UpM, TZ, RT) pelletiert, der Überstand vollständig entfernt und in Tris-Puffer (2.8.6) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernen des Überstandes wurde das Zellsediment in 200 µl SDS-Probenpuffer (2.8.3) gelöst und im Thermomixer "Thriller" der Firma Peqlab gekocht (10 Min., 99 °C, 1.000 UpM). Zelltrümmer und fehlgefaltete Proteine (*inclusion bodies*) wurden durch Zentrifugation pelletiert (10 Min., 13.000 UpM, TZ, RT) und der Überstand in ein neues EPG überführt. Die isolierten Proteinlysate wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **2.14.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)**

Die denaturierende SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes. Hierzu wird durch die Zugabe von SDS ein negativ geladener Protein-SDS-Komplex hergestellt, bei dem die eigentlichen Ladungen der Aminosäuren durch die negative Ladung des SDS überlagert werden. Durch die stark negative Ladung der Proteine wandern diese im elektrischen Feld mit einer Geschwindigkeit, die proportional zum Molekulargewicht der Proteine ist, zur Anode. Die in dieser Arbeit abgebildeten denaturierten SDS-Polyacrylamidgele wurden mit dem "X-Cell Sure Lock System" (2.10) und dem "Novex PowerEase 500" der Firma Invitrogen unter Verwendung von "NuPAGE 4 - 12 % Bis-Tris" Gelen (1 mm) in 1-fach "NuPAGE SDS-Running Buffer" (2.8.3) nach Herstellerangaben angefertigt.

#### **2.14.3 Coomassie-Färbung zur Proteindetektion (Merril, 1990)**

Die Färbung von SDS-Gelen erfolgte nach der Elektrophorese (2.14.2) in einer Coomassie-Brillant-Blau-Färbelösung (2.8.3) unter langsamem Schütteln bei Raumtemperatur. Nach einer einstündigen Inkubation wurde die Färbelösung durch Entfärbelösung (2.8.3) ersetzt, die alle 30 Minuten bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes erneuert wurde. Die Dokumentation der entfärbten Gele erfolgte mit Hilfe der Videodokumentationsanlage "Stella" der Firma Raytest (2.10).

#### **2.14.4 Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Wilson & Juan, 1989)**

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden auf eine PVDF-Membran mit Hilfe des "X-Cell Sure Lock Systems" der Firma Invitrogen (2.10) übertragen. Dazu wurde die Membran 5 Minuten in Methanol equilibriert und anschließend 10 Minuten in 1-fach "NuPAGE Transfer Buffer" (2.8.3) gewaschen. Für den Transfer wurde ein "Blot-Sandwich" bestehend aus dem Polyacrylamidgel, welches die aufgetrennten Proteine enthielt (2.14.2), sowie der equilibrierten und gewaschenen PVDF-Membran gebildet. Gel und Membran wurden flankiert von 2 Schichten Whatman-Papier und einem Blotschwamm zu jeweils beiden Seiten. Der Transfer fand in 1-fach "NuPAGE Transfer Buffer" (2.8.3) bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA für 40 Minuten statt.

#### 2.14.5 Immunodetektion von Proteinen

Nach dem Übertrag der Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (2.14.4) können diese immunologisch nachgewiesen werden. Dazu wird ein primäres Antiserum, welches spezifisch für das zu untersuchende Zielprotein ist, eingesetzt. In einem zweiten Hybridisierungsschritt wird ein zweites Antiserum (2.7) verwendet, welches spezifisch an das erste Antiserum bindet und an die Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist. Bei Verwendung des *Enhanced-chemo-luminescence* (ECL) Western-Blotting-Detektionssystems wird durch die Reaktion von Wasserstoffperoxid, Luminol (Bestandteile des ECL-Kits) und der Meerrettich-Peroxidase (HRP) eine Chemolumineszenz erzeugt, die fotografisch mit Hilfe der Videodokumentationsanlage "Stella" der Firma Raytest (2.10) detektiert und dokumentiert werden kann.

Für den spezifischen Nachweis wurde die Membran nach dem Proteintransfer über Nacht in einer 3 %-igen Milchpulver-TBST-Lösung (2.8.4) inkubiert um alle freien Bindungsstellen der Membran zu sättigen. Anschließend wurde die Membran für 30 Minuten in TBST-Puffer gewaschen bevor das erste Antiserum in entsprechender Verdünnung in TBST-Puffer zugegeben und für eine Stunde inkubiert wurde. Nach einem halbstündigen Waschschrift mit TBST-Puffer wurde das Zweitantiserum ebenfalls in geeigneter Verdünnung in TBST-Puffer auf die Membran gegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Abschließend folgte ein weiterer 1-stündiger Waschschrift, bei dem der TBST-Puffer mehrmals getauscht wurde. Die Chemolumineszenzreaktion erfolgte mit Hilfe des ECL-Kit der Firma GE Healthcare (2.9) nach Herstellerangaben.

#### 2.14.6 Färbung von PVDF-Membranen

Die Färbung von PVDF-Membranen dient der Visualisierung sämtlicher Proteine auf der Membran. Dazu wurde die Membran für 15 Minuten in TBST-Puffer gewaschen und anschließend für 15 - 30 Minuten in einer Amidoschwarz-Färbelösung (2.8.4) inkubiert. Die Trocknung der gefärbten Membran erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

#### 2.14.7 Reinigung Histidin-getagter Proteine mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix (Crowe *et al.*, 1994)

Die Gene, die für die zu reinigenden Proteine kodieren, wurden direkt vor oder hinter einer Sequenz kloniert, die für 6 - 10 aufeinanderfolgende Histidine - einen sogenannten His-Tag - kodiert. Dadurch entsteht nach der erfolgten Expression (Proteinbiosynthese) eine Translationsfusion, bestehend aus dem Zielprotein und dem N- bzw. C-terminalen His-Tag. Die Reinigung beruht auf einer nicht-kovalenten Bindung des His-Tags an die Ni<sup>2+</sup>-Ionen, die über Nitrilo-3-Essigsäure (NTA) an die Gelmatrix gebunden sind. Nicht getagte Proteine binden nicht an die Säulenmatrix und fließen an der Säulenmatrix vorbei, während die Zielproteine an diese binden.

Für die Reinigung wurden die Zellen der Expressionskultur durch Zentrifugation sedimentiert (10 Min., 5.000 UpM, 4 °C) und anschließend in Lysepuffer resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels Ultraschallsonotrode (2.10) bei stetiger Kühlung auf Eis (2-mal 5 Min., Stärke 40 %, 50 Zyklen/Min.). Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (45 Min., 4 °C, 16.000 UpM) sedimentiert. Der zellfreie Proteinüberstand wurde auf die zuvor mit 5 Säulenvolumen Lysepuffer (2.8.5) equilibrierte Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule geladen. Die Flussrate der Protein- und Pufferlösungen wurde während der Reinigung durch die Peristaltikpumpe "LKB Pump P-1" der Firma Pharmacia (2.10) eingestellt und betrug maximal 4 ml pro Minute. Nach dem Auftragen der Proteinlösung wurde die Säule mit weiteren 5 Säulenvolumen Lysepuffer gespült bevor diese mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer (2.8.5) gewaschen wurde, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säulenmatrix zu entfernen. Anschließend wurde das gebundene Zielprotein mit 5 Säulenvolumen Elutionspuffer (2.8.5) von der Säule gelöst und aufgefangen. Elutionspuffer enthält eine hohe Konzentration an Imidazol, welches mit den Histidinen um die Bindestellen an der Gelmatrix konkurriert und die gebundenen Proteine von der Säule verdrängt. Zur Lagerung des gereinigten Proteins wurde dieses in Lagerpuffer umgepuffert und konzentriert. Dazu wurden Zentrifugationsfilter "VivaSpin20" der Firma Satorius mit einem geeignetem Porendurchmesser genutzt. Proteinlösungen wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung entweder bei 4 °C oder für längere Zeiträume bei -20 °C im Dunkeln gelagert.

## 2.15 Optische Methoden

### 2.15.1 Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford, 1976)

Die Proteinkonzentration wurde mittels der Bradford-Tests photometrisch über die Absorption im Spektralphotometer "Genesys 6" der Firma Thermo Scientific (2.10) bestimmt. Dabei nutzt man die Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 (2.8.8) mit den hydrophoben und positiv geladenen Seitenketten der Aminosäuren, wobei sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 470 nm nach 595 nm verschiebt.

### 2.15.2 Aufnahme von Carotinoidabsorptionsspektren

Zur Aufnahme von Carotinoidabsorptionsspektren wurde zunächst der zu untersuchenden *D. shibae* Flüssigkultur (2.11.3) eine Zellmenge entsprechend einer  $OD_{660}$  von 1 entnommen und durch Zentrifugation (10 Min., 10.000 UpM, TZ, RT) pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Carotinoide durch Zugabe von 1 ml Ethanol und vortexen gelöst. Nach einer Inkubation der Suspension für 10 Min. bei 50 °C und erneuter Zentrifugation wurde der Überstand in eine

Quarzglasküvette überführt und das Absorptionsspektrum im Spektralphotometer "Genesys 6" der Firma Thermo Scientific (2.10) im Bereich von 300 nm bis 900 nm aufgenommen.

### **2.15.3 Photometrische Fluoreszenzmessung**

Zur spektralen Fluoreszenzmessung von *in vivo* sowie *in vitro* Proben wurde das Fluoreszenzspektrometer "Cary Eclipse" der Firma Varian (2.10) genutzt. Dabei wurden *in vitro* Proteinlösungen auf eine  $OD_{450}$  von 0,1 eingestellt. Für *in vivo* Messungen wurde den jeweiligen Flüssigkulturen eine Zellmenge entsprechend einer  $OD_{580}$  von 0,5 entnommen und diese durch Zentrifugation (1 Min., 13.000 UpM, TZ, RT) pelletiert und anschließend in 1 ml Tris-Puffer (2.8.6) resuspendiert. Alle Proben wurden für die Messung in Quarzglasküvetten überführt.

### **2.15.4 Bestimmung der Quantenausbeute**

Die Quantenausbeute wurde mit Hilfe des Fluoreszenzspektralphotometers "QuantaMaster" der Firma Photon Technology International (2.10) und der Integrationssphäre vom selben Hersteller nach Herstellerangaben bestimmt. Dazu wurde die zu untersuchende Proteinlösung auf eine  $OD_{450}$  von 0,1 in Proteinlagerpuffer eingestellt, in eine Quarzglas-Makroküvette überführt und in der Integrationssphäre vermessen. Es wurden sowohl Anregungsspektren von 440 nm bis 460 nm, als auch Emissionsspektren von 460 nm bis 650 nm aufgenommen, wobei die Anregungswellenlänge auf 450 nm eingestellt wurde. Mit Hilfe der Software "Felix32", ebenfalls von PTI (2.16), wurden die Integrale der gemessenen Spektren miteinander verrechnet und ergaben die Quantenausbeute.

### **2.15.5 Messung der Photostabilität von Fluoreszenzproteinen**

Während der andauernden Anregung der Fluoreszenzemission von Proteinen nimmt deren Intensität mit der Zeit ab, wobei sich die Stärken der Abnahmen der Intensitäten zwischen den Spezies und Varianten der jeweiligen Fluoreszenzproteine stark unterscheiden. Zur Bestimmung des Ausbleichens (*bleaching*) wurde die zu untersuchende Proteinlösung (2.14.7) in Proteinlagerpuffer auf eine Konzentration entsprechend einer  $OD_{450}$  von 0,1 eingestellt. Mit Hilfe des Fluoreszenzspektrometers "Cary Eclipse" der Firma Varian wurde die Fluoreszenzaktivität der Proteinlösung über einen längeren Zeitraum (ungefähr 15 Min.) gemessen, bis sich ein gleichbleibendes Niveau der Fluoreszenzintensität eingestellt hatte. Während der Messung wurde die Proteinlösung enthaltene Quarzglasküvette ständig von oben mit einer Blaulicht-LED ( $\lambda = 440 \text{ nm}$ ,  $180 \text{ mW} \times \text{cm}^{-2}$ ) bestrahlt. Eine zusätzliche Anregung des Fluoreszenzproteins fand bei 450 nm, die Detektion der Emission bei 495 nm mit einer Spalteinstellungen von 5 nm (sowohl für die Anregung als auch für die Emission)

statt. Die Kinetik der Reaktion wurde als Funktion der Fluoreszenzintensität gegen die Zeit aufgenommen.

#### **2.15.6 *In vitro* pH-Sensitivitätsmessungen von Fluoreszenzproteinen**

Zur pH-Titration von Fluoreszenzproteinen wurden Proteinlösungen über die Absorption bei 450 nm auf eine Konzentration entsprechend einer o.D.<sub>450</sub> von 0,1 in einem pH-Universalpuffer (2.8.9) eingestellt und anschließend deren Fluoreszenzaktivität detektiert (2.15.3).

#### **2.15.7 Fluoreszenzanalyse unter UV-Licht ( $\lambda$ 365 nm)**

Zur schnellen und einfachen *in vivo* Visualisierung von fluoreszierenden Bakterienkolonien auf Festmedienplatten (2.11.1) wurde eine UV-Lichtapparatur „Vilber Lourmat CN-6“ der Firma Vilber Lourmat eingesetzt. Die Agarplatten werden dabei durch Licht mit einer Wellenlänge von 365 nm illuminiert, woraufhin die fluoreszierenden Kolonien detektiert und fotografisch dokumentiert werden können.

#### **2.15.8 Konfokale *laser-scanning* Mikroskopie**

Säugerzelllinien wurden wie in Abschnitt (2.11.10) beschrieben transfiziert. Nach erfolgreicher Transfektion wurde die Reaktion durch Zugabe von fetalem Kälberserum (PAA, Pasching, Österreich) gestoppt und die Zellen durch eine Trypsin-EDTA-Lösung vom Plattenboden gelöst. Anschließend wurden die Zellen auf Objektträger überführt, die zuvor mit 0,1 % Gelatin (Invitrogen, Darmstadt) beschichtet wurden. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch 4 % Roti Histofix (Carl-Roth, Karlsruhe), die Blockierung durch Roti Immuno Block / 0,01 % Triton-X (Sigma-Aldrich, München). Für die mikroskopischen Analysen wurde ein konfokales *laser-scanning* Mikroskop (Zeiss cLSM 510, Carl-Zeiss, Jena) genutzt, wobei für die Visualisierung von transgener Expression von Fluoreszenzproteinen ein Argonlaser ( $\lambda = 488$  nm) eingesetzt wurde.

#### **2.15.9 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von FMN-bindenden Fluoreszenzproteinen**

(Wingen, unveröffentlicht)

Der Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) ist ein Maß für die Stärke der Schwächung von elektromagnetischer Strahlung (Licht) durch ein Medium aufgrund von Absorption und Streuung. Zur Bestimmung des  $\epsilon$  von FMN-bindenden Fluoreszenzproteinen wurde eine Proteinlösung auf ein oD<sub>450</sub> von 0,1 in Proteinlagerpuffer (2.14.7) eingestellt und deren Absorption im Spektralphotometer bei 280 und 450 nm sowohl bei 20 °C als auch bei 95 °C gemessen. Aus dem Verhältnis der Absorptionen bei 20 °C

und 95 °C, multipliziert mit dem Extinktionskoeffizienten des freien Kofaktors errechnet sich der Extinktionskoeffizient des Proteins bei der jeweiligen Wellenlänge.

#### 2.15.10 Berechnung der Kofaktor-Beladung

Die Kofaktor-Beladung beschreibt den Anteil an mit Kofaktor beladenem Protein (Holoprotein) in der gesamten Proteinmenge. Zur Berechnung der Beladung wurden die Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Fluoreszenzproteine bei 280 nm sowie 450 nm bestimmt.

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \times c \times d$$

( $E_{\lambda}$ : Extinktion;  $\epsilon_{\lambda}$ : Extinktionskoeffizient;  $c$ : Stoffmengenkonzentration;  $d$ : Schichtdicke)

Durch Einsetzen dieser Parameter in das Lambert-Beersche-Gesetz wurden die Kofaktor- und Proteinkonzentrationen bestimmt, deren Verhältnis den prozentualen Anteil des Holoproteins an der Proteingesamtmenge repräsentiert.

#### 2.15.11 Bestimmung der Rückkehrkinetiken von LOV-Proteinen

Zur Bestimmung der Zeit, die LOV-Proteine benötigen, um aus ihrem Lichtzustand wieder in den Dunkel- oder Grundzustand zu wechseln, wurde das jeweilige LOV-Protein in Proteinlagerpuffer (2.14.7) auf ein  $OD_{450}$  von 0,1 verdünnt. Um das Protein in seinen Lichtzustand zu überführen, wurde die Proteinlösung mit Hilfe einer Blaulicht-LED ( $\lambda = 440 \text{ nm}$ ,  $180 \text{ mW cm}^{-2}$ ) „Luxeon Lumileds“ der Firma Philips für 30 Sekunden bestrahlt. Anschließend wurde die Rückkehrkinetik der bestrahlten Proteinlösung über die Zunahme der Absorption bei 485 nm aufgenommen. Für die statistische Absicherung der Experimentaldaten wurden die Kinetiken dreier unabhängiger Messungen einer mono-, oder wenn nötig doppel-exponentieller Regression unterzogen.

#### 2.15.12 *In vitro* Quantifizierung von Wasserstoffperoxid

Zum *in vitro* Nachweis und Quantifizierung von Wasserstoffperoxid wurde das „Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit“ der Firma Molecular Probes (2.9) nach Herstellerangaben und Verwendung der mitgelieferten Puffer und Lösungen genutzt. Die für jede Reaktion eingesetzte Proteinkonzentration entsprach dabei ein  $OD_{450}$  von 0,1. Für die enzymatische Umsetzung des durch die spezifische Belichtung ( $\lambda 450 \text{ nm}$ ,  $\sim 0,5 \text{ mW cm}^{-2}$ ) der Proteinlösung gebildete Superoxid nach Wasserstoffperoxid wurden jeder Reaktion 4 U/ml Superoxiddismutase (2.5) zugegeben. Die rötliche Färbung der Amplex Red-Reagenz, die durch dessen Reaktion mit Wasserstoffperoxid in Gegenwart einer Peroxidase hervorgerufen wird, wurde mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Fluoreszenzspektrometers „Infinite M1000 Pro“ der Firma Tecan (2.10) bei einer Wellenlänge von 585 nm detektiert, wobei die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs Resorufin bei 571 nm erfolgte.

**2.15.13 *In vitro* Quantifizierung von Singulett-Sauerstoff**

Die Menge an *in vitro* generierten Singulett-Sauerstoff wurde in Kooperation mit und in den Labors der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Santi Nonell von der Universität Ramon Llull in Barcelona, Spanien, bestimmt. Die dabei angewandte Methodik folgte der Beschreibung von Ruiz-González *et al.* (Ruiz-González *et al.*, 2013). Die Detektion des Singulett-Sauerstoffs erfolgte über seine Eigenschaft der Phosphoreszenz bei 1275 nm. Eine genauere Quantifizierung erfolgte indirekt durch den Vergleich mit der Referenzsubstanz Phenalenon-2-Sulfat (PNS), deren  $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeute mit 1 angegeben ist.

## 2.16 Computerprogramme und Datenbanken

**Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Computerprogramme und Datenbanken**

Bezeichnung	Referenz / Hersteller	Verwendung
Aida	Raytest	Dokumentation von SDS-PAGEs und Western-Blots
BioEdit	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html">http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html</a>	Visualisierung von Sequenzalignments
Clone Manager 9	Scientific & Educational Software	Verwaltung von DNA-Sequenzen
ClustalW2	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolformebi?tool=clustalw2">http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolformebi?tool=clustalw2</a>	Multiple Sequenz-Alignments
DNA-Microarray Database	Institut für Bio- und Geowissenschaften 1 (IBG-1) Forschungszentrum Jülich	Archivierung von Microarraydaten
ExpASY Molecular Biology Server	<a href="http://www.expasy.org">http://www.expasy.org</a>	
GenePix Pro 6.0 & 7.0	Molecular Devices	Scannen und Auswertung von DNA-Microarrays
Graphical Codon Usage Analyzer	<a href="http://gcu.schoedl.de/">http://gcu.schoedl.de/</a>	Optimierung der <i>codon-usage</i>
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	<a href="http://www.genome.jp/kegg/">http://www.genome.jp/kegg/</a>	Genomsequenz von <i>Dinoroseobacter shibae</i>
Mendeley Desktop	Mendeley Ltd.	Literaturverwaltung
Microsoft Office 2010	Microsoft	Auswertung und Dokumentation
Nucleotide Blast – Align two Sequences	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov</a>	DNA-Sequenzvergleiche
Origin 7G	OriginLab	Auswertung von Experimentaldaten
Primer3	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/">http://frodo.wi.mit.edu/</a>	Design von Oligonukleotidprimern
RCSB Protein Data Bank	<a href="http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do">http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do</a>	Proteindatenbank
R-Package	BioConductor	Normalisierung von DNA-Microarray Daten
Stella	Raytest	Dokumentation von SDS-PAGEs und Western-Blots
UCSF Chimera 1.8	<a href="http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/">http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/</a>	Visualisierung von <i>pdb</i> -Dateien

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der LOV-basierte Blaulichtrezeptor DsLOV des marinen phototrophen Bakteriums *Dinoroseobacter shibae*

Wie bereits einleitend erwähnt wurde, besitzt das marine Bakterium *D. shibae* die Fähigkeit zur aeroben anoxygenen Photosynthese, wodurch es naheliegend ist, dass dieses Bakterium über Lichtrezeptoren verfügt. Da das Genom dieses Bakteriums sequenziert ist (Wagner-Döbler *et al.*, 2010), war es möglich, nach Proteinen mit Sequenzhomologie zu bereits bekannten LOV-Proteinen, wie dem Sensory-Box 2 Protein (PpSB2-LOV) aus *P. putida* (Krauss *et al.*, 2005) und YtvA aus *B. subtilis* (Losi *et al.*, 2002) zu suchen. Wie das Alignment in Abbildung 7 zeigt, wurden als Ergebnis dieser Suche drei putative LOV-Proteine im Genom von *D. shibae* identifiziert.

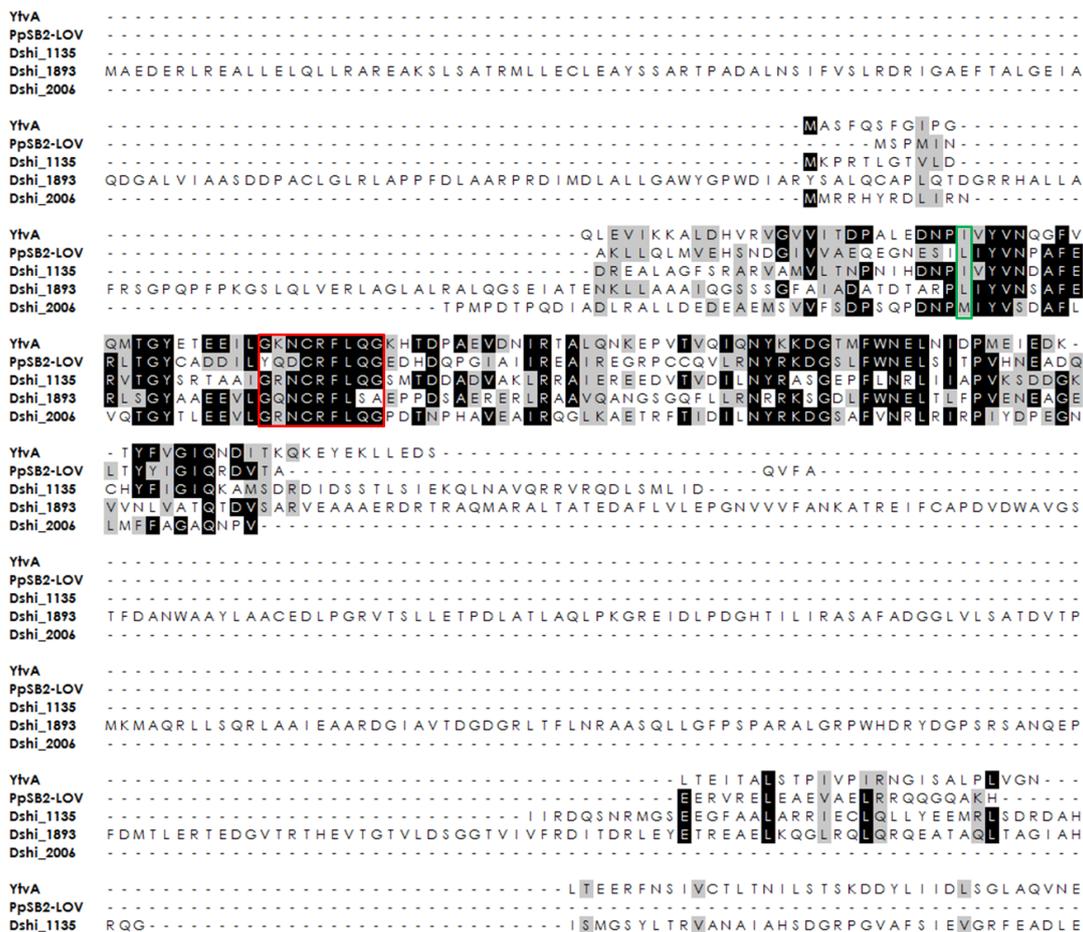
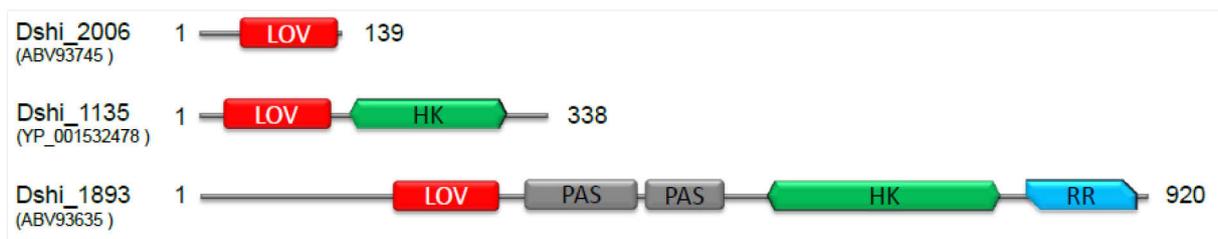


Abbildung 7: Sequenz-Alignment der putativen LOV-Blaulichrezeptoren aus *D. shibae* und bekannter LOV-Proteine

Die Aminosäuresequenzen der drei putativen LOV-Proteine aus *D. shibae* und den bekannten LOV-Proteinen YtvA und PpSB2-LOV wurden durch ein multiples Alignment mit Hilfe des Programms ClustalW2 (Thompson *et al.*, 1997) analysiert. Die Konsensussequenz der LOV-Domäne (GXNCRFLQG), die das photoaktive Cystein enthält, ist durch das rote Rechteck, die im Rahmen dieser Arbeit mutierte Aminosäureposition durch das grüne Rechteck hervorgehoben

Der *open reading frame* (ORF) *dshi\_2006* kodiert für ein LOV-Protein, das keine C-terminale Effektor-domäne besitzt und daher als short-LOV klassifiziert und im Folgenden als DsLOV bezeichnet wird. Die beiden anderen putativen LOV-Proteine *Dshi\_1135* und *Dshi\_1893* besitzen allerdings solche Effektor-domänen. Aus Abbildung 8 geht hervor, dass im C-terminalen Bereich des *Dshi\_1135* eine Histidinkinasedomäne zu finden ist, während das Protein, das durch das *dshi\_1983* kodiert wird, Sequenzbereiche für zwei PAS (Per-ARNT-Sim) -Domänen, sowie eine Histidinkinasedomäne und eine *response-regulator* Domäne besitzt.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Multidomänen-Architektur der drei putativen LOV-Proteine aus *D. shibae***

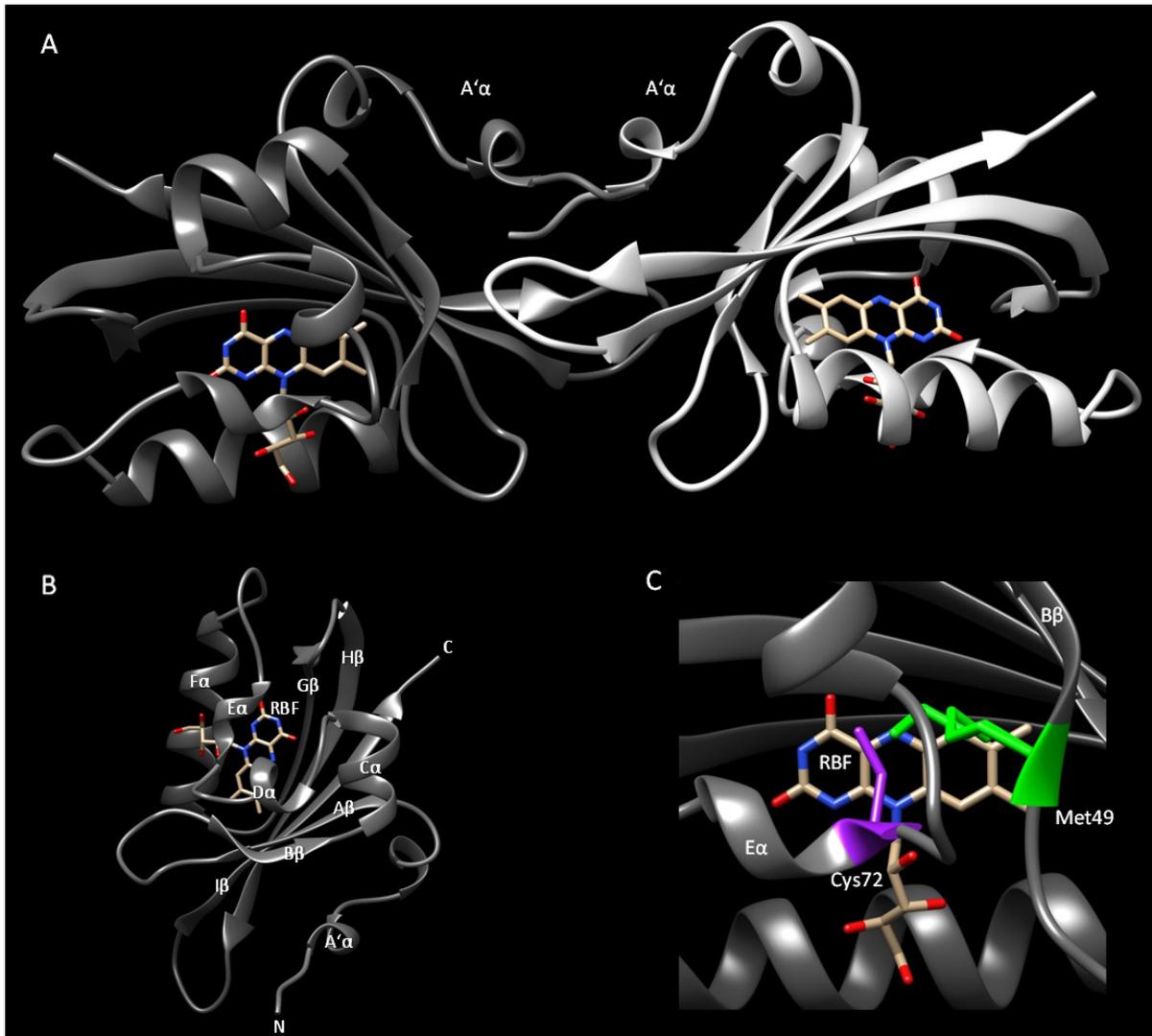
Illustration der Architektur der drei putativen *D. shibae* LOV-Proteine. Die Identität, Größe und Lage der dargestellten Domänen bezüglich ihrer Positionierung im Protein wurde mit Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) analysiert. LOV: Light-Oxygen-Voltage-Domäne; PAS: Per-ARNT-Sim-Domäne, HK: Histidinkinase; RR: *response regulator*).

Im Folgenden wurde das DsLOV im Hinblick auf seine Struktur und den LOV-Domänen typischen Photozyklus charakterisiert. Des Weiteren wurde die regulatorische Funktion dieses Blaulichtrezeptors in *D. shibae* mit Hilfe eines *dslov*-defizienten Stammes untersucht. Außerdem sollte auf Grundlage dieses Photorezeptors durch Methoden der ortsgerichteten Mutagenese ein neues Fluoreszenzreporterprotein erzeugt werden.

### 3.1.1 Die Proteinstruktur des putativen Blaulichtrezeptors DsLOV aus *D. shibae*

In Zusammenarbeit mit Franco Circolone, Dr. Ulrich Krauss sowie in Kooperation mit den Strukturbiologen PD Dr. Renu Batra-Safferling und PD Dr. Joachim Granzin vom *Institute of Complex Systems* (ICS-6) des Forschungszentrum Jülich konnte die DsLOV-Proteinstruktur durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden. Die in Abbildung 9-A dargestellte Struktur zeigt die homodimere Organisation von DsLOV. Dabei zeigen die einzelnen Monomere die LOV-typische Topologie der Kerndomäne (Abbildung 9-B), welche aus fünf antiparallelen  $\beta$ -Faltblätter ( $A\beta$  (As 36-40),  $B\beta$  (As 49-52),  $G\beta$  (As 98-105),  $H\beta$  (As 111-122) und  $I\beta$  (As 128-137)) sowie vier  $\alpha$ -Helices ( $C\alpha$  (As 54-60),  $D\alpha$  (As 64-67),  $E\alpha$  (As 72-75) und  $F\alpha$  (As 82-94)) besteht. Typischerweise binden LOV-Proteine den Kofaktor FMN nicht-kovalent, wobei die Strukturanalysen ergaben, dass es sich bei dem im Kristall vorliegenden Kofaktor um Riboflavin (RBF) handelte. HPLC-Analysen der Kofaktoren, die vor

der Kristallisation aus dem löslichen DsLOV Protein isoliert wurden, ergaben jedoch eine Kofaktorzusammensetzung aus 74,3 % Flavinmononukleotid (FMN) und 25,7 % Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD). Da auf diesem Wege kein RBF nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass das gebundene FMN während der Kristallisation bzw. Lagerung der Proteinkristalle über mehrere Wochen hinweg zu RBF hydrolysierte.



**Abbildung 9: Die DsLOV-Proteinstruktur im Dunkelzustand**

Darstellung der dreidimensionalen DsLOV-Proteinstruktur im Dunkelzustand als Homodimer (A), wobei Monomer A in dunkelgrau, Monomer B in hellgrau illustriert ist (PDB-ID: 4KUK). Die Dimerisierung erfolgt großenteils über ein N-terminales *Turn*-Helix-Loop-Motiv der A' $\alpha$ -Helix sowie weitere hydrophobe Aminosäuresreste. Der nicht-kovalent gebundene Kofaktor Riboflavin (RBF) ist als Stabmodell dargestellt. (B) Die dreidimensionale Proteinstruktur des DsLOV-Monomers illustriert dessen LOV-typische Kernstruktur, bestehend aus fünf  $\beta$ -Faltblättern (A $\beta$ , B $\beta$ , G $\beta$ , H $\beta$ , I $\beta$ ) und vier  $\alpha$ -helikalen (C $\alpha$ , D $\alpha$ , E $\alpha$ , F $\alpha$ ) Strukturelementen. (C) Positionen der beiden im Rahmen dieser Arbeit mutierten Aminosäuren (siehe Abb. 7): Das photoaktive Cystein an Position 72 ist in violett und das Methionin an Position 49 in grün dargestellt.

Neben den kanonischen Strukturelementen der LOV-Kerndomäne konnte des Weiteren eine untypische N-terminale Region identifiziert werden, die aus einem *Turn*-Element, bestehend aus den

As 20-23, einer  $\alpha$ -Helix A' $\alpha$  (As 24-27) sowie einem *Loop*-Motiv (As 28-35) besteht. Von PD Dr. Joachim Granzin durchgeführte PISA (*proteins, interfaces, structures and assemblies*)-Analysen (Krissinel & Henrick, 2007) ergaben, dass die A' $\alpha$ -Helix gemeinsam mit weiteren hydrophoben Aminosäureresten des zentralen  $\beta$ -Faltblattgerüsts (insbesondere H $\beta$ , I $\beta$ ) wichtige Elemente der Dimerisierung darstellen (vgl. Abbildung 9-A), was innerhalb der bekannten LOV-Proteinstrukturen ungewöhnlich ist und in ähnlicher Form bisher nur für den Blaulichtrezeptor VVD aus *Neurospora crassa* beschrieben wurde (Vaidya *et al.*, 2011). Des Weiteren ergaben diese Berechnungen, dass eine Verkürzung des N-Terminus theoretisch zur Bildung von DsLOV-Monomeren führen sollte. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass eine monomere Organisation der Fluoreszenzproteine gegenüber einer dimeren Struktur für biotechnologische Anwendungen von Vorteil ist. Bei der Verwendung dieser Proteine als Fluoreszenzreporter würden sich diese zu Dimeren organisieren, was besonders bei Studien mittels Proteinfusionen zu sterischen Hindernissen und damit zum Verlust der biologischen Aktivität des an den Fluoreszenzreporter fusionierten Zielproteins führen kann. Des Weiteren kommt es durch Dimerisierung zu einer Verdoppelung des Molekulargewichts des Reporterproteins, wodurch dessen Anwendbarkeit für spezielle Fragestellung limitiert sein kann.

Auf dieser Erkenntnis basierend wurden auf Grundlage des DsFbFP, einer fluoreszenzaktiven Variante des DsLOV, bei der der LOV-Photozyklus inaktiviert wurde (vgl. 3.3.1), zwei verkürzte Proteinvarianten erzeugt. Die N-terminalen Verkürzungen betragen dabei 28 Aminosäuren bei DsFbFP Ncap28 bzw. 35 Aminosäuren bei DsFbFP Ncap 35. Bei der Charakterisierung dieser Varianten stellte sich allerdings heraus, dass in *E. coli* BL21(DE3) Zellkulturen, die das DsFbFP Ncap35 exprimierten, keine *in vivo* Fluoreszenz gemessen werden konnte, obwohl ein immunologischer Nachweis mittels Western-Blot die Produktion des gewünschten Polypeptids zeigte (Ergebnisse nicht gezeigt). Hingegen konnte in *E. coli* Zellen, die das DsFbFP Ncap28 produzierten, eine *in vivo* Fluoreszenzaktivität nachgewiesen werden. Doch war eine anschließende Reinigung des Proteins mittels IMAC nicht erfolgreich. Das Protein degradierte, wodurch es akkumulierte und schlussendlich ausfiel, weshalb es nicht stabil in Lösung gebracht werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt). Folglich war die Konstruktion und Expression der verkürzten DsFbFP-Varianten erfolgreich, doch verloren die synthetisierten Proteine entweder ihre Aktivität (DsFbFP Ncap 35) oder waren in Lösung instabil (DsFbFP Ncap 28). Daher war es nicht möglich monomere Proteinvarianten zu erzeugen.

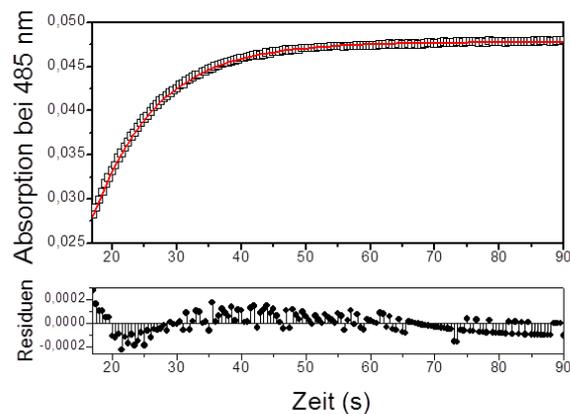
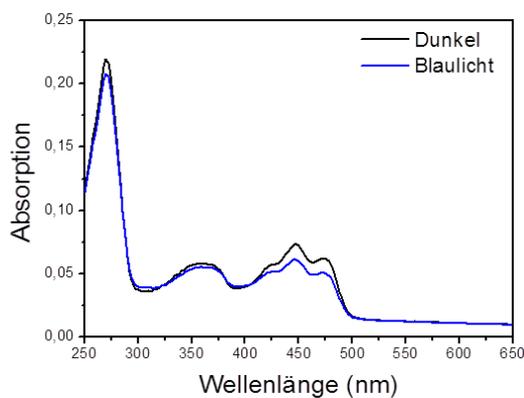
Die DsLOV-Röntgenstruktur zeigte eine LOV-Protein-typische Kerndomänen-Organisation bestehend aus fünf  $\beta$ -Faltblattstrukturen sowie vier  $\alpha$ -Helices. DsLOV liegt nativ als Homodimer vor. Die Dimerisierung erfolgt dabei größtenteils über ein N-terminales *Turn-Helix-Loop*-Motiv, das unter bakteriellen LOV-Photorezeptoren einzigartig ist und in ähnlicher Form nur für den Blaulichtrezeptor VVD aus *N. crassa* bekannt ist. Als Kofaktor bindet DsLOV vornehmlich FMN, obwohl bei der Kristallisation Riboflavin in der Kofaktorbindestelle identifiziert wurde.

### 3.1.2 Photochemische Charakterisierung des LOV-Photorezeptors aus *D. shibae*

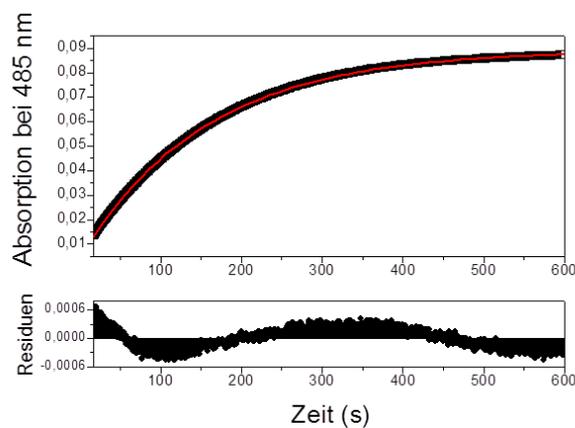
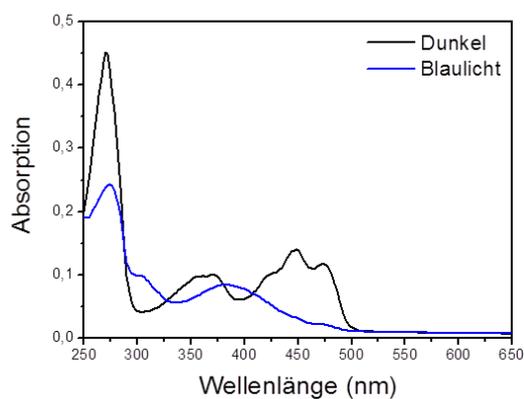
LOV-Proteine durchlaufen nach der spezifischen Anregung mit Blaulicht ( $\lambda = 440 - 485 \text{ nm}$ ) einen Photozyklus, in dessen Verlauf ein nicht-fluoreszierender Photoadduktzustand gebildet wird, bei dem der Kofaktor FMN kovalent an das photoaktive Cystein der LOV-Kerndomäne gebunden ist (1.2). Die Lebensdauer dieses Zustands ( $\tau_{\text{REC}}$ ) ist dabei der zeitbestimmende Faktor für die Dauer des Photozyklus sowie der Rückkehr des Proteins in seinen Ursprungs- bzw. Dunkelzustand. Als nächstes wurde daher die Lebensdauer des Dunkelzustandes für den *D. shibae* Blaulichtrezeptor DsLOV bestimmt. Dazu wurde das DsLOV mit Hilfe des pRhotHi-2 Expressionsvektors in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen heterolog exprimiert und das Protein mittels IMAC gereinigt (2.14.7). Anschließend wurde das DsLOV in Proteinlagerpuffer (2.8.5) auf eine Absorption entsprechend einer o.D.<sub>450</sub> von 0,1 verdünnt und dessen Absorption in einem Absorptionsspektralphotometer (Beckmann UV/Vis DU-650) bei einer konstanten Temperatur von 20 °C bestimmt. Das daraus resultierende, den Dunkel- bzw. Grundzustand des Proteins beschreibende Spektrum ist anhand der schwarzen Linie im linken Diagramm der Abbildung 10-A dargestellt und zeigt die für diesen Zustand charakteristischen Absorptionsmaxima bei 449 und 485 nm. Zur Erzeugung des Photoaddukts wurde die Proteinlösung für 30 Sekunden mit einer Blaulicht-LED ( $\lambda = 440 \text{ nm}$ ,  $180 \text{ mW cm}^{-2}$ ) (Luxeon Lumileds, Philips, Aachen) bestrahlt, woraufhin das Absorptionsspektrum erneut aufgenommen wurde. Dieses wird durch die blaue Linie repräsentiert und zeigt im Vergleich zum Dunkelspektrum verminderte Absorptionen bei 449 und 485 nm. Üblicherweise zeigen lichtangeregte LOV-Proteine nur ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 390 nm (vgl. 1.2). Der Umstand, dass nach der Belichtung des DsLOV die beiden Grundzustand-spezifischen Maxima weiterhin erkennbar waren, kann entweder auf eine unvollständige Überführung des Proteins in den Lichtzustand - durch unzureichende Belichtungsdauer bzw. -intensität - oder auf eine kurze Lebensdauer des Lichtzustands und somit auf eine schnelle Rückkehr des Proteins in den Dunkelzustand zurückgeführt werden. Um dies zu Ergründen, wurde anschließend die Rückkehrkinetik des Photoaddukts in den Grundzustand über die Zunahme der spezifischen Absorption bei 485 nm nach der Belichtungsperiode von 30 Sekunden analysiert. Die zeitaufgelöste Wiederherstellung der Absorption ist in Form einer exponentiellen Regressionskurve im rechten Diagramm in Abbildung 10-A dargestellt. Die darunter dargestellten Residuen dienen der optischen Beurteilung der Qualität der exponentiellen Regression und sollten über den gesamten Bereich möglichst gleichmäßig verteilt sein, was sie im vorliegenden Fall des DsLOV auch nahezu sind. Die Auswertung der Regression ergab eine Lebensdauer des DsLOV-Photoaddukts ( $\tau_{\text{REC}}$ ) von  $9,6 (\pm 0,1)$  Sekunden, was unter den beschriebenen LOV-Photorezeptoren den bisher kleinsten Wert darstellt. Die bisher kürzeste Adduktlebensdauer wurde für die pflanzliche LOV2-Domäne des Phototropin2 aus *A. thaliana* mit 10

Sekunden beschrieben (Kasahara *et al.*, 2002) wodurch diese in etwa auf dem Niveau des DsLOV liegt.

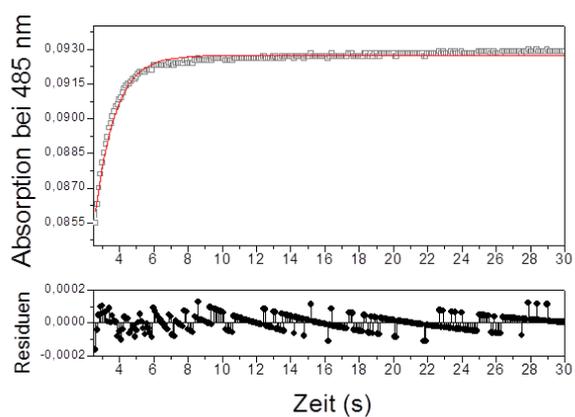
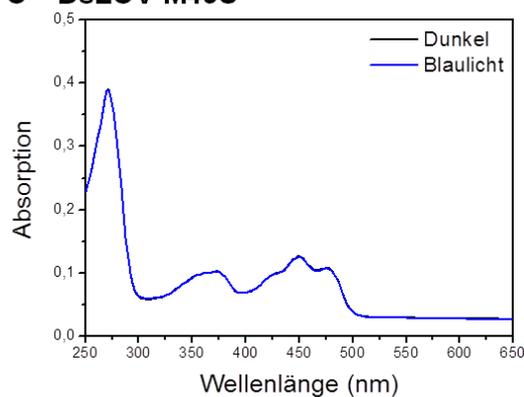
**A - DsLOV**



**B - DsLOV M49I**



**C - DsLOV M49S**



**Abbildung 10: Messungen zur Photoadduktlebensdauer von DsLOV und dessen Varianten M49I und M49S**

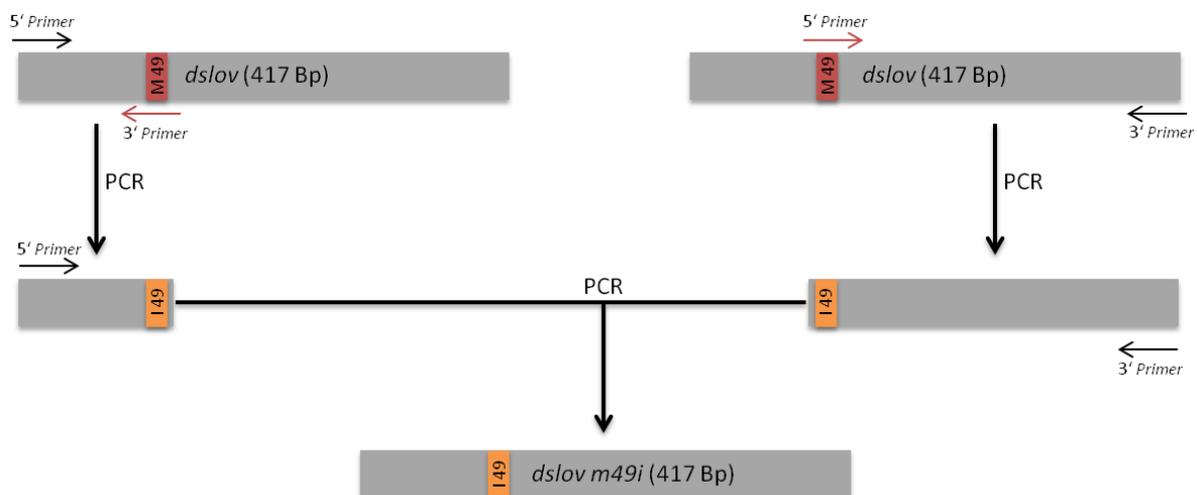
Die Bildung des Photoaddukts von DsLOV (A), DsLOV M49I (B) und DsLOV M49S (C) wurde über die Abnahme der Absorption bei  $\lambda_{\text{Abs Max}} = 449 \text{ nm}$  anhand der Absorptionsspektren von unbelichteten (schwarze Linie) und mit Blaulicht belichteten (blaue Linie) DsLOV-Proben bestimmt (jeweils linke Diagramme). Nach der Belichtung (30 Sekunden mit Blaulicht  $\lambda = 440 \text{ nm}$ ) wurden die Lebensdauern der Lichtzustände über eine exponentielle Regressionskurve der Ergebnisse dreier unabhängiger Messreihen der zeitaufgelösten Wiederherstellung der Absorption bei 485 nm ermittelt (rechte Diagramme). Die dargestellten Residuen spiegeln die Schwankungen der realen Messwerte um die exponentielle Regressionskurve wieder und sind damit ein Maß für die Qualität der Regression. Um eine unspezifische Belichtung der Proben durch natürliches Tageslicht zu vermeiden wurden alle Messungen unter Rotlicht und bei konstanter Temperatur von 20 °C durchgeführt.

