

Zusammenfassung

Der Dissertation mit dem Titel “ Untersuchungen zur Redoxregulation der Photosynthesemembran-expression in dem fakultativ phototrophen Bakterium *Rhodospirillum rubrum*“
vorgelegt von dipl. Biol. Anke Berit Carius.

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 Photosynthesegen-regulation 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.

Abstract

Der Dissertation mit dem Titel “ Untersuchungen zur Redoxregulation der Photosynthesemembran-expression in dem fakultativ phototrophen Bakterium *Rhodospirillum rubrum*“

vorgelegt von dipl. Biol. Anke Berit Carius.

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 ~-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 would be interesting to assume 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.