

Inhalt

Geleitwort	V
Vorwort	VII
Inhalt	IX
Abkürzungsverzeichnis	XIII
Abbildungsverzeichnis	XV
Tabellenverzeichnis	XVII
1 Einleitung	1
1.1 Optogenetik in der synthetischen Biologie	1
1.2 LOV-Photorezeptoren	2
1.3 Zwei-Komponenten-Systeme	3
1.4 Die Licht-regulierten Histidin-Kinasen YF1, LF1 und YLF1	4
1.5 Die Expressionssysteme pDusk und pDawn	6
1.6 Das Zwei-Komponenten-System TodST	7
1.7 Zielstellung der Arbeit	8
2 Material und Methoden	11
2.1 Materialien	11
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	11
2.1.2 Chemikalien	12
2.1.3 Biologische Materialien	13
2.1.4 Puffer und Lösungen	13
2.1.5 Medien und Nährboden für <i>E. coli</i>	14
2.2 Molekularbiologische Methoden	14
2.2.1 Zielgerichtete Mutagenese	14
2.2.2 Fehleranfällige PCR (epPCR)	15
2.2.3 Megaprimer-PCR an ganzen Plasmiden (MEGAWHOP)	16
2.2.4 Fusions-PCR	17
2.2.5 Klonierung von DNA-Sequenzen in Plasmide	19
2.2.6 Mini-Präparation von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	20
2.2.7 Analytischer Restriktionsverdau	20
2.3 Mikrobiologische Methoden	20

2.3.1	Transformation von <i>E. coli</i> durch Hitzeschock	20
2.3.2	Transformation und screening einer randomisierten Plasmid-Bibliothek	21
2.3.3	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	21
2.3.4	Anlegen eines Glycerin-Stocks von CmpX13 <i>E. coli</i> Zellen	21
2.3.5	Inkubation von <i>E.coli</i> CmpX13 für <i>in vivo</i> Kinase-Aktivitäts-Assays	21
2.3.5.1	Inkubation für Quantifizierung des Licht-Dunkel-Unterschieds	21
2.3.5.2	Design des LED-Array-Formats für den Kinase-Aktivitäts-Assay	22
2.4	Fluoreszenzmessungen von DsRed	22
2.5	Proteinbiochemische Methoden	23
2.5.1	Expression und Aufreinigung von LOV-Photorezeptoren-Mutanten	23
2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.6	Photometrische Methoden	24
2.6.1	Bestimmung des Proteingehalts	24
2.6.2	Kinetische Absorptionsmessungen	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Identifizierung und Charakterisierung von LOV-Photorezeptor-Mutanten mit veränderten Zerfallskinetiken	26
3.1.1	Mutagenese und Bestimmung des Licht-regulierten Dynamikbereichs der Mutanten	26
3.1.2	Kinetische Absorptionsmessungen an YF1- und LF1-Mutanten	28
3.1.3	Regulation der Kinaseaktivität <i>in vivo</i> durch Modulation von Beleuchtungsstärke und Pulsfrequenz	29
3.1.3.1	Etablierung des LED-Array Formats für <i>in vivo</i>-Assays	29
3.1.3.2	Ergebnisse der <i>in vivo</i>-Assays im LED-Array Format	30
3.2	Konstruktion und Charakterisierung eines synthetischen, Licht-regulierten Zwei-Komponenten-Systems	34
3.2.1	Konstruktion der Plasmide pDusk_YT1 und pDusk_LT1	34
3.2.2	Charakterisierung von pDusk_YT1 und pDusk_LT1 im <i>in vivo</i> Assay	37
3.2.3	Design des Inverters SrpR und dessen Insertion in pDusk_YT1 und pDusk_LT1	38
3.2.4	Charakterisierung des SrpR-Inverters im <i>in vivo</i> Assay	38
3.3	Mutagenesestudien an YLF1 zur Untersuchung der intramolekularen Signalintegration	40
3.3.1	Zufallsmutagenese an LF1	40
3.3.2	Zielgerichtete Mutagenese an beiden LOV-Domänen von YLF1	41
4	Diskussion	43
4.1	Selektive Genexpression durch Modulation der Lichtpulsfrequenz	43
4.1.1	Mutagenese von LOV-Domänen zur Modifikation der Relaxationskinetiken	43
4.2	Konstruktion eines genetischen Schaltkreises mit zwei Zwei-Komponenten-Systemen	46

4.3	Funktion der LOV-Domänen im Tandem-Konstrukt YLF1	48
4.4	Ausblick und Anwendungen.....	49
	Literaturverzeichnis	53