

Untersuchungen zur Redoxregulation der
Photosynthesemembranexpression in dem
fakultativ phototrophen Bakterium
Rhodospirillum rubrum

Dissertation

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

von Dipl.-Biol. Anke Berit Carius
geb. am 26.08.1982 in Marburg (Lahn)

Gutachter:
Prof. Dr. Wolfgang Marwan
Prof. Dr. Jörg Soppa

eingereicht am: 24.06.2012

verteidigt am: 24.10.2012

Für meine Familie

Der Mensch muss sich stets auf neue Überraschungen gefasst machen...

(Max Planck)

Danke

Ohne Unterstützung wäre diese Arbeit nicht entstanden. Deshalb danke ich herzlich:

- ♡ Den Gutachtern für die faire und kompetente Beurteilung und die viele Arbeit die damit zusammenhängt
- ♡ Dem Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme für den tollen Arbeitsplatz
- ♡ Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Finanzierung im Rahmen der ForSys-Initiative
- ♡ Dr. Hartmut Grammel für umfassende Betreuung und Mentoring
- ♡ Christiane Nüsslein-Volhard und der CNV-Stiftung für das Stipendium
- ♡ Meinen Kollegen für die tolle Zusammenarbeit, besonders Lisa Carius, Ruxandra Rehner, Marius Henkel, Ivan Ivanov, Marcus Hoffmann, Erdmann Rapp, Markus Ikert, Christiane Rudolf, Andrea Focke und Oliver Hädicke
- ♡ Meinen Freunden und meiner Familie für Unterstützung in allen Lebenslagen besonders Stefan, Emmy, Lisa, Jannis, Karin, Andy, Stephanie, Katrin, Benjamin, Olli, Brille, Susann, Urmel, Juliane und allen anderen
- ♡ Meinen Eltern Tine und Reinhard für alles

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Abstract | 1 |
| 2 | Einleitung | 3 |
| 2.1 | Ziele dieser Arbeit | 3 |
| 2.2 | <i>Rhodospirillum rubrum</i> | 4 |
| 2.3 | Redoxpools der Zelle | 6 |
| 2.3.1 | NAD/NADH und NADP/NADPH Pool | 6 |
| 2.3.2 | Der Chinonpool | 7 |
| 2.3.3 | Der Glutathionpool | 8 |
| 2.4 | Regulation der Photosynthesegene in anoxygenen Photosynthesebakterien | 10 |
| 2.4.1 | Das RegB/RegA Zweikomponentensystem | 10 |
| 2.4.2 | PpsR | 11 |
| 2.4.3 | Weitere Regulatoren der Photosynthesegene | 16 |
| 3 | Material und Methoden | 17 |
| 3.1 | Wachstums- und Kultivierungsbedingungen | 17 |
| 3.1.1 | Minimalmedien für die Anzucht von <i>R. rubrum</i> | 18 |
| 3.1.2 | Wachstumsversuche mit Manipulation des intrazellulären Redox- potentials | 19 |
| 3.1.3 | Messung der optischen Dichte | 20 |
| 3.1.4 | Berechnung der Wachstumsraten und der PM-Syntheseraten | 21 |
| 3.1.5 | Glutathionbestimmung | 22 |
| 3.1.6 | DTNB | 22 |
| 3.1.7 | Berechnung von Redoxpotentialen mit der Nernstgleichung | 25 |
| 3.2 | Molekularbiologischer Arbeitsteil | 26 |
| 3.2.1 | Isolation von DNA | 26 |
| 3.2.2 | Polymerasekettenreaktion (PCR) | 27 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.2.3 | Agarose-Gelelektrophorese | 28 |
| 3.2.4 | Restriktionsverdau von DNA | 28 |
| 3.2.5 | Ligation von DNA | 29 |
| 3.2.6 | Genetische Veränderung von <i>E. coli</i> durch Transformation | 29 |
| 3.2.7 | Liste der verwendeten Primer, Vektoren und Stämme | 31 |
| 3.2.8 | Biparentale Konjugation: <i>R. rubrum</i> und <i>E. coli</i> S17.1 | 33 |
| 3.2.9 | Klonierungsschema für die Erstellung von <i>R. rubrum</i> PpsR ⁻ | 34 |
| 3.3 | Proteinbiochemischer Arbeitsteil | 35 |
| 3.3.1 | Zellaufschluss | 35 |
| 3.3.2 | Heterologe Expression von PpsR in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | 35 |
| 3.3.3 | SDS-PAGE und native PAGE | 37 |
| 3.3.4 | Proteinmengenbestimmungen | 42 |
| 3.4 | Entwicklung einer Ligandenaffinitätschromatographie mit Ubichinon als Ligand | 42 |
| 3.4.1 | Oxidation der Isoprenseitenkette von Ubichinon 10 | 44 |
| 3.4.2 | Probenvorbereitung für die Ligandenaffinitätschromatographie | 46 |
| 3.4.3 | Durchführung der Ligandenaffinitätschromatographie | 47 |
| 3.4.4 | Analyse der Ergebnisse der Ligandenaffinitätschromatographie | 49 |
| 4 | Ergebnisse | 50 |
| 4.1 | Ergebnisse der Wachstumsversuche | 50 |
| 4.1.1 | Zusatz von DTT zu den Kultivierungen | 51 |
| 4.1.2 | Zusatz von reduziertem Glutathion (GSH) zu den Kultivierungen | 55 |
| 4.1.3 | Zusatz von oxidiertem Glutathion (GSSG) zu den Kultivierungen | 58 |
| 4.1.4 | Zusatz von Diethylmaleat (DEM) zu den Kultivierungen | 59 |
| 4.1.5 | Zusatz von Diamid, H ₂ O ₂ oder DMSO zu den Kultivierungen | 61 |
| 4.1.6 | Zusatz von Glycin, Cystein und Glutamat zu den Kultivierungen | 61 |
| 4.1.7 | Zugabe von DTT und GSH zu <i>R. rubrum</i> SN20 | 61 |
| 4.2 | Glutathionaufnahme in <i>R. rubrum</i> | 65 |
| 4.3 | Heterologe Expression von PpsR aus <i>R. rubrum</i> | 70 |
| 4.3.1 | Experimente mit gereinigtem PpsR: Bindung von DNA an PpsR | 71 |
| 4.3.2 | Redoxtitration mit PpsR aus <i>R. rubrum</i> | 71 |
| 4.4 | Genetische Veränderungen in <i>R. rubrum</i> | 73 |
| 4.4.1 | Die PpsR-Deletionsmutante <i>R. rubrum</i> PpsR ⁻ | 73 |
| 4.4.2 | Überexpression von PpsR in <i>R. rubrum</i> auf pRK404 | 75 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.5 | Ergebnisse der Ligandenaffinitätschromatographie mit oxidiertem Ubichinon als Liganden | 77 |
| 4.5.1 | Herstellung des Säulenmaterials | 77 |
| 4.5.2 | Verlauf der Ligandenaffinitätschromatographie | 81 |
| 4.5.3 | Ergebnis der Ligandenaffinitätschromatographie | 81 |
| 5 | Diskussion | 83 |
| 5.1 | Wachstumsversuche: <i>R. rubrum</i> mit redoxaktiven Medienzusätzen | 83 |
| 5.1.1 | Zusatz von DTT zu den Kultivierungen | 83 |
| 5.1.2 | Zusatz von GSH, DEM oder Diamid zu den Kultivierungen | 85 |
| 5.1.3 | Zusatz von GSSG zu den Kultivierungen | 87 |
| 5.1.4 | Zusatz von DMSO zu den Kultivierungen | 87 |
| 5.2 | Glutathionaufnahme in <i>R. rubrum</i> | 87 |
| 5.2.1 | Auswirkungen der intrazellulären GSH-Akkumulation | 89 |
| 5.2.2 | Ausscheidung von GSH in das Kulturmedium | 91 |
| 5.2.3 | Aerobe Kultivierung mit GSH-Zugabe | 92 |
| 5.3 | PpsR aus <i>R. rubrum</i> | 94 |
| 5.3.1 | Ein Aktivator-Protein? | 94 |
| 5.4 | Ligandenaffinitätschromatographie mit Ubichinon als Ligand | 101 |
| 6 | Zusammenfassung | 105 |
| 7 | Ausblick | 107 |
| 8 | Anhang | 108 |
| 8.1 | pBLAST-Ergebnisse zu relevanten Proteinen in <i>R. rubrum</i> | 108 |
| 8.2 | Abkürzungsverzeichnis | 110 |
| 8.3 | Chemikalien- und Geräteliste | 112 |
| 8.4 | Antibiotika | 113 |
| 8.5 | Klonierungen | 114 |
| 8.6 | Geräte und Verbrauchsmaterialien | 114 |
| | Literaturverzeichnis | 115 |
| | Abbildungsverzeichnis | 127 |
| | Tabellenverzeichnis | 130 |

Kapitel 1

Abstract

In this work, I investigated the regulation of photosynthetic membrane (PM) synthesis in the nonsulfur purple bacterium *Rhodospirillum rubrum*. For that purpose, I performed growth experiments with the addition of chemical substances that can alter the intracellular redox potential. *R. rubrum* reacted to quantitative changes in the glutathione (GSH) pool with alteration in PM synthesis. A rise in intracellular reduced GSH was established by active uptake of GSH from the culture medium and influenced the PM levels positively, whereas a depletion of GSH by diethylmaleate or diamide lowered PM synthesis drastically. The GSH uptake rate was 0.049 mM/(g*h). The larger amount of intracellular GSH did not cause a reduction of the intracellular redox potential. This was kept at \sim -220 mV by oxidation of small amounts of GSH to GSSG, as shown by intracellular GSH measurements. The electrons that were additionally available from this reaction were discharged via the electron transport chain and caused a higher reduction level in the ubiquinone pool.

Dithiothreitol (DTT) caused a decrease in PM synthesis, in spite of the fact that it is a strong reducing agent. This effect might have arisen from the switching of reductive stress to oxidative stress by elevation of respiration rates and the accompanying creation of reactive oxygen species. Accordingly, *R. rubrum* cells in aerobic cultivations did not tolerate DTT and showed a decrease of optical density after the addition of more than 0.25 mM. The addition of GSH did probably not cause oxidative stress, because the transfer of electrons to the electron transport chain is in this case catalyzed by enzymes and therewith occurs with controlled rates. Alternative electron acceptors, such as dimethylsulfoxide (DMSO), influenced PM synthesis in a negative way, although they should not cause changes in the GSH/GSSG amounts.

PpsR proteins are widely known as master regulators of photosynthesis genes and have been extensively studied in other nonsulfur purple bacteria. The results from heterologous expression, overexpression and deletion of the *ppsR*- gene from *R. rubrum* showed consistently, that PpsR activated PM synthesis. The PpsR protein from heterologous expression showed oxidized bands on a native PAGE at redox potentials higher than -150 mV, which would be significantly higher than the cellular redox potential. This indicates a direct oxidation of PpsR by oxygen or other oxidizing substances, similar to CrtJ from *Rhodobacter capsulatus*.

The ligand affinity chromatography with ubiquinone as a ligand did not produce unambiguous results. However, many results hint on the existence of at least one additional regulator for the photosynthetic genes in *R. rubrum*. This regulator would probably integrate signals from the redox state of the ubiquinone pool, because this signal seems to play a significant role in PM synthesis. This regulator is still unknown and could not be identified, although there were specific bands from the ligand affinity chromatography on the SDS-PAGEs.

The *ppsR*- deletion mutant of *R. rubrum* could not synthesize any PM while in the *ppsR*-overexpression mutant PM-expression was only slightly enhanced. This suggests, that PM synthesis is controlled by at least one additional regulator, which is probably a repressor. This regulator is so far unknown, as is a sensory protein detecting the ubiquinone redox state, so it could be speculated that this was about an interplaying sensor system.

In summary, this work draws a new scheme of PM regulation in *R. rubrum*. It includes an activating PpsR protein and at least one protein for the detection of the redox state in the ubiquinone pool, with a response regulator that possibly acts as a repressor. Such a combination of regulators has so far not been described for purple nonsulfur bacteria and represents therefore a great potential for new and interesting research.

Kapitel 2

Einleitung

2.1 Ziele dieser Arbeit

Diese Arbeit soll dazu beitragen, die Mechanismen der Redoxregulation der Photosynthesemembran (PM)-Produktion in dem fakultativ phototrophen Bakterium *Rhodospirillum rubrum* besser zu verstehen. Dazu soll zunächst das Verhalten der Redoxregulation genauer untersucht werden. Nach dem Beispiel von Malpica et al. [2004] werden Substanzen zu Kultivierungen von *R. rubrum* zugegeben, die das intra- und extrazelluläre Redoxpotential beeinflussen können. Von diesen Versuchen soll abgeleitet werden, welche Redoxpools in die Signaltransduktion involviert sind.

Ein in anderen Nichtschwefel-Purpurbakterien (NSPB) gut charakterisierter Regulator, PpsR, wurde im Genom von *R. rubrum* bereits annotiert. Experimentelle Daten liegen zu diesem Protein aber noch nicht vor. Durch Anwendung verschiedener molekularbiologischer und proteinbiochemischer Methoden soll der PpsR-Regulator aus *R. rubrum* untersucht werden. Ein Homolog zu dem ebenfalls in NSPB weit verbreiteten Regulationssystem RegB/RegA (PrrB/PrrA) konnte in *R. rubrum* bisher nicht annotiert werden [Hunter 2009]. Ob es in *R. rubrum* ein System gibt, das den Redoxzustand des Chinonpools detektieren kann, ist daher unbekannt.

Zu Beginn dieser Arbeit entstand die Idee, dass sich eine unbekannte chinonbindende Histidinkinase über eine Ligandenaffinitätschromatographie screenen lassen könnte. Der Ligand sollte ein Ubichinon sein, denn RegB bindet Ubichinon an einer regulatorischen Bindungsstelle [Wu and Bauer 2010]. Zunächst muss ein geeignetes Säulenmaterial entwickelt werden, das dann mit bekannten Ubichinon-bindenden Proteinen getestet werden kann. Dann soll aus *R. rubrum* eine analoge Histidinkinase gescreent und mit Hilfe von

modernen MALDI-TOF oder LC-MS/MS Methoden identifiziert werden.

So nähert sich diese Arbeit auf wachstumsphysiologischer und proteinbiochemischer Ebene der Problematik, dass über die genaue Regulation der PM-Expression in *R. rubrum* praktisch nichts bekannt ist und die Unterschiede zu den verwandten Organismen wie *Rhodobacter capsulatus* und *Rhodobacter sphaeroides* zu groß sind um Bekanntes von einem auf den anderen Organismus zu übertragen.

2.2 *Rhodospirillum rubrum*

NSPB leben in verschiedenen Gewässern, bevorzugt in der anoxischen Zone. Sie verfügen über vielfältige Möglichkeiten Stoffwechsel zu betreiben. Diese reichen von photoautotropher oder photoheterotropher anoxygener Photosynthese bis hin zu chemoheterotropher Lebensweise entweder anaerob mit fermentativem Stoffwechsel oder anaerober Atmung, über mikroaerobe Atmung bis hin zu vollständiger Aerobie [Schultz and Weaver 1982]. Als Elektronendonoren für die Photosynthese nutzen NSPB bevorzugt organische Verbindungen, wachsen also photoorganoheterotroph, aber sie verfügen über die Enzyme des Calvin-Zyklus und können CO₂ fixieren. Meistens wachsen sie mixotroph, kombinieren also verschiedene Stoffwechselformen. Dadurch können sie sich bestmöglich in den Übergangsbereichen in Gewässern etablieren und sehr flexibel auf sich ändernde Bedingungen reagieren. [Eitinger et al. 2007]

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit dem α -Proteobakterium *R. rubrum* gearbeitet. Wie seine Verwandten kann *R. rubrum* intracytoplasmatische Photosynthesemembranen (PM) ausbilden, auf denen der Photosyntheseapparat lokalisiert ist [Oelze and Kamen 1971]. *R. rubrum* besitzt ein Photosystem vom Typ II, das dem pflanzlichen System II ähnelt und Chinone als Elektronenakzeptoren nutzt. Ein Photosystem I gibt es nicht und auch der wasserspaltende Komplex fehlt. Das bedeutet, dass keine Wasserspaltung und damit ein Gewinn von Reduktionsäquivalenten mit Sauerstoffproduktion stattfindet, sondern ein zyklischer Elektronentransport, der hauptsächlich der ATP-Regeneration, kurz der Energiegewinnung dient. Der Lichtsammelkomplex (LH1) von *R. rubrum* enthält Bakteriochlorophyll a als lichtaktives Molekül. In anderen Nichtschwefel-Purpurbakterien, wie z.B. bei *Rb. sphaeroides* oder *Rb. capsulatus* kommt noch ein zweiter Lichtsammelkomplex (LH2) vor, dessen Expression je nach Lichtintensität variiert. Die Lichtsammelkomplexe unterscheiden sich in ihren Absorptionsmaxima. [Eitinger et al. 2007, Drews 1985]

Dadurch, dass in *R. rubrum* nur ein LH-Komplex gebildet wird der bei 880 nm ein Ab-

sorptionsmaximum aufweist, kann die Expression von PM leicht spektroskopisch quantitativ in vivo erfasst werden [Ghosh et al. 1994].

Generell wird bei Sauerstofflimitation, also mikroaeroben oder anaeroben Bedingungen, die Bildung von PM induziert [Grammel et al. 2003]. Chlorophylle erzeugen in Verbindung mit Sauerstoff und Licht ROS, z.B. H_2O_2 oder Superoxide, die Zellbestandteile stark schädigen können [Glaeser and Klug 2005]. Unter oxidativen Bedingungen steht durch Veratmen von Reduktionsäquivalenten genug Energie zur Verfügung, so dass eine Expression des Photosyntheseapparates nicht notwendig, sondern sogar gefährlich ist. Es ist also sinnvoll, dass die PM-Expression in Abhängigkeit von oxidierenden Substanzen (z.B. Sauerstoff) in der Umgebung reguliert wird, die möglicherweise zu oxidativem Stress und "reactive oxygen species" (ROS)-Bildung führen könnten [Bauer et al. 2003, Li et al. 2004]. Aus diesem Grund und gemeinsam mit der einfachen Detektierbarkeit bietet sich die PM deshalb als Indikator für das Redoxpotential, das die Gesamtheit aller reduzierenden und oxidierenden Substanzen umfasst, im Kulturmedium an.

Die Lichtintensität scheint bei der Expression der PM in *R. rubrum* zwar eine Rolle zu spielen, ist jedoch nicht der bestimmende Faktor. So produzieren mit Starklicht versorgte Zellen weniger PM als mit Schwachlicht versorgte, jedoch können im Dunklen kultivierte Zellen unter Sauerstofflimitation ebenfalls vergleichbare Mengen an PM produzieren [Grammel et al. 2003]. Für die Optimierung der PM-Produktion in *R. rubrum* in Dunkelkulturen entwickelten [Ghosh et al. 1994] das von [Sistrom 1960] konzipierte Medium weiter. Zu Succinat als alleiniger Kohlenstoffquelle kam Fruktose als vergärbares Substrat dazu. Die PM-Synthese wurde dadurch deutlich gesteigert, wobei unklar blieb, wie dieser Effekt regulatorisch zu Stande kommt [Grammel et al. 2003].

Insgesamt machen diese Eigenschaften, zusammen mit der Verfügbarkeit der gesamten Genomsequenz *R. rubrum* zu einem hervorragenden Modellorganismus für die Erforschung von Wachstum in verschiedenen Redoxumgebungen, z.B. unter mikroaeroben Bedingungen.

R. rubrum besitzt analog zu der Stoffwechselvielfalt kein einheitliches Erscheinungsbild, sondern passt Farbe und Zellform stark an die Umweltbedingungen an [Eitinger et al. 2007]. Aerob wachsende Zellen sind kleine, fast weisse, gekrümmte Stäbchen, während phototroph gewachsene Zellen lange Spirillen mit mehreren Windungen sein können, die dunkelrot gefärbt sind. Die rote Färbung entsteht durch die Einlagerung von Carotinoiden, die vor oxidativem Stress durch Chlorophylle schützen [Glaeser and Klug 2005]. Bakteriochlorophyll a in *R. rubrum* sieht in vivo blau-grün aus, wie man an dem Carotinoid-defizienten Stamm *R. rubrum* G9 erkennen kann [Cogdell et al. 1975, Lu-

po and Ghosh 2004]. Oft, besonders unter limitierenden Bedingungen, ist *R. rubrum* bipolar begeißelt.

2.3 Redoxpools der Zelle

Die Regulation des intrazellulären Redoxpotentials ist essentiell für das Ablaufen aller Stoffwechselreaktionen in der Zelle. So werden im Katabolismus ständig reduzierte Redoxäquivalente produziert, die dann entweder über die Atmungskette, die auch über den Chinonpool verläuft, regeneriert und in Energie umgewandelt werden, oder in den Anabolismus einfließen können. Werden die Redoxäquivalente nicht regeneriert, kommt der Stoffwechsel zum Erliegen. [Madigan et al. 2003]

2.3.1 NAD/NADH und NADP/NADPH Pool

Während der Oxidation eines Substrates zu CO_2 wird gleichzeitig NAD^+ zu NADH reduziert, um die freiwerdende Energie aufzufangen. Da die NAD-Menge pro Zelle begrenzt ist, muss es wieder regeneriert werden damit der Stoffwechsel weiterarbeiten kann. Dazu kann es entweder die Elektronen an die Atmungskette abgeben, wo sie dem Aufbau eines Protonengradienten dienen und am Ende auf Sauerstoff oder einen alternativen Elektronenakzeptor übertragen werden, oder NAD muss über den fermentativen Stoffwechsel regeneriert werden, wenn kein Elektronenakzeptor zur Verfügung steht [Eitinger et al. 2007, Madigan et al. 2003].

Bereits Schön [1971] konnte zeigen, dass der Reduktionsgrad des NADH-Pools steigt, je weniger Sauerstoff zur Verfügung steht und sinkt, wenn ein Elektronenakzeptor anwesend ist. Die oxidiertesten Pools wurden in aeroben Lichtkulturen und die reduziertesten in anaeroben Dunkelkulturen gemessen. Grammel and Ghosh [2008] zeigten auch einen Zusammenhang des Reduktionsgrads des NAD/H-Pools mit dem Reduktionsgrad des Substrates. In mikroaeroben *R. rubrum* -Kulturen mit Succinat waren die Pools oxidiert, als in Kulturen, in denen zusätzlich noch Fruktose zur Verfügung stand.

Ein Teil der Elektronen wird für den Aufbau neuer Zellbestandteile gebraucht. Dazu werden sie in der Regel auf NADP^+ übertragen. Der NADPH-Pool liegt daher in der Regel reduzierter vor, als der NADH-Pool, bzw. das Verhältnis von NADH/NAD^+ ist kleiner als $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ [Grammel and Ghosh 2008]. Die beiden Dinucleotidpools sind in *R. rubrum* nur über das Enzym Transhydrogenase verbunden, die dadurch den

Elektronenfluss von Katabolismus zum Anabolismus kontrollieren kann. Daher kann nur genügend NADPH für das Wachstum gebildet werden, wenn auch genug Energie zur Verfügung steht [Olausson et al. 1995]. Diese Korellation wurde auch schon von Schön [1971] erwähnt. Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, die in anderen Organismen NADPH erzeugen kann, fehlt in *R. rubrum* [Grammel et al. 2003].

2.3.2 Der Chinonpool

Der Chinonpool ist in der Zellmembran lokalisiert und damit in einem anderen Kompartiment als die cytoplasmatischen Pools. In *R. rubrum* kommen nur Ubichinon und Rhodochinon als Bestandteile vor, wobei Ubichinon mit unterschiedlich vielen Isopreneinheiten im lipophilen Molekülteil als Q10 und Q9 vorkommt. Rhodochinon hat 10 Isopreneinheiten. [Grammel and Ghosh 2008]

Der Chinonpool kann auf verschiedenen Wegen mit Elektronen gespeist werden: Die NADH-Dehydrogenase überträgt Elektronen von NADH auf Ubichinon und die Succinat-Dehydrogenase leitet Elektronen von Succinat in diesen Pool. So ist der Chinonpool direkt mit dem Citratzyklus verbunden. Auch wenn Photosynthese betrieben wird, fließen die Elektronen aus dem Photosystem über den Chinonpool in die Elektronentransportkette. [Klamt et al. 2008]

Für den Chinonpool wird auch eine wichtige Rolle in der Genregulation diskutiert. Als Ligand kann oxidiertes Ubichinon die Phosphorylierungsaktivität von Histidinkinasen unterdrücken. Dies geschieht zum Beispiel an der Histidinkinase RegB aus dem RegB/RegA Zweikomponentensystem in *Rb. capsulatus* [Elsen et al. 2004], das auch in die Regulation der Photosynthesegene in vielen NSPB involviert ist. Die Funktion des RegB/RegA Zweikomponentensystems wird in 2.4.1 genauer beschrieben.

Rhodochinon ist essentiell für die anaerobe Atmung in *R. rubrum*. Es scheint an der Regeneration von NAD^+ über die Fumaratreduktase beteiligt zu sein. Ob es auch eine ähnliche regulatorische Funktion wie Ubichinon hat ist unbekannt. Ein essentielles Gen für die Rhodochinonsynthese und die Funktion von Rhodochinon wurden erst kürzlich mit Hilfe der *R. rubrum* Mutante F11 aufgeklärt. [Lonjers et al. 2012].

In dieser Arbeit kam zusätzlich zum Wildtyp der *R. rubrum* -Stamm SN20 zum Einsatz. In diesem Stamm wurde durch Nitrosoguanidin eine Mutation im *UbiD*-Gen erzeugt, wodurch sehr viel geringere Ubichinonmengen synthetisiert werden als im Wildtyp S1 (Grammel, pers. Mitteilung). Entgegen der Erwartungen führte ein kleinerer Ubichinonpool bei diesem Stamm nicht zu erhöhter PM-Synthese, sondern eher zu etwas niedri-

geren Werten. Dies weist darauf hin, das Ubichinon in *R. rubrum* eine andere Rolle für die Genregulation spielt als in *Rb. capsulatus* (vgl. 2.4.1).

2.3.3 Der Glutathionpool

Glutathion (GSH) ist ein Pseudotripeptid aus Glutamat, Cystein und Glycin, mit einer γ - Bindung zwischen Cystein und Glutaminsäure. Die wichtigste der drei Aminosäuren ist Cystein, das durch die Thiolgruppe für die Redoxaktivität des Pseudopeptids sorgt. Unter oxidierenden Bedingungen bilden zwei Moleküle GSH die oxidierte Form des Glutathions: Glutathion-Disulfid (GSSG). GSSG ist also ein Dimer aus zwei GSH-Molekülen, die über eine Schwefelbrücke an ihrem Cysteinrest kovalent verbunden sind. [Meister and Anderson 1983, Boyland and Chasseaud 1967]

GSSG kann von Zellen mit dem Enzym Glutathionreduktase unter NADPH-Verbrauch zu zwei Molekülen GSH regeneriert werden. In allen bisher untersuchten Zellen liegt der GSH-Pool vorwiegend reduziert vor. [Meister and Anderson 1983]

Dies spiegelt auch eine wichtige Aufgabe des GSH-Pools wieder, nämlich den Schutz vor oxidativem Stress und ROS wie z.B. Superoxid oder Wasserstoffperoxid, die während der Atmung der Zelle entstehen können [Forman et al. 2009]. Besonders in Organismen die Chlorophylle bilden können ist der Schutz vor ROS überlebenswichtig, denn Chlorophylle produzieren ROS in großen Mengen, wenn sie gleichzeitig mit Licht und Sauerstoff in Berührung kommen [Li et al. 2004], (vgl. 2.2).

Unter oxidativem Stress kann GSH auf verschiedene Art die Zelle schützen: Durch sein niedriges Redoxpotential von -240 mV hat GSH antioxidative Wirkung, was bedeutet, dass es bevorzugt oxidiert wird und so Radikale abfängt [Aslund et al. 1997]. Dieser Prozess wird durch die Glutathion-S-Transferasen beschleunigt. Sie fusionieren GSH mit Xenobiotika oder anderen Molekülen, die oxidativen Stress verursachen. Das Produkt wird in der Regel ausgeschleust oder abgebaut [Boyland and Chasseaud 1967]. GSH kann durch Glutathionylierung, also durch das Eingehen kovalenter Verbindungen mit besonders gefährdeten Thiolresten in Proteinen, die irreversible Oxidation zu Schwefeloxiden verhindern und es kann Elektronen zur Reduktion oxidierter Thiole liefern. [Masip et al. 2006, Forman et al. 2009]

GSH kann ähnlich wie NADPH als Elektronenquelle für Stoffwechselreaktionen genutzt werden. Dies tun die Enzyme Ribonucleotid Reduktase und Phosphoadenosinphosphosulfat Reduktase. Für die Nutzung von GSH als Elektronendonator sind zusätzliche Enzyme, die Glutaredoxine erforderlich [Aslund et al. 1997]. Mutationen in

Glutaredoxin-Genen von *Rb. capsulatus* führten zu höherer Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress, zu langsameren Wachstumsraten und geringerer PM-Expression [Li et al. 2004].

Abbildung 2.1 zeigt eine schematische Übersicht über das Zusammenwirken der Redoxpools mit dem Zentralstoffwechsel und der Elektronentransportkette in *R. rubrum*. Sie zeigt auch, wie Redoxsignale aus dem Stoffwechsel auf die Genregulation wirken könnten. Vor allem ist deutlich zu erkennen, dass es sich um ein vernetztes System handelt, aus dem die einzelnen Komponenten wie z.B. Zentralstoffwechsel oder Elektronentransportkette nur schwer einzeln analysiert werden können.

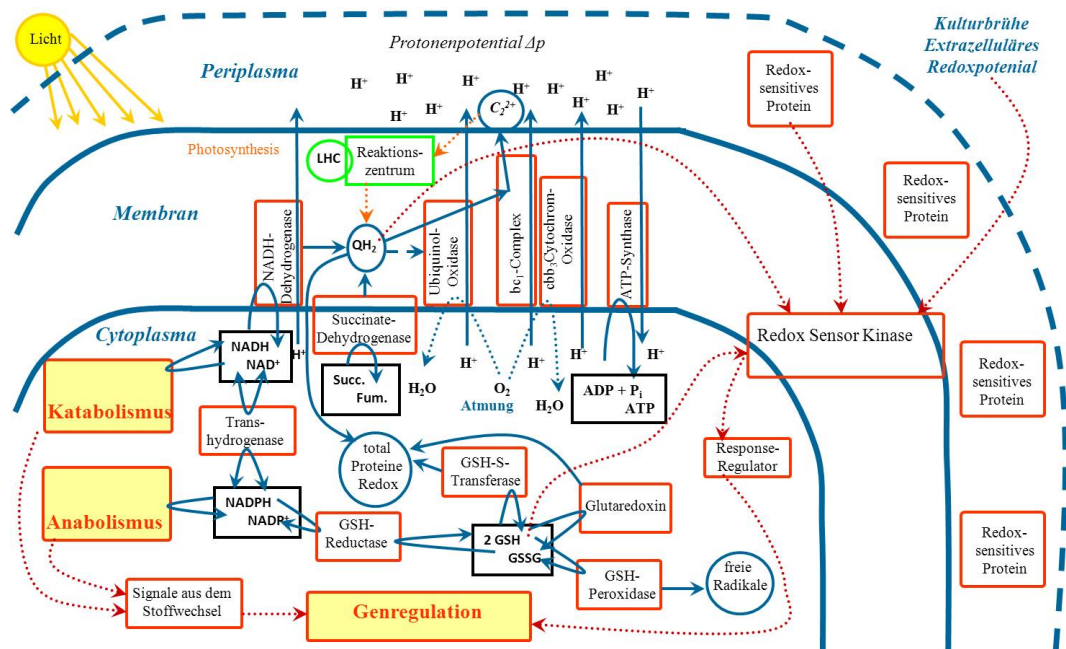


Abbildung 2.1

Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Redoxpools, Zentralstoffwechsel und Genregulation in *R. rubrum*, Proteine sind orange umrandet, Pools sind schwarz umrandet, Übertragung von Elektronen werden durch blaue Pfeile dargestellt, Signaltransduktionen durch rote gestrichelte Pfeile (wobei aus Platzgründen nur die Wirkung der Redoxpools dargestellt wird, nicht aber die Antwort der Genregulation), gelb hinterlegt sind zusammengefasste Reaktionen die nicht detailliert aufgezeigt werden. Abkürzungen: LHC: Light Harvesting Complex, QH_2 : Ubichinon/Ubichinol-Pool, C_2^+ : Cytochrom C.

2.4 Regulation der Photosynthesegene in anoxygenen Photosynthesebakterien

Die meisten Informationen über die Regulation von Photosynthesegenen in Purpurbakterien stammen aus den mit *R. rubrum* verwandten Spezies *Rb. capsulatus* und *Rb. sphaeroides*. In diesen Organismen sorgen zwei Regulationssysteme parallel dafür, dass die PM nur dann exprimiert wird, wenn es für die Zellen energetisch lukrativ ist und kein Schaden verursacht werden kann. [Bauer et al. 2003, Wu and Bauer 2008]

2.4.1 Das RegB/RegA Zweikomponentensystem

Das RegB/RegA Zweikomponentensystem ist ähnlich zu dem ArcB/ArcA System in *E. coli* und besteht aus der Histidin-Sensorkinase RegB und dem Regulator RegA [Elsen et al. 2004]. Homologe kommen in den meisten NSPB vor, wurden jedoch historisch bedingt z.T. anders benannt, z.B. in PrrB/PrrA in *Rb. sphaeroides* [Eraso and Kaplan 1995]. Die Histidinkinase RegB ist eine membranständige Kinase, die wahrscheinlich über eine Interaktion mit dem Chinonpool den Redoxzustand der Elektronentransportkette detektiert [Swem et al. 2006]. Die Chinonbindestelle der Histidinkinase bindet oxidiertes Ubichinon, das dann die Phosphorylierungsaktivität der Kinase unterbindet. Es wird diskutiert, ob durch die Bindung von oxidiertem Chinon an RegB die beiden cytoplasmaständigen -SH Gruppen der Kinase oxidiert werden können, wodurch die Kinaseaktivität unterbunden würde [Swem et al. 2003].

In PrrB aus *Rb. sphaeroides* wird die Phosphorylierungsaktivität der Kinase auch von Ubichinon inaktiviert, wenn die membranständige Domäne, wo die Chinonbindestelle vermutet wird, fehlt [Swem et al. 2006, Kim et al. 2007]. Zusätzlich liegt das Redoxpotential der Thiole mit -294 mV [Swem et al. 2003] sehr weit entfernt von dem des Ubichinonpools mit +90 mV, so dass sich der Chinonpool weit jenseits des Gleichgewichtes befinden müsste um eine Reduktion der Thiolgruppen zuzulassen [Gammel and Ghosh 2008].

Es ist also möglich, dass die Thiolgruppen das cytoplasmatische Redoxpotential detektieren und damit sowohl Signale aus der Elektronentransportkette als auch aus dem Cytoplasma an einer Kinase integriert werden. Abb. 2.2 zeigt schematisch die beschriebene Funktionsweise von RegB. Wu and Bauer [2010] konnten ihre Theorie belegen, indem sie zeigten, dass heterolog exprimiertes RegB Ubichinon enthält. In vitro bindet RegB aus *Rb. capsulatus* sowohl Ubichinon als auch das reduzierte Ubichinol, wobei nur

die oxidierte Form die Phosphorylierungsaktivität unterdrückt. Diese Versuche wurden mit wasserlöslichem Q0 (Ubichinon ohne Isoprenseitenkette) durchgeführt, was zeigt, dass die Bindeaktivität scheinbar unabhängig von der Kettenlänge ist. [Wu and Bauer 2010]

[Kim et al. 2007] schlugen als alternativen Regulationsmechanismus in PrrB vor, dass die Kinase den Fluss über die *cbb3*-Oxidase detektiert. Da sich die Gruppen um S. Kaplan und C.E. Bauer jeweils mit PrrB und RegB aus *Rb. sphaeroides* bzw. *Rb. capsulatus* beschäftigen ist es wahrscheinlich, dass die sich Mechanismen trotz Homologie der beiden Proteine unterscheiden.

Der zweite Teil des Zweikomponentensystems ist der Response Regulator, der je nach Phosphorylierungsgrad an DNA binden kann und so Gene reguliert. Phosphoryliertes RegA bzw. PrrA bindet an die DNA und aktiviert dort das Ablesen der Photosynthesegene [Swem et al. 2001, Eraso and Kaplan 1995].

In *R. rubrum* konnte bisher kein homologes Protein annotiert werden, das die gleiche Funktion wie RegB oder PrrB erfüllen könnte. Ein Homolog zu RegA/PrrA konnte ebenfalls nicht gefunden werden [Hunter 2009].

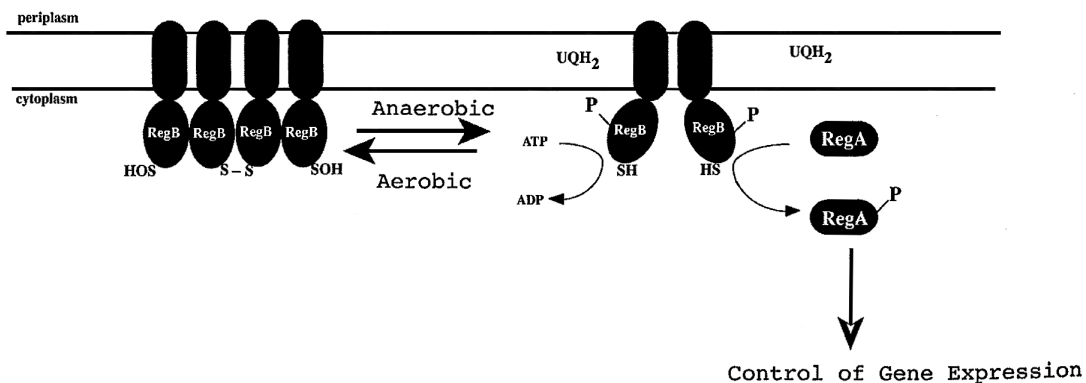


Abbildung 2.2

Funktionsweise von RegB nach Hunter [2009]. Unter aeroben Bedingungen sind die Thiolgruppen oxidiert und die Phosphorylierungsaktivität ist unterdrückt. Unter anaeroben Bedingungen wird der Ubichinonpool reduziert und dadurch die Phosphorylierungsaktivität angeregt; die cytoplasmatischen Thiolgruppen sind reduziert. Phosphoryliertes RegA kann nun die Transkription der Photosynthesegene aktivieren.

2.4.2 PpsR

PpsR-Proteine aus anaeroben anoxygenen Photosynthesebakterien gehören zu den am besten untersuchten redoxsensitiven Regulatoren. Sie sind allgemein als Masterregula-

toren des Photosynthesegeclusters bekannt und in *Rb. capsulatus* und *Rb. sphaeroides* besonders intensiv erforscht worden [Moskvin et al. 2005]. In diesen und vielen anderen Bakterien dienen PpsR und seine Homologe als Repressoren [Penfold and Pemberton 1994, Gomelsky and Kaplan 1995]. Das PpsR-Homolog von *Rb. capsulatus* heisst CrtJ. In einigen Arten, z.B. in *Rb. sphaeroides* ist der Blaublichtsensor AppA der Antirepressor von PpsR [Gomelsky and Kaplan 1998, Kim et al. 2006, Moskvin et al. 2007]. Abb. 2.3 zeigt schematisch die Funktion von PpsR in *Rb. sphaeroides*.

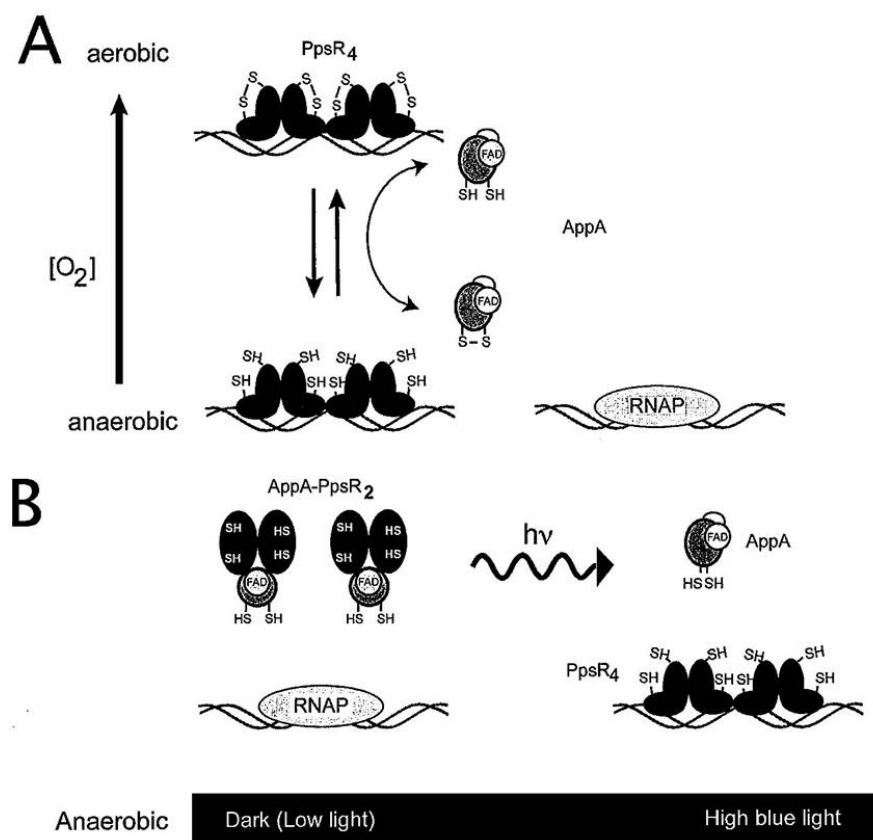


Abbildung 2.3

Funktionsweise von PpsR und AppA nach Hunter [2009]. PpsR aus *Rb. capsulatus* bildet unter oxidierenden Bedingungen Tetramere, die an DNA binden und als Repressor fungieren. Unter anaeroben Bedingungen werden die Thiole durch den Antirepressor AppA reduziert, jedoch löst sich das Tetramer erst von der DNA ab, wenn unter geringer Lichteinstrahlung durch AppA jeweils zwei PpsR-Proteine komplexiert werden. Ist die Lichteinstrahlung zu stark, zerfällt der Komplex und PpsR bindet wieder an DNA und unterdrückt die Transkription der Photosynthesegegene.

