

# Spektroskopische Aufklärung des Photozyklus der LOV1-Domäne eines Phot-Blaulichtrezeptors



DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Fakultät IV  
-Chemie und Pharmazie-  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Tilman Kottke**  
aus Tübingen

Regensburg, 2003

Promotionsgesuch eingereicht am: 12.11.2003

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. B. Dick

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. H. Krienke, Vorsitzender

Prof. Dr. B. Dick

Prof. Dr. P. Hegemann

Prof. Dr. A. Penzkofer

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Kottke, T., Heberle, J., Hehn, D., Dick, B., und Hegemann, P. (2003) Phot-LOV1: Photocycle of a blue-light receptor domain from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biophys. J.* *84*, 1192-1201.

Kottke, T., Dick, B., Fedorov, R., Schlichting, I., Deutzmann, R., und Hegemann, P. (2003) Irreversible photoreduction of flavin in a mutated Phot-LOV1 domain, *Biochemistry* *42*, 9854-9862.

Losi, A., Kottke, T., und Hegemann, P. (2004) Recording of blue light-induced energy and volume changes within the wild-type and mutated Phot-LOV1 domain from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biophys. J.* *85*, im Druck.



# Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2000 bis November 2003 am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Regensburg unter Anleitung von Prof. Dr. Bernhard Dick erstellt.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dick für die gute Betreuung und seine aktive Mithilfe bei der Auswertung der Daten. Herrn Prof. Hegemann danke ich für die motivierenden Diskussionen und die ständige Bereitstellung neuer Proben und Ideen.

Herrn PD Dr. Heberle, Frau Prof. Braslavsky und Ihren Arbeitsgruppen danke ich für die Gastfreundschaft bei der Besichtigung Ihrer Labors.

Bei Herrn Dr. Uwe Kensy und Herrn PD Alkwin Slenczka möchte ich mich für die fachliche Anleitung und die Hilfe bei technischen Problemen bedanken.

Meinen Kollegen Dr. Stephan Bäurle, Walter Finkenzeller, Huimin Guo, Cornelius Kratzer, Rudolf Lehnig, Thorsten Obernhuber, Tanja Schaffer, Dr. Reinhold Seiler und Dr. Andreas Straßer danke ich für die erholsamen Gespräche in den Pausen und die gute Zusammenarbeit.

Den Mitgliedern des Graduiertenkollegs, insbesondere Christian Neiß, gilt mein Dank für die fachfremde Beratung und die Auflockerung der Vorlesungen und Workshops. Tina Schireis und Roman Procházka danke ich für die Herstellung der Proben.

Den Angestellten des Lehrstuhls, Frau Alder, Frau Berg, Frau Höing, Frau Müller und Herrn Ziereis sowie Herrn Weingart und Herrn Steinberger als Vertreter der Werkstätten danke ich für die Unterstützung.

Meiner Familie und meinen Freunden gilt mein besonderer Dank für die Rücken- deckung und die Ablenkung von der Arbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für das Geld.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Transiente Absorptionsspektroskopie</b>	<b>3</b>
2.1	Einführung . . . . .	3
2.2	Aufbau . . . . .	4
2.2.1	Laserblitzlichtphotolyse . . . . .	4
2.2.2	Spektren und Langzeitkinetiken . . . . .	5
2.3	Auswertung . . . . .	5
2.3.1	Blitzlichtphotolysekinetiken . . . . .	5
2.3.2	Sequenzen von Spektren . . . . .	6
2.4	Standardmessungen an Bacteriorhodopsin . . . . .	8
<b>3</b>	<b>Die LOV1-Domäne des Phot-Proteins</b>	<b>12</b>
3.1	Phot-Proteine im Überblick . . . . .	12
3.2	Sequenz und Struktur . . . . .	13
3.3	Expression und Aufreinigung . . . . .	16
3.3.1	Wildtyp . . . . .	16
3.3.2	Mutanten . . . . .	16
<b>4</b>	<b>Dunkelzustand</b>	<b>17</b>
4.1	Flavin als Kofaktor . . . . .	17
4.2	Absorption und Emission der LOV1-Domäne . . . . .	19
4.2.1	Wildtyp . . . . .	19
4.2.2	Mutanten . . . . .	22

---

<b>5</b>	<b>Angeregter Triplettzustand</b>	<b>24</b>
5.1	Flavin . . . . .	24
5.2	Zeitaufgelöste Spektroskopie an der LOV1-Domäne . . . . .	25
5.2.1	Mutante LOV1-C57S . . . . .	25
5.2.2	Einfluss von Sauerstoff und Xenon auf die Zerfallskinetik	27
5.2.3	Wildtyp . . . . .	30
5.2.4	Mutante LOV1-W98F . . . . .	34
<b>6</b>	<b>Photoaddukt</b>	<b>35</b>
6.1	Photoreaktionen des Flavins . . . . .	35
6.2	Photoaddukt in der LOV1-Domäne . . . . .	36
6.2.1	Vorarbeiten . . . . .	36
6.2.2	LOV1-390 . . . . .	37
6.2.3	Vergleich zu FMN und Cystein in Lösung . . . . .	39
<b>7</b>	<b>Rückreaktion</b>	<b>41</b>
7.1	Regenerierung eines Photorezeptors . . . . .	41
7.2	Kinetik der thermischen Rückreaktion . . . . .	42
7.2.1	pH- und Salzabhängigkeit . . . . .	43
7.2.2	Additive . . . . .	46
7.2.3	Mutanten . . . . .	47
7.2.4	Mechanismus . . . . .	50
7.3	Photochemische Rückreaktion . . . . .	50
7.4	Photozyklus des Wildtyps im Überblick . . . . .	54
<b>8</b>	<b>Irreversible Photoreaktionen: Mutante LOV1-C57M</b>	<b>56</b>
8.1	Ziel und Erwartungen . . . . .	56
8.2	Kraftfeldrechnungen zum Dunkelzustand . . . . .	57
8.3	Untersuchung des Reaktionsablaufs . . . . .	61
8.4	Intermediat C57M-415 . . . . .	66
8.5	Produkt C57M-675 . . . . .	67
8.5.1	Radikalischer Charakter . . . . .	67
8.5.2	Kovalente Bindung zum Apoprotein . . . . .	68
8.5.3	Stabilität . . . . .	71
8.6	Modellverbindung für C57M-415 . . . . .	73

---

8.7	Generierung eines Radikals in der LOV1-Domäne . . . . .	76
8.7.1	Photoreduktion der LOV1-C57S-Mutante . . . . .	76
8.7.2	Photoreduktion von freiem Flavin . . . . .	79
<b>9</b>	<b>Mechanismus der Addukt-Bildung</b>	<b>82</b>
9.1	Wildtyp . . . . .	82
9.1.1	Ionischer Verlauf . . . . .	83
9.1.2	Radikalischer Verlauf . . . . .	84
9.1.3	Reaktion mit Gruppenübertragung . . . . .	86
9.1.4	Konzertierte Reaktion . . . . .	86
9.2	Mutante LOV1-C57M . . . . .	87
9.3	Fazit . . . . .	90
<b>10</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>93</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>96</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>



# 1 Einleitung

Photorezeptoren sind Proteine, die aus einem lichtempfindlichen Chromophor als Kofaktor und einem Apoprotein aufgebaut sind. In der Natur spielen sie bei der Energieerzeugung eine große Rolle, hier insbesondere das Chlorophyll und das Proteorhodopsin. Während Chlorophyll in der pflanzlichen Photosynthese zur Umwandlung von Lichtenergie in chemisches Potential dient [1], findet man das Proteorhodopsin in vielen marinen Bakterien, die mit Hilfe von Licht einen Protonengradienten erzeugen [2]. Photosensorische Rezeptoren dagegen haben eine andere Funktion, sie ermöglichen die Anpassung der Organismen an die Lichtverhältnisse in der Umgebung. Dabei wird je nach Intensität und Farbe des Lichts ein entsprechendes Signal erzeugt und weitergeleitet. Derartig gesteuerte Vorgänge sind neben dem Sehprozess unter anderem der zirkadiane Rhythmus und das Wachstum von Pflanzen zum Licht hin (Phototropismus). Der für den Phototropismus verantwortliche Rezeptor, das Phototropin, wurde erst vor wenigen Jahren identifiziert [3]. Er gehört aufgrund seiner spektralen Empfindlichkeit zur Gruppe der Blaulichtrezeptoren. Phototropin und seine Analoga, die sog. Phot-Proteine, spielen allerdings auch in einer ganzen Reihe anderer Prozesse eine wichtige Rolle. So regulieren die Phot-Proteine in höheren Pflanzen neben dem Phototropismus [4, 5] auch die Bewegung der Chloroplasten [6–8] und das Öffnen der Stomata (Spaltöffnungen) [9]. In der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* steuert der Phot-Rezeptor mehrere blaulichtabhängige Prozesse bei der Bildung von Keimzellen unter Stickstoffmangel (Gametogenese) [10].

Die Effizienz, Empfindlichkeit und Stabilität der natürlichen Photorezeptoren konnte in künstlichen Systemen bis heute nicht erreicht werden. Dies gilt sowohl für den Bereich der Sensorik als auch den der Photovoltaik. Umso wichtiger ist es, die Funktionsweise und den Aufbau der Photorezeptoren im Detail zu verstehen. Die entscheidenden Prozesse lassen sich zu einem Photozyklus zusammenfassen, in welchem nach Belichtung ein angeregter Zustand gebildet wird, der

dann in den Signalzustand übergeht. Nach Weiterleitung des Signals wird der Rezeptor wieder regeneriert. Zur Aufklärung der molekularen und photophysikalischen Abläufe in diesem Zyklus müssen die Erkenntnisse verschiedener Methoden kombiniert werden. Mit Hilfe der Elektronenanregungs-, Schwingungs- und Kernspinresonanzspektroskopie lassen sich die verschiedenen Zustände zeitlich einordnen und charakterisieren. Die Kristallstrukturanalyse erlaubt eine Zuordnung der Zustände zu Strukturänderungen im Protein. Mit theoretischen Methoden lassen sich die mechanistischen Vorschläge weiter absichern.

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich die transiente Absorptionsspektroskopie eingesetzt. Mit ihrer Hilfe lassen sich selektiv und zeitaufgelöst Änderungen des Chromophors nach Anregung durch einen Lichtpuls messen. Die erhaltenen Absorptionsspektren dienen der Identifizierung von Intermediaten im Photozyklus. Aus der Kinetik der Bildung und des Zerfalls dieser Intermediate erhält man wertvolle Hinweise auf mechanistische Abläufe. Untersucht wurde das Verhalten der LOV1-Domäne aus dem Phot-Protein der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Die LOV1-Domäne ist eine der beiden lichtempfindlichen Domänen im Photorezeptor, die beide ein Flavin-Mononucleotid als Chromophor enthalten. Zunächst wurden die grundlegenden Eigenschaften der Domäne im Dunkeln charakterisiert (Kapitel 4). Bei Belichtung bilden sich zwei Intermediate im Photozyklus, die im Detail untersucht wurden (Kapitel 5+6). Demnach erhält man nach Anregung zunächst den Triplettzustand des Chromophors, der dann mit einer benachbarten Aminosäure im Protein photochemisch ein Addukt bildet. Durch Variation der Umgebungsbedingungen und die Erzeugung geeigneter Mutanten konnten mechanistische Vorstellungen zur Bildung und zum Zerfall dieses Addukts erarbeitet werden (Kapitel 7-9).

# 2 Transiente Absorptionsspektroskopie

## 2.1 Einführung

In der transienten Absorptionsspektroskopie nutzt man die Tatsache, dass die Extinktion laut Lambert-Beerschem Gesetz der Konzentration einer Substanz direkt proportional ist. Da sich gewöhnlich Edukt und Produkt in einer Reaktion in ihrem Absorptionsspektrum unterscheiden, lässt sich ein Reaktionsverlauf über die Änderung der Extinktion verfolgen. Detektiert man mit ausreichender Zeitauflösung, so lassen sich auch Zwischenprodukte identifizieren und charakterisieren. Die Zeitauflösung der Messung hängt im Wesentlichen davon ab, wie schnell die Reaktion gestartet werden kann. Im Falle der Photoreaktion entspricht dies der Pulsdauer der verwendeten Lichtquelle. Aus technischen Gründen wird die Absorption entweder in Abhängigkeit von der Wellenlänge zu einem festen Zeitpunkt aufgenommen (spektrale Information) oder in Abhängigkeit von der Zeit bei einer festen Wellenlänge (kinetische Information). Die Standardmethode zur Untersuchung kurzlebiger Intermediate in Photoreaktionen ist die Blitzlichtphotolyse, die 1949 von Norrish und Porter vorgestellt wurde [11]. Hier wird die Probe durch einen intensiven Lichtblitz angeregt und die Absorptionsänderung bei einer festen Wellenlänge in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet. Aus den erhaltenen Abklingkurven lassen sich durch die Anpassung eines kinetischen Modells die Zeitkonstanten der ablaufenden Prozesse ermitteln. Misst man diese Kinetiken bei vielen verschiedenen Wellenlängen, so lässt sich aus den Amplituden zu einem Zeitpunkt auch das Spektrum eines Intermediats gewinnen.

## 2.2 Aufbau

### 2.2.1 Laserblitzlichtphotolyse

Die Blitzlichtphotolyseapparatur wurde in wesentlichen Teilen bereits in einer früheren Arbeit aufgebaut [12]. Zur Untersuchung der Photorezeptor-Proteine wurde die Apparatur um einige Komponenten erweitert. In Abbildung 2.1 befindet sich eine schematische Darstellung des Aufbaus.

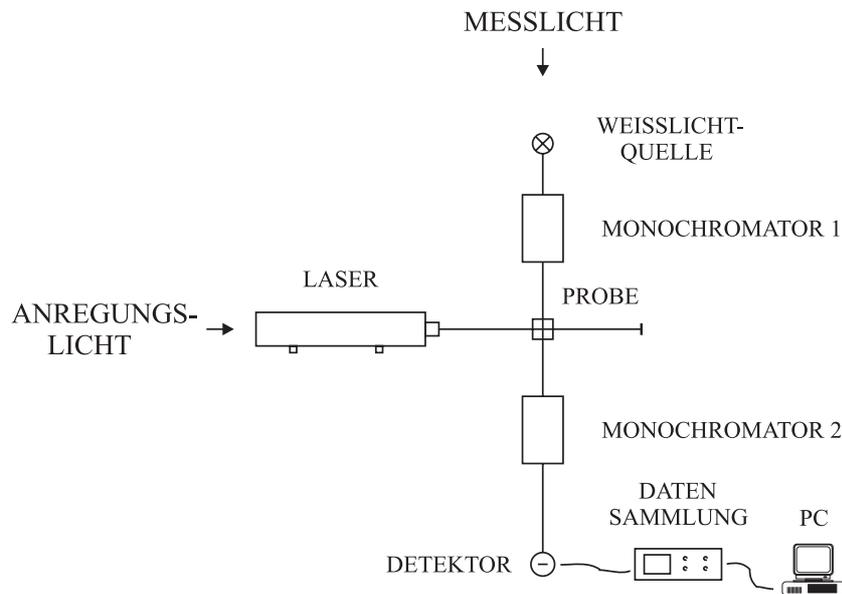


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau der Blitzlichtphotolyseapparatur

Die Anregung der Probe erfolgte dabei senkrecht zum Messstrahlengang. Als Anregungslichtquelle wurde ein Farbstofflaser (Lambda Physik Scanmate 2E) verwendet, der durch die dritte Harmonische eines Nd:YAG Lasers gepumpt wurde (Spectron Laser Systems SL-803). Der erzeugte Lichtpuls mit einer Länge von 15 ns wurde auf eine Fläche von 5 x 10 mm aufgeweitet und traf mit einer Energie von ca. 1 mJ auf die Probe. Als Messlichtquelle diente eine über eine Pulseinheit (Müller MSP-05) für die Dauer von 3 ms gepulste 150 W Xenon-Lampe. Ein Monochromator mit einer Auflösung von 3 nm selektierte vor der Probe die Messwellenlänge und minimierte damit die Belastung der Probe. Der zweite Monochromator diente der Abtrennung von Fluoreszenz- und Streulicht. Die Detektion erfolgte über einen Photomultiplier (Hamamatsu R446 bzw.

R128). Das Signal wurde in einem digitalen Speicheroszilloskop (Tektronix TDS 744A) mit einer Bandbreite von 500 MHz aufgezeichnet und an einen PC weitergeleitet. Dort wurde vor der Auswertung jeweils über 50 Messungen gemittelt. Die Triggerung der Messungen erfolgte durch den Anregungspuls über eine Photodiode. Einzelne Pulse wurden aus dem 20 Hz Takt des Lasers mit Hilfe von Verschlüssen selektiert. Um eine Anreicherung von Intermediaten im Photozyklus zu vermeiden, musste die Messrate in einigen Fällen bis auf 0.03 Hz gesenkt werden. Die Probe wurde auf 20 °C thermostatisiert. Auf eine Polarisierung des Messlichts im „Magic Angle“ zum Anregungslicht konnte verzichtet werden, da die Rotations-Korrelationszeit der untersuchten Proteine mit 11-14 ns schnell genug ist, um keinen Beitrag zur aufgenommenen Kinetik zu leisten [13]. Eine detaillierte Darstellung des Aufbaus mit den optischen Elementen und dem Strahlengang befindet sich im Anhang.

### 2.2.2 Spektren und Langzeitkinetiken

Die Absorptionsspektren wurden mit einem kommerziellen Absorptionsspektrometer (Perkin Elmer Lambda 9) aufgezeichnet. Für Reaktionsverläufe, die im Zeitbereich von Sekunden ablaufen, benötigt man nicht die hohe Zeitauflösung der Blitzlichtphotolyse. Hier wurde mit einer 50 W Wolframlampe durch einen 435 nm Kantenfilter (Schott GG435) in das Spektrometer eingestrahlt und nach Abblocken des Lichts der Zeitverlauf der Absorption bei einer Wellenlänge gemessen. Zur Aufnahme von Sequenzen von Spektren mit einem Zeitabstand von 2 s wurde ein Diodenzeilenspektrometer (Analytik Jena Specord S100B) verwendet.

## 2.3 Auswertung

### 2.3.1 Blitzlichtphotolysekinetiken

Um aus dem im Einstrahllaufbau erhaltenen Intensitätsverlauf  $I_S(t)$  die Absorptionsänderung zu berechnen, wurde jeweils eine Referenzmessung  $I_R(t)$  ohne Laseranregung durchgeführt. Bei stark fluoreszierenden oder streuenden Proben wurde zur Korrektur weiterhin ein Signal  $I_F(t)$  mit Anregung aber ohne

Messlicht und ein Verlauf  $I_B(t)$  ohne jegliche Lichtquelle aufgenommen. Aus den vier erhaltenen Spannungsverläufen lässt sich die Absorptionsänderung der Probe in Abhängigkeit von der Zeit anhand von Gleichung (2.1) berechnen.

$$\Delta E(t) = -\log \frac{I_S(t) - I_F(t)}{I_R(t) - I_B(t)} \quad (2.1)$$

Die Reaktion eines Chromophors mit seiner Proteinumgebung kann als monomolekularer Prozess angesehen werden, da hier die Reaktionspartner isoliert von der Umgebung bereits in der notwendigen Anordnung zueinander vorliegen. Daraus ergibt sich eine Reaktion erster Ordnung, die sich mit einem monoexponentiellen Verlauf  $E(t) = E_0 \cdot e^{-t/\tau}$  beschreiben lässt. Durch Anpassung der Funktion an die Abklingkurve erhält man die Zeitkonstante  $\tau$  des Zerfalls einer Spezies. Die Messung liefert allerdings nur eine Gesamtzeitkonstante

$$1/\tau_{ges} = 1/\tau_1 + 1/\tau_2 + \dots, \quad (2.2)$$

da zur Absorptionsänderung einer beobachteten Spezies alle Zerfallskanäle beitragen.