Die experimentell ermittelten Lebensdauern des Lichtzustands von bakteriellen Wildtyp-LOV-Proteinen schwanken zwischen 91 Sekunden bei dem LOV-STAS Protein aus *Listeria monocytogenes* (Chan *et al.*, 2013), 45 Minuten bei YtvA aus *B. subtilis* (Losi *et al.*, 2003) und ca. 41,2 Stunden bei PpSB1-LOV bzw. 137 Sekunden bei PpSB2-LOV aus *P. putida* (Jentsch *et al.*, 2009).

Ein Grund für die extrem kurze Lebensdauer des DsLOV-Photoaddukts könnte in den strukturellen Eigenschaften dieses Protein liegen. Frühere Studien haben gezeigt, dass ein konserviertes (Iso-) Leucin des  $\beta\beta$ -Faltblatts einen Einfluss auf die Addukt-Lebensdauer besitzt. In AsLOV2 aus *A. sativa* steht diese Aminosäure in van der Waals Kontakt zum photoaktiven Cystein der LOV-Domäne (Christie *et al.*, 2007). Eine Substitution dieser Aminosäure zu Valin führte bei den LOV-Photorezeptoren AsLOV2 I427V, YtvA I39V (*B. subtilis*) und VVD I85V (*N. crassa*) zu einer deutlichen Beschleunigung des Photozyklus durch Verkürzung des jeweiligen  $\tau_{\text{REC}}$  um das 8-, 5- bzw. 23-fache (Christie *et al.*, 2007; Zoltowski *et al.*, 2009). Die genauen Gründe für die beschleunigte Dunkelrückkehr dieser Proteine sind nicht vollständig geklärt. Für AsLOV2 wurde vorgeschlagen, dass die Insertion eines Valins anstelle des Isoleucins zum Verlust von sterischer Stabilität im Bereich des aktiven Zentrums führt (Christie *et al.*, 2007). Für VVD wurde zudem mittels Bestimmung von Lösungsmittelisotopeneffekten (*solvent-isotope-effects*, SIE) nachgewiesen, dass diese Substitution wahrscheinlich die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für das umgebende Medium verbessert, was eine schnellere Deprotonierung des FMN-N5 ermöglicht (Zoltowski *et al.*, 2009). Diese ist der zeitbestimmende Schritt für die Rückkehr des Proteins aus dem lichtangeregten in den Grundzustand. Beide Effekte müssen daher bei einer mechanistischen Deutung der schnellen DsLOV Dunkelrückkehr in Betracht gezogen werden.

Bei vergleichenden Analysen der Aminosäuresequenzen von DsLOV und anderen experimentell charakterisierten LOV-Proteinen stellte sich heraus, dass in DsLOV die Position des oben genannten Isoleucins (As 49) mit einem Methionin besetzt ist (vgl. Abbildung 7 und Abbildung 9-C). Um zu ergründen, ob das Methionin an dieser Position möglicherweise für die extrem schnelle Rückkehrkinetik des DsLOV verantwortlich ist, wurden Proteinvarianten erzeugt, in denen das Methionin 49 durch Isoleucin bzw. Serin ersetzt wurde. Isoleucin wurde wegen der starken Konservierung dieser Aminosäure an dieser Position innerhalb der LOV-Proteinfamilie gewählt (vgl. Abbildung 7). Die Substitution durch Serin wurde hingegen wegen der im Vergleich zu Methionin kleineren polaren Seitenkette dieser Aminosäure ausgewählt. Dadurch sollte ein weitere sterische Destabilisierung in der Nähe des photoaktiven Cysteins der LOV-Kerndomäne erreicht werden, wodurch eine Verkürzung der Adduktlebensdauer bewirkt werden könnte. Die Konstruktion der beschriebenen Mutanten erfolgte durch gerichtete Mutagenese mittels *overlap-extension* PCR, wie sie in Abbildung 11 schematisch beispielhaft für die Erzeugung des DsLOV M49I - kodierenden Gens dargestellt ist. Dazu wurde in einer ersten PCR (2.13.8) die Mutation durch Einsatz entsprechender

Oligonukleotidprimermoleküle (2.3.1), die die DNA-Sequenz für den Aminosäureaustausch besaßen, zusammen mit dem *dslov* (pRhotHi-2 DsLOV, (2.2)) als Template eingesetzt. Daraus resultierten verkürzte DNA-Sequenzen, die die Mutation in einem homologen Bereich enthielten. Diese beiden Fragmente wurden als Template-Moleküle mit den flankierenden *Primern* in eine zweite PCR eingesetzt, aus der die mutierten Gene *dslov m49i* bzw. *m49s* als Produkte hervorgingen. Daraufhin wurden diese Fragmente durch eine *NdeI* – *XhoI* Doppelrestriktion (2.13.4) mit anschließender Ligation (2.13.7) in den Expressionsvektor pRhotHi-2 kloniert, wodurch die neuen Expressionsplasmide pRhotHi-2 DsLOV M49I und pRhotHi-2 DsLOV M49S entstanden. Der Klonierungserfolg wurde durch erneute Restriktionsanalysen auf Agarosegelen (2.13.5) überprüft und durch Sequenzierungen (2.3.2) bestätigt.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der *overlap-extension* PCR zur Erzeugung des mutierten Gens *dslov m49i***

Zur Erzeugung des Gens *dslov m49i* mittels *overlap-extension* PCR wurden in einer ersten PCR neben flankierenden Oligonukleotidprimern (schwarze Pfeile) auch Primer genutzt, die die DNA-Sequenz für die Substitution des Methionins durch Isoleucin an Aminosäureposition 49 enthielten (rote Pfeile). Als Template für die Reaktion wurde isolierte Plasmid-DNA des pRhotHi-2 DsLOV eingesetzt. Die aus der ersten PCR resultierenden DNA-Fragmente wurden als Template-DNA gemeinsam mit den flankierenden Primern in eine zweite PCR eingesetzt, woraus das mutierte Genfragment hervorging. Zur weiteren Klonierung des Fragments in die Zielvektoren enthielten die flankierenden Primersequenzen (schwarze Pfeile) Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NdeI* (5'-Primer) und *XhoI* (3'-Primer).

Analog zur Bestimmung der Rückkehrkinetik des DsLOV wurden die neu erzeugten Proteinvarianten durch heterologe Expression in *E. coli* BL21 (DE3) produziert (2.11.2) und anschließend mittels IMAC (2.14.7) gereinigt, woraufhin die Adduktlebenszeiten der beiden Proteinvarianten bestimmt wurden. Die Ergebnisse der Bestimmung des DsLOV M49I sind in Abbildung 10-B dargestellt und zeigen das LOV-typische Absorptionsspektrum (linkes Diagramm) mit einem Maximum bei 449 nm unter Dunkelbedingungen (schwarze Linie), während das Spektrum der belichteten Probe (blaue Linie) eine Abnahme der Absorption bei 449 nm und gleichzeitiger Zunahme bei ca. 380 nm zeigt, was auf die

Bildung des Photoaddukts hinweist. Im direkten Vergleich dieser Absorptionsspektren mit denen des DsLOV (Abbildung 10-A) zeigt sich ein deutlicher Unterschied. Während beim Wildtyp der lichtangeregte Zustand mit Hilfe des Spektrums nicht eindeutig nachweisbar war, kann dieser im Falle der Isoleucin-Variante über das einzige Maximum bei 380 nm nachgewiesen werden. Dadurch lässt sich auf eine Verlangsamung der Rückkehrkinetik der Variante schließen. Um diese genauer bestimmen zu können, wurde die DsLOV M49I Photoadduktlebensdauer über die zeitaufgelöste Wiederherstellung der Absorption bei 485 nm bestimmt und die daraus resultierenden Messwerte durch eine exponentielle Regressionskurve ausgewertet (rechtes Diagramm). Aus dieser ergab sich eine Photoadduktlebensdauer  $\tau_{\text{REC}}$  von 153 ( $\pm 0,15$ ) Sekunden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Substitution des Methionins 49 zu Isoleucin eine Verlängerung des Photozyklus um einen Faktor von ungefähr 16 zur Folge hatte. Auf ein komplett gegensätzliches Verhalten weisen die Ergebnisse der Messungen für DsLOV M49S hin, die in Abbildung 10-C dargestellt sind. Bei der Betrachtung der Absorptionsspektren konnten nahezu keine Unterschiede zwischen der belichteten und der unbelichteten Proteinlösungen festgestellt werden. Dies kann zweierlei Gründe haben: (i) die erzeugte Proteinvariante hat aufgrund der Substitution die Fähigkeit zur Bildung des Photoaddukts verloren und verbleibt daher im Grundzustand oder (ii) die Adduktlebensdauer der Variante ist zu kurz, um sie mit Hilfe des Absorptionsspektrums detektieren zu können. Aufschluss darüber konnte durch die Bestimmung der Rückkehrkinetik über die Wiederherstellung der Absorption bei 485 nm nach der Belichtung der Proteinprobe mit Blaulicht erlangt werden. Die daraus resultierende exponentielle Regressionskurve, die im rechten Diagramm der Abbildung 10-C dargestellt ist, ergab eine sehr kurze Lebensdauer  $\tau_{\text{REC}}$  von 1,1 ( $\pm 0,3$ ) Sekunden. Folglich hat die Substitution des Methionins durch Serin an Position 49 der DsLOV-Aminosäuresequenz eine Beschleunigung des Photozyklus um das ca. 8-fache bewirkt. Um die Zugänglichkeit des Chromophors von DsLOV und der Varianten für das umgebende Lösungsmittel zu untersuchen wurden die SIEs bestimmt. Diese repräsentieren den Quotienten aus der in wässrigen und D<sub>2</sub>O-haltigen Puffern gemessenen Photoadduktlebenszeit des jeweiligen Proteins. Der Unterschied zwischen den Lebenszeiten in H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O basiert dabei auf der verlangsamten Deprotonierung des FMN-N5, hervorgerufen durch den Austausch des N5 Protons gegen Deuterium im lichtangeregten Zustand der LOV-Domäne. Etwaige SIE Unterschiede zwischen den DsLOV-Varianten könnte damit ein Hinweis auf veränderte Zugänglichkeiten des FMN-Chromophors für das umgebende Medium liefern.

Um dies zu untersuchen, wurden die drei Proteinlösungen lyophilisiert und anschließend im Ursprungsvolumen D<sub>2</sub>O resuspendiert. Um mögliche Effekte der Lyophilisierung auf die Dunkelrückkehr der jeweiligen Proteine ausschließen zu können, wurden gleichbehandelte Proben in H<sub>2</sub>O resuspendiert, bei deren Analyse sich herausstellte, dass die Lyophilisierung und das anschließende Resuspendieren keinen nennenswerten Effekt auf den jeweiligen Photozyklus besaß.

Wie aus Tabelle 14 hervorgeht, verlängerten sich die Photoadduktlebenszeiten der in D<sub>2</sub>O gelösten Proteine um unterschiedliche Faktoren, die von den SIE repräsentiert werden.

Dabei zeigte die Serin-Variante (DsLOV M49S) den kleinsten SIE-Wert von 4,4 (± 0,3), die Isoleucin-Varianten (DsLOV M49I) mit 6,4 (± 0,2) den größten SIE-Wert, während DsLOV einen mittleren Wert von 5,3 (± 0,1) besaß. Der geringe Wert des DsLOV M49S stellt dabei ein Indiz für eine erhöhte Zugänglichkeit des Chromophors im Protein für das umgebende Medium dar. Dadurch würden die Wechselwirkungen zwischen FMN und Lösungsmittel (z. B. in Form einer externen Base) verbessert, woraus eine verkürzte Adduktlebensdauer resultieren könnte.

**Tabelle 14: Photoadduktlebenszeiten und *Solvent-Isotop Effects* (SIE) von DsLOV, DsLOV M49I und DsLOV M49S**

Mittlere Photoadduktlebenszeiten und Standardabweichungen (in Sekunden), die aus drei voneinander unabhängigen Messungen des Wildtyp DsLOV Proteins sowie zwei verschiedener DsLOV M49-Substitutionsvarianten in Proteinlagerpuffer (2.8.5) bestimmt wurden. Nach der Lyophilisierung der Proteinproben wurden diese im Ausgangsvolumen H<sub>2</sub>O bzw. D<sub>2</sub>O resuspendiert.

Probe	vor der Lyophilisierung	$\tau_{REC}$ (Sek.)		SIE
		gelöst in H <sub>2</sub> O	gelöst in D <sub>2</sub> O	
<b>DsLOV</b>	9,6 (± 0,1)	10,0 (± 0,8)	56,2 (± 6,2)	5,3 (± 0,1)
<b>DsLOV M49I</b>	152,8 (± 0,2)	148,0 (± 2,0)	945,5 (± 21,8)	6,4 (± 0,2)
<b>DsLOV M49S</b>	1,1 (± 0,3)	1,1 (± 0,1)	4,9 (± 0,3)	4,4 (± 0,3)

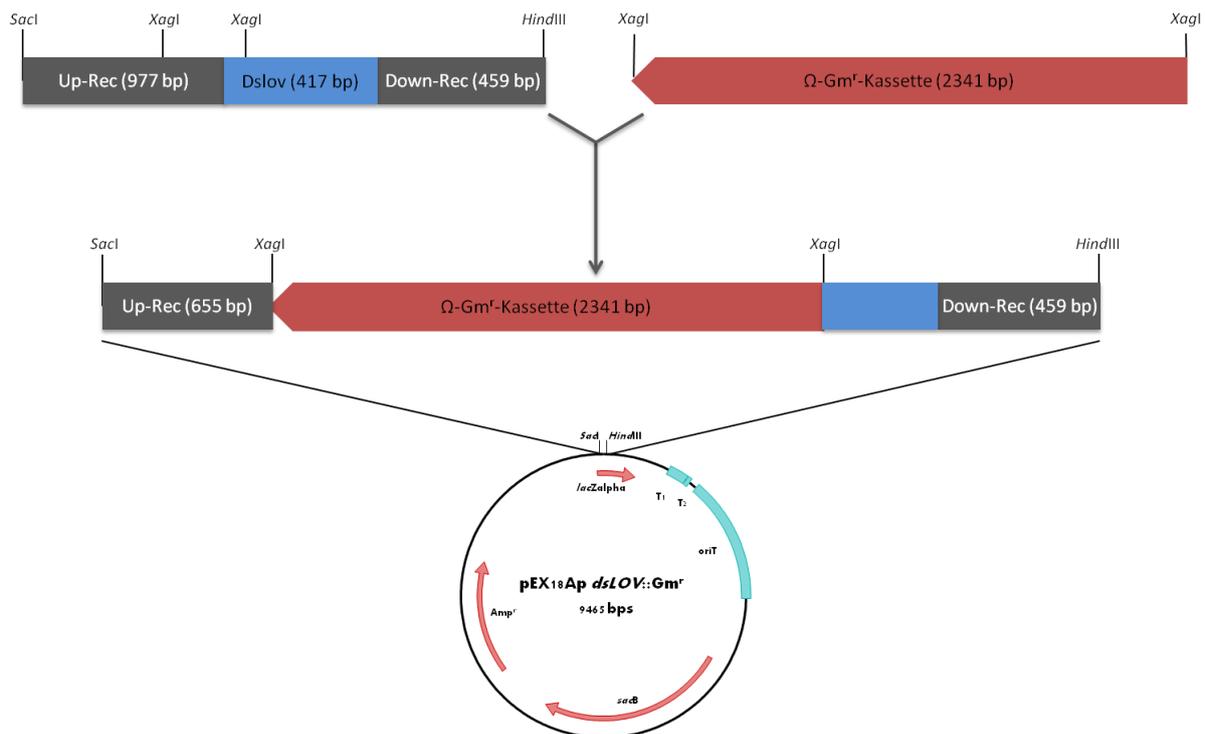
Die beschriebenen Ergebnisse zeigen eindeutig, dass das Methionin an Position 49 im LOV-Photorezeptor DsLOV ein entscheidender Grund für die schnelle Dunkelrückkehr des Proteins ist. Die Substitution dieser Aminosäure durch Isoleucin, das in LOV-Proteinen an dieser Position hoch konserviert ist, führt zu einer Verlängerung der Photoadduktlebensdauer um einen Faktor von ungefähr 16. Ob der Grund für den schnellen Photozyklus des DsLOV auf veränderte strukturelle Destabilisierungseffekte im aktiven Zentrum oder ausschließlich auf eine verbesserte Zugänglichkeit des Chromophors im Protein für das umgebende Lösungsmittel zurückgeht, konnte auf Grundlage dieser Ergebnisse allerdings nicht abschließend geklärt werden.

Mit DsLOV wurde ein neuer photochemisch aktiver LOV-Photorezeptor in dem marinen Bakterium *D. shibae* identifiziert. Im Gegensatz zu den bislang bekannten Vertretern der bakteriellen LOV-Photorezeptorfamilie weist DsLOV einen extrem schnellen Photozyklus mit einer Photoadduktlebensdauer von  $\tau_{\text{REC}} = 9,6$  Sekunden auf. Der Sequenzvergleich von DsLOV mit LOV-Proteinen, die einen langsameren Photozyklus aufweisen, wies auf eine besondere Bedeutung des Methionins an Position 49 hin. Der Austausch des an dieser Stelle ungewöhnlichen Aminosäurerestes durch die konservierte Aminosäure Isoleucin führte zu einer deutlichen Verlangsamung der Photoadduktlebenszeiten ( $\tau_{\text{REC}} = 152,8$  Sekunden). Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass der Methioninrest an Position 49 an dem extrem schnellen Photozyklus von DsLOV beteiligt ist. Überraschenderweise konnte durch die Mutation M49S der Photozyklus von DsLOV noch weiter beschleunigt werden ( $\tau_{\text{REC}} = 1,1$  Sekunden). Anhand der verringerten *solvent-isotope-effects* kann vermutet werden, dass durch diese Mutation die Zugänglichkeit des Chromophors im Protein erhöht wird, wodurch eine verbesserte Wechselwirkung zwischen FMN und dem umgebenden Puffer die Photoadduktlebenszeiten weiter verkürzen könnte.

## 3.2 Untersuchungen zur regulatorischen Funktion des Photorezeptors DsLOV in *D. shibae*

### 3.2.1 Konstruktion einer DsLOV-Insertionsmutante

Das *D. shibae* Gen *dslov* (*dshi\_2006*) kodiert für den LOV-Blaulichtrezeptor DsLOV, dessen photochemische Eigenschaften in den vorangegangenen Abschnitten untersucht wurden. Um feststellen zu können, ob dieses Protein einen lichtabhängigen regulatorischen Einfluss auf die Physiologie von *D. shibae* ausübt, sollte zunächst eine entsprechende *dslov*-Insertionsmutante erzeugt werden. Dazu wurde ein entsprechender *Suicide*-Vektor (pEX18AP *dslov*::Gm<sup>r</sup>, 2.2) zur Mutation des DsLOV im Genom von *D. shibae* sowie ein Vektor zur Komplementation der Mutation (pRhokHi-2 DsLOV, 2.2) erzeugt. Für die Konstruktion des *Suicide*-Vektors wurde mittels PCR ein DNA-Fragment aus isolierter genomischer *D. shibae* DNA amplifiziert. Dieses enthielt neben der DsLOV-kodierenden Gensequenz zusätzlich flankierende DNA-Sequenzen, die das spätere homologe Rekombinationsereignis der Vektor-lokalisierteren DNA mit der chromosomalen DNA ermöglichen sollten. Die eingesetzten Oligonukleotidprimer wurden so gewählt, dass die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *SacI* am 5'-Ende und *HindIII* am 3'-Ende des PCR-Produkts angefügt wurden, wodurch ein PCR-Produkt von 1853 Basenpaaren entstand. Durch einen *SacI* - *HindIII* Doppelrestriktionsverdau und anschließender Ligation wurde dieses DNA-Fragment in die *multiple cloning site* des pEX18Ap *Suicide*-Vektors (Hoang *et al.*, 1998) kloniert. Zur Inaktivierung des *dslov* Gens wurde die  $\Omega$ -Gm<sup>r</sup>-Kassette (Prentki & Krisch, 1984) mittels PCR aus dem Plasmid pWKR202 (2.2) herausamplifiziert, wobei über die verwendeten Primer spezifische Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *XagI* angefügt wurden. Diese 11 Nukleotide umfassende Erkennungssequenz enthielt einen universellen Bereich von fünf aufeinanderfolgenden unspezifischen Nukleotiden (N's), die bei der Herstellung der Amplifikationsprimer so gewählt wurden, dass eine richtungsorientierte (forcierte) Klonierung in die bereits amplifizierte *dslov*-Gensequenz möglich war. In der Zielsequenz waren die *XagI*-Erkennungssequenzen bereits natürlicherweise enthalten und lagen zum Einen außerhalb der *dslov*-Gensequenz, *upstream* des 5'-Endes, zum Anderen innerhalb der DsLOV-kodierenden Sequenz im Bereich der Nukleotidposition 188 bis 199. Durch eine forcierte *XagI* Klonierung der 2341 Bp umfassenden modifizierten  $\Omega$ -Gm<sup>r</sup>-Kassette in die Zielsequenz, ersetzt diese Kassette einen großen 5'-gelegenen Bereich der *dslov*-Sequenz. Dabei wurde der Bereich der Ribosomenbindestelle deletiert wodurch die Desfunktionalisierung des *dslov* bewirkt wurde. Eine schematische Darstellung der Konstruktion des pEX18Ap *dslov*::Gm<sup>r</sup> *Suicide*-Vektors ist in Abbildung 12 dargestellt. Der Klonierungserfolg wurde nach jedem Klonierungsschritt anhand von Restriktionsanalysen und abschließend durch Sequenzierungen bestätigt.



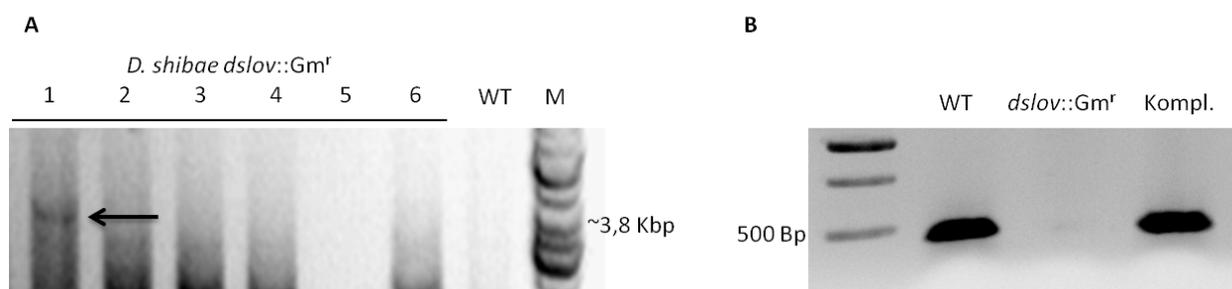
**Abbildung 12: Schematische Darstellung der Erzeugung des pEX18Ap *dslov::Gm<sup>r</sup>* Suicide-Vektors**

Mit Hilfe einer PCR wurde das *dslov*-Gen mit flankierenden *up*- (Up-Rec) und *downstream* (Down-Rec) gelegenen DNA-Sequenzen aus genomischer DNA amplifiziert, die zuvor aus *D. shibae* isoliert wurde. Dabei wurden flankierende Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *SacI* am 5'-Ende bzw. *HindIII* am 3'-Ende an das DNA-Fragment angefügt. Die  $\Omega$ -Gm<sup>r</sup>-Kassette wurde ebenfalls durch eine PCR aus dem pWKR202 amplifiziert und dabei gleichzeitig mit flankierenden *XagI*-Schnittstellen versehen. Diese *XagI*-Schnittstellen wurden durch die Primersequenzen so gewählt, dass eine anschließende richtungsorientierte Ligation in die *XagI*-sites des *dslov*-beinhaltenden DNA-Fragments möglich war. Dieses wurde zuvor in die *multiple cloning site* des pEX18Ap Suicide-Vektor kloniert (*SacI* – *HindIII*). Dabei wurde ein großer N-terminal gelegener Teil der DsLOV-kodierenden Sequenz durch die Kassetten ersetzt, wodurch die Desfunktionalisierung des Gens erreicht wurde. Der Klonierungserfolg wurde durch geeignete Restriktionsanalysen und Sequenzierung bestätigt.

Für die Anfertigung des Komplementationsstamms wurde das *dslov*-Fragment aus dem pRhotHi-2 *dslov* Expressionsvektor (2.2) durch einen *NdeI* – *XhoI* Doppelrestriktionsverdau (2.13.4) isoliert und anschließend in den pRhokHi-2 Vektor ligiert (2.13.7). Dieser ermöglicht durch den *aphII*-Promotor eine konstitutive Expression des *dslov* in *D. shibae*. Nach der Ligation wurde der Klonierungserfolg durch eine erneute Restriktionsanalyse mit *NdeI* und *XhoI* auf einem DNA-Agarosegel (2.13.5) und durch Sequenzierung bestätigt. Anschließend wurden chemisch transformationskompetente *E. coli* ST18 Zellen (2.1.1) mit dem Plasmid transformiert (2.11.5) und dieses durch konjugativen Gentransfer (2.11.5.3) in die Mutante transferiert. Die Selektion auf positiv transformierte Klone erfolgte anschließend über die vom pRhokHi-2 Vektor vermittelte Kanamycinresistenz. Die Kontraselektion der *E. coli* ST18 Zellen erfolgte über die Defizienz dieses Stammes durch Nichtzugabe der 5-Aminolävulininsäure in das Selektionsmedium (Thoma & Schobert, 2009).

Zur Herstellung des *dslov*-defizienten *D. shibae* –Stamms wurden chemisch transformationskompetente *E. coli* ST18 Zellen (2.1.1) mit isolierter pEX18Ap *dslov::Gm<sup>r</sup>* - DNA (2.2) transformiert und diese durch konjugativen Plasmidtransfer (2.11.5.3) in *D. shibae* DFL-12<sup>T</sup> (2.1.2)

Zellen transferiert. Durch die von der  $\Omega$ -Gm<sup>r</sup>-Kassette vermittelte Gentamycinresistenz (Gm<sup>r</sup>) konnte im Anschluss an die Konjugation eine positive Selektion auf *D. shibae* Klone durchgeführt werden, in denen ein homologes Rekombinationsereignis stattgefunden hatte. Durch diese Selektionen wurden 200 Klone isoliert, aus denen durch negative Selektion auf die plasmidvermittelte Ampicillinresistenz sechs Klone identifiziert wurden, bei denen ein doppeltes Rekombinationsereignis stattgefunden haben musste. Um sicherzustellen, dass die Insertion der  $\Omega$ -Gm<sup>r</sup>-Kassette an der gewünschten Stelle im Genom der *D. shibae* Klone erfolgte, wurde eine *Colony*-PCR-Analyse (2.13.9) mit Hilfe von *Primern* durchgeführt, die außerhalb der rekombinanten DNA-Bereiche in der genomischen DNA von *D. shibae* banden und daher bei positiver Insertion der Kassette an der gewünschten Position, ein PCR-Produkt von 3789 Basenpaaren entstehen sollte. Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte auf einem DNA-Agarosegel (2.13.5) analysiert, dessen Ergebnis in Abbildung 13-A dargestellt ist.



**Abbildung 13: PCR-Analysen zur Identifizierung und Verifizierung der *dslov*-Insertionsmutante und des Komplementationstamms.**

**(A)** Durch eine *Colony*-PCR und Einsatz eines Primerpaares, das außerhalb der DNA-Sequenz band, die für die homologe Rekombination genutzt wurden, wurde ein DNA-Fragment amplifiziert, das bei positiver Insertion eine Größe von 3789 Bp besaß. Dieses DNA-Fragment konnte anhand eines getesteten Klons (#1) identifiziert werden. **(B)** Das DNA-Agarosegel zeigt die DNA-Fragmente, die aus der PCR anhand von isolierter genomischer DNA und *dslov*-spezifischen Amplifikationsprimern hervorgingen. Dabei konnten PCR-Produkte mit einer *dslov*-spezifischen Größe von 417 Bp anhand des Wildtyps und des Komplementationstamms, nicht jedoch seitens der Mutante identifiziert werden. WT: Wildtyp, M: Marker (Größenstandard)

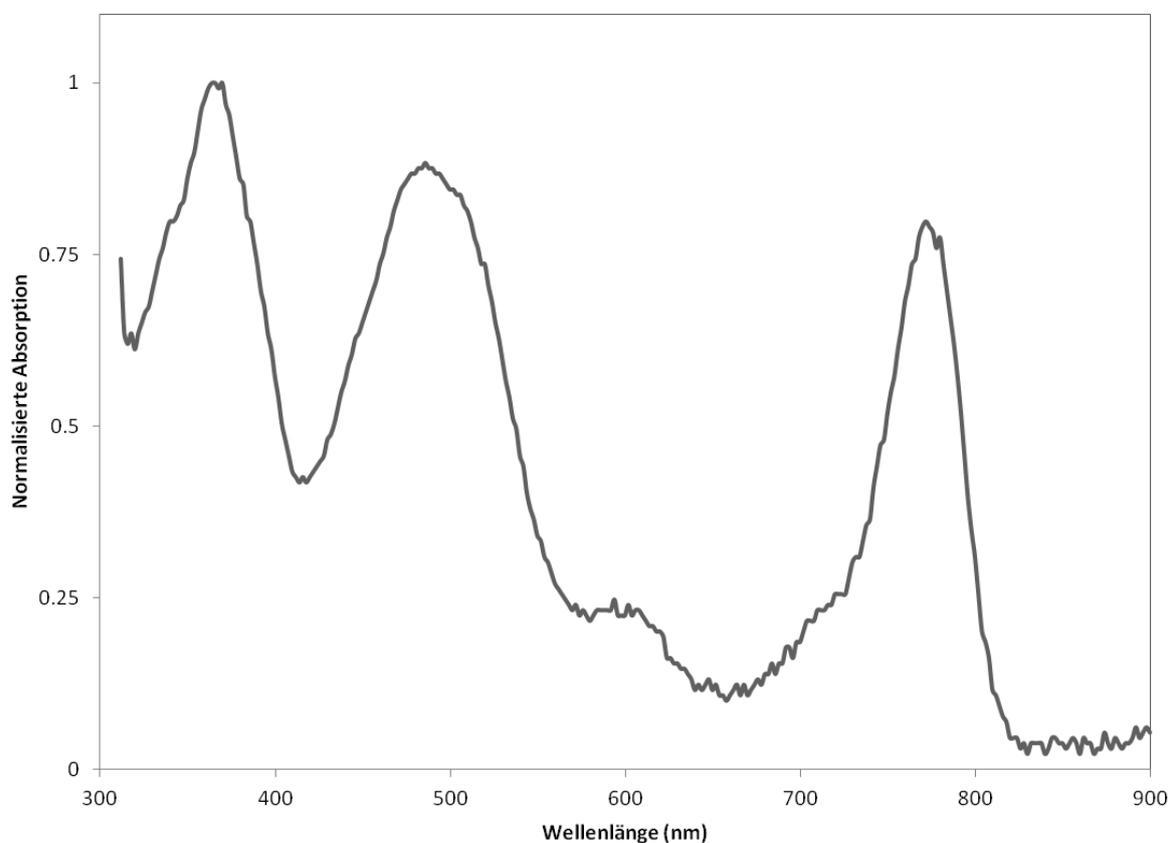
Nach der Amplifizierung konnte in nur einem getesteten Klon (#1) das gewünschte PCR-Produkt bei ca. 3,8 Kbp identifiziert werden. Jedoch war das Ergebnis dieser PCR aufgrund des vergleichsweisen großen Amplikons und der unsauberen Matrizen-DNA nicht zufriedenstellend, da hohe Mengen unspezifischen PCR-Produkts gebildet wurden, weshalb eine erneute PCR mit spezifischen *dslov*-Amplifikationsprimern (2.3.1) durchgeführt wurde. Durch den Einsatz dieser Primer sollte überprüft werden, ob das *dslov* Gen aus isolierter DNA amplifizierbar ist. Es war zu erwarten, dass dieses aus dem Wildtyp normal amplifizierbar sein müsste, während bei der Mutante kein spezifisches PCR-Produkt entstehen dürfte. Aus Zellen des *D. shibae* Wildtyps, der generierten Insertionsmutanten (Klon #1) sowie des Komplementationstamms wurde jeweils die gesamt-DNA isoliert (2.13.3) und zusammen mit den *dslov*-spezifischen Amplifikationsprimern (2.3.1) in eine Standard-PCR eingesetzt

(2.13.8). Das in Abbildung 13-B dargestellte Agarosegel zeigt das positive Ergebnis dieser PCR anhand der spezifischen PCR-Produkte, die beim Wildtyp und der komplementierten Mutante, nicht aber bei der Mutante selbst nachgewiesen werden konnten und die eine spezifische Größe von 417 Bp aufwiesen. Zusammengenommen beweisen die Ergebnisse der beiden durchgeführten PCR-Analysen sowie die zuvor angefertigten Selektionen die erfolgreiche Konstruktion eines *dslov*-defizienten *D. shibae*-Stamms durch die Insertion der  $\Omega$ -Gm<sup>r</sup>-Kassette in die DsLOV-kodierende DNA-Sequenz.

Auf Grundlage des *Suicide*-Vektors pEX18Ap wurde durch Insertion der  $\Omega$ -Gm<sup>r</sup>-Kassette in die DsLOV-kodierende Gensequenz ein Plasmid zur Defunktionalisierung des *dslov* in *D. shibae* erzeugt. Durch homologe Rekombination wurde die Kassette in die genomische DNA von *D. shibae* an der gewünschten Position eingebracht, wodurch ein *dslov*-defizienter Stamm generiert wurde.

### 3.2.2 Einfluss des DsLOV auf die lichtabhängige Regulation der Photopigmentsynthese

*D. shibae* kann aufgrund der Fähigkeit zur aeroben anoxygenen Photosynthese auf zwei unterschiedliche Weisen wachsen. Neben dem heterotrophen Wachstum in Dunkelheit kann dieses Bakterium bei Belichtung zusätzliche Energie aus einem Protonengradienten gewinnen, der durch die Absorption von Licht über Spheroidenon und Bakteriochlorophyll *a* aufgebaut wird. Unter diesen Bedingungen erfolgt die Energiegewinnung sowohl heterotroph als auch phototroph, weshalb die Bezeichnung photoheterotroph zutreffend ist (Biebl *et al.*, 2005; Wagner-Döbler & Biebl, 2006; Yurkov & Beatty, 1998). Aufgrund der spektralen Charakteristika der enthaltenen Photopigmente, die in Abbildung 14 dargestellt sind, ist die Lichtqualität für den photoheterotrophen Lebensstil von entscheidender Bedeutung.



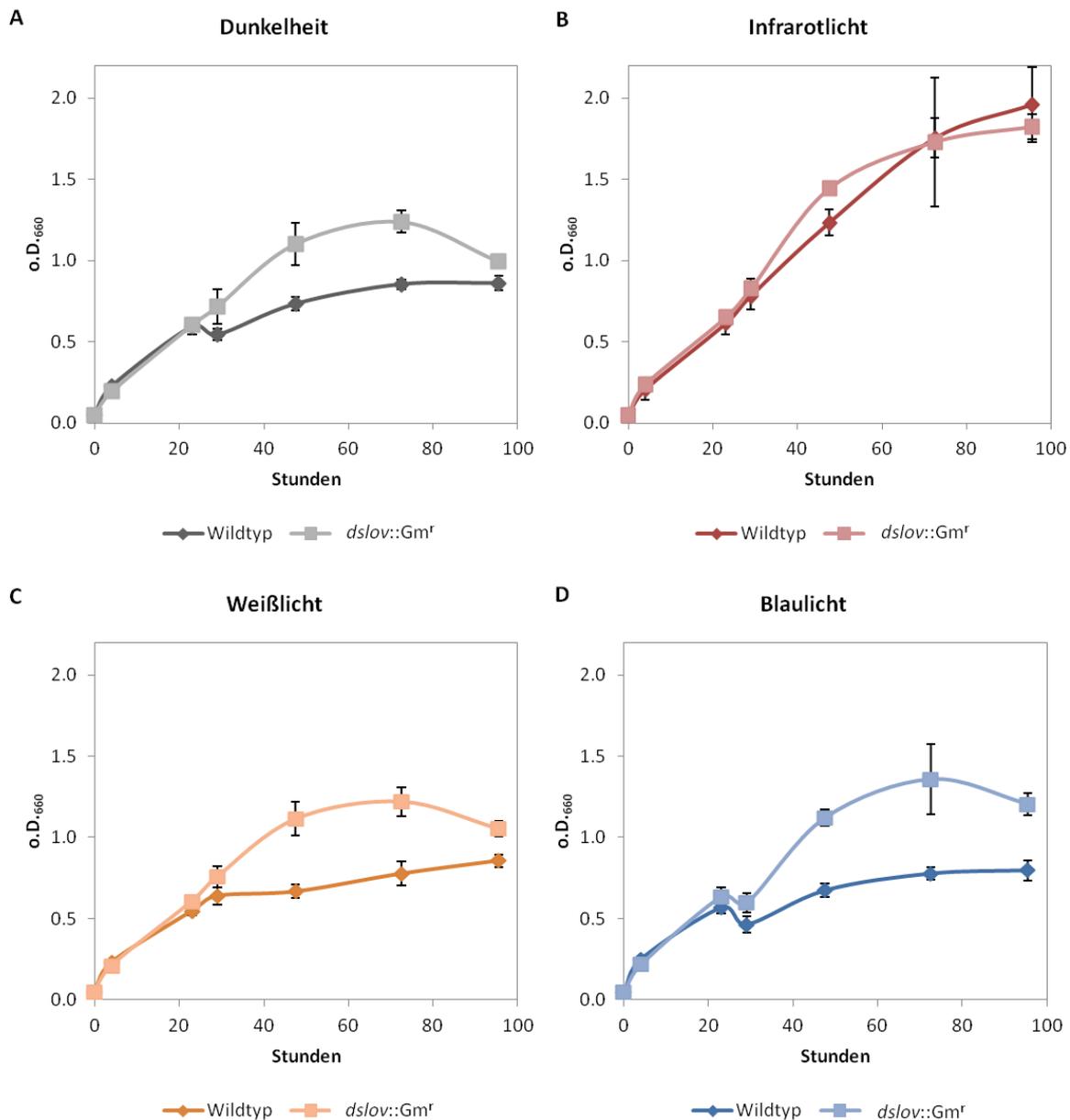
**Abbildung 14: Normalisiertes Absorptionsspektrum der Photopigmente aus in Dunkelheit kultivierten *D. shibae* DFL 12<sup>T</sup> Zellen**

Aus einer in Dunkelheit angezogenen *D. shibae* DFL 12<sup>T</sup> Kultur wurden die Photopigmente isoliert (2.15.2) und anschließend mit Hilfe eines Absorptionsspektralphotometers vermessen. Dabei zeigten sich die für isoliertes Bakteriochlorophyll *a* typischen Maxima bei 370, 600 und 770 nm. Ein weiteres Maximum, das durch das Carotinoid Spheroidenon verursacht wurde, konnte bei 482 nm identifiziert werden. Das abgebildete Spektrum entspricht der Mittelung dreier unabhängiger Einzelspektren.

Spheroidenon absorbiert Licht im Spektralbereich von 400 bis 600 nm mit einem Maximum bei 482 nm. Das Absorptionsmaximum bei 770 nm geht auf das Bakteriochlorophyll *a* in ethanolischer Lösung zurück. Allerdings sind die absorbierenden Eigenschaften dieses Pigments *in vivo* verändert,

so dass Maxima bei 373, 590, 804 und 868 nm entstehen (Biebl *et al.*, 2005). Neben der hauptsächlichlichen Absorption im Infrarotbereich ist Bakteriochlorophyll *a* durch den Soret-Peak (373 nm) in der Lage, ebenfalls Licht im blauen Spektralbereich zu absorbieren. Daher liegen die physiologisch effektiven Wellenlängen für eine photoheterotrophe Anzucht hauptsächlich im blauen Spektralbereich sowie im infraroten Spektrum.

Zunächst sollten Licht-regulierte Wachstumseffekte auf die photoheterotrophe Anzucht von *D. shibae* unter verschiedenen Belichtungsbedingungen untersucht werden. Zur Kontrolle, ob sich evtl. auftretende Effekte auf den LOV-Blaulichtrezeptor DsLOV zurückführen lassen, wurden die Wachstumsstudien ebenfalls mit der *dslov*<sup>-</sup>-Mutante vorgenommen. Für die Belichtung der Bakterienkulturen wurden spezielle Lichtquellen eingesetzt, die die beschriebenen Spektralbereiche bestmöglich abdeckten. Dazu wurden Blaulicht- ( $\lambda = 462 \text{ nm}$ ,  $100 \text{ mW cm}^{-2}$ ) bzw. Infrarotlicht- ( $\lambda = 855 \text{ nm}$ ,  $150 \text{ mW cm}^{-2}$ ) emittierende LED-Paneele (Bergmann, 2011) sowie Tageslicht-imitierende Leuchtstoffröhren (Lumilux Cool Daylight, Osram GmbH, München) eingesetzt. Letztere emittieren Licht über den gesamten Spektralbereich und besitzen daher sowohl Infrarot- als auch Blaulichtanteile. Des Weiteren wurden heterotrophe Kontrollkulturen in vollständiger Dunkelheit untersucht. Für die Wachstumsanalysen wurde der *D. shibae* Wildtyp sowie die Mutante in Marine-Boullion-Flüssigmedium unter ständiger Agitation bei 33 C kultiviert und das Bakterienwachstum in bestimmten Intervallen durch photometrische Trübungsmessung bei einer Wellenlänge von 660 nm mit Hilfe eines Absorptionsphotometers bestimmt (2.11.4). Die aus diesen Experimenten resultierenden Wuchskurven sind in Abbildung 15 dargestellt und zeigen ein weitestgehend gleichmäßiges Wuchsverhalten über die getesteten Lichtbedingungen hinweg. *D. shibae* - Kulturen, die unter Dunkel-, Blaulicht und Weißlichtbedingungen wuchsen, zeigten ein nahezu identisches Wachstum, während die Zellen, die unter Infrarotlichteinfluss kultiviert wurden, deutlich höhere Zelldichten erreichten. Folglich besitzen unterschiedliche Lichtquellen einen Einfluss auf das photoheterotrophe Wachstum von *D. shibae*. Dabei führte lediglich die Kultivierung unter Infrarotlichtbedingungen zu einem verstärktem Wachstum, was auf höhere Energiemengen zurückgeführt werden kann, die aus der optimalen Anregung des Bakteriochlorophylls *a* mit Infrarotlicht resultierten. Verglichen zum Wildtyp verhielt sich die *dslov*<sup>-</sup>-Mutante unter allen getesteten Lichtbedingungen weitestgehend gleich, wenngleich die Zelldichten der Mutante etwas höher lagen. Daraus geht hervor, dass der Blaulichtrezeptor DsLOV keinen Einfluss auf das (photo) - heterotrophe Wachstum von *D. shibae* besitzt.



**Abbildung 15: Wachstumsverhalten des *D. shibae* DFL-12<sup>T</sup> Wildtyps und der *dslov*-Insertionsmutanten bei verschiedenen Belichtungsbedingungen**

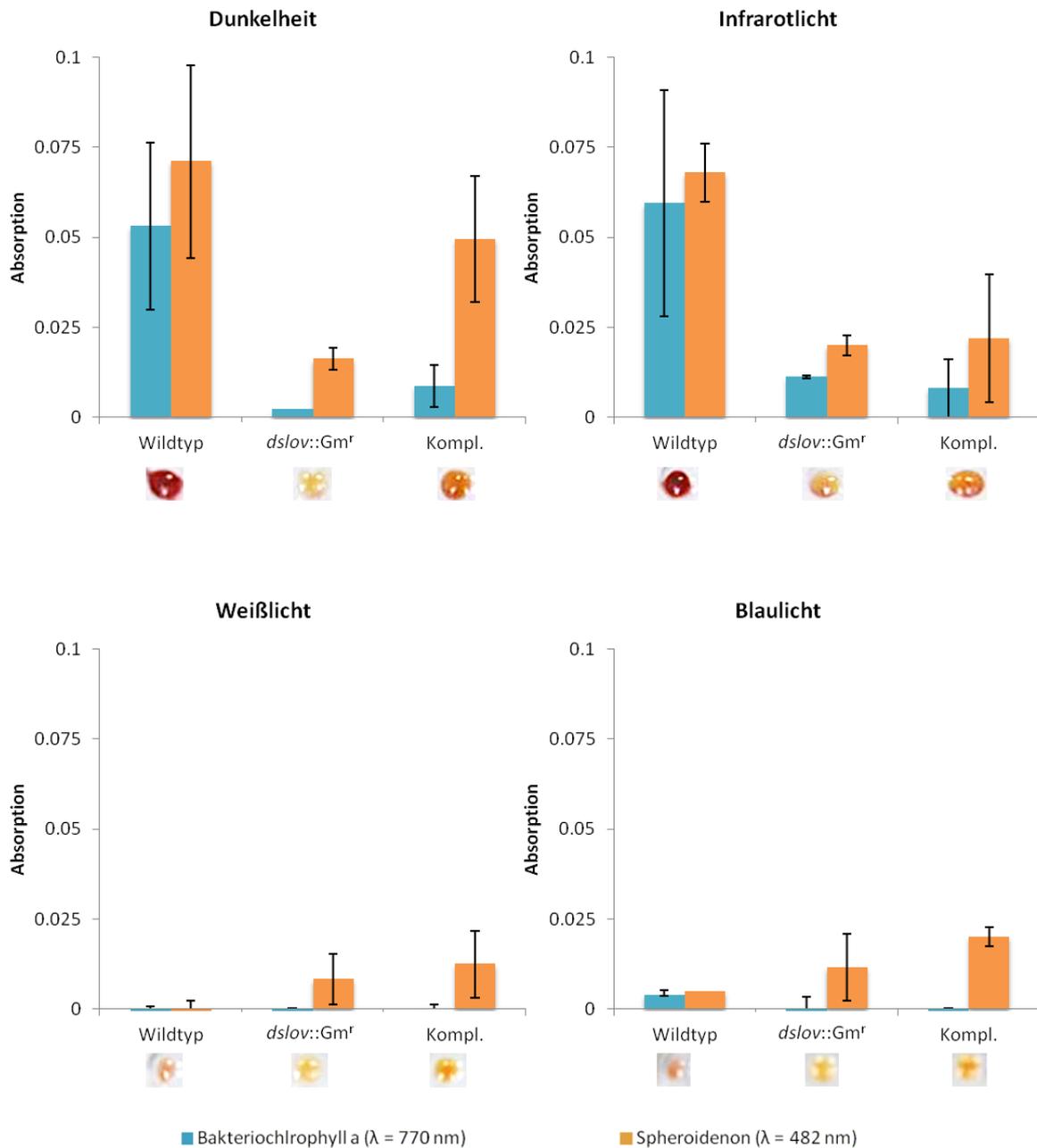
Grafische Darstellung des Wachstums anhand der Zunahme der optischen Dichte bei 660 nm von wildtypischen *D. shibae* DFL-12<sup>T</sup> und der *dslov*-Insertionsmutanten im zeitlichen Verlauf unter (A) Dunkelheit, (B) Infrarot-, (C) Weiß- und (D) Blaulichteinfluss. Die dargestellten Messwerte repräsentieren den Mittelwert dreier voneinander unabhängiger Messungen.

Ein möglicher Grund für die beobachteten Unterschiede zwischen dem photoheterotrophen Wachstumsverhalten des Wildtyps unter Infrarot-, Weiß- bzw. Blaulicht könnte in einer unterschiedlichen intrazellulären Akkumulation der Photopigmente liegen. Während der Durchführung dieser Wachstumsanalysen konnten in Abhängigkeit der jeweiligen Belichtungsbedingungen Unterschiede in der Pigmentierung beobachtet werden, die als fotografische Abbildungen von pelletierten Zellproben in Abbildung 16 dargestellt sind. Diese zeigen eine deutliche rote Pigmentierung des *D. shibae* Wildtyps nach einer Dunkel- bzw.

Infrarotlichtanzucht, wobei Zellen, die unter Blau- und Weißlichtbedingungen kultiviert wurden, eher gelblich-farblos erschienen. Dies zeigt, dass Blaulicht einen inhibitorischen Effekt auf die Photopigmentsynthese in *D. shibae* besitzt. Da die Zellen, die unter Einfluss einer Blaulichtbestrahlung standen, keine Photopigmente synthetisierten, war es ihnen folglich auch nicht möglich, zusätzliche Energie durch die Photosynthese zu gewinnen. Deshalb unterschieden sich die Wachstumseigenschaften dieser Kulturen nicht von der heterotrophen Kontrollanzucht in Dunkelheit. Hingegen war die Pigmentierung der Zellen unter Infrarotlichteinfluss hoch, wodurch die zusätzliche Energiegewinnung mittels Photosynthese möglich war, wodurch die Bakterien unter Infrarotlicht besser wachsen konnten.

Die Tatsache, dass Blaulicht bzw. ein Blaulichtanteil im Weißlicht zur vollständigen Inhibierung der Photopigment-Synthese in den Zellen führte, weist darauf hin, dass dieser Lichtimpuls in die Regulation dieses Prozesses involviert ist. Dadurch stellte sich die Frage, ob der LOV-Blaulichtrezeptor DsLOV an diesem Regulationseffekt beteiligt ist. Dies wurde anhand der Pigmentierungen der *dslov*<sup>-</sup>-Mutante unter den verschiedenen Lichtbedingungen untersucht. Im Gegensatz zum Wildtyp besaß die Mutante unter allen getesteten Lichtbedingungen immer die gleiche gelblich-farblose Pigmentierung, womit sich ein eindeutiger *dslov*<sup>-</sup>-Phänotyp darstellte.

Um diesen Mutanten-Phänotyp genauer Charakterisierung zu können, wurde der *D. shibae* Wildtyp und die Mutante unter den verschiedenen Lichtbedingungen kultiviert. Nach einer 44-stündigen Inkubationsdauer wurden den Kulturen Zellproben entnommen, aus denen anschließend die Photopigmente isoliert und deren Absorptionsspektren mit Hilfe eines Absorptionsspektralphotometers bestimmt wurden (2.15.2). Um die Veränderungen der Photopigmentakkumulationen im *D. shibae* Wildtyp sowie der *dslov*<sup>-</sup>-Mutante besser miteinander vergleichen zu können, wurden lediglich die Absorptionen bei 770 nm für das Bakteriochlorophyll *a* bzw. bei 482 nm für Spheroidenon in Abbildung 16 dargestellt. Dabei fiel auf, dass der Wildtyp unter Dunkel- und Infrarotlichtbedingungen große Mengen an Photopigmenten produzierte, wodurch die intensive rötliche Färbung der Zellen unter diesen Anzuchtbedingungen hervorgerufen wurde. Bei der Kultivierung des Wildtyps unter Blau- bzw. Weißlichtanzucht war hingegen weder Bakteriochlorophyll *a* noch Spheroidenon nachweisbar. Im Vergleich zum Wildtyp produzierte die *dslov*<sup>-</sup>-Mutante unter allen getesteten Lichtbedingungen eine konstant geringe Menge Spheroidenon. Zudem konnte, bis auf ein geringen Level unter Infrarotlichteinfluss, kein Bakteriochlorophyll *a* unter den getesteten Lichteinflüssen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Desfunktionalisierung des *dslov* einen nahezu pigmentfreien Phänotypen hervorbrachte. Daher scheint der Blaulichtrezeptor DsLOV eine Funktion bei der lichtabhängigen Regulation der Photopigmentsynthese zu besitzen.