Mit mindestens zwei redoxaktiven Cysteinen kann PpsR den Redoxzustand der Zelle detektieren. In Lösung bzw. im Cytoplasma bildet PpsR Tetramere, die an konservierte DNA-Motive binden [Ponnampalam and Bauer 1997]. Die Repressorfunktion ist aktiv, wenn die Thiole oxidiert sind, also unter aeroben Bedingungen [Ponnampalam and Bauer 1997, Elsen et al. 2004, Masuda et al. 2002]. In *Rb. capsulatus* gibt es keinen Antirepressor für CrtJ. Es wird wahrscheinlich durch den Glutathionpool reduziert und damit die DNA-Bindeaktivität verringert [Ponnampalam and Bauer 1997, Masuda et al. 2008].

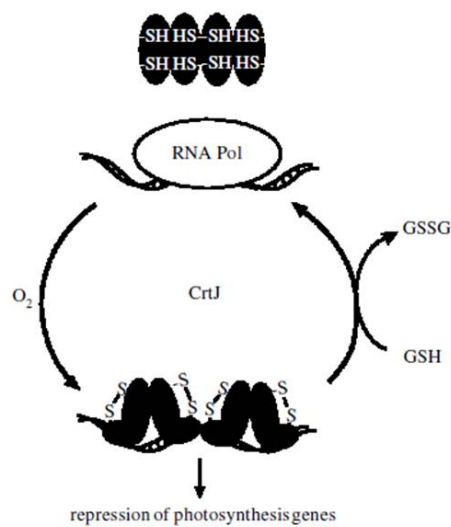


Abbildung 2.4: Funktionsweise von PpsR-Homolog CrtJ aus *Rb. capsulatus* [Masuda et al. 2002]. Wie in *Rb. sphaeroides* bildet CrtJ Tetramere als aktiver Repressor im oxidierten Zustand. Zur Auflösung ist aber kein Antirepressor notwendig, sondern PpsR wird durch den GSH-Pool reduziert.

Neben den Photosynthesegenen kontrolliert PpsR auch noch z.B. die Gene der Ubichinoloxidase und der cbb3-Oxidase [Swem et al. 2001], also auch Proteine, die in die Signaltransduktion der RegB(PrrB)-Sensor kinase involviert sind. In den meisten Purpurbakterien werden die Photosynthesegene von phosphoryliertem RegA (PrrA), dem Regulator des RegB/RegA (PrrB/PrrA) Zweikomponentensystems (2.2) aktiviert [Laguri et al. 2003]. So konkurrieren RegA und PpsR um die verfügbaren Bindestellen [Bowman et al. 1999]. Ihre Genexpression ist verknüpft, so dass sich regulatorische Feedback-Loops ergeben, die eine besonders sensitive Regelung erlauben [Gomelsky et al. 2008]. Zum Beispiel kann eine *Rb. capsulatus* - Deletionsmutante von RegA z.B. nicht photo-

synthetisch wachsen. Wird jedoch auch noch PpsR deletiert, ist phototrophes Wachstum wieder möglich [Hunter 2009].

Das PpsR-Homolog von *R. rubrum* wurde von Addlesee and Hunter [2002] sequenziert aber nicht genauer erforscht. In *R. rubrum* gibt es kein Homolog zum RegB/RegA Zweikomponentensystem, [Hunter 2009] auch ein AppA-Homolog gibt es nicht. Dies weist auf eine noch globalere Rolle für PpsR hin und zeigt auch einen interessanten Aspekt auf: Die meisten reprimierenden PpsR-Proteine haben mindestens einen Antagonisten, der für eine konsistente Regulation notwendig ist (AppA oder PpsR1). Die Photosynthesegene können z.B. in *Rb. capsulatus* nicht exprimiert werden wenn RegA deletiert wurde [Moskvina et al. 2005].

In einigen Photosynthesebakterien, vor allem in aeroben anoxygenen Photosynthesebakterien dient oxidiertes PpsR als Aktivator für die Photosynthesegene, so dass bei diesen obligaten Aerobiern PM unter voll aeroben Bedingungen gebildet werden [Yurkov and Beatty 1998]. *Bradyrhizobium* BTAi und *Bradyrhizobium* ORS278 gehören zu dieser Gruppe, exprimieren ihre PM jedoch bevorzugt unter mikroaeroben Bedingungen. Sie besitzen zwei verschiedene, aber Homologe PpsR Proteine, von denen PpsR1 redoxaktiv ist und in reduzierter Form aktivierend auf die Photosynthesegene wirkt. PpsR2 besitzt keine redoxaktiven Cysteine, sondern bindet lichtaktive Kofaktoren und dient so als Lichtsensor. Es wirkt als Konkurrent zu PpsR1 reprimierend. [Jaubert et al. 2004] Eine phylogenetische Analyse von C. E. Bauer in Hunter [2009] teilt die PpsR-Proteine in drei verschiedene PpsR-Gruppen ein, die sich auch in ihrer Funktionalität unterscheiden (vgl. Abb. 2.5).

1. Unter reduzierenden Bedingungen aktivierend wirkendes PpsR mit nur einem redoxaktiven Cystein, Bindung an DNA trotz reduzierter Thiolgruppen, aber auch einige im oxidierten Zustand reprimierend wirkende PpsR-Proteine (*Rhodospseudomonas palustris*)
2. Unter oxidierenden Bedingungen im Dunklen reprimierend wirkendes PpsR ohne redoxaktive Cysteine
3. Unter oxidierenden Bedingungen reprimierend wirkendes PpsR mit zwei redoxaktiven Cysteinen

PpsR von *R. rubrum* befindet sich demnach in der Gruppe 1 der in reduziertem Zustand aktivierend wirkenden PpsR-Proteine, jedoch fehlt das sonst meist zusätzlich vorkommende, reprimierende PpsR2. In *R. rubrum* ist PpsR zwar bekannt und im Genom annotiert, aber noch nicht experimentell untersucht.

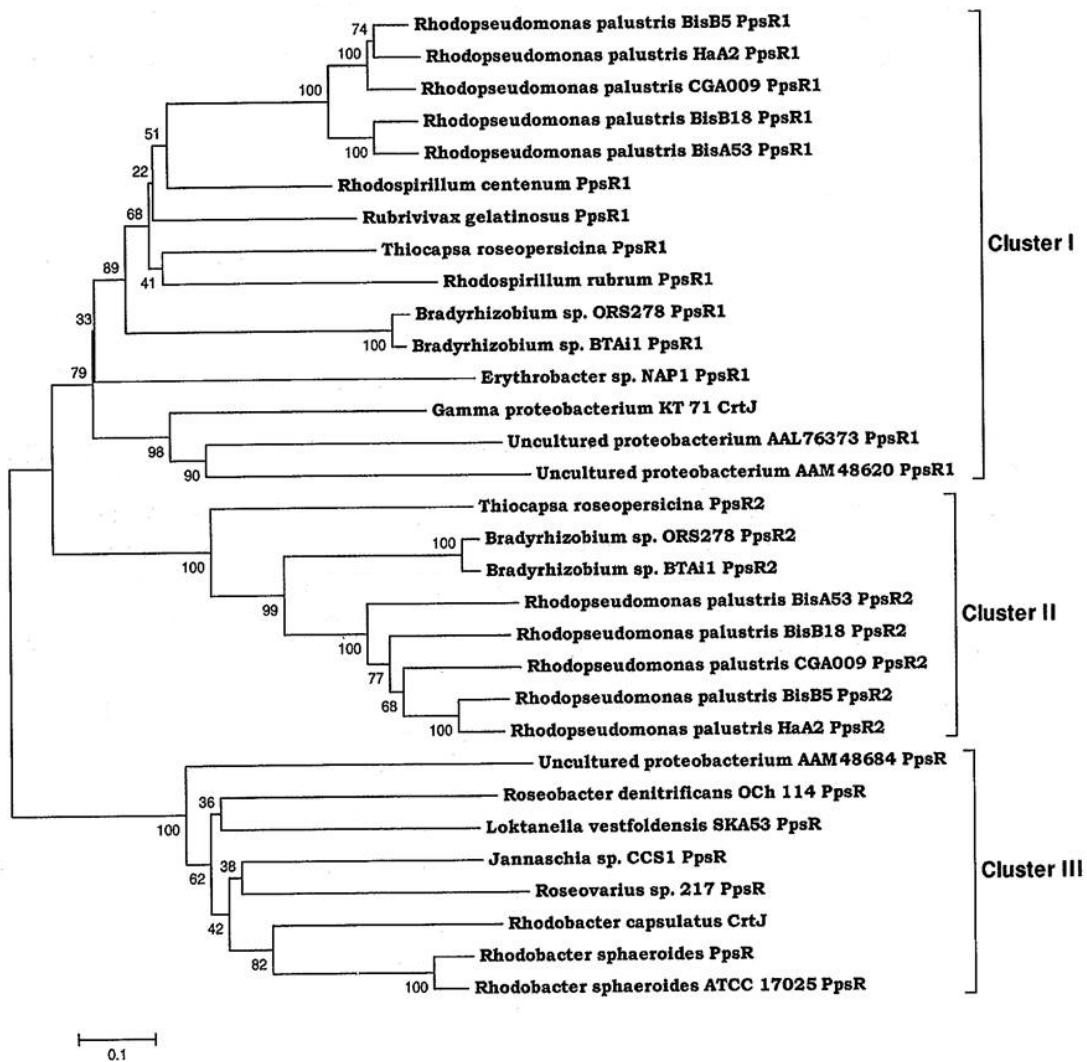


Abbildung 2.5: Phylogenetische Analyse von PpsR-Proteinen. Alignment mit Neighbor-Joining, die Astlängen spiegeln die evolutionäre Distanz wider, die Bootstrap-Werte sind in % jeweils an den Knoten angegeben. [Hunter 2009]

2.4.3 Weitere Regulatoren der Photosynthesegene

Es sollte nicht unerwähnt bleiben, dass auch Regulatoren wie TspO und FnrL eine Rolle in der Redox-Regulation der Photosynthesegene spielen. Mit AerR gibt es in *Rb. capsulatus* und einigen anderen Bakterien einen weiteren aeroben Repressor [Dong et al. 2002]. In einigen Organismen spielen Bakteriophytochrome und andere Lichtsensoren eine wichtige Rolle. Insgesamt stellen die beiden oben vorgestellten Sensorsysteme jedoch die Hauptregulatoren der Photosynthesegene dar. [Moskvin et al. 2005, Hunter 2009, Giraud et al. 2002, Zappa et al. 2010]

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Wachstums- und Kultivierungsbedingungen

Alle Wachstumsversuche mit *R. rubrum* wurden grundsätzlich bei 30°C durchgeführt. Für aerobe Anzuchtbedingungen wurden Schüttelkolben maximal zu 1/5 gefüllt. Mikroaerobe Bedingungen, also mit limitierter Sauerstoffzufuhr wurden in dieser Arbeit durch zur Hälfte der maximalen Füllmenge befüllte Schüttelkolben erreicht. Es wurden Kolben mit 4 Schikanen eingesetzt, die mit einer Metallkappe verschlossen wurden. Sie wurden im Schüttler (Certomat BS1, Sartorius, Göttingen) bei 100 rpm inkubiert. [Ghosh et al. 1994]

Für anaerobe Bedingungen wurden Pyrexflaschen verwendet, in denen ein der Flaschengröße angepasster Rührfisch für gute Durchmischung sorgte. Lichtkulturen wurden auf einem Magnetrührbrett (Variomag Poly 15; 250 rpm) unter eine Lichtquelle aus Wolfram-Glühbirnen in einem auf 27°C temperierten Raum gestellt. Die weiteren 3 °C zur Kultivierungstemperatur von 30°C wurden durch die Einstrahlung des Lichts bewerkstelligt. Damit es direkt nach dem Befüllen nicht zu phototoxischen Effekten durch die Anwesenheit von sowohl Sauerstoff als auch Lichteinstrahlung kommen konnte, wurden die Lichtkulturen zunächst in den dunklen Brutschrank gestellt und dort ~ 6 h vorinkubiert. Anaerobe Dunkelkulturen, die mit Lichtkulturen verglichen werden sollten wurden in Alufolie verpackt auf das Magnetrührbrett ins Licht gestellt [Grammel et al. 2003].

Grundsätzlich wurde für alle Kultivierungen eine Vorkultur im gleichen Medium unter den gleichen Bedingungen angezogen. Daraus wurde die Hauptkultur mit einer OD₆₆₀

Tabelle 3.1: Bestandteile der verwendeten Nährmedien nach Sistrom [1960], Ghosh et al. [1994], Feststoffe sind in g/l, Flüssigkeiten in ml/l angegeben.

| Stammlösung | Konzentration | M | M2S | M2SF | M2SF ⁺ |
|---------------------------------|-------------------|------|------|------|-------------------|
| | [g/l] bzw. [ml/l] | [ml] | [ml] | [ml] | [ml] |
| KH ₂ PO ₄ | 148 | 10 | 20 | 20 | 20 |
| K ₂ HPO ₄ | 222 | | | | |
| KSuccinat | 236/224 | 10 | – | – | – |
| NH ₄ Succinat | 236 | – | 20 | 20 | 30 |
| NH ₄ Cl | 214 | 2 | – | – | – |
| Vitaminlösung | | 10 | 10 | 10 | 10 |
| HEPES | 476,62 | – | 20 | 20 | 20 |
| NaCl | 120 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| p-Aminobenzoesäure | 2,85 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Fruktose | 30% | – | – | 10 | 66,6 |
| dH ₂ O | | 966 | 928 | 918 | 851 |

von ca. 0,2 angeimpft. Alle Wachstumskurven wurden in Duplikaten ausgeführt und jeder Versuch mindestens ein Mal reproduziert. Es wird im Ergebnisteil jeweils eine repräsentative Kurve gezeigt.

3.1.1 Minimalmedien für die Anzucht von *R. rubrum*

In Tab. 3.1 werden alle Medienbestandteile übersichtlich zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Vitaminlösung

| Substanz | Konzentration |
|--|-------------------|
| | [g/l] bzw. [ml/l] |
| Titriplex I | 20 |
| Asparaginsäure | 4 |
| Glutaminsäure | 10 |
| KOH | 22 |
| MgSO ₄ | 28,8 |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,2 |
| Nicotionsäure | 0,1 |
| Thiamin | 0,05 |
| Biotin | 0,002 |
| CaCl x 2 H ₂ O | 6,6 |
| Spurenelementlsg. | 20 |

Tabelle 3.3: Spurenelementlösung
nach Hutner [1946]

| Substanz | Konzentration |
|--|---------------|
| | [g/l] |
| EDTA | 50 |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 22 |
| H ₃ BO ₃ | 11,4 |
| MnCl ₃ x 4 H ₂ | 5,1 |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 5 |
| CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 1,6 |
| CuSO ₄ x 5 H ₂ O | 1,1 |
| 2(NH ₄) ₆ Mo ₇ O–24 x 4 H ₂ O | 1,1 |

Die Stammlösungen wurden in MilliQ-Wasser angesetzt. Der pH-Wert wurde in allen Stammlösungen (ausser NH_4 -Succinat) mit 2 N KOH auf 6,8 eingestellt. NH_4 -Succinat bestand aus 236 g Bernsteinsäure, die in MilliQ-Wasser gelöst wurde und mit konzentrierter NH_4OH Lösung neutralisiert (pH 6,8) wurde. K-Succinat setzte sich aus 236 g Bernsteinsäure in Wasser gelöst und 236 g KOH-Plättchen zusammen. Das Ansetzen der Medien begann mit der Vorlage von Wasser, dem dann die Stammlösungen der Reihe nach zugegeben wurden. Vitaminlösung und Fruktose wurden erst nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugegeben. Der pH-Wert wurde ggf. mit KOH oder NH_4OH korrigiert.

3.1.2 Wachstumsversuche mit Manipulation des intrazellulären Redoxpotentials

Das intrazelluläre Redoxpotential lässt sich durch verschiedene Chemikalien manipulieren. Da hier der Fokus auf dem Redoxzustand der intrazellulären Thiole lag, wurden Substanzen eingesetzt, die mehr oder weniger spezifisch auf Komponenten des Thiolredoxsystems einwirken.

DTT : Dithiothreitol oder Butan-2,3-diol-1,4-dithiol besitzt in reduzierter Form zwei endständige Thiolgruppen, die zu einer intramolekularen Disulfidbrücke oxidieren können, sodass eine Ringstruktur entsteht. Die oxidierte Form ist dadurch energetisch begünstigt, was DTT zu einem starken Reduktionsmittel, besonders für andere Thiole macht. Im Prinzip wirkt die Reduktionskraft aber unspezifisch. DTT ist membrangängig, kann also ins Cytoplasma gelangen. Das Standardredoxpotential bei pH 7 beträgt -330 mV. Das Reagenz ist pH sensitiv und wirkt nur bei pH-Werten von 7 und darüber, denn nur das Thiolat-Anion ist redoxaktiv, die protonierte Form hat keinen Effekt. [Cleland 1964]

GSH : Glutathion ist ein Pseudotripeptid, das bedeutet, es besteht aus drei Aminosäuren, die über eine Peptidbindung und eine Isopeptidbindung zwischen der γ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure und Cystein verbunden sind. Es ergibt sich γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin. Es wird von der Zelle selbst als Redoxregulator und zum Schutz vor oxidativem Stress synthetisiert. In den meisten Mikroorganismen ist GSH nicht membrangängig, sondern wird durch Transporter transloziert. Das Redoxpotential beträgt -240 mV. (Vgl. Abs. 2.3.3) [Masip et al. 2006]

GSSG : Oxidiertes Glutathion aus zwei GSH-Molekülen mit einer Disulfidbrücke

Diamid : 1,1'-Azobis(N,N-dimethylformamid) erhöht spezifisch den Anteil an oxidiertem Glutathion, als GSSG in der Zelle, dabei entsteht pro Diamid-Molekül aus zwei Molekülen GSH ein GSSG. [Kosower and Kosower 1995]

DEM : Diethylmaleat (Maleinsäurediethylester) verringert spezifisch die GSH-Menge im Cytoplasma, indem es enzymatisch mit GSH konjugiert wird. [Boylund and Chasseaud 1967]

3.1.3 Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte wurde zur Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen verwendet. Standardmässig für *R. rubrum* wurde eine Wellenlänge von 660 nm verwendet. Es wurde an einem Spektrometer der Firma Jasco gemessen (Jasco V-670, Tokyo, Japan). Dazu wurden Kunststoffküvetten der Firma Brand verwendet, die eine Schichtdicke von 1 cm hatten.

Optische Messung der Photosynthesemembranen (PM)

Die Ausprägung der PM-Expression wurde durch die Absorption bei 880 nm bestimmt und in Verhältnis zur optischen Dichte gesetzt. Durch die Absorption des Lichtsammelkomplexes 1 (Light-Harvesting-Complexes: LH1) bei dieser Wellenlänge kann die PM-Bildung verlässlich gemessen werden [Grammel et al. 2003]. Im Gegensatz zu *Rb. capsulatus* oder *Rb. sphaeroides* gibt es keinen weiteren Lichtsammelkomplex, sodass die Menge an PM direkt über die Absorption des LH1 ermittelt werden kann.

Verfahrensabweichung

Als Fehler der OD-Bestimmung wird eine Verfahrensabweichung von 5% angenommen [Carius et al. 2012]. Ebenso für die Berechnung der PM, da hier nur Werte aus einem Absorptionsspektrum eingehen die direkt nach Baselinekorrektur noch in der Geräte-Software des verwendeten Zweistrahlenspektrometers verrechnet wurden. So kommt nur die das Offset des Spektrometers innerhalb des Spektrums zum Tragen, das gegenüber der Verfahrensabweichung verschwindend gering ist. Es wird deshalb angenommen, dass der Fehler der PM-Bestimmung höchstens 5 % beträgt und sich nicht bei Division fortpflanzt.

3.1.4 Berechnung der Wachstumsraten und der PM-Syntheseraten

Die Wachstumsraten wurden näherungsweise mit der Formel

$$\mu = \frac{dC_x}{dt} * \frac{1}{C_x} \quad (3.1)$$

berechnet [Eitinger et al. 2007]. Die PM-Bildung über die Zeit wurde anhand der Formel

$$R_{PM} = \frac{d(OD_{880}/OD_{660})}{dt} \quad (3.2)$$

berechnet. Die Ausbeute an PM wurde anhand der Formel

$$A_{PM} = \frac{\Delta OD_{880}}{OD_{660}} \quad (3.3)$$

C_x = Biomasse in OD660, $\overline{C_x}$ = Durchschnitt der im entsprechenden Zeitraum gemessenen C_x . Die Fehler der Raten wurden aufgrund der Verfahrensabweichung der OD-Messung auf nicht mehr als 5 % abgeschätzt. Die exakte Bestimmung der Fehlergrenzen für die berechneten Raten wäre aufgrund der nicht gegebenen Unabhängigkeit der Werte mit erheblichem mathematischen Aufwand verbunden und würde nicht zu einer besseren Interpretierbarkeit der Messwerte führen.

Berechnung der Trockengewichte

Die Trockengewichte von *R. rubrum* wurden anhand folgender Formel berechnet:

$$OD_{660} = 1 \rightarrow 0,35 \text{ g Trockengewicht/l} \quad (3.4)$$

Dieser Faktor wurde in der Arbeitsgruppe nach folgendem Ablauf bestimmt [Zeiger and Grammel 2010]:

1. Ernte der Zellen aus jeweils 10 ml Kulturbrühe, 10 min in der Zentrifuge bei 5000 rpm
2. Waschen der Zellpellets mit 0,98% iger NaOH-Lösung, wieder abzentrifugieren 10 min, 5000 rpm
3. Pellets wurden in einem Lyophilisator (Christ, Osterode am Harz) vollständig getrocknet und das Gewicht mit einer Analysenwaage bestimmt

3.1.5 Glutathionbestimmung

3.1.6 DTNB

5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, Ellmans Reagenz) reagiert mit Thiolen durch Spaltung seiner Disulfidbindung unter Bildung von 2-nitro-5-thiobenzoate (NTB). NTB hat eine gelbe Farbe und kann spektrophotometrisch bei 412 nm detektiert werden Ellman [1959]. Die Reaktion von Thiolgruppen mit DTNB verläuft stöchiometrisch, d.h. 1 mol DTNB reagiert mit 1 mol Thiol zu 1 mol NTB und 1 mol Thiol-NTB.



Glutathion-Assay mit DTNB

Die Methode zur Bestimmung des Glutathiongehalt flüssiger Proben mit DTNB wurde von Tietze [1969] entwickelt. Der in dieser Arbeit verwendete Assay zur Bestimmung des Glutathiongehalts in Kulturen von *R. rubrum* basiert auf dieser Methode.

In einem ersten Schritt wird zunächst das reduzierte GSH gemessen. Es reagiert mit DTNB zu GS-TNB und TNB. Diese Farbreaktion kann wie oben beschrieben spektrophotometrisch durch Absorptionsmessung quantifiziert werden.

Im zweiten Schritt wird der Gesamtglutathiongehalt der Probe bestimmt, also auch oxidiertes Glutathion. Die Umsetzung von GSSG zu GSH wird durch Zugabe von GSH-Reduktase und NADPH gestartet, wobei auch GS-TNB wieder zu GSH und TNB umgesetzt wird ('recycling' Methode). Diese Reaktion wird spektrophotometrisch durch Messung der Absorptionskinetik detektiert.

Deproteinierung

Zur Bestimmung des intrazellulären Glutathiongehalts in Zellen müssen die Zellextrakte zuerst von Proteinen und Enzymen befreit werden, welche andernfalls ebenfalls eine Farbreaktion mit DTNB hervorrufen, oder den Redoxzustand des GSH-Pools beeinflussen würden. Dies wurde durch einen sauren Zellaufschluss mit Sulfosalicylsäure (sulfosalicylic acid, SSA) realisiert; die Proteine in den Zellextrakten werden durch Sulfosalicylsäure gefällt, kleine Peptide wie GSH bleiben in Lösung.

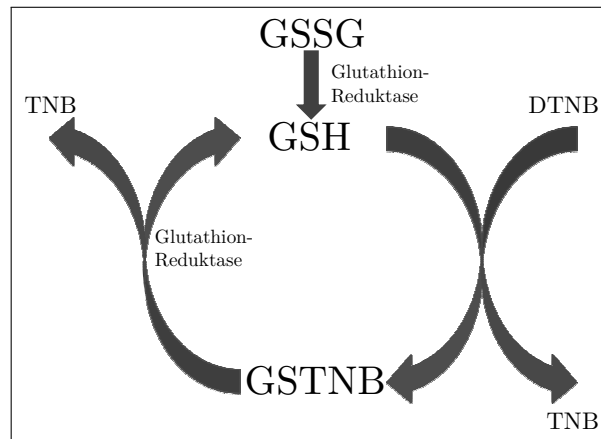


Abbildung 3.1: Prinzip des Glutathion-Assays mit DTNB

Extraktion und Probenvorbereitung

Zellpellets aus 2 ml Kultur (gelagert bei -80°C) wurden in 1 ml 10% (w/v) SSA resuspendiert und durch gründliches Vortexen homogenisiert. Im Anschluss wurden die resuspendierten Zellpellets 3 Einfrier/Auftauzyklen, bei -80°C und RT, unterzogen. Anschließend wurden die Lysate für 10 min bei 4°C und $14000 \times g$ abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C bis zur Messung gelagert.

Vor den Messungen wurden die Zellextrakte von -80°C aufgetaut, 1:10 mit Assaypuffer bis zu einer finalen Konzentration von 1% (w/v) SSA verdünnt und bis zur Messung auf Eis gelagert. Als Referenz dienten GSH bzw. GSH/GSSG Standards im Bereich zwischen $10 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ Gesamtglutathion, welche an jedem Messtag frisch angesetzt wurden. Die Standards wurden ebenfalls in Assaypuffer angesetzt, auf eine finale Konzentration von 1% (w/v) SSA eingestellt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Tabelle 3.4: Glutathion Assay Puffer

| Substanz | Konzentration |
|---------------------------|---------------|
| HEPES | 100 mM |
| EDTA | 5 mM |
| pH 7,5 mit HCl einstellen | |

Messungen

Vor jeder Messreihe wurden Assay Mastermix und NADPH/GSH-Reduktase frisch in Assaypuffer angesetzt und auf Eis gelagert:

Assay Mastermix: 11 Vol. Assay Puffer + 1 Vol. 10 mM DTNB

NADPH/GSH-Reduktase: 1 Vol. 10 mM NADPH + 2 Vol. 10 U/ml GSH-Reduktase

Protokoll GSH Messung in Mikrotiterplatte (96 well)

1. 120 μ l Assay Mastermix
2. 50 μ l Probe/Standard
3. Mischen durch auf-und abpipettieren
4. Absorptionsmessung bei 412 nm
5. 30 μ l NADPH/GSH-Reduktase Mix
6. Mischen durch auf-und abpipettieren
7. Kinetik bei 412 nm messen, bis die Steigung abflacht, min. 1 min

$$c_{\text{reduziert}} = (Abs_{412nm} * m + b) * d \quad (3.6)$$

$$c_{\text{total}} = (dAbs_{412nm} * m + b) * d \quad (3.7)$$

$$c_{\text{oxidiert}} = \frac{c_{\text{total}} - c_{\text{reduziert}}}{2} \quad (3.8)$$

mit

c - Glutathionkonzentration [$\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}$] d - Verdünnungsfaktor

m, b - Parameter der linearen Regression.

Die Messungen wurden an einem Mikrotiterplattenlesegerät der Firma Biotek (Powerwave XS, Winooski, VT, USA) bei 30°C durchgeführt.

3.1.7 Berechnung von Redoxpotentialen mit der Nernstgleichung

Die Berechnung von Redoxpotentialen aus Konzentrationen kann mit Hilfe der Nernst-Gleichung erfolgen. Sie berücksichtigt die Konzentrationen als Molalitäten (1 mol chemische Substanz in 1 kg Lösungsmittel), jedoch werden in biologischen Systemen meistens näherungsweise Molaritäten verwendet. Dies ist nur in wässrigen Puffersystemen möglich in denen die Dichte ungefähr 1 kg/l ist.

Für die Berechnung von intrazellulären Redoxpotentialen musste daher das Zellvolumen pro Gramm Trockengewicht abgeschätzt werden. Es wurde in Carius et al. [2011] bestimmt und beträgt 2,29 ml/gDW. Mit diesem Faktor wurden die gemessenen GSH und GSSG-Werte in molare Konzentrationen umgerechnet, die dann in die Nernstgleichung eingesetzt werden konnten. In die Berechnung von Redoxpotentialen aus Konzentrationen geht auch immer das Standardpotential $E^{0'}$ ein. Es wird bei Standardbedingungen, also 298 K, 1 atm und pH 0 gemessen, wobei die Konzentrationen der Edukte und Produkte 1 molal sind. Für bioaktive Stoffe, deren physiologische Umgebung normalerweise eher im neutralen Bereich liegt, wurde $E^{0'}$ eingeführt, das bei pH 7 bestimmt wird. Möchte man Redoxpotentiale bei anderen pH-Werten berechnen, so muss die Wasserstoffionenkonzentration ebenfalls in die Nernstgleichung eingehen.

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{zF} * \ln \frac{[C_{ox}]^n}{[C_{red}]^m} * \frac{[H^+]}{[H^{+0}]} \quad (3.9)$$

Tabelle 3.5: Redoxpotential E (V), Standardpotential $E^{0'}$ (V), R Gaskonstante ($8,31 \frac{J}{K * mol}$); T Temperatur (K), F Faraday Konstante ($9,65 * 10^4 \frac{J}{V * mol}$), z Anzahl der transferierten Elektronen, m bzw. n stöchiometrische Faktoren

Analyse der organischen Säuren aus dem Kulturüberstand

Unter sauerstofflimitierten Bedingungen produziert *R. rubrum* eine Reihe von organischen Säuren, von denen die meisten mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) nachgewiesen und quantifiziert werden können. Hier wurden die organischen Säuren Fumarat, Succinat, Acetat und Propionat mit einer Inertsil-Säule 100A (5μ , ODS-3, $250 \times 4,6$ mm, GL-Sciences, USA) auf einer Agilent 1100 Series HPLC-Anlage getrennt und mit einem Diodenarray-Detektor (Typ G1330B) bei 210 nm gemessen. Dafür wurden 200μ l Kulturüberstand filtriert, das Injektionsvolumen betrug 10μ l. Die

Elution erfolgte isokratisch mit 0,1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ bei pH 2,6 und 30°C. Die verwendete Einpunktkalibrierung erfolgte extern, wobei die im Standard eingesetzten Konzentrationen der organischen Säuren 1 g/l entsprach, mit Ausnahme von Fumarat mit 0,1 g/l. Die Chromatogramme wurden mit der Software Chemstation ausgewertet.

3.2 Molekularbiologischer Arbeitsteil

3.2.1 Isolation von DNA

Genomische DNA von Bakterien wurde durch eine Phenol-Chloroform -Extraktion nach Ausubel et al. [2002] gewonnen.

1. 2 ml Flüssigkultur gegen Ende der exponentiellen Phase abzentrifugieren (1 min, 13000 rpm) und mit TES-Puffer waschen
2. Pellet in 800 μl TES-Puffer resuspendieren
3. 20 μl 20% SDS-Lösung zugeben, mischen und 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
4. 300 μl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zugeben und die Proteine ausschütteln, 10 min mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren
5. Überstand abnehmen und Punkt 4 und 5 wiederholen bis keine Proteine mehr ausfallen
6. Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen und mit 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8) und einem Volumenteil Isopropanol versetzen und durch schütteln mischen
7. DNA bei -20°C über Nacht fällen
8. 10 min bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugieren und den Überstand verwerfen
9. Das Pellet mit 70% Ethanol (reinst, nicht vergällt) überschichten und 10 min bei RT inkubieren
10. 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren und den Überstand verwerfen

Tabelle 3.6: TES-Puffer

| Substanz | Konzentration |
|------------|---------------|
| Tris (HCl) | 50 mM |
| EDTA | 5 mM |
| NaCl | 50 mM |
| pH-Wert | 8 |

Tabelle 3.7: EB-Puffer

| Substanz | Konzentration |
|------------|---------------|
| Tris (HCl) | 10 mM |
| pH-Wert | 8,5 |

11. Pellet bei 60-70°C im Trockenschrank trocknen und in EB-Puffer resuspendieren
12. mehrfaches auf und ab pipettieren schert die DNA

3.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

nach [Kleppe et al. 1971, Mullis et al. 1987]

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit der DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (GoTaq PCR System, Promega) gearbeitet. Es wurden ausschließlich die mitgelieferten Puffer und Lösungen verwendet. Probenzusammensetzung für die PCR:

- 6 μ l goTaq Flexi Puffer
- 1,8 μ l $MgCl_2$ (25 mM)
- 0,5 μ l dNTP Mix (je 12,5 mM)
- 0,25 μ l goTaq Polymerase (5 u/ μ l)
- je 1 μ l Primer (25 pmol/ μ l)
- 1 μ l Template (500 ng genomische DNA, Kultur oder 1 Kolonie)
- mit autoklaviertem Reinstwasser auf 30 μ l auffüllen

Der goTaq Flexi Puffer dient im Anschluss auch noch als Ladepuffer für das Agarosegel zur Kontrolle der PCR. In einem Thermocycler (T3, Biometra, Jena) wurde das folgende Programm eingespeichert:

1. 95 °C, 5 min initiale Denaturierung
2. 95 °C, 30 s Denaturierung
3. Primerspezifische Temperatur zum Annealing, 30 s

4. 72 °C, Elongationszeit, abhängig von der Produktgröße
5. 30 Wiederholungen ab Schritt 2
6. 72 °C, 5 min abschließende Elongation
7. Kühlung auf 4 °C

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

nach [Ausubel et al. 2002]

Zum Nachweis definierter DNA Fragmente aus PCR oder Verdau wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt [Lottspeich 2006]. Dazu wurde Agarose in Konzentrationen von 1-2% in TPE Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht und in eine Gelkammer (Mini, CTI GmbH, Idstein) gegossen. Die Konzentration des Gels richtete sich nach den erwarteten Fragmentgrößen: Über 2000 bp 1%, 500-2000 bp 1,5 % und kleiner als 500 bp 2% [Mühlhardt 2008].

Waren die Proben noch nicht in Probenpuffer gelöst, so wurde Ladepuffer (6x konz. Orange DNA Loading Dye, Fermentas) zugegeben. Zum Färben der DNA wurde entweder bei DNA-Fragmenten über 1000 bp direkt 5 μ l Sybr Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) in die flüssige Agarose gegeben, oder das Gel nach dem Lauf in einer Sybr Safe Lösung 30 min lang gefärbt. In beiden Fällen wurde Sybr Safe 10.000 fach verdünnt. Der Farbstoff ist leicht positiv geladen und läuft daher in entgegengesetzter Richtung zur DNA durch das Gel. So kann es vorkommen, dass kleine DNA Fragmente schlecht gefärbt werden. Sollte die Färbung mit Sybr Save nicht ausreichen, wurde mit einer Ethidiumbromidlösung (1 μ g/ml) nachgefärbt.

Als Größenmarker wurde o'GeneRuler 1 kb plus (Fermentas) verwendet. Nach dem Beladen wurde eine Spannung von 70 V angelegt. Je nach Größe des Gels und der Anzahl der Taschen lief es 30-120 min. Nach dem Lauf wurde die gefärbte DNA mit einem UV-Transilluminator TFX-20-M (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) sichtbar gemacht und fotografiert (E.A.S.Y. 429 System Herolab, Berlin).

3.2.4 Restriktionsverdau von DNA

In dieser Arbeit kamen ausschließlich Enzyme und Puffer der Firma New England Biolabs (NEB, Ipswich, MA, USA). Ein Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 2 μ g DNA

- 4 μ l 10x Puffer
- falls notwendig 4 μ l BSA
- 1 μ l Restriktionsenzym (20 U)
- auffüllen auf 40 μ l mit autoklaviertem Reinstwasser
- bei 37°C 2 h inkubieren
- danach das Restriktionsenzym bei 65°C inaktivieren

[Ausubel et al. 2002]

3.2.5 Ligation von DNA

Das Zusammenfügen von verdauten DNA-Fragmenten erfolgte durch eine Ligation mit T4-Ligase der Firma Promega nach folgendem Protokoll:

- 100-200 ng Plasmid und Insert
- 1 μ l 10x T4 Ligase Puffer mit ATP
- 0,33 μ l T4 Ligase
- mit autoklaviertem Reinstwasser auf 10 μ l auffüllen
- Ligation über Nacht bei Raumtemperatur

Das Verhältnis von Insert zu Plasmid variierte, wobei möglichst das Insert im Überschuss vorhanden war. [Ausubel et al. 2002]

3.2.6 Genetische Veränderung von *E. coli* durch Transformation

Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen mit der RuCl_2 -Methode

1. 50 ml Psi Broth vgl. Tab. 3.11 mit einer über-Nacht-Kultur (1:100) animpfen
2. bis zu einer OD_{550} von 0,5 bei 37°C inkubieren
3. 15 min auf Eis abkühlen
4. Zellen ernten 3000*g, 5 min 4°C

5. Zellen in 0,4 Volumenteilen TfbI (Tab.3.8) Puffer resuspendieren
6. 15 min auf Eis
7. Abzentrifugieren 3000*g, 5 min, 4°C
8. Zellen in 0,04 Volumenteilen TfbII (Tab.3.10) Puffer resuspendieren
9. 15 min auf Eis
10. 15 µl Aliquots bei -80°C lagern

Mit dieser Methode können bis zu 10⁸ koloniebildende Einheiten pro 50 µl erzielt werden.
[Hanahan 1983]

Tabelle 3.8: TfbI Puffer

| Substanz | Konzentration |
|--------------------------------------|------------------|
| Kaliumacetat | 30 mM |
| RuCl ₂ | 100 mM |
| CaCl ₂ | 10 mM |
| MnCl ₂ x4H ₂ O | 50 mM |
| Glycerin | 15% |
| pH-Wert | 5,8 (Essigsäure) |

Tabelle 3.10: TfbII Puffer

| Substanz | Konzentration |
|-------------------|------------------|
| MOPS | 10 mM |
| CaCl ₂ | 75 mM |
| RuCl ₂ | 10 mM |
| Glycerin | 15 % |
| pH-Wert | 5,8 (Essigsäure) |

Tabelle 3.9: SOC Medium

| Substanz | Konzentration |
|-------------------|---------------|
| Trypton | 2 % |
| Hefeextrakt | 0,5 % |
| NaCl | 10 mM |
| KCl | 2,5 mM |
| MgCl ₂ | 10 mM |
| MgSO ₄ | 10 mM |
| D-Glucose | 10 mM |

Tabelle 3.11: Psi Broth

| Substanz | Konzentration |
|-------------------|---------------|
| Hefeextrakt | 0,5 % |
| Trypton | 2 % |
| MgSO ₄ | 0,5 % |
| pH-Wert | 7,6 (KOH) |

Transformation von *E. coli* nach Hanahan [1983]

1. Aliquot von kompetenten *E. coli* Zellen (vgl. Abs. 3.2.6) auftauen
2. Plasmid oder Ligationsansatz zugeben, 5 ng DNA gereinigtes Plasmid, 100 ng DNA Ligationsansatz
3. vorsichtig mischen mit Pipettenspitze oder invertieren, nicht vortexen

4. 30 min auf Eis inkubieren
5. 30 s bei 42°C (Hitzeshock)
6. 2 min auf Eis
7. 200µl SOC-Medium (Tab. 3.9) zugeben, vorsichtig mischen
8. 60-120 min bei 37°C inkubieren, leicht schütteln
9. 100 µl auf geeigneter Selektivagarplatte ausplattieren, bei 37 °C ca. 16-24h inkubieren

3.2.7 Liste der verwendeten Primer, Vektoren und Stämme

Tabelle 3.12: Liste der verwendeten Vektoren

| Plasmid | Beschreibung | Referenz |
|--------------|--|---------------------|
| pSUP202 | Suizidvektor tra ⁻ , mob ⁺ , narrow host range, tet ^R , Cm ^R , Amp ^R | [Simon et al. 1983] |
| pSUP202-ppsR | Suizidvektor mit Flanken des PpsR-Gens aus <i>R. rubrum</i> , unterbrochen durch Km ^R , in BamH1 Schnittstelle kloniert | [Henkel 2011] |
| pRK404 | broad host range mob ⁺ , Tc ^R , pRK229 Derivat | [Scott et al. 2003] |
| pRK404 PpsR | pRK404 mit kompletten PpsR-Gen | diese Arbeit |
| pET22b PpsR | Überexpressionsvector für PpsR in Bl21 | [Henkel 2011] |
| pKD4 | als Template für die Km ^R | Datsenko 2000 |

Tabelle 3.13: Verwendete Primer und Restriktionsschnittstellen

| Bezeichnung | Sequenz (5'→3') | Schnittstelle |
|---------------------|--|---------------|
| PpsrFullNdeI-FWD | gga att <u>cca</u> tat ggt gaa aca gtt gcg cga ccc | NdeI |
| PpsrFullBamHI-REV | ata <u>gga tcc</u> tca ctc ctc gcg atc acc at | BamHI |
| PpsrFullHindIII-REV | ata aag ctt ctc ctc gcg atc acc atc aa | HindIII |
| PPSR1-FWD | ata <u>gga tcc</u> gga aat cgt cct tga agg tct c | BamHI |
| PPSR1-REV | ata <u>tct aga</u> ata tcc cga atg acg ccc tc | XbaI |
| PPSR2-FWD | ata <u>aag ctt</u> tca ccc tga tga aca cca cc | HindIII |
| PPSR2-REV | ata <u>gga tcc</u> tga cat cgc gga tga cga ag | BamHI |
| KAN-FWD | ata <u>tct aga</u> tca cgc tgc cgc aag cac tc | XbaI |
| KAN-REV | ata <u>aag ctt</u> ggg gtg ggc gaa gaa ctc cag | HindIII |
| PPSRINT-FWD | cca gcc cag cac gca gga aa | - |
| PPSRINT-REV | ggg tca gcc gca cca gga ac | - |
| PPSRKO-FWD | tct tcg ccc acc cca agc ttt | - |
| PPSRKO-REV | cgg tca gtt cca agg cgg cc | - |
| PpsRcompF | ata aag ctt cca ggg tgt tcc gtc gtg gc | HindIII |
| PpsRcompR | ata <u>aag ctt</u> ctt agg gat gag gcg cgc | HindIII |

Tabelle 3.14: Übersicht über verwendete Stämme

| Stamm | relevante Eigenschaften | Quelle/Referenz |
|------------------------|--|------------------------------------|
| <i>E. coli</i> | | |
| DH5 α | <i>recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i> | [Hanahan 1983] |
| S17-1 | <i>tra⁺ RP4-2 -Tc::Mu -Km::Tn7</i> | [Simon et al. 1983] |
| BL21(DE3) | <i>recA1 pro Sm^R Cm^R Tp^R</i> <i>gal</i> λ (DE3 [lacI lacUV5-T7]) | [Studier and Moffatt 1986] |
| <i>R. rubrum</i> | | |
| ATCC 11170 | Wildtyp (S1) | [Imhoff et al. 1984] |
| PpsR ⁻ | <i>ppsR</i> Deletionsmutante, Km ^R | [Henkel 2011] |
| PpsR ⁺ | <i>ppsR</i> -Gen auf pRK404 exprimiert Tet ^R | diese Arbeit |
| SN20 | <i>ubiD</i> Mutation durch Nitroso- guanidin, <i>ubiD</i> -komplementierbar | Grammel unveröffentlichte Daten |
| <i>Rb. capsulatus</i> | | |
| ATCC 17015 | Wildtyp | [Imhoff et al. 1984] |
| <i>Rb. sphaeroides</i> | | |
| ATCC 17023 | Wildtyp | [Imhoff et al. 1984] |

3.2.8 Biparentale Konjugation: *R. rubrum* und *E. coli* S17.1

Die biparentale Konjugation [Tatum and Lederberg 1947] ermöglicht die Anzucht eines genetisch veränderten Stammes aus zwei verschiedenen Elternstämmen. In dieser Arbeit ermöglicht sie die genetische Veränderung von *R. rubrum*, das sich auf chemischem Wege nur mit größerem Aufwand transformieren lässt. [Fitzmaurice and Roberts 1991]

1. Transformation von *E. coli* S17.1 mit dem entsprechenden Plasmid/Vektorkonstrukt
2. Anzucht von *R. rubrum* Wildtyp und *E. coli* S17.1 incl. Plasmid
3. Ernte von je 10 ml Kultur aus der späten exponentiellen Phase beider Stämmen, zentrifugieren 5 min, 3000*g, 4°C
4. Waschen der Zellen mit je 5 ml sterilem 0,98 % NaCl und erneut 5 min, bei 3000*g und 4°C zentrifugieren
5. Beide Pellets in je 1 ml LB₀ Medium resuspendieren
6. Beide Zellsuspensionen mischen
7. Je 1 ml tropfenweise auf LB₀-Agarplatten geben, sodass einzelne Spots entstehen
8. Die Agarplatten unter der Sterilbank trocknen lassen und danach über Nacht bei 30°C inkubieren
9. Nach 12-16 h die Agarplatten mit je 2 ml M₂S-Medium überschichten und die Zellen mit einer Pipettenspitze ablösen
10. In Verdünnungen von 1:100, 1:200 und 1:1000 auf geeignete Selektivagarplatte (Minimalmedium für *R. rubrum* mit Antibiotikum) ausplattieren
11. Nach ca. 10 Tagen sind die ersten Kolonien sichtbar

Tabelle 3.15: LB₀- Medium

| Substanz | Konzentration |
|-------------|---------------|
| Trypton | 1 % |
| Hefeextrakt | 0,5 % |
| NaCl | 0,5 % |

3.2.9 Klonierungsschema für die Erstellung von *R. rubrum* PpsR⁻

Mithilfe der Primerpaare PPSR1-FWD und -REV sowie PPSR2-FWD und -REV wurden der vordere und hintere Teil des *ppsR*-Gens amplifiziert und mit Restriktionsschnittstellen für BamH1, XbaI und HindIII versehen. Die Kanamycinresistenzkassette wurde ebenfalls amplifiziert und mit Schnittstellen versehen. Nach der Ligation entstand folgendes Konstrukt:



Abbildung 3.2: Ligation der Fragmente PpsR1, Kanamycinresistenzkassette und PpsR2 ergab dieses Konstrukt

Es wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym BamH1 in den Suicidvektor pSUP202 kloniert. Dieser Vektor kann in *R. rubrum* nicht repliziert werden, sodass alle Gene die transkribiert werden sollen in das Genom integriert werden müssen. Dies soll aufgrund der angefügtem homologen Sequenzen des *ppsR*-Gens bevorzugt innerhalb eben dieses Gens erfolgen. Die Homologen Sequenzen mussten hier relativ kurz (ca. 150 bp) gewählt werden, um die Stabilität des Vektors nicht zu stören. *R. rubrum* besitzt einen sehr hohen GC-Gehalt von 65% was solche Instabilitäten begünstigt.