### 2.3.2 Sequenzen von Spektren

Untersucht man den Verlauf einer Reaktion durch Aufnahme einer Sequenz von Spektren, so lassen sich daraus über die sog. Singulärwertzerlegung (Singular Value Decomposition SVD) die beitragenden Komponenten extrahieren [14]. Im Folgenden wird eine kurze Einführung in diese Methode gegeben: Die Absorptionsspektren zu verschiedenen Zeitpunkten bilden eine Messmatrix  $D$ . In den Zeilen der Matrix stehen die gemessenen Extinktionen zu den verschiedenen Zeiten und in den Spalten steht die Abhängigkeit der Extinktionen von der Wellenlänge. Da die gemessenen Spektren zumeist ein Gemisch der verschiedenen Komponenten in einem wechselnden Verhältnis zueinander darstellen, würde man die Messmatrix gerne in ein Produkt der Matrizen  $S$  und  $C$  zerlegen.

$$D = SC \quad (2.3)$$

Dabei befinden sich in den Spalten der Matrix  $S$  die gesuchten Absolutspektren von Edukten, Intermediaten und Produkten. Die Zeilen der Matrix  $C$  zeigen die kinetische Gesetzmäßigkeit, nach der diese Spektren kombiniert werden müssen, d.h. ein Konzentrationsprofil der beteiligten Spezies.

Bei der Singulärwertzerlegung verwendet man hierzu ein äquivalentes mathematisches Konstrukt. Man beschreibt die Messmatrix  $D$  als ein Produkt

$$D = UWV^t \quad (2.4)$$

wobei die Matrix  $U$  die spektrale Information und die Matrix  $V$  die kinetische Information enthält, geordnet nach ihrer Relevanz für die Rekonstruktion der Messmatrix. Der Gewichtungsfaktor ist in der quadratischen Diagonalmatrix  $W$  enthalten. Für gewöhnlich enthält die Messmatrix  $D$  mehr Spektren, als für eine eindeutige Beschreibung des Systems nötig ist, sie ist überbestimmt. Daher befinden sich die entscheidenden Informationen für ihre Rekonstruktion nur in einigen wenigen Spalten von  $U$  und  $V$ . Alle weiteren Spalten in  $U$  und  $V$  enthalten nur Rauschen und können abgetrennt werden. Der kritische Punkt ist dabei die Bestimmung der Anzahl der signifikanten Komponenten. Betrachtet man die Matrix  $W$  in Abhängigkeit von der Zeilenzahl, so kann man die Anzahl an Komponenten (den Rang der Matrix) erkennen, die notwendig ist, um das System komplett zu beschreiben.

Im nächsten Schritt gibt man eine kinetische Gesetzmäßigkeit wie zum Beispiel Exponentialfunktionen  $e^{-k_i t}$  vor. Diese werden einzeln in die Zeilen einer Matrix  $F$  eingesetzt zuzüglich einer 1 für das konstante Hintergrundspektrum. Es gilt:

$$C = MF \quad (2.5)$$

Die Matrix  $M$  enthält ein Modell des Reaktionsablaufs, wobei jede Zeile eine Linearkombination festlegt, nach der aus den Exponentialfunktionen der Matrix  $F$  eine Konzentrationsabhängigkeit von der Zeit in der Matrix  $C$  berechnet wird. Setzt man  $V^t = YF$ , so lassen sich mit Hilfe der aus der SVD-Analyse erhaltenen Matrix  $V$  die Parameter der Matrix  $F$ , d.h. die Geschwindigkeitskonstanten, ermitteln. Da sie die nichtlinearen Parameter im Gleichungssystem

darstellen, erhält man sie durch ein iteratives Least-Square-Verfahren aus

$$|V^t - YF| = \min. \quad (2.6)$$

Die Messmatrix lässt sich somit schreiben als:

$$D \approx UWYF = UWYM^{-1}MF \quad (2.7)$$

und mit  $C = MF$  ist  $UWYM^{-1} = S$ . Um nun die Parameter in der Modellmatrix  $M$  festzulegen oder zu optimieren, benötigt man neben dem Modell des Reaktionsablaufs weitere Randbedingungen wie z.B. die Anfangskonzentrationen der beteiligten Spezies. Dies ermöglicht eine Bestimmung der gesuchten Matrix  $C$  und damit auch der Matrix  $S$ .

Der Vorteil der SVD gegenüber einer Analyse der Messmatrix  $A$  „von Hand“ ist die Berücksichtigung der gesamten in der Messung enthaltenen Information bei der Anpassung und damit ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Spektren bzw. ein geringere Standardabweichung für die kinetischen Parameter. Ist die Information nicht ausreichend, um die Absolutspektren zu rekonstruieren, so erhält man zumindest eine Aussage über die Anzahl der beteiligten Spezies. Zur Durchführung der SVD wurde ein im Arbeitskreis entwickeltes Programm verwendet [15].

## 2.4 Standardmessungen an Bacteriorhodopsin

Um nach der Überarbeitung der Blitzlichtphotolyse-Anlage ihre Eignung für biochemische Proben zu untersuchen, wurden Messungen an Bacteriorhodopsin durchgeführt. Bacteriorhodopsin (bR) ist ein Membranprotein, das dem Archaeobakterium *Halobacterium salinarum* zur Energieerzeugung dient. Dabei werden bei Lichteinfall Protonen vom cytoplasmatischen zum extrazellulären Bereich gepumpt und die Energie des Gradienten dann zur ATP-Synthese verwendet [16]. bR gehört zu den bestuntersuchten Photorezeptoren, so gibt es Kristallstrukturen mit atomarer Auflösung [17] und eine Vielzahl an spektroskopischen Studien. Der Photozyklus des bR ist im Detail bekannt und es eignet sich daher als Standardprobe zur Evaluierung von Aufbauten.

Das Absorptionsspektrum des bR im lichtadaptierten Dunkelzustand  $B_{570}$  zeigt eine breite Bande mit Maximum bei 570 nm. Vereinfacht dargestellt durchläuft das bR nach Anregung die kurzlebigen Intermediate  $J_{620}$ ,  $K_{590}$  und  $L_{550}$  bis zum langlebigen Intermediat  $M_{410}$ , das bei 410 nm absorbiert. Über die Intermediate  $N_{530}$  und  $O_{640}$  wird dann der Dunkelzustand innerhalb von wenigen Millisekunden zurückgebildet. In Abbildung 2.2 ist der Photozyklus dargestellt [18–21],

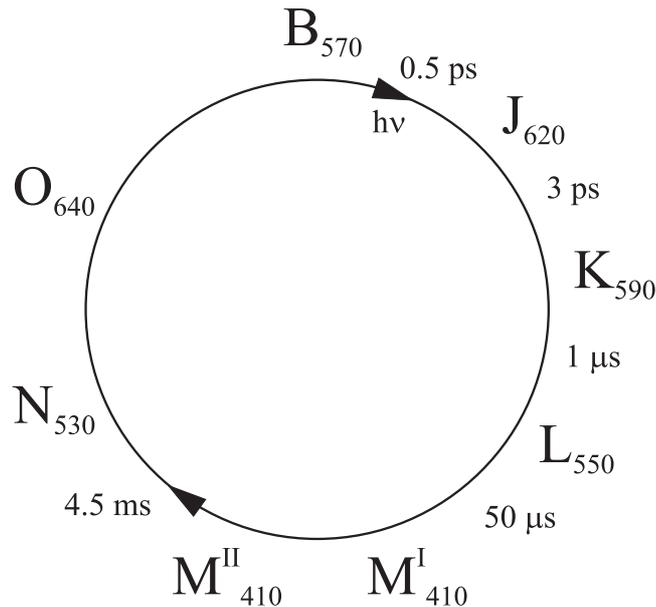


Abb. 2.2: Vereinfachter Photozyklus des Bacteriorhodopsin

wobei die Zeitkonstanten und der Ablauf stark von den Umgebungsbedingungen und dem gewählten kinetischen Modell abhängen. Mit der Blitzlichtphotolyse-Apparatur konnten die Übergänge  $K \rightarrow L$  und  $L \rightarrow M$  im Mikrosekundenbereich sowie der Übergang  $M \rightarrow B$  im Millisekundenbereich untersucht werden. Der verwendete Aufbau unterscheidet sich von dem in Kapitel 2.2.1 beschriebenen in einigen Punkten. So wurde zur Anregung die zweite Harmonische des Nd:YAG Lasers bei 532 nm verwendet, die auf 180  $\mu$ J Pulsenergie abgeschwächt wurde. Statt eines zweiten Monochromators wurden zur Abtrennung des Streulichts Interferenzfilter (AHF AG) mit einer Halbwertsbreite von 20 nm bei 590 und 410 nm verwendet. Bei Messungen im Millisekundenbereich wurde das Messlicht nicht gepulst und ein passiv beschalteter Photomultiplier (Hamamatsu 1P28) eingesetzt [22]. Die Proben wurden nicht thermostatisiert. Es

wurde jeweils über 10 Messungen gemittelt, wobei eine Streulichtkorrektur der erhaltenen Absorptionsverläufe nach Gleichung (2.1) nicht durchgeführt wurde. Die bR-Purpormembran war in 25 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.8 suspendiert und wurde vor der Messung durch Belichtung durch einen 530 nm Kantenfilter (Schott OG530) lichtadaptiert.

Im Zeitbereich der ersten 50  $\mu\text{s}$  nach Anregung wurde bei 590 nm eine leichte Abnahme der Absorption mit einer Zeitkonstante von ca. 2  $\mu\text{s}$  beobachtet, die allerdings von einem starken Streulichtsignal überlagert war. Dies lässt sich dem Übergang  $K_{590} \rightarrow L_{550}$  zuordnen, der laut Literatur unter diesen Bedingungen bei 3 °C eine Zeitkonstante von 2.8  $\mu\text{s}$  zeigt [20]. Misst man bei 590 nm über einen Zeitraum von einer Millisekunde, so zeigt sich eine weitere Abnahme der Absorption mit einer Zeitkonstante von 56  $\mu\text{s}$  (siehe Abbildung 2.3). Nach 300  $\mu\text{s}$  ist wieder eine leichte Erholung zu erkennen, die auf den nächsten Übergang hindeutet. Als Referenzwert ist hier eine Zeitkonstante von 48  $\mu\text{s}$  bei 22 °C zu finden, die den Übergang  $L_{550} \rightarrow M_{410}$  charakterisiert [20]. Wechselt man nun zur Messwellenlänge von 410 nm, so lassen sich die Bildung und der Zerfall des  $M_{410}$ -Intermediats beobachten (siehe Abbildung 2.4). Der Zerfall zeigt eine Zeitkonstante von 5 ms, laut Literatur ist hier ein Wert von 4.5 ms bei 22 °C zu erwarten [20]. Die Intermediate  $N_{530}$  und  $O_{640}$  lassen sich nicht so einfach charakterisieren, da sie während der Bildung bereits weiterreagieren [23].

Die Abweichungen von den Literaturwerten liegen im erwarteten Bereich für biochemische Proben, zumal ohne Thermostatisierung gemessen wurde. Die Zeitkonstante im frühen Mikrosekundenbereich konnte aufgrund der starken Streuung der Purpormembranen nicht ausreichend aufgelöst werden. Für die nachfolgenden Messungen wurde daher ein zweiter Monochromator zur Unterdrückung von Streulicht und Fluoreszenz eingebaut. Durch Einführung einer separaten Messung der Störsignale und ihre Einbeziehung in die Auswertung wurde die Zeitauflösung erheblich verbessert. Ein wesentlich höheres Signal-zu-Rausch Verhältnis in den bR-Messungen hätte man durch eine höhere Anregungsenergie als 180  $\mu\text{J}$  erreichen können. Es wurde aber darauf verzichtet, da die Auflösung der Apparatur bei geringer Signalintensität untersucht werden sollte. Unter Verwendung des bR konnte somit gezeigt werden, dass sich mit Hilfe der Apparatur sowohl im Mikrosekunden- als auch Millisekundenbereich die relevanten Übergänge korrekt erfassen lassen.

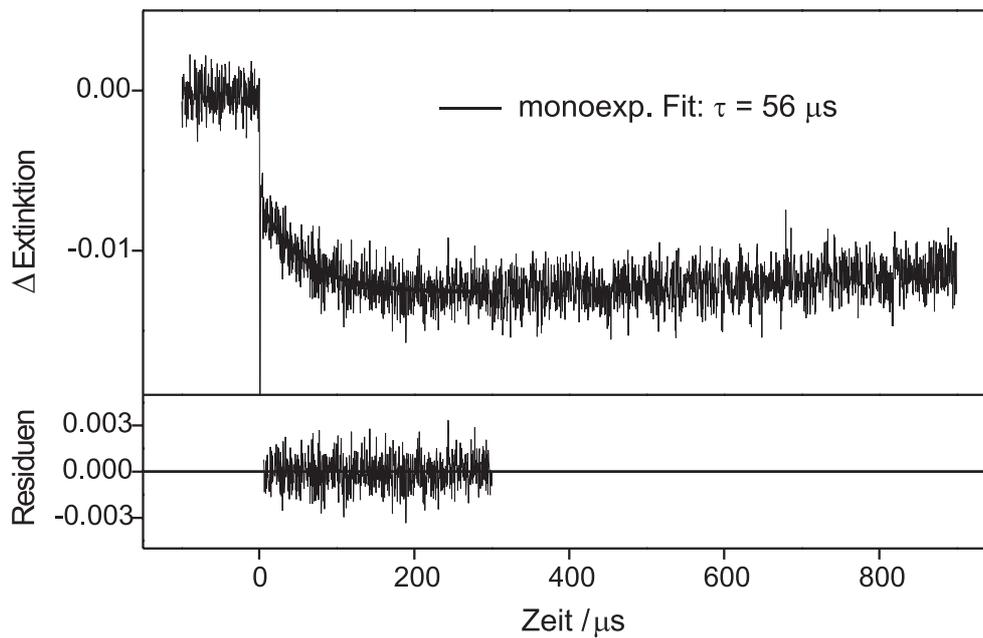


Abb. 2.3: Ausbleichen des Bacteriorhodopsin nach Anregung gemessen bei 590 nm (Übergang  $L_{550} \rightarrow M_{410}$ )

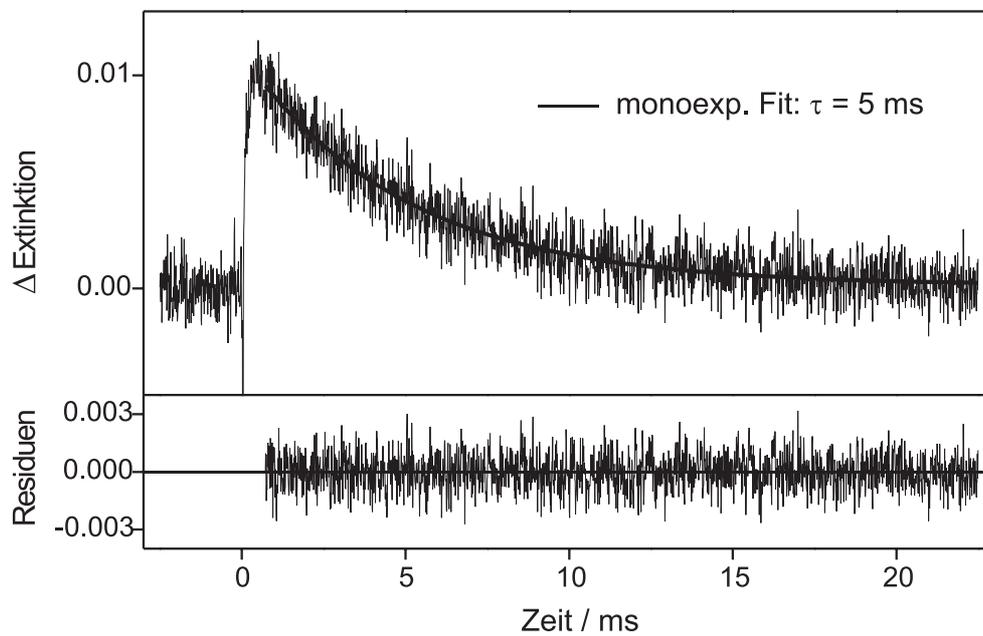


Abb. 2.4: Bildung und Zerfall des  $M_{410}$ -Intermediats gemessen bei 410 nm

# 3 Die LOV1-Domäne des Phot-Proteins

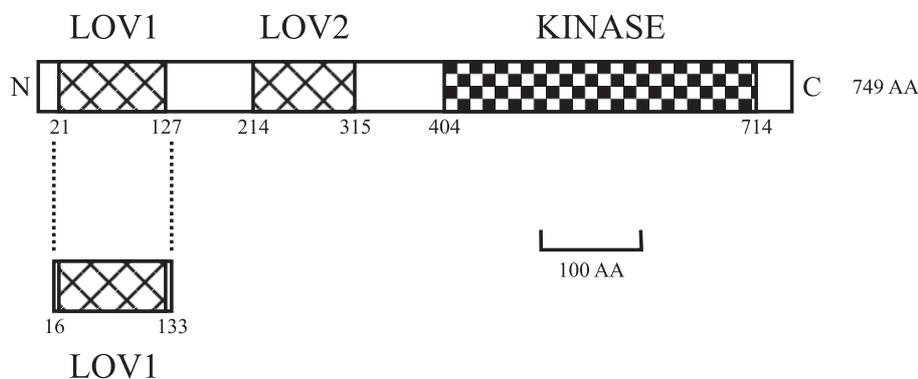
## 3.1 Phot-Proteine im Überblick

Blaues Licht und Ultraviolett A-Strahlung lösen eine Vielzahl von Reaktionen in Pflanzen aus. Dabei dienen einige dieser Prozesse der Optimierung der Photosynthese bei schwachem Licht und dem Schutz vor zu hoher UV-Belastung. Aktionsspektren für diese Prozesse sind schon lange bekannt und weisen auf ein Flavoprotein als Photorezeptor hin [24]. Erst 1998 konnte allerdings ein entsprechendes Protein identifiziert werden, das Phototropin [3]. Durch den Vergleich von DNA-Sequenzen wurden in den nächsten Jahren viele Phototropin-ähnliche Proteine gefunden, die daraufhin als „Phot“ bezeichnet wurden. Diese werden sowohl in höheren Pflanzen wie *Arabidopsis*, Hafer oder Reis, als auch in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* exprimiert. Im Farn *Adiantum capillus-veneris* wurde ein chimäres Protein aus Phot und Phytochrom entdeckt (Phy3). Die Phototropine der höheren Pflanzen wurden aufgrund einer Sequenzanalyse in zwei Gruppen eingeteilt, Phot1 und Phot2 [25], die aber in ihren Funktionen Redundanzen zeigen. Alle Phot-Proteine sind aufgebaut aus zwei licht-sauerstoff- und spannungsempfindlichen LOV-Domänen (von Light, Oxygen, Voltage) und einer Serin/Threonin-Kinase. Die Kinase autophosphoryliert das Protein bei Lichteinfall, wie durch Studien an Phot1 aus *Arabidopsis thaliana* gezeigt wurde [3]. Beide LOV-Domänen enthalten nicht-kovalent gebunden ein Flavin-Mononucleotid (FMN) als Chromophor [26]. Untersuchungen an der LOV2-Domäne aus *Avena sativa* (Hafer) Phot1 zeigten, dass bei Belichtung ein kovalentes Addukt zwischen FMN und einem benachbarten Cystein gebildet wird [27, 28]. Dieses Addukt ist metastabil und zerfällt im Zeitbereich von

Minuten wieder in den Ausgangszustand. Die Adduktbildung führt aber zu keinen wesentlichen konformativen Änderungen in der LOV-Domäne, wie in den Kristallstrukturen einer LOV2-Domäne aus *A. capillus-veneris* Phy3 zu sehen ist [30, 31]. Durch Untersuchungen mit dreidimensionaler Kernresonanzspektroskopie (NMR) konnte gezeigt werden, dass eine außerhalb liegende alpha-Helix im Dunkelzustand mit der LOV2-Domäne assoziiert ist [29]. Bei Belichtung geht diese Interaktion verloren, was nach Meinung der Autoren zu einer Aktivierung der Kinase führt. Von der weiteren Signalkaskade vom Protein zur physiologischen Reaktion ist noch wenig bekannt. In Arabidopsis zumindest wird ein Calcium-Kanal in Zellen des Blattgewebes durch das Phototropin gesteuert [32]. Es ist anzumerken, dass die Diversität der untersuchten Organismen eine Interpretation der gewonnenen Daten erschwert. Ein Vergleich zwischen LOV-Domänen aus höheren Pflanzen, Farnen und Algen aus Phot-Proteinen mit unterschiedlicher Funktion ist nur unter Vorbehalt möglich.