**Abbildung 16: Akkumulation von Bakteriochlorophyll *a* und Spheroidenon in *D. shibae*, der *dslov*-Insertionsmutante und der komplementierten *dslov*-Mutante unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen**

Nach 44-stündiger Kultivierung des *D. shibae* Wildtyp-Stamms, der *dslov*-Mutanten sowie der komplementierten Mutanten unter verschiedenen Lichtbedingungen wurden aus Zellproben die Photopigmente isoliert (2.15.2) und deren Absorptionsspektren gemessen. Daraus sind die repräsentativen Absorptionen bei 770 nm für das Bakteriochlorophyll *a* (blau) und bei 482 nm für das Carotinoid Spheroidenon (orange) als Balkendiagramme dargestellt. Unter den Diagrammen sind Fotografien der gernteten Zellpellets zur Illustrierung der beobachteten Phänotypen dargestellt.

Um sicherzustellen, dass dieser Effekt durch die Inaktivierung des *dslov* bedingt war und nicht artifizielle Ursachen hatte, wurden die Pigmentakkumulation unter den verschiedenen Lichtbedingungen anhand des bereits zuvor konstruierten *dslov*-Komplementationsstamms untersucht. Durch die Komplementation sollte sich der Mutations-Effekt rückgängig machen lassen.

Dadurch war es zu erwarten, dass die Pigmentierungen des Komplementationsstammes denen des jeweiligen Wildtyps entsprechen müssten. Allerdings erfolgte die Komplementation mit Hilfe von plasmidkodiertem *dslov*, weshalb trotzdem Unterschiede zwischen den beiden Stämmen zu erwarten waren. Diese entstehen durch verschiedene Expressionsraten des nativen Promotors im Wildtyp und dem *aphII*-Promotor des Expressionsplasmids.

Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind ebenfalls in Abbildung 16 dargestellt zeigen. Sie zeigen, dass die komplementierte Mutante unter Weiß- und Blaulichtbedingungen Pigmentierungen zeigte, die denen der Mutante glichen, wobei die gebildeten Menge an Spheroidenon in beiden Fällen geringfügig höher lagen. Wie es auch schon bei der Mutante und dem Wildtyp zuvor beobachtet werden konnte, wurde auch bei der komplementierten Mutante kein Bakteriochlorophyll  $\alpha$  unter diesen Bedingungen produziert. Unter Dunkel- bzw. Infrarotlichtbedingungen lag die gebildete Menge an Bakteriochlorophyll  $\alpha$  ungefähr auf dem Niveau der Mutanten, während die Menge an Spheroidenon im Vergleich, bei der Dunkelanzucht, deutlich höher lag, allerdings nicht den Level des Wildtyps erreichte. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Mutation durch plasmidkodiertes DsLOV prinzipiell erfolgreich komplementiert werden konnte, allerdings nicht zur vollständigen Wiederherstellung der mutanten Phänotypen genügte.

Zusammenfassend zeigen die in Abbildung 16 dargestellten Ergebnisse das blaues Licht - sowohl bei spezifischer Bestrahlung mit Blaulicht-LEDs als auch als Blaulichtanteil im Weißlicht - die Synthese der Photopigmente in *D. shibae* inhibiert. Bei dieser Regulation scheint der LOV-Photorezeptor DsLOV involviert zu sein, da in einer entsprechende Mutante unter allen getesteten Lichtbedingungen keine Photopigmente akkumulierten. Durch eine Komplementation der Mutation war es unter Dunkelbedingungen möglich, den Wildtyp-Phänotypen teilweise wiederherzustellen, wodurch der Einfluss des DsLOV auf die Blaulicht-gesteuerte Pigmentsynthese bestätigt wurde.

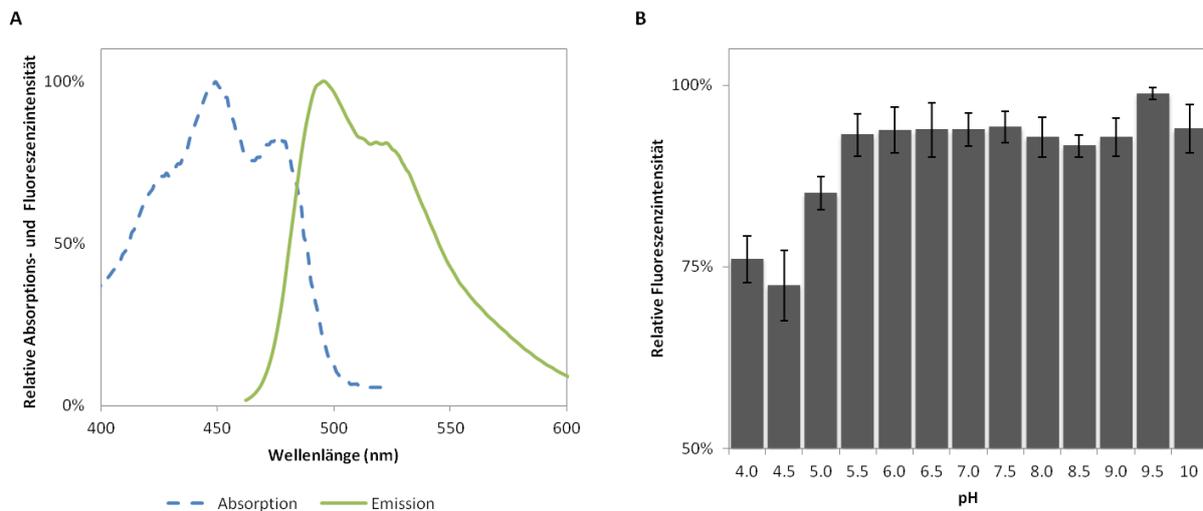
Durch Wachstumsanalysen von *D. shibae* DFL-12<sup>T</sup> Bakterienkulturen unter verschiedenen Belichtungsbedingungen konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Lichtquellen einen Einfluss auf das Wachstum dieses Bakteriums besitzen. Für ein photoheterotrophes Wachstum ist Infrarotlicht die optimale Lichtquelle. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass blaues Licht die Photopigmentsynthese inhibiert. Bei dieser ist der LOV-Photorezeptors DsLOV beteiligt, was mit Hilfe einer *dslov*<sup>-</sup>-Mutante nachgewiesen werden konnte. Daher ist erstmals ein Regulationsphänotyp für einen LOV-Photorezeptor in phototrophen Bakterien identifiziert worden.

### 3.3 Neuartige Flavinmononukleotid-bindende Fluoreszenzreporter

Einleitend wurde erwähnt, dass es durch eine Substitution des photoaktiven Cysteins der LOV-Kerndomäne durch Alanin möglich ist, den Photozyklus der LOV-Blaulichtrezeptoren zu unterbinden, wodurch dauerhaft fluoreszenzaktive Reporterproteine entstehen. In den vergangenen Jahren wurden einige solcher Fluoreszenzreporter generiert (Chapman *et al.*, 2008; Drepper *et al.*, 2007; Shu *et al.*, 2011), die in den späteren Kapiteln auch Gegenstand dieser Arbeit sind. Im Folgenden sollte allerdings zunächst das Repertoire der zur Verfügung stehenden FbFPs durch die Konstruktion eines weiteren Fluoreszenzreporterproteins auf Basis des bereits beschriebenen DsLOV-Blaulichtrezeptors aus *D. shibae* ergänzt werden. Des Weiteren sollen Varianten von bestehenden FbFPs generiert werden, an denen der Einfluss des in Abschnitt (3.1.2) beschriebenen Aminosäureaustauschs auf die photochemischen Eigenschaften dieser FbFPs analysiert werden sollte.

#### 3.3.1 Konstruktion und Charakterisierung von DsFbFP und der Variante DsFbFP M49I

Um der Fragestellung nachzugehen, ob die Konstruktion eines neuartigen FbFP auf Grundlage des LOV-Blaulichtrezeptors DsLOV aus *D. shibae* möglich ist, wurde das entsprechende DsFbFP-kodierende Gen durch die Methode der *overlap-extension-PCR* erzeugt. Dazu wurde die *dslov*-DNA-Sequenz durch die Verwendung geeigneter Oligonukleotidprimer (2.3.1) derart modifiziert, dass das für das photoaktive Cystein kodierende Codon der Ursprungssequenz durch ein für Alanin kodierendes Codon ersetzt wurde. Das aus dieser Reaktionen resultierende 423 Bp umfassenden *dsfbfp*-DNA-Fragment wurden anschließend durch *NdeI* – *XhoI* Doppelrestriktion (2.13.4) und darauffolgender Ligation (2.13.7) in pET28a- Expressionsvektoren kloniert. Das PCR-Produkt wurde durch Sequenzierung (2.3.2) auf seine Fehlerfreiheit überprüft und der Klonierungserfolg durch eine Restriktionsanalyse und anschließender DNA-Gelelektrophorese (2.13.5) überprüft. Zum Zweck der *in vitro* Charakterisierung der photochemischen Eigenschaften des neuen DsFbFP wurden diese durch heterologe Expression in *E. coli* BL21(DE3)-Expressionskulturen hergestellt (2.11.2) und mittels IMAC (2.14.7) isoliert. Anschließend wurden zunächst mit Hilfe von Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektralphotometern die spektralen Eigenschaften dieses Proteins untersucht (2.15.3) und deren Resultate in Abbildung 17-A dargestellt sind.



**Abbildung 17: Grafische Darstellung der spektralen Eigenschaften und der pH-Stabilität des DsFbFP**

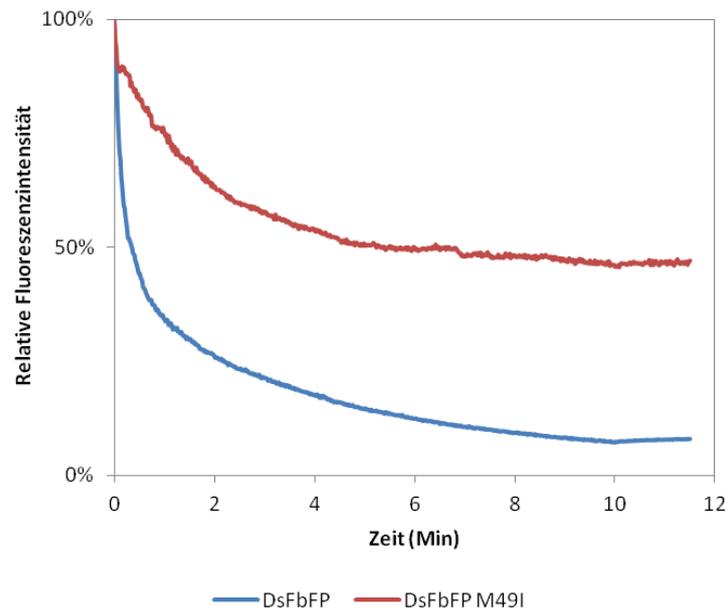
(A) Normalisierte Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren von DsFbFP. Für die Messungen wurde eine Proteinkonzentration entsprechend einer o.D.<sub>450</sub> von 0,1 in eine Quarzküvette überführt und mit Hilfe eines Absorptions- und eines Fluoreszenzspektralphotometers vermessen. Für die Detektion der DsFbFP-vermittelten Fluoreszenz wurde die Proteinlösung bei 450 nm angeregt. (B) Relative Fluoreszenzintensitäten des DsFbFP unter verschiedenen pH-Werten. Die dargestellten Werte spiegeln den Mittelwert dreier unabhängiger Messungen wieder.

Die dort abgebildeten normalisierten Absorptions- und Emissionsspektren (2.15.3) zeigen die für LOV-Domänen typischen Charakteristika mit einem Absorptionsmaximum bei 449 nm und einer maximalen Emission bei 495 nm mit einer kleineren Schulter bei 527 nm. Somit zeigen die Analysen der spektralen Eigenschaften des neuen DsFbFP die erfolgreiche Konstruktion eines neuartigen Fluoreszenzreporterproteins. Für die biotechnologische Anwendbarkeit von Fluoreszenzreportern ist es, besonders bei *in vivo* Applikationen von besonderer Bedeutung, dass die emittierte Fluoreszenz möglichst unabhängig von äußeren Parametern wie z. B. dem pH-Wert ist. Um Aufschluss über die pH-Toleranz der vom DsFbFP emittierten Fluoreszenz zu erhalten, wurde diese bei verschiedenen pH-Bedingungen getestet und vergleichend in Abbildung 17-B dargestellt. Aus dieser geht eine hohe Stabilität mit einer nahezu konstanten Fluoreszenzintensität im pH-Bereich von 5 bis 10 hervor. Im Vergleich zum weitverbreitetsten Fluoreszenzreporter GFP besitzt DsFbFP damit Vorteile bei Anwendungen in schwach-sauren Umgebungen. GFP und GFP-basierte Proteine sind gegenüber diesen pH-Bedingungen stark sensitiv (Bizzarri *et al.*, 2009).

Vor allem für mikroskopische Studien mit Hilfe von Fluoreszenzreportern ist eine hohe Photostabilität der Fluoreszenzemission auch bei hohen Belichtungsdauern und -intensitäten wünschenswert. Die Untersuchungen zum Photozyklus des DsLOV und seiner Variante M49I ergaben eine starke Verlangsamung der Rückkehrkinetik des Proteins durch die Substitution der Aminosäure Methionin an Position 49 durch Isoleucin (vgl. 3.1.2). Die im Zuge dieser Bestimmungen festgestellten SIEs der beiden Proteine ergaben Hinweise auf eine stärkere Abschirmung des Chromophors durch die Proteinumgebung der Variante, was ein Grund für deren verlangsamten

Photozyklus darstellen konnte. Um feststellen zu können, ob diese Mutation ebenfalls zu günstigeren Eigenschaften des Protein bezüglich der Photostabilität führten, wurde auf Grundlage des DsLOV M49I ebenfalls ein neuartiges FbFP, das DsFbFP M49I erzeugt. Die Konstruktion dieses Fluoreszenzreporters erfolgte analog der Erzeugung des DsFbFP mit Hilfe einer *overlap-extension* PCR. Überdies geschah die Klonierung in den pET28a-Expressionsvektor sowie die heterologe Expression in *E. coli* BL21(DE3) und die anschließende Proteinreinigung in gleicher Weise wie zuvor beim DsFbFP. Des Weiteren wurden die spektralen Eigenschaften des DsFbFP M49I in Bezug auf das Absorptions- und Emissionsspektrum sowie der pH-Stabilität bestimmt. Diese unterschieden sich nicht von den zuvor bestimmten Eigenschaften des DsFbFP, die in Abbildung 17 dargestellt sind. Um der Fragestellung nachzugehen, ob der durchgeführte Aminosäureaustausch des Methions 49 zu Isoleucin einen Einfluss auf die Photostabilität des DsFbFP besitzt, wurden diese in *in vitro* Messungen bestimmt. Dazu wurde der Verlust der emittierten Fluoreszenzintensitäten der Proteinlösungen mit Hilfe eines Fluoreszenzspektralphotometers bei andauernder Anregung durch die Bestrahlung mit einer Blaulicht-LED ( $\lambda = 440 \text{ nm}$ ,  $180 \text{ mW cm}^{-2}$ ) bestimmt. Zuvor wurden die Proteinlösungen auf eine Absorption entsprechend einer o.D.<sub>450</sub> von 0,1 eingestellt. Die Anregung der Proteine erfolgte bei 450 nm, während die Emission bei einer Wellenlänge von 495 nm detektiert wurde. Die daraus resultierenden Kinetiken der Licht-abhängigen Fluoreszenzabnahmen sind in Abbildung 18 dargestellt und zeigen, dass die DsFbFP-vermittelte Fluoreszenz durch die andauernde Bestrahlung stark beeinflusst wurde und bereits nach eine Belichtungsdauer von ca. 20 Sekunden auf 50 % des Ausgangswertes fiel. Im weiteren Verlauf des Versuchs nahm diese zwar weniger schnell, aber trotzdem stetig weiter ab bis sich nach ungefähr 10 Minuten ein Grundniveau von ungefähr 10 % des Ausgangswertes einstellte. Im Gegensatz dazu konnte anhand der M49I-Variante eine deutliche Verminderung dieser Abnahme beobachtet werden. Zwar nahm auch diese in den ersten Sekunden der Belichtung stark ab und fiel binnen einer Minute auf 75 % des Startwerts, doch nahm sie im weiteren Verlauf nur noch gering ab, bis sich ein Niveau bei ungefähr 50 % des Ausgangswertes einstellte. Aus den beiden abgebildeten Kurven ergaben sich *Bleaching*-Halbwertszeiten von 0,3 Minuten für DsFbFP bzw. 4,7 Minuten für DsFbFP M49I. In beiden Fällen regenerierten sich die emittierten Fluoreszenzintensitäten nach der Beendigung der Belichtung nicht und verblieben auf dem dargestellten gebleichten Niveau. Diese Ergebnisse zeigen, dass die M49I-Substitution neben der deutlichen Verlangsamung des Photozyklus im DsLOV zu einer signifikant gesteigerten Photostabilität der Fluoreszenzemission des DsFbFP führte. Diese ist aufgrund des stabilen Niveaus von ungefähr 50 % Fluoreszenzintensität unter den bekannten FbFPs einzigartig. Wie bei der Beeinflussung des Photozyklus des DsLOV M49I könnte diese sowohl auf stabilisierende sterische Einflüsse des Chromophors durch die Proteinumgebung des DsFbFP M49I als auch auf eine

verbesserte Abschirmung des Chromophors für das umgebende Lösungsmittel zurückgeführt werden.



**Abbildung 18: Photostabilität der DsFbFP bzw. DsFbFP M49I - vermittelten Fluoreszenzaktivität**

Grafische Darstellung der zeitaufgelösten Fluoreszenz-Ausbleichkinetiken des DsFbFP und des DsFbFP M49I. Für die Messungen wurden Proteinlösungen auf eine Konzentration entsprechend einer o.D.450 von 0,1 eingestellt und deren Fluoreszenzintensitäten bei 495 nm (Anregung bei 450 nm) detektiert, während die Proteinlösungen von oben mit Hilfe einer Blaulicht-LED ( $\lambda = 440 \text{ nm}$ ,  $180 \text{ mW cm}^{-2}$ ) bestrahlt wurden.

Neben der Photostabilität und der Sensitivität gegenüber von Umgebungsfaktoren wie dem pH-Wert ist außerdem die Helligkeit der Fluoreszenzemission ein entscheidendes Kriterium für die Anwendbarkeit der Fluoreszenzreporter in der Biotechnologie. Diese wird hauptsächlich durch den Parameter der Fluoreszenzquantenausbeute, aber auch durch den molaren Extinktionskoeffizienten und der Kofaktorbeladung bestimmt. Daher wurden diese drei charakteristischen Merkmale der beiden neuen Fluoreszenzreporter bestimmt (2.15.4, 2.15.9, 2.15.10). Die aus diesen Messungen hervorgegangenen Ergebnisse sind in der Tabelle 15 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass diese Parameter durch die Substitution nicht wesentlich verändert wurden. Die Fluoreszenzquantenausbeuten von beiden getesteten Proteinen lagen bei 0,31 und die molaren Extinktionskoeffizienten bei 450 nm wurden mit ca.  $14.633 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für das DsFbFP bzw. mit  $14.003 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für die M49I-Variante bestimmt. Allerdings unterschied sich die mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnete Kofaktorbeladung beider Proteine um ungefähr 10 %, wobei die des DsFbFP M49I mit ca. 51 % den höheren Wert erreichte.

Mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von 0,31 ist die Fluoreszenzemission des DsFbFP und der M49I Variante im Vergleich zu den bereits publizierten LOV-Protein-basierten Fluoreszenzreportern effektiv. Pp2FbFP z. B. besitzt nur eine geringe Quantenausbeute von 0,18, während EcFbFP und iLOV

mit 0,39 bzw. 0,44 etwas höhere Fluoreszenzquantenausbeuten zeigen (Chapman *et al.*, 2008; Drepper *et al.*, 2007).

**Tabelle 15: Photochemischen Eigenschaften des DsFbFP und des DsFbFP M49I**

Dargestellt sind die bestimmten Werte der Fluoreszenzquantenausbeuten ( $\Phi_F$ ), der molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{\lambda 450 \text{ nm}}$ ), Kofaktorbeladungen und der *Bleaching*-Halbwertszeiten der Flavinmononukleotid-bindenden Fluoreszenzreporterproteine DsFbFP und DsFbFP M49I.

Fluoreszenzreporter	$\Phi_F$	$\epsilon_{\lambda 450 \text{ nm}}$ ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	Kofaktorbeladung	<i>Bleaching</i> $t_{1/2}$ (Min)
<b>DsFbFP</b>	0,31 ( $\pm 0,02$ )	14633 ( $\pm 27$ )	41 %	0,3
<b>DsFbFP M49I</b>	0,31 ( $\pm 0,02$ )	14003 ( $\pm 513$ )	51 %	4,7

Auf Grundlage des LOV-Blaulichtrezeptors DsLOV aus *D. shibae* wurden durch Methoden der gerichteten Mutagenese zwei neuartige Flavinmononukleotid-bindende Fluoreszenzreporterproteine DsFbFP und DsFbFP M49I erzeugt, indem das photoaktive Cystein der LOV-Kerndomäne durch Alanin ersetzt wurde. Die *in vitro* Bestimmungen der photochemischen Eigenschaften beider Proteine ergaben für beide Varianten eine Fluoreszenzquantenausbeute von 0,31 und eine hohe pH-Stabilität im getesteten Bereich von pH 6 bis 10. DsFbFP M49I zeigte eine hohe Photostabilität und behielt auch bei andauernden Blaulichtanregung eine Fluoreszenzintensität die einem relativen Wert von 50 % der Ursprungsemission entsprach. Diese könnte auf eine verbesserte Abschirmung des Chromophors durch die Proteinumgebung zurückgehen.

### 3.3.2 Konstruktion und Charakterisierung von Pp2FbFP L30M

Im vorangegangenen Abschnitt wurde ein starker Einfluss der Substitution von Methionin durch Isoleucin an der Position 49 des DsFbFP auf die Photostabilität des Proteins festgestellt, wobei die Variante eine deutlich höhere Stabilität der Fluoreszenzemission aufwies. Im Anschluss daran sollte anhand eines anderen FbFPs überprüft werden, ob sich dessen Fluoreszenzbleachingverhalten ebenfalls durch einen Aminosäureaustausch an der entsprechenden Aminosäureposition durch Methionin destabilisieren lässt, was am Beispiel des Pp2FbFP untersucht werden sollte. Mit Hilfe eines Aminosäuresequenzalignments (siehe Anhang) mit DsFbFP wurde die entsprechende Position (As 30) in der Sequenz des Pp2FbFP identifiziert, an der sich ein Leucin befindet. Auf Grundlage von isolierter pET28a Pp2FbFP Plasmid-DNA (2.2) als Template wurde durch Einsatz von geeigneten Oligonukleotidprimern (2.3.1), die die DNA-Sequenz für die gewünschte Aminosäuresubstitution trugen, das 465 Bp umfassende DNA-Fragment *pp2fbfp l30m* durch eine *overlap-extension* PCR (2.13.8) erzeugt. Nach der erfolgreichen PCR wurde das Genprodukt mittels *NdeI* - *XhoI* Doppelrestriktion (2.13.4) und anschließender Ligation (2.13.7) in den pET28a Expressionsvektor kloniert, wobei der Erfolg der Klonierung durch eine geeignete Restriktionsanalyse auf einem DNA-Agarosegel (2.13.5) und mittels Sequenzierung (2.3.2) überprüft wurde. Für die weiteren *in vitro* Analysen der Pp2FbFP Variante L30M wurde dieses im heterologen Expressionswirt *E. coli* BL21(DE) exprimiert (2.11.2) und anschließend mittels IMAC (2.14.7) gereinigt. Zu Beginn der photochemischen Charakterisierung der neuen Proteinvariante wurden die spektralen Eigenschaften des Pp2FbFP L30M bestimmt (2.15.3). Dabei zeigte das Protein weiterhin die FbFP-typischen Spektraleigenschaften (vgl. Spektren des DsFbFP in Abbildung 17-A) mit einem Absorptionsmaximum von 449 nm und einem Fluoreszenzmissionsmaximum im grün-gelben Spektralbereich bei 495 nm. Ebenfalls war das lokale Maximum bei 527 nm erkennbar. Um herauszufinden, ob der durchgeführte Aminosäureaustausch die Fluoreszenzeigenschaften des Proteins beeinflusste, wurden die Fluoreszenzquantenausbeuten (2.15.4), molare Extinktionskoeffizienten bei 450 nm (2.15.9) und Kofaktorbeladungen (2.15.10) des Pp2FbFP L30M und des Pp2FbFP bestimmt. Die resultierenden Ergebnisse sind in Tabelle 16 vergleichend dargestellt. Es stellte sich heraus, dass die Fluoreszenzquantenausbeute nur gering durch den Aminosäureaustausch von Leucin durch Methionin beeinflusst wurde, da sich die Werte der beiden Proteinvarianten um lediglich 2 % unterschieden. Mit 0,18 (Pp2FbFP) und mit 0,2 (Pp2FbFP L30M) besitzen diese FbFPs die schwächsten Fluoreszenzquantenausbeuten im Vergleich zu anderen beschriebenen LOV-Fluoreszenzreportern (vgl. Tabelle 1). Des Weiteren stimmt der hier bestimmte Wert der Fluoreszenzquantenausbeute des Pp2FbFP mit dem Literaturwert von 0,17 (Drepper *et al.*, 2007; Mukherjee *et al.*, 2012) nahezu überein.

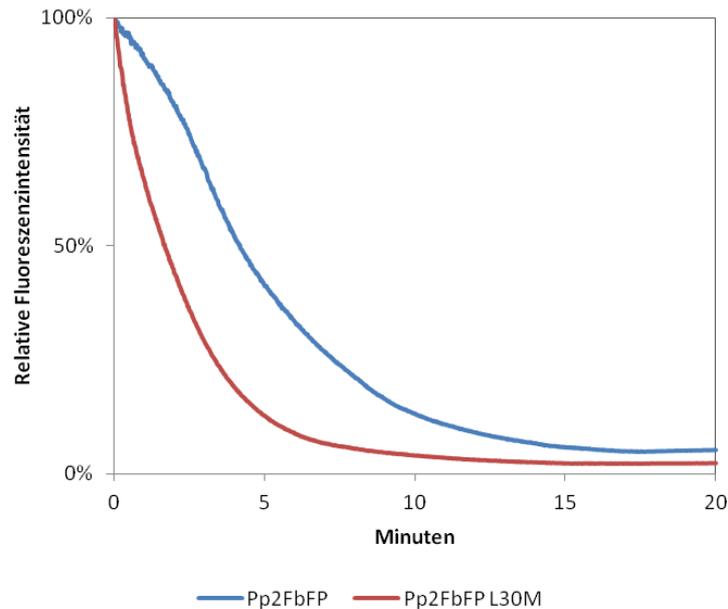
Die molaren Extinktionskoeffizienten bei 450 nm der beiden Proteine unterschieden sich faktisch nicht, da die Differenz der gemessenen Werte die berechnete Standardabweichung nicht überschritt. Die mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes berechneten Kofaktorbeladungen variierten hingegen zwischen den beiden getesteten Fluoreszenzreportern, wobei die neu erzeugte Variante eine Beladung von 49 % besaß, während der Wert des Pp2FbFP mit 29 % deutlich geringer ausfiel. Wie es auch schon anhand der DsFbFP und der M49I-Variante zuvor beobachtet werden konnte (3.3.1), führte der Aminosäureaustausch nicht zu einer Veränderung der photochemischen Eigenschaften des Proteins.

**Tabelle 16: Photochemischen Eigenschaften der LOV-basierten Fluoreszenzreporter Pp2FbFP und dessen Variante Pp2FbFP L30M**

Dargestellt sind die bestimmten Werte der Fluoreszenzquantenausbeuten ( $\Phi_F$ ), der molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{\lambda 450 \text{ nm}}$ ), Kofaktorbeladungen und der *Bleaching*-Halbwertszeiten der Flavinmononukleotid-bindenden Fluoreszenzreporterproteine Pp2FbFP und Pp2FbFP L30M.

Fluoreszenzreporter	$\Phi_F$	$\epsilon_{\lambda 450 \text{ nm}}$ ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	Kofaktorbeladung	<i>Bleaching</i> $t_{1/2}$ (Min)
<b>Pp2FbFP</b>	0,18 ( $\pm 0,02$ )	13356 ( $\pm 774$ )	29 %	4,2
<b>Pp2FbFP L30M</b>	0,20 ( $\pm 0,02$ )	14084 ( $\pm 743$ )	49 %	1,7

Um der eingangs gestellten Frage nachzugehen, ob die Substitution des Leucin zu Methionin an der Aminosäureposition 30 der Pp2FbFP-Primärsequenz zu einer verstärkten Photostabilität des Proteins führte, so wie es für das DsFbFP beobachtet werden konnte, wurde diese in einer zeitaufgelösten Fluoreszenzintensitätsmessung analog bestimmt. Die aus diesen Messungen resultierenden Kinetiken sind in Abbildung 19 dargestellt und zeigen, dass auch in diesem Fall der Aminosäureaustausch nach Methionin zu einer Destabilisierung der Fluoreszenzemission bei andauernder Blaulichtbestrahlung führte. Dabei nahm die emittierte Fluoreszenz der Methionin-Variante nach dem Beginn der Belichtung ab und betrug nach 1,7 Minuten nur noch die Hälfte der zu Anfangs beobachteten Intensität, wobei das Pp2FbFP diesen Wert (*Bleaching*-Halbwertszeit) erst nach ungefähr 4,2 Minuten erreichte. Allerdings bleichten beide Proteine bis auf ein ähnliches Grundniveau von ungefähr 2 % bis 5 % aus, wobei die neu erzeugte Variante dieses bereits nach etwas mehr als 10 Minuten Belichtungsdauer erreichte, was beim wildtypischen Pp2FbFP hingegen ungefähr 16 Minuten benötigte. Nach Beendigung der Blaulichtbestrahlung der Proteinlösungen konnte die emittierte Fluoreszenzintensität nicht wieder gesteigert werden.



**Abbildung 19: Photostabilität der Pp2FbFP bzw. Pp2FbFP L30M - vermittelten Fluoreszenzaktivität**

Grafische Darstellung der zeitaufgelösten Fluoreszenz-Ausbleichkinetik des Pp2FbFP und des Pp2FbFP L30M. Für die Messungen wurden Proteinlösungen auf eine Konzentration entsprechend einer o.D.450 von 0,1 in Proteinlagerpuffer eingestellt und deren Fluoreszenzintensitäten bei 495 nm (Anregung bei 450 nm) detektiert. Während der Messung wurden die Proteinlösungen mit Hilfe einer Blaulicht-LED ( $\lambda = 440 \text{ nm}$ ,  $180 \text{ mW cm}^{-2}$ ) von oben bestrahlt.

Durch die Verkürzung der *Bleaching*-Halbwertszeiten von 4,2 Minuten (Pp2FbFP) auf 1,7 Minuten (Pp2FbFP L30M) konnte gezeigt werden, dass die durchgeführte Substitution zur Verminderung der Photostabilität dieses Proteins führte, was die Beobachtungen der entsprechende Mutation des DsFbFP bestätigt (vgl. 3.3.1). Folglich sind die Proteinvarianten, die an der beschriebenen Aminosäureposition ein Leucin bzw. Isoleucin besitzen gegenüber dem *Photobleaching* stabiler, während die jeweiligen Methionin-Varianten sensibler erscheinen. Das Pp2FbFP zeigt eine ähnliche Stabilität die das DsFbFP M49I (4,7 Minuten). Allerdings führt die andauernde Anregung des Pp2FbFP zum nahezu vollständigen Aktivitätsverlust während DsFbFP M49I eine konstante Aktivität behält (vgl. Abbildung 18 und Abbildung 19). Daher besitzt das Pp2FbFP aufgrund der hohen Halbwertszeit passende Eigenschaften zur Anwendung als Fluoreszenzreporter, doch ist das DsFbFP M49I wegen der konstanten Restaktivität für solche Analysen vorzuziehen.

Nachdem aus einem Aminosäureaustausch von Methionin zu Isoleucin im DsFbFP eine Erhöhung der Photostabilität des Proteins resultierte, konnte dieser Effekt durch Rückmutation im LOV-Fluoreszenzreporter Pp2FbFP bestätigt werden. Durch eine Substitution von Leucin durch Methionin wurde die Photostabilität des Proteins negativ beeinflusst, was eine Verkürzung der *Bleaching*-Halbwertszeit um einen Faktor von 2,5 zur Folge hatte.

### 3.4 LOV-basierte Fluoreszenzproteine und deren Eigenschaften als Photosensibilisatoren

Fluoreszenzaktive Proteine wie das GFP (*green fluorescent protein*) aus *Aquorea victoria* emittieren nicht nur elektromagnetische Strahlung (Fluoreszenz) als Reaktion auf eine spezifische Anregung, sondern generieren ebenfalls Sauerstoffradikale als Nebenprodukt ihrer Aktivität (Greenbaum *et al.*, 2000; Jiménez-Banzo *et al.*, 2008). Die Effektivität der Radikalproduktion hängt dabei hauptsächlich von der Zugänglichkeit des Chromophors für molekularen Sauerstoff sowie den *Quenching*-Eigenschaften der direkten Proteinumgebung ab (Carpentier *et al.*, 2009; Jiménez-Banzo *et al.*, 2010; Pletnev *et al.*, 2009; Roy & Carpentier, 2010). Ein in dieser Hinsicht sehr effizienter Sauerstoffradikalproduzent ist das rotfluoreszierende GFP-homologe Fluoreszenzprotein KillerRed, mit dessen Hilfe gezielt Protein- bzw. Zellstrukturen inaktiviert oder gesamte Zellen abgetötet werden können (Bulina *et al.*, 2006a, b).

LOV-basierte Fluoreszenzproteine (LOV-FP) wie die Flavinmononukleotid basierte Fluoreszenzproteine (FbFPs) benötigen für ihre Fluoreszenzaktivität den Kofaktor FMN, den sie nichtkovalent binden (Drepper *et al.*, 2007). Flavine sind sehr wirkungsvolle Photosensibilisatoren (Liang *et al.*, 2013) mit Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten ( $\Phi_{\Delta}$ ) von ungefähr 50 % (Baier *et al.*, 2006). Ob sich diese phototoxischen Eigenschaften der Flavine auf die Fluoreszenzreporterproteine übertragen lassen und mit welcher Effektivität Sauerstoffradikale durch die FbFPs generiert werden, soll im Folgenden mittels vergleichenden *in vivo* und *in vitro* Studien untersucht werden.

#### 3.4.1 Erzeugung von Vektoren für die konstitutive Expression von LOV-FP-Genen

Für die *in vivo* Analyse einer möglichen, durch Lichtbestrahlung ausgelösten, phototoxischen Wirkung der LOV-FPs auf Bakterienzellen wurde zunächst ein Set aus Expressionsvektoren zur *aphII*-Promotor abhängigen, konstitutiven Expression der zu untersuchenden Fluoreszenzproteine erstellt. Für die folgenden Studie wurden die bereits publizierten LOV-FPs Pp2 und EcFbFP, phiLOV2.1 (Christie *et al.*, 2012a) sowie miniSOG eingesetzt (vgl. Tabelle 1). Zusätzlich wurden die phototoxischen Eigenschaften von Pp1FbFP, das auf PpSB1-LOV aus *P. putida* basiert sowie von DsFbFP, das in dieser Arbeit neu konstruiert wurde (3.3.1) analysiert. Durch diese vielseitige Auswahl an LOV-FPs wird ein möglichst großes Spektrum dieser Proteingruppe abgedeckt. Da miniSOG bisher der einzige beschriebene LOV-basierte Photosensibilisator ist, dient dieser als Referenz. Neben den bakteriellen LOV-FPs Ds-, Ec-, Pp1- und Pp2FbFP dient phiLOV2.1 als ein Beispiel für einen pflanzlichen Fluoreszenzreporter, der eine hohe Photostabilität besitzt. Des Weiteren basiert das phiLOV2.1 auf der selben LOV-Domäne wie der *photosensitizer* miniSOG und könnte daher ebenfalls phototoxische Eigenschaften besitzen.

Für die Konstruktion der Expressionsplasmide wurden die LOV-FP-kodierenden Gene in den pRhokHi-2 Vektor kloniert, der neben der konstitutiven  $P_{ahpII}$ -abhängigen Genexpression auch die Möglichkeit der Fusion eines C-terminalen His<sub>6</sub>-Tags an das Zielprotein ermöglicht, durch den anschließend eine Proteinreinigung mittels immobilisierter Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) sowie eine einfache immunologische Detektion der Zielproteine mittels Western-Blot Analyse unter Einsatz eines His-Tag spezifischen Antikörpers möglich ist. Die Konstrukte pRhokHi-2 Pp2FbFP (Heck, Diplomarbeit), pRhokHi-2 phiLOV2.1 (M. Wingen, *unveröffentlicht*), pRhokHi-2 DsFbFP (3.3.1) und pRhokHi-2 EcFbFP (J. Potzkei, *unveröffentlicht*) lagen bereits vor, so dass lediglich die entsprechenden Konstrukte für Pp1FbFP und miniSOG erstellt wurden. Das Pp1FbFP-kodierende Gen wurde unter Verwendung geeigneter Oligonukleotidprimer (2.3.1) mittels PCR aus dem Vektor pET28a Pp1FbFP (F. Circolone, *unveröffentlicht*) amplifiziert, wobei die Primermoleküle so gewählt wurden, dass an das *pp1fbfp* flankierende Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI* fusioniert wurden, um später eine Klonierung mittels dieser Enzyme in die *multiple cloning site* (MCS) des Zielvektors zu ermöglichen. Des Weiteren wurde durch das Design des 3'-gelegenen Primers das Stopp-Codon entfernt, wodurch die Fusion der C-terminalen His-Tag kodierenden Sequenz an das Zielgen erfolgte. Nach der PCR (2.13.8) wurde die amplifizierte DNA mittels der Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI* hydrolytisch gespalten (2.13.4) und in den ebenfalls hydrolysierten Zielvektor pRhokHi-2 ligiert (2.13.7).

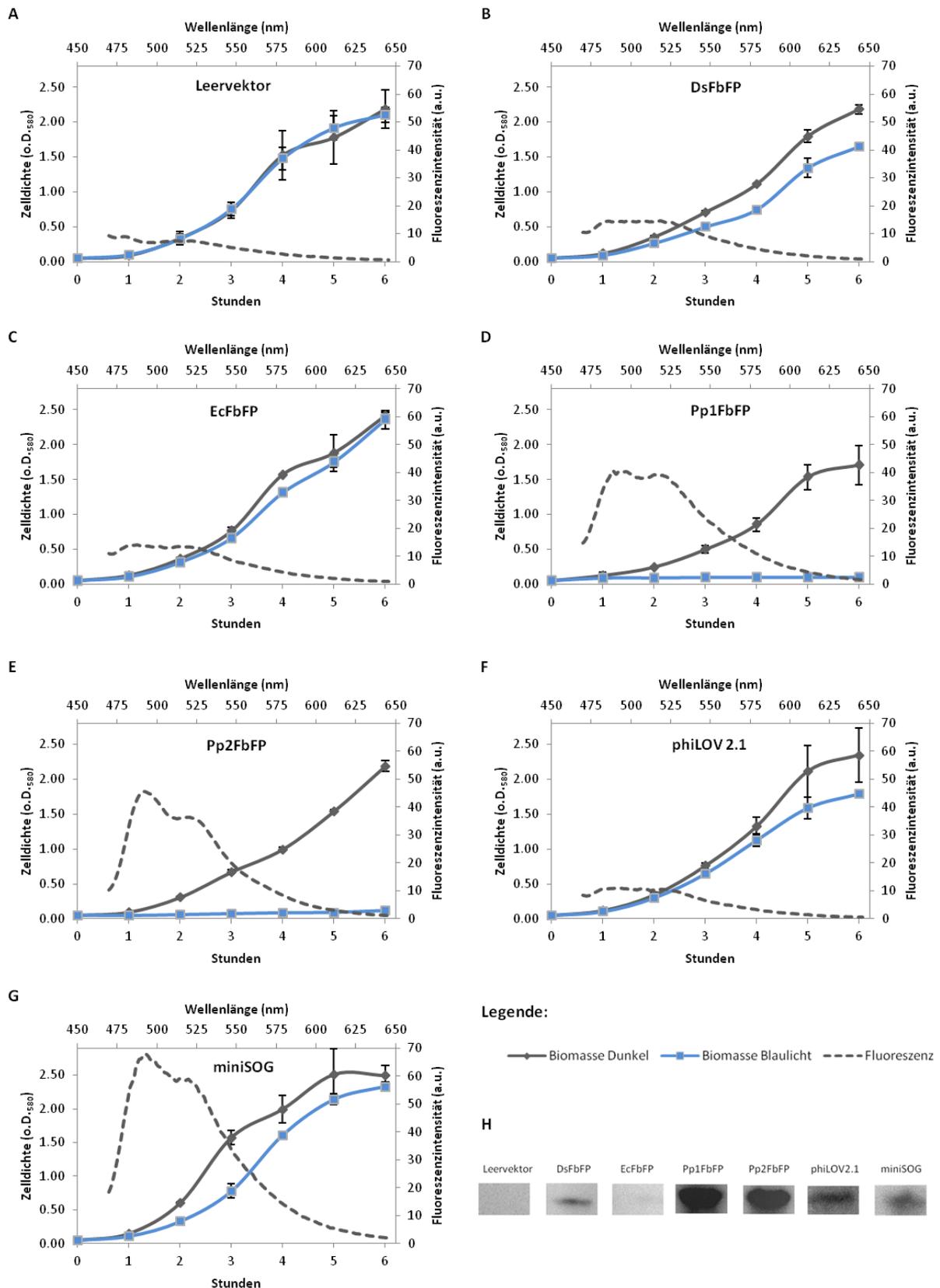
Die *minisog* DNA-Sequenz wurde durch Gensynthese (MWG Eurofins, Ebersberg) mit den entsprechenden flankierenden Erkennungssequenzen für einen enzymatischen Verdau mittels *NdeI* und *XhoI* erstellt und nach erfolgter Hydrolyse in den pRhokHi-2 Expressionsvektor ligiert. In beiden Fällen wurde der Klonierungserfolg mittels geeigneter Restriktionsanalyse (*NdeI* und *XhoI*) durch ein DNA-Agarosegel und anschließender Sequenzierung (2.3.2) überprüft und bestätigt.

Nach der erfolgten Klonierung stand ein Set an pRhokHi-2 Expressionsvektoren für die konstitutive Expression der folgenden LOV-FPs zur Verfügung, die eine *in vivo* Phototoxizitätsanalyse in *E. coli* ermöglichten:

- DsFbFP
- EcFbFP
- miniSOG
- phiLOV2.1
- Pp1FbFP
- Pp2FbFP

### 3.4.2 Einfluss der LOV-FPs auf das Wachstum von *E. coli* unter Blaulichtbestrahlung

Zur Analyse, ob die Expression der verschiedenen LOV-FP-Gene einen Effekt auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* Kulturen ausübt, wurden chemisch transformationskompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen mit den entsprechenden Expressionsvektoren (3.4.1) transformiert. Das Wachstumsverhalten der LOV-FP-exprimierenden Kulturen wurde wie in (2.11.6) beschrieben über einen Zeitraum von sechs Stunden verfolgt. Um sicherzustellen, dass die Belichtung keinen Effekt auf das bakterielle Wachstum von *E. coli* ausübt, wurde ebenfalls das Wachstum einer mit dem pRhokHi-2 Leervektor transformierten Kultur analysiert. Die aus diesen Versuchen resultierenden Ergebnisse sind in Abbildung 20-A dargestellt. Aus dem Wachstumsverhalten der mit dem Leervektor transformierten *E. coli* Kulturen geht hervor, dass die Bestrahlung mit Blaulicht keinerlei Einfluss auf das Wachstum der Bakterien ausübt, da beide Wuchskurven (Dunkel- und Blaulichtkultur) nahezu deckungsgleich verlaufen. Ebenfalls zeigt die Bestrahlung der EcFbFP-exprimierenden Kultur (Abbildung 20-C) keinen Effekt auf das Bakterienwachstum. Geringe wachstumsverzögernde Einflüsse konnten hingegen bei blaulichtbestrahlten Kulturen beobachtet werden, die phiLOV2.1 (Abbildung 20-F), DsFbFP (Abbildung 20-B) und miniSOG (Abbildung 20-G) exprimierten. Bei diesen Versuchen lagen die Zelldichten der belichteten Kulturen unterhalb derer der jeweiligen Dunkelkontrollen, auch wenn sich diese Effekte wie beim phiLOV2.1 oder dem DsFbFP nur sehr gering darstellten. Im Gegensatz dazu konnten starke Effekte auf das Wachstumsverhalten von Pp1FbFP- (Abbildung 20-D) sowie Pp2FbFP- (Abbildung 20-E) exprimierenden *E. coli* Kulturen nachgewiesen werden, die durch die Belichtung hervorgerufen wurden. In beiden Fällen konnte ein normales Zellwachstum unter Dunkelbedingungen beobachtet werden, während es zu keiner Zunahme der Biomasse in den Kulturen kam, die einer Blaulichtbestrahlung ausgesetzt waren.



**Abbildung 20: Einfluss von Blaublicht auf das Wachstum von konstitutiv LOV-FP-exprimierenden *E. coli* DH5 $\alpha$  Kulturen**

Chemisch transformationskompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen wurden, für die konstitutive Expression, mit pRhokHi-2 LOV-FP Expressionsplasmiden transformiert. Ausgehend von jeweils einem Klon wurden über Nacht Kulturen hergestellt, aus denen 50 ml LB-Km-Testkulturen auf eine o.D.<sub>580</sub> von 0,05 beimpft wurden.

Anschließend wurden die Kulturen in temperierbare Inkubationshauben bei 37 °C zwischen Blaulicht-LED-Platinen ( $\lambda = 462 \text{ nm}$ ) platziert. Zur Kontrolle wurden analoge Testkulturen unter gleichen Bedingungen in Dunkelheit inkubiert. Über einen Zeitraum von sechs Stunden wurde die Zunahme der Biomassen der mit dem Leervektor transformierten Zellen (**A**) sowie der DsFbFP (**B**), EcFbFP (**C**), Pp1FbFP (**D**), Pp2FbFP (**E**) phiLOV2.1 (**F**) und miniSOG (**G**) exprimierenden Zellen mit Hilfe photometrischer Trübungsmessungen analysiert und gegen die Zeit dokumentiert (durchgehende Linien). Des Weiteren wurde am Ende der Versuchsreihe die *in vivo* Fluoreszenz der Testkulturen analysiert (gestrichelte Linien) und die Akkumulation des Fluoreszenzproteins in den löslichen Proteinfractionen mit Hilfe immunologischer Nachweise überprüft (**H**). Die dargestellten Kurven entsprechen dem arithmetischen Mittel dreier unabhängiger Messungen.

Zusätzlich zur Analyse des Bakterienwachstums wurden den in Dunkelheit inkubierten Kulturen nach sechs Stunden Zellproben entsprechend einer o.D.<sub>580</sub> von 0,5 entnommen und deren *in vivo* Fluoreszenzintensitäten bestimmt (2.15.3), die ebenfalls in Abbildung 20 A bis G dargestellt sind. Dabei zeigte sich, dass Bakterienzellen, die den Leervektor trugen oder die die LOV-FPs phiLOV2.1, EcFbFP sowie DsFbFP exprimierten, keine *in vivo* Fluoreszenzaktivitäten besaßen bzw. deren Intensitäten zu gering waren, um sie eindeutig vom Hintergrundsignal abzugrenzen. Hingegen emittierten sowohl miniSOG- als auch Pp1- und Pp2FbFP-exprimierende *E. coli* Kulturen eine deutliche Fluoreszenz. Dabei spiegelten die detektierten Spektren die für LOV-Domänen charakteristischen Fluoreszenzemissionen mit dem Maximum bei 495 nm und einer kleineren Schulter bei 527 nm wider. Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass ein phototoxischer Effekt auf das Bakterienwachstum nur bei Kulturen beobachtet wurde, bei denen auch eine Fluoreszenzaktivität nachweisbar war (miniSOG, Pp1FbFP und Pp2FbFP). Daher werden die Blaulicht-induzierten wachstumshemmenden Effekte durch die Aktivitäten der LOV-FPs verursacht.

Ob die hier beobachteten Varianzen der Fluoreszenzaktivitäten auf Expressionseffekte oder auf eine unterschiedlich starke Akkumulation der Fluoreszenzproteine begründet sind, wurde durch den immunologischen Nachweis der jeweiligen LOV-FPs in *E. coli*-Ganzzellextrakten untersucht. Dazu wurden die löslichen Proteine, wie in (2.14.1) beschrieben, aus den Zellproben isoliert, die den in Dunkelheit inkubierten Versuchskulturen ebenfalls am Ende der Wachstumsversuche nach sechs Stunden entnommen wurden. Der Protein-spezifische immunologische Nachweis der LOV-FPs erfolgte unter Einsatz eines His<sub>6</sub>-spezifischen Antikörpers (2.7) mittels Western-Blot Analyse (2.14.5). Die Ergebnisse der proteinspezifischen Detektionen sind in Abbildung 20-H dargestellt. Durch diese Experimente stellte sich heraus, dass die Akkumulationsmengen der LOV-FPs in den löslichen Ganzzellextrakten starken Unterschieden unterlagen. Die beiden FbFPs aus *P. putida* (Pp1- und Pp2FbFP) akkumulierten vergleichsweise stark und zeigten intensive Banden im immunologischen Nachweis. Zusätzlich zeigten diese beiden Proteine auch deutliche Fluoreszenzaktivitäten und übten einen starke phototoxische Effekte auf die belichteten Kulturen aus. miniSOG akkumulierte deutlich geringer, zeigte allerdings eine hohe *in vivo* Fluoreszenzintensität. Im Vergleich zur Toxizität der *P. putida*-FbFPs war die des miniSOG allerdings etwas moderater. Die beiden LOV-FPs DsFbFP und phiLOV2.1 zeigten ebenfalls eine schwache intrazelluläre Akkumulation, besaßen allerdings keine

Fluoreszenzaktivität und übten daher auch keinen phototoxischen Effekt auf die belichteten Zellen aus. Die könnte an einer schwachen Beladung dieser Proteine mit dem Kofaktor FMN liegen, da diese dadurch keine Aktivität besitzen. Des Weiteren zeigt der immunologische Nachweis, dass EcFbFP nicht funktionell exprimiert werden konnte, da es nicht akkumulierte.