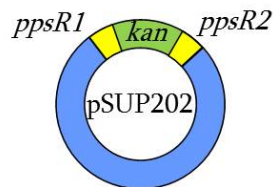


Abbildung 3.3: Nach der Ligation in den Suicidvektro pSUP202 entstand dieses Konstrukt

Der Vektor wurde dann in *E. coli* DH5 α transformiert und dort amplifiziert. Nach der Kontrolle mittels Verdau und PCR erfolgte die Übertragung in *E. coli* S17.1 und die Konjugation mit *R. rubrum*. Nach ca. 1 Woche auf M2S-Agarplatten mit Kanamycin zeigten sich die ersten Kolonien. Sie wurden auf Ampicillin und Chloramphenicol Resistenzen getestet, die für eine vollständige und unspezifische Rekombination hinweisen würden. Anschließend erfolgt die weitere Kontrolle der Stämme mittels PCR: Mit verschiedenen Primern wurde die korrekte Position im Genom und die tatsächliche Deletion des PpsR-Gens bestätigt.

3.3 Proteinbiochemischer Arbeitsteil

3.3.1 Zellaufschluss

Um zelluläres Protein zu gewinnen, z.B. aus heterologen Expressionsstämmen wurden die Zellen mit dem Ultraschallstab (Sonopuls HD 3100, Bandelin, Berlin) in 5 Zyklen zu je 30 s bei 50 % Leistung aufgeschlossen. Um Denaturierung zu vermeiden wurde der Aufschluss auf Eis durchgeführt und Pausen von min. 2 min zwischen den Zyklen eingehalten.

3.3.2 Heterologe Expression von PpsR in *E. coli* BL21 (DE3)

Für die heterologe Expression von PpsR aus *R. rubrum* in *E. coli* wurde der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) mit pET22b-PpsR verwendet, der in Diplomarbeit von Henkel [2011] konstruiert wurde. Dieser Stamm zeichnete sich durch eine deutlich höhere Proteinexpression aus als das Konstrukt mit pET15b. Die beiden Plasmide unterscheiden sich nur durch die Position des His-Tags, in pET22b befindet er sich auf der C-terminalen, in pET15b auf der N-terminalen Seite.

Induktion der Proteinproduktion

1. Übernacht Kultur in LB₀ Medium mit Ampicillin (1:100) animpfen
2. Neue Kultur aus der über-Nacht Kultur animpfen mit OD₅₅₀ = 0,5 mit Ampicillin (1:200)
3. Bis OD₅₅₀ = 1-2 bei 37°C inkubieren
4. 0,1 Volumen 100 mM IPTG (sterilfiltriert) zugeben, finale Konzentration 10 mM
5. 2 h bei 37°C inkubieren

Aufreinigung von PpsR mit NiNTA-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung von Proteinen mit His-Tag erfolgte über eine Affinitätschromatographie, bei der man sich die Affinität von Histidin zu Nickel oder Cobalt zu Nutze macht [Hochuli et al. 1988]. Der His-Tag bindet mit größerer Affinität an die Nickel-NTA-Agarose als das restliche Zellprotein. So kann zunächst das Zellprotein abgewaschen werden und danach das Protein mit His-Tag eluiert werden. Als Konkurrenzmolekül

zum Histidin setzt man Imidazol in verschiedenen Konzentrationen ein [Hengen 1995]. In dieser Arbeit wurden das HisPur Spin Column Kit von Pierce und das His-Bind Kit von Novagen verwendet. Beide Kits wurden nach den Vorgaben des Herstellers benutzt.

Tabelle 3.16: PBS-Phosphat gepufferte Saline

| Substanz | Konzentration |
|----------------------------------|---------------|
| Na ₂ HPO ₄ | 20 mM |
| NaCl | 300 mM |
| pH-Wert | 7,4 (HCl) |

Tabelle 3.17: Imidazolkonzentrationen in PBS für das HisPur Spin Column Kit

| Puffer | Imidazolkonzentration |
|-----------------------|-----------------------|
| Equilibrierungspuffer | 10 mM |
| Waschpuffer | 25 mM |
| Elutionspuffer | 250 mM |

Tabelle 3.18: Puffer für das His-Bind Kit

| Substanz | Konzentration |
|----------|---------------|
| NaCl | 500 mM |
| TrisHCl | 20 mM |
| pH-Wert | 7,9 (HCl) |

Tabelle 3.19: Imidazolkonzentrationen in TrisHCl für das His-Bind Kit

| Puffer | Imidazolkonzentration |
|----------------|-----------------------|
| Bindungspuffer | 5 mM |
| Waschpuffer | 60 mM |
| Elutionspuffer | 1000 mM |

Herstellung von gesättigtem Resin

Bei der Entsalzung des Proteins traten Probleme auf, wobei es keine Rolle spielte, ob die Entsalzung mittels Dialyse oder Filtration durchgeführt wurde. Henkel [2011] entsalzte mittels einer NAP-5 Säule, prüfte dabei aber nicht, ob Protein bei der Entsalzung verloren ging. Auf der Säule konnte er ausgefallenes Protein nicht sehen. Bei der Dialyse gegen PBS traten schon massive Verluste durch ausgefallenes PpsR-Protein auf, das sich auch nicht wieder lösen ließ. Auch bei der Entsalzung mittels Ultrafiltration traten diese Schwierigkeiten auf. Um diese Problematik zu umgehen, wurde für den Versuch zur DNA-Bindung das Resin direkt mit Protein abgesättigt. Dazu wurde die NiNTA-Säule mit Rohextrakt beladen und 2 Waschschriffe laut Protokoll durchgeführt. Dann wurde sie mit Equilibrierungspuffer bzw. Binding Buffer äquilibriert und es wurde noch einmal Rohextrakt aufgetragen. Dieser Vorgang wurde noch 2 mal wiederholt, bis davon ausgegangen werden konnte, dass fast alle Positionen von PpsR-Protein besetzt waren. Vor dem Umpuffern auf Protein-DNA-Bindepuffer oder Puffer mit definiertem Redoxpotential wurden noch 4 Waschschriffe durchgeführt, bis kein Protein mehr eluierte.

Herstellung von Puffern mit definiertem Redoxpotential

Zur Herstellung von Puffern mit definiertem Redoxpotential wurde das Redoxpaar GSH und GSSG verwendet. Dieses Paar ist besonders gut geeignet, da ohne das Enzym Glutathion-Reduktase keine Reaktionen stattfinden und das eingestellte Redoxpotential lange stabil bleibt. Mit Hilfe der Nernst-Gleichung (vgl. Gleichung 3.1.7) wurden die erforderlichen Konzentrationen für das gewünschte Redoxpotential ermittelt. GSH reagiert leicht sauer, sodass der pH-Wert der Lösungen ungefähr pH 3 war. Um keine störenden Puffersubstanzen zugeben zu müssen, wurde der pH-Wert so belassen. Das Redoxpotential ist pH-abhängig, jedoch wurden hier die Potentiale weiterhin für pH 7 angegeben, da dies der für Proteine relevante Bereich ist. Dies ist möglich, da das Redoxpotential in beiden Fällen gleich vom pH-Wert beeinflusst wird.

Tabelle 3.20: Zusammensetzung der GSH-Redoxpuffer, die Redoxwerte wurden mit Hilfe der Nernst-Gleichung (vgl. Abs. 3.1.7) berechnet.

| Konzentration | | Redoxwert [mV] | |
|---------------|-----------|----------------|------|
| GSH [M] | GSSG [M] | pH 7 | pH 3 |
| 0,00001* | 0,01 | 0 | 180 |
| 0,00002 | 0,01 | -18 | 162 |
| 0,00006 | 0,01 | -47 | 133 |
| 0,0002 | 0,01 | -78 | 102 |
| 0,0004 | 0,01 | -96 | 84 |
| 0,001 | 0,009 | -121 | 59 |
| 0,002 | 0,004 | -150 | 30 |
| 0,007 | 0,002 | -192 | -12 |
| 0,009 | 0,001 | -207 | -27 |
| 0,001 | 0,000001* | -300 | -120 |

*Konzentration geschätzt

3.3.3 SDS-PAGE und native PAGE

SDS-PAGE - Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zum Nachweis der Aufreinigung von Proteinen wurden SDS-PAGEs angefertigt. Bei dieser Methode werden die Proteine in der Probe durch das Detergenz SDS linearisiert und durch eine Gelelektrophorese nach der Größe aufgetrennt. Mithilfe eines Größenmarkers

kann man die ungefähre Größe eines Proteins abschätzen, die Expression eines Proteins überwachen oder die Aufreinigung eines Proteins kontrollieren. In dieser Arbeit wurde die Gelelektrophorese nach Laemmli [1970] durchgeführt und es wurden Laufleinrichtung von Biometra und zur Stromversorgung PowerPac300 von BioRad eingesetzt.

Probenvorbereitung für die SDS-PAGE

Die Proben für die SDS-PAGE konnten sowohl aus ganzen Zellen, als auch aus Proteinextrakten hergestellt werden.

1. Zellen ernten: 1 ml Kultur bei 13000*g 5 min lang zentrifugieren
2. Pellets in 50µl 5x SDS-Probenpuffer je OD/ml resuspendieren
3. Proteinextrakte (vgl. Abs. 3.3.1) mit 0,25 Volumenteilen 5x SDS-Probenpuffer versetzen
4. Proben bei 95°C und 300 rpm im Thermomixer 5 min lang kochen
5. 20 µl pro Tasche auf das SDS-Gel laden

Tabelle 3.21: SDS-Probenpuffer (5x)

| Substanz | Konzentration |
|----------------|---------------|
| SDS | 10% w/v |
| DTT | 10 mM |
| Glycerin | 20 % v/v |
| Tris | 200 mM |
| Bromphenolblau | 0,05 % w/v |
| pH-Wert | 6,8 (HCl) |

Herstellung der SDS-Gele

Die SDS-Gele wurden nach dem Zusammensetzen der Gelkammern nach folgendem Rezept gegossen:

1. Trenngelmixtur zusammengeben, das APS als Radikalstarter als Letztes zufügen
2. zügig das Trenngel giessen
3. mit Isopropanol überschichten

Tabelle 3.22: Oberer Gelpuffer (4x)

| Substanz | Konzentration |
|----------|---------------|
| Tris | 6 % |
| SDS | 0,4 % |
| pH-Wert | 6,8 (HCl) |

Tabelle 3.23: Unterer Gelpuffer (4x)

| Substanz | Konzentration |
|----------|---------------|
| Tris | 18,15 % |
| SDS | 0,4 % |
| pH-Wert | 8,8 (HCl) |

Tabelle 3.24: Trenngel

| Lösung | Volumen |
|-------------------|------------|
| Acrylamidlösung | 2,2 ml |
| unterer Gelpuffer | 1,5 ml |
| H ₂ O | 2,3 ml |
| Temed | 5 μ l |
| APS | 10 μ l |

Tabelle 3.25: Sammelgel

| Lösung | Volumen |
|------------------|------------|
| Acrylamidlösung | 0,2 ml |
| oberer Gelpuffer | 0,5 ml |
| H ₂ O | 1,3 ml |
| Temed | 5 μ l |
| APS | 10 μ l |

4. nach ca. 60 min ist das Gel auspolymerisiert
5. das Isopropanol abgiessen und Reste mit einem saugfähigen Tuch entfernen
6. Sammelgelmixtur zusammengenben, das APS als Radikalstarter als letztes zufügen
7. zügig das Sammelgel giessen und einen Kamm mit der gewünschten Taschenzahl und Größe aufstecken
8. mindestens 30 min polymerisieren lassen

Native PAGE - native Polyacrylamid Gelelektrophorese

Um Tertiär und Quartärstrukturen von Proteinen sichtbar zu machen, in diesem Falle Änderungen im Redoxzustand des PpsR-Proteins durch z.B. inter- oder intramolekulare Disulfidbrücken wurden native PAGEs angefertigt. Sie arbeiten ohne das linearisierende Detergenz SDS, wodurch die native Struktur des Proteins erhalten bleibt. [Rehm and Letzel 2010, Schägger and von Jagow 1991]

Das hier verwendete Protokoll funktioniert ohne separates Sammelgel, der Kamm wird also einfach auf das Trenngel aufgesteckt.

Tabelle 3.26

Nativer Laufpuffer (5x)

| Substanz | Konzentration |
|----------|---------------|
| Glycin | 1 M |
| Tris | 125 mM |
| pH-Wert | 8,9 (NaOH) |

Tabelle 3.27

Nativer Probenpuffer

| Substanz | Konzentration |
|----------|---------------|
| Glycerin | 10 % |
| Glycin | 40 mM |
| Tris | 5 mM |
| pH-Wert | 8,9 (NaOH) |

Tabelle 3.28

Natives Gel

| Lösung | Volumen |
|------------------|-------------|
| Acrylamidlösung | 2,16 ml |
| Laufpuffer | 1,44 ml |
| H ₂ O | 3,36 ml |
| Temed | 3,6 μ l |
| APS | 36 μ l |

Nach dem Zusammensetzen der Gelkammern wurde die Gelmixtur zusammengegeben und gut gemischt. Das Gel wurde zügig gegossen und der Kamm blasenfrei direkt auf das Trenngel aufgesetzt. Nach min. 2 h Polymerisation wurde das Gel beladen, wobei die Proben mit nativem Probenpuffer versetzt wurden. Dem farblosen Puffer konnte nach Belieben noch mit 0,05 % Bromphenolblau pro Probe zugesetzt werden. Das Gel lief ungefähr 1 h bei 4 °C bei 12,5 mV bis die Bromphenolblau-Bande am unteren Ende des Gels angekommen war.

Heisse Coomassie-Färbung

Einige der Acrylamidgele wurden mit Coomassie Brilliant Blue Lösung angefärbt [Bennett and Scott 1971]. Um den Färbevorgang zu beschleunigen wurde ein Protokoll verwendet, bei dem das Gel in der Färbelösung in der Mikrowelle erhitzt wird (Hot Coomassie Stain, Phast Gel System, GE Healthcare) [Rehm and Letzel 2010].

1. Gel aus der Laufkammer nehmen und in einer mikrowelleneigneten Schale mit Coomassie Stain Lösung überschichten
2. In der Mikrowelle bei 800 W erhitzen, bis die Lösung kocht
3. 30 min auf dem Wippschüttler bei Raumtemperatur inkubieren
4. Färbelösung abgiessen (kann mehrfach verwendet werden), Gel kurz mit VE-Wasser spülen
5. Mit Entfärbelösung überschichten, in der Mikrowelle aufkochen
6. Einige Cellulosetücher zusammengerollt am Rand in die Schale geben
7. 30 min auf dem Wippschüttler entfärben

8. Bei Bedarf Entfärbeschritte wiederholen bis die Banden gut sichtbar sind

Tabelle 3.29: Coomassie-Färbelösung

| Substanz | Konzentration |
|-----------------------|---------------|
| Phast Gel Blue R-Tabs | 0,025 % |
| Essigsäure | 10 % |

Tabelle 3.30: Entfärbelösung / Lösung 1

| Substanz | Konzentration |
|------------|---------------|
| Methanol | 20 % |
| Essigsäure | 10 % |

Silberfärbung [Heukeshoven and Dernick 1988]

Eine Silberfärbung ermöglicht eine deutlich sensitivere Proteindetektion (5-30 ng/Bande) als eine Coomassie Färbung (200-400 ng/Bande) [Rehm and Letzel 2010]. Sie wurde also bei geringen Proteinkonzentrationen in den Proben eingesetzt. Es ist ebenfalls möglich, eine bereits mit Coomassie gefärbte PAGE noch einmal mit Silber nachzufärben.

1. Fixieren der Banden im Gel mit Lösung 1 (vgl. Abs. 3.30) für min 1 h (enfällt bei vorheriger Coomassie-Färbung)
2. 30 min Reduktion in Lösung 2
3. 3x 5-10 min Waschen mit Reinstwasser
4. 15 min Färben mit Lösung 3
5. 20 s mit Reinstwasser spülen
6. 3-15 min Entwickeln mit Lösung 4
7. Abstoppen mit Lösung 1

Tabelle 3.31

Reduzierlösung / Lösung 2

| Substanz | Konzentration |
|---|---------------|
| Na ₂ S ₂ O ₃ | 200 mg/l |

Tabelle 3.32

Färbelösung / Lösung 3

| Substanz | Konzentration |
|-------------------|---------------|
| AgNO ₃ | 0,2 % |

Tabelle 3.33

Entwickler / Lösung 4

| Substanz | Konzentration |
|---|---------------|
| Na ₂ CO ₃ | 30 g/l |
| Na ₂ S ₂ O ₃ | 5 mg/l |
| Formaldehyd | 500 µl/l |

3.3.4 Proteinmengenbestimmungen

Bicinchonin-Säure (BCA) Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Assay beruht auf zwei Reaktionsschritten. Im ersten Schritt wird das Kupferion aus CuSO_4 von den Peptidbindungen von Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert. Diese Reaktion ist temperaturabhängig. Im zweiten Schritt bildet die namensgebende Substanz Bicinchonin-Säure einen Chelat-Komplex mit Cu^+ , der stark bei 562 nm absorbiert und daher lila gefärbt ist. Der BCA-Assay ist wenig abhängig von der Aminosäure-Zusammensetzung der Probe und kann so auch für gereinigte Proteine verlässliche Werte ergeben. [Smith et al. 1985]

In dieser Arbeit wurde das BCA Protein Assay Kit von Pierce Biotechnology/ Thermo Scientific nach den Herstellerangaben verwendet. Die Farbreaktion wurde in einer 96er Mikrotiterplatte an einem PowerWave XS der Firma Biotek erfasst. Zur genauen Quantifizierung wurde eine Standardreihe mit definierter BSA-Konzentration mitgemessen.

Quantifizierung nach Warburg and Christian [1941]

Für eine schnelle Proteinbestimmung in geringen Probenvolumina wurde ein NanoDrop-Photometer verwendet, das die Absorption jeweils bei 260 und 280 nm Wellenlänge misst und nach der Formel 3.10 die Proteinkonzentration berechnet. Diese Methode benötigt nur 1 μl Probenvolumen, jedoch muss berücksichtigt werden, ob sich Substanzen in der Probe befinden, die im UV-Bereich absorbieren. Wenn größere Probenvolumina zur Verfügung standen wurde in UV-fähigen Quarzküvetten im Jasco V-670 (Jasco, Tokyo, Japan) gemessen. Nach der Ligandenaffinitätschromatographie wurde in UV-fähigen Mikrotiterplatten im Biotek-Reader Powerwave XS (Winooski, VT, USA) gemessen. Die Funktion Pathlengthcorrection glich unterschiedliche Füllstände aus.

$$(1,55 * Abs_{280}) - (0,76 * Abs_{260}) = c(Protein)[mg/ml] \quad (3.10)$$

3.4 Entwicklung einer Ligandenaffinitätschromatographie mit Ubichinon als Ligand

Zur schnellen spezifischen Aufreinigung von Proteinen, die Liganden binden können, ist die Ligandenaffinitätschromatographie ein sehr mächtiges Werkzeug. Zwar ist die

Entwicklung einer spezifischen Chromatographie relativ aufwändig, aber keine andere Aufreinigungsmethode ermöglicht so hohe Reinigungsfaktoren wie die Ligandenaffinitätschromatographie von bis zu 10.000-fach in einem Schritt [Novick and Rubinstein 2012]. Wie bei der gewöhnlichen Affinitätschromatographie binden die zu reinigenden Proteine am Säulenmaterial während die restlichen Proteine bei Waschschrritten abgespült werden. Nach dem Waschen werden die Pufferbedingungen so abgeändert, dass die gebundenen Proteine eluieren. Das besondere an einer Ligandenaffinitätschromatographie ist, dass die Liganden speziell für ein Protein oder eine Proteinklasse entwickelt werden und daher hochspezifische Ergebnisse geliefert werden [?].

Die Aufreinigung der Proteine basiert also auf spezifischen Wechselwirkungen mit ihren Liganden. Diese können, je nach Funktion des Proteins z.B. Substrate sein, die umgesetzt werden, Erkennungssequenzen auf DNA, oder andere Proteine. Wichtig für eine Ligandenaffinitätschromatographie ist eine Wechselwirkung, die kräftig und spezifisch genug ist, um die Reinigungsschritte zu überstehen. Meistens werden bei der Ligandenaffinitätschromatographie keine kovalenten Wechselwirkungen eingegangen, sodass die Bindung wieder zu lösen ist [Rudat 2006]. Aktuell werden in der Forschung vor allem Cytokine mit Ligandenaffinitätschromatographie aufgereinigt [Novick and Rubinstein 2007], aber auch Methoden für die Reinigung einer Benzenhexacarbonsäure-Decarboxylase [Rudat 2006] oder Immunoglobulin [Yang et al. 2009] wurden entwickelt.

Die Elution der Proteine kann durch verschiedene Mittel erfolgen. Sehr gut geeignet ist die Substratkonkurrenz, bei der lose Liganden in Puffer zugegeben werden und die Proteine eluieren. Dieses Prinzip ist hochspezifisch, da nur tatsächlich spezifische Wechselwirkungen gelöst werden können. Weitere Möglichkeiten wie die Änderung von Ionenstärke oder pH-Wert kommen ebenfalls in Frage, sind aber meist deutlich weniger spezifisch [Rudat 2006].

Um ein Säulenmaterial zu erhalten, mit dem Ubichinon 10-bindende Proteine gefunden, gereinigt und identifiziert werden können, musste zunächst ein passendes Grundmaterial gefunden werden. Für wässrige Chromatographien eignet sich Sepharose gut. Sepharose ist mit verschiedenen Spacern und chemischen Gruppen erhältlich, über die dann der Ligand gekoppelt und immobilisiert werden kann. Bei einem Molekül wie Ubichinon 10 stellte sich eine besondere Problematik, da nach der Kopplung die reaktive Kopfgruppe frei verfügbar sein soll, während der lipophile Schwanz des Moleküls für die Funktionalität eine untergeordnete Rolle spielt [Swem et al. 2006]. Also musste Ubichinon 10 mit dem Isoprenschwanz an die Sepharose gebunden werden. Da Isopreneinheiten eine sehr geringe Reaktivität aufweisen, musste zunächst eine chemische Gruppe eingeführt wer-

den, die sich dann mit dem Sepharosematerial koppeln liess. Auch bei der Einführung einer chemischen Gruppe durfte die Kopfgruppe nicht beschädigt werden. Zur Oxidation des Isoprenschwanzes von Ubichinon 10 gibt es zwei mögliche Ansätze: 1. Oxidation mit Kaliumpermanganat (KMnO_4) und 2. Oxidation durch Ozonolyse.

3.4.1 Oxidation der Isoprenseitenkette von Ubichinon 10

Oxidation von Ubichinon 10 mit Kaliumpermanganat

Die Oxidation von Ubichinon 10 mit Kaliumpermanganat wurde nach Lee et al. [1990] durchgeführt. Die Chemikalien wurden zusammen in einen Dreihalskolben mit rundem Boden gefüllt. Es bildeten sich zwei Phasen, die durch schnelles Rühren auf Eis vermischt wurden. 0,8 g KMnO_4 wurde in kleinen Portionen zugegeben. Die Mixtur wurde für 3 h auf Eis gerührt. Nach Entfernen des Eises wurde das Rühren noch für 18 h bei Raumtemperatur fortgesetzt. Zum Abschluss wurde das restliche KMnO_4 mit 0,6 g NaHSO_3 reduziert. Die Trennung der beiden Phasen erfolgte in einem Scheidetrichter und die organische Phase wurde per HPLC analysiert und aufgereinigt.

Tabelle 3.34: Reaktionsgemisch für die Oxidation von Ubichinon 10 mit Permanganat

| Substanz | Menge |
|-------------------------|------------------|
| H_2O | 10 ml |
| H_2SO_4 | 9M 1,2 ml |
| Adogen 464 | 50 μl |
| Eisessig | 2 ml |
| Dichlormethan | 2 ml |
| Ubichinon 10 | 1 g |

Die Oxidation von Ubichinon 10 durch Ozonolyse

Die Ozonolyse wurde nach Veselovskii et al. [1982] durchgeführt. Dazu wurden 5 g 10 in 100 ml Benzen und 0,4 ml Methanol gelöst. Die Lösung wurde dann 20 min lang auf Eis mit Ozon aus dem Ozongenerator (Sander, Labor-Ozonisator) mit einem Sauerstofffluss von 30-40l/h behandelt, das leider nicht quantifiziert werden kann. Die Zugabe von 2 ml 30 % H_2O_2 vervollständigte die Reaktion. Nun erfolgte ein Waschschrift mit gesättigter NaCl -Lösung im Scheidetrichter. Um das Wasser vollständig zu entfernen, wurde zu-

sätzlich etwas Na₂SO₄ zugegeben. Dann erst erfolgte die Trennung der beiden Phasen. Auch hier wurde die organische Phase per HPLC analysiert und gereinigt.

HPLC-Analyse und Aufreinigung der Oxidationsprodukte

Die HPLC-Methodik wurde von der Analyse von reduziertem und oxidiertem Chinon aus Grammel and Ghosh [2008] abgeleitet. Da weniger lipophile Produkte erwartet wurden, als das Edukt Ubichinon 10, wurde die Methode abgewandelt, sodass zu Beginn der Chromatographie nur 50 % des Eluenten, also Methanol/Isopropanol im Verhältnis 4:1 incl. 10 mM Ammoniumacetat und zur anderen Hälfte Wasser verwendet wurde. So wurden auch die Chinone mit gekürzten Isoprenschwänzen ausreichend retentiert und konnten auch getrennt werden. Im Gegensatz zur Ubichinon 10-Analytik wurde eine Inertsil reversed phase Säule (C18, 5 μ , ODS-3, 250 x 4,6 mm oder 250 x 10mm, GL-Sciences, USA) statt des Zorbax-Materials verwendet.

Um auch Ubichinon 10-Reste und länger-kettige Produkte entfernen zu können, steigerte die Methode den Gehalt an Eluenten in Form eines linearen Gradienten auf 100% in einer Zeit von 15 min. Die Regeneration der Ausgangskonzentrationen erfolgte in den folgenden 10 min des Programms. Die DAD-Detektion bei 275 nm zeigte die erhaltenen Chinone an, während bei 210 nm organische Säuren, die aus den abgespaltenen Isopreneinheiten entstehen, sichtbar werden. Die analytische HPL-Chromatographie wurde mit einem Fluss von 1 ml/min betrieben.

Für das Trennen der Produkte von den organischen Säuren und zur Isolation der entstandenen Produkte für die weitere Analyse wurde eine Chromatographie-Säule in semipräparativem Maßstab eingesetzt. Durch den deutlich größeren Säulendurchmesser musste der Fluss auf 3 ml/min angepasst werden. Der Fraktionssammler wurde so programmiert, dass die Peaks auf der 275 nm Absorptionsspur (muss im DAD dann Kanal A sein) detektiert und gesammelt wurden. Für alle HPL-Chromatographischen Anwendungen wurde das Agilent 1100 Series System (Agilent, Santa Clara, CA, USA) verwendet.

Analyse der Reaktionsprodukte

Die gesammelten Fraktionen der beiden Oxidationsansätze wurden im Lyophilisator getrocknet und zur weiteren Analyse in Ethanol aufgenommen. Für die Infrarotspektroskopie wurde trockenes Material verwendet. UV-Spektren wurden an einem Spektrometer der Firma Jasco (Tokyo, Japan) aufgenommen und mit dem Spectra Manager analy-

siert und exportiert. Die Infrarotspektren wurden in der AG von Prof. Kai Sundmacher mit Hilfe von Ivan Ivanov aufgezeichnet. Es wurde das “Nicolet-6700 FT-IR Spectrometer” von Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) und die ATR Einheit “Smart Orbit“ verwendet. NMR-Spektren wurden an der Universität Magdeburg von Frau Dr. Liane Hilfert am Institut für Organische Chemie der Otto von Guericke Universität Magdeburg gemessen und ausgewertet.

3.4.2 Probenvorbereitung für die Ligandenaffinitätschromatographie

Die Proteine, die mit dieser Affinitätschromatographie gereinigt werden sollen sind Membranproteine. Das bedeutet, dass sie in rein wässrigen Puffern fast unlöslich sind. Um dieses Problem zu umgehen kann man Detergenzien einsetzen, die die Membranproteine solubilisieren. Detergenzien oder Seifen sind amphiphile Moleküle, die sich an die lipophilen Bestandteile von Membranproteinen anheften und so die Phospholipide verdrängen. Da sie auch eine hydrophile Seite besitzen geht das Membranprotein dadurch in Lösung. [Rehm and Letzel 2010]

Membranpräparation und Proteinsolubilisierung

Die Membranpräparation erfolgte nach dem bewährten Prinzip von Swem et al. [2007]. Die Arbeitsgruppe von Carl Bauer hat bereits vor Jahren redoxsensitive Histidinkinasen aus der Membran von *Rb. capsulatus* isoliert und untersucht. Da *Rb. capsulatus* als ebenfalls anoxygenes photosynthetisches Purpurbakterium relativ nah verwandt mit *R. rubrum* ist, wurde davon ausgegangen, dass eine Ubichinon 10-bindende Histidinkinase mit der gleichen regulatorischen Funktion mit dem gleichen Protokoll zu solubilisieren sein müsste.

1. Die Anzucht der Bakterien erfolgte entweder phototroph oder semiaerob, sodass Photosynthesemembranen exprimiert waren, damit die Kinase nicht schon mit oxidiertem Chinon belegt war. (Mittlerweile fanden Wu and Bauer [2010] heraus, dass RegB auch reduziertes Ubichinon bindet, obwohl nur oxidiertes Ubichinon die Kinaseaktivität unterdrückt).
2. Zellernte in der Zentrifuge (Biofuge, Heraeus, Hanau) bei 5000 rpm
3. Zellen in Lysepuffer resuspendieren und mit dem Ultraschallstab aufschließen vgl. Abs. 3.3.1

4. Zelltrümmer abzentrifugieren 5000 rpm (Biofuge, Heraeus, Hanau), Pellet verwerfen
5. Membranen in der Ultrazentrifuge (Beckman, Modell L5-50, Krefeld bei 100 000 *g) 1 h lang aufkonzentrieren, Überstand verwerfen
6. 1 ml Solubilisierungspuffer pro OD und ml der Kultur zugeben und 1 h bei RT schütteln
7. Unlösliche Bestandteile bei 150 000 *g in der Ultrazentrifuge (Beckman, Modell L5-50, Krefeld) 1 h lang abzentrifugieren und verwerfen, gekühlt höchstens 1 Tag lagern

Tabelle 3.35: Lysepuffer für Membranproteine

| Substanz | Konzentration |
|----------|---------------|
| Tris-HCL | 10 mM |
| NaCl | 100 mM |
| pH-Wert | 8 |

Tabelle 3.36: Solubilisierungspuffer

| Substanz | Konzentration |
|--------------------------------|----------------|
| TrisHCL | 20 mM |
| Imidazol | 20 mM Imidazol |
| NaCl | 300 mM |
| Glycerin | 20 % |
| n-dodecyl- β -D-Maltosid | 1% |
| pH-Wert | 8 |

3.4.3 Durchführung der Ligandenaffinitätschromatographie

Zur Vorbereitung der Ligandenaffinitätschromatographie muss zunächst der Ligand an die Matrix gekoppelt werden. Dazu muss die Carboxylgruppe mit einem Carbodiimid aktiviert werden um dann mit der Ammoniumgruppe der EAH-Sepharose 4B Matrix eine Peptidbindung einzugehen Rudat [2006]. Die Anleitung der EAH-Sepharose 4B bietet einen guten Leitfaden:

- Als Carbodiimid wurde EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) ausgewählt, da mit diesem Stoff bereits Erfahrungen vorlagen und er im Haus verfügbar war, Konzentration: 0,1 M
- Der pH-Wert wurde vor der Kopplung auf ca. 4-5 eingestellt und nach 12 h Reaktionszeit noch einmal korrigiert, dies ist wichtig, denn die Carboxylgruppe muss für die Kopplung protoniert sein.

- Die Kopplung wurde in MilliQ-Wasser durchgeführt, denn Puffer könnten durch Substratkonkurrenz die Reaktion stören.
- Die Reaktion fand bei Raumtemperatur für 24 h statt.
- Für Durchmischung sorgte ein Kippschüttler
- Die Konzentration des Liganden konnte nur grob abgeschätzt werden, da kein molarer Extinktionskoeffizient bekannt ist, behelfsmäßig wurde der molare Extinktionskoeffizient von Ubichinon 10 verwendet und die Konzentration auf ca. das doppelte des Notwendigen, also der Konzentration der Aminogruppen (7-12 $\mu\text{mol/ml}$) eingestellt.
- Nach der Kopplung wurde die Matrix in eine Mini-Kunststoffsäule gefüllt und dort abwechselnd mit 0,1 M Acetat-Puffer (pH 4) und 0,1 M Tris-Puffer (pH 8,3), beide mit 0,5 M NaCl gewaschen, insgesamt 10 mal.
- Danach, sowie vor jeder Chromatographie erfolgte das Equilibrieren mit Wasser (MilliQ)

Verlauf der Ligandenaffinitätschromatographie

Nachdem die Säule mit MilliQ-Wasser gereinigt war, wurde eine Proteinprobe von ca. 50 μl auf das Material aufgetragen. Beim Auftragen der Proben sollte im Pufferreservoir der Säule keine Flüssigkeit mehr stehen, die die Probe verdünnt und dadurch das Auftragen verzögert, aber das Material darf auch nie antrocknen. Durch Warten, bis die aufgetragene Probe in der Matrix versunken war, wurde sichergestellt, dass der zugegebene Waschpuffer (entspricht dem Solubilisierungspuffer) die Probe nicht aufwirbelte. Es wurden insgesamt 3-4 ml Waschpuffer über die Säule gegeben, bis für die Elution 20 μl Ligand (ca. 1 mg/ml) aufgegeben wurde. Nach versickern des gelb gefärbten Liganden, der die spezifischen Bindungen durch Substratkonkurrenz lösen soll, wurde ein weiterer Milliliter Waschpuffer zugegeben.

Die gesamte Chromatographie wurde mit Gravitation betrieben, sodass sie relativ zeitintensiv war. Die eluierenden Flüssigkeiten wurden manuell fraktioniert in dem jeweils 10 Tropfen in jeweils ein Well einer 96er-UV-Mikrotiterplatte gegeben wurde. Resultierende, ggf. ungleiche Flüssigkeitsstände in den Wells wurden bei der Analyse durch den Reader der Firma Biotek (Winooski, VT, USA) mit der Funktion Pathlengthcorrection

korrigiert. So wurde ermöglicht mit Hilfe eines Vollspektrums schon vor der SDS-PAGE Ergebnisse über den Proteingehalt der Fraktionen zu erhalten und zu sehen, zu welchem Zeitpunkt das Ubichinon 10-Derivat eluierte.

3.4.4 Analyse der Ergebnisse der Ligandenaffinitätschromatographie

Die Eluate der Ligandenaffinitätschromatographie wurden mittels SDS-PAGE analysiert (vgl. Abs. 3.3.3). Eine Silberfärbung mit dem Fire-Silver-Kit (Proteome-Factory Berlin) sorgte für eine MS-kompatible Färbung des Gels. Die MS-Analyse der Banden wurde von Marcus Hoffmann und Erdmann Rapp aus der Arbeitsgruppe Bio/Prozessanalytik am MPI-Magdeburg durchgeführt.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Wachstumsversuche

In den folgenden Kultivierungen wurden redoxaktive Chemikalien zugesetzt, um Änderungen in Wachstums- und Membransyntheseraten oder absoluten Zell- und PM/Zelle-Mengen zu erzielen. In allen mikroaeroben Kultivierungen im Schüttelkolben ergab sich grundsätzlich der gleiche Kultivierungsverlauf. Es wurde mit einer Vorkultur gearbeitet, die auch den späteren Kultivierungsbedingungen entsprach, also in diesem Fall mikroaerob. Daraus folgt, dass das Inokulum bereits PM gebildet hatte, was an dem hohen Startwert für die PM zu erkennen ist (OD_{880}/OD_{660} , vgl. Abb. 4.1).