## 3.2 Sequenz und Struktur

Im Genom der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* befindet sich ein einzelnes Gen, das für ein Phot-Protein kodiert [33]. Die Aminosäuresequenz zeigt Homologie zu Phot-Proteinen aus höheren Pflanzen, allerdings ist das Protein deutlich kleiner. Berechnet wurde eine Größe von 81.4 kDa, das isolierte Protein zeigte eine Masse von 75 kDa. In der Algenzelle ist das Protein vermutlich an endogene Membranen assoziiert. Wie die Phototropin-Analoga aus höheren Pflanzen ist das *C. reinhardtii* Phot aus zwei LOV-Domänen und einer Serin/Threonin-Kinase aufgebaut (siehe Abbildung 3.1). In dieser Arbeit wurde die LOV1-Domäne des Proteins untersucht. Hierzu wurden die Aminosäuren 16 bis 133 separat exprimiert. Die Homologie der LOV-Domänen zu Phot1 aus höheren Pflanzen ist mit 70% bis 80% sehr hoch [33]. In Abbildung 3.2 wird ein direkter Vergleich der Sequenzen gezeigt, wobei die mit der LOV1-Domäne identischen Aminosäuren in Fettdruck hervorgehoben sind. Insbesondere sind die Aminosäuren konserviert, die die Bindungstasche für den FMN-Chromophor bilden (in Abbildung 3.2 mit Sternen markiert) [34]. Im vollständig konservierten Bereich NCRFLQG befindet sich auch das reaktive Cystein 57.

Abb. 3.1: Aufbau des Phot-Proteins aus *Chlamydomonas reinhardtii*

```

          *                               *** * *
Cr. LOV1: HTFVVADATLPDCPLVYASEGFYAMTGYGPDEVLGHNCRFLQEGTDPKEVQ 71
As. LOV1: QTFVVS DASRPGHPIMYASAGFFNMTGYTSKEVVGRNCRFLQSGTDPAEIA 190
Ac. LOV1: NSFIVVDALKPDFPIIYASTGFFNLTGYTSREVI GGNCRFLQGPDTNPADVA 726
At. LOV1: QTFVVS DATKPDYPIMYASAGFFNMTGYTSKEVVGRNCRFLQSGTDADELA 248
Cr. LOV2: QNF CISDPTLPDCPIVFASDAFLEL TGYTSREEV LGRNCRFLQAGTDRGTVD 264
As. LOV2: KNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVR 467
Ac. LOV2: KSFVITDPRLPDNPIIFASDRFLEL TEYTREEV LGNCRFLQGRGTDRKAVQ 980
At. LOV2: KNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLEL TEYSREEILGRNCRFLQGPETDLTVK 526

          **                               * * * *
Cr. LOV1: KIRDAIKKGE . ACSVRL LN YR KDG TPFWNLLTVTP IKTPDGRVSKFVG VQVDV 123
As. LOV1: KIRQALANGS . NYCGRV LN YK KDG TAFWNLLTIAP IKDEEGRV LKFI GMQVEV 242
Ac. LOV1: SIREAL AQGTGTFCGRLLN YR KDG SSWFWNLLTIAP IKDDLGSIVKLI GVQLEV 779
At. LOV1: KIRETLAAGN . NYCGRILN YK KDG TSFWNLLTIAP IKDESGKVLKFI GMQVEV 300
Cr. LOV2: QIRAAIKEGS . ELTVRILN YTKAGKA FWNMFTLAPMRDQDGHARF FVG VQVDV 316
As. LOV2: KIRDAIDNQT . EVTVQLIN YTKSGKK FWNLFH LQPMRDQKGDVQYFI GVQLDG 519
Ac. LOV2: LIRDAVKEQR . DVTVQVLN YTKGGR FWNLFH LQVMRDENG DVQYFI GVQQEM 1032
At. LOV2: KIRNAIDNQT . EVTVQLIN YTKSGKK FWNIFH LQPMRDQKGEVQYFI GVQLDG 578

Cr: Chlamydomonas reinhardtii; Ac: Adiantum capillus-veneris;
At: Arabidopsis thaliana; As: Avena sativa

```

Abb. 3.2: Aminosäuresequenz der LOV1-Domäne des *C. reinhardtii* Phot-Proteins im Vergleich mit anderen Domänen

Die Kristallstruktur der LOV1-Domäne wurde mit atomarer Auflösung (1.9 Å) bestimmt [34]. Wie in Abbildung 3.3 gezeigt, befindet sich der Isoalloxazinring des Flavins im Inneren der Domäne, während der Phosphatrest an der Oberfläche liegt. Die LOV-Domänen stellen eine Untergruppe der großen und mannigfaltigen Per-ARNT-Sim (PAS)-Domänen Überfamilie der sensorischen Proteine dar. Charakteristisch für eine PAS-Domäne ist die Sekundärstruktur des Proteins mit einer fünfsträngigen beta-Faltblattstruktur, drei kleineren alpha-Helices und einem langen helikalen Verbindungsstück [35]. Die Thiolgruppe des

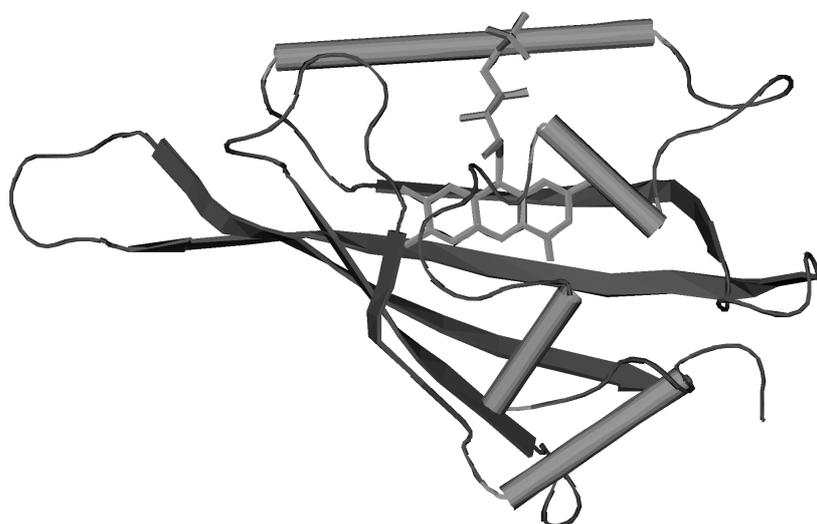


Abb. 3.3: Sekundärstruktur der LOV1-Domäne (PDB Nr. 1N9L)

reaktiven Cysteins 57 zeigt in der Kristallstruktur zwei Konformationen mit einem Abstand von 3.5 Å bzw. 4.4 Å zu der C(4a)-Position des Flavins (zur Nomenklatur siehe Abbildung 4.1). Der FMN-Chromophor ist durch Wasserstoffbrücken an das Apoprotein gebunden. Hierbei interagiert das Arg58 mit der Phosphatgruppe, während die Ribitylkette durch Gln61 und Asn56 gebunden ist. Die Heteroatome N(1), O(2), N(3), O(4) und N(5) des Flavins bilden Wasserstoffbrücken zu Gln61, Asn89, Asn99 und Gln120. Das reaktive Cys57 befindet sich dabei in einer unpolaren Umgebung ohne geladene Gruppen oder Wassermoleküle in der Nähe.

## 3.3 Expression und Aufreinigung

### 3.3.1 Wildtyp

Die Probenpräparation erfolgte freundlicherweise durch T. Schireis, Universität Regensburg. Der cDNA-Klon des vollständigen *C. reinhardtii phot* wurde von C. F. Beck und K. Huang, Universität Freiburg, zur Verfügung gestellt. Das Genfragment, das für die Aminosäuren 16-133 kodiert, wurde durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und zwischen die *Xho*I- und *Bam*HI-Schnittstellen des Expressionsvektors pET16 (Novagen) eingefügt. Das Protein wurde in *E. coli* Strang BL21 exprimiert und über eine Nickel-Nitrilotriessigsäure(NTA)-Säule (Qiagen) durch Affinitätschromatographie gereinigt. Es enthält am N-terminalen Ende ein Glycin, ein His-Tag mit 10 Histidinen und eine Schnittstelle für die Protease Faktor Xa.

Außer mit einem His-Tag wurde das Protein auch in Fusion mit einem Maltosebindeprotein hergestellt. Hierbei wurde das LOV1-Genfragment mit Oligonukleotidprimern amplifiziert, die *Eco*RI und *Hind*III-Schnittstellen enthielten. Das PCR-Produkt wurde entsprechend verdaut und in den pMALC<sub>2</sub>-Vektor (New England Biolabs) kloniert. Eine für 10 Histidine kodierende DNA-Sequenz wurde in die *Eco*RI-Schnittstelle eingefügt. Das pMal-Fusionsprotein wurde in *E. coli* BL21 exprimiert und über Amylose-Harz (New England Biolabs) säulenchromatographisch gereinigt. Alle Proben wurden gegen 10 mM Phosphatpuffer pH 8 mit 10 mM Natriumchlorid dialysiert.

### 3.3.2 Mutanten

Die Mutationen wurden durch ortsspezifische Mutagenese erzeugt und die erhaltene cDNA mit überlappender PCR amplifiziert. Die für die Blitzlichtphotolyse verwendete C57S-Mutante wurde mit His-Tag auf die gleiche Weise wie der Wildtyp exprimiert und aufgereinigt. Die Mutanten C57M, C57H, C57Y, R58K, D31N, D31Q, D31QR58K und W98F, sowie die für die Photoreduktion verwendete C57S-Mutante wurden als pMal-Fusionsprotein wie oben beschrieben dargestellt. Für massenspektrometrische Untersuchungen wurde das Maltosebindeprotein durch Inkubation mit Faktor Xa (Roche) abgetrennt und die Probe über eine Nickel-NTA-Säule gereinigt.

# 4 Dunkelzustand

## 4.1 Flavin als Kofaktor

Flavin ist in biologischen Systemen weit verbreitet und kommt in Form von Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>), Flavin-Mononucleotid (FMN) und Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) vor. Aufgrund seiner chemischen Vielseitigkeit ist es in vielen Proteinen als Kofaktor eingebaut, dabei zumeist nicht-kovalent gebunden. So steuern Flavoproteine als Photorezeptoren blaulichtabhängige Prozesse, deren Mechanismen noch weitgehend ungeklärt sind. Mehr bekannt ist über die Beteiligung von Flavoproteinen an Redoxprozessen im Dunkeln. In den Katalysezyklen der Dehydrogenasen, Disulfidreduktasen und Monooxygenasen durchläuft der Isoalloxazinring drei Redoxzustände (siehe Abbildung 4.1) und kann dabei sowohl Elektrophil als auch Nukleophil darstellen [36].

Der stabile, oxidierte Zustand des Flavins, das Flavochinon, zeigt eine charakteristische, gelbe Farbe, die durch eine Absorption des konjugierten Ringsystems bei 450 nm hervorgerufen wird. Über eine Einelektronenreduktion gelangt man zum Flavinradikal (Flavosemichinon). In Lösung ist dieses schwer zugänglich, wird aber durch eine Proteinumgebung stabilisiert. Man unterscheidet zwei Formen, das blau erscheinende Flavinradikal in seiner Neutralform mit Absorptionsmaxima bei 570 und 620 nm, und die rötliche, anionische Form, die bei 490 nm absorbiert [37]. Die meisten Flavoproteine bilden unabhängig vom pH-Wert jeweils nur eine der beiden Radikalformen aus. Das zweielektronen-reduzierten Flavin wird als Dihydroflavin oder Flavohydrochinon bezeichnet. Das konjugierte System ist dabei meist durch eine Winkelung der Struktur unterbrochen. Das Dihydroflavin ist daher farblos und absorbiert in einer unpolaren Umgebung wie im Protein bei 340-365 nm [38].

Das Absorptionsspektrum des FMN ist weitgehend unempfindlich gegenüber

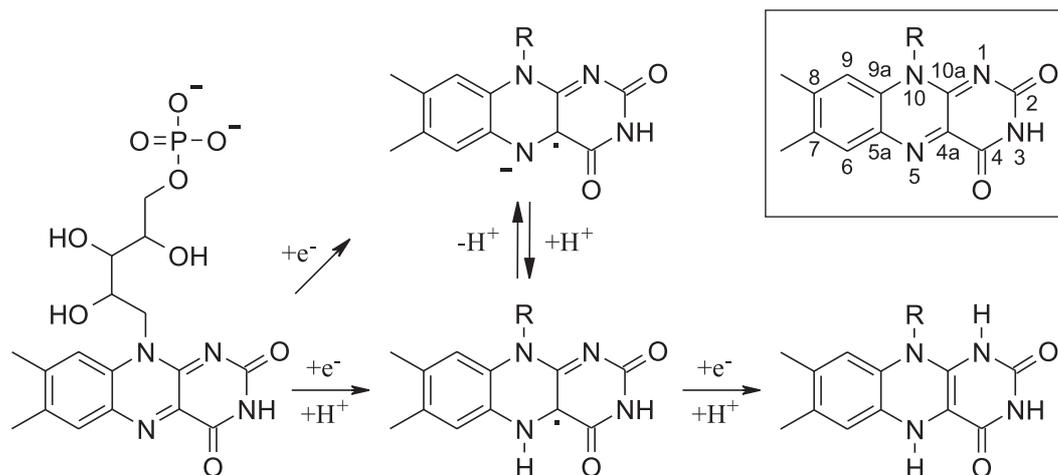


Abb. 4.1: Redoxzustände des Flavin-Mononucleotid: Oxidiertes Flavin, Flavosemichinon-Radikal (neutral und anionisch) und Dihydroflavin. Im Kasten die Nummerierung laut IUPAC

pH-Änderungen, da der Isoalloxazinring des oxidierten Flavin über weite Bereiche in seiner neutralen Form vorliegt. Er zeigt nur eine relevante Protonierungsstufe mit einem  $pK_a$  von 10.3, die einer Deprotonierung an der N(3)-Position entspricht. Der Phosphatrest des FMN ist bei neutralem pH-Wert aufgrund seiner  $pK_a$ -Werte von 2.1 und 6.2 vollständig deprotoniert [39].

Die Fluoreszenzintensität des FMN ist dagegen vom pH-Wert abhängig. In neutraler, wässriger Lösung fluoresziert es relativ stark mit einem Maximum bei 520 nm und einer Quantenausbeute von 26% [41]. Im pH-Bereich von 4 bis 9 ist diese Fluoreszenz konstant, wie anhand des Riboflavins gezeigt wurde [42]. Über pH 9 bildet sich die nur schwach fluoreszierende anionische Form, während unterhalb pH 4 die Emission durch Protonierung im angeregten Zustand gequencht wird [42]. Flavoproteine jedoch fluoreszieren oft nur schwach, was durch eine Komplexbildung mit benachbarten Aminosäuren erklärt wird (statisches Quenchen) [40]. Auch eine Reduktion des Flavins führt zum Verlust der Fluoreszenz [38].

## 4.2 Absorption und Emission der LOV1-Domäne

Vor der Untersuchung der Photoreaktion der LOV1-Domäne aus *C. reinhardtii* Phot wurde zunächst der Dunkelzustand im Detail charakterisiert. Zum Beginn dieser Arbeit waren nur wenige Informationen verfügbar, da sich die einzige Studie mit der Photoreaktion der LOV-Domänen aus *A. sativa* Phot1 befasste [27].

### 4.2.1 Wildtyp

Das Absorptionsspektrum der LOV1-Domäne zeigt zwei Absorptionsbanden im blauen und nahen UV-Bereich des Spektrums (siehe Abbildung 4.2). Diese Banden stellen die  $S_0 \rightarrow S_1$  und  $S_0 \rightarrow S_2$  Übergänge des Isoalloxazins dar, die  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Charakter besitzen [40]. Die Absorptionsmaxima liegen bei 474, 447, 370 und 354 nm mit einer zusätzlichen Schulter bei 425 nm. Eine weitere starke Bande im UV-Bereich bei 272 nm wird durch die Absorption von Tryptophan und Tyrosin im Apoprotein überlagert. Gemäß den Konventionen wird der Dunkelzustand nach der längstwelligen Absorptionsbande benannt, in diesem Falle LOV1-447. Das Spektrum des freien FMN in Wasser ähnelt dem des Proteins, besitzt allerdings nicht dessen ausgeprägte Schwingungsfinestruktur. In der LOV1-Domäne wird die Feinstruktur vermutlich sowohl durch die unpolare Umgebung als auch durch die Einschränkung der Bewegungsfreiheit im Apoprotein verursacht. So entsprechen die Spektren von Flavinen in unpolaren Lösungsmitteln (z.B.  $\text{CCl}_4$ ) weitestgehend dem Spektrum des Proteins. In diesem sollten allerdings die Wasserstoffbrückenbindungen zu den benachbarten Aminosäuren die Feinstruktur wieder weitestgehend verschmieren [43]. Nicht in allen Flavoproteinen ist die Feinstruktur so stark ausgeprägt wie in der LOV1-Domäne.