In der Gesamtheit betrachtet ist festzustellen, dass die Bestrahlung von LOV-FP-exprimierenden Bakterienkulturen mit Blaulicht einen zum Teil stark negativen Effekt auf das Wachstum ausübt. Trotzdem ist das hier angewandte Testsystem nicht zu vergleichenden Studien zwischen den jeweiligen Fluoreszenzproteinen geeignet, da es zu erheblichen Unterschieden in den Proteinakkumulationen und -funktionalitäten kommt.

Anhand von Wachstumsanalysen mit LOV-FP-exprimierenden *E. coli* DH5 $\alpha$  Kulturen konnte grundsätzlich eine mögliche phototoxische Wirkung von LOV-FPs nachgewiesen werden. Die Kulturen zeigten bei der Expression von phiLOV2.1, DsFbFP und miniSOG Wachstumsverzögerungen, die auf die Belichtung mit Blaulicht zurückzuführen waren. Sehr deutlich fiel dieser Effekt bei den Expressionen von Pp1FbFP und Pp2FbFP aus, bei denen kein Wachstum unter Blaulichtbedingungen feststellbar war.

### 3.4.3 Erzeugung von Vektoren zur P<sub>T7</sub>-abhängigen Expression von LOV-FPs

Die Wachstumsanalysen mit *E. coli* Zellen, die LOV-FPs konstitutiv exprimierten (3.4.2) ergaben, dass aufgrund der z. T. schwachen Expressionslevel der Fluoreszenzproteine, die sich in der Akkumulation dieser Proteine widerspiegelt (Abbildung 20), keine vergleichende Aussage zwischen den Ergebnissen der Versuchsreihen der verschiedenen LOV-FPs möglich war. Für vergleichende *in vivo* Studien war es daher nötig, ein Expressionssystem zu verwenden, das eine stärkere Expression der Fluoreszenzproteine ermöglichte. Daher wurde der pET28a Expressionsvektor gewählt, der den T7-Promotor zur IPTG-induzierten Genexpression besitzt und zusätzlich die Fusionierung eines N-terminalen His-Tag an das rekombinante Zielprotein ermöglicht. Für die weiteren Studien wurde ein Set aus pET28a basierten Expressionsplasmiden erstellt, wobei die Vektoren zur P<sub>T7</sub>-abhängigen Expression von phiLOV2.1, EcFbFP, Pp1FbFP, Pp2FbFP bereits zur Verfügung standen (2.2). Zusätzlich wurden die Plasmide pET28a DsFbFP, pET28a DsFbFP M49I (3.3.1), pET28a Pp2FbFP L30M (3.3.2) sowie pET28a miniSOG erzeugt. Das für die weiteren Versuche genutzte Repertoire der Fluoreszenzreporter wurde durch die beiden neu konstruierten FbFPs DsFbFP M49I und Pp2FbFP L30M ergänzt, da diese in vorangegangenen Untersuchungen unterschiedliche Eigenschaften bezüglich ihrer Photostabilitäten aufwiesen (3.3). Daher sollte mit Hilfe dieser beiden Proteine überprüft werden, ob die durchgeführten Aminosäureaustausche ebenfalls einen Effekt auf die Phototoxizitäten dieser FbFPs ausübt.

Die miniSOG kodierende DNA-Sequenz wurde durch flankierende Sequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Xho*I ergänzt und synthetisch hergestellt (MWG Eurofins, Ebersberg). Anschließend wurde die modifizierte miniSOG-Gensequenz durch eine Doppelrestriktion mit den Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Xho*I isoliert (2.13.4) und in den ebenfalls hydrolysierten Expressionsvektor pET28a ligiert (2.13.7). Der Erfolg der Klonierung wurde durch einen geeigneten Restriktionsverdau auf einem DNA-Agarosegel (2.13.5) und anschließender Sequenzierung (2.3.2) kontrolliert. Als Ergebnis der Klonierungsarbeiten stand ein Set aus pET28a-basierten Plasmiden zur P<sub>T7</sub>-abhängigen Expression folgender LOV-FPs zur Verfügung:

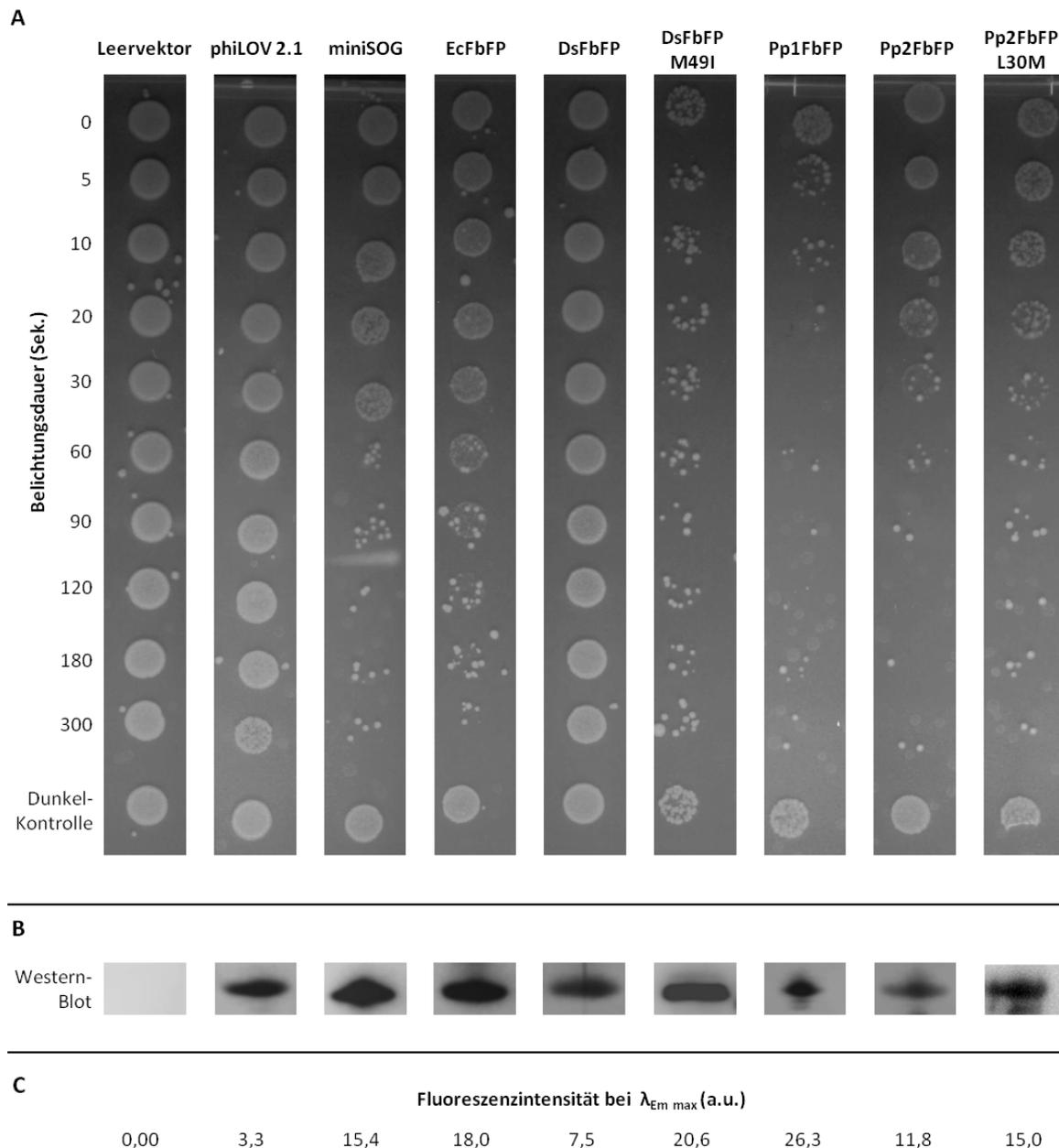
- phiLOV2.1
- miniSOG
- EcFbFP
- DsFbFP
- DsFbFP M49I
- Pp1FbFP
- Pp2FbFP
- Pp2FbFP L30M

### 3.4.4 Qualitative *in vivo* Analysen zur Blaulicht-induzierten Phototoxizität von LOV-FPs

Die  $P_{T7}$ -abhängige Genexpression ist auch durch die Induktion mit nur moderaten Induktorkonzentrationen (0,4 mM IPTG) sehr stark und führt zu einem erhöhten Stress in den Wirtszellen. Dies bewirkt wiederum längere Generationszeiten und folglich ein sehr langsames Zellwachstum. Daher war eine Untersuchung auf eine blaulichtinduzierte Phototoxizität durch Wachstumsanalysen, vergleichbar den Versuchen anhand der konstitutiv exprimierenden *E. coli* Kulturen (3.4.2) nicht möglich. Für vergleichende Studien wurde daher ein Tropftest der LOV-FPs-exprimierenden Bakterienkulturen durchgeführt. Dazu wurden chemisch-transformationskompetente *E. coli* BL21(DE3) Zellen (2.11.5.1) mit den entsprechenden pET28a Expressionsplasmiden (2.2) transformiert (2.11.5.2). Ausgehend von jeweils einem transformierten Klon wurden über Nacht Vorkulturen beimpft, aus denen am Folgetag Expressionskulturen auf eine o.D.<sub>580</sub> von 0,05 eingestellt wurden. Diese wurden drei Stunden bis zur Induktion des Zielgenexpression durch die Zugabe von 0,4 mM ITGP (Endkonzentration), bei 37 °C und unter ständigem Schütteln (130 UpM) bebrütet. Nach einer dreistündigen Expressionsdauer wurden den Kulturen Zellproben entnommen und diese auf eine einheitliche Zelldichte entsprechend einer o.D.<sub>580</sub> von 0,01 in PBS-Puffer (pH 7,4) eingestellt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in Küvetten überführt und diese auf eine Blaulicht-emittierende LED ( $\lambda = 440 \text{ nm}$ ;  $180 \text{ mW cm}^{-2}$ ) platziert. Über einen Belichtungszeitraum von fünf Minuten wurden zu definierten Zeitpunkten jeweils 3  $\mu\text{l}$  aus den belichteten Zellproben auf eine LB-Festmediumplatte überführt, so dass eine vergleichbare „Tropfreihe“ entstand. Die Phototoxizitäten der einzelnen LOV-FPs konnte so in Abhängigkeit zur Belichtungsdauer über die Anzahl der gebildeten Kolonien abgeschätzt werden. Die Ergebnisse dieser Tropftestanalysen sind in Abbildung 21-A dargestellt und zeigen eine stark variierende toxische Wirkung auf die exprimierenden Bakterienzellen. Dabei fiel auf, dass die Lebensfähigkeit der Zellen, die Pp1FbFP, Pp2FbFP und Pp2FbFP L30M exprimierten, erstaunlicher Weise bereits nach einer Belichtungsdauer von nur 5 bis 30 Sekunden stark beeinträchtigt wurde, während die Fähigkeit der Bildung von Bakterienkolonien der miniSOG und EcFbFP exprimierenden Zellen erst nach einer Belichtungsdauer von einer Minute und länger beeinflusst wurde. Zellen, die phiLOV2.1 bzw. DsFbFP exprimierten, zeigten hingegen keinen erkennbaren Belichtungseinfluss auf ihre Lebensfähigkeit und verhielten sich vergleichbar zur Leervektorkontrolle. Ein Austausch in der Aminosäuresequenz des DsFbFP von Methionin zu Isoleucin an Position 49 führte überraschender Weise zu einem detektierbaren phototoxischen Effekt, der in seiner Stärke mit dem des EcFbFP vergleichbar war.

Im Vergleich zu den vorangegangenen Wachstumsstudien bei gleichzeitiger konstitutiver Expression der LOV-FPs (3.4.2) werden die dort beobachteten Effekte durch den hier beschriebenen Ergebnisse bestätigt. In beiden Fällen zeigten Pp1- und Pp2FbFP starke Blaulicht-induzierte phototoxische Effekte, während miniSOG moderate Einflüsse besaß. Auch die nicht-toxischen Wirkungen der

Dunkelkontrollen und des DsFbFP stimmt in beiden Studien überein. EcFbFP wies hingegen in dieser Studie erstmals einen toxischen Effekt aus, der mit dem des miniSOG vergleichbar war.



**Abbildung 21: Qualitative Analyse der Phototoxizität verschiedener LOV-FPs in Abhängigkeit der Belichtungsdauer**

**(A)** LOV-FP-exprimierende *E. coli* BL21(DE3) Zellen wurden drei Stunden nach Induktion der Genexpression, durch die Zugabe von 0,4 mM IPTG, auf eine Zelldichte von einer  $o.D._{580} = 0,01$  in PBS-Puffer verdünnt und anschließend in eine Küvette überführt. Die Zellsuspension wurde von unten mit einer Blaulicht-LED ( $\lambda = 450\text{ nm}$ ,  $180\text{ mW cm}^{-2}$ ) belichtet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 3  $\mu\text{l}$  der Suspensionen auf eine LB-Festmediumplatte überführt. Für das Wachstum der Bakterienkolonien wurde die Festmediumplatte über Nacht bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  in Dunkelheit inkubiert. **(B)** Immunologischer Nachweis der mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag fusionierten Zielproteine mittels Western-Blot Analyse zur Bestimmung der Level an rekombinanten Fluoreszenzproteinen in den löslichen Proteinfractionen. **(C)** *In vivo* Fluoreszenzintensitäten der LOV-FP-exprimierenden Zellen bei  $\lambda_{Ex\ max} = 495\text{ nm}$ . Die Messung erfolgte mit einer Zellprobe entsprechend einer  $o.D._{580}$  von 0,5 in PBS-Puffer (pH 7,4) bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 450\text{ nm}$ . Von den Werten der einzelnen Proben wurde der Wert des Leervektors subtrahiert.

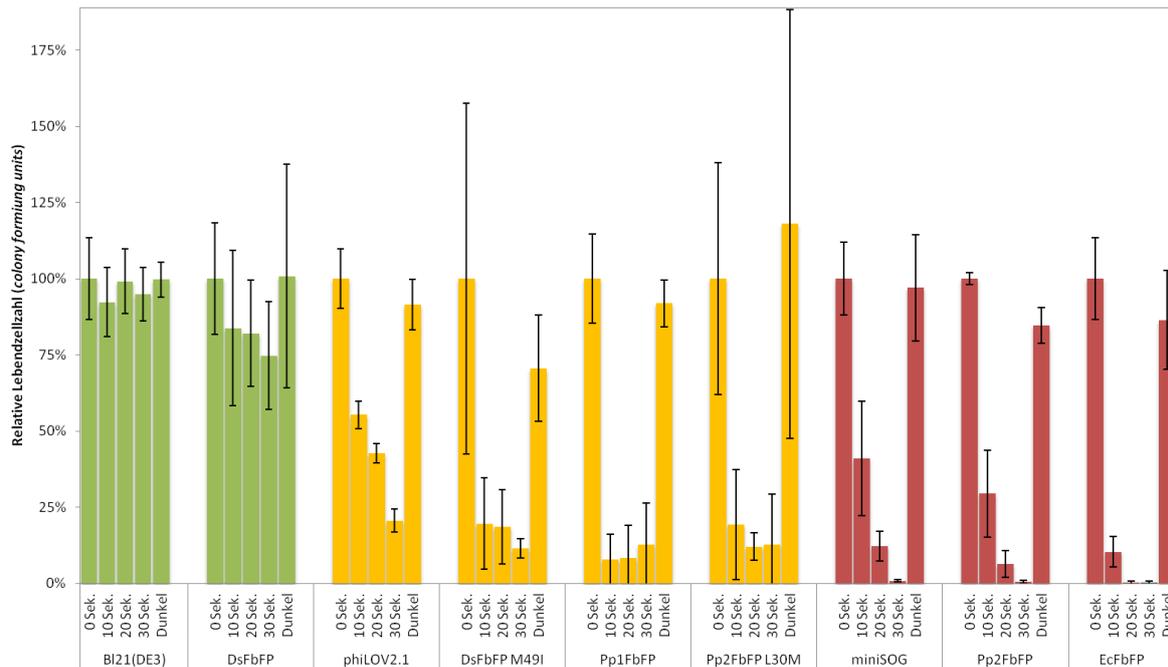
Um sicherzustellen, dass die beobachteten Unterschiede der Koloniebildungen nicht auf variierende Expressionslevel der getesteten LOV-FPs zurückzuführen waren, wurden den getesteten Kulturen vor den Belichtungsexperimenten Zellproben entnommen und daraus die löslichen Proteine isoliert (2.14.1). Die Akkumulation der rekombinanten Fluoreszenzproteine wurde daraufhin immunologisch, unter Verwendung eines spezifischen His<sub>6</sub>-Antikörpers, mittels Western-Blot Analyse nachgewiesen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 21-B dargestellt und zeigen einen nahezu konstanten Level an gebildeten Fluoreszenzproteinen in allen getesteten Proben. Dabei sind geringe Unterschiede tolerierbar, solange sich die Akkumulationsstärken der jeweiligen Proteine ungefähr auf einem Niveau befinden. Daher konnte nachgewiesen werden, dass die Expression der LOV-FPs durch den Einsatz der P<sub>T7</sub>-abhängigen Expression zu vergleichbaren Proteinlevel führte und deshalb Vergleiche zwischen den jeweiligen Proteinen zulässig waren.

Um herauszufinden, ob die in den löslichen Proteinfractionen gebildeten LOV-FPs auch funktionell sind, wurde den getesteten Kulturen vor den Belichtungsversuchen Zellproben entnommen und deren *in vivo* Fluoreszenzaktivität untersucht (2.15.3). Die daraus resultierenden maximalen Fluoreszenzintensitäten sind tabellarisch in Abbildung 21-C dargestellt, wobei von allen Messwerten die Eigenfluoreszenz, die anhand der Leervektorkontrolle bestimmt wurde, abgezogen wurde. Diese Werte zeigen starke Schwankungen der gemessenen Fluoreszenzintensitäten zwischen den einzelnen Expressionskulturen. So war anhand der *philov2.1* exprimierenden Zellen nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal zu detektieren, während in allen anderen Zellproben deutliche Fluoreszenzen messbar waren, mit maximalen Intensitäten bis 26,3 Einheiten für Pp1FbFP. Da die Akkumulationen der Fluoreszenzproteine in den getesteten Proben keinen allzu großen Schwankungen unterlagen sind proteinspezifische Charakteristika wie die Quantenausbeute, Kofaktorbeladung und der Extinktionskoeffizient die wahrscheinlichste Ursache für die verschiedenen starken Fluoreszenzintensitäten. Bei der Gegenüberstellung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten der LOV-FPs mit den jeweiligen beobachteten Phototoxizitäten kann des Weiteren festgestellt werden, dass die Stärken der beiden Effekte korrelieren. Proteine wie Ec-, Pp1FbFP und DsFbFP M49I besaßen die höchsten Fluoreszenzintensitäten und zeigten gleichzeitig einen phototoxischen Effekt auf die Zellen, während die LOV-FPs phiLOV2.1 und DsFbFP keinen solchen Effekt aufwiesen und die geringsten *in vivo* Fluoreszenzen zeigten.

Vergleichende zeitaufgelöste Tropftestanalysen zur Blaulicht-induzierten Phototoxizität von LOV-FPs, die heterolog unter Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert wurden, ergaben unterschiedliche Einflüsse auf die Lebensfähigkeit des Expressionswirtes. Dabei zeigten Pp1FbFP und Pp2FbFP (L30M) einen stark-toxischen Effekt und führten zu einer Reduzierung der gebildeten Bakterienkolonien innerhalb weniger Sekunden der Belichtung mit Blaulicht. Die toxischen Effekte von EcFbFP, miniSOG und DsFbFP M49I stellten sich moderater dar und reduzierten die Anzahl der Kolonien erst nach einer Belichtungsdauer von einer Minute und mehr. Im Gegensatz dazu verhielten sich die phiLOV2.1 und DsFbFP produzierende Zellen analog zur Leervektorkontrolle und wiesen keinen toxischen Effekt auf den Wirtsorganismus auf.

### 3.4.5 Quantitative Analyse der Licht-induzierten Phototoxizität der LOV-FPs auf die Lebensfähigkeit von *E. coli*-Bakterienzellen

Nach der rein qualitativen Untersuchung der Blaulicht-induzierten Toxizität verschiedener LOV-FPs auf *E. coli* Bakterienzellen (3.4.4) wurde anschließend ein analoges Experiment zur quantitativen Analyse der Lebendzellzahlen anhand der Bestimmung Kolonien bildender Einheiten (CFU – *colony forming units*) (2.11.9) durchgeführt. Analog der Vorgehensweise zur Untersuchung der lichtinduzierte Phototoxizität mittels Tropftestanalyse (3.4.4) wurden die LOV-FPs in *E. coli* BL21(DE3) Zellen heterolog exprimiert. Zellproben entsprechend einer o.D.<sub>580</sub> von 0,01 wurden in PBS-Puffer (pH 7,4) überführt und mit Hilfe einer Blaulicht-emittierenden LED ( $\lambda = 440 \text{ nm}$ ;  $180 \text{ mW cm}^{-2}$ ) von unten belichtet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden den Suspensionen 100  $\mu\text{l}$  entnommen und diese in drei seriellen Schritten im Verhältnis 1:10 mit LB-Flüssigmedium verdünnt. Aus der Verdünnungsreihe wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  auf LB-Festmediumplatten ausgestrichen und diese über Nacht bei 37 °C in Dunkelheit bebrütet. Am Folgetag wurden die auf den Platten gewachsenen Bakterienkulturen ausgezählt, wobei nur Platten in die Auswertung einfließen, die eine Kolonienzahl von 200 nicht überschritten. Die aus diesen Experimenten resultierenden Daten sind in Abbildung 22 dargestellt, wobei die dort abgebildeten Balken die Mittelung dreier voneinander unabhängiger Messungen repräsentieren. Aus dem Diagramm geht hervor, dass alle LOV-FPs, bis auf DsFbFP, eine blaulichtabhängige toxische Wirkung auf die Bakterienzellen ausüben. Dabei konnten die LOV-FPs auf Grundlage ihrer Toxizität in drei Gruppen eingeteilt werden, die entsprechend farblich markiert in dem Balkendiagramm dargestellt sind. Die erste, grün markierte Gruppe, umfasst die nichttoxische Leervektorkontrolle sowie DsFbFP, das ebenfalls kaum einen negativen Einfluss auf die Lebendzellzahlen der Bakterien besaß. Eine zweite Gruppe, bestehend aus phiLOV2.1, DsFbFP M49I, Pp1FbFP sowie Pp2FbFP L30M, ist gelb markiert und vermittelt einen moderaten toxischen Effekt, der zu einer deutlichen Reduzierung der Lebendzellzahlen um 80 bis 90 %, während der Belichtungsperiode führte, jedoch nicht zur vollständigen Abtötung während dieser Zeit genügte. Die dritte, rot-markierte Gruppe, besteht aus miniSOG, Pp2FbFP und EcFbFP. Diese Proteine üben einen stark-phototoxischen Effekt auf die *E. coli* Zellen aus, der zur vollständigen Abtötung der Bakterienzellen binnen der 30-sekündigen Belichtungsdauer ausreichte.



**Abbildung 22: Quantifizierung der relativen Lebendzellzahlen der LOV-FP exprimierenden *E. coli* Kulturen unter Blaulichteinfluss**

LOV-FP exprimierende *E. coli* BL21(DE3) Zellkulturen wurden drei Stunden nach Induktion der Genexpression, die durch die Zugabe von 0,4 mM IPTG erfolgte, auf eine Zelldichte entsprechend einer o.D.<sub>580</sub> = 0,01 in PBS-Puffer verdünnt und anschließend in eine Küvette überführt. Die Zellsuspension wurde von unten mit einer Blaulicht-LED ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ,  $180 \text{ mW cm}^{-2}$ ) belichtet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  den Suspensionen entnommen und in geeigneten Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1.000) auf LB-Festmedienplatten ausgestrichen. Nach Inkubation der Bakterienzellen über Nacht bei 37 °C in Dunkelheit wurden die Lebendzellzahlen durch Auszählen der gewachsenen Kolonien bestimmt. Für die Auszählung wurden nur Bakterienkulturplatten berücksichtigt, die nicht mehr als 200 Kolonien besaßen. Die abgebildeten Balken entsprechen der arithmetischen Mittellung dreier unabhängiger Messungen.

Verglichen mit den Ergebnissen der Phototoxizitäten von LOV-FPs aus den vorangegangenen Wachstums- und Tropftestanalysen ergeben sich durch die hier beschriebenen Ergebnisse Varianzen. Einige Fluoreszenzproteine wie das phiLOV2.1, miniSOG sowie EcFbFP zeigten in dieser quantitativen Studie stärkere Effekte, als sie auf Grundlage der rein qualitativen Untersuchungen zu erwarten gewesen wären. Pp1FbFP und Pp2FbFP L30M wiesen hingegen in den Tropftestanalysen starke Phototoxizitäten auf und zählen nach der Bestimmung der CFUs in die moderat-toxische Gruppe. Lediglich die nicht toxischen Eigenschaften der Vektorkontrolle und des DsFbFP sowie die moderat toxische Wirkung des DsFbFP M49I und die starke Toxizität des Pp2FbFP wurde durch die hier angefertigten Studien bestätigt.

In der Gesamtheit betrachtet demonstrieren die präsentierten Ergebnisse die funktionelle Anwendbarkeit der LOV-FPs als Photosensibilisatoren zur Blaulicht-induzierten Abtötung von Bakterienzellen. Diese geht auf die phototoxischen Eigenschaften dieser Proteine zurück, deren Ausprägung allerdings vom jeweiligen Protein abhängt und daher zwischen den verschiedenen

LOV-FPs deutlich variiert. Fluoreszenzproteine mit starken phototoxischen Effekten sind dabei miniSOG, Ec- und Pp2FbFP.

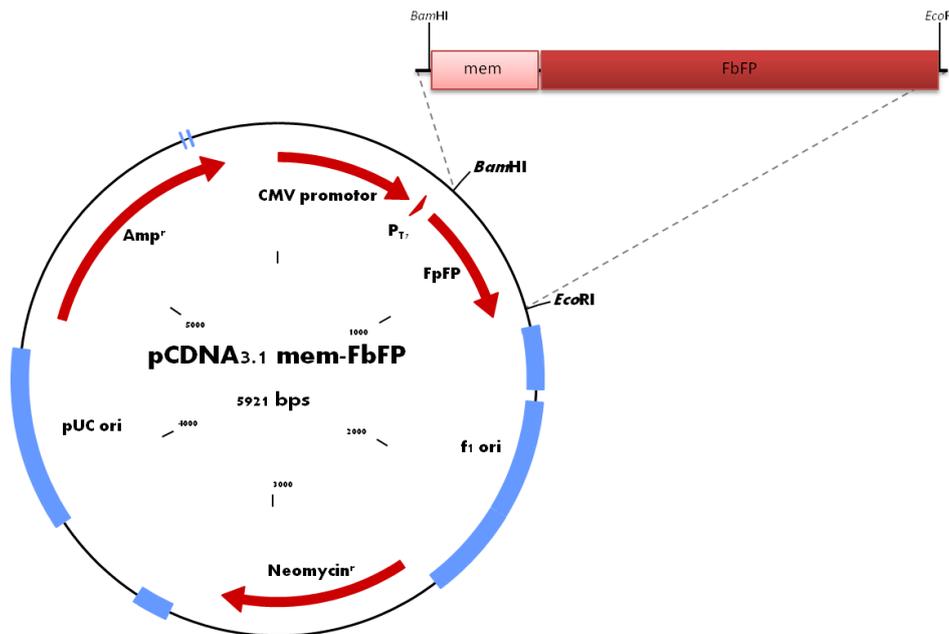
Die quantitative Analyse der Licht-induzierten Phototoxizitäten von LOV-FPs auf *E. coli* Bakterienzellen ergaben, dass alle getesteten LOV-FPs, mit Ausnahme von DsFbFP einen phototoxischen Effekt besaßen. Dadurch können LOV-FPs als leitungsfähige Photosensibilisatoren zur gezielten Abtötung von Bakterien eingesetzt werden. Allerdings unterscheiden sich die Stärken dieser Toxizitäten zwischen den verschiedenen Fluoreszenzproteinen und ist bei miniSOG, EcFbFP und Pp2FbFP besonders ausgeprägt während DsFbFP keinen erkennbaren Effekt besitzt.

### 3.4.6 Anwendung der LOV-FPs als Photosensibilisatoren in Säugerzellen

In den vorangegangenen Experimenten konnte anhand des Modellorganismus *E. coli* nachgewiesen werden, dass die LOV-FPs als Photosensibilisatoren zur lichtinduzierten Abtötung von Bakterienzellen erfolgreich eingesetzt werden konnten. Folglich sollte untersucht werden, ob diese Fähigkeit auf prokaryotische Organismen beschränkt ist oder ob dieser Effekt ebenfalls in Säugerzellen beobachtet werden kann. Dazu wurden Expressionsplasmide, basierend auf dem pcDNA3.1 Vektor (Invitrogen, Darmstadt) erzeugt, der den Promotor P<sub>CMV</sub> besitzt, mit dessen Hilfe eine konstitutive Expression der LOV-FPs in Säugerzellen möglich ist. Die Experimente zur lichtgesteuerten Abtötung von Säugerzellen fanden im Rahmen eines Kooperationsprojektes in den Labors der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marcel Dihné vom Hertie-Institut für klinische Hirnforschung in Tübingen statt.

Vorversuche hatten gezeigt, dass murine hippokampale HT22-Tumorzellen, die unfusioniertes Pp2FbFP exprimierten und diese als lösliche Fluoreszenzproteine im Zytosol akkumulierten, nicht durch eine Belichtung mit Blaulicht abgetötet werden konnten (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde eine Signalsequenz für die Membranassoziation (Skene & Virág, 1989; Zuber *et al.*, 1989) der LOV-FPs vor deren N-Terminus kloniert. Dadurch sollte erreicht werden, dass die von den LOV-FPs generierten Sauerstoffradikale, die sehr reaktiv sind aber nur eine geringe Lebensdauer besitzen, gezielt an den Membranstrukturen wirken können, die für die Lebensfähigkeit der Zellen von grundlegender Relevanz sind. Im Zytosol hingegen können die Radikale mit vielen verschiedenen Proteinen oder Zellkompartimenten reagieren, deren Einfluss für das Überleben der Zellen nicht von so entscheidender Tragweite sind und gegebenenfalls durch Neusynthese oder Reparatur wiederhergestellt werden können. Des Weiteren finden sich im Zytosol viele unterschiedliche Substanzen und Enzyme, wie z.B. Katalasen, die in der Lage sind Radikale zu reduzieren oder deren Wirkung durch *Quenching*-Effekte zu minimieren.

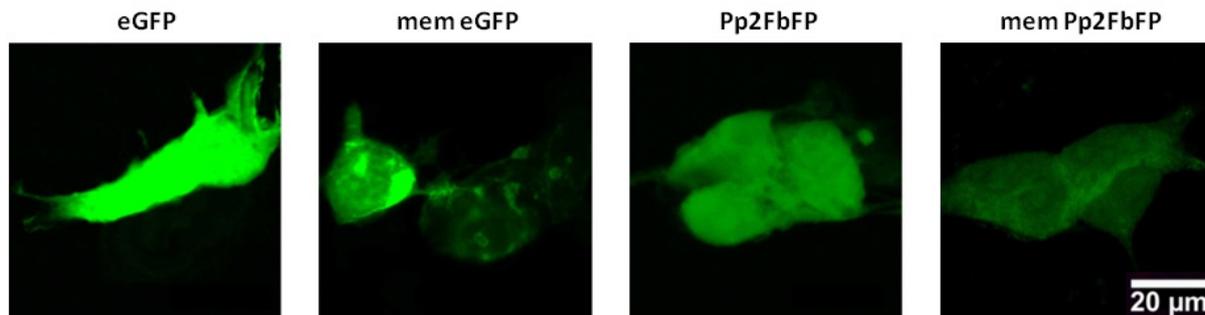
Für die Konstruktion der membranassoziierten FbFPs wurden die Sequenzen der LOV-FPs kodierenden Gene *ds-*, *ec-*, *pp1-* und *pp2fbfp* sowie *egfp* (zur Kontrolle) mit der Signalsequenz ergänzt und an die humane *codon-usage* angepasst. Des Weiteren wurden die Gensequenzen mit flankierenden Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonucleasen *Bam*HI und *Eco*RI versehen, um die spätere Klonierung in den pcDNA3.1-Vektor zu ermöglichen. Nach der Synthese dieser Sequenzen (MWG Eurofins, Ebersberg) wurden die Gene aus dem Synthesektor mit Hilfe einer *Bam*HI – *Eco*RI Doppelrestriktion (2.13.4) isoliert und in den entsprechend hydrolysierten Zielvektor ligiert (2.13.7). Eine schematische Darstellung der genutzten Klonierungsstrategie ist in Abbildung 23 dargestellt. Der Klonierungserfolg wurde nach einem erneuten Restriktionsverdau durch eine DNA-Agarosegel (2.13.5) überprüft und mittels Sequenzierung (2.3.2) bestätigt.



**Abbildung 23: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Erzeugung von pcDNA3.1 basierten Plasmiden zur Expression von membranassoziierten FbFPs in Säugerzellen**

Zur Erzeugung von Plasmiden zur  $P_{CMV}$ -abhängigen, konstitutiven Expression von Membran-assoziierten FbFPs in Säugerzellen wurden die DNA-Sequenzen der Fluoreszenzproteine an die humane *codon-usage* angepasst und am 5'-Ende mit einer Signalsequenz für die spätere Membranassoziation ergänzt. Nach erfolgter Synthese wurden die Gensequenzen mit Hilfe eines *Bam*HI - *Eco*RI Doppelrestriktionsverdau isoliert und anschließend in den pcDNA3.1-Vektor ligiert.

Für die Bestätigung, ob eine erfolgreiche Adhäsion der Fluoreszenzproteine an die Membranen der Säugerzellen durch die Fusion mit der Signalsequenz erfolgreich war, wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK) mit den Plasmiden pcDNA3.1 eGFP, mem-eGFP, Pp2FbFP sowie mem-Pp2FbFP transient transfiziert (2.11.10) und anschließend die intrazelluläre Lokalisierung der Fluoreszenzproteine mikroskopisch visualisiert. Aus den in Abbildung 24 dargestellten Aufnahmen geht hervor, dass sich die Lokalisierung der Fluoreszenzproteine durch die Fusion mit dem Membrananker grundlegend änderte. Die von eGFP und Pp2FbFP vermittelte Fluoreszenz war über das gesamte Zytosol hinweg nachweisbar was die zytosolische Lokalisierung dieser Proteine beweist. Die mit dem Membrananker fusionierten Fluoreszenzproteine zeigten hingegen lokale Fluoreszenzsignale an zellulären Membran-Kompartimenten wie die Membranen der Zellen, Zellkerne und der Mitochondrien.



**Abbildung 24: Konfokale *laserscanning* mikroskopische Visualisierung der Lokalisierung von eGFP, Pp2FbFP und deren Membran-assoziierten Varianten in HEK-Zellen**

Humane embryonale Nierenzellen (HEK) wurden mit den Plasmiden pcDNA3.1 - eGFP, - mem eGFP, - Pp2FbFP und - mem Pp2FbFP transient transfiziert. Die Lokalisierung der Fluoreszenzproteine ist in grün dargestellt.

Nachdem die Lokalisierung der membranassoziierten Fluoreszenzproteine erfolgreich demonstriert werden konnte, sollte im Anschluss daran überprüft werden, ob mit deren Hilfe Blaulicht-induziertes Abtöten von Säugerzellen möglich war. Dazu wurden murine HT22-Tumorzellen mit den pcDNA3.1 mem-Pp1FbFP, mem-Pp2FbFP, mem-EcFbFP und mem-DsFbFP Expressionsplasmiden transfiziert und kultiviert (2.11.10). Die Auswahl der für diesen Versuch eingesetzten FbFPs beruhte dabei auf den Ergebnissen der vorangegangenen *in vivo* Phototoxizitätsmessungen anhand von *E. coli* Bakterienzellen. Mit Ec- und Pp2FbFP wurden zwei *photosensitizer* mit starker Toxizität untersucht, während Pp1FbFP einen etwas geringeren phototoxischen Effekt verursachte. Mit DsFbFP wurde ebenfalls ein Fluoreszenzprotein eingesetzt, das keinen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zellen ausübte (vgl. Abbildung 22). Die Belichtung der transfizierten Tumorzellen erfolgte in 6-Well-Platten mit Hilfe einer Blaulicht-LED ( $\lambda = 440 \text{ nm}$ ,  $180 \text{ mW cm}^{-2}$ ) durch direkte Auflage der LED auf den Plattendeckel. Das Absterben der belichteten Zellen sollte durch mikroskopische Analyse der Zelltypischen Morphologien erfolgen. Die durch die Belichtung abgetöteten Zellen sollten daraufhin ihre Form verändern und zu kleineren, kugelförmigen Strukturen kollabieren. Um diesen Effekt zu analysieren wurden vor- und nach einer 15-minütigen Bestrahlungsdauer Hellfeld-mikroskopische Aufnahmen der Zellen angefertigt, die in Abbildung 25 dargestellt sind. Zur Visualisierung der Fluoreszenz wurden zusätzliche Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen angefertigt, die zusammen mit überlagerten Bildern ebenfalls abgebildet sind. In den Hellfeldabbildungen aller getesteten Fluoreszenzproteine lassen sich die gesunden Zellmorphologien der transfizierten und nicht-transfizierten Zellen erkennen. Diese veränderten sich jedoch nach der Belichtung bei den Zellen, die die Membran-assoziierten FbFPs exprimierten (Pfeile in den Abbildungen 25 A-D), wobei die erwarteten kugelförmigen Strukturen der abgetöteten Zellen identifizierbar waren. Zusätzlich ist besonders am Beispiel des Pp2FbFP in Abbildung 25-D erkennbar, dass sich die Lokalisierung des Fluoreszenzproteins nach der Belichtung stark verändert. Vor der Belichtung ist das Protein an die Membranstrukturen über die gesamte Zelle verteilt, während es nach der Belichtung eine granulöse

Form annimmt. Anhand dieses Beispiels ist ebenfalls gut ersichtlich, dass untransfizierte Zellen - die keine Fluoreszenz emittierten - diesen Effekt nicht zeigten und daher von der Belichtung nicht beeinflusst wurden. Daher geht der beobachtete toxische Effekt auf die Bestrahlung mit Blaulicht zurück. Folglich konnte der Einsatz der LOV-FPs als Photosensibilisatoren zur gezielten Blaulicht-induzierten Abtötung von Säugerzellen durch diese Experimente erfolgreich demonstriert werden.

Im Vergleich mit den Beobachtungen der zuvor durchgeführten *in vivo* Analysen in *E. coli* wird die Phototoxizität des Ec-, Pp1-, sowie Pp2FbFP durch die beschriebenen Ergebnisse bestätigt. Allerdings ist eine Graduierung in stark bzw. schwach-toxische Proteine bedingt durch den Versuchsaufbau nicht möglich. Bemerkenswerter Weise zeigte das DsFbFP in diesem Versuch ebenfalls einen phototoxischen Effekt auf die Säugerzellen, wobei es in *E. coli* keinen solchen Effekt offenbarte. Möglicherweise konnte dies durch die Lokalisierung des Proteins an die Membranoberflächen ausgelöst worden sein, da dadurch bereits geringe Radikalmengen zur letalen Schädigung der Zellen genügen. Bei der zytosolischen Lokalisierung des Proteins in *E. coli* reichen diese Radikalkonzentrationen dann nicht zur Abtötung der Zellen aus, oder konnten durch zelluläre Schutzmechanismen (vgl. 3.4.8) wirksam entgiftet werden.

Zur weiteren Kontrolle des phototoxischen Effekts der FbFPs wurde mit eGFP ein Kontroll-Fluoreszenzprotein gewählt, dessen Fluoreszenz mit den gleichen Filtern detektierbar war. Die Anwendbarkeit dieses Proteins zur lichtgesteuerten Inaktivierung von biologischen Strukturen mittels der CALI-Technik wurde bereits demonstriert (Rajfur *et al.*, 2002; Surrey *et al.*, 1998; Tanabe *et al.*, 2005). Allerdings absorbiert das eGFP bei der Belichtungswellenlänge von 440 nm nur schwach. Daher war in diesem Experiment kein phototoxischer Effekt des an die Membranoberflächen adhärenen Proteins zu erwarten. Die Ergebnisse dieser Kontrollbestimmung sind in Abbildung 25-E dargestellt und bestätigen die Vermutung. Zwischen den Morphologien der transfizierten Zellen sind vor und nach der Belichtung (Pfeile) keine auffallenden strukturellen Veränderungen zu beobachten. Mit Hilfe des eGFP konnte somit nochmals demonstriert werden, dass das Abtöten der HT22-Zellen durch die Licht-induzierte Phototoxizität der FbFPs hervorgerufen wurde und nicht auf die Belichtung als solche zurückging.

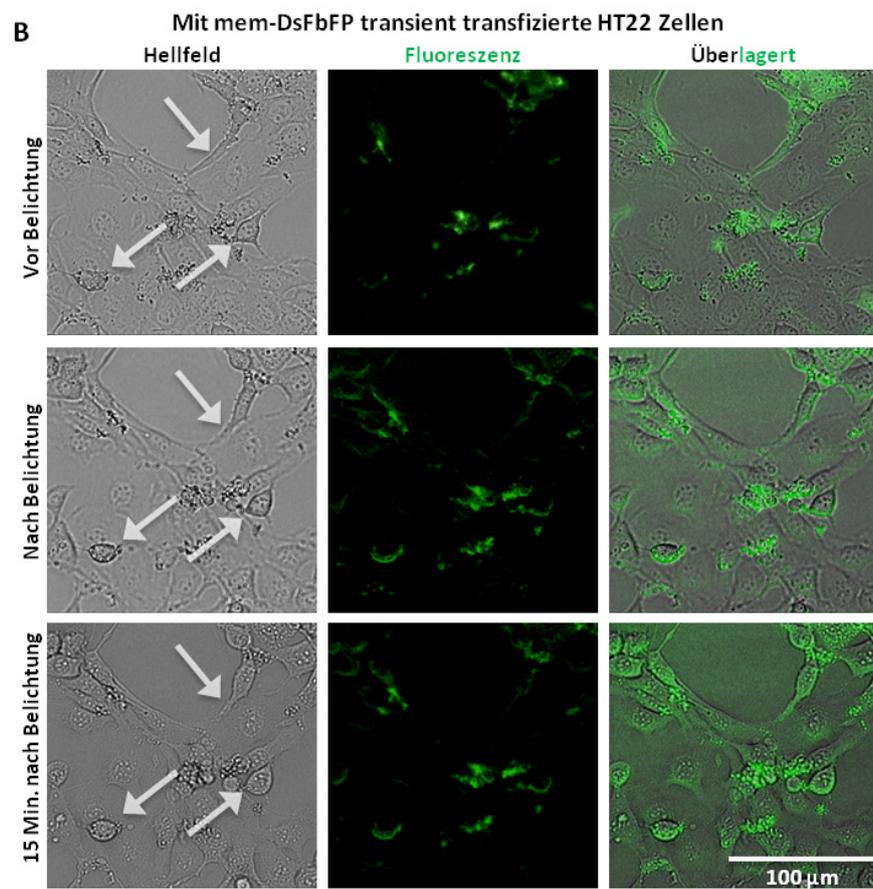
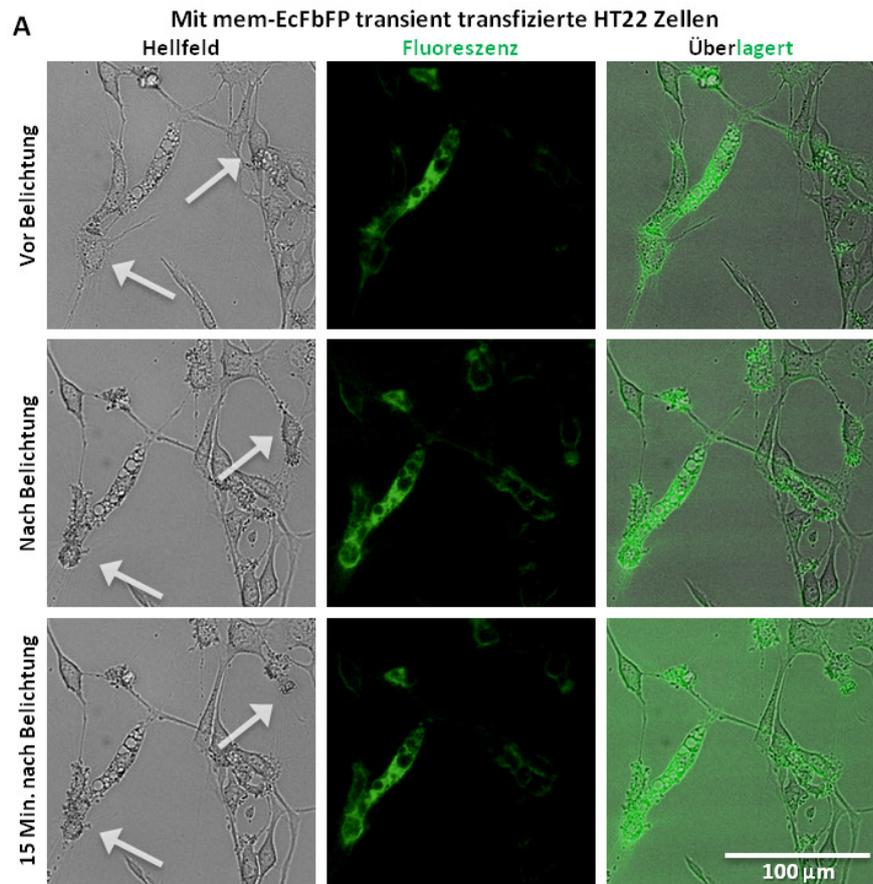
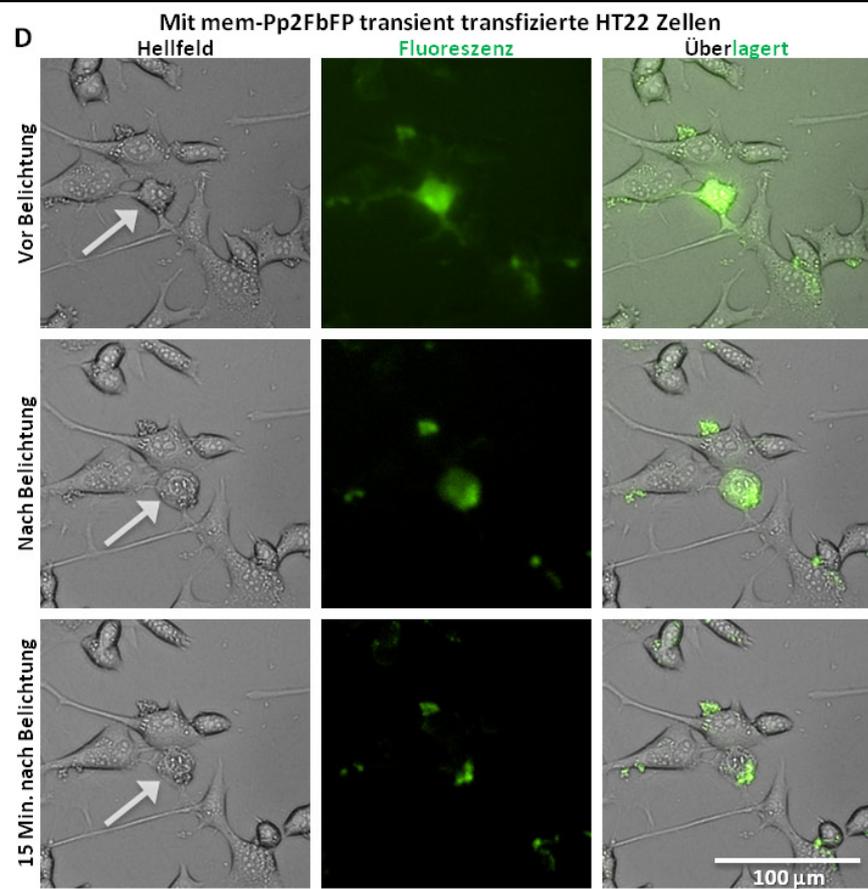
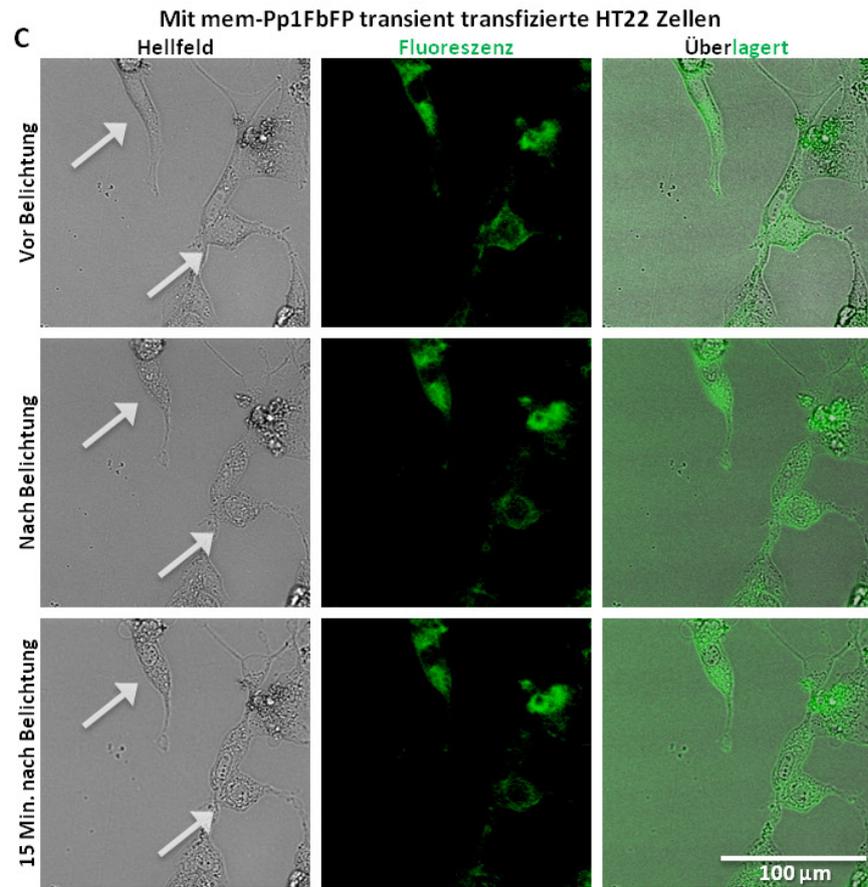
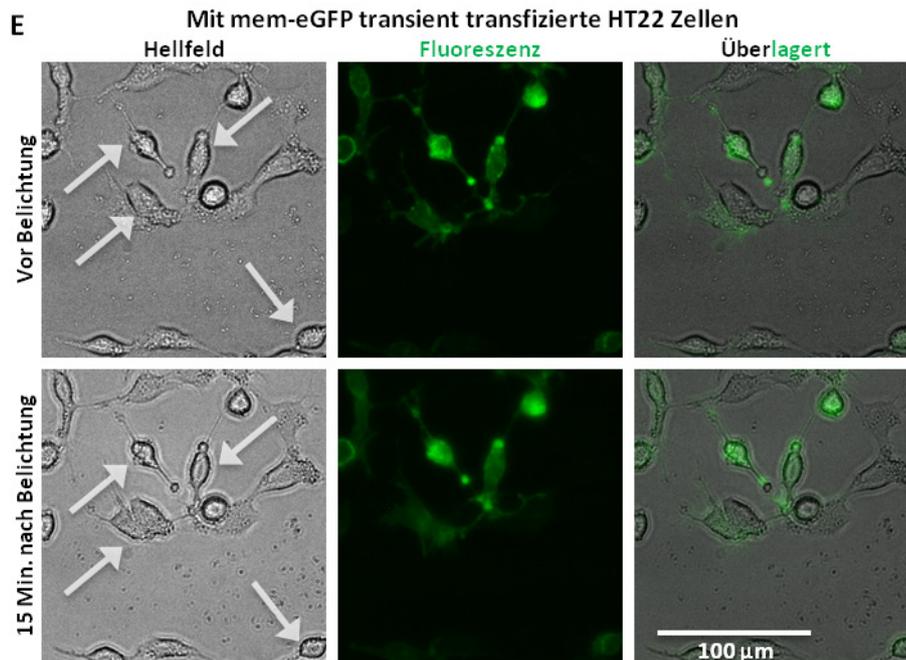


Abbildung 25: Hellfeld- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Membran-assoziierten FbFP-exprimierenden muriner HT22-Tumorzellen vor- und nach der Belichtung mit Blaulicht



Fortsetzung Abbildung 25: Hellfeld- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Membran-assoziierten FbFP-exprimierenden muriner HT22-Tumorzellen vor- und nach der Belichtung mit Blaulicht



**Fortsetzung Abbildung 25: Hellfeld- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Membran-assoziierten FbFP-exprimierenden muriner HT22-Tumorzellen vor- und nach der Belichtung mit Blaulicht**

Murine HT22 Tumorzellen wurden zur konstitutiven Expression von Membran-assoziierten FbFPs mit pcDNA3.1 basierten Expressionsplasmiden transfiziert. Nach der Anzucht der Zellen wurden diese mit Hilfe einer Blaulicht-LED ( $\lambda = 440 \text{ nm}$ ,  $180 \text{ mW cm}^{-2}$ ) belichtet. Vor- und nach der 15-minütigen Belichtungsphase wurden Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt um den Zustand der Zellen zu überprüfen. Die Pfeile verweisen auf die für den jeweiligen Versuch relevanten Zellen.