Die Kultivierungen ließen sich in vier Phasen einteilen. Sie begannen mit einer aeroben Phase in der die Anzahl der Zellen noch nicht ausreichte, um den Sauerstoffeintrag durch das Schütteln zu verbrauchen. In dieser Phase wuchsen die Zellen am schnellsten und der PM-Gehalt der Zellen nahm ab. Bei einer OD von ungefähr 1 trat eine Sauerstofflimitation ein. Dieser Punkt war gekennzeichnet durch das Einsetzen der PM-Synthese. Es folgte die 2. Phase der Kultivierung, in der die Membransyntheserate am höchsten war. In Phase 3 stieg der Anteil der Photosynthesemembran pro Zelle nicht mehr, oder nur noch kaum an, die Zellen waren stark sauerstofflimitiert und wuchsen nur noch sehr langsam. Die vierte Phase war die stationäre bzw. die Sterbephase. Sie hat in dieser Arbeit keine Relevanz. In Abb. 4.1 ist eine Wachstumskurve mikroaerob auf M2S-Medium mit PM-Produktion zu sehen, die oben beschriebenen Phasen wurden markiert.

Kam Fruktose im M2SF Medium als Substrat hinzu, wurde sie zunächst simultan aufgenommen. Sobald Sauerstoff limitiert war, wurde Fruktose als vergärbare Substrat bevorzugt aufgenommen. Dadurch war sie schneller aufgebraucht als Succinat aber es kam eine ähnliche Phaseneinteilung zustande: Phase 1: Aerobes Wachstum mit 2 Substraten, Abnahme der PM; Phase 2: Membranproduktionsphase mit 2 Substraten; und

Phase 3: Mikroaerobes Wachstum nur auf Succinat, sehr langsam. Bei Wachstum auf M2SF-Medium wurden in mikroaeroben Kultivierungen mehr PM synthetisiert als auf M2S-Medium (vgl. Abs. 2.2).

Die Sterbephase, die sich an jede Kultivierung anschloss beinhaltete bei *R. rubrum* in der Regel einen Anstieg des Membranverhältnisses, da sich die Membranbestandteile lysierter Zellen noch in der Kultur befanden und die OD gleichzeitig absank. Dieser Anstieg hatte deshalb nichts mit einer geregelten Genexpression zu tun und findet hier keine Beachtung.

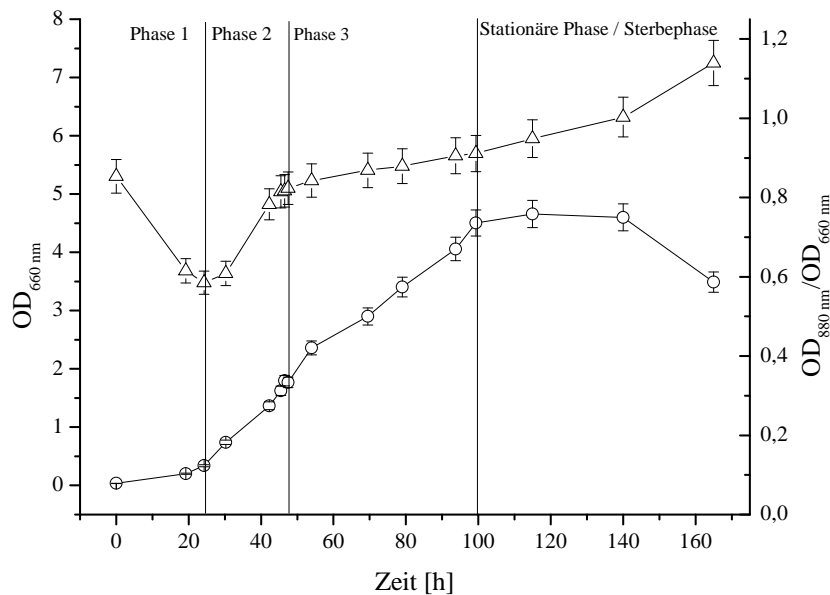


Abbildung 4.1

Wachstumsversuch mit *R. rubrum* S1 auf M2S-Medium mikroaerob im Schüttelkolben. ○: Wachstum OD_{660nm}, △: PM-Produktion OD_{880nm}/OD_{660nm}; die Fehlerbalken zeigen die maximale Verfahrensabweichung von 5 %

4.1.1 Zusatz von DTT zu den Kultivierungen

Der Zusatz von Dithiothreitol (DTT) zu den Kultivierungen verursachte zunächst trotz des sehr niedrigen Redoxpotentials von DTT (-330 mV) keine sofortige Steigerung der PM-Produktion. In Abb. 4.2 ist eine Kultivierung mit M2SF-Medium zu sehen. Bei Zugabe zum Zeitpunkt des niedrigsten PM-Levels verzögerte sich der Beginn der PM-Synthese um eine gewisse Zeit, die von der Menge des zugegebenen DTT abzuhängen

schien. War diese Phase vorüber, begann die Membransynthese. Interessanterweise übertraf dann die maximal erreichte Membranmenge pro Zelle in den Versuchen mit wenig (0,3 mM) DTT die der Kontrollen.

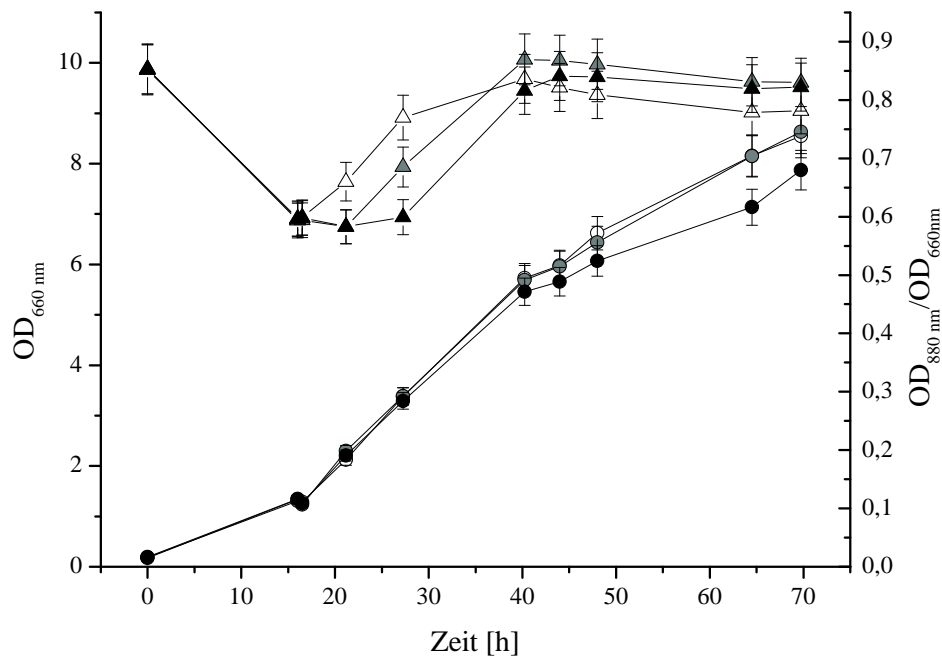


Abbildung 4.2

Wachstumsversuch mit *R. rubrum* S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von DTT bei OD = 1. ○: Wachstum OD_{660nm}, △: PM-Produktion OD_{880nm}/OD_{660nm}; □: Kontrolle; ■: 0,3 mM DTT; ●: 0,5 mM DTT; die Fehlerbalken zeigen die maximale Verfahrensabweichung von 5 %

Vergleicht man die PM-Syntheseraten und die Wachstumsraten, so zeigte sich, dass die PM-Synthese pro Zeit ungefähr gleich, jedoch die Wachstumsraten in Phase 2 deutlich unterschiedlich waren. Dies zeigt, dass DTT das Wachstum negativ beeinflusste, wobei aber nach einer kurzen Lag-Phase die PM-Syntheserate unverändert blieb.

Wurde zu aeroben Schüttelkolben (M2SF-Medium) DTT zugegebenen so zeigte *R. rubrum* schon ab einer Konzentration von 0,25 mM DTT nur noch minimalste Wachstumsraten, bei höheren DTT-Konzentrationen stagnierte das Wachstum. Eine Anregung der PM-Synthese durch das Absenken des Kulturredoxpotentials durch die Zugabe von DTT erfolgte nicht.

In M2S-Medium ohne Fruktose, mikroaerob mit DTT, verhielt sich *R. rubrum* ähnlich. Auch ohne Fruktose wurde die PM-Synthese verzögert. Wurde DTT erst nach dem

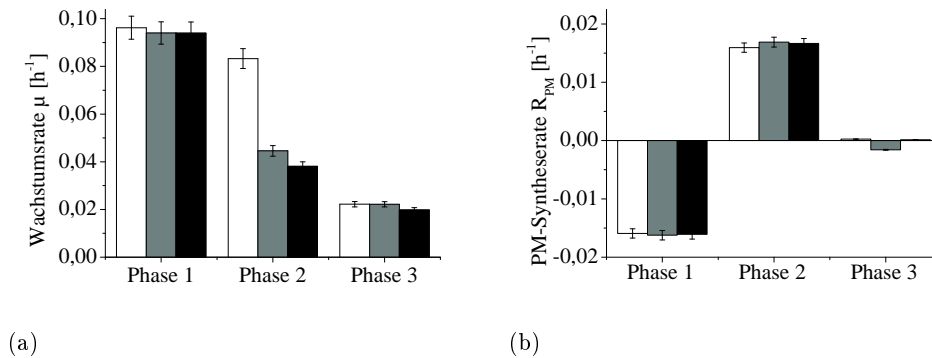


Abbildung 4.3

Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von *R. rubrum* S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von DTT. □: Kontrolle; ■: 0,3 mM DTT; ■: 0,5 mM DTT; Phasenbezeichnung siehe Abb. 4.1; die Fehlerbalken zeigen eine Fehlergrenze von 5%

Einsetzen der PM-Synthese zugegeben, so sank das PM-Level deutlich ab. Nach dem Abklingen des DTT-Effektes stieg die PM-Syntheserate wieder an, während sie in der Kontrollkultur ohne DTT bereits stagnierte (vgl. Abb. 4.4).

Besonders bemerkenswert war der Anstieg der PM nach Zugabe von 0,5 mM DTT auf einen maximalen Wert von über 1, was selbst in Kultivierungen mit Fruktose nur sehr selten vorkam ($OD_{880}/OD_{660} = 1,04$, Abb. 4.4). Trotzdem war zu keiner Zeit der Kultivierung die PM-Syntheserate in Schüttelkolben mit DTT höher als die maximale PM-Syntheserate der Kontrolle, es wurde mehr, aber nicht schneller PM synthetisiert als ohne Zugabe von DTT.

Auch in diesem Versuch zeigte sich eine wachstumsinhibierende Wirkung von DTT, jedoch erst ab einer Konzentration von 1 mM. Die Zugabe von 0,5 mM DTT regte das Wachstum sogar etwas an, während die PM-Synthese aussetzte. Sobald die PM-Synthese wieder begann, war die Wachstumsrate niedriger als die der Kontrolle (vgl. Abb. 4.5(a) und 4.5(b)). In Abb. 4.4 ist ein solcher Kultivierungsverlauf zu sehen. Zum Vergleich der Wachstums und PM-Syntheseraten wurde eine Phase 2b eingeführt um die Abnahme der PM und den erneuten Anstieg anschaulicher zu machen. Phase 2b bezeichnet die Phase in der die PM-Synthese nach der DTT-Zugabe abfällt, sie war also negativ, wie am Anfang der Kultivierung und dauerte von 47 h bis 70 h, abhängig von der zugegebenen DTT Konzentration (Abb. 4.5(b)).

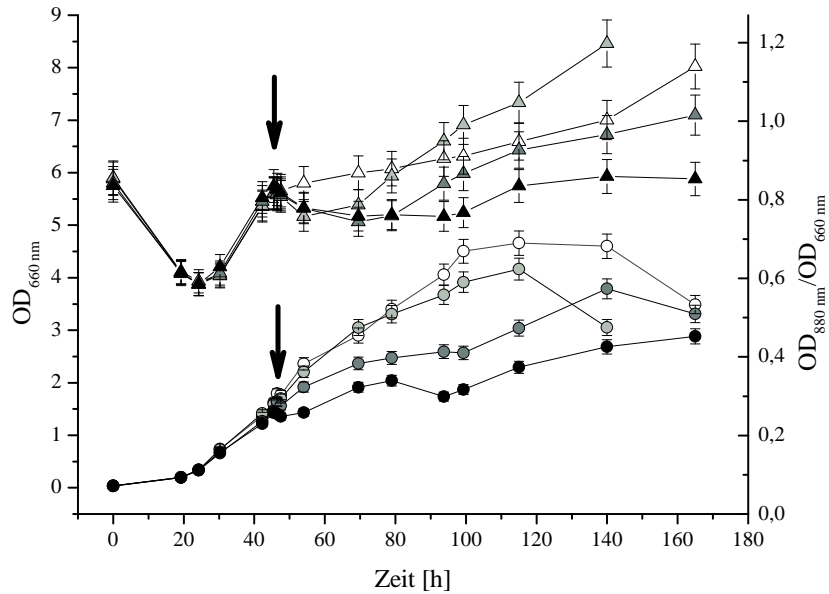


Abbildung 4.4

Wachstumsversuch mit *R. rubrum* S1 auf M2S-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von DTT. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe; ○: Wachstum OD_{660nm}, △: PM-Produktion OD_{880nm}/OD_{660nm}; □: Kontrolle; ■: 0,5 mM DTT; ■: 1 mM DTT; ■: 2 mM DTT; die Fehlerbalken zeigen die maximale Verfahrensabweichung von 5 %

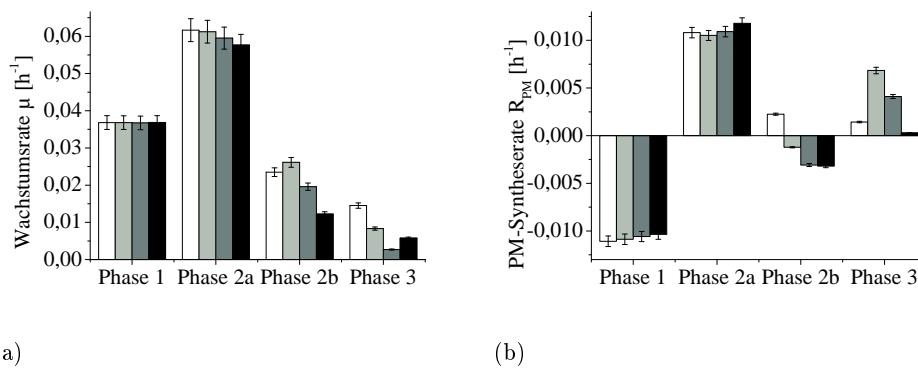


Abbildung 4.5

Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von *R. rubrum* S1 auf M2S-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von DTT. □: Kontrolle; ■: 0,5 mM DTT; ■: 1 mM DTT; ■: 2 mM DTT; die Fehlerbalken zeigen eine Fehlergrenze von 5%

4.1.2 Zusatz von reduziertem Glutathion (GSH) zu den Kultivierungen

Die Zugabe von reduziertem Glutathion (GSH) zu den Kultivierungen im Schüttelkolben bewirkte sowohl in M2S als auch in M2SF-Medium einen Anstieg der PM-Syntheserate sowie des maximal erreichten PM-Levels (vgl. Abb. 4.6 und 4.7(b)). Da sich für Konzentrationen von 2 mM GSH ein signifikanter Unterschied zeigte, wurde das höhere PM-Level nach Zugabe von 1 mM GSH ebenfalls als signifikant gewertet, obwohl er nicht ganz ausserhalb der Verfahrensabweichung liegt. In diesem Versuch stieg es nach der Zugabe von 2 mM GSH auf 1,05 an. Die Wachstumsrate blieb davon unbeeinflusst, ein geringer Abfall bei steigender GSH-Konzentration und damit auch steigender PM-Syntheserate könnte erahnt werden. Dies bestätigte sich aber nicht in den Versuchen für die GSH-Aufnahme in denen mit 6 mM GSH gearbeitet wurde (vgl. Abb. 4.19(a)).

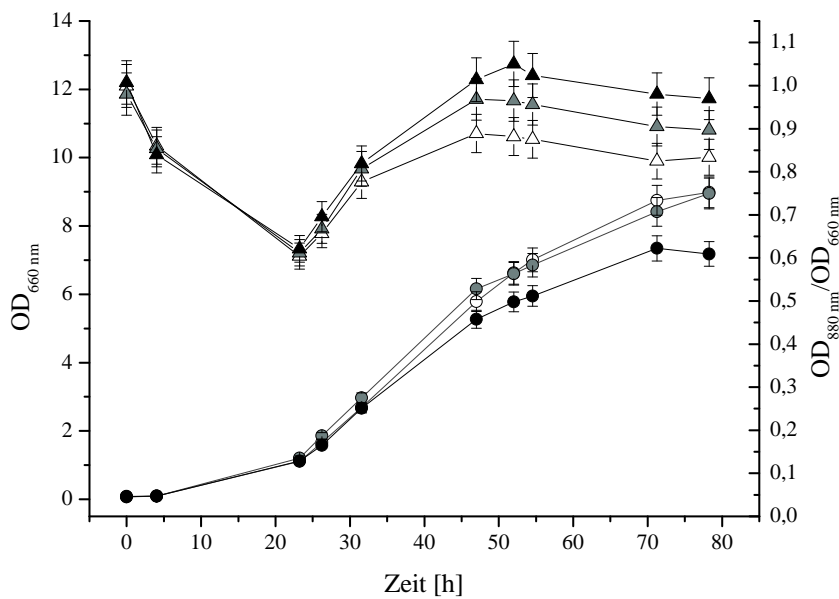


Abbildung 4.6

Wachstumsversuch mit *R. rubrum* S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH; Zugabe bei OD = 1; ○: Wachstum OD_{660 nm}, △: PM-Produktion OD_{880 nm}/OD_{660 nm}; □: Kontrolle; ■: 1 mM GSH; ●: 2 mM GSH; die Fehlerbalken zeigen die maximale Verfahrensabweichung von 5 %

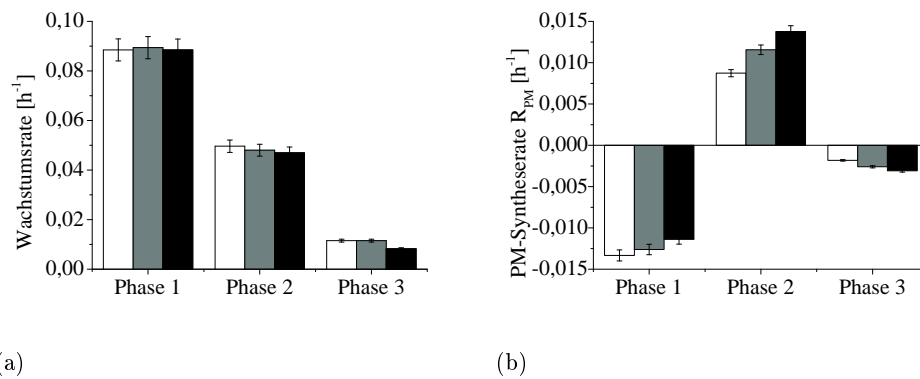


Abbildung 4.7

Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von *R. rubrum* S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH; □: Kontrolle; ■: 1 mM GSH; ■: 2 mM GSH; die Fehlerbalken zeigen eine Fehlergrenze von 5%

Zusatz von GSH zu aeroben Kultivierungen

Unter aeroben Bedingungen werden in NSPB in der Regel keine PM gebildet [Bauer et al. 2003]. Nachdem sich GSH unter mikroaeroben Bedingung als stark PM-synthesefördernd erwiesen hatte, bestand zumindest die theoretische Möglichkeit, dass sich die PM-Synthese ebenfalls unter aeroben Bedingungen anregen lassen würde, ebenso wie die ArcB/ArcA-kontrollierte Genexpression in *E. coli* in den Experimenten von Malpica et al. [2004]. Diese Erwartung konnte zum Teil bestätigt werden. *R. rubrum* produzierte tatsächlich gegen Ende der Kultivierung eine geringe Menge an PM. Ob diese Ergebnisse signifikant sind, lässt sich schwer beurteilen ohne noch deutlich mehr Replikate zu erzeugen. Die Unterschiede in den höchsten PM-Levels der Kultivierung lag innerhalb der Verfahrensabweichung der OD- und PM-Messung. In dieser Arbeit zeigten 6 Replikate die gleiche Tendenz. Zusätzlich zeigte sich eine deutliche Wachstumsbeschleunigung durch die Zugabe von GSH, so dass sehr hohe Wachstumsraten von ungefähr $0,15 \text{ h}^{-1}$ erreicht wurden; bei Zugabe von 10 mM zeigte sich die Wachstumssteigerung später.

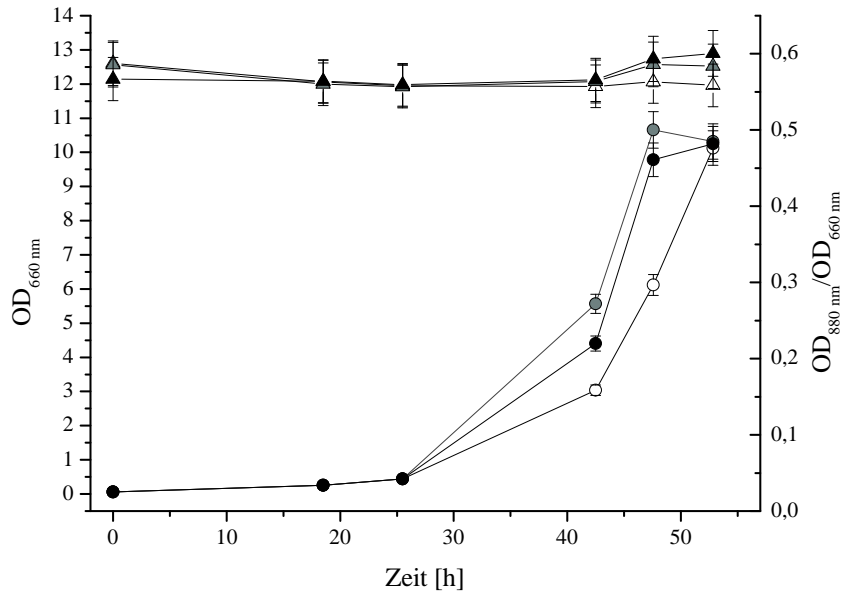
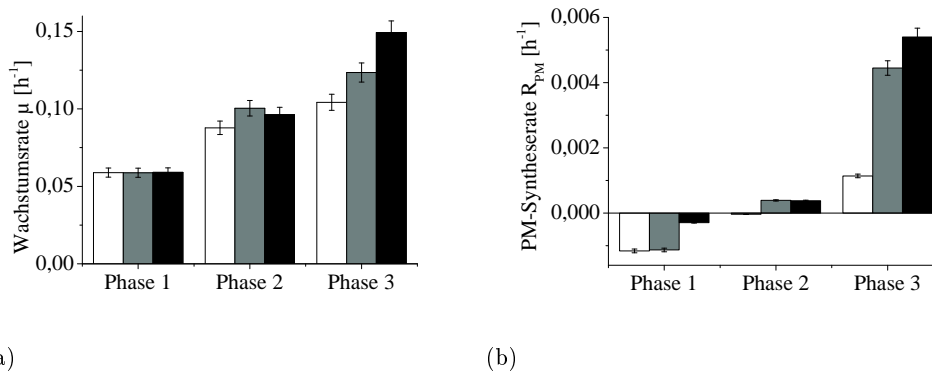


Abbildung 4.8

Wachstumsversuch mit *R. rubrum* S1 auf M2SF-Medium aerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH; Zugabe bei $OD = 1$; \circ : Wachstum OD_{660nm} , \triangle : PM-Produktion OD_{880nm}/OD_{660nm} ; \square : Kontrolle; \blacksquare : 5 mM GSH; \blacksquare : 10 mM GSH; die Fehlerbalken zeigen die maximale Verfahrensabweichung von 5 %



(a)

(b)

Abbildung 4.9

Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von *R. rubrum* S1 auf M2SF-Medium aerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH; \square : Kontrolle; \blacksquare : 5 mM GSH; \blacksquare : 10 mM GSH; die Fehlerbalken zeigen eine Fehlergrenze von 5%

4.1.3 Zusatz von oxidiertem Glutathion (GSSG) zu den Kultivierungen

Durch die Zugabe von oxidiertem Glutathion (GSSG) wurde die PM-Synthese nicht beeinträchtigt, obwohl GSSG das Redoxpotential in den Schüttelkolben anheben müsste. Im Gegenteil schien auch in diesem Ansatz die PM-Synthese zumindest leicht angeregt zu werden. Es scheint einen ähnlichen Effekt zu haben wie GSH. Die angegebene Verfahrensabweichung für die OD- und PM-Messung zeigt aber, dass die beobachteten Effekte nicht signifikant sind.

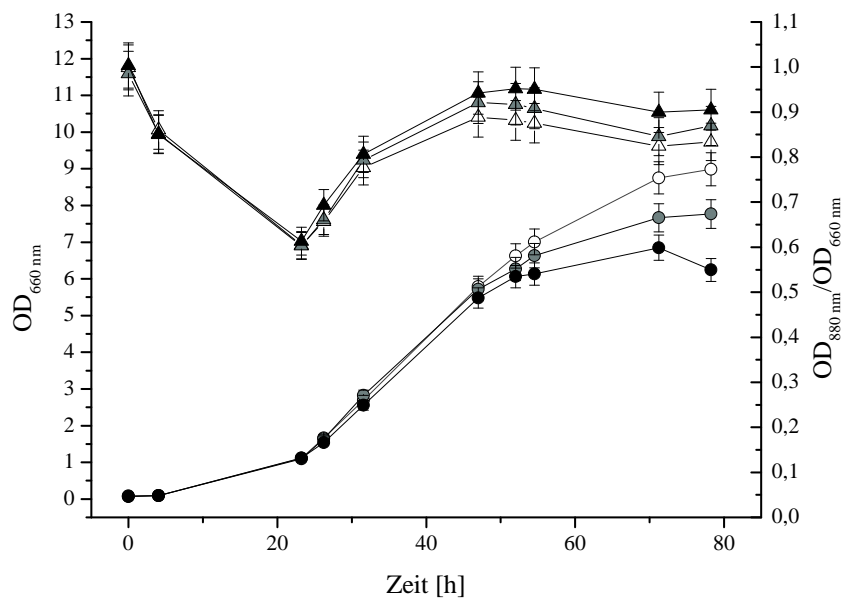


Abbildung 4.10

Wachstumsversuch mit *R. rubrum* S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSSG; Zugabe bei OD = 1; ○: Wachstum OD_{660nm}, △: PM-Produktion OD_{880nm}/OD_{660nm}; □: Kontrolle; ■: 1 mM GSSG; ■: 2 mM GSSG; die Fehlerbalken zeigen die maximale Verfahrensabweichung von 5 %

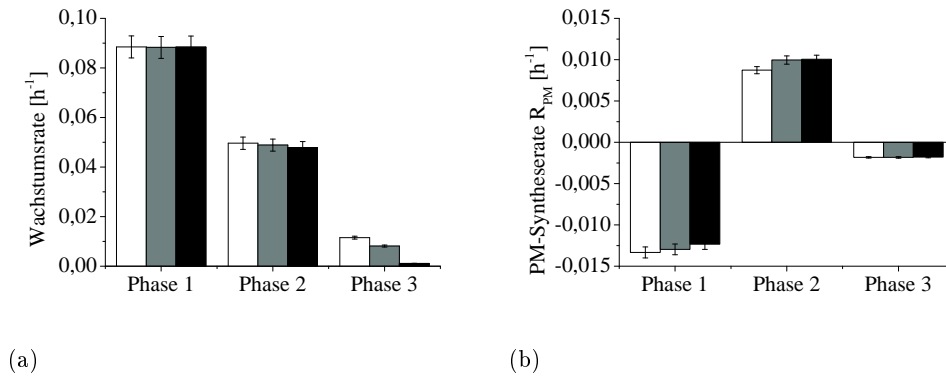


Abbildung 4.11

Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von *R. rubrum* S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSSG; □: Kontrolle; ■: 1 mM GSSG; ■: 2 mM GSSG; die Fehlerbalken zeigen eine Fehlergrenze von 5%

4.1.4 Zusatz von Diethylmaleat (DEM) zu den Kultivierungen

Diethylmaleat erzeugt eine spezifische Abnahme der Menge an GSH in der Zelle [Boylan and Chasseaud 1967]. Erwartungsgemäß sollte es also die PM-Synthese inhibieren oder zumindest abschwächen. Dies traf auch zu. Mit steigender DEM-Konzentration in den Kulturen sank das maximal erzeugte PM-Level deutlich ab. DEM hatte eine leicht wachstumsmindernde Wirkung, die aber erst in der letzten Phase der Kultivierung sichtbar wurde, vermutlich nach dem Verbrauch der Fruktose. Sie war nur im Vergleich von Kontrolle mit 2 mM DEM signifikant. In M2SF-Medium zeigte DEM, wie GSH erst in der 3. Phase der Kultivierung einen Effekt auf die PM-Synthese. Dadurch wurde die maximal erzeugte Menge an PM stark beeinflusst, ein Wiederanstieg der PM-Syntheserate erfolgte während der Kultivierung nicht. DEM verhinderte oder verzögerte nicht wie DTT das Einsetzen der PM-Synthese bei OD 1, auch eine spätere Abnahme von bereits synthetisierter PM wurde nicht beobachtet.

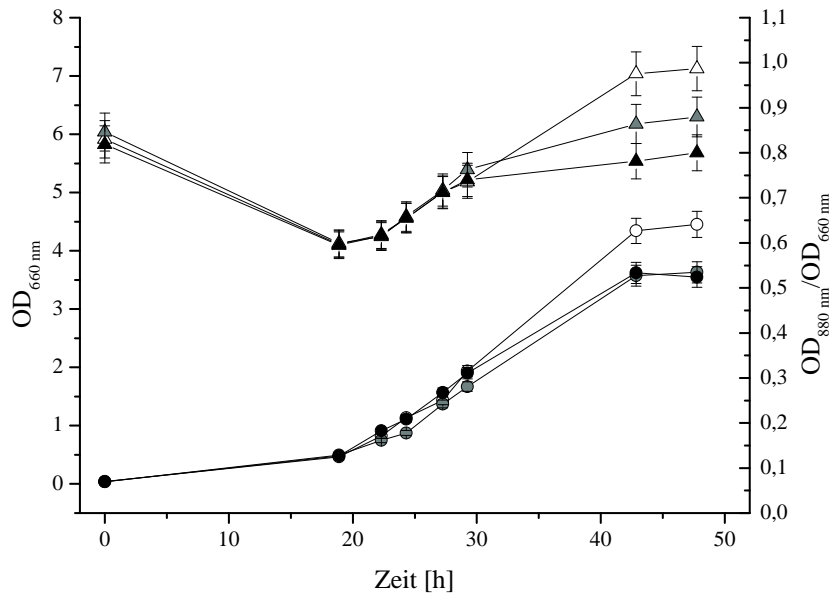


Abbildung 4.12

Wachstumsversuch mit *R. rubrum* S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von DEM; Zugabe bei OD = 1; ○: Wachstum OD_{660nm}, △: PM-Produktion OD_{880nm}/OD_{660nm}; □: Kontrolle; ■: 1 mM DEM; ■: 2 mM DEM; die Fehlerbalken zeigen die maximale Verfahrensabweichung von 5 %

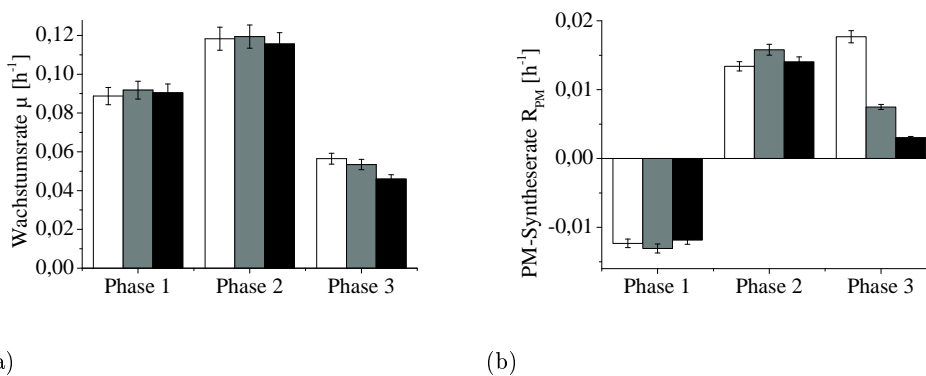


Abbildung 4.13

Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von *R. rubrum* S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von DEM; □: Kontrolle; ■: 1 mM DEM; ■: 2 mM DEM; die Fehlerbalken zeigen eine Fehlergrenze von 5%

4.1.5 Zusatz von Diamid, H₂O₂ oder DMSO zu den Kultivierungen

Die Zugabe von oxidierenden Substanzen zu den Kultivierungen führte meistens zu einer sehr starken Wachstumsinhibierung, so dass wenig auswertbare Ergebnisse erzeugt werden konnten. Besonders im Falle von Diamid, das spezifisch den GSH-Pool oxidiert, trat dieser Effekt unerwartet auf, denn *R. rubrum* hatte eine relativ gute Toleranz von bis zu 2 mM DEM gezeigt, das ebenfalls spezifisch auf den GSH-Pool wirkt. DMSO kann als alternativer Elektronenakzeptor veratmet werden und hat dadurch wahrscheinlich einen ähnlichen Effekt auf die PM-Synthese wie Sauerstoff. Eine starke Wachstumsinhibierung trat hier nicht auf, und ein stöchiometrischer Zusammenhang zwischen PM-Synthese und DMSO-Zugabe zeigte sich. Da das DMSO aber durch Veratmung verbraucht wird ergibt sich eine Regeneration der PM-Synthese.

4.1.6 Zusatz von Glycin, Cystein und Glutamat zu den Kultivierungen

Um festzustellen, ob die beobachteten Effekte des GSH durch Supplementierung mit zusätzlichen Aminosäuren verursacht wurden, kamen diese ebenfalls als Medienzusatz zum Einsatz. Es zeigte sich, dass keine der eingesetzten Aminosäuren Auswirkungen auf die PM-Synthese hatte, auch nicht, wenn alle drei Aminosäuren gemeinsam eingesetzt wurden. Eine Erhöhung der PM-Synthese durch GSH als zusätzliche Kohlenstoffquelle kann somit ausgeschlossen werden, insbesondere da es auch nicht als alleinige Kohlenstoffquelle verwertet werden konnte.

4.1.7 Zugabe von DTT und GSH zu *R. rubrum* SN20

In diesem Versuch sollte geprüft werden, ob GSH oder DTT über den Ubichinon-Pool auf das zelluläre Redoxpotential einwirken, denn dieser Stamm kann durch eine Mutation im Ubichinon-Biosyntheseweg nur noch Rhodochinon und geringe Mengen an Ubichinon synthetisieren (Grammel pers. Mitteilung). Wären die beobachteten Effekte auf eine Wechselwirkung mit dem Ubichinon-Pool zurückzuführen, so müssten sie bei verringerter Ubichinon-Konzentration in der Membran verändert auftreten. Im Falle von DTT trifft dies auch zu. Im Gegensatz zu der Kultivierung mit dem Wildtyp blieb hier das PM-Verhältnis niedrig und stieg gegen Ende der Kultivierung nicht wieder an (vgl. Abb. 4.14).

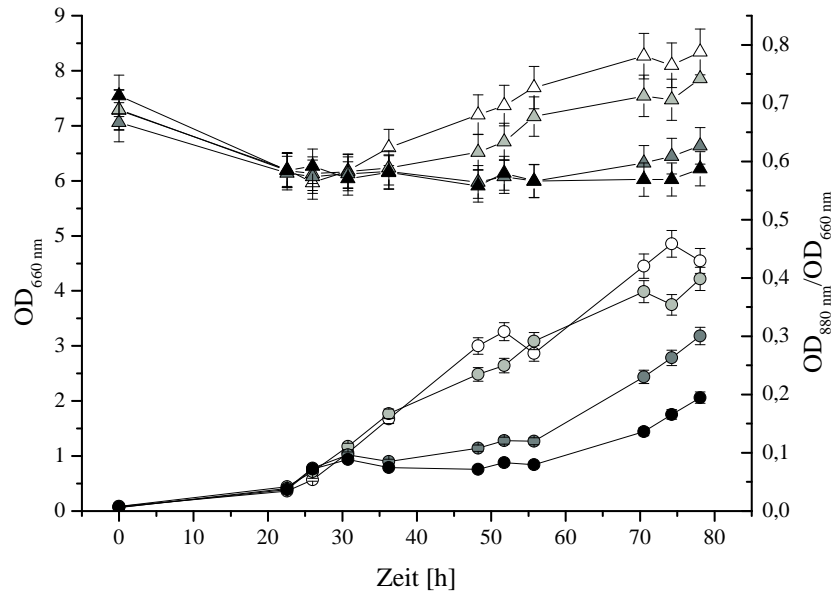


Abbildung 4.14

Wachstumsversuch mit *R. rubrum* SN20 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH; Zugabe bei OD = 1; ○: Wachstum OD_{660nm}, △: PM-Produktion OD_{880nm}/OD_{660nm}; □: Kontrolle; ■: 1 mM DTT; ■: 2,5 mM DTT; ■: 5 mM DTT; die Fehlerbalken zeigen die maximale Verfahrensabweichung von 5 %

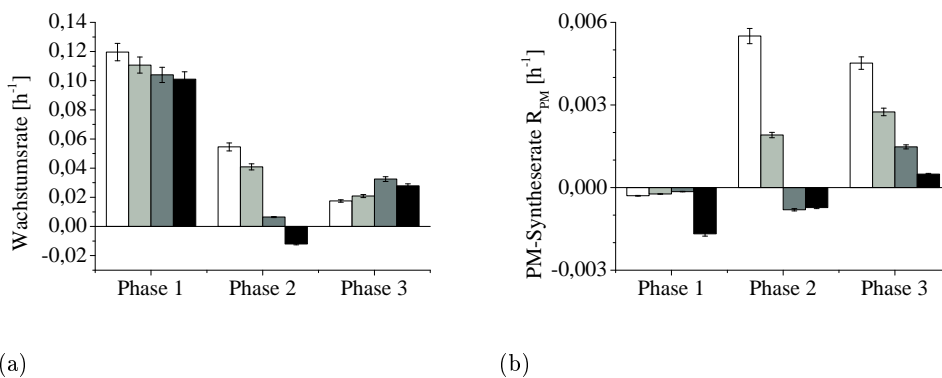


Abbildung 4.15

Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von *R. rubrum* SN20 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH; □: Kontrolle; ■: 1 mM DTT; ■: 2,5 mM DTT; ■: 5 mM DTT; die Fehlerbalken zeigen eine Fehlergrenze von 5%

Trotzdem schienen *R. rubrum* SN20 Zellen etwas robuster gegenüber höheren DTT-Konzentrationen zu sein. Während der Wildtyp nach der Zugabe von 2 mM DTT bei OD 1 bereits stark beeinträchtigt war, konnte *R. rubrum* SN20 noch wachsen. Aus diesem Grund wurden die Experimente mit dem Wildtyp mit deutlich geringeren Konzentrationen (0,3 mM und 0,5 mM) durchgeführt (vgl. Abb. 4.2).

Bei der Zugabe von GSH zeigt sich, dass sich im Falle des kleineren Ubichinon-Pools die Zugabe von GSH auch auf die Wachstumsrate auswirkte (vgl. Abb. 4.16). Dies könnte einen weiteren Hinweis auf die Wirkungsweise des erhöhten GSH-Pools in den *R. rubrum* Zellen geben und zusätzlich die Auswirkungen des verkleinerten Ubichinon-Pools auf den Zellstoffwechsel veranschaulichen. Die PM-Synthese konnte durch GSH in SN20 ebenfalls deutlich gesteigert werden, jedoch erreichten die Kulturen nicht das Wildtyp-Level. Bemerkenswert ist weiterhin, dass der PM-steigernde Effekt der Fruktose nicht auftrat sondern die PM sogar etwas geringer blieb als auf M2S-Medium.