Die Feinstruktur des Spektrums ist ein guter Indikator für die Integrität des Proteins, da sie bei Denaturierung durch die Freisetzung des Chromophors verloren geht. Misst man die Absorptionsspektren der LOV1-Domäne in Abhängigkeit des pH-Wertes, so zeigt sich keinerlei Änderung in einem pH-Bereich von 3.5 bis 8, erst unter pH 3.5 beginnt die Denaturierung. In Abbildung 4.2 ist ein Spektrum der LOV1-Domäne bei pH 3 im Vergleich mit derselben Probe im nativen Zustand bei pH 8 dargestellt. Das Spektrum der denaturierten Probe

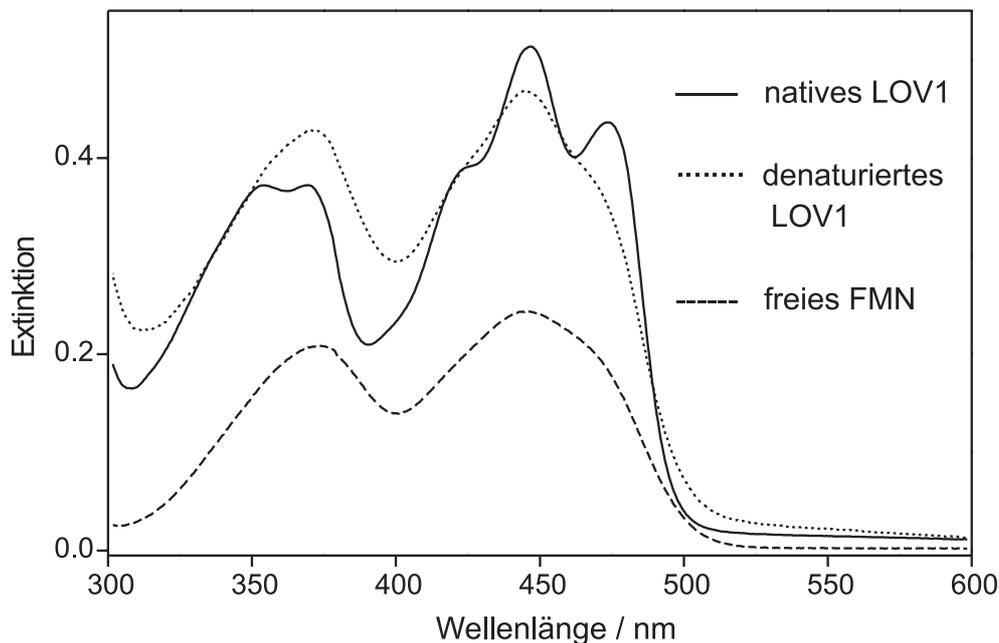


Abb. 4.2: Absorptionsspektrum der nativen LOV1-Domäne im Vergleich mit einer denaturierten Probe bei pH 3 und freiem FMN

entspricht in seiner Struktur dem des FMN und zeigt eine vergleichbare Extinktion zu dem der nativen Domäne. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich der Extinktionskoeffizient von freiem FMN von  $12500 \text{ l}/(\text{cm}\cdot\text{mol})$  [44] nicht wesentlich durch Einbau des Flavins in das Protein ändert. Zu einem genauen Vergleich der Koeffizienten müsste man allerdings sicherstellen, dass das Protein nach Denaturierung wirklich entfaltet vorliegt und der Chromophor alle Wechselwirkungen mit dem Apoprotein verloren hat.

Anhand der Spektren des Dunkelzustands lässt sich feststellen, dass das reaktive Cystein 57 in der LOV1-Domäne protoniert vorliegen muss. Da sich das Cystein nahe am Isoalloxazinring befindet, wäre im Falle eines Thiolats die Ausbildung einer Charge-Transfer-Bande im Bereich von 500 bis 600 nm zu erwarten [45, 46], die nicht beobachtet wurde. In einer Quecksilber-Reduktase, einem vergleichbaren System, konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Feinstruktur der 450 nm-Bande bei Deprotonierung des dem FMN benachbarten Cysteins verschwindet [45]. Alle anderen in der Reduktase essentiellen Cysteine waren vorher durch Alanin ersetzt worden. Ein Beleg für ein protoniertes Cys-

tein lieferte die Infrarotspektroskopie der LOV1-Domäne [47]. So konnte eine S-H-Bande bei  $2567\text{ cm}^{-1}$  identifiziert werden, die bei Belichtung verschwindet. Dies steht im Widerspruch zu der Interpretation von Swartz *et al.*, die aufgrund von Fluoreszenzmessungen ein deprotoniertes Cystein in der LOV2-Domäne aus *A. sativa* Phot1 postulierten [48].

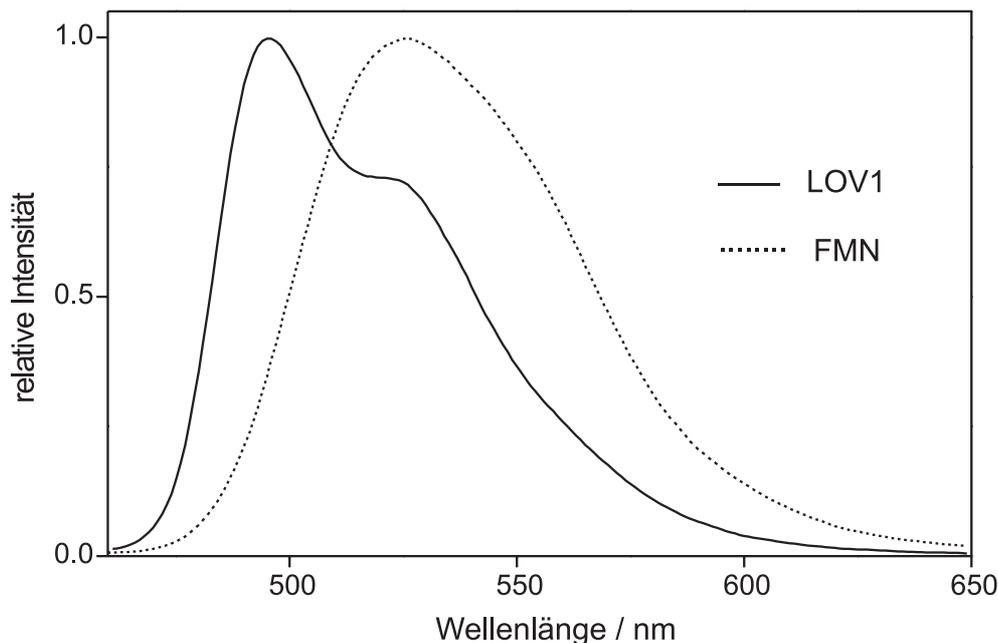


Abb. 4.3: Normierte Emissionsspektren der LOV1-Domäne und des freien FMN in Wasser bei Anregung mit  $\lambda = 350\text{ nm}$

Die LOV1-Domäne fluoresziert im Gegensatz zu vielen anderen Flavoproteinen relativ stark mit einer Quantenausbeute von 17% [13]. Das Spektrum zeigt bei Anregung mit 350 nm Wellenlänge eine breite, grüne Emission mit einem Maximum bei 495 nm und einer Schulter bei 520 nm (siehe Abbildung 4.3). Der Unterschied zum Emissionsspektrum des freien FMN lässt sich wie bei der Absorption mit der Ausbildung einer Schwingungsfineinstruktur und einer Verschiebung der Franck-Condon-Faktoren zugunsten des  $S_0^0 \leftarrow S_1^0$  - Übergangs erklären [49]. Bei Aufnahme der Fluoreszenzspektren der LOV1-Domäne kann eine gleichzeitige Photoreaktion nicht ausgeschlossen werden. Allerdings fluoresziert das Photoprodukt nicht oder nur schwach [13], daher wird die Form des Spektrums nicht verfälscht. Zeitaufgelöste Messungen ergaben eine Fluores-

zenzlebensdauer von 2.9 ns [13], woraus sich mit Hilfe der Quantenausbeute eine effektive Strahlungslebensdauer von 17 ns berechnen lässt.

### 4.2.2 Mutanten

Die Einführung von Mutationen in Photorezeptoren ist ein wertvolles Mittel, um mechanistische Vorstellungen zur Photoreaktion zu bekommen und zu überprüfen. Dabei ist es wichtig, dass sich diese nur gezielt in einzelnen Eigenschaften vom Wildtyp unterscheiden, so z. B. in ihrer Reaktionskinetik oder der Anzahl der gebildeten Intermediate. Unterscheidet sich hingegen schon ihr Absorptionsspektrum grundlegend von dem des Wildtyps, so stellt die Mutante oft kein geeignetes Vergleichssystem mehr dar. Die hier untersuchten Mutationen in

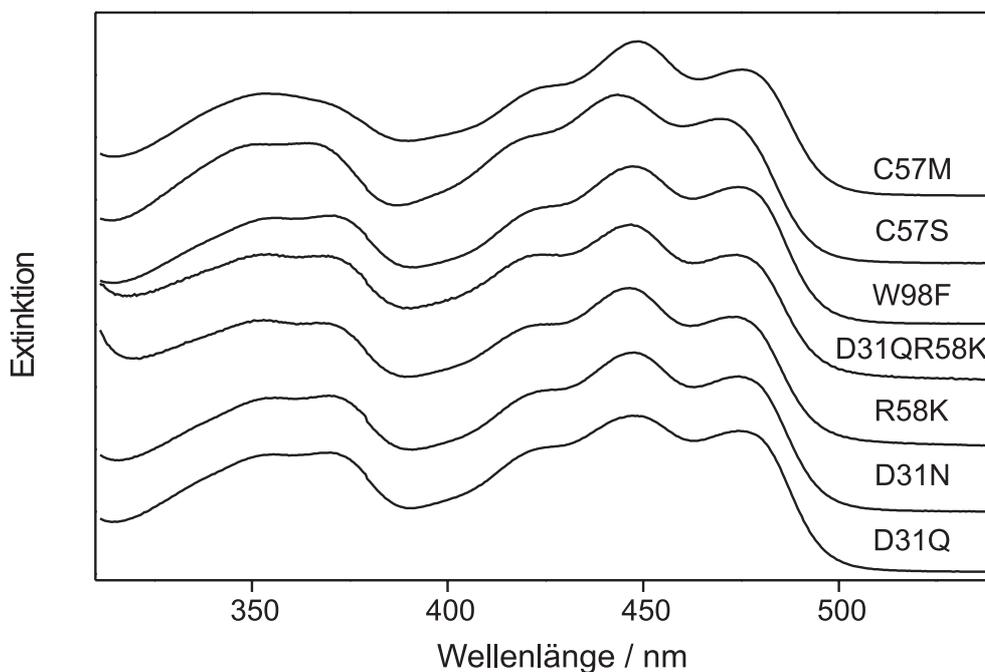


Abb. 4.4: Absorptionsspektren verschiedener Mutanten der LOV1-Domäne

der LOV1-Domäne haben keine oder nur geringe Auswirkungen auf das Absorptionsspektrum, wie in Abbildung 4.4 zu sehen ist. Sowohl bei einer peripheren Mutation (W98F), wie auch bei einem Austausch in der Bindungstasche des FMN (D31QR58K, R58K, D31N, D31Q) erhält man ein dem Wildtyp entspre-

chendes Spektrum. Ersetzt man das reaktive Cystein 57, so ist dies im Spektrum erkennbar. Das Einführen eines Serins (C57S) führt zu einer leichten Blauverschiebung des Absorptionsmaximums von 447 auf 443 nm. Ein Methionin (C57M) hingegen erzeugt eine geringe Rotverschiebung auf 448 nm. Zusätzlich verliert das Spektrum der C57M-Mutante weitgehend seine Feinstruktur bei 350 nm, diese wird durch ein breites Maximum bei 354 nm ersetzt.

Dies ist im Einklang mit der Beobachtung, dass die Absorptionsbande bei 350 nm ein sehr empfindlicher Indikator für die lokale Umgebung des Chromophors ist. So zeigen die Spektren der LOV2-Domänen von *A. sativa* [27], *A. capillus-veneris* [50] und *A. thaliana* [51] eine dem freien FMN ähnliche Struktur mit einem einzelnen Maximum um 380 nm. Mutiert man allerdings das reaktive Cystein in *A. sativa* LOV2 zu Serin oder Alanin, so erhält man einen Verlauf mit zwei Maxima [48] entsprechend den LOV1-Domänen von *C. reinhardtii*, *A. sativa* [27] und *A. thaliana* [51]. Dies ist überraschend, da in der Mutation vom Cystein zum Serin effektiv nur ein Schwefel-Atom durch einen Sauerstoff ersetzt wird. Einige Mutationen führen dazu, dass der Chromophor nicht oder nur noch zu geringer Menge gebunden wird. Dies ist der Fall sowohl in der C57H- als auch der C57Y-Mutante. Zurückführen lässt sich dies möglicherweise auf sterische Konflikte der voluminösen Aminosäuren Histidin und Tyrosin mit dem FMN. Allerdings zeigt eine Studie an *A. sativa* LOV2, dass auch ein konservativer Austausch von Aminosäuren die Bindungsaffinität stark beeinflussen kann [27].

# 5 Angeregter Triplettzustand

## 5.1 Flavin

Die photochemische Reaktion eines Moleküls erfolgt nach Anregung entweder vom Singulettzustand aus, oder nach einem Intersystem Crossing aus dem Triplettzustand. Als Konkurrenzprozesse treten sowohl die Fluoreszenz bzw. Phosphoreszenz als auch die strahlungslose interne Konversion auf. Im Falle des Flavins geht man davon aus, dass die Reaktion zumeist aus dem angeregten Triplettzustand erfolgt [52]. Dieser wird mit einer relativ hohen Quantenausbeute gebildet, so zeigt das Riboflavin in Wasser eine Ausbeute von 40-60% [53–55]. Für das FMN wurde dieser Wert nie bestimmt, es liegen nur falsche Zitate vor [50, 56–58]. Die Lebensdauer des Triplettzustands hängt stark von der Konzentration ab und liegt zwischen einer Millisekunde und wenigen Mikrosekunden. Erklären lässt sich dies durch das Auftreten von Triplett-Triplett-Annihilation und einem Quenchen durch Moleküle im Grundzustand, wie eine Studie zum Lumiflavin zeigt [59]. Auch der Substituent an N(10) hat einen großen Einfluss, so verkürzt sich beim FMN mit seiner langen Seitenkette die Lebensdauer des Triplettzustands auf 200  $\mu\text{s}$  [60]. Beim Zerfall des Triplettzustands dominieren nichtstrahlende Prozesse. Die Quantenausbeute der Phosphoreszenz ist im Gegensatz zur Fluoreszenz sehr niedrig, selbst bei 77 K in Ethanol beträgt sie nur 1% [61]. Der Triplettzustand zeigt eine erhöhte Basizität im Vergleich zum Grundzustand des Moleküls. So findet man im Grundzustand einen  $\text{pK}_a$  von 0 an der N(1)-Position, wohingegen für den Triplettzustand des Lumiflavins ein  $\text{pK}_a$ -Wert von 4.4 bestimmt wurde [62]. Die Protonierung erfolgt wahrscheinlich am N(5), da *ab-initio*-Rechnungen an dieser Position eine erhöhte Protonenaffinität zeigen, wohingegen der N(1) an Affinität verliert [63]. Das Spektrum des angeregten FMN zeigt eine Triplett-Triplett-Absorption im

roten Bereich mit zwei Maxima bei 710 und 660 nm und weitere Banden bei 494 und 377 nm [64]. Bei Protonierung verändert sich das Spektrum und zeigt nun eine breite Absorptionsbande mit einem Maximum bei 675 nm, eine Schulter bei 635 nm und weitere Maxima bei 485 und 395 nm [64].

## 5.2 Zeitaufgelöste Spektroskopie an der LOV1-Domäne

Die meisten Photorezeptoren zeigen in ihrem Photozyklus eine Vielzahl von Intermediaten. Diese lassen sich durch zeitaufgelöste Methoden identifizieren und charakterisieren. Ausgangspunkt zur Untersuchung der LOV1-Domäne mit transientser Absorptionsspektroskopie war eine Studie, die die Bildung eines Addukts zwischen dem FMN und einem Cystein in den LOV-Domänen bei Belichtung postulierte [27]. Die Einzelschritte dieser Reaktion waren allerdings nicht bekannt und sollten daher untersucht werden. Während der hier gezeigten Messungen an der LOV1-Domäne wurde eine detailliertere Untersuchung publiziert, die an der LOV2-Domäne aus dem Phot1-Protein des Hafers durchgeführt worden war [48]. Sie zeigte die Bildung eines Intermediats ( $\text{LOV2}_{660}^L$ ) wenige Nanosekunden nach Anregung, das dem angeregten Triplettzustand des Chromophors zugeordnet wurde. Das Intermediat zerfällt mit einer Zeitkonstante von 4  $\mu\text{s}$ . Trotz der Unterschiede in Sequenz und Eigenschaften zwischen der LOV1-Domäne aus *C. reinhardtii* und der LOV2-Domäne aus *A. sativa* lässt sich diese Studie zu einem Vergleich heranziehen.

### 5.2.1 Mutante LOV1-C57S

Der langsame Photozyklus der LOV-Domänen erschwert die zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie, da dies eine niedrige Repetitionsrate und damit ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis bedingt. Um dennoch detaillierte Untersuchungen durchführen zu können, wurde eine Mutante mit der Vorgabe erzeugt, dass das langlebige Photoprodukt nicht mehr gebildet werden kann. Hierzu wurde das reaktive Cystein durch ein Serin ersetzt (C57S), da man sich hiervon eine Verringerung der Reaktivität erhoffte.

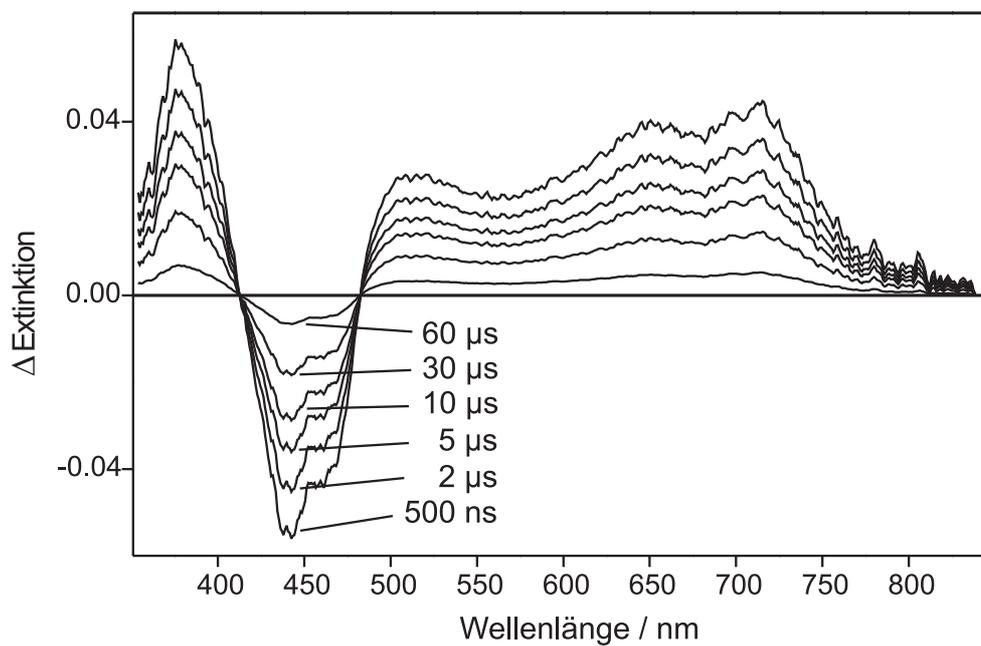


Abb. 5.1: Absorptions-Differenzspektren der C57S-Mutante der LOV1-Domäne nach Anregung mit einem 450 nm Laserpuls (übernommen aus [67])

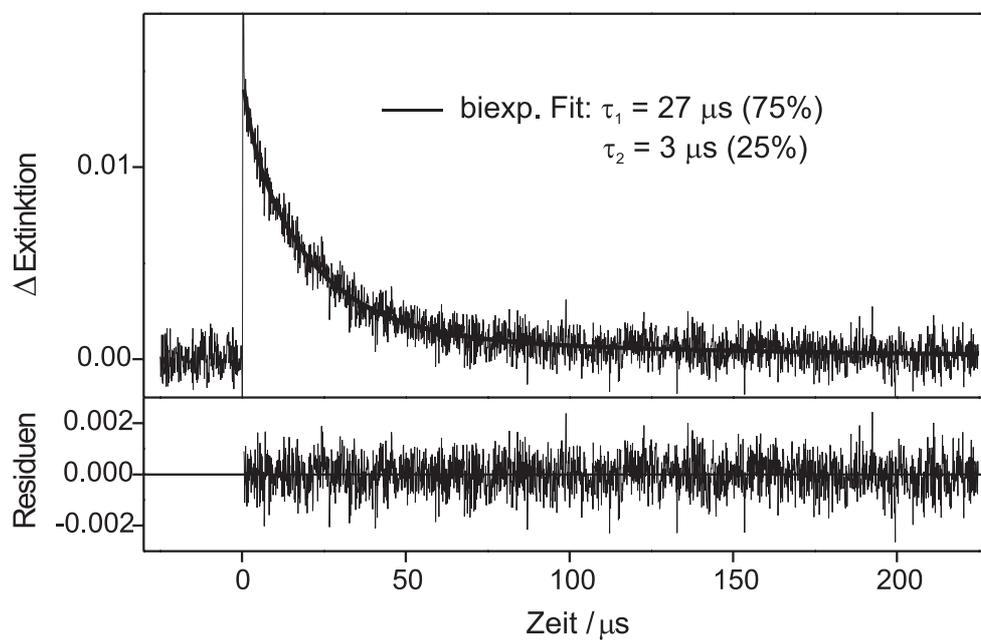


Abb. 5.2: Abklingkurve des Intermediats LOV1-715 in der C57S-Mutante aufgenommen bei 650 nm nach Anregung mit einem 446 nm Laserpuls

In Abbildung 5.1 sind Absorptions-Differenzspektren der C57S-Mutante abgebildet, die nach Anregung mit einem blauen ns-Laserpuls aufgenommen wurden (freundlicherweise überlassen von J. Heberle, Forschungszentrum Jülich). Zu erkennen ist die Bildung einer Spezies, die eine breite Absorptionsbande mit Maxima bei 715 und 648 nm zeigt. Im Bereich zwischen den isobestischen Punkten ist das Ausbleichen des Dunkelzustands der C57S-Mutante mit Maxima bei 470 und 442 nm zu erkennen. Im nahen UV-Bereich absorbiert das Intermediat stärker als der Dunkelzustand, was zu einer Bande bei 379 nm führt. Alle transiente Absorption ist nach 100  $\mu$ s verschwunden, was bedeutet, dass in der C57S-Mutante tatsächlich kein langlebiges Intermediat mehr gebildet wird. Eine SVD-Analyse des Zerfalls zeigt nur eine signifikante Spezies, die nach ihrer langwelligen Absorption LOV1-715 benannt wird. Aufgrund ihrer Lebensdauer und ihres Spektrums lässt sich LOV1-715 dem Triplettzustand des Chromophors FMN zuordnen. Das Spektrum ähnelt sehr dem des Triplettzustands von freiem FMN in Wasser.