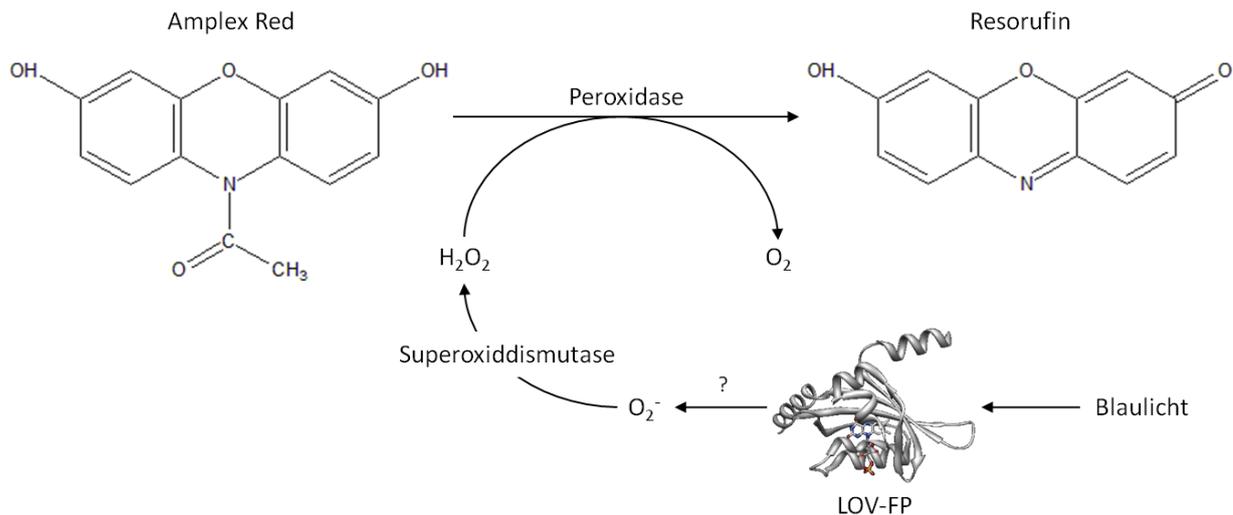
Zusammenfassend zeigen die hier beschriebenen Ergebnisse die erfolgreiche Anwendung verschiedener LOV-FPs zur lichtgesteuerten Abtötung von Säugerzellen, was anhand von HT22-Tumorzellen demonstriert wurde. Daher ist deren Einsatz als genetisch kodierte Photosensibilisatoren nicht auf bakterielle Zellen beschränkt. Allerdings war die funktionelle Inaktivierung der Zellen nur durch gezielte Fusionierung der *photosensitizer* an die essentiellen Membranstrukturen möglich.

Murine HT22-Tumorzellen, die membranassoziiertes DsFbFP, EcFbFP, Pp1FbFP oder Pp2FbFP exprimierten, konnten durch eine 15-minütige Blaulichtbestrahlung erfolgreich abgetötet werden. Der Zelltod wurde dabei durch die Veränderung der Zellmorphologien festgestellt, indem die zellulären Strukturen nach der Belichtungsperiode kollabierten.

### 3.4.7 *In vitro* Quantifizierung von Wasserstoffperoxid

In den bisherigen *in vivo* Analysen konnte erfolgreich demonstriert werden, dass die LOV-FPs als Photosensibilisatoren zur lichtgesteuerten Abtötung von Bakterien- und Säugerzellen einsetzbar sind. Des Weiteren konnte dieser Effekt nicht nur qualitativ funktionell nachgewiesen werden, sondern war ebenfalls eine *in vivo* Quantifizierung dieses Effektes anhand von vergleichenden Lebendzellzahlbestimmungen von *E. coli* Bakterienzellen möglich. Allerdings kann bei diesen *in vivo* Studien nicht ausgeschlossen werden, dass verschiedene Nebeneffekte, wie z.B. die Effektivität der Genexpression, die Proteinlöslichkeit und Akkumulation sowie intrazelluläre bzw. proteinspezifische *Quenching*-Effekte die festgestellten Ergebnisse unterschiedlich stark beeinflussen. Um diese Nebeneffekte weitestgehend zu minimieren, wurden die LOV-FPs im heterologen Expressionswirt *E. coli* BL21(DE3) produziert, durch IMAC gereinigt und anschließend deren Fähigkeit zur Sauerstoffradikalproduktion in quantitativen *in vitro* Studien untersucht.

Photosensibilisatoren können Sauerstoffradikale durch zwei unterschiedliche Mechanismen generieren, wobei entweder Singulett-Sauerstoff oder Superoxid entsteht (1.4.5). Für die Quantifizierung von Superoxid wurde das Wasserstoffperoxid Nachweis-Kit „Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Kit“ (Molecular Probes, Darmstadt) eingesetzt. Dieses Kit beruht auf der Peroxidase-katalysierten Umsetzung der farblosen Amplex Red-Reagenz in das rotfluoreszierende Resorufin, das eine fluoreszenzspektroskopische Detektion ermöglicht. Die stöchiometrische Umsetzung von Superoxid in Wasserstoffperoxid wurde durch Zugabe von Superoxiddismutase (SOD) erreicht. Die dem Nachweis-Kit zugrunde liegenden Reaktionen sind in Abbildung 26 schematisch dargestellt.



**Abbildung 26: Schematische Darstellung der Reaktion zur Bestimmung der von den LOV-FPs generierten Superoxidradikale durch Anwendung des Amplex Red Reaktionskits**

Die durch die Belichtung ( $\lambda = 440 \text{ nm}$ ) des Photosensibilisators (LOV-FP) potentiell gebildeten Superoxidradikale werden durch die Superoxiddismutase (SOD) in Wasserstoffperoxid umgesetzt, welches als Substrat für die im Nachweis-Kit enthaltene Meerrettich-Peroxidase dient und von dieser zu elementarem Sauerstoff umgesetzt wird. Bei dieser Reaktion wird gleichzeitig im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 die farblose Amplex Red-Reagenz in den fluoreszierenden Farbstoff Resorufin konvertiert ( $\lambda_{\text{Ex max}} 571 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em max}} 585 \text{ nm}$ ).

Zur genauen Quantifizierung der gebildeten Radikale wurde eine Eichreihe mit Hilfe von bekannten Wasserstoffperoxidkonzentrationen (0 bis  $10 \mu\text{M}$ ) angefertigt. Für die Messung der produzierten Mengen an Wasserstoffperoxid wurden die Mengen aller LOV-FPs, entsprechend einer o.D.<sub>450</sub> von 0,1 in  $100 \mu\text{l}$  Reaktionspuffer eingestellt und in 96-Well Platten pipettiert. Die Belichtung der Proteinlösungen in den einzelnen Wells erfolgte von oben mit einer weiteren 96-Well-Platte, die pro Well mit einer Blaulicht-LED ( $\lambda = 440 \text{ nm}$ ,  $\sim 0,05 \text{ mW cm}^{-2}$ , Luxeon Lumileds, Philips, Aachen) ausgestattet war. Die Zunahme der Wasserstoffperoxidkonzentration wurde indirekt über die Zunahme der Resorufin-Fluoreszenz in einem Mikrotiterplatten-Fluoreszenzspektrometer bei einer Emissionswellenlänge von  $585 \text{ nm}$  detektiert, wobei die Anregungswellenlänge bei  $571 \text{ nm}$  lag. Die Ergebnisse der belichteten Proben sowie der Dunkelkontrolle sind in Abbildung 33 (siehe Anhang) dargestellt.

Die dort dargestellten Kurven zeigen in den ersten Belichtungsminuten eine lineare Steigung, so dass, aus den Steigungen der jeweils ersten 5 Minuten, die Produktionsraten von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro Minute berechnet werden konnten. Die daraus resultierenden Werte der belichteten und unbelichteten Proteinlösungen sind in der Tabelle 17 zusammengefasst und zeigen stark variierende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktionsraten der verschiedenen LOV-FPs, die auf der belichtungsbedingten Generierung von Superoxidradikalen beruht. Dabei zeigte sich, dass DsFbFP M49I mit ungefähr  $1,5 \mu\text{M}$  pro Minute mit Abstand die höchste Menge Wasserstoffperoxid produzierte, wobei auch DsFbFP und EcFbFP noch vergleichsweise hohe Raten von  $0,9$  bzw.  $0,8 \mu\text{M} / \text{Min}$ . generierten. Deutlich geringeren Mengen dieser Radikale wurden von miniSOG, Pp1-, Pp2- sowie Pp2FbFP L30M durch die Belichtung mit

Blaulicht erzeugt, deren Produktionsraten zwischen ca. 0,1 und 0,2  $\mu\text{M}$  pro Minute lagen. Die geringste Superoxidradikal und damit verbunden auch geringste Wasserstoffperoxid-Produktionsrate konnte hingegen anhand des phiLOV 2.1 bestimmt werden.

**Tabelle 17: Übersicht der von den verschiedenen LOV-FPs generierten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Raten als Reaktion auf die Blaulichtbestrahlung**

Basierend auf den Messungen der absoluten Wasserstoffperoxidkonzentrationen in den (un-)belichteten LOV-FP-Proben (siehe Abbildung 33) wurden die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktionsraten in  $\mu\text{M}$  pro Minute berechnet. Die Produktion von Wasserstoffperoxid beruhte auf der stöchiometrischen Umsetzung von Superoxid-Radikalen, die von den LOV-FPs als Reaktion auf die Belichtung generiert wurden zu Wasserstoffperoxid durch die enzymatische Aktivität der Superoxiddismutase.

	$\mu\text{M H}_2\text{O}_2 / \text{Min.}$	
	Blaulicht	Dunkelheit
<b>DsFbFP M49I</b>	1,5 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0
<b>DsFbFP</b>	0,9 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<b>EcFbFP</b>	0,8 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0
<b>miniSOG</b>	0,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<b>Pp1FbFP</b>	0,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<b>Pp2FbFP L30M</b>	0,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<b>phiLOV2.1</b>	0,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<b>Pp2FbFP</b>	0,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

Um sicherzustellen, dass die beobachtete Generierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  der LOV-FPs auf die Belichtung zurückzuführen war, wurden die Produktionsraten der jeweiligen Dunkelkontrollen berechnet. Bei diesen war über alle getesteten LOV-FPs hinweg keine signifikante Zunahme der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion nachweisbar, wodurch die Ursache der Radikalproduktion in der Belichtung liegt. Wie aus Abbildung 33-B (siehe Anhang) hervorgeht, führte auch eine längere Inkubation der unbelichteten Proteinlösungen von einer Stunde nicht zu signifikanten Zunahmen der absoluten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen.

Im Vergleich dieser Experimentaldaten mit den Ergebnissen der vorangegangenen *E. coli in vivo* Toxizitätstests fällt auf, dass kein direkter Zusammenhang zwischen den Ausprägungen beider Effekte abzulesen ist. Die LOV-FPs Pp2FbFP (L30M), miniSOG und Pp1FbFP produzierten nur geringe Raten an  $\text{H}_2\text{O}_2$ , übten allerdings einen eindeutigen toxischen Effekt auf die Bakterienzellen aus, während DsFbFP keine Phototoxizität besaß, allerdings große Mengen  $\text{H}_2\text{O}_2$  generierte. Daher kann die primäre Ursache der Phototoxizitäten der LOV-FPs nicht auf die produzierten Mengen an Wasserstoffperoxid zurückgeführt werden.

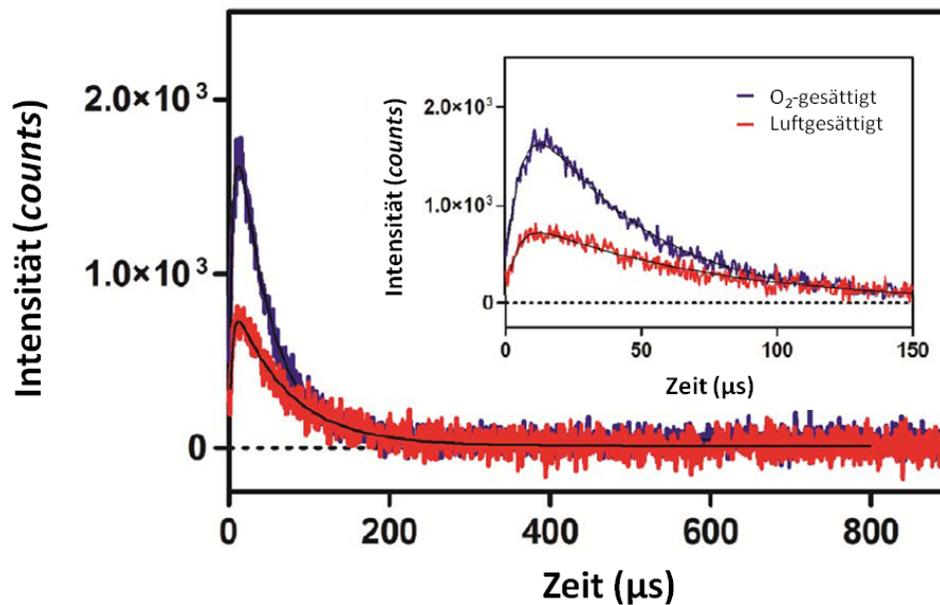
Alle getesteten LOV-FPs produzieren als Reaktion auf die Belichtung mit Blaulicht Superoxid, das durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid umgewandelt wurde. Das auf diesem Wege gebildete Wasserstoffperoxid konnte durch Einsatz eines Amplex Red-basierten Wasserstoffperoxid-Assays indirekt quantifiziert werden. Die Fähigkeiten der einzelnen KOV-FPs zur Superoxidproduktion unterscheiden sich stark, wobei besonders DsFbFP (M49I) und EcFbFP hohe Konzentrationen generieren.

### 3.4.8 *In vitro* Quantifizierung von Singulett-Sauerstoff

Neben der Reaktionstyp-I-vermittelten Produktion von Superoxid, als Reaktion auf die spezifische Anregung der Photosensibilisatoren mit Blaulicht können über den Typ-II Reaktionsmechanismus ausgehend vom Triplettzustand des Chromophors Singulett-Sauerstoffradikale generiert werden. Diese sehr reaktiven und kurzlebigen Radikale können auf zwei unterschiedliche Arten nachgewiesen bzw. quantifiziert werden. Die erste Möglichkeit ist der Einsatz eines weiteren Stoffes, der als spezifische Radikalfalle eingesetzt wird. Dieser Stoff besitzt die Fähigkeit der spezifischen Reaktion mit Singulett-Sauerstoff, woraufhin eine detektierbare Reaktion wie z. B. eine bestimmte Fluoreszenz erzeugt wird. Ein Vertreter dieser Substanzen ist das SOSG (*singlet oxygen sensor green*) (Flors *et al.*, 2006). Doch konnte es für die Analytik der LOV-FPs nicht eingesetzt werden, da sich die Fluoreszenzemissionsspektren der Fluoreszenzproteine und des SOSGs zu stark überschneiden und daher eine zuverlässige Messung unmöglich machten (LOV-FPs  $\lambda_{\text{Ex max}}$  450 nm,  $\lambda_{\text{Em max}}$  495 nm; SOSG  $\lambda_{\text{Ex max}}$  504 nm,  $\lambda_{\text{Em max}}$  525 nm). Ein weiterer Nachweis ist über die in den folgenden Analysen eingesetzte Detektion der Singulett-Sauerstoff-charakteristischen Phosphoreszenz bei 1275 nm möglich. Für die Berechnung der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute der LOV-FPs wurde Phenalenon-2-Sulfat (PNS;  $\Phi_{\Delta} = 1$ ) als Referenzsubstanz eingesetzt. Der photometrische Nachweis der generierten Radikale erfolgte im Rahmen eines internationalen Kooperationsprojektes in den Labors der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Santi Nonell an der Ramon Llull Universität Barcelona, Spanien.

Für die Detektion der generierten Singulett-Sauerstoffradikale wurden die Proteinproben mit deuteriertem PBS-Puffer (dPBS) auf ein finales D<sub>2</sub>O : H<sub>2</sub>O Verhältnis von 9 : 1 eingestellt. Der Einsatz von schwerem Wasser sollte den Nachweis der Singulett-Sauerstoffradikale erleichtern, da die <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Lebenszeit in diesem Medium mit ~65  $\mu$ s um das ca. 20-fache länger ist als in Wasser (~ 3,5  $\mu$ s) (Wilkinson *et al.*, 1995). Die Proben wurden entweder luft- oder sauerstoffgesättigt und die Phosphoreszenz bei 1275 nm nach einer kurzen Anregung durch einen Laserimpuls bei 355 nm detektiert. Die Messungen ergaben, dass alle getesteten LOV-FPs Singulett-Sauerstoff generieren, wie es beispielhaft für das Pp2FbFP in Abbildung 27 dargestellt ist (Ergebnisse der Phosphoreszenzmessungen aller untersuchten LOV-FPs sind in der Abbildung 34 im Anhang dargestellt). Die dort dargestellten Kurven repräsentieren die Intensität der Phosphoreszenz (1275 nm) im zeitlichen Verlauf nach der Anregung durch einen Laserpuls bei 355 nm. Dabei ist eine deutliche Zunahme der Emission als Reaktion auf den Laserimpuls erkennbar, die nach dem Erreichen eines Maximums innerhalb von 150  $\mu$ s wieder abklingt. Des Weiteren ist erkennbar, dass die Intensität der Phosphoreszenz und damit auch die Menge der Singulett-Sauerstoffradikale, in der sauerstoffgesättigten Probe höher liegt als in der luftgesättigten Proteinlösung. Dies ist auf die höhere Sauerstoffkonzentration zurückzuführen, da mehr molekularer Sauerstoff für die Reaktion

mit dem sich im Tripletzustand befindlichen Chromophor zur Verfügung steht, das zu Singulett-Sauerstoff reagieren kann.



**Abbildung 27: Nachweis der von Pp2FbFP ausgelösten Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ )-Produktion**

Zeitaufgelöste  $^1\text{O}_2$ -Phosphoreszenz bei 1275 nm von Pp2FbFP in  $\text{O}_2$ -gesättigtem (blaue Kurve) bzw. luftgesättigtem (rote Kurve) dPBS-Puffer nach Anregung durch einen Laserimpuls bei 355 nm. Das Insert zeigt die Ergebnisse der gleichen Messung mit einer modifizierten Skalierung der Zeitachse.

Nachdem die Fähigkeit der LOV-FPs zur Produktion von Singulett-Sauerstoffradikalen erfolgreich demonstriert werden konnte, wurden zur Bestimmung der Effektivität dieser Reaktion die  $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeuten der einzelnen Fluoreszenzproteine bestimmt. Dies erfolgte über eine multi-exponentielle Regression der aufgenommenen Phosphoreszenzkurven der Proteine. Die gemessenen Kurven, als Funktion der Lumineszenz gegen die Zeit, zeigen einen exponentiellen Anstieg und einen exponentiellen Zerfall. Der Anstieg beschreibt dabei die Produktion der  $^1\text{O}_2$ -Radikale bei gleichzeitigem Zerfall des Tripletzustandes und ist daher ein Maß für die Lebensdauer dieses Zustandes. Somit repräsentiert die anfängliche Zunahme der Phosphoreszenz, vom Beginn der Messung bis zum Erreichen des Maximums, die Lebensdauer des Tripletzustandes des Chromophors ( $\tau_{\text{Triplet}}$ ). Der Zerfall der Kurve beschreibt hingegen die Lebensdauer der  $^1\text{O}_2$ -Radikale ( $\tau_{\Delta}$ ), wobei diese von dem Zeitpunkt der maximalen Emission bis zum Erreichen des Null-Werts beschrieben wird. Da für die Bestimmung der  $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeuten ( $\Phi_{\Delta}$ ) nur die Zerfallskinetik von Belang ist, wurde der exponentielle Anstieg durch die Formel:  $\tau_{\Delta \text{ Probe}} = \tau_{\Delta} / (\tau_{\text{Triplet}} - \tau_{\Delta})$  aus dem Wert eliminiert. Um einen absoluten Wert der  $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeuten für die LOV-FPs berechnen zu können, wurden die gleichen Messungen mit der Referenzsubstanz PNS ( $\Phi_{\Delta} = 1$ ) durchgeführt, woraus die Werte für  $\tau_{\Delta \text{ Referenz}}$  erhalten wurden. Dabei wurde das PNS auf Absorptionen bei 355 nm eingestellt, die den

Absorptionen der jeweiligen Proteinproben entsprachen. Durch Verhältnisbildung der Lebenszeiten der Probe ( $\tau_{\Delta \text{ Probe}}$ ) mit der Lebenszeit der Referenz ( $\tau_{\Delta \text{ Referenz}}$ ) ergab sich der Wert für die  $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeute des Proteins ( $\Phi_{\Delta}$ ). Die sich aus dieser Bestimmung ergebenden Werte sind in Tabelle 18 zusammengefasst und zeigen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Fluoreszenzproteinen. Dabei fällt auf, dass DsFbFP und miniSOG nur wenig Singulett-Sauerstoffradikale generieren, während das DsFbFP M49I mit einer  $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeute von 0,64 deutlich höhere Radikalmengen produziert. Alle anderen getesteten LOV-FPs erzeugen im Vergleich etwas moderate Mengen, so dass ihre  $\Phi_{\Delta}$  zwischen 0,08 (EcFbFP), 0,11 (Pp2FbFP und Pp2FbFP L30M) und 0,26 (phiLOV2.1) schwanken.

**Tabelle 18: Übersicht der *in vitro* bestimmten Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten ( $\Phi_{\Delta}$ ) der LOV-FPs**

Übersicht der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten der LOV-FPs. Die Messung erfolgte über die Phosphoreszenz bei 1275 nm nach einer Laser-Anregung bei 355 nm. Als Referenzsubstanz wurde PNS ( $\Phi_{\Delta} = 1$ ) eingesetzt.

LOV-FP	$\Phi_{\Delta}$
DsFbFP M49I	0,64
phiLOV2.1	0,26
Pp1FbFP	0,22
Pp2FbFP	0,11
Pp2FbFP L30M	0,11
EcFbFP	0,08
miniSOG	0,03
DsFbFP	0,02

Beim Vergleich dieser Werte mit den beobachteten *in vivo* Phototoxizitäten der verschiedenen LOV-FPs (Abbildung 21 und 22) ist festzustellen, dass die Ergebnisse beider Bestimmungen tendenziell korrelieren, wenngleich phiLOV2.1 und miniSOG diesem Trend nicht folgen. DsFbFP M49I generierte  $^1\text{O}_2$ -Radikale mit einer Quantenausbeute von 0,64 und zeigte auch einen deutlichen phototoxischen Einfluss auf die *E. coli* Bakterienzellen. Auch die festgestellte Reihenfolge der Höhe der  $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeuten von Pp1FbFP, Pp2FbFP (L30M) gefolgt von EcFbFP konnte in der selben Rangfolge bei den qualitativen *in vivo* Toxizitätstests beobachtet werden (Abbildung 21). Ferner generiert DsFbFP, das keinen toxischen Effekt auf die Bakterienzellen ausübte, auch nur sehr geringe Mengen Singulett-Sauerstoffradikale. Ausnahmen dieser Übereinstimmungen bilden phiLOV2.1 und miniSOG. phiLOV2.1 produzierte  $^1\text{O}_2$ -Radikale mit einer Quantenausbeute von 0,26, zeigte allerdings keinen negativen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Bakterienzellen, während sich die Zusammenhang genau gegenläufig für das miniSOG darstellte. Eine Begründung für dieses Phänomen kann allerdings auf

Grundlage der experimentellen Messdaten, die im Rahmen dieser Arbeit angefertigt wurden nicht erfolgen.

Im direkten Vergleich der  $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeuten der LOV-FPs mit den jeweiligen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktionsraten (Tabelle 17) ist überdies festzustellen, dass die Produktionsraten, mit denen die ROS-Spezies von den LOV-FPs generiert werden, nicht korrelieren. Daher ist die Verteilung der ROS-Spezies und die Effizienz mit denen dieser erzeugt werden von weiteren Faktoren ab. Dabei könnte die Effektivität mit denen die angeregten Singulett- bzw. Triplettzustände gebildet werden sowie deren Stabilitäten von Bedeutung sein, da diese Zustände für die Art der gebildeten Radikale bestimmend sind (vgl. Abbildung 6).

Die *in vitro* Bestimmungen der generierten Singulett-Sauerstoffradikale über deren Phosphoreszenz bei 1275 nm ergaben, dass alle getesteten LOV-FPs diese reaktive Spezies als Reaktion auf einen Laserpuls bei 355 nm erzeugten. Dabei unterschieden sich die Produktionsraten der Radikale je nach betrachtetem Fluoreszenzproteinen jedoch stark, was durch die hohen Schwankungen der festgestellten Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten ( $\Phi_\Delta$ ) repräsentiert wurde. Das LOV-FP mit der schwächsten  $\Phi_\Delta$  ist DsFbFP (0,02), während das DsFbFP M49I mit 0,64 die höchste Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute besaß.

### 3.4.9 Genomweite Analyse der durch die Photosensibilisatoren ausgelösten Stressantwort in *E. coli* BL21(DE3)

Nachdem in den vorangegangenen *in vitro* Experimenten die Fähigkeiten zur Sauerstoffradikalproduktion der LOV-FPs und die daraus resultierenden Möglichkeiten zur lichtinduzierten Abtötung von Bakterien- sowie Säugerzellen *in vivo* demonstriert wurden, sollte im Anschluss daran die Reaktion von *E. coli* BL21(DE3) Zellen auf den intrazellulären Radikalstress auf transkriptioneller Ebene untersucht werden, was mit Hilfe DNA-Microarray Experimente erfolgte. Dabei stand die Fragestellung im Vordergrund, ob eine Untersuchung der *E. coli*-Radikalstressantwort durch das Hilfsmittel der *photosensitizer* ermöglicht wird, wodurch diese ein neuartiges probates Werkzeug für solche Arten der Analysen darstellen würden. Durch spezifische Markierung bestimmter Strukturen mit den LOV-FPs wäre es dann nicht-invasiv möglich, einen lokalen, intrazellulären oxidativen Stress auszulösen und dessen Auswirkungen auf die Zellphysiologie oder die Signaltransduktion zu studieren.

Da die Durchführung von Transkriptomanalysen vergleichsweise aufwendig und teuer ist, wurden zwei LOV-FPs aus dem zur Verfügung stehenden Repertoire ausgewählt, anhand derer die Analysen durchgeführt wurden. Als Modellproteine wurden dazu DsFbFP M49I und Pp2FbFP gewählt. Ersteres stellte ein interessantes Beispiel dar, da es in den vorangegangenen *in vitro* Analysen hohe Mengen an Sauerstoffradikalen erzeugte, und in den *E. coli* Lebendzellzahlanalysen einen deutlichen toxischen Effekt auf die belichteten Bakterienzellen ausübte. Im Kontrast dazu wurde als zweites Modellprotein Pp2FbFP gewählt, da es einen ähnlichen phototoxischen Effekt auf die Bakterien- und Säugerzellen besaß, jedoch nur vergleichsweise geringe Mengen an ROS (*reactive oxygen species*) generierte. Daher war im Vergleich beider Proteine evtl. ein Unterschied in der Stressantwort von *E. coli* zu erwarten.

Für die Transkriptomanalyse wurden chemisch-transformationskompetente *E. coli* BL21(DE3) Zellen (2.11.5.1) mit den Expressionsplasmiden pET28 DsFbFP M49I bzw. pET28a Pp2FbFP (2.2) transformiert (2.11.5) und, wie unter (2.11.7) beschrieben, angezogen, wobei die Testkultur beidseitig mit Blaulicht (LED-Platinen  $\lambda = 462 \text{ nm}$ ,  $100 \text{ mW cm}^{-2}$ , Insta Elektro, Lüdenscheid) bestrahlt wurde, während die Kontrollkultur in Dunkelheit inkubiert wurde. Der Abstand der eingesetzten LED-Platinen betrug dabei 15 cm wobei die Kulturen mittig zwischen diese platziert wurden. Vorversuche, die anhand einer Zeitreihe von 5, 10, 15 und 30-minütiger Belichtungsdauer durchgeführt wurden hatten gezeigt, dass eine Belichtungsdauer der *E. coli* Expressionskulturen von 15 Min. für die DsFbFP M49I-exprimierende Kultur sowie 5 Min. für die Pp2FbFP-exprimierende Kultur für die Analyse der Stressantwort am besten geeignet waren. Zu diesen Zeitpunkten wurden in den jeweiligen Proben die stärksten regulatorischen Effekte in Hinblick auf die Veränderung der Transkriptionsraten sowie auf die Anzahl der regulierten Gene identifiziert. Daher wurden diese Bedingungen für die weiteren

Experimente gewählt. Diese unterschiedlichen experimentellen Bedingungen waren einsetzbar, da die von dem jeweiligen LOV-FP ausgelöste Stressantwort separat betrachtet werden sollte und nicht direkte Vergleiche zwischen beiden Photosensibilisatoren durchgeführt werden sollten. Eine prinzipielle, vergleichende Aussage zur Stärke der Antwort sollte allerdings trotzdem möglich sein, da von beiden Proben die Bedingungen mit den prägnantesten, regulatorischen Effekten angewandt wurden.

Um diese Stressantwort genomweit analysieren zu können, wurden transkriptomweite DNA-Microarray Experimente durchgeführt. Diese geschahen in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Tino Polen vom Institut für Bio- und Geowissenschaften 1 (IBG-1) des Forschungszentrum Jülich. Für die DNA-Microarray-Experimente wurden nach den angegebenen Belichtungsdauern Zellproben aus den Expressionskulturen entnommen und daraus die Gesamt-RNA isoliert (2.12.1). Um sicherzustellen, dass die Bakterien zum Zeitpunkt der Probenentnahmen noch voll lebensfähig und nicht durch den beschriebenen phototoxischen Einfluss der LOV-FPs bereits abgetötet waren, wurden den Kulturen Zellproben entsprechend einer o.D.<sub>580</sub> von 0,001 entnommen. Diese wurden anschließend auf LB-Festmedienplatten ausgestrichen, über Nacht inkubiert und am Folgetag auf gewachsene Bakterienkolonien hin analysiert (Abbildung 35 im Anhang). Dabei wurde festgestellt, dass alle Platten mit ungefähr der gleichen Anzahl an Bakterienkolonien bewachsen waren, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Lebensfähigkeit der Bakterienzellen durch die gewählten Versuchsbedingungen nicht beeinflusst wurde. Für die Analyse der zellulären Stressantwort war dies eine grundlegende Voraussetzung.

Basierend auf der isolierten Gesamt-RNA wurden daraufhin fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden durch reverse Transkription hergestellt (2.12.3) und diese mit den entsprechenden *E. coli* DNA-Chips hybridisiert (2.13.10). Dabei wurde die cDNA, die aus der belichteten Kultur hergestellt wurde, mit dem Cy5-Farbstoff rot-fluoreszierend markiert und die aus der Dunkelkontrolle hergestellte cDNA mit dem Cy3-Farbstoff grün-fluoreszierend markiert. Nach der Hybridisierung wurden die Fluoreszenzsignale der hybridisierten cDNA-Sonden mit Hilfe eines DNA-Microarray-Scanners detektiert und unter Einsatz der Software „GenePix Pro 7“ ausgewertet (2.13.11), wobei nur Spots betrachtet wurden, die durch die Software automatisch erkannt wurden ( $Flags \geq 0$ ) und deren Signal-zu-Hintergrundverhältnisse  $\geq 3$  betragen. Diese Daten wurden daraufhin mit Hilfe des Softwarepakets „BioConductor R-Package“ normalisiert, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse über mehrere DNA-Microarray-Experimente zu ermöglichen. Aus den normalisierten Werten der einzelnen Fluoreszenzsignale wurde das Verhältnis gebildet, wodurch ein Wert resultierte, der das regulatorische Verhältnis des jeweiligen Gens auf transkriptioneller Ebene beschrieb. Werte  $> 1$  beschreiben eine verstärkte Expression eines Gens um einen Faktor, der dem jeweiligen Wert entspricht. Werte  $< 1$  beschreiben hingegen eine verminderte Genexpression um den Faktor, der

dem Kehrwert des jeweiligen Wertes entspricht. Da in diesem Experiment allerdings der Fokus auf der Sauerstoffradikal-induzierten Stressantwort von *E. coli* lag, wurden nur positive, also verstärkte Regulationsprozesse betrachtet, wobei der Schwellenwert auf eine zumindest dreifach-verstärkte Genexpression festgelegt wurde. Um eine belastbare Aussage bezüglich der Regulation einzelner Gene unter den beschriebenen Bedingungen tätigen zu können, wurden die Analysen in drei voneinander unabhängigen Experimenten anhand von biologischen Replikaten durchgeführt. Die aus den einzelnen Versuchen resultierenden Ergebnisse wurden für jedes Gen gemittelt und anschließend dem student'schen t-Test unterzogen, wobei nur Ergebnisse als signifikant betrachtet wurden, die einen *p*-Wert von  $\leq 0,05$  aufwiesen. Gene, deren Expression den beschriebenen Voraussetzungen entsprachen, sind in Tabelle 19 für die Pp2FbFP-exprimierende Kultur bzw. in Tabelle 20 für die DsFbFP M49I -exprimierende Kultur dargestellt.

**Tabelle 19: Übersicht der durch transkriptomweite DNA-Microarray-Analyse identifizierten Gene einer Pp2FbFP-exprimierenden *E. coli* BL21(DE) Kultur, die mit Blaulicht ( $\lambda = 462$  nm) bestrahlt wurde**

Dargestellt sind Gene, deren Expressionsraten in den belichteten *E. coli* BL21(DE3) Pp2FbFP-Expressionskulturen um das mind. 3-fache erhöht waren und einen *p*-Wert (Student'scher t-Test) von  $\leq 0,05$  aufwiesen. (\* Kriterien nicht vollständig erfüllt)

Gen	Verstärkte Expression	<i>p</i> -Wert	zugeordnete Funktion	Referenz
<i>azoR</i>	7,7	0,023	NADH/NADPH abhängige Azoreduktase	(Ito <i>et al.</i> , 2005, 2006)
<i>ybiJ</i>	6,6	0,034	nicht bekannt	
<i>yhaK</i>	5,6	0,055*	Bicupin-ähnliches Protein	(Gurmu <i>et al.</i> , 2009)
<i>gntK</i>	4,0	0,046	Glukonokinase	(Izu <i>et al.</i> , 1996)

Durch die Analysen der belichteten Pp2FbFP-exprimierenden *E. coli* BL21(DE3) Kultur konnten überraschender Weise lediglich vier Gene identifiziert werden, deren Expressionslevel um den Faktor von mindestens drei erhöht waren. Dabei konnte für *azoR* eine ca. 7,7-fache verstärkte Expression, für *ybiJ* eine 6,6-fache, für *yhaK* eine 5,6-fache und für *gntK* eine 4-fach verstärkte Genexpression bestimmt werden. Das Gen *azoR* kodiert eine NADH/NADPH abhängige Azoreduktase, die eine Chinonreduktase-Aktivität besitzt, wodurch sie an der zellulären Antwort auf Thiol-bedingten Stress involviert ist (Liu *et al.*, 2009). Für einige Chinonreduktasen ist deren Einbindung in Wasserstoffperoxid-Resistenzmechanismen beschrieben (Gonzalez *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008; Patridge & Ferry, 2006), was eine mögliche Erklärung der beobachteten verstärkten Expression des *azoR* darstellt. Das Gen *yhaK* kodiert für ein Bicupin-ähnliches Protein, dessen Funktion unbekannt ist. Allerdings konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die Expression von *yha* in *E. coli* durch Nitrosoglutathion verstärkt wird (Gurmu *et al.*, 2009). Den Genprodukten von *ybiJ* und *gntK* konnte

bislang keine Funktion in der ROS-Stressantwort zugeordnet werden. Die nur geringe Anzahl an Genen, die als Reaktion auf die Belichtung der Pp2FbFP-exprimierenden Zellen identifiziert wurde, zeigt, dass die Auslösung einer ROS-spezifischen Stressantwort durch den Einsatz von Pp2FbFP nicht erfolgreich war.

Im Gegensatz zu dieser geringen Menge an regulierten Genen konnte anhand der DsFbFP M49I-exprimierenden Bakterienkultur eine deutlich größere Anzahl hochregulierter Gene identifiziert werden, die in Tabelle 20 zusammengefasst sind. Das mit Abstand am stärksten hochregulierte Gen ist *dps*, dessen Expression unter Belichtungsbedingungen um mehr als das 27-fache erhöht war. Aber auch *azoR*, *sufB* und *lacI* sind um mehr als den Faktor 10 hochreguliert. Für mehrere dieser Gene ist deren Involvierung in die Radikalstressantwort bekannt. Darunter ist die Gruppe der *suf*-Gene, die unter Stressbedingungen das Suf-System ausbilden, welches die Funktionen des Eisen-Schwefel-Cluster-Synthese-Komplexes (Isc) übernehmen, welches sensitiv gegenüber Radikalstress ist (Imlay, 2013; Jang & Imlay, 2010). Die Regulation erfolgt in diesem Fall über das OxyR-System, wobei sich in der dargestellten Liste weitere Gene befinden, deren Expressionen ebenfalls durch OxyR reguliert werden (Chiang & Schellhorn, 2012). OxyR ist ein Transkriptionsregulator, der ein Cystein im aktiven Zentrum besitzt, das sehr schnell mit  $H_2O_2$  reagieren kann (eine intrazelluläre  $H_2O_2$ -Konzentration von ungefähr 200 nM genügt zur Aktivierung), wonach es zur Ausbildung einer Disulfidbindung kommt. Dadurch kommt es zu einer konformellen Modifikation des OxyR, wodurch dieses in seine aktive Form überführt wird und daraufhin als positiver Transkriptionsfaktor die Expression der Stressantwortgene induziert (Aslund *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2001). Gene, die diesem Regulon zugeordnet sind, konnten bereits identifiziert werden (Chiang & Schellhorn, 2012; Zheng *et al.*, 2001). Unter diesen Genen befinden sich die Gene *dps* und *yaaA*, deren Genprodukte an der Kontrolle des intrazellulären Eisenlevels und dadurch am DNA-Schutzmechanismus beteiligt sind (Liu *et al.*, 2011b; Park *et al.*, 2005), wobei Dps als ein Ferritin-Homolog an die DNA binden und diese durch Eisen-Komplexbildung vor Sauerstoffradikale schützen kann (Grant *et al.*, 1998; Ilari *et al.*, 2002). AhpC und AhpF bilden zusammen einen Thiol-basierten Peroxidasekomplex, der Elektronen von NADH auf  $H_2O_2$  übertragen kann, wodurch letzteres zu Wasser reduziert wird (Morgan *et al.*, 1986). MntH ist ein Transporter, der unter Stressbedingungen vermehrt Mangan, welches eine höhere Stabilität gegenüber  $H_2O_2$  aufweist, in die Zelle transportiert, wo dieses Eisen als Kofaktor ersetzt und des Weiteren als Kofaktor für die manganabhängige Superoxiddismutase (Mn SOD) dient (Kehres *et al.*, 2002). Weitere, durch OxyR regulierte Gene sind *grxA* (Glutaredoxin 1) (Tao, 1997), *trxC* (Thioredoxin 2) (Ritz, 2000), *katG* (Hydroperoxidase I) (Hoerter *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 1986; Oktyabrsky *et al.*, 2001) und *hemH*, das eine Eisen-Chelatase kodiert (Zheng *et al.*, 2001).

**Tabelle 20: Übersicht der durch transkriptomweite DNA-Microarray-Analyse identifizierten Gene einer DsFbFP M49I-exprimierenden *E. coli* BL21(DE) Kultur, die mit Blaulicht ( $\lambda = 462 \text{ nm}$ ) bestrahlt wurde**

Dargestellt sind Gene, deren Expressionsraten in den belichteten *E. coli* BL21(DE3) DsFbFP M49I-Expressionskulturen um das mind. 3-fache erhöht waren und einen *p*-Wert (Student'scher t-Test) von  $\leq 0,05$  aufwiesen. (\* Kriterien nicht vollständig erfüllt). Gene, die durch OxyR-reguliert werden, sind in blauer Schrift dargestellt.

Gen	Verstärkte Expression	<i>p</i> -Wert	zugeordnete Funktion	Referenz
<i>dps</i>	27,6	0,002	Eisen bindendes Protein	(Altuvia <i>et al.</i> , 1994)
<i>azoR</i>	13,0	0,002	NADH/NADPH abhängige Azoreduktase	(Ito <i>et al.</i> , 2005, 2006)
<i>sufB</i>	12,0	0,008	Aufstellung SufBCD-Komplex	(Zheng <i>et al.</i> , 2001)
<i>lacl</i>	11,2	0,048	Transkriptionsrepressor	(Matthews & Nichols, 1998)
<i>ahpC</i>	7,5	0,005	Peroxidasekomplex	(Morgan <i>et al.</i> , 1986)
<i>sufC</i>	6,8	0,012	Aufstellung SufBCD-Komplex	(Zheng <i>et al.</i> , 2001)
<i>sufS</i>	6,7	0,014	Aufstellung SufBCD-Komplex	(Zheng <i>et al.</i> , 2001)
<i>sufD</i>	5,5	0,017	Aufstellung SufBCD-Komplex	(Zheng <i>et al.</i> , 2001)
<i>yhaK</i>	5,4	0,014	Bicupin-ähnliches Protein	(Gurmu <i>et al.</i> , 2009)
<i>pspA</i>	5,1	0,004	<i>phage shock</i> Protein	(Darwin, 2005)
<i>ybiJ</i>	5,1	0,012	keine Funktion	
<i>glpE</i>	4,8	0,003	Schwefeltransferase	(Ray <i>et al.</i> , 2000)
<i>mokB</i>	4,8	0,031	Regulatorisches Peptid	
<i>mntH</i>	4,7	0,021	Mangan-Transporter	(Kehres <i>et al.</i> , 2002)
<i>ahpF</i>	4,6	0,014	Peroxidasekomplex	(Morgan <i>et al.</i> , 1986)
<i>katG</i>	4,2	0,015	Hydroperoxidase I	(Morgan <i>et al.</i> , 1986)
<i>grxA</i>	4,2	0,017	Glutaredoxin 1	(Tao, 1997)
<i>hemH</i>	4,1	0,020	Eisenchelatase	(Zheng <i>et al.</i> , 2001)
<i>trxC</i>	4,0	0,009	Thioredoxin 2	(Ritz, 2000)
<i>pspD</i>	3,8	0,003	<i>phage shock</i> Protein	(Darwin, 2005)
<i>clpS</i>	3,8	0,002	ClpAP-Proteasekomplex	(Hou <i>et al.</i> , 2008)
<i>pspB</i>	3,7	0,029	<i>phage shock</i> Protein	(Darwin, 2005)
<i>pspC</i>	3,3	0,008	<i>phage shock</i> Protein	(Darwin, 2005)
<i>yaaA</i>	3,1	0,021	Kontrolle des Eisenlevel	(Liu <i>et al.</i> , 2011b)
<i>sufW</i>	2,9*	0,008	Aufstellung SufBCD-Komplex	(Zheng <i>et al.</i> , 2001)

Des Weiteren konnte mit Hilfe des DsFbFP M49I eine verstärkte Expression von Genen nachgewiesen werden, die nicht durch das OxyR-System kontrolliert werden. Darunter das *psp*-Operon, das *phage*-

*shock* Proteine kodiert und *glpE*, welches eine Schwefeltransferase kodiert (Ray *et al.*, 2000) sowie *clpS* (Teil des ClpAP-Proteasokomplexes) (Hou *et al.*, 2008) und *mokB*, dem bisher keine Funktionalität zugeordnet ist.

Die hohe Anzahl der regulierten Gene, von denen einige der OxyR-Radikalstressantwort zugeordnet sind, zeigt, dass durch die Belichtung der DsFbFP M49I-exprimierenden Kultur die ROS-spezifische Stressantwort in *E. coli* ausgelöst werden konnte. Dadurch könnte dieses Fluoreszenzprotein zur gezielten Induktion von Sauerstoffradikalstress in einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung eingesetzt werden. Daher könnten für diese Analysen völlig neue Möglichkeiten entstehen.

Neben dem OxyR-System zum Schutz vor oxidativen Stress besitzt *E. coli* mit dem SoxRS-System noch ein weiteres Sauerstoffradikal-abhängiges Regulationssystem, das primär auf Superoxid und reduzierende Intermediate organischer freier Radikale (*redox-cycling drugs*) aktiviert wird (Baez & Shiloach, 2013; Gu & Imlay, 2011; Liochev *et al.*, 1999; Pomposiello *et al.*, 2001). Bemerkenswerter Weise finden sich unter den identifizierten Genen (Regulation  $\geq 3$ ) keine Vertreter dieses Regulons, so dass ausschließlich das OxyR-Schutzsystem durch die Belichtung der DsFbFP M49I-exprimierenden Zellen induziert wurde. Im Gegensatz zum SoxRS-System wird der OxyR-Mechanismus primär durch Wasserstoffperoxid ausgelöst (Imlay, 2008, 2013).

Daher könnte der Unterschied der beiden Stressantworten in den unterschiedlichen Mengen der generierten Radikale liegen. Die *in vitro* Studien zur ROS-Produktion der LOV-FPs ergaben, dass Pp2FbFP mit nur 0,1  $\mu\text{M}$  / Min. geringe Mengen Wasserstoffperoxid generierte, während DsFbFP M49I 1,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzierte. Deshalb könnte die vom Pp2FbFP erzeugte Radikalkonzentration nicht zur Auslösung der Stressantwort genügt haben. Hingegen war die vom DsFbFP M49I hergestellte Radikalkonzentration für die Auslösung der OxyR-regulierten Stressantwort ausreichend.

Die transkriptomweite Analyse auf Veränderungen der Genexpression von Pp2FbFP bzw. DsFbFP M49I-exprimierenden *E. coli* Kulturen unter Blaulichtbedingungen durch DNA-Microarray-Experimente wurden in der Pp2FbFP-exprimierenden Kultur vier, und in der DsFbFP M49I-exprimierenden Kultur 25 Gene identifiziert, deren Expressionsraten unter Blaulichtbedingungen um das mind. Dreifache hochreguliert waren. Dabei konnten einige Gene identifiziert werden, die durch das OxyR-System reguliert werden. Dadurch konnte erfolgreich gezeigt werden, dass insbesondere DsFbFP M49I als Photosensibilisator zur gezielten Auslösung der Radikalstressantwort befähigt ist. Dieses Fluoreszenzprotein könnte somit als ein neuartiges molekulargenetisches Werkzeug verwendet werden, um gezielt Sauerstoffradikalstress mit hoher Zeit- und Raumauflösung zu erzeugen, wodurch völlig neue Möglichkeiten zu deren Analyse entstehen.

## 4 Diskussion

Lichtsensitive *light, oxygen, voltage* (LOV) Sensordomänen sind über alle drei Domänen des Lebens verteilt (Krauss *et al.*, 2009). In Pflanzen sind sie als funktionelle sensorische Einheiten der Phototropine an grundlegenden lichtgesteuerten Prozessen, wie z. B. dem Phototropismus, der Regulation der Stomataöffnung und der Reorganisation der Chloroplasten beteiligt (Christie, 2007; Demarsy & Fankhauser, 2009; Losi & Gärtner, 2011). In den vergangenen Jahren konnten mehrere bakterielle LOV-Blaulichtrezeptoren identifiziert werden. Darunter PpSB1-LOV und PpSB2-LOV aus *P. putida*, RsLOV aus *Rhodobacter sphaeroides* und YtvA aus *B. subtilis* (Hendrischk *et al.*, 2009a; Jentzsch *et al.*, 2009; Krauss *et al.*, 2005; Losi, 2004). Die regulatorischen Funktionen der bakteriellen LOV-Lichtrezeptoren sind noch unzureichend erforscht, doch zeigen die bisherigen Erkenntnisse, dass diese Funktionen sehr vielfältig sind. So besitzen diese LOV-Lichtrezeptoren regulatorische Einflüsse bei der generellen Stressantwort, Virulenz, Pathogenität und Motilität (Herrou & Crosson, 2011). Neben diesen regulatorischen Funktionen ist es daher für die Grundlagenforschung von besonderem Interesse, die Reizaufnahme der Rezeptoren zu erforschen. Dabei kommt der Analyse des Photozyklus eine besondere Bedeutung zuteil, da er das primäre Licht-anhängigen Ereignis für die spätere intra- und intermolekulare Signalweiterleitung darstellt. Neben dieser grundlegenden Fragestellung ist die biotechnologische Anwendbarkeit der Rezeptoren als biotechnologische Werkzeuge im Bereich der Optogenetik von Interesse (Christie *et al.*, 2012b). Bei diesem Anwendungsgebiet werden Photorezeptoren zur nicht-invasiven lichtgesteuerten Kontrolle von biologischen Prozessen mit einer hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung eingesetzt (Fenno *et al.*, 2011).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese Punkte anhand des LOV-Blaulichtrezeptors DsLOV aus *D. shibae* untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Studien in Hinblick auf die Funktionsweise des Rezeptors, seine regulatorische Funktion sowie die Anwendungsmöglichkeiten von bakteriellen LOV-Rezeptoren als Fluoreszenzreporter und Photosensibilisatoren diskutiert.