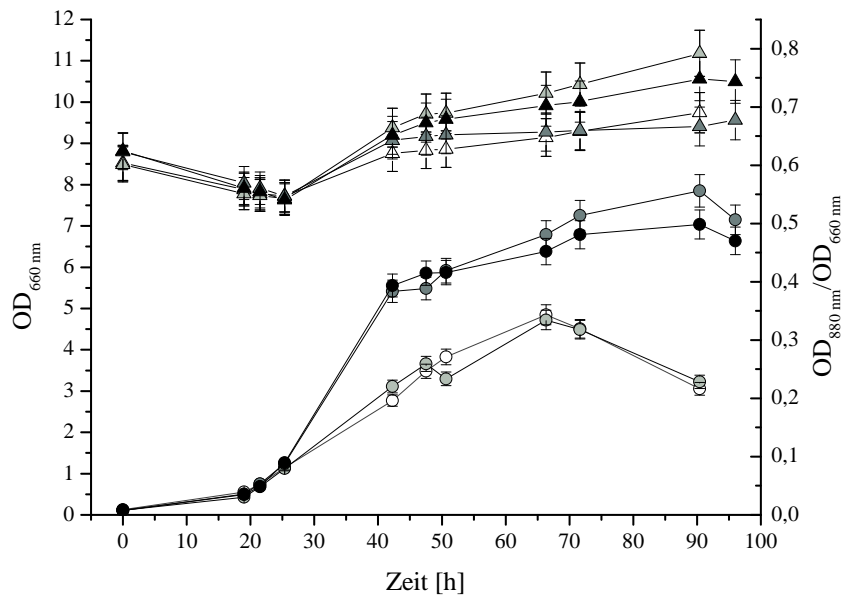


Abbildung 4.16

Wachstumsversuch mit *R. rubrum* SN20 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH; Zugabe bei OD = 1; ○: Wachstum OD_{660nm}, △: PM-Produktion OD_{880nm}/OD_{660nm}; □: M2S Kontrolle; ■: M2S mit 2 mM GSH; ■: M2SF Kontrolle; ■: M2SF mit 2 mM GSH; die Fehlerbalken zeigen die maximale Verfahrensabweichung von 5 %

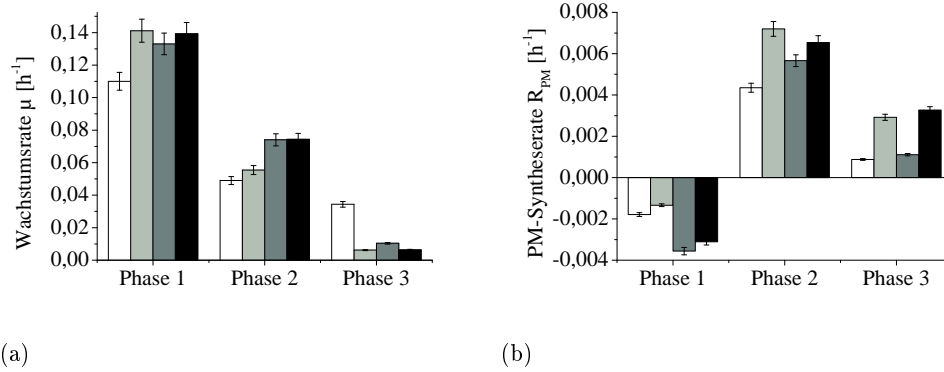


Abbildung 4.17

Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von *R. rubrum* SN20 auf M2S-Medium bzw. M2SF-Medium, mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH; □: M2S Kontrolle; ■: M2S mit 2 mM GSH; ▒: M2SF Kontrolle; ■: M2SF mit 2 mM GSH; die Fehlerbalken zeigen eine Fehlergrenze von 5%

4.2 Glutathionaufnahme in *R. rubrum*

Die Wachstumsversuchen mit GSH zeigten deutliche Auswirkungen von GSH auf die PM-Synthese. Um zu kären, ob GSH von den Zellen aufgenommen und verwertet wird, oder ob es das Redoxpotential in der Kulturbrühe veränderte und dadurch diesen Effekt auslöste, wurde GSH im Kulturüberstand und intrazellulär gemessen. Die Daten zeigten dass GSH aus dem Kulturüberstand in die Zellen aufgenommen wurde und dort akkumulierte. Abb. 4.18 zeigt die Wachstumskurve dieses Versuchs.

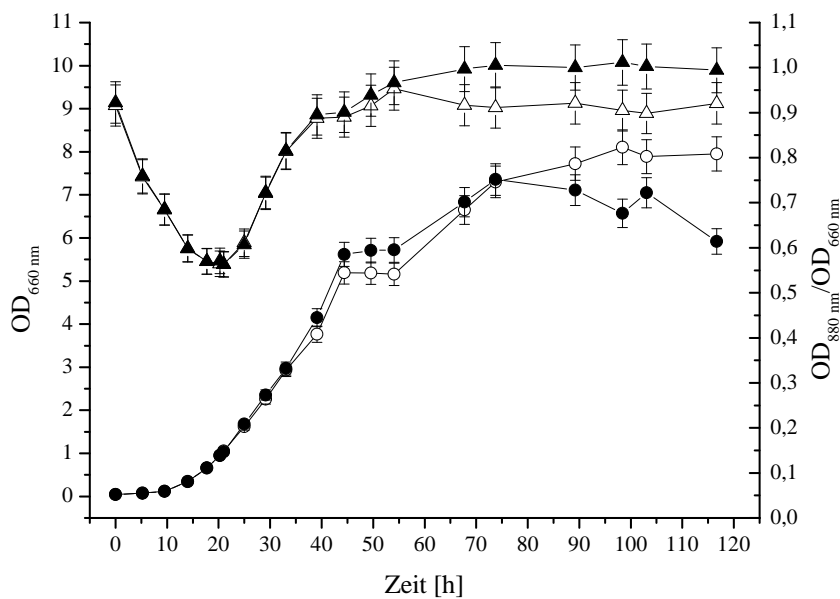


Abbildung 4.18

Wachstumskurve zum GSH-Aufnahme Versuch; Zugabe bei $OD = 1$; ○: Wachstum OD_{660nm} , △: PM-Produktion OD_{880nm}/OD_{660nm} ; □: Kontrolle; ■: 6 mM GSH; die Fehlerbalken zeigen die maximale Verfahrensabweichung von 5 %

Die Kultivierung wurde in etwas größerem Maßstab (500 ml in 1 l- anstatt 50 ml in 100 ml- Schüttelkolben) durchgeführt als die Experimente zu den Wachstumskurven, um genügend Material für die GSH-Messungen zu erhalten. Auch im größeren Maßstab zeigte sich wieder das gleiche Verhalten wie in den vorherigen Kultivierungen mit GSH: Ein Wachstumseinbruch zwischen 40 und 50 h Kultivierungszeit signalisierte deutlich, dass Fruktose aufgebraucht war. Dies unterstützt die Messung von Fruktose im Kul-

turüberstand die in Abb. 4.22 dargestellt ist. Gleichzeitig verlangsamt sich auch die PM-Synthese, in der Kultivierung mit GSH-Zusatz weniger, als in der Kontrollkultivierung. Die maximal erreichten PM-Level unterschieden sich um $\sim 0,1$ und lagen bei $\sim 0,9$ in der Kontrolle und ~ 1 mit GSH-Zusatz.

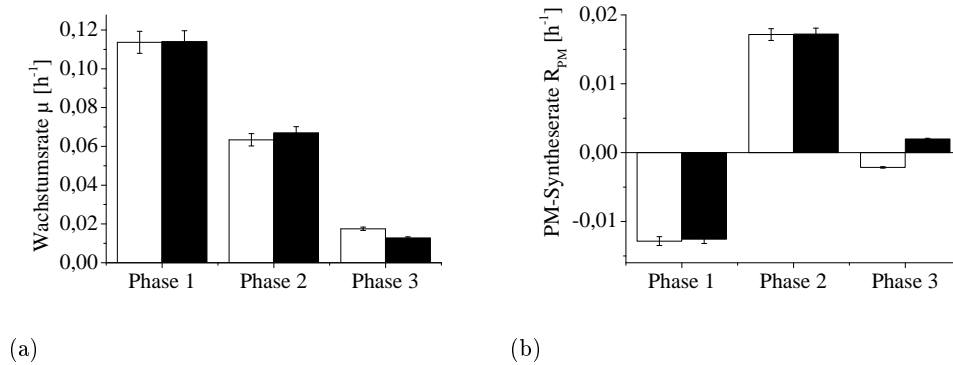


Abbildung 4.19

Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von *R. rubrum* S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH (6 mM); \square : Kontrolle; \blacksquare : 6 mM GSH; die Fehlerbalken zeigen eine Fehlergrenze von 5%

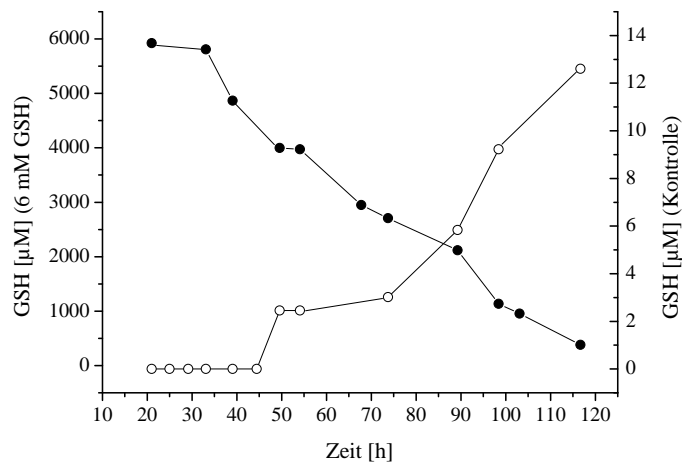


Abbildung 4.20

Verlauf der extrazellulären GSH-Konzentrationen; Zugabe von 6 mM GSH bei 20 h; \square : Kontrolle; \blacksquare : 6 mM GSH; keine Fehlerbalken da nur Einfachbestimmungen

Nach der GSH-Zugabe, ab der 35. Stunde der Kultivierung sank der GSH-Gehalt der Kulturbrühe deutlich ab, also zum gleichen Zeitpunkt zu dem die Fruktose verbraucht war. Die Aufnahme begann nicht direkt nach der Zugabe, sondern schien kontrolliert einzusetzen. Abb. 4.21 zeigt ebenfalls einen Anstieg der intrazellulären GSH-Konzentration. Hier begann der Anstieg jedoch früher, bereits direkt nach der GSH-Zugabe war eine erhöhte intrazelluläre GSH-Konzentration zu erkennen. Diese blieb aber bis zur 45. Stunde ungefähr konstant so dass es sich wahrscheinlich um eine adhäsive Bindung des GSH an die Zelloberflächen handelte. Zusätzlich war bei Zelldichten unter OD 2 der Messfehler sehr groß, so dass wie die Fehlerbalken zeigen, erst ab der 35. Stunde klare Aussagen ableitbar waren.

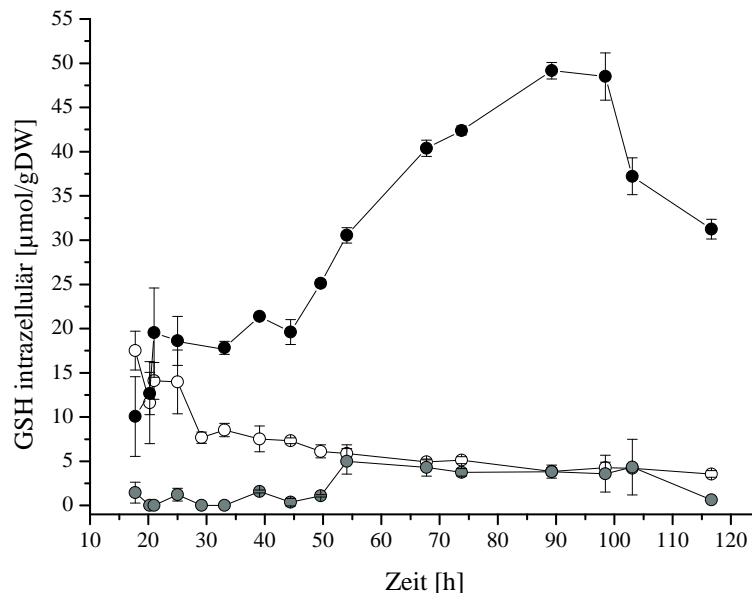


Abbildung 4.21

Verlauf der intrazellulären GSH-Konzentrationen; \square : Kontrolle GSH; \blacksquare : "6 mM GSH", GSSG; \blacksquare : "6 mM GSH" GSH; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen aus 6-Fachbestimmungen

Ab der 35. Stunde, also nach dem Verbrauch der Fruktose, wurde GSH dann exponentiell mit einer Aufnahmerate von $0,049 \text{ mM/g} \cdot \text{h}$ (Standardabweichung von 3 Versuchen $0,0024$) aufgenommen. Die starke Akkumulation im Cytoplasma deutete auf eine

aktive GSH-Aufnahme hin. Der intrazelluläre GSH-Gehalt erreichte bei $49\mu\text{mol/gDW}$ sein Maximum, während in der Kontrollkultivierung der GSH-Gehalt der Zellen eher abnahm und durchschnittlich zwischen 4 und $7\mu\text{g/gDW}$ betrug. In der Kultivierung mit GSH-Zugabe konnte auch GSSG detektiert werden. In der Kontrollkultivierung lag es grundsätzlich unterhalb der Detektionsgrenze. Es konnte in aeroben Kontrollversuchen jedoch nachgewiesen werden, so dass davon aus zu gehen ist, dass es sich tatsächlich um einen starken Reduktionsgrad des GSH-Pools handelte.

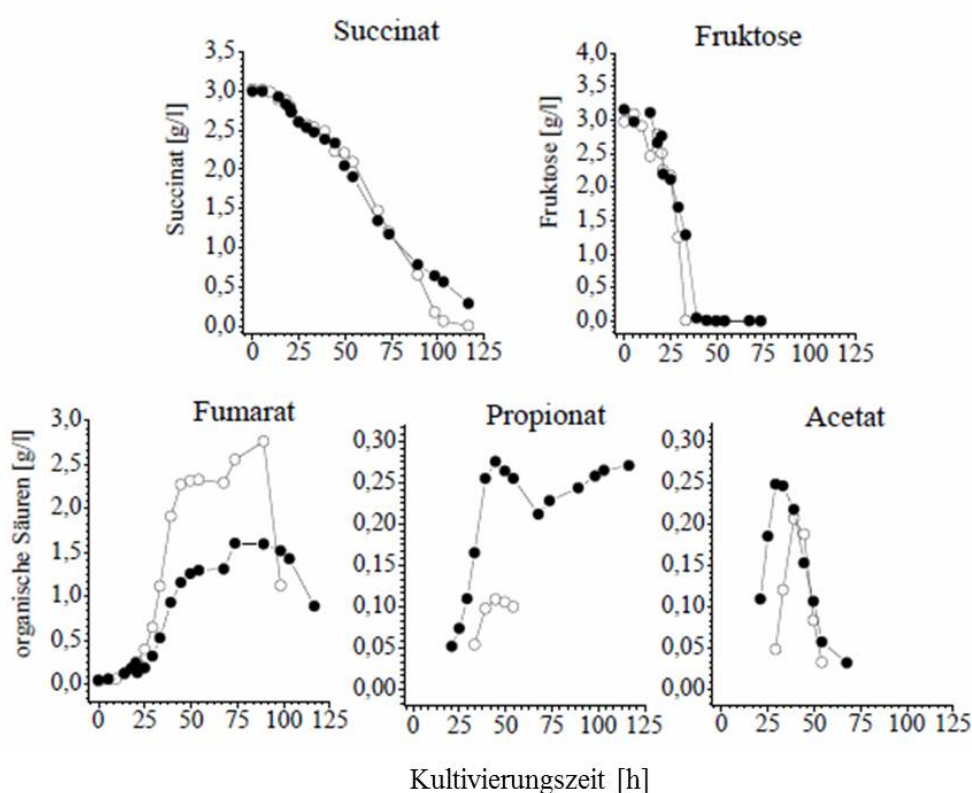


Abbildung 4.22

Analyse der organischen Säuren im Vergleich; □: Kontrolle GSH; ■: "6 mM GSH"

Zum Ende der Kultivierung nahm die intrazelluläre GSH-Konzentration in der Kultivierung mit GSH-Zugabe wieder deutlich ab, obwohl das extrazelluläre GSH noch nicht vollständig verbraucht war. Die Zellen der Kontrollkultivierung zeigten gegen Ende der Kultivierung einen deutlichen Anstieg der extrazellulären GSH-Konzentration auf $12,6$

μM . Die Daten bewegen sich nah am Detektionslimit und auch am untersten Punkt der Kalibriergerade ($10 \mu\text{M}$) so dass weitere Messungen notwendig wären um hier eine Aussage treffen zu können. Um auszuschließen, dass das GSH durch Zellyse in den Kulturüberstand gelangt, sollte die Malatdehydrogenaseaktivität bestimmt werden.

Die in der Kultivierung produzierten organischen Säuren zeigten sehr auffällige Änderungen im Vergleich mit den Kultivierungen ohne GSH-Zusatz. Es traten besonders bei Fumarat und Propionat signifikante Mengenverschiebungen auf, während Acetat zwar ungefähr gleich viel, aber früher in der Kultivierung produziert wurde.

4.3 Heterologe Expression von PpsR aus *R. rubrum*

Der Stamm zur heterologen Expression von PpsR wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Marius Henkel erstellt und geprüft. Es zeigte sich, dass der Stamm *E. coli* B121 DE3 mit dem Vector pET22b, auf dem das Protein einen N-terminalen His-Tag bekommt, zu einer deutlich höheren Expressionsrate und auch zu einer größeren Menge an gereinigtem Protein führte. Über einen Trypsinverdau mit anschließender LC-MS-Analyse, durchgeführt von der Arbeitsgruppe Erdmann Rapp am MPI Magdeburg, wurde kontrolliert, ob es sich wirklich um das richtige PpsR-Protein handelte. Das PpsR-Protein aus *R. rubrum* hat eine Größe von ungefähr 52 kDa und nach der Aufreinigung über eine Affinitätschromatographie mit NiNTA-Resin zeigte sich eine Bande der entsprechenden Größe auf der SDS-PAGE.

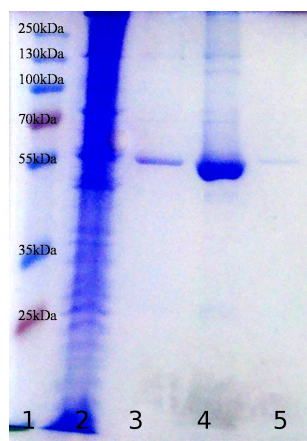


Abbildung 4.23

SDS-PAGE von NiNTA-chromatographisch gereinigtem PpsR-Protein aus fraktionierter Elution, von links nach rechts: Lane 1: Marker, 2: Rohextrakt, 3-5: Elution-Fraktion 1-3

Wie bereits in Henkel [2011] beschrieben, funktionierte die heterologe Expression von PpsR in *E. coli* sehr gut. Probleme traten allerdings bei der nativen Entsalzung des Proteins auf, wobei es keine Rolle spielte, ob die Entsalzung mittels Dialyse, Gel- oder Ultra-Filtration durchgeführt wurde. Um diese Problematik zu umgehen, wurde für den Versuch zur DNA-Bindung und für die Inkubation mit verschiedenen Redoxpotentialen das Resin direkt mit Protein abgesättigt (vgl. Abs. 3.3.2).

4.3.1 Experimente mit gereinigtem PpsR: Bindung von DNA an PpsR

Henkel [2011] konnte zeigen, dass mit reduziertem PpsR abgesättigtes NiNTA-Resin deutlich mehr verdaute DNA aus *R. rubrum* band als oxidiertes PpsR. Bei der Wiederholung dieses Versuchs wurde der Entsalzungsschritt (Pufferwechsel über eine NAP5 Säule) durch direkte Absättigung des Resins umgangen, da das Protein dazu neigte dabei auszufallen. So konnte die pro μg Protein gebundene DNA-Menge noch einmal deutlich gesteigert werden (auf ca. 20 ngDNA/ngPpsR-Protein). Diese gebundene DNA wurde eluiert und in pUC18 kloniert. Es entstanden 27 Klone *E. coli* DH5 α pUC18::PpsR-Bindesequenz. Aus zeitlichen Gründen wurde die Analyse der Klone zurückgestellt.

4.3.2 Redox Titration mit PpsR aus *R. rubrum*

In diesem Versuch wurden zwei Ansätze verglichen: PpsR wurde nach der Reinigung nicht direkt vom Resin eluiert, sondern das Resin wurde auf 10 Portionen aufgeteilt und mit 10 mM GSH/GSSG Puffer mit definiertem Redoxpotential versetzt. Danach wurden sie mit dem Elutionspuffer des Novagenkits eluiert und mittels nativer PAGE analysiert (vgl. Abb. 3.3.2).

Diese PAGE zeigte ein charakteristisches Bandenmuster, das auf eine ausgeprägte Quartärstruktur von PpsR schließen lässt. Unter relativ oxidierenden Bedingungen zwischen 0 und -78 mV waren insgesamt 5 Banden in verschiedenen Größen nachweisbar: Die kleinste befand sich ungefähr auf der Höhe der 15 kDa Bande des Markers. Da bei der nativen Page die Ladung und Struktur des Proteins eine wichtigere Rolle spielt als die Größe des Proteins in kDa, kann der Marker hier nur verwendet werden um die Größen der einzelnen Banden von PpsR zu vergleichen, nicht aber um deren exakte Größe zu bestimmen.

Bei der kleinsten Bande handelt es sich wahrscheinlich um ein reduziertes PpsR-Monomer. Direkt darüber wurde eine Bande sichtbar, die in den Proben mit reduzierendem Puffer deutlich weniger stark ausgeprägt war. Dies ist wahrscheinlich ein PpsR-Monomer in oxidiertem Zustand. Es hat deshalb eine etwas andere Struktur als reduziertes PpsR und läuft daher etwas langsamer. Weiter oben sind noch Banden auf den Höhen von ungefähr 40 kDa, 65 kDa und 90 kDa. Dabei könnte es sich um Multimere des PpsR-Proteins handeln, da sie in relativ regelmäßigen Abständen erscheinen. Denkbar wäre z. B. ein Dimer oder Trimer bei ~ 40 kDa, ein Tetramer bei ~ 65 kDa und ein Hexamer bei ~ 90 kDa.

Bei reduzierenden Bedingungen, also unterhalb eines Redoxpotentials von -121 mV, zeig-

ten sich weniger Banden. Die mittlere Bande bei 40 kDa fehlte und die Bande bei 20 kDa von der ausgegangen wurde, dass es sich um oxidiertes PpsR-Monomer handelte, erschien deutlich schwächer.

Proteine, die mit reduzierenden Puffern gewaschen wurden liessen sich mit der Silberfärbung schneller anfärben, als diejenigen, die mit Redoxpuffern behandelt wurden, deren Potential über -150 mV lag.

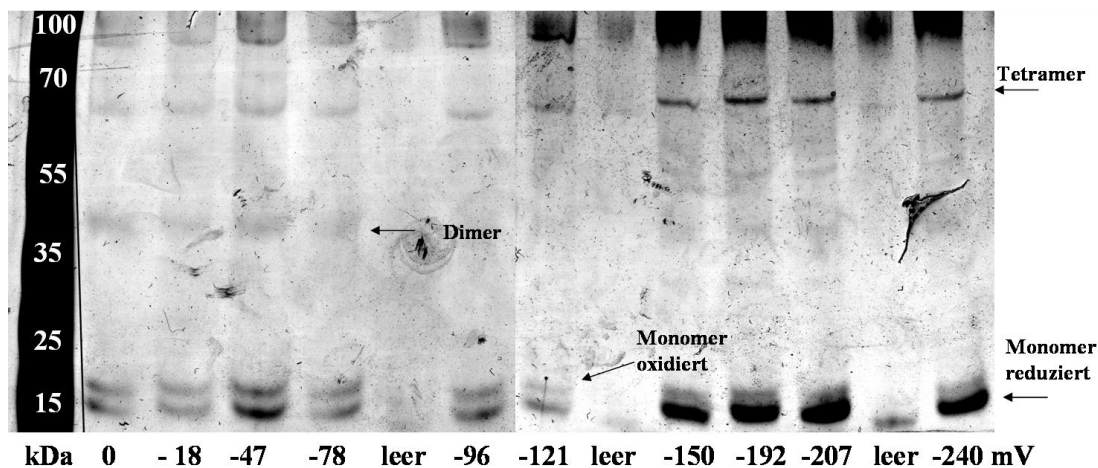


Abbildung 4.24

2 native PAGEs der Redoxtitration des PpsR-Proteins, Aufgetragen wurden die Eluate einer NiNTA-Affinitätschromatographie, jeweils vorher inkubiert in GSH-Redoxpuffer mit den unter den Lanes angegebenen Redoxwerten in mV (vgl. Abs. 3.3.2).

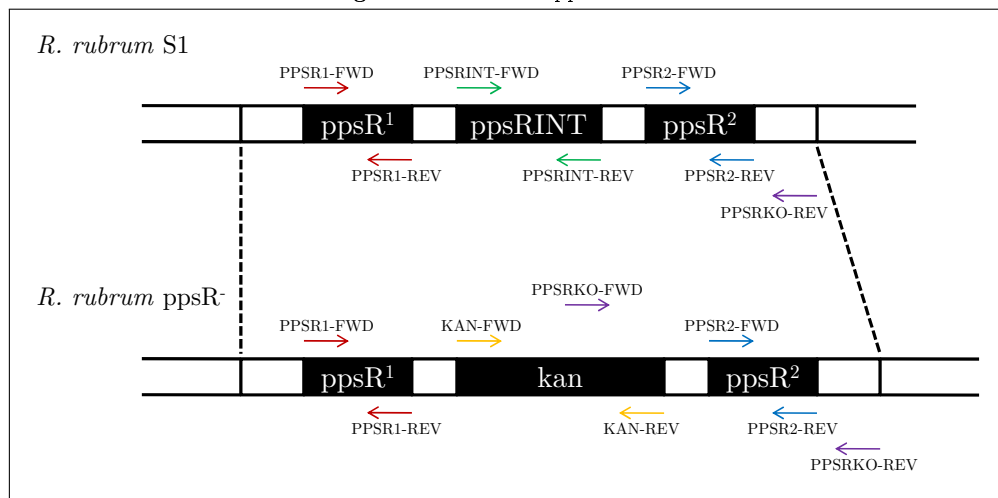
Im zweiten Fall wurden sie nach der Elution mit Ammoniumsulfat gefällt und in dem jeweiligen Redoxpuffer aufgenommen und ebenfalls mittels nativer PAGE analysiert. Der zweite Versuch lieferte für die vier reduziertesten Proben <-240 mV bis -150mV qualitativ das gleiche Ergebnis (ohne Abb.). Bei den oxidierteren Proben kam es zu massiven Beeinträchtigungen bei der Silberfärbung für deren Funktion reduzierte Aminosäuren notwendig sind. Der Reduktionsschritt mit Thiosulfat reichte offenbar nicht aus um die PpsR-Proteine genügend zu reduzieren, um eine Silberfärbung möglich zu machen. Der Versuch die PAGE zu entfärben und die Proteine mit DTT zu reduzieren scheiterte, das Gel quoll nach der Behandlung mit 10 mM DTT auf ein Vielfaches seiner Ausgangsgröße auf und konnte nicht weiter verwendet werden. Für PAGEs schien DTT also kein geeignetes Reduktionsmittel zu sein. Eine andere Färbung kam leider nicht in Frage, da die Proteinkonzentrationen zu gering waren.

4.4 Genetische Veränderungen in *R. rubrum*

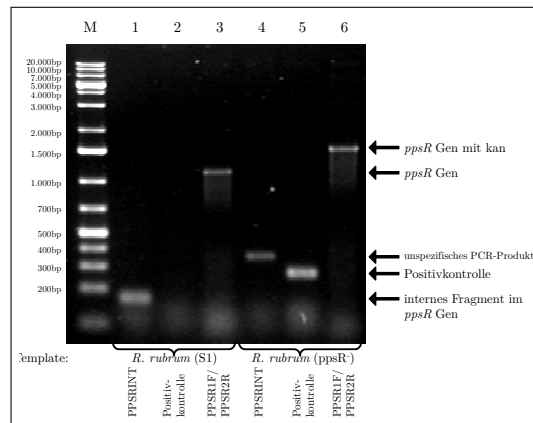
4.4.1 Die PpsR-Deletionsmutante *R. rubrum* PpsR⁻

Die Herstellung einer Deletionsmutante des interessanten Regulators PpsR in *R. rubrum* erwies sich als äusserst schwierig. Die Integration von neuer DNA verlief mit der biparentalen Konjugation problemlos, die Rekombination erwies sich jedoch als sehr unspezifisch. Nur ca. 1 aus 300 Klonen rekombinierten an der richtigen Stelle, so dass das entsprechende PCR-Produkt zur Positivkontrolle detektiert werden konnte. Abb. 4.25 zeigt schematisch, wie die richtige Rekombination im Vergleich zum Wildtyp aussehen sollte. Auch die anderen Klone rekombinierten zwar, denn sie zeigten im Screening keine Resistenz gegen Tetracyclin oder Chloramphenicol, jedoch relativ zufällig im Genom. Es konnten jedoch immer wieder Klone isoliert werden, die korrekt zweifach rekombiniert waren. Abb. 4.26 zeigt zwei Beispiele für PCR-Produkte einer solchen korrekten Rekombination.

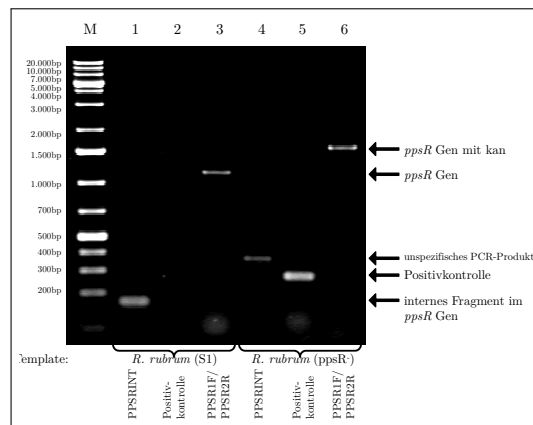
Abbildung 4.25: Übersicht *ppsR* Gen und Primer



Es zeigte sich, dass die beiden Klone C86 und C139 PpsR-Deletionsmutanten waren. Mit der Deletion von PpsR war ein sehr signifikanter Phänotyp verbunden: *R. rubrum* PpsR⁻ konnte keine PM bilden. Unter mikroaeroben Bedingungen zeigte sich zwar Wachstum, jedoch waren die Wachstumsraten etwas langsamer als im Wildtyp, möglicherweise aufgrund des zugegebenen Antibiotikums oder wegen physiologischer Nachteile durch das Fehlen des PpsR-Regulators. Phototrophe Kulturen zeigten über mehrere Tage kein Wachstum. Dann begannen die Zellen mit der PM-Produktion und zeigten



(a) *R. rubrum* ppsR PpsR⁻ Klon c86



(b) *R. rubrum* PpsR⁻ Klon c139

Abbildung 4.26: Untersuchung der *R. rubrum* ppsR⁻ Klone c86 und c139 mittels PCR

vergleichbare PM-Level wie der Wildtyp. Nach dem Ausplattieren zeigte sich ein sehr heterogener Phänotyp der auf Sekundärmutationen schließen liess. Diese Sekundärmutationen zeigten sich auch schon nach zwei Überimpfungen auf Agarplatten, so dass aufgrund der Instabilität der Mutanten auf eine Komplementierung verzichtet werden musste. Aus diesem Grunde kann auch nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass PpsR das einzige für die PM-Synthese relevante, von der Mutation betroffene Gen war, also auch der beobachtete Phänotyp möglicherweise auf Sekundärmutationen zurückzuführen ist. Eine ausführliche Beschreibung der Mutanten ist in Henkel [2011] zu finden.

4.4.2 Überexpression von PpsR in *R. rubrum* auf pRK404

Um die Ergebnisse der PpsR-Deletionsmutanten zu stützen wurde der *R. rubrum* Überexpressionsstamm von PpsR *R. rubrum* PpsR⁺ konstruiert. Dazu wurde das *PpsR*-Gen incl. der Promotorregion mit dem Primerpaar PpsRcomp in den Vector pRK404 [Scott et al. 2003] kloniert. Auf ein quantitatives LacIQ-System wurde verzichtet, denn die Grundexpression des nicht reprimierten *lac*-Promotors sollte ausreichen, um einen Überexpressionseffekt zu erzielen, ohne die gesamte Zellphysiologie zu stören (Experimente der Gruppe mit GFP in pRK404 bestätigen dies). Der entstandene Stamm *R. rubrum* PpsR⁺ produzierte auch tatsächlich mehr PM als der Wildtyp, obwohl er langsamer wuchs und demnach auch wahrscheinlich weniger Sauerstoff verbrauchte. Abb. 4.27 zeigt einen Wachstumsversuch mit M2S und M2SF Medium und GSH-Zusatz.

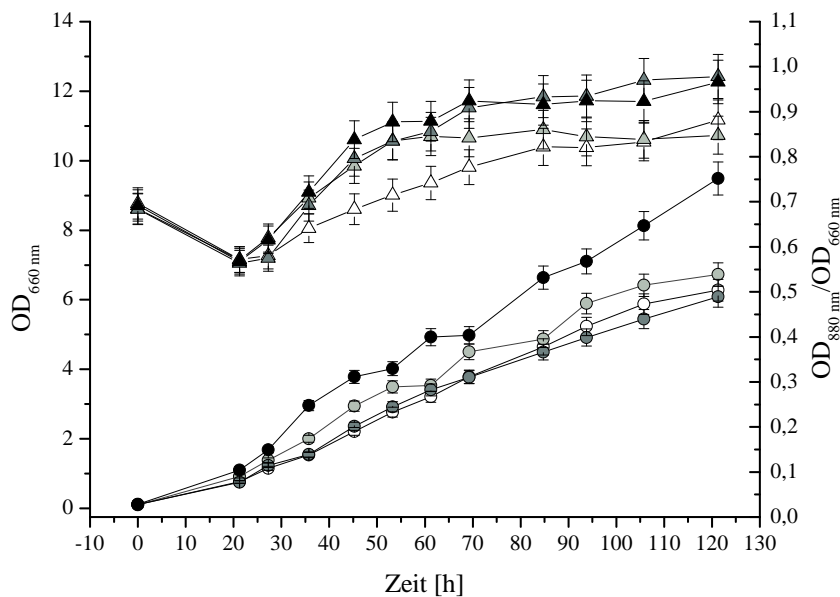


Abbildung 4.27

Wachstumsversuch mit *R. rubrum* PpsR⁺ auf M2S und M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH bei OD 1. ○: Wachstum OD_{660nm}, △: PM-Produktion OD_{880nm}/OD_{660nm}; □: M2S Kontrolle; ■: M2SF Kontrolle; ●: M2S 0,5 mM GSH; ▲: M2SF 0,5 mM GSH; die Fehlerbalken zeigen die maximale Verfahrensabweichung von 5 %

Anders als bei Wildtyp-Kultivierungen konnte nur 0,5 mM GSH zugegeben werden. Zellen die pRK404 auch ohne das *PpsR*-Gen enthielten reagierten mit starken Absinken der OD nach Zugabe von 1-5 mM GSH. Trotz der verhältnismässig geringen GSH-Menge

reagierte *R. rubrum* PpsR⁺ mit einem deutlichen Anstieg der PM. In M2SF Medium wuchsen die Zellen schneller, und auch die PM-Syntheserate war höher, trotzdem wurde insgesamt nicht mehr PM synthetisiert als auf M2S Medium. Für diesen Effekt ist wahrscheinlich ebenfalls das Plasmid pRK404 verantwortlich, denn auch ohne das PpsR-Gen wurde dieses Verhalten beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Da der Stamm *R. rubrum* PpsR⁺ deutlich langsamer wuchs als *R. rubrum* Prk404 oder der Wildtyp konnte die PM-Synthese nicht direkt verglichen werden. Dazu wurden Ausbeuten berechnet:

Tabelle 4.1: Ausbeuten an PM der *R. rubrum* Stämme PpsR⁺ und pRK404 (Berechnung vgl. Abs. 3.1.4)

| Medium | Stamm | |
|---------|-------------------|--------|
| | PpsR ⁺ | pRK404 |
| M2S | 0,063 | 0,061 |
| M2SF | 0,096 | 0,083 |
| M2S+GSH | 0,129 | 0,091 |

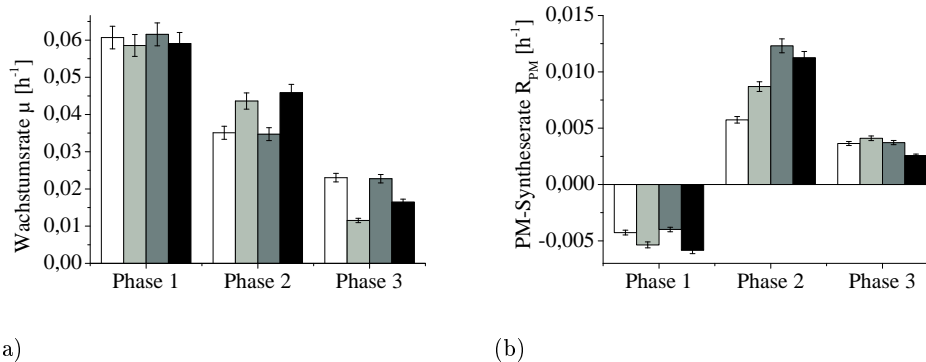


Abbildung 4.28

Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von *R. rubrum* PpsR⁺ auf M2SF-Medium mikrobereich im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH. □: M2S Kontrolle; ■: M2SF Kontrolle; ▣: M2S 0,5 mM GSH; ■: M2SF 0,5 mM GSH; die Fehlerbalken zeigen eine Fehlergrenze von 5%

Im Vergleich mit dem Wildtyp zeigte *R. rubrum* PpsR⁺ deutlich langsameres Wachstum ($\mu_{max} \sim 0,06 \text{ h}^{-1}$ bei PpsR⁺ statt $0,09 \text{ h}^{-1}$ beim WT). Trotzdem trat bei *R. rubrum* PpsR⁺ gegen Ende der Kultivierung ein um 0,1 höheres PM-Level als bei WT auf. Aufgrund des Fehlens des M2SF-Effektes in *R. rubrum* PpsR⁺ war auf diesem Medium der Unterschied nicht vorhanden.

4.5 Ergebnisse der Ligandenaffinitätschromatographie mit oxidiertem Ubichinon als Liganden

4.5.1 Herstellung des Säulenmaterials

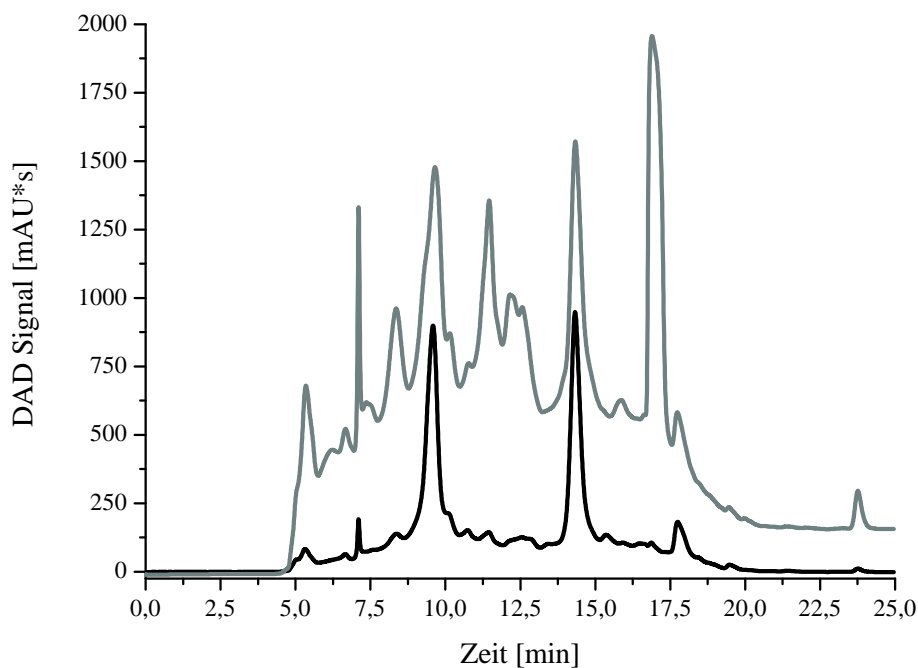


Abbildung 4.29: Ein typisches HPL-Chromatogramm der Ozonolyse-Produkte, die beiden Peaks mit größerer Absorption bei 275 nm wurden gesammelt und weiter analysiert; ■: DAD-Signal 210 nm; ■: DAD-Signal 275 nm

Synthese des Liganden

Zunächst wurde versucht, über eine Oxidation mit Kaliumpermanganat die gewünschte Carboxylgruppe in die Isoprenseitenkette des Ubichinon 10-Moleküls einzufügen. Nach der Aufreinigung mittels HPLC konnten zwei Fraktionen mit potentiellen Carboxy-Ubichinonen isoliert werden. Leider konnte in der folgenden NMR-Kontrolle aufgrund der geringen Produktivität dieser Synthese keine Carboxylgruppe nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde eine zweite Synthesestrategie getestet, bei der die Doppelbindung in der Isoprenseitenkette von Ubichinon 10 mit Ozon aktiviert und danach mit

Wasserstoffperoxid zu einer Carboxylgruppe oxidiert wurde.

Diese Methode erwies sich als bedeutend effektiver und so konnten mit Hilfe der semipräparativen HPLC zwei Fraktionen isoliert werden. In Abb. 4.29 ist ein Chromatogramm der Ozonolyse zu sehen. Die beiden Peaks mit größerer Absorption bei 275 nm wurden für weitere Analysen gesammelt. Oxidierte Ubichinonkopfguppen absorbieren typischerweise bei 275 nm [Mopton 1965], so dass diese Peaks ausgewählt wurden da anzunehmen war, dass sie intakte Ubichinonkopfguppen enthalten.

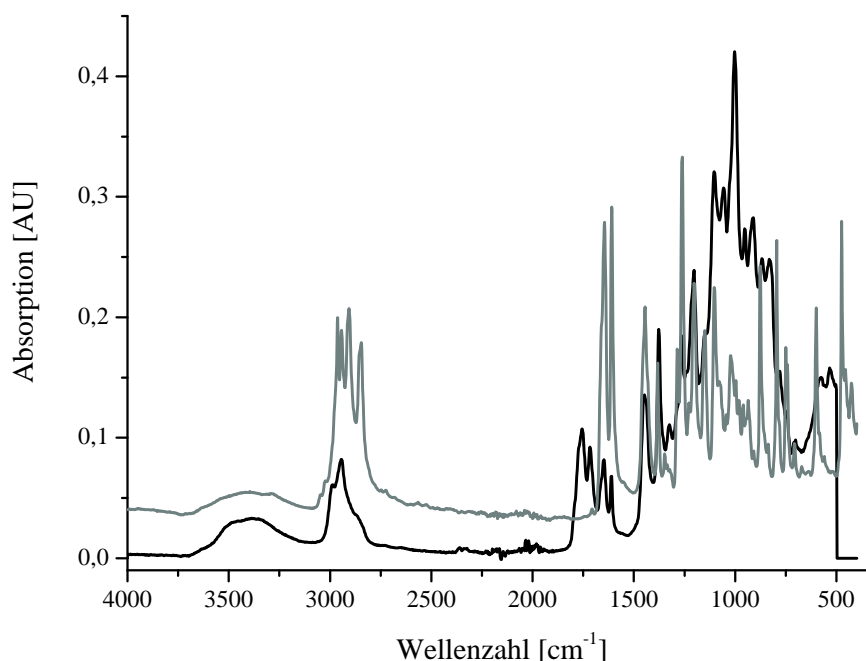


Abbildung 4.30: Das FTIR-Spektrum des Ozonolyseprodukts F2 ■; im Vergleich mit dem FTIR-Spektrum von Ubichinon 10 ■. Es zeigen sich spezifische Unterschiede, vor allem auf der Höhe der Wellenzahl 1800. Hier absorbieren typischerweise die C=O Doppelbindung einer Carboxylgruppe. Die verstärkte Hydrophilie und die Hydroxylgruppe zeigen sich in einem deutlichen Wasserpeak bei 3200-3700 cm⁻¹

Nach dem Trocknen der gesammelten Fraktionen wurden FTIR-Spektren angefertigt. Wie in Abb. 4.30 zu sehen ist, kann ein FTIR-Spektrum schon erste Veränderungen an einem Molekül aufzeigen. Das Spektrum der Fraktion 2 zeigte eine Bande bei der

Wellenzahl 1800, die auf eine Doppelbindung zu Sauerstoff hinweist, also auf die C=O Doppelbindung der gewünschten Carboxylgruppe. Auch die sogenannte Wasserbande zwischen 3200 und 3700 Wellenzahlen verstärkte sich, wahrscheinlich aufgrund der C-OH Bindung in der Carboxylgruppe. Castresana et al. [1992] beschreiben typische Banden für Ubichinone bei den Wellenzahlen 1600-1680. Diese sind sowohl im Referenzspektrum, als auch im Spektrum des ozonolysierten Ubichinons deutlich zu erkennen.