Die Kinetik des Zerfalls wurde mit Blitzlichtphotolyse näher untersucht. Zunächst wurden Abklingkurven bei verschiedenen Wellenlängen aufgenommen. Die Verhältnisse der gemessenen Differenzabsorption bei 390, 510, 650 und 710 nm entsprechen dabei qualitativ dem gezeigten Differenzspektrum. Da bei 650 und 710 nm die Störung durch Fluoreszenz klein ist bei gleichzeitig hoher Differenzabsorption, wurden die weiteren Messungen bei diesen Wellenlängen durchgeführt. Bei 650 nm zeigt LOV1-715 in der C57S-Mutante einen biexponentiellen Zerfall mit Zeitkonstanten von 27  $\mu$ s (75%) und 3  $\mu$ s (25%) (siehe Abbildung 5.2). Für ein Intersystem Crossing des Triplettzustands zum Grundzustand wäre zunächst kein biexponentieller sondern ein monoexponentieller Verlauf zu erwarten. Zur Interpretation der Kinetik waren daher weitere Untersuchungen notwendig.

### 5.2.2 Einfluss von Sauerstoff und Xenon auf die Zerfallskinetik

Ein Konkurrenzprozess zum Intersystem Crossing eines Triplettzustands ist das Quenchen durch Zusätze wie molekularer Sauerstoff. Da die Messungen an der LOV1-Domäne in aerober Lösung durchgeführt wurden, wurde der Einfluss des

Sauerstoffs auf die Kinetik des LOV1-715-Zerfalls in der C57S-Mutante untersucht. Hierzu wurde Stickstoff für 15 Minuten durch die Lösung geleitet. Wie in Abbildung 5.3 zu sehen ist, zeigten die Abklingkurven bei 650 nm daraufhin keinen biexponentiellen Verlauf mehr, sondern eine einfache monoexponentielle Abhängigkeit mit einer Zeitkonstante von 27  $\mu\text{s}$ . Demnach bleibt die dominierende, langsame Komponente des Zerfalls bestehen, während die schnelle Komponente mit 3  $\mu\text{s}$  Zeitkonstante in anaerober Lösung verschwindet. Interpretiert werden kann dies als ein Quenchen des Triplettzustands in einem kleinen Teil der Flavine durch ein benachbartes, gelöstes Sauerstoffmolekül. In den übrigen Flavinen dagegen zerfällt der angeregte Zustand mit seiner intrinsischen Lebensdauer. Diese Beobachtung bestätigt die Zuordnung des LOV1-715 zum Triplettzustand des FMN. Ein Quenchen des FMN-Triplettzustands durch Sauerstoff wurde auch bereits in anderen Studien beobachtet [64], sogar mit einer vergleichbaren Zeitkonstante von 1-4  $\mu\text{s}$  [57]. Möglicherweise verläuft das Quenchen unter Bildung von Singulett-Sauerstoff, wie in der photokatalysierten Oxidation von einigen Aminosäuren [65] und ungesättigten Fettsäuren [66].

Außer durch Quencher kann die Zerfallszeit von Triplettzuständen auch durch einen Schweratomeffekt beeinflusst werden. So stellt sich die Frage, ob bei einem Übergang von Serin in der Mutante auf das Cystein des Wildtyps der Schwefel einen signifikanten, externen Schweratomeffekt ausüben kann. Um dies in der Mutante zu untersuchen, wurde Xenon als nicht reaktives Schweratom durch 20-minütiges Einleiten in die Lösung eingeführt. Die anschließenden Messungen der Kinetik zeigten einen monoexponentiellen Verlauf des Abklingens von LOV1-715 bei 650 nm mit einer Zeitkonstante von 27  $\mu\text{s}$  (siehe Abbildung 5.4). Dies lässt sich wie beim Stickstoff mit einem Entfernen des Sauerstoffs aus der Lösung erklären. Ein externer Schweratomeffekt auf die Kinetik konnte demnach nicht direkt festgestellt werden. Allerdings waren sowohl das Fluoreszenzsignal als auch die Differenzabsorption von LOV1-715 in der Messung verringert im Vergleich zur aeroben wie Stickstoff-gesättigten Lösung. Dies weist auf ein erleichtertes Intersystem Crossing durch das Xenon sowohl bei Bildung als auch Zerfall des Triplettzustands eines Teils der Moleküle hin. Eine entsprechende Abklingzeit läge aber dann außerhalb der Zeitauflösung des verwendeten Messaufbaus, der Effekt wurde daher nicht weiter quantifiziert.

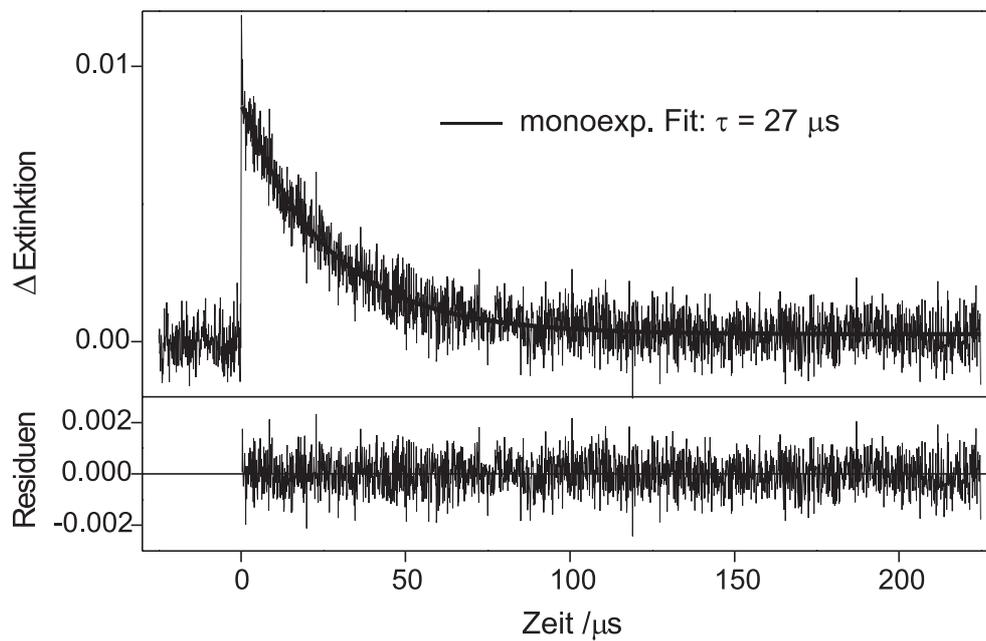


Abb. 5.3: Abklingkurve von LOV1-715 in der C57S-Mutante bei 650 nm nach Spülen mit Stickstoff

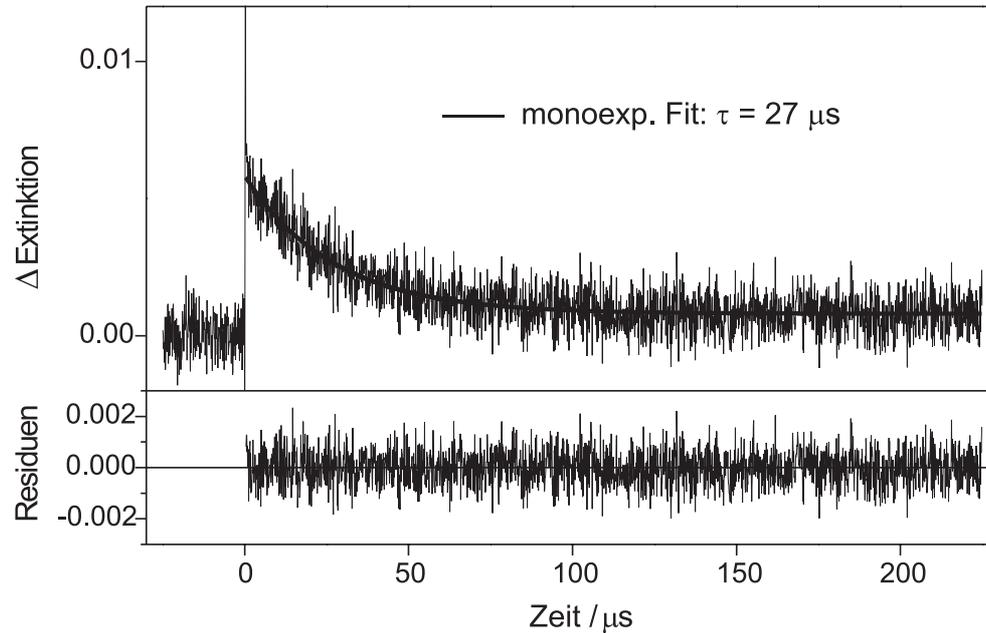


Abb. 5.4: Abklingkurve von LOV1-715 in der C57S-Mutante bei 650 nm nach Spülen mit Xenon

### 5.2.3 Wildtyp

Der Wildtyp der LOV1-Domäne wurde mit Hilfe der transienten Absorptionsspektroskopie untersucht. In Abbildung 5.5 ist das Absorptions-Differenzspektrum nach Anregung mit einem blauen ns-Laserpuls abgebildet (freundlicherweise überlassen von J. Heberle, Forschungszentrum Jülich). Das nach einer Mikrosekunde aufgenommene Spektrum zeigt Absorptionsbanden bei 390 und 510 nm und eine breite Bande im roten Bereich von 600 bis 750 nm. Die negativen Peaks bei 447 und 475 nm entsprechen einem Ausbleichen des Dunkelzustands LOV1-447. Die später aufgenommenen Spektren zeigen im Zeitbereich von 10  $\mu$ s bis 1 ms keine transiente Absorption mehr über 500 nm. Die anderen Banden sind weiterhin stark ausgeprägt und weisen auf die Bildung einer langlebigen Spezies hin. Hierbei handelt es sich um das in Kapitel 6 näher beschriebene Photoaddukt LOV1-390. Aus einem Vergleich des Transientenspektrums mit dem der C57S-Mutante lässt sich das kurzlebige Intermediat dem angeregten Triplettzustand des Chromophors FMN zuordnen. Die Feinstruktur in der roten Absorptionsbande bei 650 und 715 nm ist im Wildtyp nicht so deutlich ausgeprägt, was an dem schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnis liegen kann. Weiterhin ist es möglich, dass durch Änderung der Polarität von Serin zum Cystein auch die Feinstruktur verändert wird. Allerdings gibt es hierfür keinerlei Hinweise aus der Literatur, alle Referenz-Spektren wurden in wässriger Lösung aufgenommen und zeigen eine Feinstruktur [50, 64, 68]. Erst kürzlich wurden die LOV2-Domänen aus *A. sativa* Phot1 und *A. capillus-veneris* Phy3 mit transienter Absorptionsspektroskopie mit Femtosekunden-Auflösung untersucht [50]. Die Autoren interpretieren die geringe Feinstruktur im Spektrum des Triplettzustands mit einer Protonierung von 60% der Flavinmoleküle durch das benachbarte Cystein. Leider verwenden die Autoren zur Anpassung als Vergleichssystem Spektren des freien FMN in Wasser. So weiß man bisher nicht, wie im Protein das Spektrum des protonierten Triplettzustands des FMN aussieht. Auch stützen sich die Autoren bei der Betrachtung der Ausbeuten an Triplettzustand und Photoaddukt auf nicht vorhandene bzw. grobe Referenzwerte. Eine genauere Betrachtung ist hier dringend notwendig, da die Protonierung im Widerspruch zu einem radikalischen Mechanismus steht, wie er in Kapitel 9 im Detail diskutiert wird.

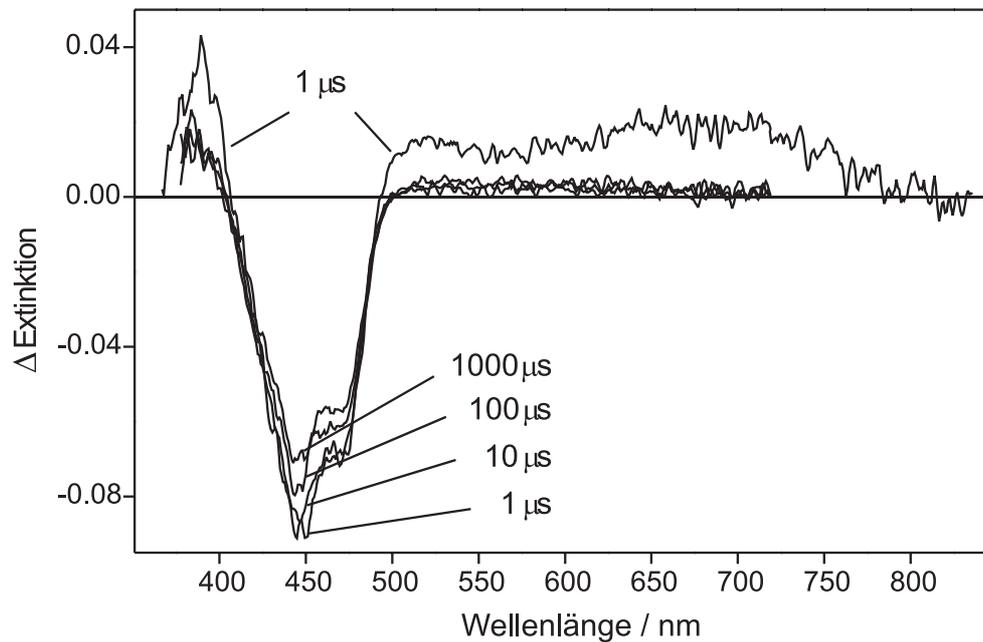


Abb. 5.5: Absorptions-Differenzspektren des Wildtyps der LOV1-Domäne nach Anregung mit einem 450 nm Laserpuls (übernommen aus [67])

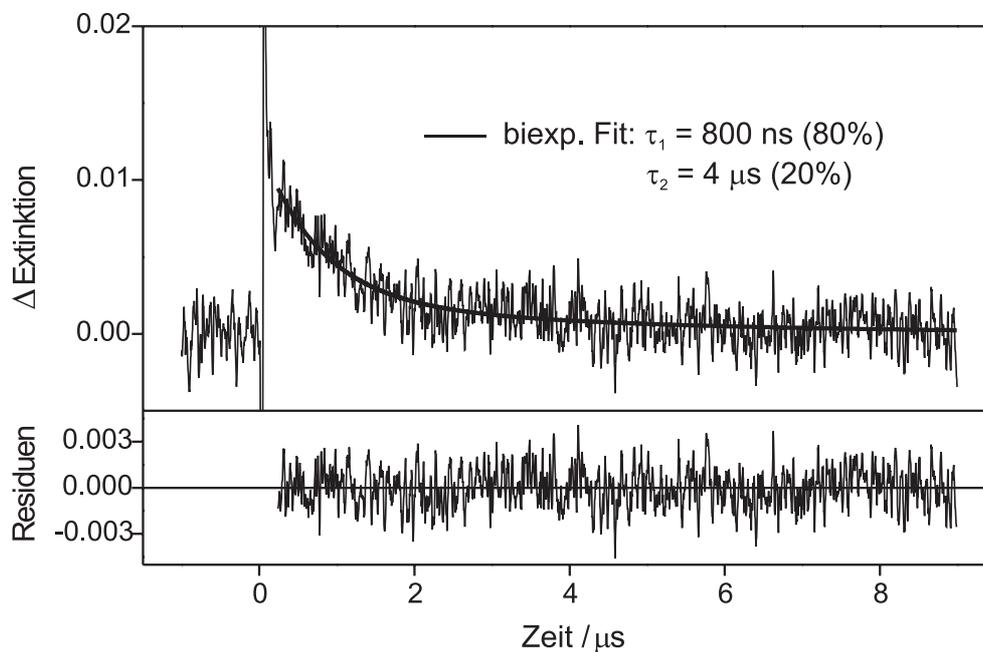


Abb. 5.6: Abklingkurve des Intermediats LOV1-715 im Wildtyp aufgenommen bei 710 nm nach Anregung mit einem 446 nm Laserpuls

Interessanterweise gibt es im Transientenspektrum der LOV1-Domäne einen Hinweis auf die Beteiligung von radikalischen Intermediaten. So ist die Absorptionsbande bei 500 nm stärker ausgeprägt, als aufgrund der Referenzspektren von freiem FMN in Wasser zu erwarten wäre. Auch in den Untersuchungen zur LOV2-Domäne musste bei der Anpassung der Spektren 10% an Neutralradikalform des Flavins mit eingerechnet werden [50].

Um die Zerfallskinetik des kurzlebigen Intermediats näher zu untersuchen, wurde mit Blitzlichtphotolyse eine Abklingkurve bei 710 nm aufgenommen (siehe Abbildung 5.6). Das Intermediat bildet sich demnach in einem Zeitbereich von wenigen Nanosekunden, der nicht aufgelöst werden konnte. Eine Analyse des Zerfalls ergibt einen biexponentiellen Verlauf mit Zeitkonstanten von 800 ns (80%) und 4  $\mu$ s (20%). Demnach ist der Prozess bereits nach wenigen Mikrosekunden beendet, was erklärt, warum nach 10  $\mu$ s im Spektrum nichts mehr zu sehen ist.