### 4.1 Funktion des Photorezeptors DsLOV

#### 4.1.1 DsLOV - Struktur

Durch Sequenzvergleiche mit bekannten bakteriellen LOV-Photorezeptoren konnten drei putative LOV-Blaulichtrezeptoren im Genom von *D. shibae* identifiziert werden (vgl. Abbildung 7). Eines dieser Gene (*Dshi\_2006*) kodiert für das DsLOV, dessen Struktur im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde (siehe Abbildung 9-B). Diese zeigt eine Organisation der Kerndomäne in fünf antiparallele

$\beta$ -Faltblätter und vier  $\alpha$ -Helices mit nichtkovalent gebundenem Kofaktor und entspricht damit den jeweiligen LOV-Kerndomänen bereits bekannter bakterieller LOV-Proteinstrukturen, wie z. B. der des PpSB1-LOV aus *P. putida* (Circolone *et al.*, 2012), des YtvA aus *B. subtilis* (Möglich & Moffat, 2007) oder des RsLOV aus *R. sphaeroides* (Metz *et al.*, 2012a). Analytische Größenausschlusschromatographien (SEC), die von der Arbeitsgruppe um Dr. Ulrich Krauss durchgeführt wurden, ergaben ein Molekulargewicht des gereinigten DsLOV von 35,6 ( $\pm$  0,5) kDa und bewiesen damit die dimere Organisation des Proteins in Lösung, da dessen berechnetes theoretisches Dimer-Molekulargewicht 33,7 kDa betrug. Üblicherweise dimerisieren LOV-Blaulichrezeptorproteine über mehrere hydrophobe Bereiche der angehängten N- und C-terminalen Helices sowie der LOV-Kerndomäne, wie es beispielhaft beim PpSB1-LOV geschieht (Circolone *et al.*, 2012). PISA-Analysen (Krissinel & Henrick, 2007), die von PD Dr. Joachim Granzin anhand der Strukturdaten des DsLOV durchgeführt wurden, legten allerdings eine ungewöhnliche Dimerisierung des DsLOV über ein untypisches N-terminal gelegenes *Turn* (As 20-23)- *Helix* (A' $\alpha$ , As 24-27)- *Loop* (As 28-35)-Motiv (vgl. Abbildung 9-A) nahe. Dieses Motiv zeigt starke Homologien mit einem N-terminalen *Loop-Helix-Loop*-Motiv des pflanzlichen AsLOV2 (LOV2 Domäne des Phototropin 1) aus *A. sativa*, welches als isolierte Domäne allerdings ausschließlich als Monomer vorkommt (Halavaty & Moffat, 2007). Eine dem DsLOV vergleichbare Dimerisierung ist bisher nur für einen weiteren LOV-Blaulichreporter beschrieben, dem VVD aus *N. crassa* (Schafmeier & Diernfellner, 2011; Vaidya *et al.*, 2011; Zoltowski & Crane, 2008; Zoltowski *et al.*, 2007, 2009). Dieser LOV-Rezeptor besitzt wie das DsLOV keine C-terminale Effektdomäne, allerdings eine N-terminale Erweiterung, die als Ncap bezeichnet wird und aus einer  $\alpha$ -Helix und einem  $\beta$ -Faltblatt besteht. Im Dunkelzustand bindet das Ncap an hydrophobe Bereiche des  $\beta$ -Faltblattgerüsts der LOV-Domäne (Zoltowski *et al.*, 2007). Durch Belichtung wird diese Bindung gelöst, wodurch das Ncap zur Ausbildung von Dimeren oder zur Interaktion mit anderen LOV-Rezeptoren wie dem WCC (*White Collar Complex*) dient (Chen *et al.*, 2010; Hunt *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2003; Vaidya *et al.*, 2011). Obwohl die N-terminale Verlängerung des VVD mit 71 Aminosäuren deutlich größer ist als die nur 35 Aminosäuren umfassende des DsLOV, zeigten ebenfalls von PD Dr. Joachim Granzin durchgeführte Strukturüberlagerungen beider Proteine eine gewisse Übereinstimmung in diesen Strukturbereichen (Circolone *et al.*, *unveröffentlicht*), wodurch die Dimerisierungen beider Proteine in der Gesamtheit betrachtet ähnlich sind. Dies könnte evtl. auf ähnliche Signalweiterleitungsmechanismen, z. B. über eine lichtinduzierte Änderung der Quartärstruktur, hinweisen.

#### 4.1.2 DsLOV - Photozyklus

Wie bereits erwähnt wurde, ist neben der Aufklärung struktureller Eigenschaften die Beschreibung des LOV-Photozyklus als primäres sensorisches Ereignis von besonderer Bedeutung. Dabei ist die Art

und Weise wie dieser Zyklus durchlaufen wird, bei allen LOV-Rezeptoren gleich. Allerdings kommt es in Abhängigkeit zum jeweiligen LOV-Protein zu großen Unterschieden der Photoadduktlebenszeiten, die die zeitbestimmenden Schritte der Photozyklen sind. Die Photoadduktlebensdauer des DsLOV wurde in dieser Arbeit mit 9,6 Sekunden bestimmt. Im Vergleich zu diesem extrem schnellen Photozyklus liegen die Addukt-Lebenszeiten anderer experimentell charakterisierter Vertreter der LOV-Proteinfamilie zum Teil deutlich höher und betragen z. B. bei YtvA aus *B. subtilis* 45 Minuten (Losi *et al.*, 2003), bei VVD aus *N. crassa* 5 Stunden und bei PpSB2-LOV 137 Sekunden (Jentsch *et al.*, 2009). In der Gruppe der pflanzlichen LOV-Rezeptoren schwanken die Werte je nach betrachteter Domäne zwischen 10 Sekunden, die für das Phot2 LOV2 aus *A. thaliana* bestimmt wurde, 86 Sekunden beim Pho1 LOV2 aus *Oryza sativa* (Kasahara *et al.*, 2002) und 204 Sekunden bei der LOV1-Domäne aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Losi *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte mit PpSB1-LOV ein bakterieller LOV-Photorezeptor mit einer extrem langen Adduktlebensdauer von ungefähr 41,2 Stunden beschrieben werden (Jentsch *et al.*, 2009). Daher zeigt DsLOV mit einer Lebensdauer des Photoadduktzustands von 9,6 eine extrem schnelle Dunkelrückkehr.

In der Vergangenheit haben sich bereits verschiedene Arbeiten mit der Veränderung der Photoadduktlebenszeiten durch Mutationsstudien beschäftigt (Circolone *et al.*, 2012; Conrad *et al.*, 2013; Jentsch *et al.*, 2009; Raffelberg *et al.*, 2011, 2013; Zoltowski & Crane, 2008). Dabei wurde in mehreren Studien der Einfluss eines konservierten Isoleucins des  $\beta$ B-Faltblattes auf die Adduktlebenszeit beschrieben (Christie *et al.*, 2007; Zoltowski *et al.*, 2009). Bei AsLOV2 steht dieses Isoleucin (I427) in van-der-Waals Kontakt mit dem photaktiven Cystein und trägt dadurch zur sterischen Stabilität des Photoadduktzustands bei. Durch die Mutation dieser Aminosäure wird dieser stabilisierende Effekt entfernt, wodurch auch der Adduktzustand instabiler wird und folglich schneller in den Grundzustand zurückkehrt (Christie *et al.*, 2007). Auf Grundlage dieser Erkenntnis wurde in DsLOV, bei dem die entsprechende Aminosäureposition mit einem Methionin besetzt ist, eine Substitution durch Isoleucin eingefügt. Dadurch sollte überprüft werden, ob u. a. dieses Methionin für den schnellen Photozyklus des DsLOV verantwortlich ist. Durch die vergleichenden Analysen der Photozyklen der Mutante und des Wildtyps konnte eine 15-fache Verlangsamung des Photozyklus der Isoleucin-Variante beobachtet werden. Dies könnte durch verstärkende sterische Stabilisierungseffekte des Isoleucins hervorgerufen werden, wodurch dessen Einfluss an dem besonders kurzen Photozyklus des DsLOV bewiesen werden konnte. Ein gegensätzlicher Effekt konnte durch die Einführung eines Serins an diese Aminosäureposition erreicht werden, wobei sich der Photozyklus dieser Variante im Vergleich zum Wildtyp um das nahezu 5-fache beschleunigte. Ein möglicher Grund dafür könnte die kleinere Seitenkette des Serins im Vergleich zum Methionin sein, wodurch die sterische Stabilität im aktiven Zentrum der LOV-Domäne weiter reduziert werden könnte. Neben diesen sterischen Einflüssen scheint ebenfalls die Zugänglichkeit der jeweiligen

Chromophore durch diese Substitutionen beeinflusst zu werden. Bei strukturellen Analysen des VVD-Photozyklus wurde die Deprotonierung des FMN-N5 als zeitbestimmender Schritt für den Zerfall des Photoaddukts angenommen (Zoltowski *et al.*, 2009). Da diese Reaktionen in schwerem Wasser ( $D_2O$ ) deutlich langsamer ablaufen als in wässriger Umgebung, ist der vergleichende Faktor (SIE) der unter diesen Bedingungen bestimmten Lebenszeiten ein Maß für die Deprotonierungsraten bzw. -Geschwindigkeiten des FMN-N5 in den verschiedenen Proteinen. Die Bestimmung der SIEs des DsLOV und der beiden Varianten ergab für die M49S-Variante den kleinsten, für die M49I-Variante den größten Wert. Die unterschiedlichen SIEs der verschiedenen Varianten sind ein Indiz für variable Zugänglichkeiten der jeweiligen Chromophore für das umgebende Medium. Aufgrund des hohen SIE-Wertes scheint das Chromophor in der Isoleucin Variante am besten geschützt zu sein, weshalb die Deprotonierung am lichtangeregten Chromophor langsam ablaufen. Im Gegensatz dazu wird das Chromophor durch die Proteinumgebung der M49S-Variante nicht so effektiv abgeschirmt, weshalb die Reaktionen zwischen Medium und Chromophor schneller ablaufen können. Zusammenfassend betrachtet besitzt die Aminosäure an Position 49 des DsLOV eine Rolle für die Stabilität des Photoadduktzustands. Dabei sind sowohl sterische Effekte als auch die Zugänglichkeit des Chromophors für das umgebende Medium und die dadurch beschleunigte Deprotonierung des FMN-N5 im lichtangeregten Zustand Gründe für diesen Effekt.

#### 4.1.3 DsLOV - Regulatorische Funktion

*D. shibae* gehört zur Gruppe der aeroben anoxygenen phototrophen Bakterien (*aapB*) (Biebl *et al.*, 2005) und kann daher Lichtenergie mittels Photosynthese in einen Protonengradienten umwandeln, der anschließend zur Gewinnung von biochemisch nutzbarer Energie in Form von ATP dient (Yurkov & Beatty, 1998). Neben Bakteriochlorophyll *a* besitzt dieses Bakterium das Carotinoid Spheroidenon als weiteres Photopigment. Im Gegensatz zu den anaeroben anoxygenen Purpurbakterien, wie z. B. *R. sphaeroides*, produzieren *aapB* Photopigmente nur in Gegenwart von Sauerstoff (Koblížek *et al.*, 2003; Yurkov & Beatty, 1998). Dadurch ergibt sich allerdings für diese Organismen eine Problemstellung, da Licht-angeregtes Bakteriochlorophyll *a* Energie auf molekularen Sauerstoff übertragen kann, woraus Singulett-Sauerstoffradikale entstehen (Borland *et al.*, 1989). Dieses Radikal ist sehr reaktiv und zerstört Zellkompartimente wie DNA, Lipide und Proteine, weshalb der Schutz vor diesen Radikalen eine besondere Herausforderung für diese Bakterien darstellt (Berghoff *et al.*, 2011; Dufour *et al.*, 2008; Halliwell, 2006). Um diese negativen Einflüsse zu vermeiden, wird in *aapB* die Synthese der Photopigmente als Reaktion auf den Lichtreiz eingestellt (Wagner-Döbler & Biebl, 2006; Yurkov & van Gemerden, 1993). Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob dieser regulatorische Prozess von einem generellen Lichtstimulus ausgelöst wird oder ob unterschiedliche Wellenlängen einen Einfluss auf diesen Effekt ausüben. Dazu wurde der *D. shibae* Wildtypstamm unter

verschiedenen Lichteinflüssen kultiviert, wonach sich zeigte, dass Blaulicht den auslösenden Reiz darstellt (vgl. Abbildung 16). In Dunkelheit und Infrarotlicht waren die Zellen stark pigmentiert und enthielten große Mengen Bakteriochlorophyll *a* und Spheroidenon, während unter Blau- bzw. Weißlichteinfluss (im Weißlicht ist ein hoher Blaulichtanteil enthalten) keine Photopigmente in den Zellen akkumulierten. Folglich ist die Synthese der Photopigmente durch Blaulicht reguliert.

Eine Lichtwellenlängen-abhängige Adaption der Photopigmentsynthese konnte auch bei dem Cyanobakterium *Fremyella diplosiphon* beobachtet werden (Stowe-Evans & Kehoe, 2004). Dieser Organismus besitzt mit RcaE einen Phytochrom-Lichtsensoren, der in Abhängigkeit der Lichtwellenlänge entweder selbst von seinem Interaktionspartner RcaF phosphoryliert wird (unter Grünlicht) oder diesen phosphoryliert (unter Rotlicht) (Terauchi *et al.*, 2004). Ausgelöst durch diesen sensorischen Unterschied werden die Gene verschiedener Phycobiliproteine exprimiert, die die Einzelbestandteile der Lichtsammelkomplexe, der Phycobilisomen von *F. diplosiphon* darstellen. Folglich variiert die Zusammensetzung dieser Komplexe in Abhängigkeit der Belichtungswellenlänge, wodurch die Zellen entweder grün- oder rot pigmentiert erscheinen.

In Microarray-basierten Transkriptomstudien mit *D. shibae* wurde gezeigt, dass die Expression von Genen, die an der Synthese des Photosynthese-Apparats bzw. der Photopigmente beteiligt sind, nach einem Licht-induzierten Wechsel von einem heterotrophen zu einem photoheterotrophen Wachstum stark herunter reguliert wurden. Gleichzeitig wurden Gene, die an der oxidativen Stressantwort involviert sind, verstärkt exprimiert (Tomasch *et al.*, 2011). Danach stellte sich die Frage, ob die verminderte Expression der Photosynthesegene als Reaktion auf den Radikalstress ausgelöst wird. Die Beobachtungen anhand der verschiedenen lichtabhängigen Pigmentierungsstärken der Zellen zeigt allerdings (Abbildung 16), dass dieser Effekt nicht durch Radikalstress ausgelöst werden kann, sondern auf den Lichtreiz zurückgehen muss. Wäre die Regulation durch Radikalstress ausgelöst, dürften die Zellen, die unter Infrarotlichteinfluss kultiviert wurden, keine Photopigmente synthetisieren, da das Bakteriochlorophyll *a* in diesem Spektralbereich sehr effektiv angeregt wird und daher auch viele Sauerstoffradikale generiert werden müssten. Da diese Zellen allerdings eine deutlich rote Pigmentierung besaßen ist dieser Effekt, trotz Radikalproduktion nicht induziert worden. Folglich ist die Regulation der Photopigmente in *D. shibae* Blaulicht-abhängig. Ob der LOV-Blaulichtrezeptor DsLOV bei dieser Regulation involviert ist, wurde anhand einer entsprechenden *dslov*<sup>-</sup>-Mutante untersucht. Im Zuge dieser Studien zeigte sich, dass in diesem Mutationsstamm unabhängig von der gewählten Lichtquelle, sogar bei Dunkel- und Infrarotlichtanzucht, keine Photopigmente akkumulierten, womit sich ein eindeutiger *dslov*<sup>-</sup>-Phänotyp ergab. Daher konnte erstmals gezeigt werden, dass DsLOV eine regulatorische Funktion bei der Photopigmentsynthese in *D. shibae* besitzt.

Der Einfluss eines LOV-Lichtrezeptors auf die Pigmentsynthese ist bisher nur am Beispiel des fakultativ anaeroben, phototrophen nicht Schwefel-Purpurbakteriums *R. sphaeroides* bekannt. Bei Bakterien der Gattung *Rhodobacter*, die zur anaeroben anoxygenen Photosynthese fähig sind, ist die Photopigmentsynthese hauptsächlich durch die Sauerstoffkonzentration reguliert. Die Aktivierung der Photopigmentsynthese erfolgt unter anaeroben Bedingungen durch ein klassisches Zwei-Komponenten-System RegB/RegA (Elsen *et al.*, 2004; Gregor & Klug, 1999, 2002; Wu & Bauer, 2008). RegB stellt dabei eine Membran-gebundene Sensor kinase dar, die in Abwesenheit von Sauerstoff autophosphoryliert wird und anschließend RegA phosphoryliert. RegA ist ein *response-regulator* der als Reaktion auf seine Phosphorylierung die Expression der an der Photosynthese beteiligten Gene induziert. Bei einer hohen Sauerstoffkonzentration hingegen reprimiert der Repressor PpsR die Transkription dieser Gene (Gomelsky & Kaplan, 1997; Gomelsky *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2007). Unter mikroaeroben Bedingungen ist die Photopigmentsynthese in *Rhodobacter* allerdings auch durch Blaulicht reguliert. Dabei spielt der Blaulichtrezeptoren AppA, der eine *blue light using FAD* (BLUF) Domäne besitzt, eine Rolle. In Dunkelheit kann AppA an den Repressor PpsR binden, wodurch dieser inaktiviert wird, woraufhin die Photosynthese-Gene exprimiert werden. Unter Blaulichteinfluss hingegen wird die Bindung zwischen AppA PpsR gelöst, woraufhin der Repressor aktiviert wird und die Expression der Photosynthese-Gene somit inhibiert (Braatsch & Klug, 2004; Braatsch *et al.*, 2002; Masuda & Bauer, 2002). Neben AppA ist das Cryptochrom CryA an der Blaulicht-gesteuerten Regulation des Photopigmentsynthese beteiligt, indem es lichtgesteuert mit der C-terminalen Domäne des AppA interagiert und dadurch dessen Bindung an den Transkriptionsrepressor PpsR moduliert (Frühwirth *et al.*, 2012; Geisselbrecht *et al.*, 2012; Hendrischk *et al.*, 2009b; Metz *et al.*, 2012b). Überdies besitzt der LOV-Blaulichtrezeptor RsLOV einen Einfluss auf die Photopigmentsynthese in *R. sphaeroides*, was anhand einer  $\Delta rslov$ -Mutante demonstriert werden konnte (Metz *et al.*, 2012a). Verglichen zum Wildtyp, besaß diese Mutante nach einer mikroaeroben Dunkelanzucht eine stärkere Pigmentierung. Jedoch ist der genaue Mechanismus der RsLOV-vermittelten Signaltransduktion nicht bekannt. Allerdings zeigt RsLOV in Lösung unterschiedliche Oligomerisierungszustände, wobei es in Dunkelheit als Dimer und bei Belichtung als Monomer vorliegt (Conrad *et al.*, 2013), wodurch sich ein erstes Indiz für die initiale Signaltransduktion ergibt.

Wie bereits erwähnt wurde, sind die bisher bekannten regulatorischen Funktionen der bakteriellen LOV-Photorezeptoren nachgewiesen wurden, sehr vielseitig. Die wohl am besten charakterisierte Funktion besitzt das YtvA an der generellen Stressantwort in *B. subtilis*. Diese wird in *B. subtilis* über den alternativen Sigmafaktor  $\sigma^B$  vermittelt und wird durch energetischen Stress oder Umweltfaktoren wie z. B. Salz, Ethanol, Hitze und Blaulicht ausgelöst (Hecker *et al.*, 2007). Die Signalwahrnehmung des Blaulichtreizes erfolgt dabei durch YtvA, welches im Gegensatz zum *short-LOV* DsLOV, über eine C-terminale STAS (Sulfat Transporter und anti-Sigmafaktor Antagonist) -

Effektordomäne verfügt. Über diese Domäne ist YtvA an der Bildung eines Multi-Proteinkomplexes, dem Stressosom, beteiligt. Dieser Komplex reguliert die Expression des Stress-Sigmafaktors  $\sigma^B$ , der wiederum die Expression von Genen zur generellen Stressantwort in *B. subtilis* reguliert (Avila-Pérez *et al.*, 2006, 2009; Jurk *et al.*, 2013; van der Steen *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2007). Ein weiteres Beispiel für ein bakterielles LOV-Protein dessen regulatorische Funktion beschrieben ist, ist die LOV-Histidinkinase (LOV HK) aus *B. abortus*. Diese reguliert über eine lichtinduzierte Autophosphorylierung die Virulenz dieses intrazellulären Pathogens (Swartz *et al.*, 2007). Eine weitere LOV-Histidinkinase, LovK, reguliert gemeinsam mit dem Regulator LovR die blaulichtgesteuerte Zelladhäsion in *C. crescentus*, einem oligothrophen Bakterium, das in Frischwasserhabitaten vorkommt (Foreman *et al.*, 2012; Purcell *et al.*, 2007). Ebenfalls bekannt ist die regulatorische Funktion des SL2 aus *S. elongatus*, welches über eine Phosphodiesterase-Aktivität den intrazellulären Level des sekundären Botenstoffs c-di-GMP (zyklisches di-Guanosinmonophosphat) reguliert. C-di-GMP ist in die Regulation der Biofilmbildung, Virulenz und Motilität involviert (Cao *et al.*, 2010; Herrou & Crosson, 2011). Vor kurzem konnte mit Pst-LOV ein LOV-basiertes Zwei-Komponentensystem in *P. syringae* identifiziert werden, welches an der Virulenz dieses Bakteriums gegen *A. thaliana* beteiligt ist (Moriconi *et al.*, 2013).

## 4.2 LOV-Rezeptoren in der Biotechnologie

Neben den interessanten nativen Eigenschaften der LOV-Photorezeptoren wie deren Reizaufnahme, -verarbeitung und regulatorische Funktion sind, diese Proteine auch für biotechnologische Fragestellungen relevant (Christie *et al.*, 2012b; Losi & Gärtner, 2011). Besonders im stetig wachsenden Feld der Optogenetik werden Proteine dieser Rezeptorfamilie zur lichtabhängigen nicht-invasiven Steuerung von biologischen Prozessen eingesetzt. Des Weiteren ist es möglich, durch eine Mutagenese am photoaktiven Cystein der LOV-Kerndomäne, den Photozyklus zu unterbinden und dadurch Varianten zu erzeugen, die als *in vivo* Fluoreszenzreporter einsetzbar sind (Chapman *et al.*, 2008; Drepper *et al.*, 2007; Salomon *et al.*, 2000; Swartz *et al.*, 2001). In früheren Studien konnten erste Indizien auf einen phototoxischen Effekt der LOV-FPs beobachtet werden (Drepper *et al.*, 2010b; Endres, 2010). Diese wurden durch die Beschreibung einer  $^1\text{O}_2$ -Produktion des miniSOG, einer photochemisch inaktivierten Variante der LOV2-Domäne des Photoropsins2 aus *A. thaliana* bestätigt (Pimenta *et al.*, 2013; Ruiz-González *et al.*, 2013; Shu *et al.*, 2011). Daher können LOV-FPs als Photosensibilisatoren in der Biotechnologie eingesetzt werden (Lin *et al.*, 2013; Ryumina *et al.*, 2013), wodurch sich vielseitige Anwendungsmöglichkeiten der LOV-FPs in den Bereichen der Optogenetik, Biomedizin sowie der biotechnologischen Grundlagenforschung ergeben. Einige dieser Möglichkeiten werden im Folgenden diskutiert.

#### 4.2.1 LOV-Domänen in *Photoswitch*-Fusionsproteinen

Im Bereich der Optogenetik ist es von Interesse, biologische Prozesse lichtgesteuert zu kontrollieren. Dazu werden häufig synthetische Fusionsproteine aus den LOV-Sensordomänen mit bestimmten Effektor-domänen konstruiert. Deren Funktion, wie z. B. enzymatische Aktivität oder DNA-Bindung, wird dabei durch die Reiz-abhängige Signaltransduktion der Signaldomäne kontrolliert (Möglich & Moffat, 2010; Möglich *et al.*, 2010). Die Signalweitergabe von der Sensor- auf die Effektor-domäne geschieht durch lichtinduzierte, strukturelle Modifikationen der LOV-Domäne, die zu einer konformellen Modifikation des Proteins führt, die wiederum die Aktivität der Effektor-domäne beeinflusst. Zum besseren Verständnis dieser intramolekularen Signaltransduktion, werden diese Mechanismen anhand von ausgewählten Beispielen bekannter LOV-Proteinen, im Zusammenhang zu ihrem nativen Effektor, an dieser Stelle beschrieben.

Die initiale Signalaufnahme der LOV-Rezeptoren erfolgt durch die Absorption eines Lichtimpulses durch die LOV-Domäne, die daraufhin einen Photozyklus durchläuft (vgl. 1.2). In Folge dessen wird ein lichtangeregter Adduktzustand erzeugt, der den aktiven Signalzustand des Rezeptorproteins repräsentiert (Christie, 2007). Die anschließende Signalweiterleitung erfolgt daraufhin durch strukturelle Modifikationen des Proteinrückgrats (Christie, 2007; Christie *et al.*, 2012b; Losi & Gärtner, 2011, 2012). Pflanzliche Photropine bestehen aus zwei LOV-Sensordomänen, die in der N-terminalen Region des Proteins liegen und einer Serin/Threonin Kinasedomäne, die sich am C-Terminus befindet (Christie *et al.*, 1999). Dabei ist der sensorische Bereich des Phototropins über ein helikales Element, das als  $\text{J}\alpha$ -Helix bezeichnet wird, mit der Effektor-domäne verbunden (Harper *et al.*, 2003). Die Effekte, die durch die Signalaufnahmen der beiden LOV-Domänen verursacht werden, unterscheiden sich dabei grundlegend. Während die Anregung der LOV1-Domäne zu einer Dimerisierung des Photorezeptors führt (Liscum & Stowe-Evans, 2000; Salomon *et al.*, 2004), aktiviert die LOV2-Domäne die Kinase-Funktionalität der Effektor-domäne (Cho *et al.*, 2007; Christie *et al.*, 2002; Sullivan *et al.*, 2008). Im Dunkelzustand bindet das LOV2 die C-terminale Kinasedomäne, wodurch diese inhibiert wird (Tokutomi *et al.*, 2008). Durch den Lichtstimulus kommt es zu einer strukturellen Modifikation der LOV-Kernregion, die ein Wegklappen der  $\text{J}\alpha$ -Helix bewirkt (Harper *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2007; Nash *et al.*, 2008). Als Konsequenz dieser Modifikation löst sich die Bindung des LOV2 von der Kinasedomäne, woraufhin diese aktiviert wird (Harper *et al.*, 2004). Wie bei den Phototropinen ist in YtvA aus *B. subtilis* die LOV-Sensor- mit der Effektor-domäne (STAS) über eine  $\text{J}\alpha$ -Helix verbunden. Allerdings bildet YtvA ein Dimer, bei dem die beiden  $\text{J}\alpha$ -Helices, entsprechend einer *coiled-coil*-Struktur umeinander verwunden, von den LOV-Domänen ausgestreckt vorliegen. Der Lichtstimulus führt zu einer Verminderung der Rotation beider Helices zueinander, wodurch die Aktivität des Effektors induziert wird (Herrou & Crosson, 2011; Losi *et al.*, 2005; Möglich & Moffat, 2007). Eine weitere Methode der intramolekularen Signaltransduktion wurde für den LOV-

Rezeptor VVD aus dem roten Schimmelpilz *N. crassa* beschrieben, der an der Regulation der circadianen Rhythmik beteiligt ist (Heintzen & Liu, 2007; Schafmeier & Diernfellner, 2011). Im Gegensatz zu dem bisher beschriebenen Phototropin und YtvA besitzt VVD als *short*-LOV Protein keine C-terminale Effektor-domäne, allerdings eine N-terminale Erweiterung, die als Ncap bezeichnet wird und aus einer  $\alpha$ -Helix und einem  $\beta$ -Faltblatt besteht. Im Dunkelzustand bindet das Ncap an hydrophobe Bereiche des  $\beta$ -Faltblattgerüsts der LOV-Domäne (Zoltowski *et al.*, 2007). Durch Belichtung wird diese Bindung gelöst, wodurch das Ncap zur Ausbildung von Dimeren oder zur Interaktion mit anderen LOV-Rezeptoren, wie dem WCC (*White Collar Complex*) dient (Chen *et al.*, 2010; Hunt *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2003; Vaidya *et al.*, 2011).

Durch die beschriebenen intramolekularen Signaltransduktionsprozesse und die damit verbundenen strukturellen Modifikationen ist es möglich, synthetische Fusionsproteine zu konstruieren, mit denen sich biologische Prozesse steuern lassen (*Photoswitch*). Ein Beispiel dafür ist das Fusionsprotein LovTAP, das aus einer N-terminalen LOV-Domäne (AsLOV2 aus *A. sativa*) besteht, die über eine  $\alpha$ -Helix mit dem C-terminal gelegenen *E. coli* Tryptophan-Repressor TrpR verbunden ist. In Gegenwart von freiem L-Tryptophan bindet LovTAP nur sehr schwach an den DNA-Operator, doch wird dessen Bindungsaffinität bei Belichtung um das nahezu 65-fache gesteigert (Christie *et al.*, 2012b; Drepper *et al.*, 2011; Peter *et al.*, 2013; Strickland *et al.*, 2008, 2010). Ein weiteres Beispiel für einen solchen LOV-basierten *Photoswitch* ist das YF1, mit dessen Hilfe die Expression von Genen lichtgesteuert reguliert werden kann (Christie *et al.*, 2012b; Diensthuber *et al.*, 2013; Drepper *et al.*, 2011; Möglich *et al.*, 2009). Dieser chimäre Lichtsensor besteht aus der YtvA-LOV-Domäne aus *B. subtilis*, die, wie bei LovTAP, über eine  $\alpha$ -Helix mit der Sensor-Histidinkinase FixL aus *Bradyrhizobium japonicum* verbunden ist. FixL induziert gemeinsam mit dem *response-regulator* FixJ in einem Zwei-Komponentensystem die Expression von Genen, die unter der Kontrolle des Promotors P<sub>fixK2</sub> stehen (Fischer, 1994). Durch die Koexpression des YF1 und dem *response-regulator* FixJ in *E. coli* konnte die Expression von Genen, die unter die Kontrolle des P<sub>fixK2</sub> gestellt wurden, um das ungefähr 70-fache in Abhängigkeit der Belichtung gesteigert werden (Möglich *et al.*, 2009).

Es wurde bereits erwähnt, dass der lichtangeregte Zustand der LOV-Domäne für die Signalweitergabe bzw. Effekt-Auslösung verantwortlich ist und dass die Stabilität dieser Zustände von dem jeweiligen Protein abhängt. Daher kann es von Bedeutung sein, dieses Charakteristikum bei der Auswahl der LOV-Domäne für die Konstruktion solcher *photoswitch*-Fusionsproteinen zu beachten. Soll der kontrollierte Effekt, wie z. B. die Regulation der Genexpression mittels YF1, in einer hohen zeitlichen Auflösung durch wechselnde Lichtbedingungen (Licht - Dunkel) aktivier- oder inaktivierbar sein, ist es von Vorteil LOV-Domänen mit kurzen Addukt-lebenszeiten auszuwählen. Am Beispiel von YF1 wurde die YtvA-LOV-Domäne verwendet, die in ihrem Voll-längenprotein YtvA 45 Minuten für die Dunkelrückkehr benötigt. Angenommen, diese Zeit bleibt bei YF1 erhalten, dauert es nach

Ausschalten der Belichtung folglich 45 Minuten bis die verstärkte Expression der Zielgene eingestellt wird. Diese Zeitspanne könnte durch Einsatz von „schnelleren“ LOV-Domänen wie dem DsLOV ( $\tau_{\text{REC}} = 9,6$  Sekunden) deutlich verkürzt werden, wodurch eine höhere temporale Auflösung ermöglicht würde.

Neben den hier diskutierten Möglichkeiten zur lichtbasierten Kontrolle von biologischen Prozessen sind LOV-Proteine ebenfalls als Fluoreszenzreporter für biotechnologische Anwendungen interessant.

#### 4.2.2 LOV-basierte Fluoreszenzproteine

In der modernen Biotechnologie und Grundlagenforschung sind Fluoreszenzreporterproteine als Werkzeuge zur Analyse von Genexpressionsmustern und Lokalisationsstudien unverzichtbar geworden. Den größten Einfluss besitzt dabei das GFP sowie Proteine der GFP-Familie, weshalb die Entdecker dieser Proteine im Jahr 2008 mit dem Nobelpreis für Chemie gewürdigt wurden (Chalfie, 2009; Shimomura, 2009; Tsien, 2009). Seit der Entdeckung des GFP vor mehr als 40 Jahren (Shimomura *et al.*, 1962) wurden vielzählige GFP-Varianten und GFP-artige Proteine beschrieben, die in Hinblick auf ihre Fluoreszenzeigenschaften, wie z. B. der Quantenausbeute, des molaren Extinktionskoeffizienten, der Chromophorreifung, Löslichkeit oder spektralen Eigenschaften verändert sind (Chudakov *et al.*, 2005; Day & Davidson, 2009; Shaner *et al.*, 2005, 2007). Trotz der großen biotechnologischen Anwendungspalette besitzt GFP und seine Derivate drei grundlegende Limitierungen. Erstens ist für die Reifung des Chromophors ein Oxidationsschritt zwingend erforderlich (Craggs, 2009; Tsien, 1998), weshalb dessen Anwendung in strikt anaeroben System nicht möglich ist (Drepper *et al.*, 2007; Walter *et al.*, 2012). Zweitens ist die emittierte Fluoreszenz der GFP-artigen Proteine stark sensitiv gegenüber Halidionen und einer sauren Umgebung ( $\text{pH} < 5$ ) (Bizzarri *et al.*, 2009; Jayaraman, 2000; Shaner *et al.*, 2007). Drittens ist die relativ große Proteingröße (ca 25 kDa) des GFP für bestimmte Anwendungen limitierend (Chapman *et al.*, 2008). Alle diese Hindernisse konnten durch die Entwicklung von FMN-abhängigen Fluoreszenzreportern überwunden werden (Chapman *et al.*, 2008; Drepper *et al.*, 2007, 2013). Da die Fluoreszenz dieser Proteine von der nicht-kovalenten Bindung des Kofaktors FMN vermittelt wird, ist deren Emission von Sauerstoff unabhängig, weshalb diese auch unter anaeroben Bedingungen funktionell sind (Drepper *et al.*, 2007; Walter *et al.*, 2012). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzemission dieser Proteine über einen großen pH-Bereich von (pH 4 bis 10) konstant ist (Mukherjee *et al.*, 2013; Swartz *et al.*, 2001). Auch durch die geringere Größe der LOV-FPs (11 - 16 kDa) ergaben sich neue Möglichkeiten biologische Prozesse optisch nachvollziehbar zu gestalten. So konnte z. B. durch das LOV-FP iLOV die Infektion eines Blattes der Tabakpflanze *N. tabacum* mit dem Tabakmosaikvirus lokal nachverfolgt werden, was in der erreichten Auflösung mit GFP nicht möglich war (Chapman *et al.*, 2008). Dies war u. a. dadurch möglich, dass iLOV in Lösung als Monomer vorkommt. Im Gegensatz

dazu organisieren sich alle LOV-FPs, bis auf BsFbFP, die auf Grundlage von bakteriellen LOV-Photorezeptoren konstruiert wurden, zu Dimeren (vgl. Tabelle 1). Dies stellt eine gewisse Limitierung in der Anwendbarkeit dieser Proteine dar. Besonders bei der Bildung von Fusionsproteinen zur Analyse von Protein-Protein Interaktionen oder Lokalisierungen kann es durch die Oligomerisierung des LOV-FPs zur Fehlfaltung, Aggregation und Funktionsverlust des Zielproteins kommen. Daher ist die Konstruktion von monomeren LOV-FPs für deren Anwendbarkeit von großem Vorteil.

Die DsLOV-Proteinstruktur wies eine N-terminale Verlängerung auf, die die hauptsächliche Interaktions-Schnittstelle der DsLOV-Dimere darstellt (3.1.1 und 4.1.1). Weitere Strukturanalysen, die von PD Dr. Joachim Granzin durchgeführt wurden, prognostizierten eine monomere Struktur des DsLOV durch Entfernen dieser Erweiterung. Auf Grundlage dieser Vorhersage wurden zwei verkürzte DsFbFP Varianten (Ncap28 und Ncap35) erzeugt und analysiert. Zwar war die heterologe Expression dieser Proteine in *E. coli* grundsätzlich erfolgreich, doch besaß das DsFbFP Ncap35 keine Fluoreszenzaktivität. Das DsFbFP Ncap28 war hingegen in Lösung instabil und aggregierte. Daher war es nicht möglich, auf Grundlage des LOV-Fluoreszenzreporters DsFbFP ein monomeres Fluoreszenzprotein zu erzeugen.

Eine charakterisierende Grundeigenschaft von Fluoreszenzproteinen ist deren Helligkeit, die hauptsächlich durch die Parameter des molaren Extinktionskoeffizienten und der Fluoreszenzquantenausbeute beschrieben wird. Dabei beziffert der molare Extinktionskoeffizient die Fähigkeit einer Substanz, elektromagnetische Strahlung (Licht) einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren. Die Fluoreszenzquantenausbeute gibt hingegen an, wie viele absorbierte Photonen wieder in Form der Fluoreszenz emittiert werden. Die in dieser Arbeit experimentell bestimmten Werte des neu erzeugten DsFbFP ergaben eine Quantenausbeute von 0,31 und einen molaren Extinktionskoeffizienten bei 450 nm von  $14633 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Die in der Literatur angegebenen Werte für die molaren Extinktionskoeffizienten anderer LOV-FPs schwanken zwischen  $12.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und  $16.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (siehe Tabelle 1). Dabei entspricht der Wert von  $12.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  dem des freien Kofaktors FMN (van den Berg *et al.*, 2001). Die Annahme, dass sich dessen Fähigkeit der Lichtabsorption durch die Assoziation an das LOV-Protein nicht ändert, darf bezweifelt werden, ist allerdings nicht Gegenstand dieser Diskussion. Allerdings liegt der für das DsFbFP gemessene Wert durchaus auf dem Niveau aktueller Messdaten der LOV-FPs (M. Wingen, *unveröffentlicht*). Mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von 0,31 erreicht es, verglichen zu den anderen LOV-FPs, einen durchschnittlichen Wert. Bezogen auf die Fluoreszenzquantenausbeute ist das bisher schwächste beschriebene LOV-FP Pp2FbFP mit 0,18 (Drepper *et al.*, 2007). Hellere Proteine sind miniSOG (0,37), EcFbFP (0,39) und iLOV (0,44) (Chapman *et al.*, 2008; Drepper *et al.*, 2007; Shu *et al.*, 2011). Durch die Mutation einer Aminosäure des DsFbFP konnte dessen Photostabilität bedeutend gesteigert werden. Während das DsFbFP eine *Bleaching*-Halbwertszeit von 0,3 Minuten besaß, lag die von DsFbFP M49I

um das fast 16-fache höher und betrug 4,7 Minuten. Besonders bemerkenswert ist dabei der Umstand, dass die Fluoreszenzintensität bei andauernder Belichtung nicht signifikant unter einen Wert von 48 % fiel. Der dem *Photobleaching* zugrundeliegende Mechanismus ist allerdings noch nicht vollständig verstanden. Durch ungerichtete Mutagenesen an iLOV aus *A. thaliana* wurden einige Varianten (phiLOV) erzeugt und beschrieben, die *in vivo* eine optimierte Photostabilität zeigten (Christie *et al.*, 2012a). Dabei begründen die Autoren die verbesserten Eigenschaften auf Grundlage von Struktur- sowie Strukturmodell-Daten mit einer engeren „Verpackung“ des nichtkovalent gebundenen Kofaktors durch das Protein, wodurch es zu einer Minimierung des Energieverlustes kommen könnte. Eine ähnliche Begründung könnten die Beobachtungen liefern, die in dieser Arbeit bei der Bestimmung des DsLOV Photozyklus und dessen M49I-Variante getätigt wurden. Durch den Aminosäureaustausch verlängerte sich die Photoadduktlebenszeit der Variante drastisch, was evtl. durch stabilisierende Effekte des Isoleucins im Bereich des Chromophors hervorgerufen wurde oder auf eine bessere Abschirmung des FMN vor dem umgebenden Medium durch das Proteingerüst zurückzuführen sein könnte (vgl. 3.1.2 und 4.1.2.). Eine weitere mögliche Ursache des *Photobleachings* stellt die durch die Anregung ausgelöste Produktion von Sauerstoffradikalen am Chromophor dar. Im Rahmen dieser Arbeit konnte deren Generierung durch die Belichtung der LOV-FPs in unterschiedlichen Experimenten nachgewiesen werden (3.4) und ist später auch Gegenstand dieser Diskussion. Sauerstoffradikale sind sehr reaktiv und führen durch ihre stark oxidativen Eigenschaften zu irreparablen Schäden an DNA, RNA, Lipiden und Proteinen (Dufour *et al.*, 2008; Halliwell, 2006; Imlay, 2003; Storz & Imlay, 1999). Folglich kann es durch die Produktion dieser Radikale am Chromophor zu Schädigungen des Proteins kommen, wodurch wiederum das *Bleaching* ausgelöst würde. Ungeachtet der Ursache der hohen Photostabilität des DsFbFP M49I besitzt es durch diese Eigenschaft ein großes Potential bei der Verwendung als *in vivo* Fluoreszenzreporter, besonders bei Mikroskop-gestützten Analysen.

Zwar sind die alternativen LOV-FPs bezüglich ihrer Fluoreszenzeigenschaften, insbesondere ihrer geringen Helligkeit, den GFP-artigen Fluoreszenzreportern unterlegen - eGFP besitzt einen molaren Extinktionskoeffizienten von ca.  $55.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und eine Quantenausbeute von 0,6 (Patterson *et al.*, 1997) -, doch konnten sie erfolgreich in speziellen Anwendungen als Reporter eingesetzt werden, die mit den „klassischen“ GFP-Proteinen nicht möglich waren (Drepper *et al.*, 2013). So konnten LOV-FPs bereits funktionell unter anaeroben Bedingungen im fakultativ anaeroben phototrophen Bakterium *R. capsulatus* sowie im obligat anaeroben Pathogen *P. gingivalis* exprimiert werden (Choi *et al.*, 2011; Drepper *et al.*, 2007). Ferner war deren funktionelle Expression unter hypoxischen Bedingungen in den Hefen *C. albicans* und *S. cerevisiae* sowie in humanen Tumorzellen möglich (Tielker *et al.*, 2009; Walter *et al.*, 2012). Durch die sauerstoffunabhängige Fluoreszenz der LOV-FPs war es ferner möglich, ein EcFbFP-YFP FRET-Fusionsprotein zu konstruieren, mit dessen Hilfe die intrazelluläre

Sauerstoffkonzentration nichtinvasiv determiniert werden kann (Pötzkei *et al.*, 2012). Darüber hinaus bewiesen diese alternativen Fluoreszenzreporter ihr Potential bei etablierten Anwendungen zur optischen Verfolgung von horizontalem Gentransfer oder zur Überwachung der Genexpression markierter Zielproteine in anaeroben und aeroben Systemen (Drepper *et al.*, 2010a; Gawthorne *et al.*, 2012; Król *et al.*, 2010; Lobo *et al.*, 2011).

#### 4.2.3 LOV-FPs als Photosensibilisatoren

Genetisch kodierte Photosensibilisatoren, wie das GFP-artige KillerRed, sind ein vielversprechendes optogenetisches Werkzeug in der biotechnologischen und medizinischen Grundlagenforschung. Aufgrund der Licht-induzierbaren Produktion von schädlichen Sauerstoffradikalen durch das KillerRed-Chromophor ist es möglich, bestimmte zelluläre Strukturen oder Prozesse mit einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung zu inaktivieren (Bulina *et al.*, 2006a, b; Serebrovskaya *et al.*, 2011; Teh *et al.*, 2010). Des Weiteren war es mit diesem dimeren *photosensitizer* möglich, ganze prokaryotische- (Bulina *et al.*, 2006a; Mueller *et al.*, 2010; Waldeck *et al.*, 2012), eukaryotische- (Waldeck *et al.*, 2009) sowie Krebszellen (Serebrovskaya *et al.*, 2009; Shirmanova *et al.*, 2013) lichtgesteuert abzutöten. Bis vor kurzem war dieses Protein der einzig verfügbare, vollständig genetisch kodierte Photosensibilisator, bis diese Gruppe durch miniSOG ergänzt wurde. miniSOG basiert auf der LOV2-Domäne des Photoropin2 aus *A. thaliana* und bindet daher FMN als Kofaktor (Shu *et al.*, 2011). Flavine sind sehr effiziente Photosensibilisatoren und produzieren als Reaktion auf ihre Anregung mit Licht hohe Mengen Singulett-Sauerstoff, wobei Riboflavin und Flavinmononukleotid Quantenausbeuten von über 0,5 erreichen (Baier *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2013; Pimenta *et al.*, 2013). Daher basiert die phototoxische Eigenschaft des miniSOG grundsätzlich auf der Fähigkeit der Radikalproduktion des Kofaktors, wobei das Protein als „shuttle“ für den Photosensibilisator dient, um diesen an die gewünschten Zielstrukturen zu binden. Dabei wurde zuerst angenommen, dass das Protein keinen negativen Einfluss auf die Effektivität des FMN ausübt, da die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute bei ca. 0,47 liegt (Shu *et al.*, 2011), doch wurde dieser Wert kürzlich in zwei unterschiedlichen Studien auf einem Wert von 0,03 deutlich korrigiert (Pimenta *et al.*, 2013; Ruiz-González *et al.*, 2013).

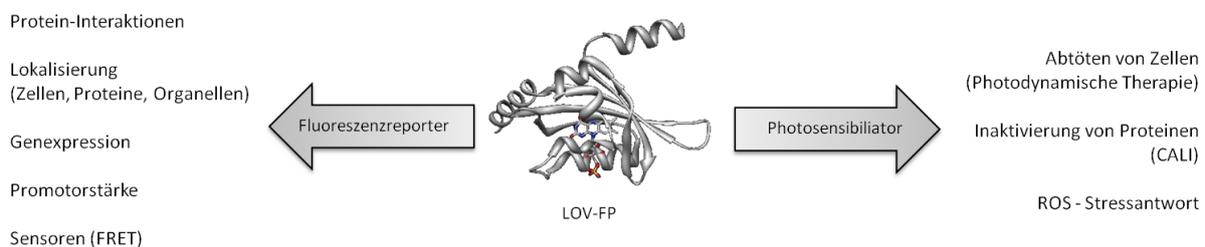
In der vorliegenden Arbeit wurden die Eignungen verschiedener LOV-FPs als Photosensibilisatoren in verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Experimenten untersucht. Mit Hilfe der durchgeführten Analysen konnte demonstriert werden, dass LOV-FPs zur lichtgesteuerten Abtötung von Bakterienzellen binnen Sekunden fähig sind. Dabei wurden allerdings deutliche Unterschiede der Effektstärken zwischen den einzelnen Fluoreszenzproteinen aufgezeigt. Durch eine quantitative Analyse der *in vivo* Phototoxizitäten der LOV-FPs konnten diese in drei Gruppen eingeordnet werden. (i) Die erste Gruppe enthält die Proteine, die keinen signifikanten Effekt auf die Bakterienzellen ausübten und

besteht lediglich aus DsFbFP. (ii) Die zweite Gruppe enthält mit phiLOV2.1, DsFbFP M49I, Pp1FbFP und Pp2FbFP L30M die Proteine, die zwar eine deutlich negative Auswirkung auf die Lebensfähigkeit der Bakterien ausübten, jedoch nicht zur vollständigen Abtötung der Kulturen innerhalb der gewählten Belichtungsdauern genügten. (iii) Die dritte, toxischste Gruppe besteht aus den Photosensibilisatoren miniSOG, Pp2FbFP sowie EcFbFP, mit denen das vollständige Abtöten der Bakterienzellen innerhalb einer Belichtungsdauer von 30 Sekunden möglich war. Besonders bemerkenswert ist dabei die Beobachtung, dass der alleinige Austausch einer Aminosäure des DsFbFP zur Verstärkung dessen lichtinduzierter Toxizität führte. Ebenfalls macht die Tatsache, dass das DsFbFP *in vivo* als einziges LOV-FP keinen toxischen Effekt auf *E. coli* ausübt, dieses Protein zu einem geeigneten Fluoreszenzreporterprotein für z.B. Expressionsanalysen oder Lokalisierungsstudien.