Um die Vermutungen aus dem FTIR-Spektrum zu belegen wurde von Frau Dr. Liane Hilfert eine NMR-Analyse durchgeführt. Sie ergab, dass es sich bei Fraktion 2 um ein Molekül mit intakter Ubichinonkopfgruppe handelte und eine Carboxylgruppe eingeführt wurde. Das Molekül verfügte über ein oder zwei Isopreneinheiten in der Seitenkette. Dies konnte leider nicht exakt festgestellt werden wodurch auch das Molekulargewicht des Produktes nicht eindeutig bestimmt werden konnte. Fraktion 1 wurde ebenfalls analysiert, es stellte sich aber heraus, dass die Ubichinonkopfgruppe verändert war. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Versuche mit Fraktion 2 durchgeführt.

Kopplung des Liganden an EAH-Sepharose 4B

Die Kopplung erfolgte wie in Abs. 3.4.3 beschrieben und wurde durch ein Differenzspektrum geprüft. Da es sich bei dem Carboxylchinon um eine neusynthetisierte Substanz handelt die noch nicht weiter charakterisiert oder beschrieben ist, ist leider kein molarer Extinktionskoeffizient bekannt, mit dessen Hilfe die Absättigung der Sepharose berechnet werden könnte. Auch eine Näherung über den Extinktionskoeffizienten von Ubichinon 10 ist leider nicht sinnvoll, denn wie in Abb. 4.31 zu sehen ist, verschob sich das Absorptionsmaximum von 275 nm auf 300 nm nach der Kopplung an Sepharose. Aus diesem Grund war es auch nicht möglich zu berechnen, wie viele Aminogruppen von Ubichinongruppen besetzt wurden. Für eine exakte Bestimmung des Molekulargewichts und des molaren Extinktionskoeffizienten reichte die gereinigte Menge an synthetisierter Substanz leider nicht aus.

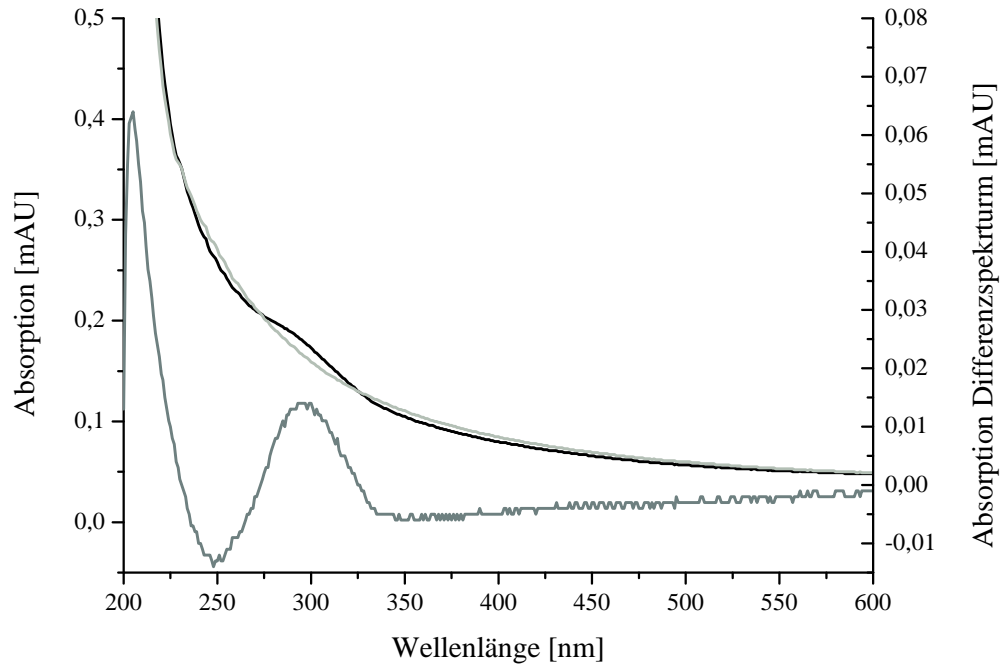


Abbildung 4.31: Dieses Diagramm zeigt die UV-Spektren der Sepharose ■, Ozonolyseprodukt F2 gekoppelt an Sepharose ■ und ein Differenzspektrum, das das Ausgangsspektrum der F2 widerspiegelt ■.

4.5.2 Verlauf der Ligandenaffinitätschromatographie

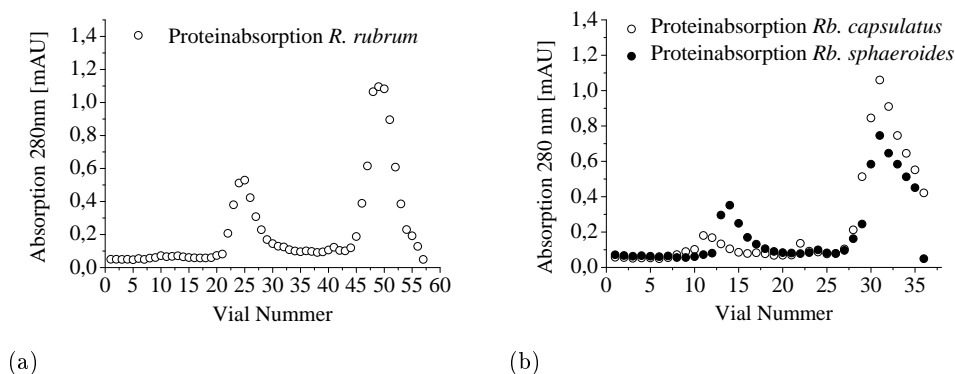


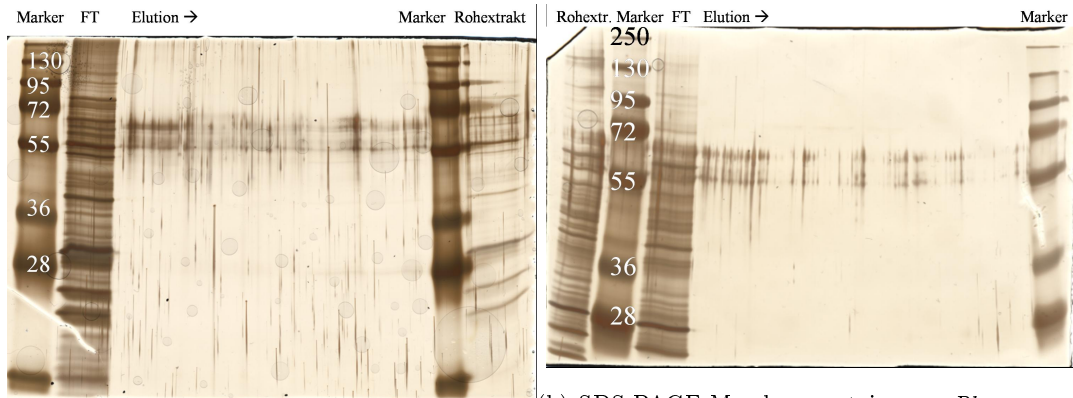
Abbildung 4.32: Elutionsprofile der Ligandenaffinitätschromatographien von *R. rubrum* (a), *Rb. sphaeroides* und *Rb. capsulatus* (b). Gezeigt ist jeweils die Proteinabsorption bei 280 nm nach [Warburg and Christian 1941] in manuell gesammelten Fraktionen von $\sim 200 \mu\text{l}$ aus der Elution der Ligandenaffinitätschromatographie

Nach der Equilibrierung der Säule mit Wasser (vgl. Abs. 3.4.2) wurden die solubilisierten Membranproteine aufgegeben. Die Säule wurde mit Solubilisierungspuffer gewaschen bis keine Proteine mehr eluierten. Dies wurde durch Fraktionierung der Eluate in einer UV-fähigen Mikrotiterplatte erreicht. Die Absorption bei 280 nm zeigt die Elution von Proteinen deutlich an.

Ein typisches Elutionsprofil ist in Abb. 4.32 zu sehen. Durch Zugabe von ungebundenen Liganden wurden die gereinigten Proteine eluiert. Da Ubichinone bei 275 nm ein Absorptionsmaximum haben und die Proteinelution bei 280 nm überwacht wurde zeigt sich die Elution des Ubichinonderivates in einem sehr großen Peak im Elutionsprofil. Wie viel Protein zu diesem Zeitpunkt mit eluiert konnte nur eine SDS-PAGE zeigen.

4.5.3 Ergebnis der Ligandenaffinitätschromatographie

Die Proben der Ligandenaffinitätschromatographien wurden weiter mittels SDS-PAGE analysiert. Es konnten 2 Banden durch Silberfärbung detektiert werden (vgl. Abb. 4.33(a) und 4.33(b)). Sowohl bei *Rb. capsulatus* als auch bei *R. rubrum* zeigten sich Banden in der Größe von ungefähr 55 kDa und ungefähr 70 kDa.



(a) SDS-PAGE Membranproteine aus *R. rubrum capsulatus*

(b) SDS-PAGE Membranproteine aus *Rb.*

Abbildung 4.33: Ergebnis der Ligandenaffinitätschromatographie, Elutionsfraktionen wurden auf SDS-Gele aufgetragen und zeigten nach der Silberfärbung Banden bei 55 und 72 kDa bei beiden Organismen.

Interessanterweise zeigte die Ligandenaffinitätschromatographie von *Rb. sphaeroides* keine detektierbaren Banden in dieser Grössenordnung (ohne Gelbild).

Die Banden wurden ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF und Esi MS/MS analysiert. Die Analyse dieser Banden erwies sich als schwierig, denn Membranproteine sind lipophil und enthalten wenig Schnittstellen für Trypsin. Ausserdem sind sie nicht wasserlöslich, was den Einsatz von einem Detergenz (RapiGest) notwendig machte.

Die Ergebnisse der Proteinidentifizierung sind in Tab. 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Esi-MS/MS-Analyse der Banden aus der Ligandenaffinitätschromatographie

| Bande | Organismus | Ergebnis | Größe |
|--------|-----------------------|-----------------------------------|----------|
| 55 kDa | <i>R. rubrum</i> | L-Glutamin-Synthetase gi 83593421 | 52 kDa |
| 70 kDa | <i>R. rubrum</i> | Chaperonin GroEL gi 83591926 | 57,6 kDa |
| 55 kDa | <i>Rb. capsulatus</i> | Porin P31243.1 | 31,5 kDa |

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Wachstumsversuche: *R. rubrum* mit redoxaktiven Medienzusätzen

5.1.1 Zusatz von DTT zu den Kultivierungen

Malpica et al. [2004] zeigten in ihren Versuchen mit *E. coli*, dass sich das Histidin-Kinase-Sensorsystem ArcB/ArcA hauptsächlich von DTT beeinflussen ließ, welches als gut membrangängig bekannt ist. Es erzeugte deutlich verstärkte Reportergenexpression, sogar unter aeroben Bedingungen. Sollte die PM-Expression in *R. rubrum* über ein ähnliches Regulationssystem kontrolliert werden, so würde man erwarten, dass nach Zugabe von DTT die PM-Produktion ansteigt. *R. rubrum* dagegen zeigte zunächst eine entgegengesetzte Reaktion: Statt einer Steigerung der PM-Expression fiel diese je nach Zugabezeitpunkt stark ab oder blieb gering. Auch das Wachstum der Zellen war ab DTT-Konzentrationen von 0,5 mM gestört, ab 1 mM stark gestört. Nach einer Lag-Phase erholten sich die Zellen und bildeten wieder PM.

Bei Experimenten mit 0,3 und 0,5 mM DTT konnte ein interessanter Effekt beobachtet werden: Nachdem die PM-Synthese zunächst verzögert wurde, begann *R. rubrum* nach einer Zeit, abhängig von der zugegebenen DTT-Konzentration, wieder mit der gleichen Syntheserate PM zu bilden wie die Kultur ohne DTT. Es fand also eine zeitliche Verzögerung statt. Danach übertraf die Menge an synthetisierter PM der DTT-haltigen Kulturen den der Kontrollen geringfügig. Deutlicher wurden zeitliche Verzögerung und darauf folgende größere PM-Produktion, wenn DTT erst später (als OD 1, Beginn der

Sauerstofflimitierung) zu den Kulturen zugegeben wurde. Dann äusserte sich der Effekt in einem starken Abfall des PM-Gehalts der Zellen, um dann nach ~ 20 h mit höheren Syntheseraten anzusteigen und den maximalen PM-Gehalt der Kultivierung ohne DTT um $\sim 0,1$ zu übertreffen (vgl. Abb. 4.4).

DTT hat ein sehr geringes Redoxpotential von -330 mV bei pH 7 [Cleland 1964] und wirkt dadurch sehr stark reduzierend. Es ist möglich, dass durch seine Membrangängigkeit verschiedene Redoxpools der Zelle so stark reduziert werden, dass der Stoffwechsel zum Erliegen kommt. Malpica et al. [2004] erwähnten keine Störungen in den Wachstumsraten nach der Zugabe von DTT oder Mercaptoethanol, das zu Vergleichszwecken eingesetzt wurde; allerdings wurde in der Publikation generell nicht auf das Wachstum der Zellen eingegangen. *R. rubrum* reagierte jedoch gerade unter aeroben Bedingungen auf DTT besonders empfindlich: Nach der Zugabe war schon ab einer Konzentration von $0,25$ mM fast kein Wachstum mehr zu beobachten, ab einer Konzentration von 1 mM DTT starben die Zellen. Eine Erhöhung der Wachstumsraten fand bei aeroben Versuchen nicht statt. Dies spricht gegen die Theorie der Überreduktion der zellulären Redoxpools, da in diesem Falle die Auswirkungen für sauerstofflimitierte Zellen größer sein müssten.

Die wahrscheinlichste Erklärung für dieses Verhalten wäre durch Thiolstress ausgelöster oxidativer Stress. Durch die DTT-Zugabe werden die Redoxpools der Zelle ohne enzymatischen Zwischenschritt reduziert, also auch der NAD/NADH-Pool. In *Streptomyces coelicolor* werden die durch die DTT-Zugabe zusätzlich verfügbaren Reduktionsäquivalente durch erhöhte Atmungsraten kompensiert. Dies führt zu größerem Fluss durch die Elektronentransportkette und dadurch zur Produktion von ROS. Passend dazu reagierte *S. coelicolor* mit deutlich erhöhten Katalaseaktivitäten und oxidativen Phosphorylierungsraten auf die Zugabe von DTT [Vekaria and Chivukula 2010].

Sollte *R. rubrum* ebenfalls nach Zugabe von DTT unter oxidativen Stress geraten, wäre der Abfall der PM-Synthese unter mikroaeroben Bedingungen eine sinnvolle Reaktion. Durch den oxidativen Stress könnte *R. rubrum* zu einer Erhöhung der intrazellulären Redoxpufferkapazität stimuliert werden. Nach dem Aufbrauchen des DTT wäre der oxidative Stress aufgehoben und die PM-Synthese würde fortgesetzt. Die erhöhten PM-Syntheseraten und das erhöhte PM-Level gegen Ende der Kultivierung könnte durch die erhöhte Redoxpufferkapazität verursacht werden.

Unter mikroaeroben Bedingungen, also unter Sauerstofflimitation könnte *R. rubrum*

den Fluss über die Atmungskette erhöhen indem mehr Oxidasen synthetisiert würden. Klamt et al. [2008] gehen in ihrem Modell der Elektronentransportkette in *R. rubrum* davon aus, dass mit dem Einsetzen der PM-Synthese auch mehr Oxidasen entstehen, die dafür sorgen, dass der verfügbare Sauerstoff optimal genutzt werden kann. Unter aeroben Bedingungen wäre der Fluss durch die Elektronentransportkette nicht durch Sauerstoff limitiert, sodass viel stärkerer oxidativer Stress entstehen könnte. So wäre auch die Wachstumsinhibierung unter aeroben Bedingungen bei DTT-Zugabe zu erklären.

Einige Organismen reagieren mit erhöhten GSH-Levels auf oxidativen Stress [Zhou and Freed 2005]. Eine erhöhte Redoxpufferkapazität in *R. rubrum* könnte durch die vermehrte Synthese von GSH zu Stande kommen [Fahey et al. 1987]. So wäre der durch DTT hervorgerufene PM-synthesesteigernde Effekt evtl. auf die gleiche molekulare Ursache zurückzuführen wie der GSH-Effekt.

In *R. rubrum* SN20 ist der Ubichinonpool verkleinert und damit ist der Fluss durch die Atmungskette begrenzt, da sich am Ubichinonpool ein sog. Bottleneck bild. Es kann also nicht so starker oxidativer Stress entstehen, wie im Wildtyp. Dieser Stamm reagiert weniger empfindlich auf den Zusatz von bis zu 5 mM DTT unter mikroaeroben Bedingungen. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Empfindlichkeit gegenüber DTT durch oxidativen Stress aus der Atmungskette zurückgeführt werden kann.

5.1.2 Zusatz von GSH, DEM oder Diamid zu den Kultivierungen

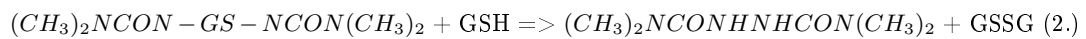
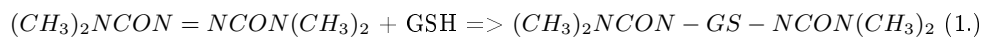
Mit GSH, anstelle von DTT, ließen sich PM-Syntheserate und PM-Level positiv beeinflussen, obwohl es in den Versuchen von Malpica et al. [2004] kaum Wirkung gezeigt hatte. Die Autoren schoben diesen Effekt auf die Undurchlässigkeit der Cytoplasmamembran für das hydrophile GSH, obwohl Suzuki et al. [1993] bereits eine Verwertung von GSH durch *E. coli* gezeigt hatten. Sollte GSH auch in *R. rubrum* nicht membran-gängig sein, so wäre hier von einem sensorischen Effekt durch einen periplasmatischen oder membranständigen thiolischen Redoxsensor auszugehen.

Um den Effekt von GSH auf PM-Expression zu präzisieren, wurden zusätzliche Versuche mit DEM und Diamid gemacht, die das Verhältnis von reduziertem GSH zu oxidiertem GSSG intrazellulär verändern können. DEM ist ein Substrat der Glutathion-S-Transferase. Es dezimiert also gezielt die Zahl der GSH-Moleküle im Cytoplasma [Boylan and Chasseaud 1967]. Diamid ist ein stark oxidierendes Agens, das spezifisch 2

GSH zu GSSG oxidieren soll [Kosower and Kosower 1995].

Der Einsatz der beiden Substanzen brachte wie erwartet eine Verringerung der PM-Expression. Leider erwies sich Diamid als extrem wachstumshemmend, sodass kaum auswertbare Ergebnisse erzeugt werden konnten. Durch die Stöchiometrie der Reaktionen mit GSH haben die beiden Oxidantien sehr unterschiedlich starke Wirkungen auf das GSH-Redoxpotential der Zelle.

So ergibt sich für die Reaktion von GSH mit Diamid:



Kosower and Kosower [1995], Green and Paget [2004]

Im Falle von DEM addiert das GSH einfach an die Doppelbindung in DEM, sodass 1 Mol DEM mit 1 Mol GSH konjugiert wird [Boylard and Chasseaud 1967]. Da diese Reaktion enzymatisch katalysiert wird, ist sie möglicherweise etwas spezifischer als die Reaktion mit Diamid. Ausgeschlossen sind Reaktionen mit anderen Thiolgruppen in den Zellen in keinem Fall.

Um die unterschiedliche Wirkung der beiden Reagenzien zu veranschaulichen wurden die zellulären GSH-Werte in die Nernstgleichung eingesetzt. Mikroaerob kultivierte *R. rubrum* Zellen enthalten 2,462 mM GSH und $8,2 \cdot 10^{-3}$ mM GSSG (geschätzt, ca. Faktor 300 weniger [Elsen et al. 2005, Hickman et al. 2002, Hwang et al. 1992]) und damit ein Redoxpotential von -236 mV. Setzt man nun 1 mM Diamid ein und geht von einer schnellen vollständigen Reaktion des Diamids mit GSH aus ergeben sich: 0,462 mM GSH und 1,0082 mM GSSG, also ein Redoxpotential von -130 mV. Die Zugabe von 1 mM Diamid würde also einen Redoxsprung von +106 mV auf den Glutathionpool geben. Im Falle von DEM ergibt sich: 1,462 mM GSH und $8,2 \cdot 10^{-3}$ mM GSSG, also ein Redoxpotential von -222 mV. Der Redoxsprung wäre dann mit +14 mV deutlich kleiner und damit für *R. rubrum* besser zu verkraften .

In zu Beginn dieser Arbeit wurden zunächst möglichst gleiche Konzentrationen an redoxaktiven Substanzen eingesetzt. Eine Wiederholung der Versuche, nachdem der intracytoplasmatischen GSH-Gehalt bestimmt wurde, mit geringeren Diamidkonzentrationen wurde wegen der geringeren Spezifität von Diamid gegenüber DEM als nicht notwendig eingeschätzt.

5.1.3 Zusatz von GSSG zu den Kultivierungen

Die oxidierte Form GSSG bewirkte keine Verringerung der PM-Expression in *R. rubrum*, obwohl reduziertes GSH das PM-Level positiv beeinflusste und daher ein entgegengesetztes Verhalten erwartet wurde. Im Gegenteil, es konnte sogar ein leichter Anstieg der PM-Expression detektiert werden, der aber kaum signifikant war. Dies könnte daran liegen, dass das GSSG durch das niedrige Redoxpotential im Schüttelkolben reduziert wurde und dann als reduziertes GSH aufgenommen wurde (vgl. Abs. 5.2), wodurch sich dann der gleiche Effekt zeigte, wie bei der direkten Zugabe von GSH. Oxidiertes GSSG kann wegen seiner sperrigen Struktur wahrscheinlich nicht aufgenommen werden [Pittman et al. 2005]. So blieb das intrazelluläre Redoxpotential unbeeinflusst von der oxidierenden Wirkung von GSSG. Tatsächlich scheint für die Regulation der PM-Expression das Redoxpotential in der Zelle ausschlaggebend zu sein, da Stoffe, die nicht aufgenommen wurden, die PM-Synthese nicht beeinflussten. Dies lässt vermuten, dass das Redoxsignal für die Regulation der PM-Expression nicht extrazellulär detektiert wird.

5.1.4 Zusatz von DMSO zu den Kultivierungen

DMSO ist ein Oxidationsmittel und ein möglicher Elektronenakzeptor der anaeroben Atmung in *R. rubrum* [Schultz and Weaver 1982]. Im Grunde wird es wie Sauerstoff verwertet und dient als finaler Elektronenakzeptor in der Atmungskette. Dies könnte den Abfluss von angestauten Elektronen im Chinonpool oder aus dem NADH-Pool ermöglichen. Laut Kirilin et al. [1999] wirkt sich DMSO in eukaryotischen Zellen nicht auf den GSH-Pool aus. Die Versuche mit DMSO-Zugabe zeigten, dass das sensorische System für die PM-Regulation in *R. rubrum* kein reines Sauerstoffdetektionssystem sein kann, sondern auch auf andere oxidierend wirkende Substanzen, wie DMSO reagierte, auch wenn sie nicht direkt auf den GSH-Pool wirkten wie DEM. Ausschlaggebend für die Wirkung war aber, ob die Substanzen in die Zellen gelangen konnten (vgl. Abs. 5.1.3).

5.2 Glutathionaufnahme in *R. rubrum*

Aus den Versuchen mit den membrangängigen Substanzen DEM und Diamid wurde geschlossen, dass der beobachtete GSH-Effekt durch Beeinflussung des intracytoplasmatischen GSH-Pools entstehen müsste und nicht durch membranständige oder periplasmatische Sensoren detektiert wurde.

Dazu müsste GSH entgegen der Annahme von Malpica et al. [2004] durch die Zellmembran diffundieren können oder über ein Transportersystem aufgenommen werden. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurde zunächst überprüft, was mit dem zugegebenen GSH aus dem Kulturüberstand passierte.

Die Messung der GSH-Konzentration im Kulturüberstand (in Versuchen mit GSH-Zugabe) und in den Zellen liessen auf eine Aufnahme des GSH schließen. Nach der Zugabe von GSH nahm die extrazelluläre Konzentration kontinuierlich ab und GSH akkumulierte in den *R. rubrum*-Zellen bis zu $49\mu\text{mol/gDW}$. Die GSH-Aufnahmerate betrug $0,049\text{ mM g}^{-1}\text{ h}^{-1}$. Dies spricht für eine kontrollierte Aufnahme des GSH durch einen Transporter. Wäre GSH membrangängig, würde sich die intrazelluläre Konzentration der Konzentration im Kulturmedium anpassen.

E. coli erreichte mit nur $1,86\mu\text{mol g}^{-1}\text{ h}^{-1}$ deutlich niedrigere Raten, jedoch scheint *E. coli* GSH zu verwenden um intra- und extrazelluläre Redoxpufferkapazitäten zu schaffen, oder wie ein kompatibles Solut. Zu diesem Zweck wird es je nach Bedingungen aus oder in die Zellen gepumpt Smirnova et al. [2012].

Für eine aktive, kontrollierte Aufnahme von GSH in *R. rubrum* gibt es noch ein weiteres Indiz: Die GSH-Aufnahme begann nicht direkt nach der Zugabe (von GSH), sondern erst nach dem Aufbrauchen der Fruktose. Ein ähnliches Phänomen wurde von Smirnova et al. [2012] beobachtet. Auch *E. coli* beginnt mit der GSH-Aufnahme erst nach dem Verbrauchen des Zuckers. Es ist denkbar, dass Malpica et al. [2004] aus diesem Grund bei Wachstum auf komplexem LB-Medium mit Xylose als C-Quelle keine Effekte von GSH beobachten konnten. Analog zu den o.g. Forschungsarbeiten wurde GSSG in *R. rubrum* nicht aufgenommen und konnte somit auch keine regulatorischen oder physiologischen Effekte verursachen.

Die Aufnahme von GSH könnte in *R. rubrum* durch ein Homolog des in *E. coli* beschriebenen GSH-Transporter GsiA/B/C/D [Suzuki et al. 2005] erfolgen. Ein weiterer bekannter GSH-Transporter CydD gehört zur Gruppe der ABC-Transporter, dient aber eher der GSH-Sekretion zur Redoxhomeostase [Suzuki et al. 2005, Pittman et al. 2005, Smirnova et al. 2012]. *R. rubrum* besitzt ebenfalls ein Homolog dieses Transporters (vgl. Anhang 8.2). Mit diesen Proteinen wäre eine kontrollierte GSH-Aufnahme und Ausscheidung möglich. Ein Transporter für oxidiertes GSSG wurde in Gram-negativen Bakterien bisher nicht beschrieben, aber in Gram-positiven, die GSH oft nicht selbst synthetisieren können wird GSSG mit ähnlichen Aufnahmeraten aufgenommen wie GSH [Sherrill and Fahey 1998]. Bei Pflanzen und anderen Eukaryonten werden sowohl GSH als auch GSSG über die Plasmamembran transloziert; besonders in mehrzelligen Organismen, wo GSH

und GSSG im interstitiellen Raum für Redoxhomöostase und Schutz vor Xenobiotika und oxidativem Stress sorgen. [Masip et al. 2006, Foyer et al. 2001, LaBelle et al. 1986].

5.2.1 Auswirkungen der intrazellulären GSH-Akkumulation

Interessanterweise führt die Akkumulation von reduziertem GSH nicht zu einer Veränderung im Redoxzustand des GSH-Pools, denn gleichzeitig mit der Anhäufung von reduziertem GSH stieg auch die Konzentration von oxidiertem GSSG. Am Punkt der höchsten GSH-Konzentration betrug das Redoxpotential des GSH-Pools -223 mV (Berechnung vgl. Abs. 3.1.7). Dieser Wert ist tatsächlich sogar höher als der für mikroaerob gewachsene Zellen ursprünglich angenommene von -236 mV, der durch Abschätzung der GSSG-Konzentration berechnet wurde, da die GSSG-Konzentration unterhalb des Detektionslimits lag [Carius et al. 2011]. Es ist also wahrscheinlich, dass das Verhältnis von 300/1 (GSH/GSSG) zu hoch angesetzt wurde (die Literatur schlägt für das Verhältnis von GSH/GSSG Werte zwischen 50/1 und 300/1 vor [Elsen et al. 2005, Hickman et al. 2002, Hwang et al. 1992]). Daher ist der Wert von -236 mV, der mit einem geschätzten Verhältnis von 300/1 berechnet wurde, wahrscheinlich zu niedrig.

In *Rb. capsulatus* wird das intrazelluläre GSH-Redoxpotential fast garnicht von den Sauerstoffbedingungen beeinflusst und liegt bei -222 bis -224 mV bei aeroben bzw. anaeroben Bedingungen [Masuda et al. 2002]. Die ebenfalls erhöhte Konzentration von GSSG in *R. rubrum* -Zellen, die GSH aufgenommen haben, weist darauf hin, dass durch die GSH-Aufnahme das Redoxpotential nicht beeinflusst wird, sondern die Zelle gezielt durch Oxidation von GSH zu GSSG eine Thiolredoxhomöostase im Bereich von ungefähr -220 mV herstellt.

Die Ursache für die gesteigerte PM-Synthese schien demnach die erhöhte intrazelluläre GSH-Konzentration zu sein. Dies könnte durch verschiedene Mechanismen verursacht werden:

1. Über die Glutathionreduktase könnten große Mengen Elektronen von GSH in den NADPH-Pool gedrückt werden. Diese gelängen dann über die Transhydrogenase in den NADH-Pool [Yamaguchi and Hatefi 1997]. Von dort aus würden sie über die Atmungskette abfließen und NAD^+ würde regeneriert werden, ähnlich wie bei der Zugabe von DTT (vgl. Abs. 5.1.2). Dies würde den Elektronenzufluss zum Chinonpool erhöhen und damit das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Ubichinon verschieben.

Dies war auch der Fall. In Kulturen mit GSH-Zugabe konnte ein reduzierterer Ubichinon-Pool gemessen werden [Carius et al. 2011] als in den Kontrollkultivierungen. Dadurch hätte die Zelle mehr Redoxäquivalente zur Verfügung, die aber auch abgeatmet werden müssten. Da der Eintrag von Sauerstoff in die Kultur nicht erhöht wurde, wäre er stärker limitiert und die Elektronen würden sich anstauen. An welcher Stelle die Regulatoren der Photosynthese das Signal abgreifen und integrieren könnten, bliebe bei diesem Szenario offen.

Betrachtet man die gemessenen Werte für die produzierten organischen Säuren, so erkennt man, dass die GSH-Zugabe den Stoffwechsel von *R. rubrum* beeinflusste. Die ausgeschiedene Menge an Fumarat sank ab, während deutlich mehr Propionat produziert wurde als ohne GSH-Zugabe. Wie die Bestimmung des Redoxzustandes im Chinonpool ergab, war er nach GSH-Zugabe stärker mit Elektronen belegt als sonst. Deswegen konnte er möglicherweise nicht so viele Elektronen von der Succinatdehydrogenase aufnehmen, wie ohne GSH-Zugabe, wodurch weniger Fumarat entstand. Succinat würde statt dessen zu Propionat umgesetzt und auf diesem Wege verstoffwechselt. Der Citratzyklus müsste dafür die Reaktion von Succinat zu Succinyl-CoA in reduktiver Richtung ausführen. Über den Methylmalonyl-CoA-Weg könnte es dann zu Propionat vergoren werden, was die größeren Propionatmengen bei Kultivierungen mit GSH unterstützen.[Eitinger et al. 2007, Klamt et al. 2007]

Eigentlich müsste es auch, ähnlich wie bei DTT zu oxidativem Stress kommen, wenn durch die GSH-Aufnahme die Menge an verfügbaren Reduktionsäquivalenten stark ansteigen würde. Möglicherweise passierte dies nicht, weil die zur Übertragung der Elektronen von GSH auf NAD^+ zwei Enzyme, nämlich GSH-Reduktase und Transhydrogenase notwendig sind, die den Prozess evtl. kontrollieren können. So konnte sogar unter aeroben Bedingungen gefahrlos GSH aufgenommen und kontrolliert als Elektronenquelle genutzt werden. DTT dagegen kann Zellbestandteile unkontrolliert reduzieren und besitzt zusätzlich noch ein niedrigeres Redoxpotential als GSH.[Cleland 1964]

2. Durch die große Menge an GSH könnten Thiolgruppen an Proteinen stärker reduziert werden. Potentiell redoxsensitive, regulatorische Thiole wie in PpsR oder einer Sensorkinase die mit RegB vergleichbar wäre, würden reduziert und damit eine stärkere PM-Expression induzieren. In *Rb. capsulatus* wird PpsR durch GSH

direkt reduziert [Ponnampalam and Bauer 1997, Masuda et al. 2002]. In einem Kontrollversuch mit *Rb. capsulatus* erfolgte keine Reaktion auf die GSH-Zugabe. Obwohl auch in diesem Stamm Homologe für GSH-Transporter annotiert sind, wurde kein GSH aufgenommen (Ergebnisse nicht gezeigt).

3. Die Aktivität der Aminolaevulinsäure Synthase aus *Rb. sphaeroides* konnte in vitro durch die Reduktion ihrer Cysteinreste aktiviert werden [Kikuchi et al. 1958, Clement-Metral 1979]. Durch die Erhöhung des intrazellulären GSH-Spiegels in *R. rubrum* könnte die Enzymaktivität steigen und zu verstärkter PM-Synthese führen, denn Aminolaevulinsäure ist der limitierende Precursor für die Porphyrinbiosynthese und ist auch in die Feedbackregulation der Porphyrinbiosynthese involviert [Madigan et al. 2003, Hunter 2009].
4. Die Möglichkeit, dass *R. rubrum* GSH einfach als Kohlenstoff-Quelle für die PM-Synthese verwertete, wurde durch verschiedene Negativkontrollen unwahrscheinlich:
 - a) 20 mM GSH wurden als alleinige Kohlenstoffquelle eingesetzt. *R. rubrum* konnte auf diesem Substrat nicht wachsen.
 - b) Die Bestandteile des GSH: Cystein, Glutamat und Glycin wurden einzeln und gemeinsam als Zusatz zu *R. rubrum* -Kulturen zugegeben. Keine Aminosäure zeigte einen Effekt.
 - c) Kulturen mit GSH-Zusatz waren nicht in der Lage grössere Zellmengen zu produzieren, als die Kontrollkultivierungen.

5.2.2 Ausscheidung von GSH in das Kulturmedium

In den Kontrollkultivierungen konnten gegen Ende der Kultivierung signifikante Mengen an GSH von über 12 μM im Kulturmedium nachgewiesen werden. Ob dieser Anstieg allein durch Zellyse verursacht werden konnte, müsste noch mittels Analyse der Malatdehydrogenaseaktivität überprüft werden.

Smirnova et al. [2012] beschreiben einen dynamischen Zyklus der GSH-Exkretion und Aufnahme in *E. coli*, wobei *E. coli* aber eher unter oxidierenden Bedingungen, z.B. in frischem Medium GSH ausscheidet. Unter Nährstoffmangel, wie z.B. ohne Glucose oder Phosphat wird weniger GSH exkretiert.

In *R. rubrum* schien die GSH-Exkretion entgegengesetzt zu sein: Sie begann erst in einem späten Stadium der Kultivierung, in dem Sauerstoff schon stark limitiert war. GSH könnte hier verwendet worden sein, um aus Sauerstoffmangel nicht nutzbare Reduktionsäquivalente abzustößen. In *E. coli* dient das ausgeschleuste GSH eher dem Schutz vor oxidativem Stress durch Xenobiotika oder hohe Atmungsraten, aber auch bei pH-Werten abseits des Optimums, also auch bei zu hohen pH-Werten [Smirnova et al. 2012]. *R. rubrum* begann die GSH-Exkretion nach dem Verbrauch der Fruktose, bei Wachstum ausschließlich auf Succinat. Die extrazelluläre Konzentration betrug maximal 4,5 $\mu\text{mol/g DW}$, während *E. coli* noch deutlich höhere Werte erreichen konnte. Durch die Aufnahme der organischen Säure Succinat aus dem Kulturmedium steigt der pH-Wert deutlich an und kann Werte von über pH 8 erreichen [Zeiger and Grammel 2010]. Die Exkretion von GSH, das leicht sauer reagiert, könnte durch diesen pH-Wert-Anstieg ausgelöst werden. Wie bereits erwähnt besitzt *R. rubrum* ein Homolog des GSH-Transporters CydA/B/C/D, der auch von *E. coli* zur Ausscheidung von GSH verwendet wird. Eine aktive Ausscheidung von GSH wäre in *R. rubrum* -Kulturen denkbar, aber es sollten noch weitere Kontrollen durchgeführt werden.

5.2.3 Aerobe Kultivierung mit GSH-Zugabe

Der Zusatz von GSH zu aeroben Kultivierungen von *R. rubrum* führte tatsächlich zu etwas PM-Synthese. Bemerkenswert war, dass die Wachstumsrate in aeroben Kultivierungen mit GSH deutlich über der der Kontrollkultivierung lag und mit $0,149 \text{ h}^{-1}$ deutlich höher als die bisher bestimmten maximalen Wachstumsraten von $0,128 \text{ h}^{-1}$ [Zeiger and Grammel 2010] auf M2SF-Medium im Schüttelkolben. Scheinbar konnte *R. rubrum* die zusätzlich mit GSH zur Verfügung gestellten Redoxäquivalente über die Atmungskette in Energie umwandeln und damit schneller wachsen. Wachstum mit GSH als alleiniger Kohlenstoffquelle war auch unter aeroben Bedingungen nicht möglich. Anders als DTT scheint hierbei kein oxidativer Stress zu entstehen, gegen Ende der Kultivierung wurde sogar etwas PM gebildet.

Anders als DTT ist GSH relativ inert. Viele Reaktionen, z.B. die Oxidation zu GSSG werden durch Enzyme katalysiert oder durch starke Oxidantien wie Diamid, Wasserstoffperoxid, andere Xenobiotika oder Radikale herbeigeführt. Daher ist es sehr gut zur Herstellung von Lösungen mit definiertem Redoxpotential geeignet, wie sie für Redox-titrationen gebraucht werden. [Aslund et al. 1997] Oder eben als Speicher von Redoxäquivalenten in der Zelle.

Auch anhand dieser Versuche lässt sich nur spekulieren, wie in *R. rubrum* die Redoxsignale aus dem Cytoplasma integriert werden. Ob die erhöhten Wachstumsraten durch Verwertung von GSH als C-Quelle, durch Senkung des oxidativen Stresses oder nur durch die zusätzlich verfügbaren Reduktionsäquivalente zu Stande kamen, kann nicht belegt werden. Jedoch ist letzteres wahrscheinlich, da die Zellen nicht auf höhere ODs wuchsen, je mehr GSH zur Verfügung stand, sondern nur schneller wuchsen. In der Kultivierung mit 10 mM GSH trat die Wachstumsratensteigerung später auf, *R. rubrum* wuchs aber trotz der größeren GSH-Menge nicht noch schneller, als mit 5 mM GSH.

In mikroaeroben Kulturen von *R. rubrum* SN20 wirkte sich GSH ebenfalls positiv auf die Wachstumsrate aus. Dies hängt wahrscheinlich mit dem verkleinerten Ubichinonpool zusammen. Laut dem Modell der Elektronentransportkette aus Klamt et al. [2008] sollt die Ubichinonkonzentration, ebenso wie die Anzahl der Oxidasen unter Sauerstofflimitation ansteigen. In SN20 könnte durch den Defekt im UbiD-Gen nur die Anzahl der Oxidasen steigen; der Ubichinonpool bliebe verhältnismäßig klein. Durch die größere Anzahl an Oxidasen würden die Elektronen aus dem Ubichinonpool schneller abgezogen, um die Atmungs- und Energiegewinnungsraten aufrecht zu erhalten. Dadurch wäre der Ubichinonpool stark oxidiert, was eine potentielle Sensor kinase als Signal für sauerstoffreiche Bedingungen wahrnehmen würde. Dies würde begründen, warum SN20 entgegen der Annahmen generell weniger PM produziert als der Wildtyp (gruppeninterne Ergebnisse, Grammel pers. Mitteilung). Liefert nun die GSH-Zugabe zusätzliche Elektronen, so kann durch die GSH-Reduktase mehr NADPH generiert werden, ohne Energie und Elektronen aus der Atmungskette abzuzweigen. Insgesamt stünde also mehr Energie für das Wachstum zur Verfügung.