Um die Temperaturabhängigkeit des Prozesses zu untersuchen, wurden die Abklingkurven anstatt bei 20 °C bei 5 °C aufgenommen. Die Kurven zeigen aufgrund ihrer schlechteren Auflösung eine monoexponentielle Kinetik, die Summenzeitkonstante beträgt allerdings wie bei Raumtemperatur 1.4  $\mu$ s. Die Temperaturänderung scheint demnach die Reaktion nicht wesentlich zu verlangsamen. Analog zur Untersuchung an der C57S-Mutante wurde der Einfluss von Sauerstoff auf den Zerfall gemessen. Dabei konnte im Rahmen der Messgenauigkeit keine wesentliche Änderung der Zeitkonstanten von 800 ns und 4  $\mu$ s festgestellt werden. Demnach spielt das Quenchen des Triplettzustands durch Sauerstoff im Wildtyp keine größere Rolle. Der schnelle Zerfall des Triplettzustands im Wildtyp im Vergleich zur Mutante C57S bedeutet entweder eine schnelle und effiziente Reaktion zum Photoprodukt, oder eine starke Verkürzung der Triplettlebensdauer durch den Wechsel vom Serin zum Cystein durch einen externen Schweratomeffekt. Allerdings konnte ein derartiger Schweratomeffekt auf die Kinetik in der Mutante nicht festgestellt werden. Weiterhin zeigen die transienten Spektren, dass auch nach Zerfall des Triplettzustands nach 10  $\mu$ s der Grundzustand LOV1-447 nicht in größerem Maße zurückgebildet wird. Daraus lässt sich schließen, dass im Wildtyp der Triplettzustand effizient zum Photoprodukt reagiert. Eine Quantenausbeute der Photoproduktbildung lässt sich allerdings nicht berechnen, da bisher bestimmte Werte für die Triplettquantenausbeute

der LOV1-Domäne zwischen 26% [53] und 63% [69] variieren.

Der biexponentielle Zerfall des LOV1-715 weist auf die Beteiligung von zwei unabhängigen Spezies hin. Im einfachsten Falle beruht dies auf einer konsekutiven Bildung dieser Spezies. Allerdings gibt es im Protein neben dem Triplettzustand keine weitere Flavinspezies, die bei 710 nm nennenswert absorbiert. Weiterhin wird trotz einer Zerfallskonstante von 800 ns der ersten Spezies auch nach 1  $\mu$ s noch ein Triplettzustand beobachtet. Daraus kann geschlossen werden, dass nach Anregung zwei Triplettpezies gleichzeitig gebildet werden, die gleiche Spektren, aber unterschiedliche Zerfallszeiten zeigen. Tatsächlich wurden in der Kristallstruktur der LOV1-Domäne zwei Konformere gefunden, die sich im Abstand des reaktiven Cysteins zum Flavin unterscheiden [34]. Eine Interpretation könnte demnach sein, dass das reaktive Konformer mit einer Zeitkonstante von 800 ns mit dem Flavin reagiert, während die zweite Konformation sich vor der Reaktion noch mit einer Zeitkonstante von 4  $\mu$ s in das reaktive Konformer umwandeln muss. Eine direkte, langsamere Reaktion des zweiten Konformers kann aber anhand der kinetischen Daten nicht ausgeschlossen werden.

In dem vergleichbaren System der LOV2-Domäne aus *A. sativa* Phot1 wurde nur eine Zeitkonstante von 2  $\mu$ s für den Zerfall des Triplettzustands gefunden [48]. Die Kinetik wurde so interpretiert, dass dieser mit einer Zeitkonstante von 4  $\mu$ s das Addukt bildet, wobei allerdings 50% der Moleküle ohne Reaktion mit der gleichen Zeitkonstante in den Grundzustand zurückkehren. In einer Mutante dieser Domäne, in der die Adduktbildung durch Einfügen eines Alanins verhindert wird (LOV2C39A), wurde die Zeitkonstante zu 72  $\mu$ s bestimmt. Die Autoren erklären den großen Unterschied zwischen den Zerfallszeiten mit einem Schweratomeffekt des Schwefels. Dabei muss allerdings angenommen werden, dass die Geschwindigkeitskonstante für den Zerfall zum Grundzustand durch den Schweratomeffekt zufälligerweise identisch ist zur Geschwindigkeit der Adduktbildung und dass die Adduktbildung mit 50% wenig effektiv verläuft. Im Gegensatz zur LOV1-Domäne genügen laut Aussage der Autoren sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante eine monoexponentielle Anpassung zur Beschreibung des Systems. Demnach unterscheiden sich nicht nur die Kinetiken von LOV1 und LOV2 sondern auch ihre Interpretation deutlich voneinander.

### 5.2.4 Mutante LOV1-W98F

In vielen Proteinen spielt das Tryptophan eine wesentliche Vermittlerrolle bei einer Elektronenübertragung von der Umgebung in das Zentrum. So erfolgt in dem Flavoprotein Photolyase aus *E. coli* die Photoreduktion des Chromophors über eine Kette von Tryptophanen [70]. Um herauszufinden, ob ähnliche Prozesse an der Photoreaktion in der LOV1-Domäne beteiligt sind, wurde das einzige vorhandene Tryptophan durch ein Phenylalanin ausgetauscht. Es hat die Position 98 und ist über 11 Å von dem Chromophor entfernt. Die Mutante W98F wurde daraufhin mit Hilfe der Blitzlichtphotolyse untersucht. Die Abklingkurve bei 710 nm zeigt eine biexponentielle Kinetik mit Zeitkonstanten von 900 ns (91%) und 4.4  $\mu$ s (9%). Demnach verursacht die Mutation keine wesentliche Änderung in der Zerfallszeit des Triplettzustands im Vergleich zum Wildtyp. Eine Elektronenübertragung über das Tryptophan z. B. zur Aktivierung des Flavins ist daher unwahrscheinlich.

# 6 Photoaddukt

## 6.1 Photoreaktionen des Flavins

Mit einer Vielzahl von Substraten reagiert das Flavin unter Photoreduktion zu C(4a)-, N(5)- oder C(8)-substituierten Photoaddukten [40]. Bis auf wenige Ausnahmen wurden stabile Produkte nur dann erhalten, wenn die Anbindung an das Flavin über einen Kohlenstoff erfolgte [71]. Bei einigen Substraten wird der Substituent sofort wieder eliminiert, was zu einer Bildung des Dihydroflavins führt. Die Photoaddukte zeigen ein Absorptionsmaximum bei 340 bis 360 nm. In Konkurrenz zur Photoreduktion reagiert das Flavin auch intramolekular. So reagieren N(10)-substituierte Flavine wie Riboflavin unter Dealkylierung zum Alloxazin Lumichrom [72]. Auch eine interne Photoaddition ist bekannt, wobei eine Hydroxy-Gruppe der Seitenkette mit dem Ringsystem reagiert. In Flavoproteinen hingegen ist das Flavin meist photochemisch inert. Sowohl die Fluoreszenz als auch die Bildung des Triplettzustands wird durch die Einbindung in das Protein gequencht [40]. Durch externe Elektronendonatoren wie z. B. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) lassen sich Flavoproteine allerdings photoreduzieren [37], wie in Kapitel 8.7.1 anhand der LOV1-Domäne gezeigt wird. In vielen Katalysezyklen der Flavoproteine sind C(4a)-Addukte mit Sauerstoff oder Sulfiden beteiligt. Diese bilden sich allerdings nicht photochemisch, sondern im Dunkeln in einer Reaktion mit dem reduzierten Dihydroflavin [36]. Die Photochemie des Flavins im Protein ist daher wenig untersucht. Als Ausnahme ist hier die Photolyase zu sehen, bei der das Flavin über eine Photoreduktion aktiviert wird, um Thymin-Dimere in der DNA zu spalten [73]. Die Identifizierung einer ganzen Reihe von flavinbasierenden Photorezeptoren in den letzten Jahren hat allerdings die Aufmerksamkeit auf die Bildung von Photoaddukten im Protein gelenkt.

## 6.2 Photoaddukt in der LOV1-Domäne

### 6.2.1 Vorarbeiten

Nach der Identifizierung des Phototropins im Jahre 1997 gelang es, die LOV2-Domäne aus *A. sativa* Phot1 in größeren Mengen heterolog zu exprimieren. Bei Belichtung des Proteins wurde die Bildung einer langlebigen Spezies beobachtet, die im Dunkeln mit einer Zeitkonstante von 39 s wieder zerfällt [27]. Dieses Intermediat zeigt eine breite Absorptionsbande mit einem Maximum bei 390 nm. Eine derartige Bande wurde in Flavoproteinen bereits einmal beobachtet, in einer Studie über die Quecksilber-Reduktase [45]. In dieser Studie wurden drei der vier für die Katalyse essentiellen Cysteine durch Alanin ersetzt. In der Mutante bildete sich im Dunkeln bei pH 5 unter Zugabe von NADP<sup>+</sup> ein permanentes Addukt zwischen dem Flavin und einem benachbarten Cystein. Damit gelang es, ein Intermediat im Katalysezyklus der Reduktase zu isolieren. Das Absorptionsspektrum des Intermediats zeigt im Vergleich zu C(4a)-alkylierten Photoaddukten eine Rotverschiebung von 40 nm. Es ähnelt weitaus mehr dem Spektrum von synthetischen Addukten des Flavins mit Sauerstoff an der C(4a)-Position [38]. Daher wurde das Intermediat als Flavin C(4a)-Thiol Addukt identifiziert. Analog wurde auch für die LOV2-Domäne die Bildung eines derartigen Addukts postuliert und als LOV-390 bezeichnet (siehe Abbildung 6.1) [27].

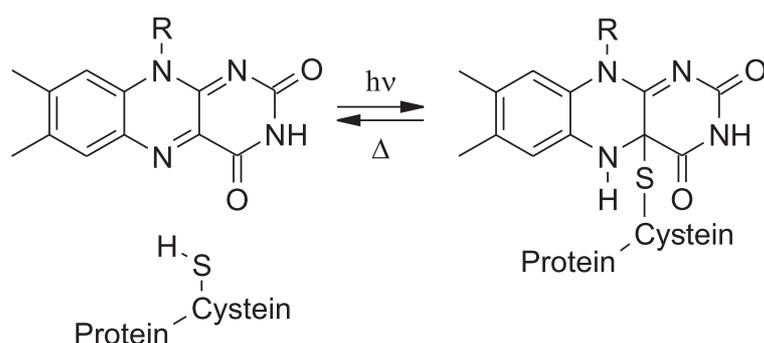


Abb. 6.1: Bildung des Flavin C(4a)-Thiol Addukts LOV-390 in der LOV2-Domäne

Inzwischen konnte dieses Addukt sowohl durch NMR-spektroskopische Untersuchungen [28] als auch durch Kristallstrukturen des belichteten Zustands in

anderen LOV-Domänen nachgewiesen werden [31, 34].

### 6.2.2 LOV1-390

Nicht nur für die LOV2-, sondern auch für die LOV1-Domäne aus *A. sativa* wurde ein entsprechendes LOV-390-Intermediat postuliert [27]. Da die LOV1-Domäne allerdings durch Belichtung nicht vollständig konvertiert werden konnte, konnte ein entsprechendes Absorptionsspektrum als Beleg nicht gezeigt werden. In der hier untersuchten LOV1-Domäne aus *C. reinhardtii* war ebenfalls eine vollständige Konversion in das Intermediat nicht möglich. Nimmt man allerdings eine Sequenz von Spektren nach Belichtung auf, die die Rückbildung des Dunkelzustands zeigen, so lässt sich daraus über die im Methodenteil beschriebene Singulärwertzerlegung (SVD) das Intermediatspektrum extrahieren. In Abbildung 6.2 ist eine entsprechende Sequenz an Absorptionsspektren abgebildet. Dazu wurde die Probe mit einem Xenon-Blitz belichtet und anschließend alle 20 Sekunden ein Spektrum mit einem Diodenzeilenspektrometer aufgenommen. Bei der SVD-Analyse wurde die erhaltene Datenmatrix unter Verwendung einer steigenden Anzahl an Komponenten rekonstruiert und die Abweichung von den Messdaten in Form der Standardabweichung berechnet. Im Inset der Abbildung 6.2 ist zu sehen, dass die Standardabweichung mit der dritten und allen folgenden Komponenten nur noch geringfügig abnimmt (freundlicherweise überlassen von B. Dick, Universität Regensburg). Demnach tragen nur zwei Komponenten relevante Information zur Rekonstruktion bei, während die anderen Komponenten nur Rauschen enthalten. Trennt man die überflüssige Information ab, so erhält man die Spektren der beiden Komponenten. Diese entsprechen dem Dunkelzustand der LOV1-Domäne und einem Differenzspektrum zum Intermediaten. Da sich die beiden Spektren im gesamten Bereich überlappen, müssen zusätzliche Rahmenbedingungen gesetzt werden, um daraus durch Linearkombination das abgebildete Spektrum des Intermediats zu generieren. So darf das Spektrum des Intermediats keine negative Absorption haben und soll das Maximum des Dunkelzustands bei 475 nm nicht mehr enthalten. Das erhaltene Spektrum des Intermediats zeigt wie das des Homologen in der LOV2-Domäne ein breites Absorptionsmaximum bei 390 nm und wird daher dem Addukt eines Cysteins mit dem FMN zugeordnet.

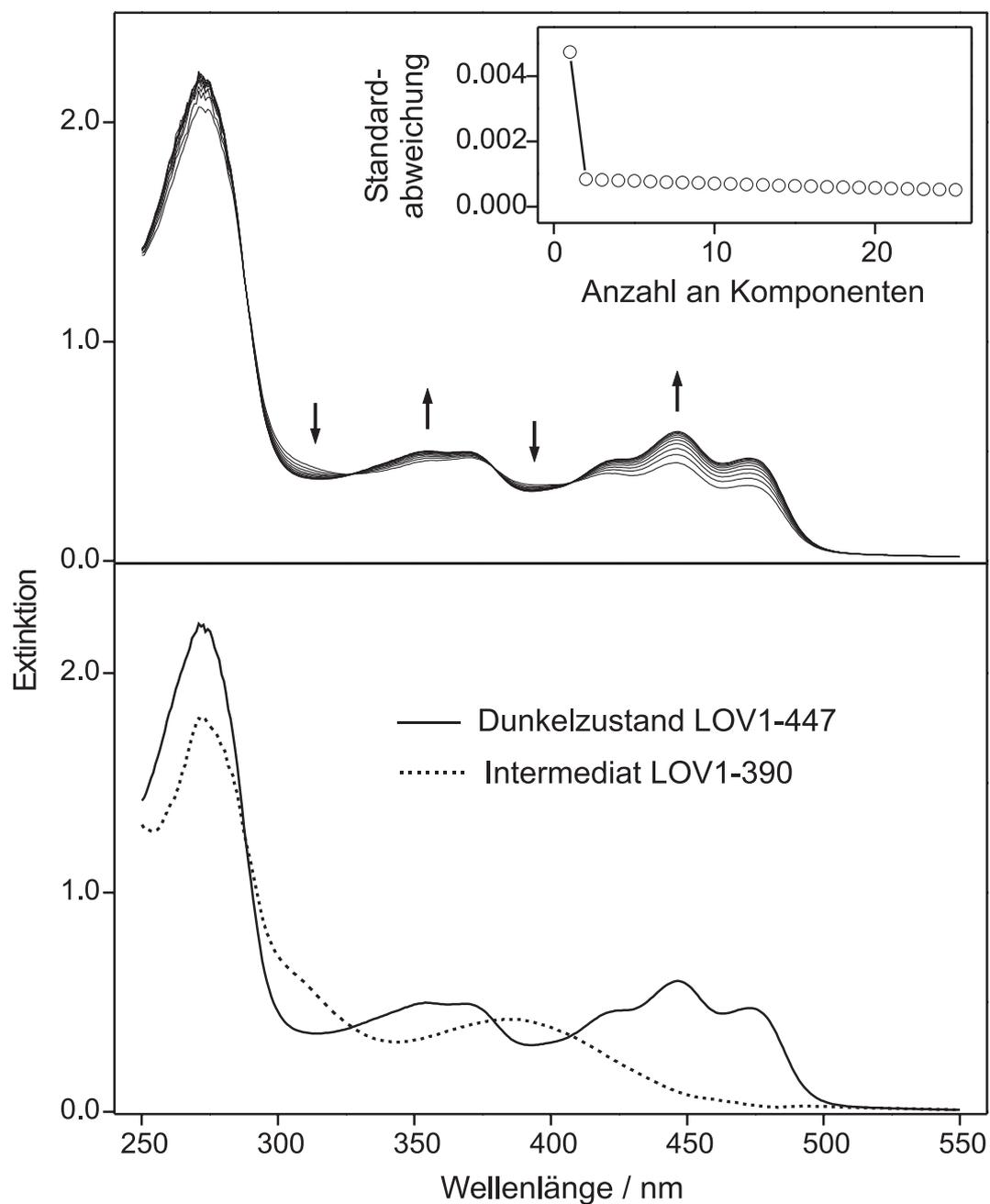


Abb. 6.2: (Oben) Sequenz von Absorptionsspektren der LOV1-Domäne nach Belichtung. Der Inset zeigt die bei der SVD-Analyse gewonnene Anzahl an relevanten Komponenten. (Unten) Das erzeugte Spektrum des Intermediats LOV1-390

In der LOV1-Domäne befinden sich drei Cysteine, von denen sich allerdings laut Kristallstruktur nur das Cystein 57 nahe genug am Flavin befindet, um das Addukt zu bilden [34]. Da weiterhin durch Mutation des Cysteins 57 zu Serin eine Adduktbildung verhindert wird (siehe Kapitel 5.2.1), kann geschlossen werden, dass das Cystein 57 die reaktive Aminosäure ist. Dies wurde später durch eine Kristallstruktur des belichteten Zustands bestätigt [34]. Dort ist zu sehen, dass die Bindungslänge zwischen Flavin-C(4a) und dem Schwefel der Thiolgruppe 1.89 Å beträgt. Das Flavin verliert seine planare Geometrie aufgrund der  $sp^3$ -Hybridisierung des C(4a). Im Vergleich zur Struktur des Dunkelzustands gibt es keine größeren Positionsänderungen im Protein. Nur die Aminosäuren Leu34, Asn56 und Arg58 in der Nähe des reaktiven Cysteins bewegen sich bei Adduktbildung.

### 6.2.3 Vergleich zu FMN und Cystein in Lösung

Um einen Vergleich mit der Reaktion im Protein vornehmen zu können, wurde die Photoreaktion des FMN mit Cystein in wässriger Lösung untersucht. Eine äquimolare Lösung beider Komponenten wurde durch 20-minütiges Einleiten von Argon von Sauerstoff befreit und in einem Phosphatpuffer bei pH 8 mit einer 50 W Wolframlampe durch einen 435 nm Kantenfilter belichtet. Die Absorption des Flavins bei 445, 373 und 267 nm nahm dabei ab. Nach langer Belichtungszeit wurde ein Produkt sichtbar, das eine Schulter im Spektrum bei 350 nm aufweist. Dies kann dem reduzierten Dihydroflavin zugeordnet werden [38], das bei diesem pH-Wert in wässriger Lösung im anionischen Zustand vorliegt. So zeigen die Spektren von mit EDTA photoreduziertem FMN denselben Verlauf bei nicht vollständiger Konversion (siehe Kapitel 8.7.2). Man erhält drei isosbestische Punkte bei 255, 289 und 337 nm, woraus geschlossen werden kann, dass keine weiteren Produkte außer dem Dihydroflavin entstehen. Ein Photoaddukt wie in der LOV-Domäne mit einer Absorption bei 390 nm wird demnach nicht gebildet, oder nur als kurzlebige Intermediat.