Nachdem die Fähigkeit der LOV-FPs zur Licht-induzierten Abtötung von Bakterienzellen demonstriert werden konnte, wurde dies ebenfalls mit Hilfe der LOV-FPs Pp1-, Pp2-, Ec- und DsFbFP an murinen HT22-Tumorzellen gezeigt. Erste Versuche mit zytosolisch lokalisiertem Pp2FbFP ergaben allerdings, dass dieses keinen toxischen Effekt auf die Tumorzellen bewirkte. Dies wurde in ähnlichen Experimenten mit miniSOG als *photosensitizer* von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Qi *et al.*, 2012; Ryumina *et al.*, 2013). Diese Einschränkung konnte allerdings durch die gezielte adhäsive Bindung der LOV-FPs an die zellulären Membranoberflächen erreicht werden, die durch die Fusionierung der LOV-FPs mit einer entsprechenden Signalsequenz erfolgte (Abbildung 24 und 25). Wahrscheinlich konnten die von den Photosensibilisatoren generierten Radikale mit den lokalen essentiellen Strukturen oder Proteinen gezielter reagieren und sie dadurch inaktivieren. Durch die hier demonstrierte Fähigkeit der LOV-FPs, ganze pro-, eukaryotische und Tumorzellen Belichtungsabhängig abzutöten, ermöglichen diese Proteine weitere Perspektiven in der photodynamischen Krebstherapie, wie es z. B. mit Hilfe von KillerRed-Fusionen an Mitochondrien, Histonen und speziellen Antikörpern gezeigt werden konnte (Serebrovskaya *et al.*, 2009; Shirmanova *et al.*, 2013). Überdies konnte vor Kurzem am Beispiel des miniSOG aufgezeigt werden, dass die LOV-FPs als *photosensitizer* in der CALI (*chromophore assisted light inactivation*) -Technik einsetzbar sind. Durch Fusion des miniSOG an synaptische Proteine konnte die vesikuläre Freisetzung von Neurotransmittern in den präsynaptischen Spalt bei *C. elegans* inhibiert werden (Lin *et al.*, 2013). Bei dieser Technik wird die zu untersuchende Struktur mit dem Photosensibilisator markiert, woraufhin diese anschließend durch die spezifische Anregung des Chromophors und die daraus resultierende Radikalproduktion zerstört wird. Durch die Anregung mittels Laser wird dabei eine sehr hohe spatial-temporale Auflösung erzielt (Jacobson *et al.*, 2008; McLean *et al.*, 2009). Mit GFP und GFP-artigen Proteinen wurden zwar etablierte Fluoreszenzproteine bereits erfolgreich in dieser Technik eingesetzt (Rajfur *et al.*, 2002), doch wurde die Effizienz dieser Technik durch den genetisch

kodierten Photosensibilisator KillerRed deutlich gesteigert, weshalb dieser vermehrt Anwendung in CALI fand (Bulina *et al.*, 2006b; Destaing *et al.*, 2010; Serebrovskaya *et al.*, 2011; Teh *et al.*, 2010). Aktuell wurde mit SuperNova eine monomere KillerRed-Variante beschrieben, die ebenfalls erfolgreich in der CALI-Technik einsetzbar ist und dabei gleichzeitig den Nachteil der homodimerisierung des KillerReds überwindet (Takemoto *et al.*, 2013). Neben den Grünlicht absorbierenden KillerRed und SuperNova ( $\lambda_{\text{Ex Max}} = 585 \text{ nm}$ ) wird die Palette der effektiven CALI-*photosensitizer* durch die Blaulicht absorbierenden LOV-FPs ergänzt ( $\lambda_{\text{Ex Max}} = 450 \text{ nm}$ ).

Ferner demonstrieren die in dieser Arbeit durchgeführten DNA-Microarray-gestützten Stressantwortanalysen in *E. coli*, dass das LOV-FP DsFbFP M49I zur gezielten Induktion der OxyR-vermittelten Stressantwort geeignet ist. Dadurch ergeben sich neue Mittel zur Analyse der ROS-abhängigen Signaltransduktion durch die Möglichkeit, denselben *photosensitizer* in verschiedene zelluläre Komponenten gezielt einzubringen und dort lokalen ROS-Stress auszulösen. Bisher war eine solche Analyse nur durch die Zugabe von Radikalstress-auslösenden Substanzen, wie Wasserstoffperoxid oder chemische Farbstoffe wie Rose-Bengal oder Methylen-Blau, möglich, die ebenfalls photosensibilisierende Eigenschaften besitzen (Glaeser & Klug, 2005; Ledford *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012; Metz *et al.*, 2012a). Bei *in vivo* Studien besitzen solche Substanzen allerdings zwei Nachteile. Erstens müssen diese Substanzen nach der exogenen Zugabe über die zellbegrenzenden Strukturen in die zu untersuchenden Organismen aufgenommen werden und zweitens können diese Substanzen nicht gezielt an bestimmten Zellkompartimente oder Strukturen fusioniert werden. Zusammenfassend ergeben sich aufgrund der Fluoreszenzeigenschaften und der Fähigkeit der Sauerstoffradikalproduktion der LOV-FPs vielseitige biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten als Fluoreszenzreporter und Photosensibilisatoren, die in Abbildung 28 zusammenfassend dargestellt sind.



**Abbildung 28: Darstellung der möglichen Anwendungen von LOV-FPs als Photosensibilisatoren und Fluoreszenzreporter**

Gängige Anwendungen von Fluoreszenzreportern sind links, neuartige Anwendungsfelder der LOV-FPs als Photosensibilisatoren rechts dargestellt.

## 5 Zusammenfassung

Blaulichtrezeptoren, die auf *light, oxygen, voltage* (LOV) Sensordomänen basieren, sind in Mikroorganismen, Pilzen und Pflanzen weit verbreitet. In dieser Arbeit sind LOV-Proteine in Hinblick auf ihre Photorezeptoreigenschaften und regulatorische Funktionen untersucht worden. Weiterhin wurde ihre Anwendbarkeit in der Biotechnologie und Biomedizin näher untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein „short LOV“ Protein aus dem marinen Bakterium *Dinoroseobacter shibae* identifiziert und photochemisch charakterisiert, das neben der Lichtrezeptordomäne keine weitere regulatorische Effektdomänen aufweist. Nach der heterologen Expression und Reinigung des als DsLOV bezeichneten Photorezeptors wurde mittels spektroskopischer Methoden nachgewiesen, dass der Blaulichtrezeptor Flavinmononukleotid (FMN) als Blaulicht-absorbierendes Chromophor trägt und nach Lichtanregung ( $\lambda_{\max}=450$  nm) ein Photoaddukt ausbildet, welches für LOV-Proteine eine ungewöhnlich kurze Lebensdauer von 9,6 Sekunden besitzt. Im Rahmen eines Kooperationsprojektes wurde anschließend die Röntgenstruktur des neuen LOV-Proteins aufgeklärt. Durch Sequenz-, Struktur- und Mutationsanalysen konnte der Aminosäurerest M49 identifiziert werden, der maßgeblich an dem schnellen Photozyklus beteiligt ist. Im zweiten Teil wurde untersucht, welche regulatorische Funktion der Blaulichtrezeptor DsLOV in *D. shibae* besitzt. Dazu wurde mittels homologer Rekombination eine DsLOV-defiziente *D. shibae* Mutante erzeugt und ihr Wachstumsverhalten unter verschiedenen Belichtungsbedingungen mit dem des Wildtypstamms verglichen. Anhand dieser Studien konnte beobachtet werden, dass das phototrophe Bakterium *D. shibae* die Photopigmente Spheroidenon und Bakteriochlorophyll *a* nur dann ausbildet, wenn kein Blaulicht auf die Zellen trifft. Überraschender Weise zeigte die *dslov<sup>-</sup>* Mutante, unabhängig von der Lichtfarbe, keine Akkumulation der Photopigmente. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass der neue Photorezeptor DsLOV an der Blaulicht-vermittelten Inhibierung der Photopigmentsynthese beteiligt ist. Neben der Analyse Licht-vermittelter DsLOV-abhängiger Prozesse wurde im dritten Teil der Arbeit untersucht, in wieweit verschiedene LOV-Varianten (i) als Fluoreszenzproteine und (ii) als genetisch kodierte Photosensibilisatoren eingesetzt werden können. Bei den Varianten handelt es sich um bakterielle und pflanzliche LOV-Derivate, die keinen Photozyklus durchlaufen und dadurch nach ihrer Anregung Licht in Form von blaugrüner Fluoreszenz ( $\lambda_{\max}=495$  nm) emittieren. Um zu analysieren, ob mit der Fluoreszenz auch eine Licht-induzierte Sauerstoffradikalproduktion einhergeht, wurde die Radikalproduktion bei sechs ausgewählten LOV-basierten Fluoreszenzproteinen (LOV-FP) in quantitativen *in vitro* Studien nachgewiesen. Mittels *in vivo* Phototoxizitätsstudien, die mit *E. coli* Zellen und muriner HT22 Tumorzellen durchgeführt wurden, konnte abschließend gezeigt werden, dass die Sauerstoffradikalproduktion der LOV-FPs zum einen

für die Induktion einer spezifischen Stressantwort in Bakterien und zum anderen zur gezielten Abtötung von Bakterien und Maus-Tumorzellen eingesetzt werden kann.

## 6 Summary

Blue-light receptors based on light oxygen voltage (LOV) sensor domains are widespread among microorganisms, fungi and plants. Within this thesis, LOV proteins have been examined with respect to their characteristics as photoreceptors and their regulatory functions. Additionally, their applicability for biotechnology and biomedicine has been investigated.

In the first part of this thesis, a short-LOV protein from marine *Dinorosebacter shibae* featuring no regulatory effector domains except its light receptor domain was identified and subsequently characterized photochemically. This so called DsLOV photoreceptor has been expressed heterologally, isolated and purified. The spectroscopic analysis revealed flavin mononucleotide (FMN) being the blue light absorbing chromophore of DsLOV. Excited with blue light ( $\lambda_{\text{max}}=450$  nm), a photo-adduct is formed, showing a remarkably short live time of only 9.6 seconds. Within a collaboration project, the three-dimensional structure of the new blue-light receptor DsLOV was solved by X-ray crystallography. By means of sequence, structure and mutational analysis amino acid residue M49 was identified as being essential for the fast photocycle.

Within the second part of this thesis, regulatory functions of the blue-light receptor DsLOV were studied *in vivo*. A DsLOV-deficient mutant strain of *D. shibae* was constructed by homologous recombination. Its growth behavior was investigated under different light-conditions in comparison to the respective wild-type strain. These studies revealed that the phototrophic bacterium *D. shibae* accumulates its photo-pigments spheroidenone and bacteriochlorophyll *a* only in the absence of blue-light. Surprisingly, the *dslov*<sup>-</sup> mutant does not accumulate any photo-pigments irrespective of the light source. Thus, it was shown for the first time that the photo-receptor DsLOV is involved in the inhibition of light-mediated photo-pigment synthesis of *D. shibae*.

Furthermore, the applicability of different variants of LOV fluorescent-proteins (LOV-fp) as (i) reporter proteins and (ii) genetically encoded photosensitizers has been investigated within the third part of this thesis. All variants are bacterial or plant-based LOV-derivatives that do not undergo a photo-cycle. Therefore, these proteins emit fluorescence light in the blue-green range ( $\lambda_{\text{max}}=495$  nm) of the light spectrum after excitation with light of appropriate wavelengths. Quantitative *in vitro* studies of six different LOV-fp revealed that fluorescence light emission is accompanied by light-induced production of reactive oxygen species (ROS). Furthermore, *in vivo* photo-toxicity studies in *E. coli* and murine HT22 tumor-cells proved that the LOV-fp-generated ROS can be employed for the induction of specific bacterial stress responses as well as for targeted killing of bacteria and mouse tumor-cells.

## 7 Literatur

- Adams, S. R., Campbell, R. E., Gross, L. A., Martin, B. R., Walkup, G. K., Yao, Y., Llopis, J. & Tsien, R. Y. (2002). New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling *in vitro* and *in vivo*: synthesis and biological applications. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 6063–6076.
- Altuvia, S., Almirón, M., Huisman, G., Kolter, R. & Storz, G. (1994). The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase. *Molecular microbiology* **13**, 265–272.
- An, G., Hidaka, K. & Siminovitch, L. (1982). Expression of bacterial beta-galactosidase in animal cells. *Molecular and cellular biology* **2**, 1628–1632.
- Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J. & Storz, G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6161–6165.
- Auldridge, M. E., Satyshur, K. A., Anstrom, D. M. & Forest, K. T. (2012). Structure-guided engineering enhances a phytochrome-based infrared fluorescent protein. *The Journal of biological chemistry* **287**, 7000–7009.
- Avila-Pérez, M., Hellingwerf, K. J. & Kort, R. (2006). Blue light activates the sigmaB-dependent stress response of *Bacillus subtilis* via YtvA. *Journal of bacteriology* **188**, 6411–6414.
- Avila-Pérez, M., Vreede, J., Tang, Y., Bende, O., Losi, A., Gärtner, W. & Hellingwerf, K. (2009). *In vivo* mutational analysis of YtvA from *Bacillus subtilis*: mechanism of light activation of the general stress response. *The Journal of biological chemistry* **284**, 24958–24964.
- Baez, A. & Shiloach, J. (2013). *Escherichia coli* avoids high dissolved oxygen stress by activation of SoxRS and manganese-superoxide dismutase. *Microbial cell factories* **12**, 23
- Baier, J., Maisch, T., Maier, M., Engel, E., Landthaler, M. & Bäumler, W. (2006). Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers. *Biophysical journal* **91**, 1452–1459.
- Bandhuvula, P., Fyrst, H. & Saba, J. D. (2007). A rapid fluorescence assay for sphingosine-1-phosphate lyase enzyme activity. *Journal of lipid research* **48**, 2769–2778.
- Berger, J., Hauber, J., Hauber, R., Geiger, R. & Cullen, B. R. (1988). Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene* **66**, 1–10.
- Berghoff, B. A., Glaeser, J., Nuss, A. M., Zobawa, M., Lottspeich, F. & Klug, G. (2011). Anoxygenic photosynthesis and photooxidative stress: a particular challenge for *Roseobacter*. *Environmental microbiology* **13**, 775–791.

- Bergmann, R. (2011).** Optimierung eines Expressionssystems für die Synthese von Redox- und Membranproteinen in *Rhodobacter capsulatus*. *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Bermejo, C., Haerizadeh, F., Takanaga, H., Chermak, D. & Frommer, W. B. (2011).** Optical sensors for measuring dynamic changes of cytosolic metabolite levels in yeast. *Nature protocols* **6**, 1806–1817.
- Biebl, H., Allgaier, M., Tindall, B. J., Koblizek, M., Lünsdorf, H., Pukall, R. & Wagner-Döbler, I. (2005).** *Dinoroseobacter shibae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic phototrophic bacterium isolated from dinoflagellates. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **55**, 1089–1096.
- Bizzarri, R., Serresi, M., Luin, S. & Beltram, F. (2009).** Green fluorescent protein based pH indicators for *in vivo* use: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry* **393**, 1107–1122.
- Boassa, D., Berlanga, M. L., Yang, M. A., Terada, M., Hu, J., Bushong, E. A., Hwang, M., Masliah, E., George, J. M. & Ellisman, M. H. (2013).** Mapping the subcellular distribution of  $\alpha$ -synuclein in neurons using genetically encoded probes for correlated light and electron microscopy: implications for Parkinson's disease pathogenesis. *The Journal of neuroscience* **33**, 2605–2615.
- Borland, C. F., Cogdell, R. J., Land, E. J. & Truscott, T. G. (1989).** Bacteriochlorophyll *a* triplet state and its interactions with bacterial carotenoids and oxygen. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **3**, 237–245.
- Braatsch, S. & Klug, G. (2004).** Blue light perception in bacteria. *Photosynthesis research* **79**, 45–57.
- Braatsch, S., Gomelsky, M., Kuphal, S. & Klug, G. (2002).** A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular microbiology* **45**, 827–836.
- Bracha-Drori, K., Shichrur, K., Katz, A., Oliva, M., Angelovici, R., Yalovsky, S. & Ohad, N. (2004).** Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **40**, 419–427.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248–254.
- Brazma, A. (2009).** Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME)-successes, failures, challenges. *TheScientificWorldJournal* **9**, 420–423.
- Bruhn, J. B., Nielsen, K. F., Hjelm, M., Hansen, M., Bresciani, J., Schulz, S. & Gram, L. (2005).** Ecology, inhibitory activity, and morphogenesis of a marine antagonistic bacterium belonging to the *Roseobacter* clade. *Applied and environmental microbiology* **71**, 7263–7270.
- Buelow, P. (1964).** The ONPG test in diagnostic bacteriology. Methodical investigations. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* **60**, 376–386.
- Bulina, M. E., Chudakov, D. M., Mudrik, N. N. & Lukyanov, K. A. (2002).** Interconversion of *Anthozoa* GFP-like fluorescent and non-fluorescent proteins by mutagenesis. *BMC biochemistry* **3**, 7.

- Bulina, M. E., Chudakov, D. M., Britanova, O. V., Yanushevich, Y. G., Staroverov, D. B., Chepurnykh, T. V., Merzlyak, E. M., Shkrob, M. A., Lukyanov, S. & Lukyanov, K. A. (2006a).** A genetically encoded photosensitizer. *Nature biotechnology* **24**, 95–99.
- Bulina, M. E., Lukyanov, K. A., Britanova, O. V., Onichtchouk, D., Lukyanov, S. & Chudakov, D. M. (2006b).** Chromophore-assisted light inactivation (CALI) using the phototoxic fluorescent protein KillerRed. *Nature protocols* **1**, 947–953.
- Cabantous, S. & Waldo, G. S. (2006).** *In vivo* and *in vitro* protein solubility assays using split GFP. *Nature methods* **3**, 845–854.
- Cao, Z., Livoti, E., Losi, A. & Gärtner, W. (2010).** A blue light-inducible phosphodiesterase activity in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Photochemistry and photobiology* **86**, 606–611.
- Carpentier, P., Violot, S., Blanchoin, L. & Bourgeois, D. (2009).** Structural basis for the phototoxicity of the fluorescent protein KillerRed. *FEBS letters* **583**, 2839–2842.
- Chalfie, M. (2009).** GFP: lighting up life (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* **48**, 5603–5611.
- Chan, R. H., Lewis, J. W. & Bogomolni, R. A. (2013).** Photocycle of the LOV-STAS protein from the pathogen *Listeria monocytogenes*. *Photochemistry and photobiology* **89**, 361–369.
- Chang, C. C., Chuang, Y. C. & Chang, M. C. (2004a).** Fluorescent intensity of a novel NADPH-binding protein of *Vibrio vulnificus* can be improved by directed evolution. *Biochemical and biophysical research communications* **322**, 303–309.
- Chang, C. C., Chuang, Y. C., Chen, Y. C. & Chang, M. C. (2004b).** Bright fluorescence of a novel protein from *Vibrio vulnificus* depends on NADPH and the expression of this protein is regulated by a LysR-type regulatory gene. *Biochemical and biophysical research communications* **319**, 207–213.
- Chang, H.-C., Kaiser, C. M., Hartl, F. U. & Barral, J. M. (2005).** *De novo* folding of GFP fusion proteins: high efficiency in eukaryotes but not in bacteria. *Journal of molecular biology* **353**, 397–409.
- Chapman, S., Faulkner, C., Kaiserli, E., Garcia-Mata, C., Savenkov, E. I., Roberts, A. G., Oparka, K. J. & Christie, J. M. (2008).** The photoreversible fluorescent protein iLOV outperforms GFP as a reporter of plant virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 20038–20043.
- Chen, C.-H., DeMay, B. S., Gladfelter, A. S., Dunlap, J. C. & Loros, J. J. (2010).** Physical interaction between VIVID and white collar complex regulates photoadaptation in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 16715–21670.
- Chiang, S. M. & Schellhorn, H. E. (2012).** Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Archives of biochemistry and biophysics* **525**, 161–169.
- Cho, H.-Y., Tseng, T.-S., Kaiserli, E., Sullivan, S., Christie, J. M. & Briggs, W. R. (2007).** Physiological roles of the light, oxygen, or voltage domains of phototropin 1 and phototropin 2 in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **143**, 517–529.

- Choi, C. H., DeGuzman, J. V., Lamont, R. J. & Yilmaz, Ö. (2011).** Genetic transformation of an obligate anaerobe, *P. gingivalis* for FMN-green fluorescent protein expression in studying host-microbe interaction. *PLoS one* **6**, e18499.
- Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G. & Ryu, S. E. (2001).** Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* **105**, 103–113.
- Christie, J. M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M. & Briggs, W. R. (1999).** LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (*nph1*): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 8779–8783.
- Christie, J. M. (1998).** *Arabidopsis* NPH1: A flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* **282**, 1698–1701.
- Christie, J. M. (2007).** Phototropin blue-light receptors. *Annual review of plant biology* **58**, 21–45.
- Christie, J. M., Swartz, T. E., Bogomolni, R. A. & Briggs, W. R. (2002).** Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *The Plant journal* **32**, 205–219.
- Christie, J. M., Corchnoy, S. B., Swartz, T. E., Hokenson, M., Han, I.-S., Briggs, W. R. & Bogomolni, R. A. (2007).** Steric interactions stabilize the signaling state of the LOV2 domain of phototropin 1. *Biochemistry* **46**, 9310–9319.
- Christie, J. M., Hitomi, K., Arvai, A. S., Hartfield, K. A., Mettlen, M., Pratt, A. J., Tainer, J. A. & Getzoff, E. D. (2012a).** Structural tuning of the fluorescent protein iLOV for improved photostability. *The Journal of biological chemistry* **287**, 22295–22304.
- Christie, J. M., Gawthorne, J., Young, G., Fraser, N. J. & Roe, A. J. (2012b).** LOV to BLUF: flavoprotein contributions to the optogenetic toolkit. *Molecular plant* **5**, 533–544.
- Chudakov, D. M., Lukyanov, S. & Lukyanov, K. A. (2005).** Fluorescent proteins as a toolkit for *in vivo* imaging. *Trends in biotechnology* **23**, 605–613.
- Circolone, F., Granzin, J., Jentsch, K., Drepper, T., Jaeger, K.-E., Willbold, D., Krauss, U. & Batra-Safferling, R. (2012).** Structural basis for the slow dark recovery of a full-length LOV protein from *Pseudomonas putida*. *Journal of molecular biology* **417**, 362–374.
- Conrad, K. S., Bilwes, A. M. & Crane, B. R. (2013).** Light-induced subunit dissociation by a light-oxygen-voltage domain photoreceptor from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **52**, 378–391.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. & Falkow, S. (1996).** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33–38.
- Craggs, T. D. (2009).** Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation. *Chemical Society reviews* **38**, 2865–2875.
- Crosson, S. & Moffat, K. (2001).** Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2995–3000.

- Crowe, J., Döbeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stüber, D. & Henco, K. (1994).** 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods in molecular biology* **31**, 371–387.
- Darwin, A. J. (2005).** The phage-shock-protein response. *Molecular microbiology* **57**, 621–628.
- Davies, M. M. J. (2003).** Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and biophysical research communications* **305**, 761–770.
- Davis, S. J., Vener, A. V & Vierstra, R. D. (1999).** Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* **286**, 2517–20.
- Day, R. N. & Davidson, M. W. (2009).** The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society reviews* **38**, 2887–2921.
- De Wet, J., Wood, K., DeLuca, M., Helinski, D. & Subramani, S. (1987).** Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Molecular and cellular biology* **7**.
- Del Bene, F., Wyart, C., Robles, E., Tran, A., Looger, L., Scott, E. K., Isacoff, E. Y. & Baier, H. (2010).** Filtering of visual information in the tectum by an identified neural circuit. *Science* **330**, 669–673.
- Demarsy, E. & Fankhauser, C. (2009).** Higher plants use LOV to perceive blue light. *Current opinion in plant biology* **12**, 69–74.
- Destaing, O., Planus, E., Bouvard, D., Oddou, C., Badowski, C., Bossy, V., Raducanu, A., Fourcade, B., Albiges-Rizo, C. & Block, M. R. (2010).**  $\beta$ 1A integrin is a master regulator of invadosome organization and function. *Molecular biology of the cell* **21**, 4108–4119.
- Diensthuber, R. P., Bommer, M., Gleichmann, T. & Möglich, A. (2013).** Full-length structure of a sensor histidine kinase pinpoints coaxial coiled coils as signal transducers and modulators. *Structure* **21**, 1127–1136.
- Drepper, T., Eggert, T., Circolone, F., Heck, A., Krauss, U., Guterl, J.-K., Wendorff, M., Losi, A., Gärtner, W. & Jaeger, K.-E. (2007).** Reporter proteins for *in vivo* fluorescence without oxygen. *Nature biotechnology* **25**, 443–445.
- Drepper, T., Huber, R., Heck, A., Circolone, F., Hillmer, A.-K., Büchs, J. & Jaeger, K.-E. (2010a).** Flavin mononucleotide-based fluorescent reporter proteins outperform green fluorescent protein-like proteins as quantitative *in vivo* real-time reporters. *Applied and environmental microbiology* **76**, 5990–5994.
- Drepper, T., Endres, S., Jaeger, K.-E. & Potzkei, J. (2010b).** LOV-Domänen Protein zur photosensiblen Desfunktionalisierung. Patent: DE 10 2010 036 997.
- Drepper, T., Krauss, U., Meyer zu Berstenhorst, S., Pietruszka, J. & Jaeger, K.-E. (2011).** Lights on and action! Controlling microbial gene expression by light. *Applied microbiology and biotechnology* **90**, 23–40.
- Drepper, T., Gensch, T. & Pohl, M. (2013).** Advanced *in vivo* applications of blue light photoreceptors as alternative fluorescent proteins. *Photochemical & photobiological sciences* **12**, 1125–1134.

- Dufour, Y. S., Landick, R. & Donohue, T. J. (2008).** Organization and evolution of the biological response to singlet oxygen stress. *Journal of molecular biology* **383**, 713–730.
- Dugaiczyk, A., Boyer, H. W. & Goodman, H. M. (1975).** Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *Journal of molecular biology* **96**, 171–184.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. & Botstein, D. (1998).** Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 14863–14868.
- Elhai, J. & Wolk, C. P. (1988).** Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods in enzymology* **167**, 747–754.
- Elsen, S., Swem, L. R., Swem, D. L. & Bauer, C. E. (2004).** RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **68**, 263–279.
- Endres, S. (2010).** Lokalisierung und Anwendung von Light-Oxygen-Voltage (LOV) Proteinen in Bakterien. *Diplomarbeit*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Esposito, A., Gralle, M., Dani, M. A. C., Lange, D. & Wouters, F. S. (2008).** pHlameleons: a family of FRET-based protein sensors for quantitative pH imaging. *Biochemistry* **47**, 13115–13126.
- Feilmeier, B. J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H. & Phillips, G. J. (2000).** Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **182**, 4068–4076.
- Fenno, L., Yizhar, O. & Deisseroth, K. (2011).** The development and application of optogenetics. *Annual review of neuroscience* **34**, 389–412.
- Fischer, A. J. & Lagarias, J. C. (2004).** Harnessing phytochrome's glowing potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 17334–17339.
- Fischer, H. M. (1994).** Genetic regulation of nitrogen fixation in *rhizobia*. *Microbiological reviews* **58**, 352–386.
- Flors, C., Fryer, M. J., Waring, J., Reeder, B., Bechtold, U., Mullineaux, P. M., Nonell, S., Wilson, M. T. & Baker, N. R. (2006).** Imaging the production of singlet oxygen *in vivo* using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green. *Journal of experimental botany* **57**, 1725–1734.
- Foote, C. S. (1991).** Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and photobiology* **54**, 659.
- Foreman, R., Fiebig, A. & Crosson, S. (2012).** The LovK-LovR two-component system is a regulator of the general stress pathway in *Caulobacter crescentus*. *Journal of bacteriology* **194**, 3038–3049.
- Fowler, A. V & Zabin, I. (1970).** The amino acid sequence of beta galactosidase. *The Journal of biological chemistry* **245**, 5032–5041.

- Frühwirth, S., Teich, K. & Klug, G. (2012).** Effects of the cryptochrome CryB from *Rhodobacter sphaeroides* on global gene expression in the dark or blue light or in the presence of singlet oxygen. *PLoS one* **7**, e33791.
- Gärtner, W. (2010).** Lights on: a switchable fluorescent biliprotein. *Chembiochem: a European journal of chemical biology* **11**, 1649–1652.
- Gau, D., Ding, Z., Baty, C. & Roy, P. (2011).** Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)-based Detection of Profilin-VASP Interaction. *Cellular and molecular bioengineering* **4**, 1–8.
- Gawthorne, J. A., Reddick, L. E., Akpunarlieva, S. N., Beckham, K. S. H., Christie, J. M., Alto, N. M., Gabrielsen, M. & Roe, A. J. (2012).** Express your LOV: an engineered flavoprotein as a reporter for protein expression and purification. *PLoS one* **7**, e52962.
- Geisselbrecht, Y., Frühwirth, S., Schroeder, C., Pierik, A. J., Klug, G. & Essen, L.-O. (2012).** CryB from *Rhodobacter sphaeroides*: a unique class of cryptochromes with new cofactors. *EMBO reports* **13**, 223–229.
- Glaeser, J. & Klug, G. (2005).** Photo-oxidative stress in *Rhodobacter sphaeroides*: protective role of carotenoids and expression of selected genes. *Microbiology* **151**, 1927–1938.
- Gomelsky, M. & Kaplan, S. (1997).** Molecular genetic analysis suggesting interactions between AppA and PpsR in regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of bacteriology* **179**, 128–134.
- Gomelsky, M., Horne, I. M., Lee, H. J., Pemberton, J. M., McEwan, A. G. & Kaplan, S. (2000).** Domain structure, oligomeric state, and mutational analysis of PpsR, the *Rhodobacter sphaeroides* repressor of photosystem gene expression. *Journal of bacteriology* **182**, 2253–2261.
- Gomelsky, M. & Hoff, W. D. (2011).** Light helps bacteria make important lifestyle decisions. *Trends in microbiology* **19**, 441–8.
- Gonzalez, C. F., Ackerley, D. F., Lynch, S. V & Matin, A. (2005).** ChrR, a soluble quinone reductase of *Pseudomonas putida* that defends against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *The Journal of biological chemistry* **280**, 22590–22595.
- Gorman, C., Moffat, L. & Howard, B. (1982).** Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Molecular and cellular Biology* **2**, 1044–1051.
- Grant, R. A., Filman, D. J., Finkel, S. E., Kolter, R. & Hogle, J. M. (1998).** The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nature structural biology* **5**, 294–303.
- Green, H. M. & Alberola-Ila, J. (2005).** Development of ERK Activity Sensor, an *in vitro*, FRET-based sensor of extracellular regulated kinase activity. *BMC chemical biology* **5**, 1.
- Greenbaum, L., Rothmann, C., Lavie, R. & Malik, Z. (2000).** Green fluorescent protein photobleaching: a model for protein damage by endogenous and exogenous singlet oxygen. *Biological chemistry* **381**, 1251–1258.
- Gregor, J. & Klug, G. (1999).** Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light. *FEMS microbiology letters* **179**, 1–9.

- Gregor, J. & Klug, G. (2002).** Oxygen-regulated expression of genes for pigment binding proteins in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **4**, 249–253.
- Griffin, B. A. (1998).** Specific Covalent Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Live Cells. *Science* **281**, 269–272.
- Gu, M. & Imlay, J. A. (2011).** The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. *Molecular microbiology* **79**, 1136–1150.
- Gurmu, D., Lu, J., Johnson, K. A., Nordlund, P., Holmgren, A. & Erlandsen, H. (2009).** The crystal structure of the protein YhaK from *Escherichia coli* reveals a new subclass of redox sensitive enterobacterial bicipins. *Proteins* **74**, 18–31.
- Gurskaya, N. G., Fradkov, A. F., Terskikh, A., Matz, M. V., Labas, Y. A., Martynov, V. I., Yanushevich, Y. G., Lukyanov, K. A. & Lukyanov, S. A. (2001).** GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins. *FEBS letters* **507**, 16–20.
- Halavaty, A. S. & Moffat, K. (2007).** N- and C-terminal flanking regions modulate light-induced signal transduction in the LOV2 domain of the blue light sensor phototropin 1 from *Avena sativa*. *Biochemistry* **46**, 14001–14009.
- Halliwell, B. (2006).** Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* **141**, 312–322.
- Hampton, R. Y., Koning, A., Wright, R. & Rine, J. (1996).** *In vivo* examination of membrane protein localization and degradation with green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 828–833.
- Han, Y., Meyer, M. H. F., Keusgen, M. & Klug, G. (2007).** A haem cofactor is required for redox and light signalling by the AppA protein of *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular microbiology* **64**, 1090–1104.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**, 557–580.
- Harper, S. M., Neil, L. C. & Gardner, K. H. (2003).** Structural basis of a phototropin light switch. *Science* **301**, 1541–1544.
- Harper, S. M., Neil, L. C., Day, I. J., Hore, P. J. & Gardner, K. H. (2004).** Conformational changes in a photosensory LOV domain monitored by time-resolved NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 3390–3391.
- Hecker, M., Pané-Farré, J. & Völker, U. (2007).** SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annual review of microbiology* **61**, 215–236.
- Heim, R. & Tsien, R. Y. (1996).** Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current biology* **6**, 178–182.
- Heim, R., Prasher, D. C. & Tsien, R. Y. (1994).** Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 12501–12504.

- Heim, R., Cubitt, A. B. & Tsien, R. Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663–664.
- Heintzen, C. & Liu, Y. (2007). The *Neurospora crassa* circadian clock. *Advances in genetics* **58**, 25–66.
- Hendrischk, A.-K., Moldt, J., Frühwirth, S. W. & Klug, G. (2009a). Characterization of an unusual LOV domain protein in the alpha-proteobacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Photochemistry and photobiology* **85**, 1254–1259.
- Hendrischk, A.-K., Frühwirth, S. W., Moldt, J., Pokorny, R., Metz, S., Kaiser, G., Jäger, A., Batschauer, A. & Klug, G. (2009b). A cryptochrome-like protein is involved in the regulation of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular microbiology* **74**, 990–1003.
- Herrou, J. & Crosson, S. (2011). Function, structure and mechanism of bacterial photosensory LOV proteins. *Nature reviews microbiology* **9**, 713–723.
- Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J. & Schweizer, H. P. (1998). A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**, 77–86.
- Hoerter, J. D., Arnold, A. A., Ward, C. S., Sauer, M., Johnson, S., Fleming, T. & Eisenstark, A. (2005). Reduced hydroperoxidase (HPI and HPII) activity in the delta fur mutant contributes to increased sensitivity to UVA radiation in *Escherichia coli*. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* **79**, 151–157.
- Hou, J. Y., Sauer, R. T. & Baker, T. A. (2008). Distinct structural elements of the adaptor ClpS are required for regulating degradation by ClpAP. *Nature structural & molecular biology* **15**, 288–294.
- Huala, E. (1997). Arabidopsis NPH1: A Protein Kinase with a Putative Redox-Sensing Domain. *Science* **278**, 2120–2123.
- Hunt, S. M., Thompson, S., Elvin, M. & Heintzen, C. (2010). VIVID interacts with the WHITE COLLAR complex and FREQUENCY-interacting RNA helicase to alter light and clock responses in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 16709–16714.
- Hwang, C.-S., Choi, E.-S., Han, S.-S. & Kim, G.-J. (2012). Screening of a highly soluble and oxygen-independent blue fluorescent protein from metagenome. *Biochemical and biophysical research communications* **419**, 676–681.
- Ilari, A., Ceci, P., Ferrari, D., Rossi, G. L. & Chiancone, E. (2002). Iron incorporation into *Escherichia coli* Dps gives rise to a ferritin-like microcrystalline core. *The Journal of biological chemistry* **277**, 37619–37623.
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annual review of microbiology* **57**, 395–418.
- Imlay, J. A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual review of biochemistry* **77**, 755–776.
- Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature reviews Microbiology* **11**, 443–454.

- Ito, K., Nakanishi, M., Lee, W.-C., Sasaki, H., Zenno, S., Saigo, K., Kitade, Y. & Tanokura, M. (2005).** Crystallization and preliminary x-ray analysis of AzoR (azoreductase) from *Escherichia coli*. *Acta crystallographica Section F, Structural biology and crystallization communications* **61**, 399–402.
- Ito, K., Nakanishi, M., Lee, W.-C., Sasaki, H., Zenno, S., Saigo, K., Kitade, Y. & Tanokura, M. (2006).** Three-dimensional structure of AzoR from *Escherichia coli*. An oxidoreductase conserved in microorganisms. *The Journal of biological chemistry* **281**, 20567–20576.
- Izu, H., Adachi, O. & Yamada, M. (1996).** Purification and characterization of the *Escherichia coli* thermoresistant gluconokinase encoded by the *gntK* gene. *FEBS Letters* **394**, 14–16.
- Jablonski, A. (1935).** Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Zeitschrift für Physik* **94**, 38–46.
- Jacobson, K., Rajfur, Z., Vitriol, E. & Hahn, K. (2008).** Chromophore-assisted laser inactivation in cell biology. *Trends in cell biology* **18**, 443–450.
- Jang, S. & Imlay, J. A. (2010).** Hydrogen peroxide inactivates the *Escherichia coli* Isc iron-sulphur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate. *Molecular microbiology* **78**, 1448–1467.
- Jayaraman, S. (2000).** Mechanism and Cellular Applications of a Green Fluorescent Protein-based Halide Sensor. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 6047–6050.
- Jentzsch, K., Wirtz, A., Circolone, F., Drepper, T., Losi, A., Gärtner, W., Jaeger, K.-E. & Krauss, U. (2009).** Mutual exchange of kinetic properties by extended mutagenesis in two short LOV domain proteins from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **48**, 10321–10333.
- Jiménez-Banzo, A., Nonell, S., Hofkens, J. & Flors, C. (2008).** Singlet oxygen photosensitization by EGFP and its chromophore HBDI. *Biophysical journal* **94**, 168–172.
- Jiménez-Banzo, A., Ragàs, X., Abbruzzetti, S., Viappiani, C., Campanini, B., Flors, C. & Nonell, S. (2010).** Singlet oxygen photosensitisation by GFP mutants: oxygen accessibility to the chromophore. *Photochemical & photobiological sciences* **9**, 1336–1341.
- Jones, M. A., Feeney, K. A., Kelly, S. M. & Christie, J. M. (2007).** Mutational analysis of phototropin 1 provides insights into the mechanism underlying LOV2 signal transmission. *The Journal of biological chemistry* **282**, 6405–6414.
- Jurk, M., Schramm, P. & Schmieder, P. (2013).** The blue-light receptor YtvA from *Bacillus subtilis* is permanently incorporated into the stressosome independent of the illumination state. *Biochemical and biophysical research communications* **432**, 499–503.
- Kagawa, T. (2003).** The phototropin family as photoreceptors for blue light-induced chloroplast relocation. *Journal of plant research* **116**, 77–82.
- Kao, T.-H., Chen, Y., Pai, C.-H., Chang, M.-C. & Wang, A. H.-J. (2011).** Structure of a NADPH-dependent blue fluorescent protein revealed the unique role of Gly176 on the fluorescence enhancement. *Journal of structural biology* **174**, 485–93.

- Kasahara, M., Swartz, T. & Olney, M. (2002). Photochemical Properties of the Flavin Mononucleotide-Binding Domains of the Phototropins from *Arabidopsis*, Rice, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology* **129**, 762–773.
- Katzke, N., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Markert, A., Svensson, V., Jaeger, K.-E., Heck, A. & 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.
- Kehres, D. G., Janakiraman, A., Slauch, J. M. & Maguire, M. E. (2002). Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *mntH* transcription by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup>. *Journal of bacteriology* **184**, 3151–3158.
- Khodursky, A. B., Peter, B. J., Cozzarelli, N. R., Botstein, D., Brown, P. O. & Yanofsky, C. (2000). DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 12170–12175.
- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M. & Shimazaki, K. (2001). Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**, 656–660.
- Koblížek, M., Bèjà, O., Bidigare, R. R., Christensen, S., Benitez-Nelson, B., Vetriani, C., Kolber, M. K., Falkowski, P. G. & Kolber, Z. S. (2003). Isolation and characterization of *Erythrobacter* sp. strains from the upper ocean. *Archives of microbiology* **180**, 327–338.
- Kottke, T., Heberle, J., Hehn, D., Dick, B. & Hegemann, P. (2003). Phot-LOV1: photocycle of a blue-light receptor domain from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophysical journal* **84**, 1192–1201.
- Krauss, U., Losi, a, Gärtner, W., Jaeger, K.-E. & Eggert, T. (2005). Initial characterization of a blue-light sensing, phototropin-related protein from *Pseudomonas putida*: a paradigm for an extended LOV construct. *Physical chemistry chemical physics* **7**, 2804–2811.
- Krauss, U., Minh, B. Q., Losi, A., Gärtner, W., Eggert, T., von Haeseler, A. & Jaeger, K.-E. (2009). Distribution and phylogeny of light-oxygen-voltage-blue-light-signaling proteins in the three kingdoms of life. *Journal of bacteriology* **191**, 7234–7242.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of molecular biology* **372**, 774–797.
- Król, J. E., Rogers, L. M., Krone, S. M. & Top, E. M. (2010). Dual reporter system for *in situ* detection of plasmid transfer under aerobic and anaerobic conditions. *Applied and environmental microbiology* **76**, 4553–4556.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Ledford, H. K., Chin, B. L. & Niyogi, K. K. (2007). Acclimation to singlet oxygen stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic cell* **6**, 919–930.
- Lee, A., Mathuru, A. S., Teh, C., Kibat, C., Korzh, V., Penney, T. B. & Jesuthasan, S. (2010). The habenula prevents helpless behavior in larval zebrafish. *Current biology* **20**, 2211–2216.

- Lee, K., Dunlap, J. C. & Loros, J. J. (2003). Roles for WHITE COLLAR-1 in circadian and general photoperception in *Neurospora crassa*. *Genetics* **163**, 103–114.
- Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C. C. & Kain, S. R. (1998). Generation of Destabilized Green Fluorescent Protein as a Transcription Reporter. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 34970–34975.
- Liang, J.-Y., Yuann, J.-M. P., Cheng, C.-W., Jian, H.-L., Lin, C.-C. & Chen, L.-Y. (2013). Blue light induced free radicals from riboflavin on *E. coli* DNA damage. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* **119**, 60–64.
- Lim, C. R., Kimata, Y., Oka, M., Nomaguchi, K. & Kohno, K. (1995). Thermosensitivity of green fluorescent protein fluorescence utilized to reveal novel nuclear-like compartments in a mutant nucleoporin NSP1. *Journal of biochemistry* **118**, 13–17.
- Lin, J. Y., Sann, S. B., Zhou, K., Nabavi, S., Proulx, C. D., Malinow, R., Jin, Y. & Tsien, R. Y. (2013). Optogenetic Inhibition of Synaptic Release with Chromophore-Assisted Light Inactivation (CALI). *Neuron* **79**, 241–253.
- Liochev, S. I., Benov, L., Touati, D. & Fridovich, I. (1999). Induction of the soxRS regulon of *Escherichia coli* by superoxide. *The Journal of biological chemistry* **274**, 9479–9481.
- Liscum, E. & Stowe-Evans, E. L. (2000). Phototropism: a “simple” physiological response modulated by multiple interacting photosensory-response pathways. *Photochemistry and photobiology* **72**, 273–282.
- Liu, G., Zhou, J., Jin, R., Zhou, M., Wang, J., Lu, H. & Qu, Y. (2008). Enhancing survival of *Escherichia coli* by expression of azoreductase AZR possessing quinone reductase activity. *Applied microbiology and biotechnology* **80**, 409–416.
- Liu, G., Zhou, J., Fu, Q. S. & Wang, J. (2009). The *Escherichia coli* azoreductase AzoR Is involved in resistance to thiol-specific stress caused by electrophilic quinones. *Journal of bacteriology* **191**, 6394–6400.
- Liu, M., Gong, X., Alluri, R. K., Wu, J., Sablo, T. & Li, Z. (2012). Characterization of RNA damage under oxidative stress in *Escherichia coli*. *Biological chemistry* **393**, 123–132.
- Liu, X., Liu, X., Zhou, Y., Zou, D., Shi, R., Li, Z. & Zheng, D. (2010). T vector bearing KillerRed protein marker for red/white cloning screening. *Analytical biochemistry* **405**, 272–274.
- Liu, X., Shi, R., Zou, D., Li, Z., Liu, X., Chen, Y., Yang, X., Zhou, Y. & Zheng, D. (2011a). Positive selection vector using the KillerRed gene. *Analytical biochemistry* **412**, 120–122.
- Liu, Y., Bauer, S. C. & Imlay, J. A. (2011b). The YaaA protein of the *Escherichia coli* OxyR regulon lessens hydrogen peroxide toxicity by diminishing the amount of intracellular unincorporated iron. *Journal of bacteriology* **193**, 2186–2196.
- Lobo, L. A., Smith, C. J. & Rocha, E. R. (2011). Flavin mononucleotide (FMN)-based fluorescent protein (FbFP) as reporter for gene expression in the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *FEMS microbiology letters* **317**, 67–74.

- Losi, A & Gärtner, W. (2008).** Bacterial bilin- and flavin-binding photoreceptors. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **7**, 1168–1178.
- Losi, A. (2004).** The bacterial counterparts of plant phototropins. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **3**, 566–574.
- Losi, A. & Gärtner, W. (2011).** Old chromophores, new photoactivation paradigms, trendy applications: flavins in blue light-sensing photoreceptors. *Photochemistry and photobiology* **87**, 491–510.
- Losi, A. & Gärtner, W. (2012).** The evolution of flavin-binding photoreceptors: an ancient chromophore serving trendy blue-light sensors. *Annual review of plant biology* **63**, 49–72.
- Losi, A., Polverini, E., Quest, B. & Gärtner, W. (2002).** First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes. *Biophysical journal* **82**, 2627–2634.
- Losi, A., Quest, B. & Gärtner, W. (2003).** Listening to the blue: the time-resolved thermodynamics of the bacterial blue-light receptor YtvA and its isolated LOV domain. *Photochemical Photobiological Sciences* **2**, 759–766.
- Losi, A., Kottke, T. & Hegemann, P. (2004).** Recording of blue light-induced energy and volume changes within the wild-type and mutated phot-LOV1 domain from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophysical journal* **86**, 1051–1060.
- Losi, A., Ghiraldelli, E., Jansen, S. & Gärtner, W. (2005).** Mutational effects on protein structural changes and interdomain interactions in the blue-light sensing LOV protein YtvA. *Photochemistry and photobiology* **81**, 1145–1152.
- Magliery, T. J., Wilson, C. G. M., Pan, W., Mishler, D., Ghosh, I., Hamilton, A. D. & Regan, L. (2005).** Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 146–157.
- Masuda, S. & Bauer, C. E. (2002).** AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Cell* **110**, 613–623.
- Matsunaga, S., Takata, H., Morimoto, A., Hayashihara, K., Higashi, T., Akatsuchi, K., Mizusawa, E., Yamakawa, M., Ashida, M. & other authors. (2012).** RBMX: a regulator for maintenance and centromeric protection of sister chromatid cohesion. *Cell reports* **1**, 299–308.
- Matthews, K. S. & Nichols, J. C. (1998).** Lactose repressor protein: functional properties and structure. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **58**, 127–164.
- Matz, M. V., Fradkov, A F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L. & Lukyanov, S. A. (1999).** Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nature biotechnology* **17**, 969–973.
- McComb, R. B. & Bowers, G. N. (1972).** Study of optimum buffer conditions for measuring alkaline phosphatase activity in human serum. *Clinical chemistry* **18**, 97–104.

- McLean, M. A., Rajfur, Z., Chen, Z., Humphrey, D., Yang, B., Sligar, S. G. & Jacobson, K. (2009).** Mechanism of chromophore assisted laser inactivation employing fluorescent proteins. *Analytical chemistry* **81**, 1755–1761.
- Meissner, D., Vollstedt, A., van Dijk, J. M. & Frendl, R. (2007).** Comparative analysis of twin-arginine (Tat)-dependent protein secretion of a heterologous model protein (GFP) in three different Gram-positive bacteria. *Applied microbiology and biotechnology* **76**, 633–642.
- Meng, F. & Sachs, F. (2012).** Orientation-based FRET sensor for real-time imaging of cellular forces. *Journal of cell science* **125**, 743–750.
- Merril, C. R. (1990).** Gel-staining techniques. *Methods in enzymology* **182**, 477–488.
- Metz, S., Jäger, A. & Klug, G. (2012a).** Role of a short light, oxygen, voltage (LOV) domain protein in blue light- and singlet oxygen-dependent gene regulation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology* **158**, 368–379.
- Metz, S., Habertzettl, K., Frühwirth, S., Teich, K., Hasewinkel, C. & Klug, G. (2012b).** Interaction of two photoreceptors in the regulation of bacterial photosynthesis genes. *Nucleic acids research* **40**, 5901–5909.
- Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R. & Tsien, R. Y. (1999).** Dynamic and quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 2135–2140.
- Möckli, N. & Auerbach, D. (2004).** Quantitative beta-galactosidase assay suitable for high-throughput applications in the yeast two-hybrid system. *BioTechniques* **36**, 872–876.
- Möglich, A. & Moffat, K. (2007).** Structural basis for light-dependent signaling in the dimeric LOV domain of the photosensor YtvA. *Journal of molecular biology* **373**, 112–126.
- Möglich, A. & Moffat, K. (2010).** Engineered photoreceptors as novel optogenetic tools. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **9**, 1286–1300.
- Möglich, A., Ayers, R. A. & Moffat, K. (2009).** Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases. *Journal of molecular biology* **385**, 1433–1444.
- Möglich, A., Ayers, R. A. & Moffat, K. (2010).** Addition at the molecular level: signal integration in designed Per-ARNT-Sim receptor proteins. *Journal of molecular biology* **400**, 477–486.
- Morgan, R. W., Christman, M. F., Jacobson, F. S., Storz, G. & Ames, B. N. (1986).** Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 5059–5063.
- Moriconi, V., Sellaro, R., Ayub, N., Soto, G., Rugnone, M., Shah, R., Pathak, G., Gärtner, W. & Casal, J. J. (2013).** LOV-domain photoreceptor, encoded in a genomic island, attenuates the virulence of *Pseudomonas syringae* in light-exposed *Arabidopsis* leaves. *The Plant journal* **76**, 322–331.

- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H. & Winant, J. (1974).** Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* **13**, 2656–2662.
- Mueller, G., Waldeck, W. & Braun, K. (2010).** From green to red--To more dead? Autofluorescent proteins as photosensitizers. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* **98**, 95–98.
- Mukherjee, A., Weyant, K. B., Walker, J. & Schroeder, C. M. (2012).** Directed evolution of bright mutants of an oxygen-independent flavin-binding fluorescent protein from *Pseudomonas putida*. *Journal of biological engineering* **6**, 20.
- Mukherjee, A., Walker, J., Weyant, K. B. & Schroeder, C. M. (2013).** Characterization of flavin-based fluorescent proteins: an emerging class of fluorescent reporters. *PLoS one* **8**, e64753.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* **155**, 335–350.
- Murphy, J. T. & Lagarias, J. C. (1997).** The phytofluors: a new class of fluorescent protein probes. *Current biology* **7**, 870–876.
- Nash, A. I., Ko, W.-H., Harper, S. M. & Gardner, K. H. (2008).** A conserved glutamine plays a central role in LOV domain signal transmission and its duration. *Biochemistry* **47**, 13842–13849.
- Oi, V. T., Glazer, A. N. & Stryer, L. (1982).** Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *The Journal of cell biology* **93**, 981–986.
- Oktyabrsky, O. N., Smirnovam, G. V & Muzyka, N. G. (2001).** Role of glutathione in regulation of hydroperoxidase I in growing *Escherichia coli*. *Free radical biology & medicine* **31**, 250–255.
- Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. & Remington, S. J. (1996).** Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392–1395.
- Östling, S. & Virtama, P. (1946).** A Modified Preparation of the Universal Buffer Described by Teorell and Stenhagen. *Acta Physiologica Scandinavica* **11**, 289–293.
- Park, S., You, X. & Imlay, J. A. (2005).** Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx- mutants of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 9317–9322.
- Patridge, E. V & Ferry, J. G. (2006).** WrbA from *Escherichia coli* and *Archaeoglobus fulgidus* is an NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *Journal of bacteriology* **188**, 3498–3506.
- Patterson, G. H., Knobel, S. M., Sharif, W. D., Kain, S. R. & Piston, D. W. (1997).** Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical Journal* **73**, 2782–2790.
- Pédélecq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C. & Waldo, G. S. (2006).** Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature biotechnology* **24**, 79–88.
- Peter, E., Dick, B. & Baeurle, S. A. (2013).** Regulatory mechanism of the light-activable allosteric switch LOV-TAP for the control of DNA binding: a computer simulation study. *Proteins* **81**, 394–405.