Diese Hypothese wird auch von den Versuchen mit DTT unterstützt: Am Ubichinonpool könnte ein Flaschenhalseffekt entstehen, der die Atmungsrate und damit die Energiegewinnung, sowie bei DTT-Zugabe auch noch die ROS-Produktion limitierte. Dies führte zu einer besseren Verträglichkeit von DTT, doch der Effekt der Inhibierung der Membransynthese hielt durch den langsameren Umsatz von DTT bis zum Ende der Kultivierung an (vgl. Abs. 5.1.1 und 5.1.2).

5.3 PpsR aus *R. rubrum*

5.3.1 Ein Aktivator-Protein?

Bindung von PpsR an DNA

Nach der erfolgreichen Aufreinigung des PpsR-Proteins aus *R. rubrum* konnten die Eigenschaften des Proteins genauer untersucht werden. Bei einem Regulator-Protein ist natürlich die DNA-Bindung besonders interessant. Henkel [2011] beschrieb bereits, dass PpsR eigentlich nur in der nativen, reduzierten Form DNA bindet. Dieses Ergebnis konnte hier bestätigt werden: Die DNA-Bindungskapazität konnte durch Inkubation über Nacht auf einen Wert von 20 ng DNA/ng PpsR gesteigert werden. Dieser Wert wird aber auch stark durch die Effizienz des vorangegangenen DNA-Verdaus beeinflusst. Je größer die gebundenen DNA-Fragmente sind, desto größer wird auch das Verhältnis von DNA zu Protein. Die starke Affinität von reduziertem PpsR zu DNA wurde so bestätigt. Oxidiertes PpsR band nur sehr wenig DNA, sodass davon ausgegangen werden muss, dass nur die reduzierte Form von PpsR regulierend auf die Transkription von Genen einwirken kann. Ausserdem zeigt es, dass die Regulatoraktivität des Proteins durch Reduktion und Oxidation des Proteins gesteuert wird.

Wenn PpsR die PM-Expression in *R. rubrum* direkt kontrolliert, wie in den meisten NSPB der Fall ist [Moskvin et al. 2005], müsste es sich bei dem PpsR-Protein aus *R. rubrum* um ein Aktivatorprotein handeln. Da unter reduzierenden Bedingungen die PM-Synthese beginnt, also die Photosynthesegene aktiviert oder dereprimiert werden, sollte ein reduzierter redoxsensitiver Regulator die Transkription ermöglichen. Besitzt ein reduzierter Regulator starke DNA-Bindeaktivität so sollte es sich um einen Aktivator für die entsprechenden Gene handeln. Ein oxidiertes Regulator mit DNA-Bindeaktivität sollte die Transkription unterdrücken, wie PpsR in *Rb. capsulatus* oder *Rb. sphaeroides* in oxidiertes Form als Repressor für die Photosynthesegene funktioniert [Penfold and Pemberton 1994]. Es wäre möglich, dass durch reduziertes PpsR Gene reprimiert würden, die unter aeroben Bedingungen die PM-Expression unterdrücken. Ein solcher Mechanismus wäre für ein PpsR-Homolog eher untypisch, jedoch zumindest zusätzlich zur Aktivatorfunktion für eine Feedbackregulation denkbar. In einem solchen Falle hätte PpsR Aktivator- und Repressorfunktion im reduzierten Zustand, wie es in dem Bakterium *Ru. gelatinosus* der Fall ist [Steunou et al. 2004].

PAGE-Analyse von nativem PpsR bei verschiedenen Redoxwerten

Die native PAGE von PpsR-Proben in Redoxpuffern zwischen 0 und -300 mV zeigten deutliche Oligomerisierung von PpsR aus *R. rubrum*. Unter reduzierenden Bedingungen wurden drei verschiedene Banden sichtbar, deren Größe mit Hilfe des Markers und der Laufstrecke auf Monomer, Tetramer und Hexamer geschätzt wurden. Die Tatsache, dass sich im Bereich über -120 mV eine deutliche Bande knapp über dem reduzierten PpsR-Monomer zeigte, weist darauf hin, dass PpsR aus *R. rubrum* eine redoxabhängige Konformationsänderung durchläuft. Diese könnte auf eine intramolekulare Disulfidbrücke zurückzuführen sein. Erst bei -78 mV wurde eine blasse Bande sichtbar, die im Größenbereich für ein PpsR-Dimer lag.

Auch das PpsR-Protein aus *Rb. sphaeroides* bildet Komplexe. Den Ergebnissen von Masuda et al. [2002] und Gomelsky et al. [2000] zufolge bilden sich Tetramere, die dann im oxidierten Zustand an eine palindromische DNA-Sequenz binden können. Bei einer strukturellen Analyse von Yamazaki et al. [2008] konnten jedoch keine Tetramerstrukturen mehr detektiert werden, sondern es wurden nur Dimere gefunden.

Eigentlich kann die verwendete Silberfärbung nicht quantitativ ausgewertet werden, da unterschiedliche Proteine sich unterschiedlich stark anfärben lassen [Rehm and Letzel 2010]. Da es sich in diesem Falle um gleiche Proteine handelt, die, nach der Reduktion mit Thiosulfat während dem Färbeprozess den gleichen Redoxzustand haben sollten, können jedoch unter Vorbehalt Vergleiche der Bandenintensitäten vorgenommen werden.

Interessant ist, dass die Bandenmuster im physiologisch interessanten Bereich von -192 bis -240 mV keine erkennbaren Veränderungen im Bandenmuster auftraten, also der "Umschaltunkt" für den Thiolschalter möglicherweise gar nicht im physiologischen Redoxbereich des Cytoplasmas liegt [Carius et al. 2011, Masuda et al. 2002] (vgl. Abs. 5.1.2). Dies ist aber auch bei beiden genauer beschriebenen PpsR-Proteinen aus *Rb. sphaeroides* und *Rb. capsulatus* bekannt:

1. in *Rb. sphaeroides* liegt das Standardredoxpotential $E^{0'}$ von PpsR bei -320 mV [Kim et al. 2006]. In der Zelle herrscht jedoch ein Redoxpotential von ungefähr -220 mV [Masuda et al. 2002], sodass die Disulfidbrücke eigentlich immer oxidiert ist und das Photosystem reprimiert wird. Der Antirepressor und Lichtsensor AppA hat ebenfalls ein Redoxpotential von -315 bis -320 mV und kann deshalb dafür sorgen, dass unter Sauerstoffmangel und Lichteintrag PpsR reduziert bleibt und die Photosynthesegene abgelesen werden können [Cho et al. 2004, Kim et al. 2006, Moskvin et al. 2007].

2. in *Rb. capsulatus* dagegen liegt das $E^{0'}$ von CrtJ bei -180 mV und damit deutlich über dem Wert des Cytoplasmas, auch unter aeroben Bedingungen (vgl. auch Abs. 5.1.2). Es ist also immer reduziert und kann nur von molekularem Sauerstoff oxidiert werden, wäre also in diesem Szenario ein direkter Sauerstoffsensor [Masuda et al. 2002]. Ob sich PpsR aus *Rb. capsulatus* auch von DMSO oxidieren lässt ist nicht bekannt (vgl. Abs. 5.1.4).

Passend zu diesen beiden Mechanismen unterscheiden sich auch die DNA-Bindungsaktivitäten der beiden Proteine; CrtJ aus *Rb. capsulatus* besitzt eine 5 x so große Bindeaktivität wie PpsR aus *Rb. capsulatus*.

Läge nun das Redoxpotential des aktivierend wirkenden PpsR aus *R. rubrum* deutlich unter dem Wert des Cytoplasmas, so müsste ein weiteres regulativ wirkendes Protein, z. B. ein Thioredoxin zusätzlich an der Regulation beteiligt sein, sonst könnte die PM-Synthese nicht angeschaltet werden. Die direkte Regulation über den GSH-pool wäre damit ausgeschlossen, da dieser ein $E^{0'}$ von -240 mV hat, und so PpsR nicht ohne zusätzliche Reduktionskraft reduzieren könnte.

Da in *R. rubrum* kein Homolog zum AppA-Protein aus *Rb. sphaeroides* vorliegt, ist es wahrscheinlicher, dass das Standardredoxpotential von PpsR aus *R. rubrum* über dem physiologischen Redoxpotential des Cytoplasmas liegt, wie im Falle von CrtJ aus *Rb. capsulatus*. Auch die Ergebnisse aus dem nativen Gel sprechen dafür, dass PpsR aus *R. rubrum* bei einem Redoxpotential zwischen -120 mV und -150mV umschaltet, da bereits bei -121 mV eine deutliche zweite Bande oberhalb des reduzierten PpsRs zu erkennen ist. Natives PpsR-Protein aus *E. coli* musste nicht reduziert werden bevor es DNA-Bindeaktivität zeigte, jedoch musste es mit oxidierenden Substanzen behandelt werden, um die Bindeaktivität zu unterdrücken [Henkel 2011]. Dies bedeutet dass es unter physiologischen Redoxbedingungen reduziert vorliegen müsste.

Ein weiteres Argument für dieses Szenario ist die Möglichkeit der direkten Reduktion von PpsR durch den GSH-Pool. PpsR könnte also direkt von Sauerstoff oder anderen oxidierend wirkenden Substanzen wie DMSO oxidiert und vom GSH-Pool wieder reduziert werden. Dazu passt, dass *R. rubrum* in den Wachstumsversuchen mit deutlich erhöhter PM-Synthese auf die Zugabe von GSH reagierte, während eine gezielte Erhöhung des Redoxpotentials im GSH-Pool mit einer Verringerung der PM-Synthese einherging. Ein Vergleich der Sequenzen der PpsR und CrtJ Proteine der drei Organismen brachte keine Hinweise darauf, welcher Mechanismus eher in Frage käme, PpsR aus *R. rubrum* ist ähnlich homolog zu beiden anderen Proteinen (vgl. Anhang 8.1).

Bisher sind PpsR-Proteine, die im reduzierten Zustand DNA binden können u.a. aus aeroben anoxygenen Photosynthesebakterien wie *Bradyrhizobium ORS278* aber auch anaeroben anoxygenen Photosynthesebakterien wie *Rubrivivax gelatinosus* bekannt [Jaubert et al. 2004, Steunou et al. 2004]. Dabei handelt es sich bei dem PpsR-Protein aus *Ru. gelatinosus* um ein Protein, das auf den LH2-Komplex aktivierend wirkt, jedoch reprimierend auf das Carotinoid-Gencluster [Steunou et al. 2004]. In *Bradyrhizobium ORS278* gibt es zwei PpsR-Proteine, wobei PpsR2 redoxinsensitiv ist und als Repressor wirkt. PpsR1 dagegen ist redoxaktiv und besitzt wie das PpsR-Protein von *R. rubrum* sogar 3 PAS-Domänen, statt wie üblich nur 2 [Jaubert et al. 2004, Kovacs et al. 2005]. Im phylogenetischen Baum (vgl. Abb. 2.5) befindet sich das PpsR-Protein aus *R. rubrum* in der Gruppe 1 in der sich auch die o.g. aktivierend wirkenden PpsR-Proteine befinden. Damit stehen ihnen diese phylogenetisch deutlich näher als PpsR aus *Rb. sphaeroides* oder CrtJ aus *Rb. capsulatus*.

PpsR aus *R. rubrum* besitzt zwei Cysteinreste, einen bei Position 428 und den konservierten redoxaktiven Cysteinresten (Cys420) zugeordnet werden kann, die aus *Bradyrhizobium* oder *Rb. capsulatus* bekannt und erforscht sind. Dieser Cysteinrest ist für die Redoxaktivität der Proteine verantwortlich, wobei unterschiedliche Mechanismen involviert sind [Hunter 2009].

Gruppe 3-PpsR-Proteine besitzen ein weiteres konserviertes Cystein bei Position 249 mit dem Cys420 eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden kann [Masuda et al. 2002, Kim et al. 2006]. In *R. rubrum* fehlt dieser Cysteinrest, ebenso wie in den anderen PpsR-Proteinen der Gruppe 1. Statt einer intra-molekularen Disulfidbrücke bilden die genauer erforschten PpsR-Proteine dieser Gruppe Dimere oder größere Oligomere mit inter-molekularen Disulfiden [Jaubert et al. 2004].

In *R. rubrum* existiert noch ein weiterer Cysteinrest bei Position 375. Dieses ist homolog zu Cys377 aus *Rhodopseudomonas palustris*, wobei dessen Protein aber wiederum Cys420 fehlt. Ob dieses Cys377 in *Rps. palustris* redoxaktiv ist, ist bisher nicht bekannt, erstaunlich ist aber, dass in diesem Organismus sowohl PpsR1 als auch PpsR2 Repressorproteine sind [Braatsch et al. 2006].

In *R. rubrum* existieren also zwei potentiell redoxaktive Cysteinreste deren Abstand von 53 Aminosäuren ausreichen könnte um eine intramolekulare Disulfid zu bilden. Im Gegensatz zu den meisten anderen Spezies, deren PpsR-Proteine der Gruppe 1 angehören, zeigte der Sequenzvergleich kein Homolog zu PpsR2 Proteinen, das reprimierend wirken könnte. Es scheint sich also bei dem PpsR-Protein aus *R. rubrum* um einen Typ zu handeln, der bisher noch nicht weiter beschrieben wurde.

***R. rubrum* PpsR⁻ - Deletionsmutante von PpsR**

Die Deletionsmutante *R. rubrum* PpsR⁻ zeigte ebenfalls, dass es sich bei dem PpsR-Protein von *R. rubrum* wahrscheinlich um einen Aktivator für die Photosynthesegene handelte. Sie konnte gar keine PM bilden und blieb völlig weiss. Sie wuchs etwas langsamer als der Wildtyp, jedoch schien ihr Stoffwechsel durch das Fehlen des *ppsR*-Gens nicht signifikant beeinträchtigt zu werden. Trotzdem neigte sie zu Sekundärmutationen die einen heterogenen Phänotyp hervorriefen. Neue mit pSUP202-ppsR transformierte *R. rubrum* -Kolonien zeigten sehr häufig unspezifische Rekombinationen. Bei Rekombinationen im PpsR-Gen handelte es sich oft um einfach rekombinierte, statt Doppel-Crossover Mutanten, sodass die Klone innerhalb weniger Überimpfschritte wieder revertierten.

Der Grund hierfür könnte die homologe Sequenzen sein, die für die spezifische Rekombination sorgen sollten. Die homologen Sequenzen von 123 und 136 wurde so kurz ausgewählt um die Stabilität des genetischen Konstruktes zu gewährleisten (K. Bettenbrock, pers. Mitteilung). Nachdem sich gezeigt hatte, dass durch so kurze homologe Sequenzen die Spezifität der Rekombination nicht mehr gewährleistet war, wurde versucht ein ähnliches Konstrukt mit homologen Sequenzen mit einer Länge von 700 bp zu erstellen, wie sie auch von anderen Arbeitsgruppen für die Erstellung von Deletionsmutanten von *R. rubrum* verwendet wurden [Joshi and Tabita 1996, Lonjers et al. 2012]. Trotz mehrerer Anläufe gelang es nicht, die einzeln amplifizierten Fragmente zusammen in pSUP202 zu ligieren (Daten nicht gezeigt).

Die Neigung zum Revertieren oder zu Sekundärmutationen nach der Deletion von wichtigen Genen in *R. rubrum* wurde auch schon von Weare [1978] beschrieben. Nach der Deletion des Enzyms für die CO₂-Fixierung Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (RuBisCo) traten ebenfalls schnell Sekundärmutationen auf (persönliche Mitteilung von Prof. Tabita an Prof. Grammel), wenn die Klone unter Evolutionsdruck gerieten. Auch der sehr gut charakterisierte Stamm *R. rubrum* G9 revertierte häufig, vor allem nach dem Ausplattieren aus der Glycerinkultur, was sehr gut an den roten Kolonien auf den Agarplatten zu erkennen ist (Gruppeninterne Ergebnisse). Es auch ist möglich, dass eine PpsR-Deletion in *R. rubrum* letal ist, und daher nie eine reine PpsR⁻-Mutante erzeugt werden konnte. Die erzeugten Mutanten hätten dann nur durch Sekundärmutationen wachsen können, was u.u. ihre Instabilität erklären könnte. Aufgrund der genetischen Instabilität der *R. rubrum* PpsR⁻ Klone konnte keine Komplementierung durchgeführt werden. Statt dessen wurde der für die Komplementierung vorgesehene Vector

pRK404::*ppsR* in den Wildtyp transformiert und so ein Überexpressionsstamm kreiert. Für die Aufklärung der Funktionsweise von PpsR in *R. rubrum* würde der weisse, instabile Phänotyp bedeuten, dass die Photosynthesegene ausschließlich von PpsR aktiviert werden könnten. Fehlte PpsR, so könnte keine PM gebildet werden. Zusätzlich müsste es wahrscheinlich noch einen Repressor geben, der die Expression der Photosynthesegen völlig unterdrücken kann, sonst wäre ohne einen Aktivator zumindest basale Expression des Photosystems möglich. Dieser Repressor ist bisher in *R. rubrum* noch nicht beschrieben worden. Diese Hypothese wird zwar vom Phänotyp der Mutante unterstützt, jedoch kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass in der Mutante nur das PpsR-Gen verändert war.

Der Überexpressionsstamm *R. rubrum* PpsR⁺

Ein potentielles Aktivator-Protein sollte, wenn es stärker exprimiert wird als üblich, auch zu einer vermehrten Expression der Zielgene führen. Dies konnte für PpsR aus *R. rubrum* bestätigt werden. Als vergleichbare Größe musste aber statt der PM-Syntheserate die Ausbeute verwendet werden, da die Zellen deutlich langsamer wuchsen, als der zu Vergleichszwecken erzeugte Stamm ohne *ppsR*-Gen auf dem pRK404 Plasmid. Im Schüttelkolben führte dies bei gleichbleibendem Sauerstoffeintrag dazu, dass die Zellen weniger stark sauerstofflimitiert sind. Die Verringerung der Wachstumsrate lag wahrscheinlich an der zusätzlich erforderlichen Proteinproduktion für die Überexpression von PpsR. In die Ausbeute geht die Zellmengen im Quozienten ein, sodass sich eine vermehrte Expression trotz langsameren Wachstums positiv auf den Wert auswirkt (vgl. Abs. 3.1.4). Der Stamm *R. rubrum* PpsR⁺ zeigte in allen getesteten Medienzusammensetzungen höhere PM- Ausbeuten als der Vergleichsstamm, im Falle der Zugabe von GSH sogar deutlich höhere Ausbeuten. Dies unterstützt ebenfalls die Theorie, dass es sich bei dem PpsR-Regulator aus *R. rubrum* tatsächlich um ein Protein mit aktivierender Funktion für die Photosynthesegene handelt.

Obwohl das Plasmid pRK404 eigentlich standardmässig für Purpurbakterien eingesetzt wird [Zhang et al. 2004, Scott et al. 2003] sind bisher noch keine Auffälligkeiten in Verbindung mit dem Plasmid beschrieben worden.

R. rubrum -Stämmen mit dem pRK404-Plasmid wuchsen auf M2SF-Medium zwar schneller und zeigten auch höhere PM-Syntheseraten als auf M2S-Medium, erreichten jedoch kein höheres maximales PM-Level, was einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp darstellt. Zusätzlich reagierten die Zellen sehr empfindlich auf die Zugabe von reduzier-

tem GSH, was erstaunlich war, denn es konnte zu Kultivierungen mit dem Wildtyp bis zu 10 mM eingesetzt werden, ohne dass die Zellen beeinträchtigt waren. Beide Beobachtungen betrafen auch Stamm *R. rubrum* PpsR⁺. Wie diese Effekte durch das Plasmid pRK404, möglicherweise in Verbindung mit dem Einsatz von Tetracyclin als Antibiotikum zu Stande kommen konnten, kann hier nicht abschließend geklärt werden. Eine mögliche Erklärung für die Empfindlichkeit gegenüber GSH liefern Zhang and Duan [2009]. Sie berichten über eine gesteigerte Effektivität von Tetracyclin in Gegenwart von GSH bei *Pseudomonas aeruginosa*. Als Erklärung für diesen Effekt schlugen sie jedoch eine generelle Wachstumsinhibierung bei GSH-Zugabe vor, was jedoch im Falle von *R. rubrum* nicht zutrif.

IPTG wurde vermieden um zu Verhindern dass die Zellen durch die Zugabe von weiteren Chemikalien noch mehr gestört wurden, z.B. durch Beeinflussung des Zellredoxpotentials oder LacI-ähnlicher Regulatoren in *R. rubrum* (L. Carius, pers. Mitteilung). Da das pRK-Konstrukt auch kein *lacI*-Gen enthielt, war ein Zusatz von IPTG nicht nötig.

Ohne die Zugabe von GSH kam es nur zu einer relativ geringen Steigerung der PM-Synthese. Dies könnte daran liegen, dass der PpsR-Regulator ein Redoxsensor ist der mit dem Redoxpotential der Zelle im Gleichgewicht ist. Das bedeutet, dass nicht allein durch die Überexpression durch eine vermehrte Zielgenexpression kommen muss, sondern dass es möglicherweise eines verstärkten Signals bedarf, das dann auch eine Änderung des Redoxzustands der größeren Regulatormenge bewirken könnte.

Andere bekannte *ppsR*-Überexpressionstämme z.B. ein *ppsR*-Überexpressionstamm von *Rb. sphaeroides* zeigte keine PM-Produktion mehr und konnte auch nicht phototroph wachsen [Gomelsky et al. 2008]. Ein Überexpressionstamm von einem Organismus in dem PpsR aktivierend wirkt wurde bisher nicht beschrieben.

5.4 Ligandenaffinitätschromatographie mit Ubichinon als Ligand

Die Synthese des Ligandenaffinitätschromatographie -Säulenmaterials hing maßgeblich von der Synthese des koppelbaren Ubichinon-Derivats mit einer Carboxylgruppe in der Isoprenseitenkette ab. Ohne diese Carboxylgruppe konnte das Ubichinon nicht an die Sepharose gekoppelt werden. Da die zunächst durchgeführte Kaliumpermanganatoxidation eine große Menge an unspezifischen Produkten lieferte und die Ubichinonkopfgruppe angriff, wurde dieser Ansatz aufgegeben. Statt dessen brachte die Ozonolyse nach Veselovskii et al. [1982] die gewünschte, schonende Oxidation der Isoprenseitenkette unter Bewahrung der Ubichinon-Kopfgruppe. Diese Produkte wurden mit semipräparativer HPLC aufgereinigt.

Leider erwies sich die Ozonolyse als sehr schwierig zu reproduzieren, da der etwas ältere Ozongenerator (Sander, Labor-Ozonisator) weder die produzierte Ozonmenge, noch die eingesetzte Sauerstoffmenge quantifizieren konnte. Generell färben sich mit Ozon begaste, farblose Lösungen bläulich, sobald Ozon im Überschuss eingetragen wurde. Bei der tief gelborange-farbenen Ubichinon 10 Lösung war dies nicht erkennbar.

Da sich bei den weiteren Ozonolysen nicht immer die gleichen Produkte zeigten, wurde nur die mittels NMR geprüfte Probe des Carboxyl-Ubichinons eingesetzt. Dies hatte zur Folge, dass für die Versuche sehr wenig Stoffmenge zur Verfügung stand und daher auf die Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten, eine gezielte Optimierung der Kopplung an die Sepharose oder die Bestimmung des genauen Molekulargewichts verzichtet werden musste.

Trotzdem schien die Ligandenaffinitätschromatographie wie erwartet zu funktionieren. Auf der SDS-PAGE zeigten sich nach dem Auftragen der Eluate aus der Ligandenaffinitätschromatographie mit solubilisierten Membranproteinen aus *Rb. capsulatus* oder *R. rubrum* reproduzierbar Banden in den Größen von 55 und 70 kDa. Dies verleitet schnell dazu, anzunehmen, dass es sich bei den ähnlich großen Proteinen auch um ähnliche Aminosäuresequenzen und damit um funktionell gleiche Proteine handeln müsste.

Diese Vermutung konnte nicht belegt werden; die MS-Analyse lieferte kein Ergebnis, das zu den Vermutungen über die Identität der isolierten Proteine passen würde. Statt dessen wurde aus *Rb. capsulatus* ein Porin identifiziert, das mit einer Größe von 31,5 kDa nicht unbedingt zu der detektierten Bande bei 55 kDa passt. Die Identifizierung eines einzelnen Proteins bedeutet auch nicht, dass es sich um das einzige Protein in dieser Bande handelte. Es ist ebenso möglich, dass sich noch weitere Membranproteine in der

Bande befinden, welche nicht identifiziert werden konnten. Um die Funktionalität der Ligandenaffinitätschromatographie zu belegen, wäre eine Detektion des Proteins RegB aus *Rb. capsulatus* optimal.

Diese Histidinkinase bindet Ubichinone in reduzierter und oxidiertes Form, sowohl in vivo, als auch in vitro [Wu and Bauer 2010]. Sie besitzt ein Molekulargewicht von gut 50 kDa. Die detektierte Bande hatte mit ungefähr 55 kDa eine ähnliche Größe, zumal die Genauigkeit der Gewichtsbestimmung von Proteinen mit molekularen Gewichtsmarkern im SDS-Gel wegen der unterschiedlichen Eigenschaften der Proteine nur einen Anhaltspunkt für die tatsächliche Größe des Proteins bietet.

Nutzt man ein bioinformatisches Programm zum virtuellen Verdau der RegB-Proteins (hier ExPASy, PeptideCutter), so zeigen sich die theoretisch möglichen Trypsinschnittstellen des Proteins. Diese sind in der Sequenz von RegB relativ ungünstig gelegen, da die Transmembranhelices sehr hydrophobe Aminosäuren enthalten. Trypsin schneidet nur nach den Aminosäuren Lysin und Arginin [Rehm and Letzel 2010] die durch die endständigen Aminogruppen in den Seitenketten eher hydrophil sind. Diese Konstellation macht es sehr schwierig eine solche Histidinkinase überhaupt mit dem hier verwendeten Verfahren zu identifizieren.

Aus der Ligandenaffinitätschromatographie mit solubilisierten Membranproteinen aus *R. rubrum* wurde die L-Glutaminsynthetase identifiziert, die zumindest von der Größe her zu der ausgeschnittenen Bande bei ca. 55 kDa passt. Da es sich um ein lösliches, cytoplasmatisches Protein handelt, war das Ergebnis überraschend und es liegt nahe, dass es sich bei diesem Protein um eine Kontamination handelt, die aus der Solubilisierung der Membranproteine mitgeschleppt wurde. Wie oben erläutert kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich noch weitere, nicht identifizierte Proteine in der Bande befinden, die sich aufgrund ihrer Membranproteinstruktur schlecht verdauen und damit auch schlecht identifizieren lassen.

Das Scheitern der Identifizierung von Proteinen aus den Eluaten, die die Funktionalität der Ligandenaffinitätschromatographie belegen, kann, ausser den Problemen bei der Identifizierung von Membranproteinen noch weitere Gründe haben:

1. Die RegB-Histidinkinase konnte nicht an die Liganden binden. Wie Wu and Bauer [2010] beschrieben, bindet RegB sowohl reduziertes als auch oxidiertes Ubichinon und könnte in nativer Form voll mit Chinon belegt sein, sodass eine Bindung an das Säulenmaterial nicht erfolgte, zumal oft der natürliche Ligand besser bindet als ein Derivat. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Veränderungen am Isoprenanteil die

Bindung sehr stark stört ist eher gering: RegB aus *Rb. capsulatus* band in vitro z.B. auch an Ubichinon 0 das überhaupt keine Isoprenseitenkette besitzt [Swem et al. 2006].

2. *R. rubrum* besitzt möglicherweise keine Histidinkinase, die an Ubichinon bindet. Da es zu RegB kein Homolog gibt, sollte mit dieser Ligandenaffinitätschromatographie eben dieser Sachverhalt untersucht werden.
3. Die Konzentration der gebundenen Liganden war zu gering um ausreichend Protein zu binden. Da kein molekularer Extinktionskoeffizient verfügbar ist, konnte die Kopplungseffizienz nicht berechnet werden, es ist also möglich, dass zu wenig Ligand gebunden wurde. Zusätzlich konnte nicht geprüft werden, ob die Kopplung tatsächlich über die Carboxylgruppe am Isoprenende erfolgte. Wären die Liganden mit der Ubichinon-Gruppe an die Sepharose gekoppelt worden, wäre die funktionelle Gruppe des Liganden nicht verfügbar und die Ligandenaffinitätschromatographie könnte gar nicht funktionieren.

Abschließend sollte aber erwähnt werden, dass das Erscheinen von mehreren fast gleichgroßen Banden nach einer Ligandenaffinitätschromatographie aus zwei verschiedenen Organismen eigentlich kein Zufall sein sollte. Weiterhin zeigte sich nach der Ligandenaffinitätschromatographie mit Proteinen aus *Rb. sphaeroides* keine Banden in der entsprechenden Größe. Das RegB-Homolog PrrB aus *Rb. sphaeroides* bindet keine Chinone, sondern detektiert den Fluss durch die Cbb3-Oxidase [Kim et al. 2007], sodass dieses Ergebnis als Negativkontrolle gewertet werden könnte.

So kann spekuliert werden, dass es in *R. rubrum* doch einen Redoxsensor gibt die ähnliche Aufgaben erfüllt wie RegB. Passend dazu vermuteten Grammel and Ghosh [2008] schon einen Zusammenhang des Redoxpotentials im Chinonpool mit der Photosynthesegenregulation. In Kombination mit der Theorie, dass PpsR aus *R. rubrum* aktivierend auf die PM-Expression wirkt, und ein Repressor als Gegenspieler zu PpsR noch unbekannt ist (vgl. Abs. 5.3.1), wäre es interessant anzunehmen, dass es sich bei dem potentiellen Response-Regulator zu dem unbekanntem Redoxsensor dann um einen Repressor für die Photosynthesegene handeln könnte. Diese Möglichkeit würde die fehlende Homologie zu den bereits beschriebenen RegB-Typ-Histidinkinasen erklären. Hinweise

auf das Vorhandensein eines Repressors für die Photosynthesegene zeigte ich in den Versuchen mit PpsR⁺ und PpsR⁻. Bei der Deletion war ein Ablesen der Photosynthesegene nicht möglich, bei Überexpression wurden sie nicht vollständig exprimiert.

In *R. rubrum* SN20, in dem der Ubichinonpool stark dezimiert ist zeigt sich ein Phänotyp der ebenfalls auf eine Signaltransduktion aus dem Ubichinonpool hindeutet: Der M2SF-Effekt, also gesteigerte PM-Synthese nach Zugabe von Fruktose zum Kulturmedium konnte in SN20 nicht beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass dieser Effekt durch ein Signal aus dem Ubichinonpool hervorgerufen wird, das nicht gegeben werden kann, wenn der Ubichinonpool dezimiert ist.

Wie in Abschnitt 5.2.3 beschrieben, könnte ein Flaschenhalseffekt am Ubichinonpool dieses Stammes entstehen, weil der Pool nicht mit der Anzahl der Oxidasen gemeinsam wächst, wie Klamt et al. [2008] annehmen. Dies müsste im Umkehrschluss zu einem Elektronenstau im oberen Teil der Atmungskette führen, der sich auch auf das cytoplasmatische Redoxpotential auswirkt. Diese erhöhte Reduktionskraft im Cytoplasma reicht in SN20 aber nicht aus, um das fehlende Signal aus dem Ubichinon-Pool aufzuheben, was darauf hinweist, dass tatsächlich noch ein weiterer wichtiger Regulator die PM-Synthese in *R. rubrum* kontrollieren könnte.

Kapitel 6

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Redoxregulation der PM-Synthese in dem nichtschwefel-Purpurbakterium *R. rubrum* untersucht. Dazu wurden Wachstumsversuche mit Zugabe von Substanzen durchgeführt, die das intrazelluläre Redoxpotential beeinflussten. *R. rubrum* reagierte auf quantitative Veränderungen im GSH-Pool mit veränderter PM-Synthese. Eine Erhöhung der GSH-Menge durch die Aufnahme von GSH aus dem Kulturmedium beeinflusste es positiv, eine Verringerung durch DEM oder Diamid führte zu einer Verringerung der PM-Synthese. GSH wurde aus dem Kulturmedium mit einer Rate von 0,049 mM/g*h aufgenommen. Der vergrößerte GSH-Pool führte nicht zu einem Abfall des intrazellulären Redoxpotentials. Es wurde durch Oxidation von GSH zu GSSG bei ungefähr -220 mV gehalten, wie die intrazelluläre GSH/GSSG-Messung ergab. Die Elektronen wurden möglicherweise über die Atmungskette abgeleitet und verursachten einen reduzierteren Ubichinonpool.

DTT bewirkte entgegen der Erwartungen ebenfalls einen Abfall der PM-Synthese. Dieser Effekt könnte mit dem Umschlagen von Thiolstress in oxidativen Stress durch die Entstehung von ROS, welche durch erhöhte Atmungsraten entstanden, erklärt werden. Passend dazu vertrugen aerob kultivierte *R. rubrum* -Zellen kein DTT und starben nach der Zugabe. Oxidativer Stress nach der GSH-Zugabe entsteht wahrscheinlich nicht, da die Übertragung von Elektronen auf die Atmungskette enzymatisch katalysiert und damit kontrolliert abläuft.

Alternative Elektronenakzeptoren wie DMSO beeinflussten die PM-Synthese ebenfalls negativ, obwohl sie sich nicht auf das Thiolredoxverhältnis auswirken sollten.

PpsR-Proteine sind als Master-Regulatoren der Photosynthesegene bekannt und in anderen Purpurbakterien sehr gut untersucht. Die Ergebnisse aus heterologer Expression,

Überexpression und Deletion des PpsR-Proteins aus *R. rubrum* zeigten einheitlich, dass PpsR aktivierend auf die PM-Synthese wirkte. Auf einer nativen PAGE zeigten sich Banden für oxidiertes PpsR ab einem Redoxpotential -150 mV, also deutlich über dem intrazellulären Redoxpotential, was auf eine direkte Oxidation des Regulators durch Sauerstoff oder andere Oxidanzien hinweist.

Die Ligandenaffinitätschromatographie lieferte leider kein eindeutiges Ergebnis. Trotzdem sprechen viele Ergebnisse für das Vorhandensein von mindestens einem weiteren Regulator für die Photosynthesegene, denn das Redoxpotential im Ubichinonpool scheint eine wichtige Rolle für die PM-Expression zu spielen. Ein Regulator, der dieses Signal integrieren könnte, ist aber noch unbekannt und konnte leider auch nicht identifiziert werden, obwohl spezifische Banden in den Eluaten der Ligandenaffinitätschromatographie gefunden wurden.

Die Deletionsmutante PpsR⁻ konnte keine PM synthetisieren, und die PpsR⁺-Mutante vor *R. rubrum* konnte nur in begrenztem Rahmen mehr PM produzieren. Dies spricht für eine Repression der Photosynthesegene durch einen weiteren Regulator, da in PpsR⁻ nicht einmal basale Expression detektiert werden konnte. Der verantwortliche Regulator ist ebenso unbekannt wie der Redoxsensor der auf den Ubichinonpool reagiert. Es wäre interessant anzunehmen, dass es sich um ein zusammenwirkendes Sensorsystem handeln könnte.

Insgesamt konnte damit in dieser Arbeit ein neues Modell für die Photosynthesegenregulation in *R. rubrum* skizziert werden. Es beinhaltet ein aktivierend wirkendes PpsR-Protein und mindestens einen weiteren Regulator der auf den Redoxzustand des Ubichinonpools reagiert und dessen Signaltransduktion reprimierend auf die Photosynthesegene wirkt. Eine solche Kombination von Regulatoren wurde bisher bei den anoxygenen Photosynthesebakterien noch nicht beschrieben und stellt damit ein großes Potential für weitere interessante Forschungsarbeit dar.

Kapitel 7

Ausblick

Durch das in dieser Arbeit skizzierte Modell der PM-Regulation in *R. rubrum* wäre die Identifizierung der weiteren Regulatoren ein wichtiges Ziel, ebenso die Identifizierung der Erkennungssequenzen der Regulatoren. Dazu könnte die Idee der Ligandenaffinitätschromatographie noch einmal aufgegriffen werden, um die Proteinmenge für die Identifizierung zu vergrößern und den gesamten Prozess zu optimieren. Dazu wäre eine heterologe Expression von RegB aus *Rb. capsulatus* hilfreich, denn mit Hilfe von isoliertem RegB könnte dessen Affinität zu der synthetisierten Chromatographiematrix leichter untersucht werden.

Ein weiteres fehlendes Puzzleteil ist die Bindungssequenz von PpsR an DNA. Die Identifizierung dieser Sequenz würde einen Überblick über das PpsR-Regulon ermöglichen und damit auch die Suche nach weiteren involvierten Regulatoren erleichtern. Dazu könnten Gel-Shift-Experimente zum Einsatz kommen, in denen verschiedenen Sequenzen getestet werden könnten.

Ein weiterer interessanter Ansatz wäre, die Promotorregionen der verschiedenen Teile des Photosynthesegenclusters in Gel-Shift-Experimente einzusetzen und darüber potentiell involvierte Regulatoren zu screenen. So könnten evtl. Response-Regulatoren zu einem Mehrkomponentensystem identifiziert werden.