Bekannt ist über die Photoreaktion, dass zunächst Flavin- und Cysteinradikal gebildet werden [74], bevor das Dihydroflavin entsteht. Die Produkte der Photoreaktion mit Cystein wurden allerdings nie genauer bestimmt. So ist nur ein Literaturzitat zu finden, in dem die Autoren auf einen uneinheitlichen Re-

aktionsverlauf hinweisen [71]. Im Dunkeln bilden Thiolate mit Flavinanaloga ein Flavin C(4a) Addukt, das von einem weiteren Thiolat nukleophil attackiert wird [75]. Die Reaktionsprodukte sind hier ein reduziertes Flavin und ein Disulfid. Dieser Mechanismus lässt sich wahrscheinlich auch auf die Photoreaktion übertragen (siehe Abbildung 6.3). Allerdings ist es auch möglich, die Reaktion

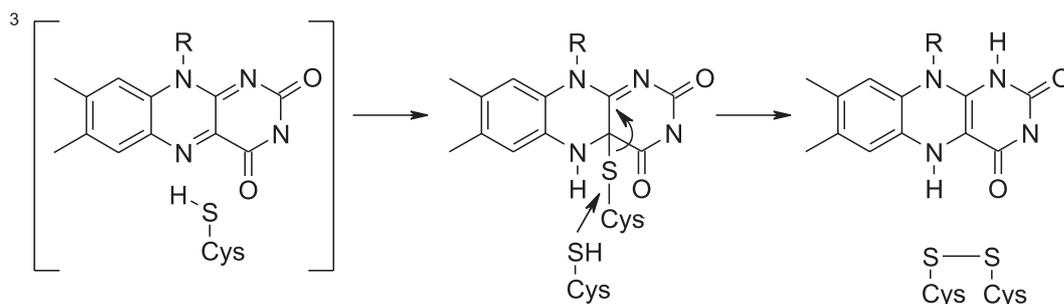


Abb. 6.3: Mechanistischer Vorschlag für die Photoreaktion von FMN und Cysteine in anaerober Lösung

ohne Adduktbildung als reine Redoxreaktion zu formulieren [76]. Ob dabei aber das Cystein decarboxyliert wird oder ein Disulfid gebildet wird, ist unklar. Für diesen Ansatz spricht, dass bisher das Addukt in dieser Photoreaktion nicht nachgewiesen werden konnte. Die Adduktbildung in der LOV-Domäne kann also nicht einfach in Lösung simuliert werden. Die Proteinumgebung fixiert nicht nur die Reaktionspartner in einer bestimmten Geometrie und schließt Nebenreaktionen aus, sondern verhindert auch den Angriff von weiteren Molekülen aus der Lösung.

# 7 Rückreaktion

## 7.1 Regenerierung eines Photorezeptors

Es lassen sich drei Konzepte für die Regenerierung eines Photorezeptors unterscheiden, die alle in der Natur verwirklicht sind. Im einfachsten Falle wird der Sensor nur einmal verwendet, nach Umwandlung durch das Licht und Signalweiterleitung muss er neu aufgebaut werden. Ein Beispiel hierfür ist der Sehprozess im menschlichen Auge, bei dem das 11-cis-Retinal nach Isomerisierung zum all-trans-Retinal aus dem Rhodopsin gelöst wird [77]. Neu synthetisiertes 11-cis-Retinal wird daraufhin wieder in das Apoprotein eingebaut. Problematisch an diesem Konzept ist die vergleichsweise lange Zeit, die die biochemische Regenerierung benötigt. Für eine gewisse Zeit ist der Rezeptor daher blind. Systeme, in denen der Photorezeptor thermisch oder photochemisch regeneriert wird, nennt man photochrom. Im Falle der photochemischen Rückreaktion liegt dabei ein bistabiler Zustand vor, der eine sehr schnelle Regenerierung des Sensors ermöglicht. Der Rezeptor wird jeweils durch ein Photon aus dem Ruhezustand in den Signalzustand und wieder zurück befördert. So konnte gezeigt werden, dass sich das Keimen von Pflanzensamen durch Infrarot-Photonen mit unterschiedlicher Wellenlänge induzieren und wieder inhibieren lässt. Verantwortlich hierfür ist das PhyB, eines der pflanzlichen Phytochrome [78]. Das dritte Konzept ist im hier beschriebenen Phot-Protein verwirklicht, dabei verläuft die Erholung des Rezeptors nach Signalerzeugung thermisch aktiviert. Der Signalzustand ist nur metastabil und reagiert je nach Aktivierungsenergie unterschiedlich schnell wieder zurück. Die Regenerierungsdauer lässt sich demnach über die Umgebung des Rezeptors variieren. Der Einfluss der Struktur des Apoproteins wie auch der Bedingungen in der Lösung auf die Rückkehrkinetik wurde daher im Detail untersucht.

## 7.2 Kinetik der thermischen Rückreaktion

Um die Rückkehrkinetik der Proben zu untersuchen, wurde nach Belichtung die Absorptionsänderung bei 475 nm aufgezeichnet (siehe Kapitel 2.2.2). Unter Standardbedingungen bei 20 °C in einem Phosphatpuffer mit pH 8 und einer 10 mM NaCl-Konzentration zeigte die LOV1-Domäne einen monoexponentiellen Verlauf der Rückreaktion mit einer Zeitkonstante von 200 s (siehe Abbildung 7.1). Misst man hintereinander mehrere Kinetiken an einer Probe,

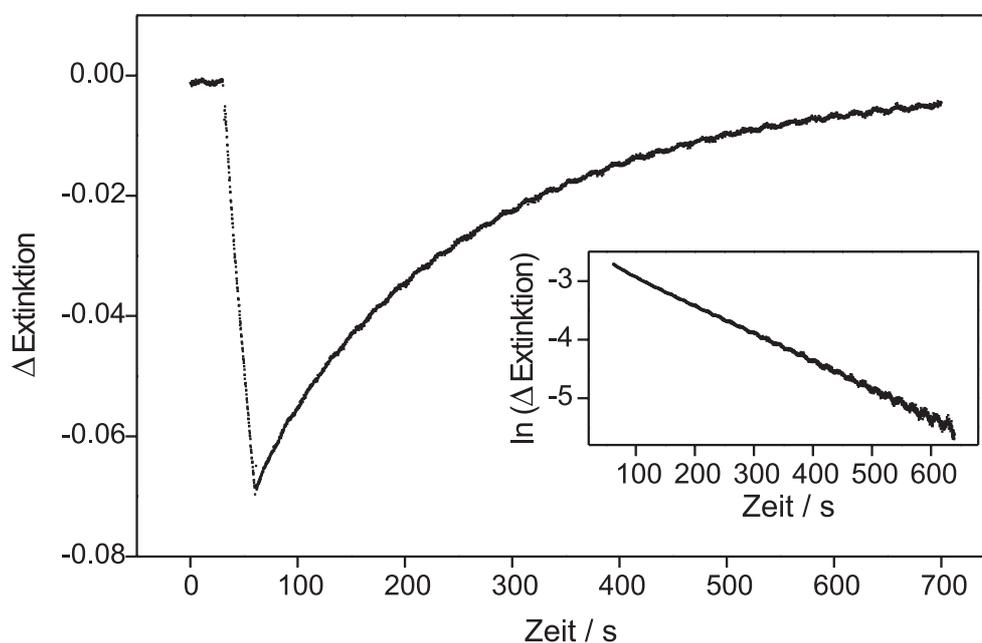


Abb. 7.1: Absorptionsänderung der LOV1-Domäne bei 475 nm unter Belichtung und bei anschließender Erholung im Dunkeln (der Inset zeigt eine logarithmische Auftragung der Rückreaktion)

so zeigen die jeweils bestimmten Zeitkonstanten eine maximale Abweichung von 3% von ihrem Mittelwert. Allerdings differiert die mittlere Zeitkonstante je nach Charge der Probe und ist demnach nicht als Absolutwert zu sehen. So zeigten andere Chargen unter identischen Bedingungen einen leicht biexponentiellen Verlauf bei neutralem und alkalischem pH-Wert, was die Interpretation und den Vergleich von Werten erschwert. In der Literatur findet sich ein Wert von 168 s, bei dem allerdings die Messbedingungen nicht angegeben sind [51].

Im Vergleich zu anderen separaten LOV1- und LOV2-Domänen der Phot-Proteine zeigt die LOV1-Domäne aus *C. reinhardtii* Phot die mit Abstand langsamste Rückkehrkinetik [51]. Dies weist auf einen strukturellen Unterschied hin. Tatsächlich zeigt ein Sequenzvergleich, dass zwei Aminosäuren, Leu34 und Thr108, in allen anderen Domänen als Ile bzw. Asp konserviert sind (siehe Abbildung 3.2). Über das Leucin/Isoleucin ist dabei bekannt, dass es sich in räumlicher Nähe zum reaktiven Cystein befindet und bei Belichtung bewegt [31, 34]. Anhand der LOV2-Domäne aus Arabidopsis Phot1 wurde gezeigt, dass eine Mutation dieses Isoleucin zu Valin die Rückkehrkinetik drastisch beschleunigt [79]. Eine Mutation des Leucin 34 in der hier untersuchten LOV1-Domäne zu Valin oder Isoleucin wurde allerdings noch nicht durchgeführt.

### 7.2.1 pH- und Salzabhängigkeit

Die Rückkehrkinetik hängt sehr stark vom pH-Wert und der Salzkonzentration der Lösung ab. In Abbildung 7.2 sind die Zeitkonstanten angegeben, die bei verschiedenen pH-Werten im Bereich von 4 bis 7 und bei Salzkonzentrationen von 10 und 90 mmol/L gemessen wurden. Dabei nimmt die Geschwindigkeit der Reaktion zu saurem pH-Wert hin stark ab. Im Bereich zwischen pH 3.8 und 5.4 führt eine Erhöhung der Salzkonzentration zu einer erheblichen Zunahme der Zeitkonstanten.

Um den Verlauf der pH-Abhängigkeit beschreiben zu können, wurde ein kinetisches Modell entworfen. Hierfür nimmt man an, dass ein Säure-Base-Paar  $BH/B^-$  einen Einfluss auf die Kinetik hat. So verläuft die Reaktion in Gegenwart der protonierten Base  $BH$  mit der Ratenkonstante  $k_1$ , wohingegen man bei Deprotonierung eine Ratenkonstante  $k_2$  beobachtet. Befinden sich beide Zustände in einem schnellen Gleichgewicht im Verhältnis zur Reaktionsgeschwindigkeit, so erhält man einen monoexponentiellen Verlauf der Rückkehrreaktion mit der sichtbaren Ratenkonstante

$$k = k_1x + k_2(1 - x), \quad (7.1)$$

wobei  $x$  die relative Besetzung der protonierten Form darstellt.

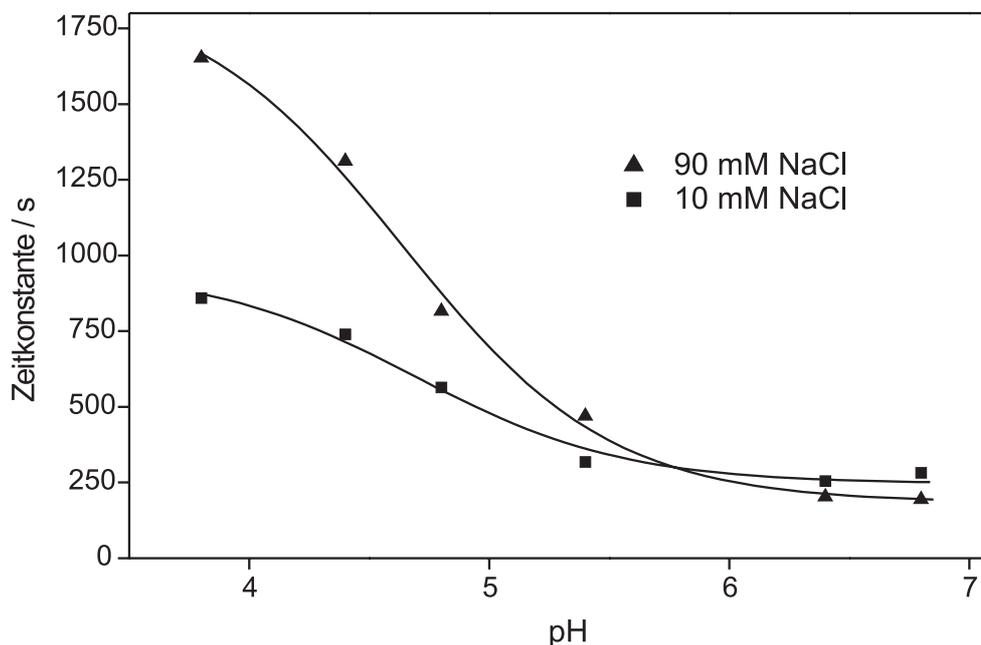


Abb. 7.2: pH- und Salzabhängigkeit der thermischen Rückreaktion

Diese steht in folgender Beziehung zum Konzentrationsverhältnis an Säure und Base:

$$\frac{[B^-]}{[BH]} = 10^{(pH-pK_a)} = \frac{1-x}{x}. \quad (7.2)$$

Setzt man nun Gleichung (7.2) in Gleichung (7.1) ein, so erhält man die Abhängigkeit der Zeitkonstante vom pH-Wert:

$$\tau = \frac{1}{k} = \frac{10^{(pH-pK_a)} + 1}{10^{(pH-pK_a)}k_2 + k_1}. \quad (7.3)$$

Passt man die Gesetzmäßigkeit von Gleichung (7.3) an die Messwerte an, so erhält man einen  $pK_a$ -Wert des Säure-Base-Paars von 5.3 bei 10 mM NaCl und 5.6 bei 90 mM NaCl. Wie in Abbildung 7.2 zu sehen ist, stimmt die Anpassungskurve gut mit den Messwerten überein, obwohl die Gleichung nur drei Parameter enthält. Die entsprechenden Grenzwerte für die Zeitkonstanten betragen 250 und 950 s bei niedriger bzw. 180 und 1900 s bei hoher Salzkonzentration. Das beteiligte Säure-Base-Paar ist auf den ersten Blick nicht leicht zu identifizieren. So

sind keine Wassermoleküle oder geladene Aminosäuren in der Nähe der Bindung zwischen Flavin C(4a) und der Cystein Thiol-Gruppe, die im sauren Bereich protoniert werden könnten [34]. Allerdings zeigt das FMN selbst einen  $pK_a$ -Wert von 6.2 an der Phosphatgruppe [39]. Diese Phosphatgruppe wiederum ist durch Wasserstoffbrückenbindungen mit Arginin 58 verknüpft, also mit der zum reaktiven Cystein benachbarten Aminosäure. In Abbildung 7.3 ist ein entsprechen-

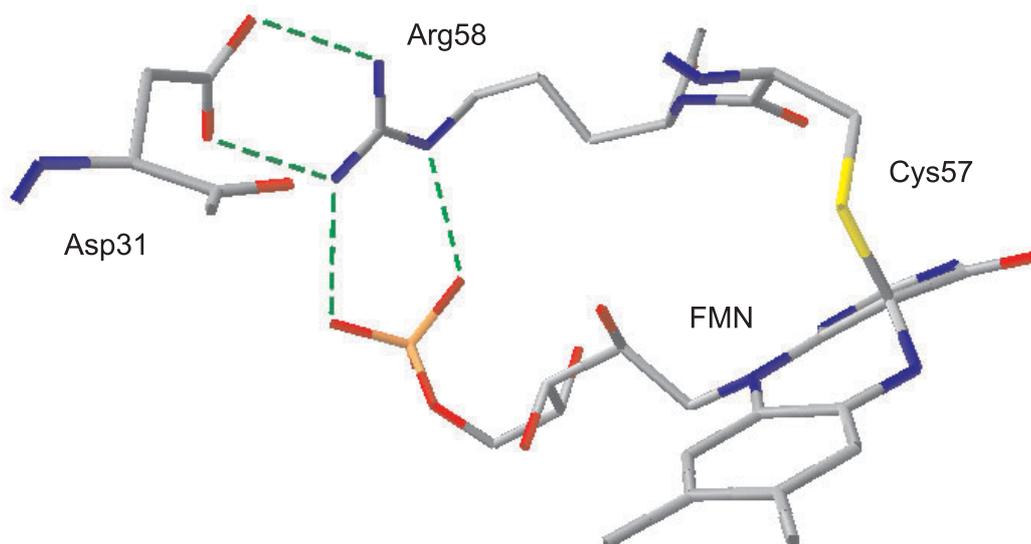


Abb. 7.3: Ausschnitt aus der Struktur der belichteten LOV1-Domäne mit Wasserstoffbrückenbindungen in grün (PDB Nr. 1N9O)

der Ausschnitt aus der Kristallstruktur des belichteten Zustands (LOV1-390) zu sehen. Dabei hat sich im Addukt eine Schleife aus FMN, Arg58 und Cys57 gebildet, die möglicherweise einen Zug auf die gebildete Bindung ausübt. Es ist nun denkbar, dass bei einem sauren pH-Wert die Wechselwirkung zwischen der Phosphatgruppe und Arginin 58 durch Protonierung geschwächt wird [34]. Dies würde die Bindung entlasten und damit eine langsamere Rückreaktion erklären. Die Lage des Phosphatrests an der Oberfläche des Proteins unterstützt diese Hypothese, da die Gruppe damit von der Lösung aus zugänglich ist. Eine Änderung des  $pK_a$ -Werts der Phosphatgruppe von 6.2 in Lösung auf 5.3 bzw. 5.6 im Protein lässt sich durch eine Änderung der Polarität des Mediums und die direkten Wechselwirkungen mit den umgebenden Aminosäuren erklären. Die Auswirkung der Natriumchlorid-Konzentration auf die Rückreaktion ist

schwierig zu erklären. Ein reiner Oberflächenladungsausgleich kann ausgeschlossen werden, da sich der Effekt bei Gesamtkonzentrationen an Ionen zwischen 100 und 200 mM zeigt, bei der die Ladungen bereits abgesättigt sein sollten. Messungen der Zeitkonstante in Abhängigkeit der Konzentration an Natriumchlorid bei pH 4.7 zeigen keine Stufe, aus der sich direkt eine Bindungsaffinität berechnen ließe. Der Effekt ist nur wenig vom Kation aber deutlich vom gewählten Anion abhängig, wobei die Auswirkung im Falle des Chloridanions am Stärksten ist. In Proteinen sind verschiedene Bindungsstellen für Chloride zu finden. So zeigt die Kristallstruktur der Chloridpumpe Halorhodopsin bei atomarer Auflösung eine direkte Wasserstoffbrückenbindung des Chlorids zu Serin [80], wohingegen in anderen Systemen unter anderem Glutamin bzw. Lysin diese Bindungen ausbilden [81, 82]. In der LOV1-Domäne weisen allerdings sowohl die vorhandenen Serine als auch Lysine aus dem Protein heraus in die Umgebung und sollten daher keinen Einfluss auf die Kinetik des Rezeptors haben. Hingegen gibt es zwei Glutamine, Glu61 und Glu120, die direkt mit dem FMN interagieren [34]. Demnach könnte eine hohe Chloridionen-Konzentration diese Wechselwirkungen schwächen und damit einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Rückreaktion nehmen. Dieser Effekt tritt allerdings nur bei sauren pH-Werten auftritt. Ist die obige Interpretation der pH-Abhängigkeit korrekt, so führt eine Protonierung der Phosphatgruppe womöglich zu einer Zugänglichkeit der Anionen zur Chromophor-Bindungstasche. Es ist allerdings zu beachten, dass hier Abhängigkeiten untersucht werden, die nicht direkt den physiologischen Bedingungen in den Kompartimenten der Algenzelle entsprechen.