- Piekarski, T., Buchholz, I., Drepper, T., Schobert, M., Wagner-Doebler, I., Tielen, P. & Jahn, D. (2009). Genetic tools for the investigation of *Roseobacter clade* bacteria. *BMC microbiology* **9**, 265.
- Pimenta, F. M., Jensen, R. L., Breitenbach, T., Etzerodt, M. & Ogilby, P. R. (2013). Oxygen-dependent photochemistry and photophysics of “MiniSOG,” a protein-encased flavin. *Photochemistry and photobiology* **89**, 1116-1126.
- Pletnev, S., Gurskaya, N. G., Pletneva, N. V., Lukyanov, K. A., Chudakov, D. M., Martynov, V. I., Popov, V. O., Kovalchuk, M. V., Wlodawer, A., Dauter, Z. & Pletnev V. (2009). Structural basis for phototoxicity of the genetically encoded photosensitizer KillerRed. *The Journal of biological chemistry* **284**, 32028–32039.
- Polen, T. & Wendisch, V. F. (2004). Genomewide expression analysis in amino acid-producing bacteria using DNA microarrays. *Applied biochemistry and biotechnology* **118**, 215–232.
- Pomposiello, P. J., Bennik, M. H. & Demple, B. (2001). Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *Journal of bacteriology* **183**, 3890–9302.
- Potzkei, J., Kunze, M., Drepper, T., Gensch, T., Jaeger, K.-E. & Büchs, J. (2012). Real-time determination of intracellular oxygen in bacteria using a genetically encoded FRET-based biosensor. *BMC biology* **10**, 28.
- Pradel, N., Delmas, J., Wu, L. F., Santini, C. L. & Bonnet, R. (2009). Sec- and Tat-dependent translocation of beta-lactamases across the *Escherichia coli* inner membrane. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**, 242–248.
- Prasher, D., Eckenrode, V. & Ward, W. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229–233.
- Prentki, P. & Krisch, H. M. (1984). *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**, 303–313.
- Purcell, E. B. & Crosson, S. (2008). Photoregulation in prokaryotes. *Current opinion in microbiology* **11**, 168–178.
- Purcell, E. B., Siegal-Gaskins, D., Rawling, D. C., Fiebig, A. & Crosson, S. (2007). A photosensory two-component system regulates bacterial cell attachment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 18241–18246.
- Qi, Y. B., Garren, E. J., Shu, X., Tsien, R. Y. & Jin, Y. (2012). Photo-inducible cell ablation in *Caenorhabditis elegans* using the genetically encoded singlet oxygen generating protein miniSOG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 7499–7504.
- Raffelberg, S., Mansurova, M., Gärtner, W. & Losi, A. (2011). Modulation of the photocycle of a LOV domain photoreceptor by the hydrogen-bonding network. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 5346–5356.

- Raffelberg, S., Gutt, A., Gärtner, W., Mandalari, C., Abbruzzetti, S., Viappiani, C. & Losi, A. (2013).** The amino acids surrounding the flavin 7a-methyl group determine the UVA spectral features of a LOV protein. *Biological chemistry* 394, 1517-28.
- Rajfur, Z., Roy, P., Otey, C., Romer, L. & Jacobson, K. (2002).** Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with EGFP fusion proteins. *Nature cell biology* 4, 286–293.
- Ray, W. K., Zeng, G., Potters, M. B., Mansuri, A. M. & Larson, T. J. (2000).** Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *Journal of bacteriology* 182, 2277–2284.
- Remington, S. J. (2006).** Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics. *Current opinion in structural biology* 16, 714–721.
- Remington, S. J. (2011).** Green fluorescent protein: A perspective. *Protein Science* 20, 1509–1519.
- Ritz, D. (2000).** Thioredoxin 2 Is Involved in the Oxidative Stress Response in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 2505–2512.
- Roy, A. & Carpentier, P. (2010).** Diffusion pathways of oxygen species in the phototoxic fluorescent protein KillerRed. *Photochemical & Photobiological Sciences* 10, 1342-1350.
- Ruiz-González, R., Cortajarena, A. L., Mejias, S. H., Agut, M., Nonell, S. & Flors, C. (2013).** Singlet oxygen generation by the genetically encoded tag miniSOG. *Journal of the American Chemical Society* 135, 9564–9567.
- Ryumina, A. P., Serebrovskaya, E. O., Shirmanova, M. V, Snopova, L. B., Kuznetsova, M. M., Turchin, I. V, Ignatova, N. I., Klementieva, N. V, Fradkov, A. F., Shakhov B. E., Zagaynova E. V., Lukyanov K. A. & Lukyanov A. A. (2013).** Flavoprotein miniSOG as a genetically encoded photosensitizer for cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* 1830, 5059–5067.
- Sacchetti, A., Cappetti, V., Marra, P., Dell’Arciprete, R., El Sewedy, T., Crescenzi, C. & Alberti, S. (2001).** Green fluorescent protein variants fold differentially in prokaryotic and eukaryotic cells. *Journal of cellular biochemistry Supplement* 36, 117–128.
- Salomon, M., Christie, J. & Knieb, E. (2000).** Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* 9401–9410.
- Salomon, M., Lempert, U. & Rüdiger, W. (2004).** Dimerization of the plant photoreceptor phototropin is probably mediated by the LOV1 domain. *FEBS letters* 572, 8–10.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- San Martín, A., Ceballo, S., Ruminot, I., Lerchundi, R., Frommer, W. B. & Barros, L. F. (2013).** A genetically encoded FRET lactate sensor and its use to detect the Warburg effect in single cancer cells. *PLoS one* 8, e57712.
- Schafmeier, T. & Diernfellner, A. C. R. (2011).** Light input and processing in the circadian clock of *Neurospora*. *FEBS letters* 585, 1467–1473.

- Serebrovskaya, E. O., Edelweiss, E. F., Stremovskiy, O. A., Lukyanov, K. A., Chudakov, D. M. & Deyev, S. M. (2009). Targeting cancer cells by using an antireceptor antibody-photosensitizer fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 9221–9225.
- Serebrovskaya, E. O., Gorodnicheva, T. V, Ermakova, G. V, Solovieva, E. A., Sharonov, G. V, Zagaynova, E. V, Chudakov, D. M., Lukyanov, S., Zaraisky, A. G. & Lukyanov, K. A. (2011). Light-induced blockage of cell division with a chromatin-targeted phototoxic fluorescent protein. *The Biochemical journal* **435**, 65–71.
- Shalon, D., Smith, S. J. & Brown, P. O. (1996). A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Research* **6**, 639–645.
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A. & Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature methods* **2**, 905–909.
- Shaner, N. C., Patterson, G. H. & Davidson, M. W. (2007). Advances in fluorescent protein technology. *Journal of cell science* **120**, 4247–4260.
- Shaw, W. V. (1975). Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods in enzymology* **43**, 737–755.
- Shimomura, O. (1979). Structure of the chromophore of *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *FEBS letters* **104**, 220–222.
- Shimomura, O., Johnson, F. H. & Morise, H. (1974). Mechanism of the luminescent intramolecular reaction of aequorin. *Biochemistry* **13**, 3278–3286.
- Shimomura, O. (2009). Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* **48**, 5590–5602.
- Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology* **59**, 223–239.
- Shirmanova, M. V, Serebrovskaya, E. O., Lukyanov, K. A., Snopova, L. B., Sirotkina, M. A., Prodanetz, N. N., Bugrova, M. L., Minakova, E. A., Turchin, I. V, Kamensky V. A., Lukyanov, S. A. & Zagaynova E. V. (2013). Phototoxic effects of fluorescent protein KillerRed on tumor cells in mice. *Journal of biophotonics* **6**, 283–290.
- Shu, X., Royant, A., Lin, M. Z., Aguilera, T. A., Lev-Ram, V., Steinbach, P. A. & Tsien, R. Y. (2009). Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science* **324**, 804–807.
- Shu, X., Lev-Ram, V., Deerinck, T. J., Qi, Y., Ramko, E. B., Davidson, M. W., Jin, Y., Ellisman, M. H. & Tsien, R. Y. (2011). A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. *PLoS biology* **9**, e1001041.
- Siemering, K. R., Golbik, R., Sever, R. & Haseloff, J. (1996). Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current biology* **6**, 1653–1663.

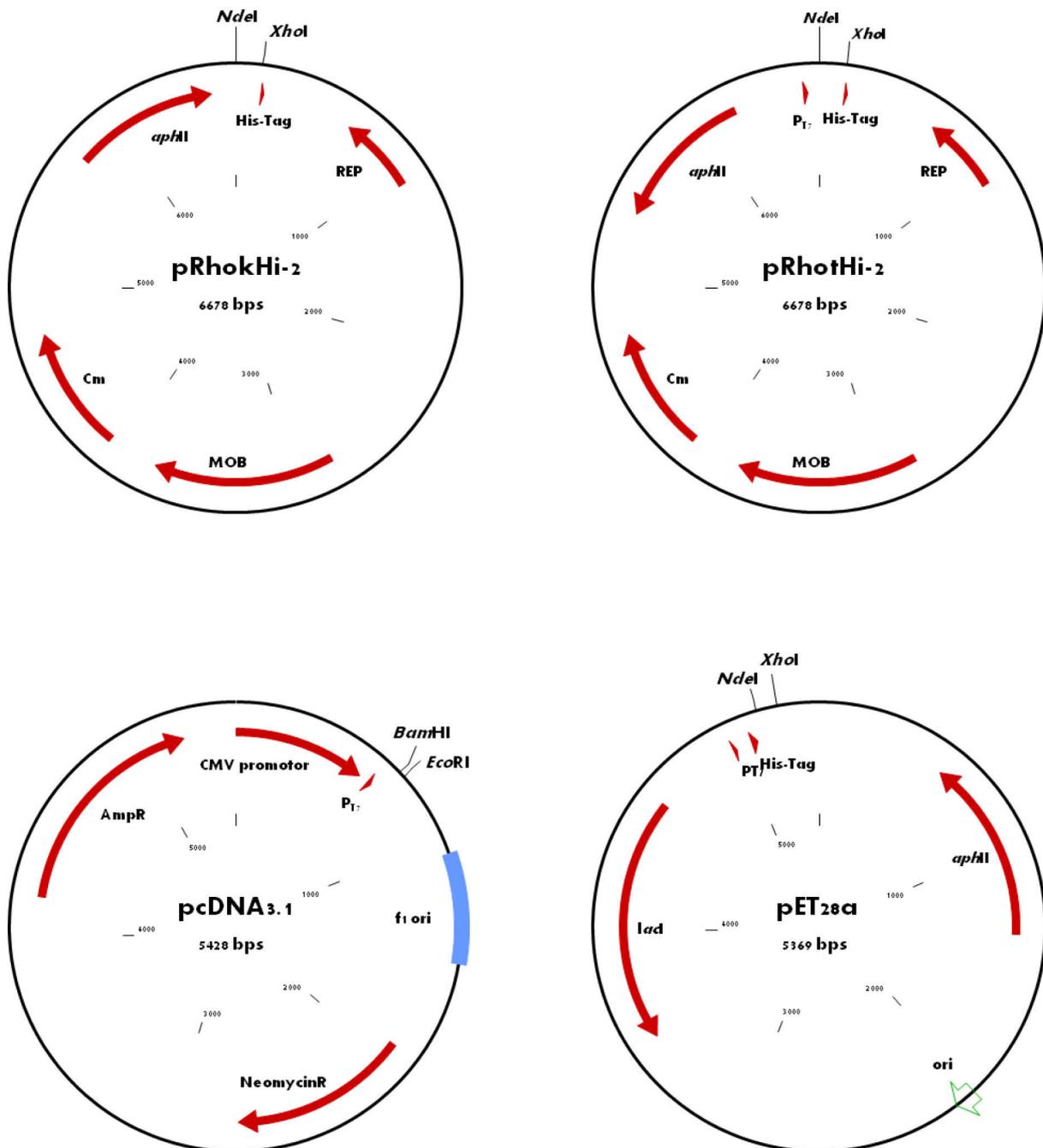
- Skene, J. & Virág, I. (1989).** Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43. *The Journal of cell biology* **108**, 613–624.
- Smith, H. O. & Birnstiel, M. L. (1976).** A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic acids research* **3**, 2387–2398.
- Storz, G. & Imlay, J. A. (1999).** Oxidative stress. *Current opinion in microbiology* **2**, 188–194.
- Stowe-Evans, E. L. & Kehoe, D. M. (2004).** Signal transduction during light-quality acclimation in cyanobacteria: a model system for understanding phytochrome-response pathways in prokaryotes. *Photochemical & photobiological sciences* **3**, 495–502.
- Strickland, D., Moffat, K. & Sosnick, T. R. (2008).** Light-activated DNA binding in a designed allosteric protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 10709–10714.
- Strickland, D., Yao, X., Gawlak, G., Rosen, M. K., Gardner, K. H. & Sosnick, T. R. (2010).** Rationally improving LOV domain-based photoswitches. *Nature methods* **7**, 623–626.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* **189**, 113–130.
- Sullivan, S., Thomson, C. E., Lamont, D. J., Jones, M. A. & Christie, J. M. (2008).** *In vivo* phosphorylation site mapping and functional characterization of *Arabidopsis* phototropin 1. *Molecular plant* **1**, 178–194.
- Surrey, T., Elowitz, M. B., Wolf, P. E., Yang, F., Nédélec, F., Shokat, K. & Leibler, S. (1998).** Chromophore-assisted light inactivation and self-organization of microtubules and motors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 4293–4298.
- Suzuki, N., Takaya, N., Hoshino, T. & Nakamura, A. (2007).** Enhancement of a sigma(B)-dependent stress response in *Bacillus subtilis* by light via YtvA photoreceptor. *The Journal of general and applied microbiology* **53**, 81–88.
- Swartz, T. E., Corchnoy, S. B., Christie, J. M., Lewis, J. W., Szundi, I., Briggs, W. R. & Bogomolni, R. A. (2001).** The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *The Journal of biological chemistry* **276**, 36493–36500.
- Swartz, T. E., Tseng, T.-S., Frederickson, M. A., Paris, G., Comerci, D. J., Rajashekar, G., Kim, J.-G., Mudgett, M. B., Splitter, G. A., Ugalde R. A., Goldbaum, F. A., Briggs, W. R. & Bogomolni R. A. (2007).** Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science* **317**, 1090–1093.
- Takemoto, K., Matsuda, T., Sakai, N., Fu, D., Noda, M., Uchiyama, S., Kotera, I., Arai, Y., Horiuchi, M. & other authors. (2013).** SuperNova, a monomeric photosensitizing fluorescent protein for chromophore-assisted light inactivation. *Scientific reports* **3**, 2629.
- Tanabe, T., Oyamada, M., Fujita, K., Dai, P., Tanaka, H. & Takamatsu, T. (2005).** Multiphoton excitation-evoked chromophore-assisted laser inactivation using green fluorescent protein. *Nature methods* **2**, 503–505.

- Tao, K. (1997).** *oxyR*-dependent induction of *Escherichia coli grx* gene expression by peroxide stress. *Journal of bacteriology* **179**, 5967–5970.
- Taylor, B. L. & Zhulin, I. B. (1999).** PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and molecular biology reviews* **63**, 479–506.
- Teh, C., Chudakov, D. M., Poon, K.-L., Mamedov, I. Z., Sek, J.-Y., Shidlovsky, K., Lukyanov, S. & Korzh, V. (2010).** Optogenetic *in vivo* cell manipulation in KillerRed-expressing zebrafish transgenics. *BMC developmental biology* **10**, 110.
- Terauchi, K., Montgomery, B. L., Grossman, A. R., Lagarias, J. C. & Kehoe, D. M. (2004).** RcaE is a complementary chromatic adaptation photoreceptor required for green and red light responsiveness. *Molecular microbiology* **51**, 567–577.
- Thoma, S. & Schobert, M. (2009).** An improved *Escherichia coli* donor strain for diparental mating. *FEMS Microbiology Letters* **294**, 127–132.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997).** The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research* **25**, 4876–4882.
- Tielker, D., Eichhof, I., Jaeger, K.-E. & Ernst, J. F. (2009).** Flavin mononucleotide-based fluorescent protein as an oxygen-independent reporter in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* **8**, 913–915.
- Tokutomi, S., Matsuoka, D. & Zikihara, K. (2008).** Molecular structure and regulation of phototropin kinase by blue light. *Biochimica et biophysica acta* **1784**, 133–142.
- Tomasch, J., Gohl, R., Bunk, B., Diez, M. S. & Wagner-Döbler, I. (2011).** Transcriptional response of the photoheterotrophic marine bacterium *Dinoroseobacter shibae* to changing light regimes. *The ISME journal* **5**, 1957–1968.
- Tsien, R. Y. (1998).** The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry* **67**, 509–544.
- Tsien, R. Y. (2009).** Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie (International ed. in english)* **48**, 5612–5626.
- Vaidya, A. T., Chen, C.-H., Dunlap, J. C., Loros, J. J. & Crane, B. R. (2011).** Structure of a light-activated LOV protein dimer that regulates transcription. *Science signaling* **4**.
- Van den Berg, P. W., Widengren, J., Hink, M. A., Rigler, R. & Visser, A. W. G. (2001).** Fluorescence correlation spectroscopy of flavins and flavoenzymes: photochemical and photophysical aspects. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* **57**, 2135–2144.
- Van der Horst, M. A. & Hellingwerf, K. J. (2004).** Photoreceptor proteins, “star actors of modern times”: a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Accounts of chemical research* **37**, 13–20.
- Van der Horst, M. A., Key, J. & Hellingwerf, K. J. (2007).** Photosensing in chemotrophic, non-phototrophic bacteria: let there be light sensing too. *Trends in microbiology* **15**, 554–562.

- Van der Steen, J. B., Nakasone, Y., Hendriks, J. & Hellingwerf, K. J. (2013).** Modeling the functioning of YtvA in the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Molecular bioSystems* **9**, 2331–2343.
- Van Rossum, T., Kengen, S. W. M. & van der Oost, J. (2013).** Reporter-based screening and selection of enzymes. *The FEBS journal* **280**, 2979–2996.
- Vasiljevic, S., Ren, J., Yao, Y., Dalton, K., Adamson, C. S. & Jones, I. M. (2006).** Green fluorescent protein as a reporter of prion protein folding. *Virology journal* **3**, 59.
- Veetil, J. V, Jin, S. & Ye, K. (2010).** A glucose sensor protein for continuous glucose monitoring. *Biosensors & bioelectronics* **26**, 1650–1655.
- Vegh, R. B., Solntsev, K. M., Kuimova, M. K., Cho, S., Liang, Y., Loo, B. L. W., Tolbert, L. M. & Bommarius, A. S. (2011).** Reactive oxygen species in photochemistry of the red fluorescent protein “Killer Red”. *Chemical communications* **47**, 4887–4889.
- Vogelstein, B. & 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**, 615–619.
- Wagner-Döbler, I. & Biebl, H. (2006).** Environmental biology of the marine *Roseobacter* lineage. *Annual review of microbiology* **60**, 255–280.
- Wagner-Döbler, I., Ballhausen, B., Berger, M., Brinkhoff, T., Buchholz, I., Bunk, B., Cypionka, H., Daniel, R., Drepper, T., Gerds, G. Hahnke, S., Han, C., Jahn, D., Kalhoefer D., Kiss, H., Klenk, H.-P., Kyrpides, N., Liebl, W., Liesegang, H., Meincke, L., Pati, A., Petersen, J., Piekarski, T., Pommerenke, C., Pradella, S., Pukall, R., Rabus, R., Stackebrandt, E., Thole, S., Thompson, L., Tielen, P., Tomasch, J., von Jan, M., Wanphrut, N., Wichels, A., Zech, H. & Simon, M. (2010).** The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae*: a hitchhiker’s guide to life in the sea. *The ISME journal* **4**, 61–77.
- Waldeck, W., Mueller, G., Wiessler, M., Brom, M., Tóth, K. & Braun, K. (2009).** Autofluorescent proteins as photosensitizer in eukaryotes. *International journal of medical sciences* **6**, 365–373.
- Waldeck, W., Mueller, G., Wiessler, M., Tóth, K. & Braun, K. (2011).** Positioning effects of KillerRed inside of cells correlate with DNA strand breaks after activation with visible light. *International journal of medical sciences* **8**, 97–105.
- Waldeck, W., Heidenreich, E., Mueller, G., Wiessler, M., Tóth, K. & Braun, K. (2012).** ROS-mediated killing efficiency with visible light of bacteria carrying different red fluorochrome proteins. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* **109**, 28–33.
- Walter, J., Hausmann, S., Drepper, T., Puls, M., Eggert, T. & Dihn , M. (2012).** Flavin Mononucleotide-Based Fluorescent Proteins Function in Mammalian Cells without Oxygen Requirement. *PLoS one* **7**, e43921.
- Wang, Y., Meng, F. & Sachs, F. (2011).** Genetically encoded force sensors for measuring mechanical forces in proteins. *Communicative & integrative biology* **4**, 385–390.
- Ward, W. W., Prentice, H. J., Roth, A. F., Cody, C. W. & Reeves, S. C. (1982).** Spectral perturbations of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Photochemistry and Photobiology* **35**, 803–808.

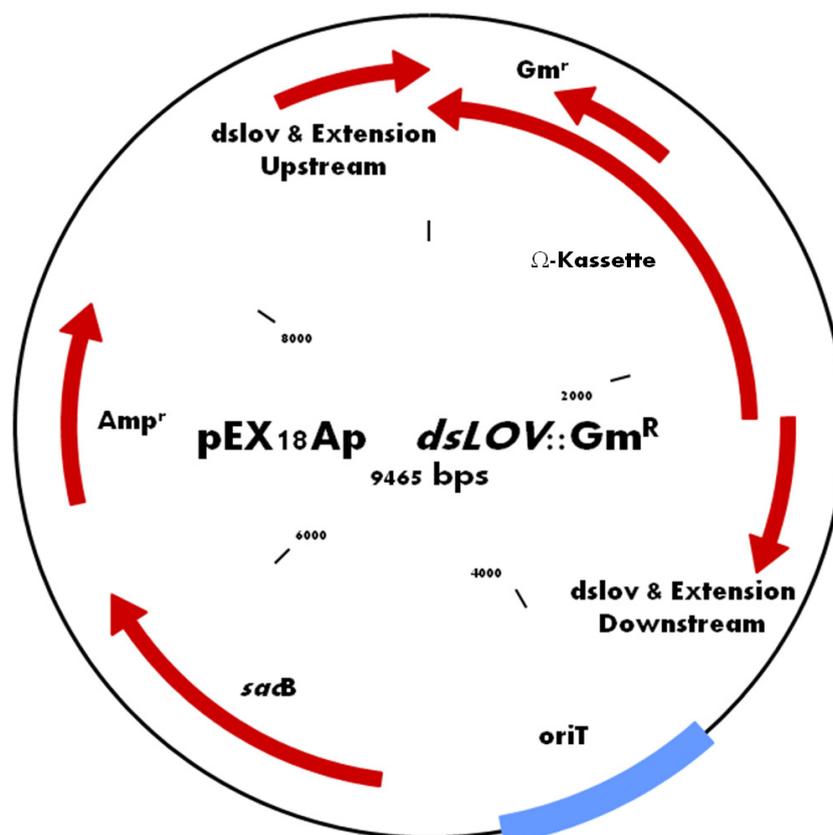
- Webb, C. D., Decatur, A., Teleman, A. & Losick, R. (1995).** Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **177**, 5906–5911.
- Wendisch, V. F., Zimmer, D. P., Khodursky, A., Peter, B., Cozzarelli, N. & Kustu, S. (2001).** Isolation of *Escherichia coli* mRNA and comparison of expression using mRNA and total RNA on DNA microarrays. *Analytical biochemistry* **290**, 205–213.
- Wilkinson, F., Helman, W. P. & Ross, A. B. (1995).** Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **24**, 663.
- Wilson, K. J. & Juan, P. M. (1989).** Protein and peptide purification. In *Protein Sequencing: a Practical Approach*, pp. 1–41. Edited by J. B. C. Findlay & M. J. Geisow. Oxford: Oxford University Press.
- Wu, J. & Bauer, C. E. (2008).** RegB/RegA, a global redox-responding two-component system. *Advances in experimental medicine and biology* **631**, 131–148.
- Yang, F., Moss, L. G. & Phillips, G. N. (1996).** The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature biotechnology* **14**, 1246–1251.
- Yurkov, V. & Beatty, J. T. (1998).** Isolation of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria from black smoker plume waters of the Juan de Fuca ridge in the Pacific Ocean. *Applied and environmental microbiology* **64**, 337–341.
- Yurkov, V. V. & van Gemerden, H. (1993).** Impact of light/dark regimen on growth rate, biomass formation and bacteriochlorophyll synthesis in *Erythromicrobium hydrolyticum*. *Archives of Microbiology* **159**, 84–89.
- Zhang, C., Wei, Z.-H. & Ye, B.-C. (2013a).** Quantitative monitoring of 2-oxoglutarate in *Escherichia coli* cells by a fluorescence resonance energy transfer-based biosensor. *Applied microbiology and biotechnology* **97**, 8307–8316.
- Zhang, L.-C., Risoul, V., Latifi, A., Christie, J. M. & Zhang, C.-C. (2013b).** Exploring the size limit of protein diffusion through the periplasm in cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 using the 13 kDa iLOV fluorescent protein. *Research in microbiology* **164**, 710–717.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L. J., Smulski, D. R., LaRossa, R. A. & Storz, G. (2001).** DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *Journal of bacteriology* **183**, 4562–4570.
- Zoltowski, B. D. & Crane, B. R. (2008).** Light activation of the LOV protein Vivid generates a rapidly exchanging dimer. *Biochemistry* **47**, 7012–7019.
- Zoltowski, B. D., Schwerdtfeger, C., Widom, J., Loros, J. J., Bilwes, A. M., Dunlap, J. C. & Crane, B. R. (2007).** Conformational switching in the fungal light sensor Vivid. *Science* **316**, 1054–1057.
- Zoltowski, B. D., Vaccaro, B. & Crane, B. R. (2009).** Mechanism-based tuning of a LOV domain photoreceptor. *Nature chemical biology* **5**, 827–834.
- Zuber, M., Strittmatter, S. & Fishman, M. (1989).** A membrane-targeting signal in the amino terminus of the neuronal protein GAP-43. *Nature* **6240**, 345–348.

## 8 Anhang



**Abbildung 29: Übersicht der verwendeten Expressionsplasmide**

In dieser Arbeit wurden die Expressionsvektoren pRhokHi-2, pRhotHi-2 und pET28a zur Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli* verwendet. Für die Expression von LOV-FPs in Säugerzellen wurde der pcDNA3.1 Expressionsvektor genutzt. Eine Übersicht der charakteristischen Merkmale der hier gezeigten Plasmide ist in Tabelle 4 dargestellt.



**Abbildung 30: Suicide-Vektor zur Erzeugung einer *dslov* Deletionsmutanten von *Dinoroseobacter shibae***  
 Der pEX18Ap Vektor kann aufgrund seines *Origin of Replication* (Ori) nur in *E. coli* repliziert werden, wodurch er nach dem konjugativen Transfer in *D. shibae* nicht stabil ist. Zur funktionellen Inaktivierung des *dslov* in *D. shibae* wurden DNA-Bereich  $\pm 600$  Bp vom Zielgen in den *Suicide*-Vektor kloniert. Durch Insertion der  $\Omega$ -Kassette, die zur Selektion eine  $Gm^r$  trägt, in das Zielgen wird dieses desfunktionalisiert. Die Kreuzung der Vektor- mit der chromosomalen DNA erfolgt durch homologe Rekombination.

## Aminosäuresequenzen der verwendeten Proteine

### >DsFbFP

MRRHYRDLIRNTPMPDTPQDIADLRALLDEDEAEMSVMVFSQDPNPMIYVSDAFLVQTGYTLEEVLGRNARFL  
QGPDTNPHAVEAIRQGLKAETRFTIDILNYRKDGSAFVNRLRIRPIYDPEGNLMFFAGAQNVP-

### >DsFbFP M49I

MRRHYRDLIRNTPMPDTPQDIADLRALLDEDEAEMSVMVFSQDPNPIIYVSDAFLVQTGYTLEEVLGRNARFLQ  
GPDNTNPHAVEAIRQGLKAETRFTIDILNYRKDGSAFVNRLRIRPIYDPEGNLMFFAGAQNVP-

### >DsLOV

MRRHYRDLIRNTPMPDTPQDIADLRALLDEDEAEMSVMVFSQDPNPMIYVSDAFLVQTGYTLEEVLGRNCRFL  
QGPDTNPHAVEAIRQGLKAETRFTIDILNYRKDGSAFVNRLRIRPIYDPEGNLMFFAGAQNVP-

### >DsLOV M49I

MRRHYRDLIRNTPMPDTPQDIADLRALLDEDEAEMSVMVFSQDPNPIIYVSDAFLVQTGYTLEEVLGRNCRFLQ  
GPDNTNPHAVEAIRQGLKAETRFTIDILNYRKDGSAFVNRLRIRPIYDPEGNLMFFAGAQNVP-

### >DsLOV M49S

MRRHYRDLIRNTPMPDTPQDIADLRALLDEDEAEMSVMVFSQDPNPSIYVSDAFLVQTGYTLEEVLGRNCRFLQ  
GPDNTNPHAVEAIRQGLKAETRFTIDILNYRKDGSAFVNRLRIRPIYDPEGNLMFFAGAQNVP-

### >EcFbFP

MASFQSGIPGQLEVIKALDHVRVGVVITDPALEDNPIVYVNQGFVQMTGYETEEILGKNARFLQGKHTDPAEVD  
NIRTALQNKEPVTVQIQNYKKGDTMFWNELNIDPMEIEDKTYFVGIQNDITKQKEYEKL-

### >mem-DsFbFP

MLCCMRRTKQVEKNDEDQKIHMRHYRDLIRNTPMPDTPQDIADLRALLDEDEAEMSVMVFSQDPNPMIYVS  
DAFLVQTGYTLEEVLGRNARFLQGPDTNPHAVEAIRQGLKAETRFTIDILNYRKDGSAFVNRLRIRPIYDPEGNLMFF  
AGAQNVP-

### >mem-EcFbFP

MLCCMRRTKQVEKNDEDQKIHMASFQSGIPGQLEVIKALDHVRVGVVITDPALEDNPIVYVNQGFVQMTGYET  
EEILGKNARFLQGKHTDPAEVDNIRTALQNKEPVTVQIQNYKKGDTMFWNELNIDPMEIEDKTYFVGIQNDITKQ  
EYEKL-

### >mem-eGFP

MLCCMRRTKQVEKNDEDQKIVSKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGLTLKFICTTGKLPVP  
WPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKE  
DGNILGHKLEYNYNHNYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS  
KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK-

### >mem-Pp1FbFP

MINAQLLQSMVDASNDGIVVAEKEGDDTILYVNAAFEYLTGYSRDEILYQDARFLQGDDRDQLGRARIRKAMAEG  
RPCREVLNRYRKDGSAFWNELSITPVKSDFDQRTYFIGIQKDVSQVELERELARPKPDERA-

**>mem-Pp2FbFP**

MLCCMRRTKQVEKNDEDQKIINAKLLQLMVEHSNDGIVVAEQEGNESILYVNPAPERLTGYCADDILYQDARFLQ  
GEDHDQPGIAIIREAIREGRPCCQVLRNRYRKDGSLFWNELSITPVHNEADQLTYYIGIQRDVTAQVFAEERVRELEAE  
VAELRRQQGQAKH-

**>miniSOG**

MEKSFVITDPRLPDNPIIFASDGFLELTEYSREEILGRNGRFLQGPETDQATVQKIRDAIRDQREITVQLINYTKSGKKF  
WLLHLQPMRDQKGELQYFIGVQLDG-

**>phiLOV2.1**

MEKSFVITDPRLPDYPIIFASDGFLELTEYSREEIMGRNARFLQGPETDQATVQKIRDAIRDQRETTVQLINYTKSGKK  
FWLLHLQPVDRKGGGLQYFIGVQLVGS DH-

**>Pp1FbFP**

MINAQLLQSMVDASNDGIVVAEKEGDDTILYVNAAFEYLTGYSRDEILYQDARFLQGDDRDQLGRARIRKAMAEG  
RPCREVLNRYRKDGSAFWNELSITPVKSDFDQRTYFIGIQKDVSQRQVELERELAELRARP KPDERA-

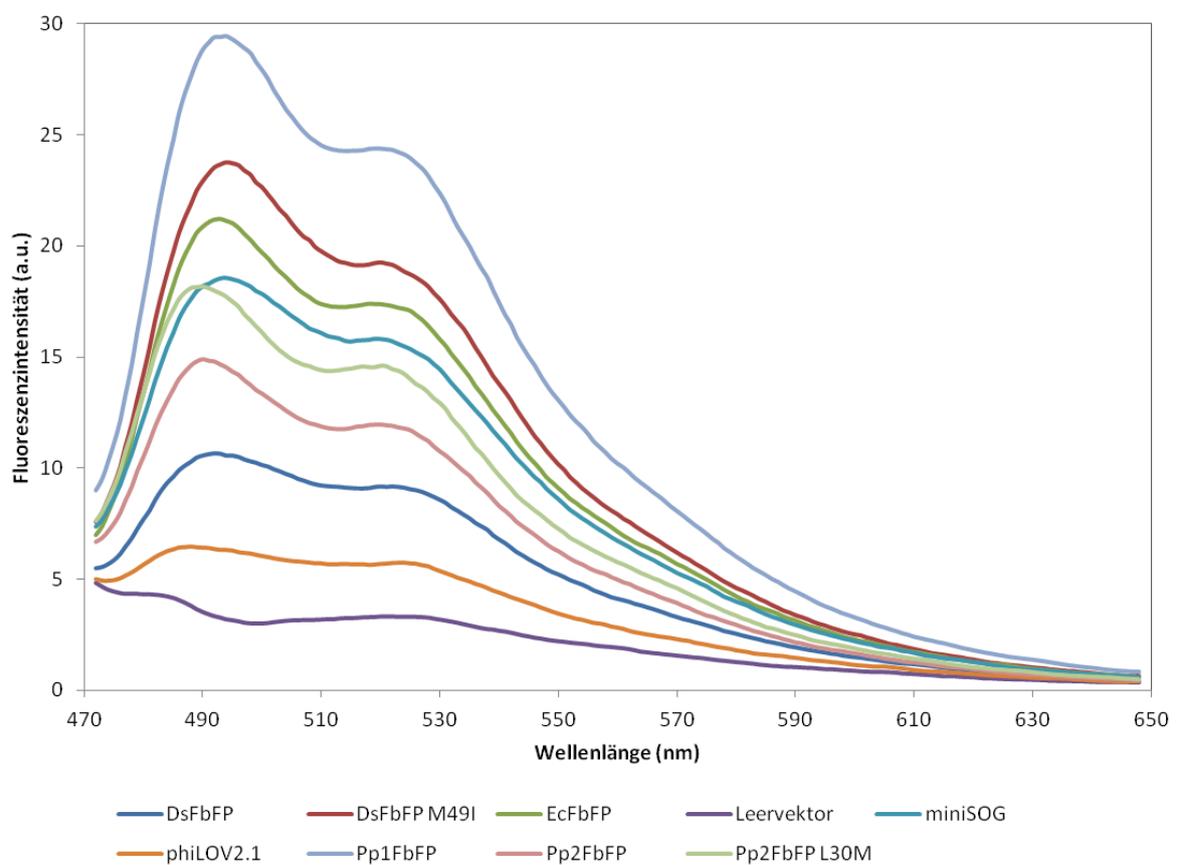
**>Pp2FbFP**

MINAKLLQLMVEHSNDGIVVAEQEGNESILYVNPAPERLTGYCADDILYQDARFLQGEDHDQPGIAIIREAIREGRP  
CCQVLRNRYRKDGSLFWNELSITPVHNEADQLTYYIGIQRDVTAQVFAEERVRELEAEVAELRRQQGQAKH-

**>Pp2FbFP L30M**

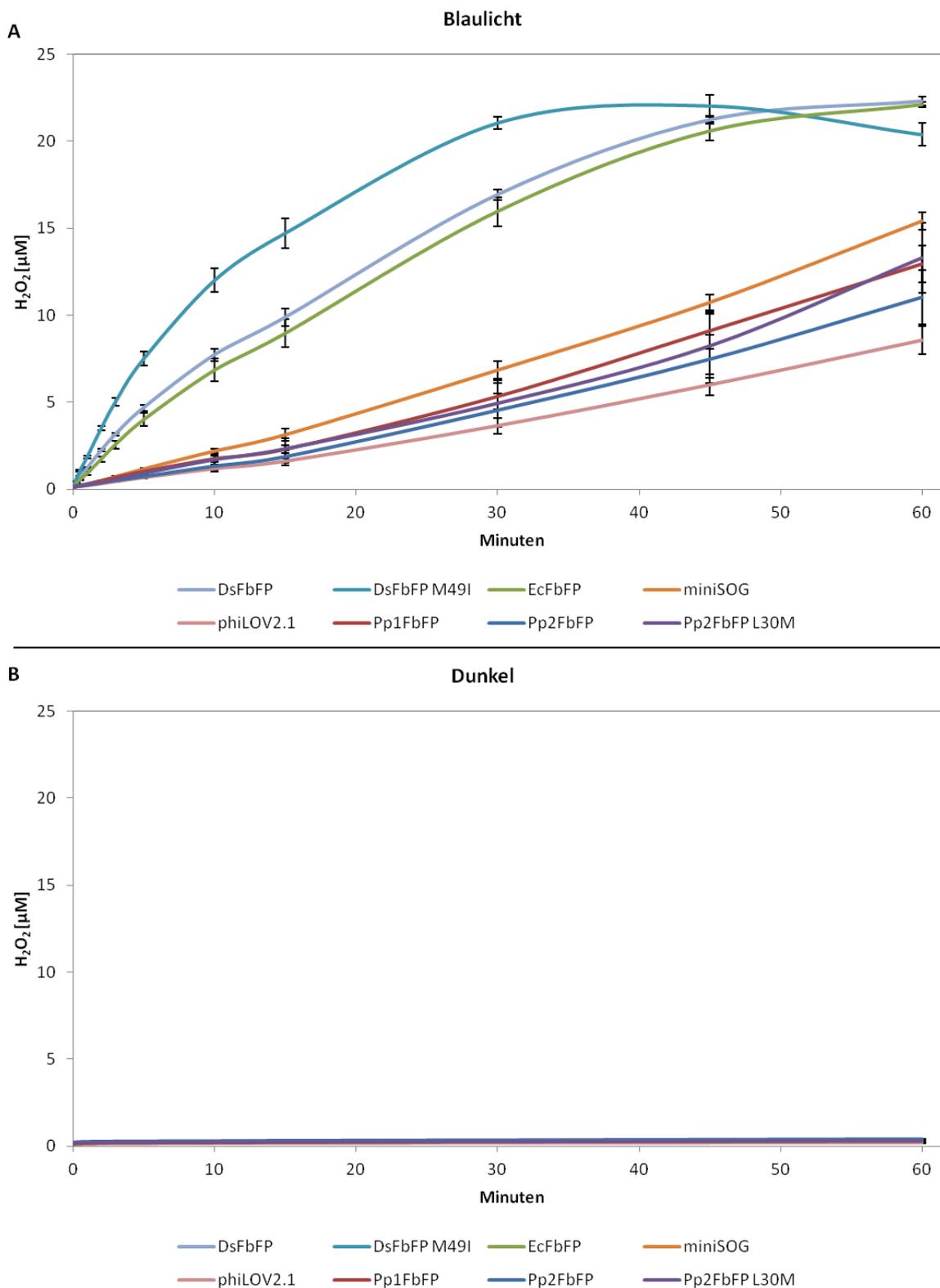
MINAKLLQLMVEHSNDGIVVAEQEGNESIMYVNPAPERLTGYCADDILYQDARFLQGEDHDQPGIAIIREAIREGR  
PCCQVLRNRYRKDGSLFWNELSITPVHNEADQLTYYIGIQRDVTAQVFAEERVRELEAEVAELRRQQGQAKH-



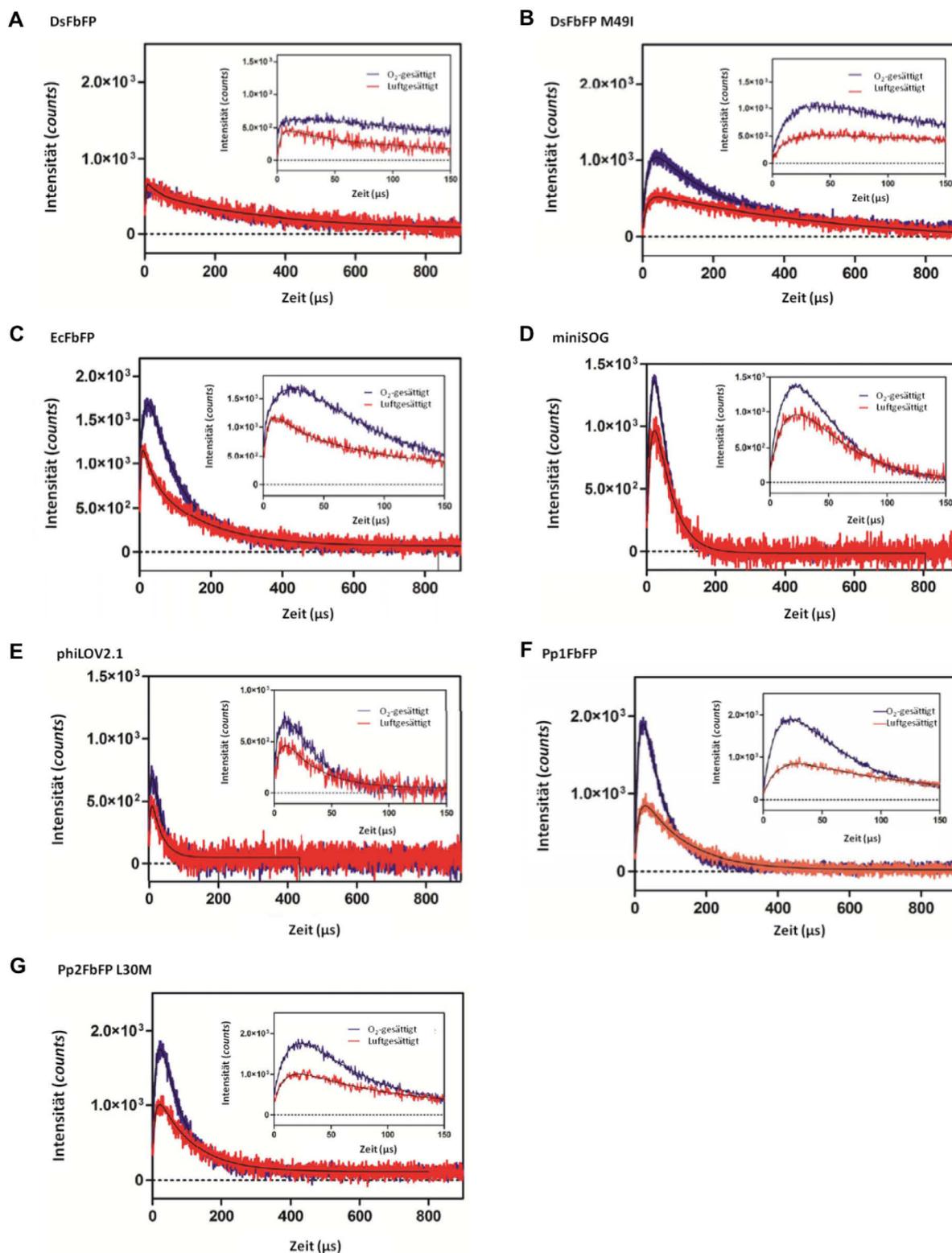


**Abbildung 32: *In vivo* Fluoreszenzspektren der  $P_{T7}$ -abhängigen LOV-FP-Expression in *E. coli* BL21(DE3)**

*E. coli* BL21(DE3) Bakterienkulturen, die unter  $P_{T7}$ -Kontrolle *lov-fp*-Gene exprimierten, wurden drei Stunden nach Induktion der Expression durch die Zugabe von 0,4 mM IPTG Zellproben entsprechend einer  $o.D._{580}$  von 0,5 entnommen, die Zellen pelletiert und in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Quarzglasküvette überführt und die *in vivo* Fluoreszenzintensitäten mit Hilfe eines spektralen Fluoreszenzphotometers detektiert, wobei die Anregung der FbFPs bei 450 nm erfolgte.

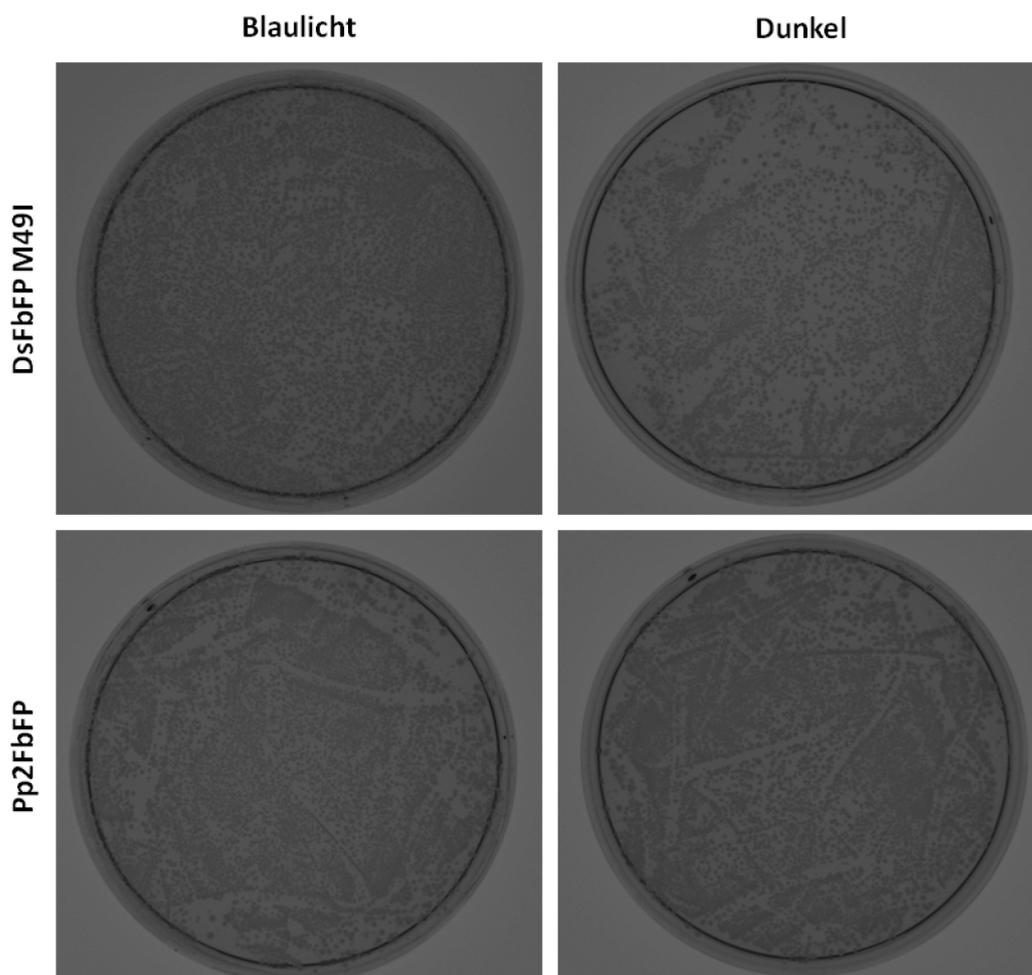


**Abbildung 33: Ergebnisse der *in vitro* Quantifizierung des von LOV-FPs generierten Wasserstoffperoxids**  
 Gereinigte LOV-FPs wurden in Amplex Red-Reaktionspuffer auf eine o.D.<sub>450</sub> von 0,1 eingestellt und mit Blaulicht belichtet. Die Zunahme der Wasserstoffperoxidkonzentration, als Konsequenz der Superoxidproduktion der FbFPs, wurde indirekt über die rötliche Fluoreszenz des Reaktionsprodukts Resorufin bestimmt. **(A)** belichtete Probe, **(B)** unbelichtete Probe.



**Abbildung 34: Nachweis der von LOV-FPs ausgelöste Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ )-Produktion**

Zeitaufgelöste  $^1\text{O}_2$ -Phosphoreszenz bei 1275 nm von DsFbFP (A), DsFbFP M49I (B), EcFbFP (C), miniSOG (D), phiLOV2.1 (E), Pp1FbFP (F) und Pp2FbFP L30M (G) in  $\text{O}_2$ -gesättigtem (Blaue Kurve) bzw. luftgesättigtem (Rote Kurve) dPBS-Puffer nach Anregung durch einen Laserimpuls bei 355 nm.



**Abbildung 35: *E. coli* Festmedienplatten zur Kontrolle auf Lebensfähigkeit nach der Blaulichtbestrahlung**

Den (un-) belichteten *E. coli* BL21(DE3) Testkulturen wurden Zellproben entsprechend einer o.D.<sub>580</sub> von 0,001 entnommen und in 100 µl LB-Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf LB-Festmediumplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C in Dunkelheit bei gleichzeitigem Selektionsdruck (Kan) inkubiert. Am Folgetag wurde die Lebensfähigkeit der Testkulturen anhand der bewachsenen Festmedienplatten fotografisch dokumentiert.

---

## LEBENS LAUF UND AUSBILDUNGSGANG

### Stephan Endres

Diplom-Biologe

\*13.11.1981 in Düsseldorf, Nordrhein-Westfalen

Familienstand – verheiratet – keine Kinder

### SCHULAU SBILDUNG

1988 - 1992

Gemeinschaftsgrundschule Vennhauser Allee, Düsseldorf

1992 - 2001

Städt. Gymnasium Gerresheim, Düsseldorf

Abschluss Allgemeine Hochschulreife - Abitur

### WEHRDIENST

07/2001 – 03/2002

Grundwehrdienst als Stabsdienstsoldat und Militärkraftfahrer im Panzergrenadierbataillon 342 in Koblenz

### HOCHSCHULBI L DUNG

10/2002 – 09/2004

Beginn des Studiums der Informatik an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

10/2004

Beginn des Studiums der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

05/2010

Abschluss des Diplomstudiengangs Biologie

Thema der Diplomarbeit:

„Lokalisierung und Anwendung von Light-Oxygen-Voltage (LOV) Proteinen in Bakterien“

seit 07/2010

Promotionsstudium am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich.

Thema der Dissertation:

„Bakterielle LOV-Blaulichtrezeptoren und deren Verwendung als Fluoreszenzreporter und Photosensibilisatoren“

seit 02/2013

Stipendium der NRW-Forschungsschule BioStruct

---

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

Düsseldorf, den 25.09.2013

Stephan Endres