Kapitel 8

Anhang

8.1 pBLAST-Ergebnisse zu relevanten Proteinen in *R. rubrum*

Tabelle 8.1: BLAST-Ergebnisse: Vergleiche von PpsR aus dem *R. rubrum* -Genom mit PpsR und CrtJ-Proteinen aus anderen Organismen

| Name | Funktion | Identifizierungscode (NCBI) | E-Values |
|------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|----------------|
| PpsR <i>R. rubrum</i> | Fis-Family transcriptional regulator | YP_425717.1 | |
| CrtJ <i>Rb. capsulatus</i> | transcriptional Regulator | P26167.1 (GenBank) | $7 * e^{-60}$ |
| PpsR <i>Rb. sphaeroides</i> | transcriptional Regulator | AAF24278 (GenBank) | $2 * e^{-63}$ |
| PpsR <i>Ru. gelatinosus</i> | transcriptional Regulator | YP_005438181 (NCBI) | $3 * e^{-143}$ |
| PpsR1 <i>Bradyrhizobium ORS278</i> | transcriptional Regulator | YP_001203751 (NCBI) | $3 * e^{-129}$ |
| PpsR1 <i>Rps. palustris HaA2</i> | transcriptional Regulator | YP_487597 (NCBI) | $5 * e^{-136}$ |

Tabelle 8.2: pBLAST-Ergebnisse der Glutathiontransporter aus dem *R. rubrum* -Proteom

| Gen Locus Tag | Funktion | Query BLAST (Swiss-Prot) | Sequence search | E-Values | Literatur |
|---------------|---|--------------------------------|--------------------|----------------|-----------------------|
| Rru_A3169 | ABC transporter component | GsiA_ <i>E. coli</i> A1A967 | | $2 * e^{-127}$ | [Suzuki et al. 2005] |
| Rru_A2011 | ABC transporter component | | | $2 * e^{-127}$ | |
| Rru_A0982 | ABC transporter component | | | $2 * e^{-127}$ | |
| Rru_A2356 | Extracellular solute binding protein | GsiB_ <i>E. coli</i> A1A968 | | $3 * e^{-38}$ | |
| Rru_A2357 | binding-protein dependent transport system inner membrane protein | GsiC_ <i>E. coli</i> A1A970 | | $3 * e^{-71}$ | |
| Rru_A2358 | binding-protein dependent transport system inner membrane protein | GsiD_ <i>E. coli</i> A1A971 | | $6 * e^{-56}$ | |
| Rru_A0863 | ABC transporter transmembrane region | CydD_ <i>E. coli</i> P29018 | | $1 * e^{-44}$ | [Pittman et al. 2005] |
| Rru_A1917 | ABC transporter transmembrane region | | | $2 * e^{-42}$ | |
| Rru_A2014 | ABC transporter transmembrane region | | | $3 * e^{-40}$ | |

8.2 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---|
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCA | engl. Bicinchoninic acid, Bicinchoninsäure |
| BLAST | Basic local alignment search tool |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| DEM | Diethylmaleat (Maleinsäurediethylester) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| DsbA/B | Disulfide bond formation protein A/B |
| DTNB | 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), Ellman Reagenz |
| DTT | Dithiothreitol |
| DW | engl. Dry weight, Trockengewicht |
| EDTA | engl. Ethylenediaminetetraacetic acid, Ethylendiamintetraessigsäure |
| GSH | Glutathion (reduzierte Form) |
| GSSG | Glutathion (oxidierte Form) |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| 6*His | 6*Histidin tag |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| LB | engl. Lysogeny broth |
| LH | Light harvesting complex, Lichtsammelkomplex |
| milliQ | deionisiertes, gereinigtes Wasser (Millipore) |
| NADH | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid |
| NADPH | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| Ni-NTA | Nickel-nitrilotriacetic acid |
| OD | Optische Dichte |
| p-ABA | engl. para-aminobenzoic acid, para-Aminobenzoessäure |
| PAGE | Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| PAS | Per (period circadian) Arnt (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) Sim (single-minded) Domäne |
| PBS | engl. Phosphate buffered saline, Phosphat gepufferte Saline |
| PCR | engl. Polymerase Chain Reaction, Polymerase Kettenreaktion |
| PM | Photosynthesemembran |
| NSPB | Nichtschwefel-Purpurbakterien |

| | |
|-------|---|
| RC | Reaction center, Reaktionszentrum |
| ROS | reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | engl. Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat |
| SSA | 5-Sulfosalicylic acid ,5-Sulfosalicylsäure |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TES | Tris-EDTA-salt Puffer |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Q10 | Ubichinon 10 |
| UV | Ultraviolettes Licht |
| Vol. | Volumen |

Antibiotika

| | |
|------|-----------------|
| Amp | Ampicillin |
| Cm | Chloramphenicol |
| Km | Kanamycin |
| Sm | Streptomycin |
| Spec | Spectinomycin |
| Tc | Tetracyclin |

Organismen

| | |
|--------------------------------|------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | <i>E. coli</i> |
| <i>Rhodobacter capsulatus</i> | <i>Rb. capsulatus</i> |
| <i>Rhodobacter sphaeroides</i> | <i>Rb. sphaeroides</i> |
| <i>Rhodospirillum rubrum</i> | <i>R. rubrum</i> |
| <i>Rubrivivax gelatinosus</i> | <i>Rv. gelatinosus</i> |

8.3 Chemikalien- und Geräteliste

| Substanz | Hersteller | Bestellnummer |
|--------------------------------------|------------------|---------------|
| Aceton | Roth | 7328.2 |
| Acetonitril | Roth | 8825.2 |
| Acrylamid (30%, 29:1) | Appllichem GmbH | A4983,0500 |
| Adogen 464 | Sigma | 856576 |
| BBL Agar Grade A | BD | 212304 |
| Agarose | Sigma | A9539 |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Merck | 1.01200.1000 |
| Asparaginsäure | Fluka Analytical | 11190 |
| Bacto Trypton | BD | 211705 |
| Bacto Yeast Extract | BD | 212750 |
| Beta-Mercaptoethanol | Roth | 4227.1 |
| Biotin | Fluka Analytical | 14400 |
| Bromphenolblau | Sigma | B55-25 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | Sigma | 12022 |
| Chloroform | Roth | Y015.1 |
| Coomassie Brilliantblau G-250 | Merck | 1.15444.0025 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | Merck | 1.02787.1000 |
| Cystein | Fluka | 30090 |
| D-Fruktose | Fluka Analytical | 47745 |
| Dichlormethan | Roth | 7334.1 |
| DL-Dithiothreitol (DTT) | Sigma | D0632 |
| DTNB | Sigma | D8130 |
| EDTA, Dinatriumsalz Dihydrat | Appllichem | A3234,0250 |
| Essigsäure 100% (Eisessig) | Merck | 1.00063.1011 |
| Ethanol | Roth | 9065.3 |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | Merck | 1.09365.0100 |
| D-Glucose (Monohydrat) | Merck | 1.08342.1000 |
| Glutaminsäure | Fluka Analytical | 49450 |
| Glutathion-Reduktase | Sigma | G3664 |
| Glycerin | Roth | 3783.1 |
| Glycin | Roth | 3908.2 |
| H ₃ BO ₃ | Merck | 1.00160.1000 |
| HEPES | Sigma | H3375 |
| Hexan | Roth | 7339.2 |
| IPTG | Roth | 2316.3 |
| K-Acetat | Roth | T874.2 |
| Kaliumpermanganat | Sigma | 223468 |
| KH ₂ PO ₄ | Roth | P018.2 |
| KCl | Merck | 1.04936.1000 |
| KOH | Roth | 6751.1 |
| L-Glutathion, reduziert | Sigma | G4251-25G |
| Malat Dehydrogenase | Sigma | M-7383 |
| Methanol | Roth | 4627.5 |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | Roth | 3532.1 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | Sigma | 63140 |

| | | |
|---|------------------------|--------------|
| MnCl ₂ x4H ₂ O | Fluka Analytical | 63536 |
| Monobrombiman | Fluka Analytical | 69898 |
| MOPS | Roth | 6979.2 |
| Na-Acetat, wasserfrei | Sigma | 25060 |
| Na ₂ HPO ₄ , Dihydrat | Roth | 4984.1 |
| NaCl | Roth | 9265.1 |
| NAD, free acid | Roche Diagnostics GmbH | 10127965001 |
| NADPH, tetra-Natriumsalz | Roche | 10107824001 |
| NH ₄ Cl | Roth | 5470.1 |
| Nicotinsäure | Fluka Analytical | 72310 |
| Nitrioltriessigsäure | Fluka Analytical | 72560 |
| p-Aminobenzoessäure (p-ABA) | Merck | 1.00102.0250 |
| Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol | Roth | A156.1 |
| O-Phosphorsäure 85% | Roth | 6366.1 |
| 2-Propanol (Isopropanol) | Roth | 7343.1 |
| Rubidiumchlorid | Merck | 1.07622.0100 |
| SDS | Serva | 20765 |
| 5-Sulfosalicylsäure Dihydrat | Roth | 4119.1 |
| TEMED | Merck | 1.10732.0100 |
| Tris | Roth | 5429.3 |
| Ubiquinon Q10 | Herbafit | 9200 |
| ZnSO ₄ x7H ₂ O | Merck | 1.08883.0100 |

8.4 Antibiotika

| Substanz | Hersteller | Bestellnummer |
|--|------------|---------------|
| Ampicillin (Natriumsalz) | Applichem | A0839.0025 |
| Chloramphenicol | Merck | 1.02366.0050 |
| Kanamycin (Disulfat) | Merck | 1.05177.0005 |
| Rifampicin | Sigma | 83907-5G |
| Streptomycin (Sulfat) | Merck | 1.10117.0025 |
| Spectinomycin (Dihydrochlorid Pentahydrat) | Sigma | S9007-5G |
| Tetracyclin (Hydrochlorid) | Merck | 1.08189.0050 |

8.5 Klonierungen

| Substanz | Hersteller | Bestellnummer |
|---|------------|-----------------|
| Restriktionsenzyme (BamHI, EcoRI, HindIII, NdeI, PstI, XbaI, XhoI) | NEB | |
| Restriktionsverdau NEBuffer 1-4 | NEB | B7001S - B7004S |
| BSA (10 mg/ml) | NEB | B9001S |
| T4 DNA Ligase | Promega | M1801 |
| T4 DNA Ligase buffer (with ATP) | Promega | C1263 |
| GoTaq DNA Polymerase | Promega | M3171 |
| 5x green GoTaq Flexi buffer | Promega | M8911 |
| MgCl ₂ | Promega | A3511 |
| dNTP Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | Promega | U1330 |

8.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

| Gerät | Hersteller | Modell |
|------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Geräte | | |
| Dunkelraum Fotokammer | Intas Inc. | EpiChemi II Darkroom |
| Hochdruckhomogenisator | Avestin, Inc. | EmulsiFlex-C5 |
| Inkubator | B. Braun Biotech Int. | Certomat BS-1 |
| Inkubator | Memmert | DO6060-400 |
| Mikrotiterplatten Reader | BioTek Instruments | PowerWaveXS |
| Acrylamidgelelektrophorese | Biometra GmbH | Mini |
| Gelelektrophorese: Stromversorgung | BioRad Inc. | PowerPac 300 |
| Spektrophotometer | Jasco Labortechnik GmbH | V-670 |
| Spektrophotometer | Jasco Labortechnik GmbH | V-560 |
| Sterilbank | Thermo Scientific | Heraeus HS15 |
| Ultraschallstab | Bandelin electronic GmbH | Modell HD-2200 (Sonotrode MS73) |
| Ultrazentrifuge | Beckman Coulter | Optima LE-80K |
| Zentrifuge, bis 2ml | Thermo Scientific | Heraeus Fresco 17 |
| Zentrifuge, bis 50ml | Thermo Scientific | Heraeus Biofuge Stratos |
| Agarosegelelektrophorese | cti GmbH, Idstein | Gelkammer Mini |
| Feinwaage | Mettler Toledo | Excellence XS205 |
| PCR Thermoblock | Biometra | T3 Thermocycler |
| Thermomixer | Eppendorf | Thermomixer comfort |
| Verbrauchsmaterialien | | |
| SDS-PAGE Marker | Fermentas | PageRuler Plus |
| DNA Ladder | Fermentas | O'GeneRuler 1kb Plus |
| DNA Loading Dye | Fermentas | 6x Orange DNA Loading Dye |
| DNA Aufreinigungs Kit | Machery-Nagel | NucleoSpin ExtractII |
| Plasmidpreparations Kit | Machery-Nagel | NucleoSpin Plasmid |

Literaturverzeichnis

- Addlesee, H. A. and Hunter, C.: 2002, *Rhodospirillum rubrum* possesses a variant of the *bchP* gene, encoding geranylgeranyl-bacteriopheophytin reductase, Journal of Bacteriology **184**, 1578–1586.
- Aslund, F., Berndt, K. D. and Holmgren, A.: 1997, Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria., Journal of Biological Chemistry **272**(49), 30780–6.
- Ausubel, F. A., Brent, R. and Kingston, R. E.: 2002, Short protocols in molecular biology, John Wiley & Sons.
- Bauer, C., Elsen, S., Swem, L. R., Swem, D. L. and Masuda, S.: 2003, Redox and light regulation of gene expression in photosynthetic prokaryotes, Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **358**, 147–154.
- Bennett, J. and Scott, K.: 1971, Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue, Analytical Biochemistry **43**, 173–182.
- Bowman, W. C., Du, S., Bauer, C. and Kranz, R. G.: 1999, In vitro activation and repression of photosynthesis gene transcription in *Rhodobacter capsulatus*, Molecular Microbiology **33**, 429–437.
- Boyland, E. and Chasseaud, L. F.: 1967, Enzyme-catalysed conjugations of glutathione with unsaturated compounds., Biochemical Journal **104**(1), 95–102.
- Braatsch, S., Bernstein, J. R., Lessner, F., Morgan, J., Liao, J. C., Harwood, C. S. and Beatty, J. T.: 2006, *Rhodopseudomonas palustris* cga009 has two functional

- ppsR* genes, each of which encodes a repressor of photosynthesis gene expression, Biochemistry **45**, 14441–14451.
- Carius, A. B., Henkel, M. and Grammel, H.: 2011, A glutathione redox effect on photosynthetic membrane expression in *Rhodospirillum rubrum*, Journal of Bacteriology **193**, 1893–1900.
- Carius, L. K., Haedicke, O. and Grammel, H.: 2012, Working title: Systematic analysis of microaerobic growth behaviour of *Rhodospirillum rubrum*, Biotechnology and Bioengineering **n.n.**, under revision.
- Castresana, J., Alonso, A., Arrondo, J. L., Goni, F. M. and Casal, H.: 1992, The physical state of ubiquinone-10, in pure form and incorporated into phospholipid bilayers. A Fourier-transform infrared spectroscopic study., European Journal Biochemistry **204**(3), 1125–30.
- Cho, S.-H., Youn, S.-H., Lee, S.-R., Yim, H.-S. and Kang, S.-O.: 2004, Redox property and regulation of PpsR, a transcriptional repressor of photosystem gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*, Microbiology **150**, 697–705.
- Cleland, W. W.: 1964, Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups, Biochemistry **3**, 480–482.
- Clement-Metral, J. D.: 1979, Activation of ala synthetase by reduced thioredoxin in *Rhodopseudomonas sphaeroides*, FEBS Letters **101**, 116–120.
- Cogdell, R. J., Monger, T. G. and Parson, W. W.: 1975, Carotenoid triplet states in reaction centers from *Rhodopseudomonas sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrum*, Biochimica et Biophysica Acta **408**, 189–199.
- Dong, C., Elsen, S. and Bauer, L. R. S. C. E.: 2002, Aerr, a second aerobic repressor of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter capsulatus*, Journal of Bacteriology **184**, 2805–2814.
- Drews, G.: 1985, Structure and functional organization of light-harvesting complexes and photochemical reaction centers in membranes of phototrophic bacteria, Microbiological Reviews **49**, 59–70.
- Eitinger, T., Fuchs, G., Heider, J., Kemper, B., Kothe, E., Schink, B., Schneider, E. and Unden, G.: 2007, Allgemeine Mikrobiologie, G. Fuchs und H.G. Schlegel.

- Ellman, G. L.: 1959, Tissue sulfhydryl groups, Archives of Biochemistry and Biophysics **82**(1), 70–77.
- Elsen, S., Jaubert, M., Pignol, D. and Giraud, E.: 2005, PpsR: a multifaceted regulator of photosynthesis gene expression in purple bacteria, Molecular Microbiology **57**, 17–26.
- Elsen, S., Swem, L. R., Swem, D. L. and Bauer, C. E.: 2004, RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system, Microbiology and Molecular Biology Reviews **68**, 263–279.
- Eraso, J. M. and Kaplan, S.: 1995, Oxygen-insensitive synthesis of the photosynthetic membranes of *Rhodobacter sphaeroides*: a mutant histidine kinase, Journal of Bacteriology **177**, 2695–2706.
- Fahey, R. C., Buschbacher, R. M. and Newton, G. L.: 1987, The evolution of glutathione metabolism in phototrophic microorganisms., Journal of Molecular Evolution **25**, 81–8.
- Fitzmaurice, W. P. and Roberts, G. P.: 1991, Artificial DNA-mediated genetic transformation of the photosynthetic nitrogen fixing bacterium *Rhodospirillum rubrum*, Archives of Microbiology **156**(2), 142–144.
- Forman, H. J., Zhang, H. and Rinna, A.: 2009, Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis, Molecular Aspects of Medicine **30**, 1–12.
- Foyer, C. H., Theodoulou, F. L. and Delrot, S.: 2001, The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants, Trends in Plant Science **6**, 486–492.
- Ghosh, R., Hardmeyer, A., Thoenen, I. and Bachofen, R.: 1994, Optimization of the stirred culture medium for large-scale batch cultivation of *Rhodospirillum rubrum* under semiaerobic conditions with maximal yield of photosynthetic membranes, Applied and Environmental Microbiology **60**, 1698–1700.
- Giraud, E., Fardoux, J., Fourrier, N., Hannibal, L., Genty, B., Bouyer, P., Dreyfus, B. and Vermeglio, A.: 2002, Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria, Nature **417**, 202–205.

- Glaeser, J. and Klug, G.: 2005, Photo-oxidative stress in *Rhodobacter sphaeroides*: protective role of carotenoids and expression of selected genes, Microbiology **151**, 1927–1938.
- Gomelsky, L., Moskvin, O. V., Stenzel, R., and T. J. Donohue, D. F. J. and Gomelsky, M.: 2008, Hierarchical regulation of photosynthesis gene expression by the oxygen-responsive PrrBA and AppA-PpsR systems of *Rhodobacter sphaeroides*, Journal of Bacteriology **190**, 8106–8114.
- Gomelsky, M., Horne, I. M., Lee, H.-J., Pemberton, J. M., McEwan, A. G. and Kaplan, S.: 2000, Domain structure, oligomeric state, and mutation analysis of PpsR, the *Rhodobacter sphaeroides* repressor of photosystem gene expression., Journal of Bacteriology **182**, 233–238.
- Gomelsky, M. and Kaplan, S.: 1995, Genetic evidence that PpsR from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 functions as a repressor of *puc* and *bchF* expression., Journal of Bacteriology **177**, 1634–1637.
- Gomelsky, M. and Kaplan, S.: 1998, AppA, a redox regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 is a flavoprotein. identification of a novel FAD binding domain., Journal of Biological Chemistry **273**, 35319–35325.
- Grammel, H. and Ghosh, R.: 2008, Redox-state dynamics of ubiquinone-10 imply cooperative regulation of photosynthetic membrane expression in *Rhodospirillum rubrum*., Journal of Bacteriology **190**(14), 4912–21.
- Grammel, H., Gilles, E.-D. and Ghosh, R.: 2003, Microaerophilic cooperation of reductive and oxidative pathways allows maximal photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodospirillum rubrum*., Applied and Environmental Microbiology **69**(11), 6577–86.
- Green, J. and Paget, M. S.: 2004, Bacterial redox sensors., Nature Reviews Microbiology **2**(12), 954–966.
- Hanahan, D.: 1983, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, Journal of Molecular Biology **166**(4), 557–580.
- Hengen, P.: 1995, Purification of his-tag fusion proteins from *Escherichia coli*, Trends in Biochemical Sciences **20**, 285–286.

- Henkel, M.: 2011, Untersuchungen des Thiol-Redox-Netzwerkes in dem fakultativ phototrophen Bakterium *Rhodospirillum rubrum* (Betreuung A. Carius und H. Grammel), Master's thesis, Otto von Guericke Universität Magdeburg.
- Heukeshoven, J. and Dernick, R.: 1988, Improved silverstain procedure for fast staining in phastsystem development unit; staining of sodium dodecylsulfate gels., Electrophoresis **9**, 28–32.
- Hickman, J. W., Barber, R. D., Skaar, E. P. and Donohue, T. J.: 2002, Link between the membrane-bound pyridine nucleotide transhydrogenase and glutathione-dependent processes in *Rhodobacter sphaeroides*., Journal of Bacteriology **184**, 400–409.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R. and Stüber, D.: 1988, Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent, Bio/Technology **6**, 1321–1325.
- Hunter, E. C.: 2009, The Purple Phototrophic Bacteria, Springer.
- Hutner, S. H.: 1946, Organic growth essentials of the aerobic nonsulfur photosynthetic bacteria, Journal of Bacteriology **52**, 213–221.
- Hwang, C. A., Sinsky, A. J. and Lodish, H. F.: 1992, Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum, Science **257**, 1496–1502.
- Imhoff, J. F., Truper, H. G. and Pfennig, N.: 1984, Rearrangement of the species and genera of the phototrophic purple nonsulfur bacteria, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **34**(3), 340–343.
- Jaubert, M., Zappa, S., Fardoux, J., Adriano, J.-M., Hannibal, L., Elsen, S., Lavergne, J., Vermeglio, A., Giraud, E. and Pignol, D.: 2004, Light and redox control of photosynthesis gene expression in *Bradyrhizobium* PpsR: Dual roles of two PpsR, The Journal of Biological Chemistry **279**(43), 44407–44416.
- Joshi, H. M. and Tabita, F.: 1996, A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation, and nitrogen fixation, PNAS **93**, 14515–14520.

- Kikuchi, G., Kumar, A., Talmage, P. and Shemin, D.: 1958, The enzymatic synthesis of gamma-aminolevulinic acid, Annals of the New York Academy of Sciences **233**, 1214–1219.
- Kim, S.-K., Mason, J. T., Knaff, D. B., Bauer, C. E. and Setterdahl, A. T.: 2006, Redox properties of the *Rhodobacter sphaeroides* transcriptional regulatory proteins PpsR and AppA, Photosynthesis Research **89**, 89–98.
- Kim, Y. J., Ko, I.-J., Kang, H.-Y., Kim, Y. M., Kaplan, S. and Oh, J.-I.: 2007, Dominant role of the cbb3 oxidase in regulation of photosynthesis gene expression through the PrrBA system in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, Journal of Bacteriology **189**, 5617–5625.
- Kirilin, W. G., Cai, J., Thompson, S. A., Diaz, D., Kavanagh, T. J. and Jones, D. P.: 1999, Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers, Free Radical Biology and Medicine **27**, 1208–1218.
- Klamt, S., Grammel, H., Straube, R., Ghosh, R. and Gilles, E. D.: 2008, Modeling the electron transport chain of purple non-sulfur bacteria., Molecular Systems Biology **4**, 156.
- Klamt, S., Saez-Rodriguez, J. and Gilles, E.: 2007, Structural and functional analysis of cellular networks with cellnetanalyzer., BMC Systems Biology **1**, 2.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I. and Khorana, H. G.: 1971, Studies on polynucleotides. XCVI. repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases, Journal of Molecular Biology **56**, 341–361.
- Kosower, N. S. and Kosower, E. M.: 1995, Diamide: An oxidant probe for thiols, Methods in Enzymology **251**, 123–133.
- Kovacs, A. T., Rakhely, G. and Kovacs, K. L.: 2005, The PpsR regulator family, Research in Microbiology **156**, 619–625.
- LaBelle, E. F., Singh, S. V., Srivastava, S. K. and Awasthi, Y. C.: 1986, Evidence for different transport systems for oxidized glutathione and s-dinitrophenol glutathione in human erythrocytes, Biochemical and Biophysical Research Communications **139**, 538–544.

- Laemmli, U. K.: 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature **227**, 680–685.
- Laguri, C., Phillips-Jones, M. K. and Williamson, M. P.: 2003, Solution structure and DNA binding of the effector domain from the global regulator PrrA (RegA) from *Rhodobacter sphaeroides*: insights into DNA binding specificity, Nucleic Acids Research **31**, 6778–6787.
- Lee, D. G., Lamb, S. E. and Chang, V. S.: 1990, Carboxylic acids from the oxidation of terminal alkenes by permanganate: Nonadecanoic acid, Organic Syntheses **7**, 397.
- Li, K., Hein, S., Zou, W. and Klug, G.: 2004, The glutathione-glutaredoxin system in *Rhodobacter capsulatus*: part of a complex regulatory network controlling defense against oxidative stress., Journal of Bacteriology **186**(20), 6800–6808.
- Lonjers, Z. T., Dickson, E. L., Chu, T.-P. T., Kreutz, J. E., Neacsu, F. A., Anders, K. R. and Shepherd, J. N.: 2012, Identification of a new gene required for the biosynthesis of rhodoquinone in *Rhodospirillum rubrum*, Journal of Bacteriology **194**, 965–971.
- Lottspeich, F.: 2006, Bioanalytik, Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag.
- Lupo, D. and Ghosh, R.: 2004, The reaction center h subunit is not required for high levels of light-harvesting complex 1 in *Rhodospirillum rubrum* mutants, Journal of Bacteriology **186**, 5585–5595.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J.: 2003, Mikrobiologie, W. Goebel.
- Malpica, R., Franco, B., Rodriguez, C., Kwon, O. and Georgellis, D.: 2004, Identification of a quinone-sensitive redox switch in the arcB sensor kinase, PNAS **101**(36), 13318–13323.
- Masip, L., Veeravalli, K. and Georgiou, G.: 2006, The many faces of glutathione in bacteria., Antioxidants and Redox Signaling **8**(5-6), 753–62.
- Masuda, S., Berleman, J., Hasselbring, B. M. and Bauer, C. E.: 2008, Regulation of aerobic photosystem synthesis in the purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* by CrtJ and AerR, Photochemical and Photobiological Sciences **7**, 1267–1272.

- Masuda, S., Dong, C., Swem, D., Setterdahl, A. T., Knaff, D. B. and Bauer, C. E.: 2002, Repression of photosynthesis gene expression by formation of a disulfide bond in CrtJ, PNAS **99**, 7078–7083.
- Meister, A. and Anderson, M. E.: 1983, Glutathione, Annual Review of Biochemistry **52**, 711–760.
- Mopton, R. A.: 1965, Biochemistry of Quinones, Academic Press, London: New York.
- Moskvin, O. V., Gomelsky, L. and Gomelsky, M.: 2005, Transcriptome analysis of the *Rhodobacter sphaeroides* PpsR regulon: PpsR as a master regulator of photosystem development, Journal of Bacteriology **187**, 2148–2156.
- Moskvin, O. V., Kaplan, S., Gilles-Gonzales, M. A. and Gomelsky, M.: 2007, Novel heme-based oxygen sensor with a revealing evolutionary history, Journal Biological Chemistry **282**, 28740–28748.
- Mühlhardt, C.: 2008, Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics, Spektrum Akademischer Verlag.
- Mullis, K. B., Erlich, H. A., Arnheim, N., Horn, G. T., Saiki, R. K. and Scharf, S. J.: 1987, Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences.
- Novick, D. and Rubinstein, M.: 2007, The tale of soluble receptors and binding proteins: from bench to bedside., Cytokine Growth Factor Reviews **18**, 525–533.
- Novick, D. and Rubinstein, M.: 2012, Ligand affinity chromatography, an indispensable method for the purification of soluble cytokine receptors and binding proteins., Methods in Molecular Biology **820**, 195–214.
- Oelze, J. and Kamen, D.: 1971, Adenosine triphosphate cellular levels in *Rhodospirillum rubrum* during transition from aerobic to anaerobic metabolism, Biochimica et Biophysica Acta **234**, 137–143.
- Olausson, T., Fjellström, O., Mueller, J. and Rydström, J.: 1995, Molecular biology of nicotinamide nucleotide transhydrogenase -a unique proton pump, Biochimica et Biophysica Acta **1231**, 1–19.

- Penfold, R. J. and Pemberton, J. M.: 1994, Sequencing, chromosomal inactivation, and functional expression in *Escherichia coli* of *ppsR*, a gene which represses carotenoid and bacteriochlorophyll synthesis in *Rhodobacter sphaeroides*, Journal of Bacteriology **176**, 2869–2876.
- Pittman, M. S., Robinson, H. C. and Poole, R. K.: 2005, A bacterial glutathione transporter (*Escherichia coli* CydDC) exports reductant to the periplasm, Journal of Biological Chemistry **280**(37), 32254–32261.
- Ponnampalam, S. N. and Bauer, C. E.: 1997, DNA binding characteristics of CrtJ, The Journal of Biological Chemistry **272**, 18391–18396.
- Rehm, H. and Letzel, T.: 2010, Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics, Springer Verlag.
- Rudat, J.: 2006, Enzymatische Decarboxylierung von Benzenpolycarbonsäuren: Isolierung bakterieller Benzenpolycarbonsäure-Decarboxylanten, vergleichende Untersuchungen des Mellitsäure-Katabolismus, Erstreinigung und Charakterisierung einer Mellitsäure-Decarboxylase sowie chemische Untersuchungen der Benzenpolycarbonsäuren., PhD thesis, Universität Bonn.
- Schägger, H. and von Jagow, G.: 1991, Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form, Analytical Biochemistry **199**, 223–231.
- Schön, G.: 1971, Der Einfluß der Kulturbedingungen auf den Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid(phosphat)-Gehalt in Zellen von *Rhodospirillum rubrum*, Archives of Microbiology **79**, 147–163.
- Schultz, J. E. and Weaver, P. F.: 1982, Fermentation and anaerobic respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*, Journal of Bacteriology **149**, 181–190.
- Scott, H. N., Laible, P. D. and Hanson, D. K.: 2003, Sequences of versatile broad-host-range vectors of the rk2 family, Plasmid **50**, 74–79.
- Sherrill, C. and Fahey, R. C.: 1998, Import and metabolism of glutathione by streptococcus mutans, Journal of Bacteriology **180**, 1454–1459.

- Simon, R., Prierer, U. and Puhler, A.: 1983, A broad-host-range mobilization system for in vivo genetic-engineering - transposon mutagenesis in gram-negative bacteria, Biotechnology **1**(9), 784–791.
- Sistrom, W. R.: 1960, A requirement for sodium in the growth of *Rhodopseudomonas spheroides*, Journal of General Microbiology **22**, 778–785.
- Smirnova, G., Muzyka, N. and Oktyabrsky, O.: 2012, Transmembrane glutathione cycling in growing *Escherichia coli* cells, Microbiological Research **167**, 166–172.
- Smith, P. K. ., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C.: 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid, Analytical Biochemistry **150**, 76–85.
- Steunou, A.-S., Astier, C. and Ouchane, S.: 2004, Regulation of photosynthesis genes in *rubrivivax gelatinosus*: Transcription factor PpsR is involved in both negative and positive control, Journal of Bacteriology **186**, 3133–3142.
- Studier, F. W. and Moffatt, B. A.: 1986, Use of bacteriophage t7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, Journal Molecular Biology **189**(1), 113–130.
- Suzuki, H., Hashimoto, W. and Kumaga, H.: 1993, *Escherichia coli* k-12 can utilize an exogenous γ -glutamyl peptide as an amino acid source, for which γ -glutamyltranspeptidase is essential, Journal of Bacteriology **175**, 6038–6040.
- Suzuki, H., Koyanagi, T., Izuka, S., Onishi, A. and Kumagai, H.: 2005, The ylia, -b, -c, and -d genes of *Escherichia coli* k-12 encode a novel glutathione importer with an ATP-binding cassette, Journal of Bacteriology **187**(17), 5861–7.
- Swem, L. R., Elsen, S., Bird, T. H., Swem, D. L., Koch, H.-G., Myllykallio, H., Daldal, F. and Bauer, C. E.: 2001, The RegB/RegA two-component regulatory system controls synthesis of photosynthesis and respiratory electron transfer components in *Rhodobacter capsulatus*, Journal of Molecular Biology **309**, 121–138.
- Swem, L. R., Gong, X., Yu, C.-A. and Bauer, C. E.: 2006, Identification of a ubiquinone-binding site that affects autophosphorylation of the sensor kinase RegB, Journal of Biological Chemistry **281**, 6768–6775.

- Swem, L. R., Kraft, B. J., Swem, D. L., Setterdahl, A. T., Masuda, S., Knaff, D. B., Zaleski, J. M. and Bauer, C. E.: 2003, Signal transduction by the global regulator RegB is mediated by a redox-active cysteine, The EMBO Journal **22**, 4699–4708.
- Swem, L. R., Swem, D. L., Wu, J. and Bauer, C. E.: 2007, Purification and assays of *Rhodobacter capsulatus* RegB/RegA two-component signal transduction system, Methods in Enzymology **422**, 173–183.
- Tatum, E. L. and Lederberg, J.: 1947, Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*, Journal of Bacteriology **53**, 673–684.
- Tietze, F.: 1969, Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues., Anal Biochem **27**(3), 502–522.
- Vekaria, H. J. and Chivukula, R. P.: 2010, Influence of thiol stress on oxidative phosphorylation and generation of ROS in *Streptomyces coelicolor*, Journal of Biophysical Chemistry **1**, 172–176.
- Veselovskii, A. B., Kozhukhova, A. I., Obolnikova, E. A., Zamurenko, V. A., Bekker, A. R., Fillippova, T. M., Bylina, G. S., Moiseenkov, A. M., Semenovskii, A. V., Odinokov, V. N., Akhunova, V., Tolstikov, G. A. and Samokhvalov, G. I.: 1982, Structure of the products from epoxidation and ozonolysis of ubiquinone-9., Translated from: Zhurnal Organicheskoi Khimii **18**, 292–295.
- Warburg, O. and Christian, W.: 1941, Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase, Biochemistry **310**, 250–257.
- Weare, N. M.: 1978, The photoproduction of H₂ and NH₄⁺ fixed from N₂ by a derepressed mutant of *Rhodospirillum rubrum*, Biochimica et Biophysica Acta **502**, 486–494.
- Wu, J. and Bauer, C. E.: 2008, RegB/RegA, a global redox-responding two-component system, Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets **Chapter 9**, 131–148.
- Wu, J. and Bauer, C. E.: 2010, RegB kinase activity is controlled in part by monitoring the ratio of oxidized to reduced ubiquinones in the ubiquinone pool, mBio **1**, 1–9.

- Yamaguchi, M. and Hatefi, Y.: 1997, High cyclic transhydrogenase activity catalyzed by expressed and reconstituted nucleotide-binding domains of *Rhodospirillum rubrum* transhydrogenase, Biochimica et Biophysica Acta **1318**, 225–234.
- Yamazaki, Y., Fukusumi, H., Kamikubo, H. and Kataoka, M.: 2008, Role of the n-terminal region in the function of the photosynthetic bacterium transcription regulator PpsR, Photochemistry and Photobiology **84**, 839–844.
- Yang, H., Gurgel, P. V. and Carbonell, R. G.: 2009, Purification of human immunoglobulin g via fc-specific small peptideligand affinity chromatography., Journal of Chromatography A **1216**, 910–918.
- Yurkov, V. V. and Beatty, J. T.: 1998, Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria, Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**, 695–724.
- Zappa, S., Li, K. and Bauer, C. E.: 2010, The tetrapyrrole biosynthetic pathway and its regulation in *Rhodobacter capsulatus*, Advances in Experimental Medicine and Biology **675**, 229–250.
- Zeiger, L. and Grammel, H.: 2010, Model-based high cell density cultivation of *Rhodospirillum rubrum* under respiratory dark conditions, Biotechnology and Bioengineering **105**, 729–739.
- Zhang, Y. N. and Duan, K. M.: 2009, Glutathione exhibits antibacterial activity and increases tetracycline efficacy against *Pseudomonas aeruginosa*, Science in China C: Life Sciences **52**, 501–505.
- Zhang, Y., Pohlmann, E. L. and Roberts, G. P.: 2004, Identification of critical residues in GlnB for its activation of NifA activity in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*, PNAS **101**, 2782–2787.
- Zhou, W. and Freed, C.: 2005, DJ-1 up-regulates glutathione synthesis during oxidative stress and inhibits A53T-synuclein toxicity, Journal of Biological Chemistry **280**, 43150–43158.

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----|--|----|
| 2.1 | Schematische Darstellung der Redoxpools der Zelle und ihren Wechselwirkungen | 9 |
| 2.2 | Funktionsweise von RegB. | 11 |
| 2.3 | Funktionsweise von PpsR und AppA. | 12 |
| 2.4 | Funktionsweise von PpsR-Homolog CrtJ aus <i>Rb. capsulatus</i> [Masuda et al. 2002]. | 13 |
| 2.5 | Phylogenetische Analyse von PpsR-Proteinen. | 15 |
| 3.1 | Prinzip des Glutathion-Assays mit DTNB | 23 |
| 3.2 | Klonierungsschema für <i>R. rubrum</i> PpsR ⁻ | 34 |
| 3.3 | Suicidvektor für <i>ppsR</i> -Deletion | 34 |
| 4.1 | Wachstumsversuch mit <i>R. rubrum</i> S1 auf M2S-Medium mikroaerob im Schüttelkolben. | 51 |
| 4.2 | Wachstumsversuch mit <i>R. rubrum</i> S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von DTT. | 52 |
| 4.3 | Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von <i>R. rubrum</i> S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von DTT. | 53 |
| 4.4 | Wachstumsversuch mit <i>R. rubrum</i> S1 auf M2S-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von DTT. | 54 |
| 4.5 | Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von <i>R. rubrum</i> S1 auf M2S-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von DTT. | 54 |
| 4.6 | Wachstumsversuch mit <i>R. rubrum</i> S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH | 55 |
| 4.7 | Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von <i>R. rubrum</i> S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH. | 56 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.8 | Wachstumsversuch mit <i>R. rubrum</i> S1 auf M2SF-Medium aerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH | 57 |
| 4.9 | Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von <i>R. rubrum</i> S1 auf M2SF-Medium aerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH. | 57 |
| 4.10 | Wachstumsversuch mit <i>R. rubrum</i> S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSSG. | 58 |
| 4.11 | Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von <i>R. rubrum</i> S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSSG. | 59 |
| 4.12 | Wachstumsversuch mit <i>R. rubrum</i> S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von DEM. | 60 |
| 4.13 | Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von <i>R. rubrum</i> S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von DEM. | 60 |
| 4.14 | Wachstumsversuch mit <i>R. rubrum</i> SN20 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH. | 62 |
| 4.15 | Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von <i>R. rubrum</i> SN20 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH | 62 |
| 4.16 | Wachstumsversuch mit <i>R. rubrum</i> SN20 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH. | 63 |
| 4.17 | Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von <i>R. rubrum</i> SN20 auf M2S-Medium bzw. M2SF-Medium, mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH | 64 |
| 4.18 | Wachstumskurve zum GSH-Aufnahme Versuch. | 65 |
| 4.19 | Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von <i>R. rubrum</i> S1 auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH (6 mM) | 66 |
| 4.20 | Verlauf der extrazellulären GSH-Konzentrationen. | 66 |
| 4.21 | Verlauf der intrazellulären GSH-Konzentrationen | 67 |
| 4.22 | Analyse der organischen Säuren. | 68 |
| 4.23 | SDS-PAGE von NiNTA-chromatographisch gereinigtem PpsR-Protein. | 70 |
| 4.24 | Native PAGEs der Redoxtitration des PpsR-Proteins | 72 |
| 4.25 | Übersicht <i>ppsR</i> Gen und Primer | 73 |
| 4.26 | Untersuchung der <i>R. rubrum</i> PpsR ⁻ Klone c86 und c139 mittels PCR | 74 |
| 4.27 | Wachstumsversuch mit <i>R. rubrum</i> PpsR ⁺ auf M2S und M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH. | 75 |

| | | |
|------|---|----|
| 4.28 | Wachstumsraten (a) und PM-Syntheseraten (b) von <i>R. rubrum</i> PpsR ⁺ auf M2SF-Medium mikroaerob im Schüttelkolben mit Zugabe von GSH. | 76 |
| 4.29 | Ein typisches HPL-Chromatogramm der Ozonolyse-Produkte. | 77 |
| 4.30 | Das FTIR-Spektrum des Ozonolyseprodukts. | 78 |
| 4.31 | UV-Spektren von Sepharose, Ozonolyseprodukt gekoppelt an Sepharose und ein Differenzspektrum. | 80 |
| 4.32 | Elutionsprofile der Ligandenaffinitätschromatographien von <i>R. rubrum</i> (a), <i>Rb. sphaeroides</i> und <i>Rb. capsulatus</i> (b). | 81 |
| 4.33 | SDS-Gele der Elutionsfraktionen der Ligandenaffinitätschromatographie. | 82 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|------|---|----|
| 3.1 | Bestandteile der verwendeten Nährmedien | 18 |
| 3.2 | Vitaminlösung | 18 |
| 3.3 | Spurenelementlösung nach Hutner [1946] | 18 |
| 3.4 | Glutathion Assay Puffer | 23 |
| 3.5 | Nernstgleichung | 25 |
| 3.6 | TES-Puffer | 27 |
| 3.7 | EB-Puffer | 27 |
| 3.8 | Tfbl Puffer | 30 |
| 3.9 | SOC Medium | 30 |
| 3.10 | TfblI Puffer | 30 |
| 3.11 | Psi Broth | 30 |
| 3.12 | Liste der verwendeten Vektoren | 31 |
| 3.13 | Verwendete Primer und Restriktionsschnittstellen | 32 |
| 3.14 | Übersicht über verwendete Stämme | 32 |
| 3.15 | LB ₀ - Medium | 33 |
| 3.16 | PBS-Phosphat gepufferte Saline | 36 |
| 3.17 | Imidazolkonzentrationen in PBS für das HisPur Spin Column Kit | 36 |
| 3.18 | Puffer für das His-Bind Kit | 36 |
| 3.19 | Imidazolkonzentrationen in TrisHCl für das His-Bind Kit | 36 |
| 3.20 | Zusammensetzung der GSH-Redoxpuffer | 37 |
| 3.21 | SDS-Probenpuffer (5x) | 38 |
| 3.22 | Oberer Gelpuffer (4x) | 39 |
| 3.23 | Unterer Gelpuffer (4x) | 39 |
| 3.24 | Trenngel | 39 |
| 3.25 | Sammelgel | 39 |

| | | |
|------|--|-----|
| 3.26 | Nativer Laufpuffer (5x) | 40 |
| 3.27 | Nativer Probenpuffer | 40 |
| 3.28 | Natives Gel | 40 |
| 3.29 | Coomassie-Färbelösung | 41 |
| 3.30 | Entfärbelösung / Lösung 1 | 41 |
| 3.31 | Reduzierlösung / Lösung 2 | 41 |
| 3.32 | Färbelösung / Lösung 3 | 41 |
| 3.33 | Entwickler / Lösung 4 | 41 |
| 3.34 | Reaktionsgemisch für die Oxidation von Ubichinon 10 mit Permanganat | 44 |
| 3.35 | Lysepuffer für Membranproteine | 47 |
| 3.36 | Solubilisierungspuffer | 47 |
| 4.1 | Ausbeuten an PM der <i>R. rubrum</i> Stämme PpsR ⁺ und pRK404 | 76 |
| 4.2 | Ergebnisse der Esi-MS/MS-Analyse der Banden aus der Ligandenaffinitätschromatographie | 82 |
| 8.1 | BLAST-Ergebnisse: Vergleiche von PpsR aus dem <i>R. rubrum</i> -Genom mit PpsR und CrtJ-Proteinen aus anderen Organismen | 108 |
| 8.2 | pBLAST-Ergebnisse der Glutathiontransporter aus dem <i>R. rubrum</i> -Proteom | 109 |

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema:

Untersuchungen zur Redoxregulation der Photosynthesemembranexpression in dem fakultativ phototrophen Bakterium *Rhodospirillum rubrum*

selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese, noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades *doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg,

Lebenslauf

Persönliche Daten

dipl. Biol. Anke Berit Carius
Wittenberger Str. 26a
39106 Magdeburg

ab 1. Juli 2011:
Pengsjövägen 35
91133 Vännäs, Schweden

Telefon: 0177/6363061, 0046-70/4607979
E-mail: carius@gmx.net

Geburstag und Ort: 26.08.1982 in Marburg (Lahn)
Geschlecht und Familienstand: Weiblich, verheiratet, eine Tochter
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Beruflicher und wissenschaftlicher Werdegang

4/2007-6/2012 Doktorandin an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Magdeburg, Fachgebiet Biologie, die Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe "Experimentelle Systembiologie" von Prof. Dr. Hartmut Grammel unter der Betreuung von Prof. Dr. Wolfgang Marwan angefertigt.

Max Planck Institut für die Dynamik komplexer technischer Systeme
Sandtorstr. 1, 39106 Magdeburg

Titel: Untersuchungen zur Redoxregulation der Photosynthesemembranexpression in dem fakultativ phototrophen Bakterium *Rhodospirillum rubrum*.

2/2011-2/2012 Stipendiatin der Christiane Nüsslein Volhard Stiftung

4/-7/2008 WHK zur Praktikumsbetreuung (zusätzlich zur Promotionsstelle)
OVGU-Magdeburg
Universitätsplatz 1, 39106 Magdeburg

10/2001-3/2007 Studium der Biologie an der Universität Bonn

am 28/02/2007 abgeschlossen mit Diplom (sehr gut 1,3) in den Fächern: Mikrobiologie
(sehr gut 1,0), Botanik (sehr gut 1,0), Phytomedizin (sehr gut 1,0)

Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe "Mikrobielle Kohlekonversion" von Dr. PD. René
Fakoussa am

Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
Meckenheimer Allee 168, 53115 Bonn

Titel: Screening nach potentiellen Huminsäure-Decarboxylanten, Charakterisierung der
Isolate und Teilsequenz der Mellitsäure-Decarboxylase aus *Sinorhizobium morelense*.
(gut 1,8)

2005-2007 Studentische Hilfskraft zur Praktikumsbetreuung in der Arbeitsgruppe
"Extremophile Mikroorganismen" von Prof. E. A. Galinski am

Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
Meckenheimer Allee 168, 53115 Bonn

1999-2005 Freiberufliche Nachhilfelehrerin

Schulbildung

1999-2001 Mädchengymnasium Jülich, Abgeschlossen mit Abitur (1,8)

1998-1999 Nyssa High School, Oregon, USA (Austauschschuljahr)

1992-1998 Mädchengymnasium Jülich