### 7.2.2 Additive

Nachdem festgestellt werden konnte, dass die Geschwindigkeit der Rückreaktion durch pH und Ionenkonzentration des Mediums beeinflussbar ist, wurden die Zusätze Imidazol und Natriumazid auf ihren Einfluss hin untersucht. Zunächst wurde bei pH 7.7 eine Pufferlösung mit Imidazol schrittweise bis zu einer Endkonzentration von 10 mmol/L zugegeben. Dabei änderte sich die Zeitkonstante der Rückreaktion von 200 auf 154 s, während sich in einer Vergleichsreihe mit einer Pufferlösung ohne Imidazol die Zeitkonstante nicht wesentlich änderte. Da Imidazol bei diesem pH-Wert in seiner Neutralform vorliegt und auch bei

konstantem pH gemessen wurde, kann es sich nicht einfach um die oben beschriebenen Auswirkungen von pH oder Ionenkonzentration handeln. Imidazol ist bekannt für seine Wirkung als nukleophiler Katalysator in der Esterhydrolyse [83]. Denkbar wäre demnach ein Angriff des Imidazols auf die C(4a)-Position im Flavin-Thiol-Addukt unter Abspaltung des Thiolats. Bei einer Eliminierung des N(5)-Protons würde dann das Imidazol regeneriert werden. Es ist allerdings fraglich, ob dieses relativ sperrige Molekül an den Reaktionsort gelangen kann, auch wenn es in hoher Konzentration vorliegt.

Als weiteres Additiv wurde Natriumazid ausgewählt. In Studien zum Photozyklus der Protonenpumpe Bacteriorhodopsin wurde gezeigt, dass Azid die Reaktionszeiten beeinflusst [84] und in der Mutante D96N in Form von  $\text{HN}_3$  den natürlichen Protonendonator Asp-96 ersetzen kann [85]. Zudem wurde vorgeschlagen, dass es das Netzwerk der Wasserstoffbrückenbindungen in Mutanten des Bacteriorhodopsins verändert [86]. In der LOV1-Domäne wurde Natriumazid bei pH 7.3 bis zu einer Konzentration von 28 mmol/L zugegeben, wodurch sich die Zeitkonstante der Rückreaktion von 194 s kaum änderte. Die Zugabe einer Pufferlösung ohne Azid führte hingegen zu einer leichten Verlangsamung auf 214 s. Weitere Erhöhungen der Azidkonzentration verursachten dann ebenfalls eine leichte Verlangsamung der Rückreaktion. Demnach ist die Auswirkung des Azids auf die Rückkehrkinetik zumindest in seiner ionischen Form nur gering und bei 28 mmol/L bereits abgesättigt.

### 7.2.3 Mutanten

In dem Modell, das die pH-Abhängigkeit der Rückkehrkinetik erklären soll, spielt das Arginin 58 eine zentrale Rolle (siehe Kapitel 7.2.1). Dieses bildet Wasserstoffbrückenbindungen zum Phosphatrest des FMN und zum Aspartat 31 aus. Daher wurden eine Reihe von Mutanten erzeugt, in denen diese beiden Aminosäuren ersetzt wurden. Die gemessenen Spektren der Mutanten sind in Abbildung 4.4 abgebildet. Die Kinetiken der Rückreaktion wurden unter Standardbedingungen bestimmt und sind im Vergleich zu einer wildtypischen Probe in Abbildung 7.4 zu sehen. Zunächst wurde das Aspartat 31 gegen Glutamin (D31Q) und Asparagin (D31N) ausgetauscht. Dies führte zu einer Beschleunigung der Rückreaktion von einer Zeitkonstante von 200 s auf 137 s (D31Q) bzw.

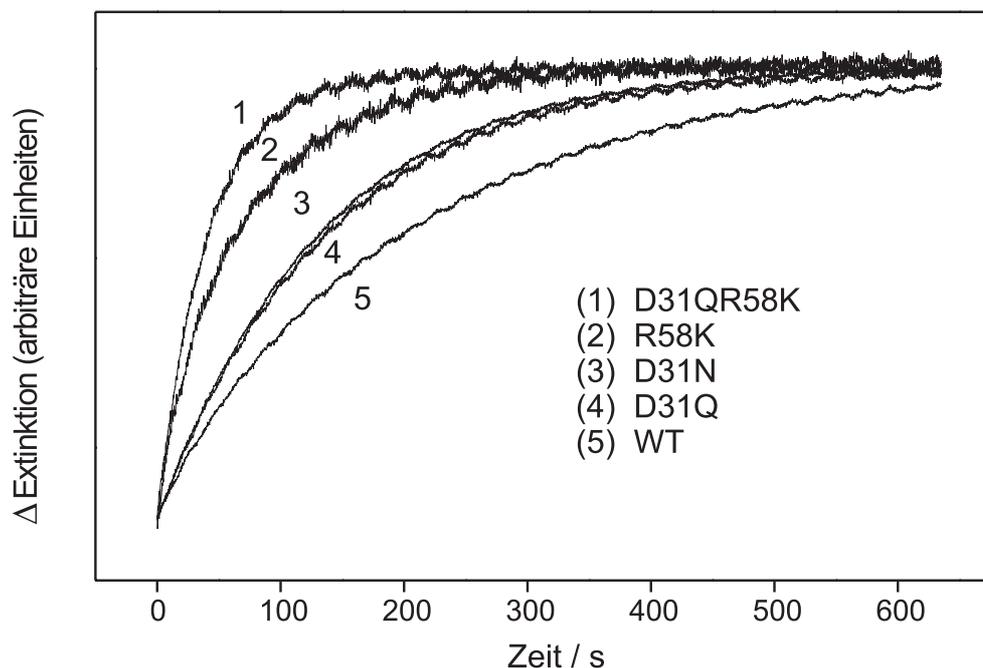


Abb. 7.4: Rückkehrkinetik verschiedener Mutanten der LOV1-Domäne im Vergleich zum Wildtyp

132 s (D31N). Die beiden Mutanten zeigten demnach eine sehr ähnliche Kinetik. Einen weitaus stärkeren Effekt beobachtete man beim Ersetzen des Arginin 58 durch Lysin (R58K). Die Rückreaktion zeigte nun eine Zeitkonstante von 73 s. Beide Effekte lassen sich kombinieren, so erhielt man bei der Doppelmutante D31QR58K eine sehr schnelle Rückreaktion mit einer Zeitkonstante von 43 s. Geht man davon aus, dass die Mutationen die Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren und dem FMN schwächen, so wäre ein ähnliches Ergebnis wie bei einer Protonierung der Phosphatgruppe zu erwarten. Die Rückreaktion der Mutanten verläuft allerdings nicht langsamer als beim Wildtyp, sondern deutlich schneller. Das Ergebnis steht dann im Widerspruch zum oben beschriebenen Modell der pH-Abhängigkeit. Allerdings muss die Mutation von Arginin 58 zu Lysin nicht zwangsläufig auch eine Schwächung der Bindungen zum Phosphat bedeuten. Im Gegenteil, es ist denkbar, dass das Lysin mit seiner endständigen, ionischen  $\text{NH}_3^+$ -Gruppe starke Bindungen zum Phosphat eingeht. Nun ist das Lysin aber um eine Einheit kürzer als das Arginin (siehe Abbildung 7.5). Wird die  $\text{NH}_3^+$ -Gruppe nun an das Phosphat herangezogen, so wird im Addukt eine

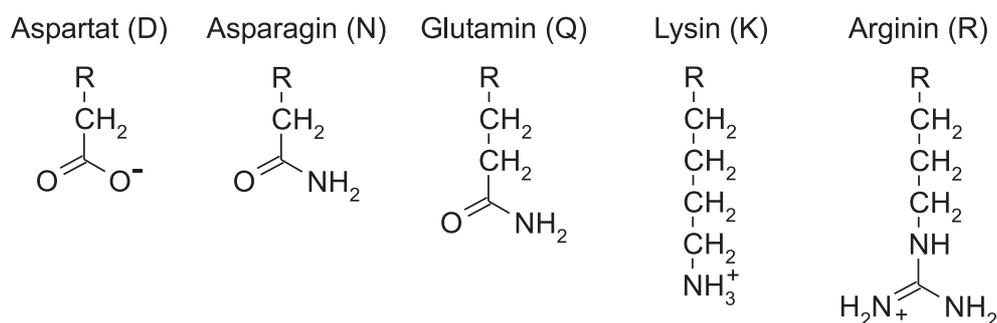


Abb. 7.5: Struktur der Seitenketten einiger Aminosäuren im Vergleich

Schleife gebildet, die noch stärker gespannt ist als im Wildtyp, wodurch sich eine schnellere Reaktion zum Dunkelzustand erklären lässt (siehe Abbildung 7.3). Entsprechend kann auch die Auswirkung der D31Q- und D31N-Mutation interpretiert werden. Hier wird die Wechselwirkung mit dem Arginin 58 geschwächt, da die Carboxylatgruppe des Aspartats durch eine Aminogruppe in Asparagin bzw. Glutamin ersetzt wird. Das Arginin 58 kann nun ein wenig näher an die Phosphatgruppe heran und erhöht damit die Spannung im Addukt. Im Einklang mit dieser Interpretation ähnelt sich das Verhalten der D31Q- und D31N-Mutanten, obwohl sie sich in der Länge um eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe unterscheiden. Würde noch eine Interaktion mit dem Arginin bestehen, so müssten die beiden Mutanten in ihrem Verhalten deutliche Unterschiede zeigen. In der Doppelmutante D31QR58K rückt dann das Lysin noch stärker an das Phosphat heran. Ob dies durch einen Verlust von ionischen Bindungen zwischen Lysin und Aspartat geschieht oder durch den größeren sterischen Anspruch des Glutamins, ist so nicht zu entscheiden. Zur Unterstützung dieser Interpretationen wäre es interessant, eine Mutante zu erzeugen, in der das Arginin 58 durch eine nicht koordinierende Aminosäure ersetzt wird. Hier wäre dann wie beim Wildtyp bei einem sauren pH-Wert eine sehr langsame Rückreaktion zu erwarten. Problematisch ist daran allerdings, dass dann auch die Einbindung des Chromophors in das Protein geschwächt wird.

In Kapitel 5.2.4 wurde die Bildungskinetik des Addukts in der W98F-Mutante untersucht. Diese unterscheidet sich nicht wesentlich von der des Wildtyps. Die Rückreaktion der W98F-Mutante zeigt eine Zeitkonstante von 126 s und ist damit deutlich schneller als im Wildtyp. Vergleichbar ist die Änderung in der

Zeitkonstante mit der in den Mutanten D31Q und D31N. Gemeinsam haben diese Mutationen, dass die ausgetauschten Aminosäuren nicht direkt, sondern nur sekundär mit dem FMN interagieren. So ist das Tryptophan 98 benachbart zum Asparagin 99, das wiederum eine Wasserstoffbrückenbindung zum O(4) des FMN ausbildet. Diese Bindung zum FMN erfolgt dabei von hinten bezogen auf das reaktive Cystein und könnte damit Einfluss auf die konformative Spannung im Addukt haben.

### 7.2.4 Mechanismus

Der Ablauf der thermischen Rückreaktion wurde nicht im Detail untersucht. Aus Studien zur LOV2-Domäne aus *A. sativa* Phot1 ist bekannt, dass die Kinetik der Rückreaktion einen Isotopeneffekt zeigt [48]. Naheliegender wäre es daher anzunehmen, dass im ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt das Proton von der N(5)-Position abstrahiert wird und daraufhin die Bindung zum Cystein gelöst wird. Allerdings befindet sich keine entsprechende Base in der Nähe des Reaktionszentrums. Eine weitere Möglichkeit ist die homolytische Spaltung der S-C(4a)-Bindung und die darauf folgende Übertragung des Wasserstoff-Radikals auf das Cysteinradikal. Dabei müsste der zweite Schritt die höhere Aktivierungsenergie aufweisen. Aus quantenmechanischen Rechnungen ergibt sich tatsächlich bevorzugt ein derartiger radikalischer Verlauf [87]. Die Tendenz der Adduktbindung zu einer homolytischen Spaltung wurde bereits experimentell anhand eines Derivats des 5-Ethyl-4a-methoxy-flavins gezeigt [88].

## 7.3 Photochemische Rückreaktion

Aufgrund der sehr langsamen Rückreaktion der LOV1-Domäne sollte es bei entsprechender Lichtintensität leicht möglich sein, sämtliche Proteine in ihren belichteten Zustand LOV1-390 zu überführen. Um dies zu untersuchen, wurde die Absorption im photostationären Zustand in Abhängigkeit der Belichtungsintensität gemessen. Als Messwellenlänge wurde 475 nm gewählt, da hier das Addukt kaum noch absorbiert. Zur Belichtung wurde eine 100 W Wolframlampe mit 435 nm Kantenfilter verwendet und die Intensität mit Hilfe von Neutralfiltern variiert. Trägt man nun die Absorptionsänderung  $\Delta A$  bezogen auf den

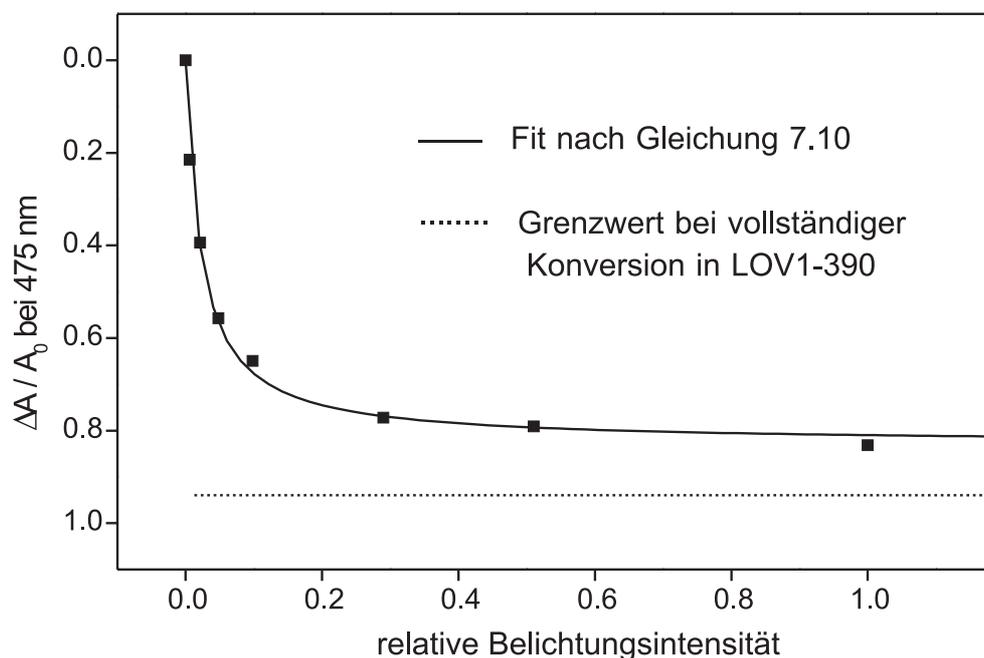


Abb. 7.6: Relative Absorptionsänderung der LOV1-Domäne unter Belichtung in Abhängigkeit der Intensität

Ausgangswert  $A_0$  bei 475 nm gegen die relative Intensität auf, so erhält man den in Abbildung 7.6 gezeigten Verlauf. Man erkennt, dass die relative Absorptionsänderung auf einen Grenzwert zuläuft, der nicht dem erwarteten Wert bei einer vollständigen Konversion in das LOV1-390 Intermediat entspricht. Bei einer rein thermisch aktivierten Rückreaktion müsste die relative Absorptionsänderung bei unendlicher Intensität größer als 0.94 sein. Dies ergibt sich aus der Annahme, dass der Extinktionskoeffizient von LOV1-390 bei 475 nm weniger als 6% von dem des Dunkelzustands beträgt, wie in Abbildung 6.1 zu erkennen ist. Eine Erklärung für die Abweichung wäre, dass neben der thermisch aktivierten Rückreaktion auch eine photoinduzierte Rückreaktion abläuft und somit eine vollständige Konversion verhindert wird.

Um den Grenzwert bei unendlicher Intensität aus einer Anpassung bestimmen zu können, wurden die folgenden Überlegungen angestellt: Der Grundzustand **1** wird photochemisch in das Intermediat **2** überführt. Für die Rückreaktion müssen sowohl ein thermischer als auch ein photoinduzierten Verlauf in Betracht

gezogen werden. Daraus lässt sich die folgende Differentialgleichung aufstellen, die das Verhältnis  $x$  zwischen der Konzentration an Intermediat  $c_2$  und der Anfangskonzentration des Dunkelzustands  $c_0$  beschreibt:

$$\frac{\partial x}{\partial t} = -(k + \alpha_2 F)x + \alpha_1 F(1 - x). \quad (7.4)$$

Dabei steht  $F$  für den Photonenfluss und  $k$  für die Geschwindigkeitskonstante der thermischen Rückreaktion. Der Koeffizient  $\alpha_1$  ergibt sich aus dem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_1(\lambda)$  des Dunkelzustands, der Quantenausbeute der Photoreaktion zum Intermediat  $\Phi_{1 \rightarrow 2}$  und der normierten Photonendichte des auftretenden Lichts  $\rho(\lambda)$  durch

$$\alpha_1 = \Phi_{1 \rightarrow 2} \int \epsilon_1(\lambda) \rho(\lambda) d\lambda. \quad (7.5)$$

Entsprechend ist  $\alpha_2$  für die photochemische Rückreaktion definiert. Im photo-stationären Zustand ist  $\partial x / \partial t = 0$ . Dann lässt sich das Verhältnis der Konzentrationen schreiben als

$$x_s = \frac{\alpha_1 F}{k + (\alpha_1 + \alpha_2) F}. \quad (7.6)$$

Die Absorption  $A'$  der Probe bei der Messwellenlänge  $\lambda'$  unter Belichtung beträgt

$$A' = c_2 \epsilon'_2 + (c_0 - c_2) \epsilon'_1 = A'_0 + c_2 (\epsilon'_2 - \epsilon'_1) \quad (7.7)$$

wobei  $A'_0$  die Absorption vor Belichtung und  $\epsilon'_1$  bzw.  $\epsilon'_2$  die Extinktionskoeffizienten bei der Messwellenlänge darstellen. Die Absorptionsänderung  $\Delta A'$  lässt dich nun mit Hilfe von Gleichung (7.6) beschreiben als

$$\Delta A' = A'_0 - A' = c_0 x_s (\epsilon'_1 - \epsilon'_2) = c_0 (\epsilon'_1 - \epsilon'_2) \frac{\alpha_1 F}{k + (\alpha_1 + \alpha_2) F} \quad (7.8)$$

Damit beträgt die relative Absorptionsänderung

$$\frac{\Delta A'}{A'_0} = \frac{\epsilon'_1 - \epsilon'_2}{\epsilon'_1} \frac{\alpha_1 F}{k + (\alpha_1 + \alpha_2) F}. \quad (7.9)$$

Mit dieser Beziehung der allgemeinen Form

$$\frac{\Delta A'}{A'_0} = \frac{RF}{a + F} \quad (7.10)$$

lassen sich nun die Messwerte in Abhängigkeit der Intensität anpassen, woraus man zwei Parameter  $R$  und  $a$  erhält. Dabei stellt  $R$  den Grenzwert dar, der durch die Auftragung bestimmt werden sollte:

$$R = \lim_{F \rightarrow \infty} \left( \frac{\Delta A'}{A'_0} \right) = \frac{1 - \epsilon'_2/\epsilon'_1}{1 + \alpha_2/\alpha_1} \quad (7.11)$$

Führt man nun die Anpassung durch, so erhält man den Wert  $R = 0.84$ . Das bedeutet, dass die Anfangsabsorption der Probe bei 475 nm von 0.37 bei Belichtung mit unendlicher Intensität um 84% und damit auf 0.06 abnehmen würde. Um nun eine quantitative Aussage über die Beteiligung einer photoinduzierten Rückreaktion zu machen, kann man aus dem Grenzwert  $R$  nach Gleichung (7.11) Wertebereiche für die Koeffizienten  $\epsilon'_i$  und  $\alpha_i$  berechnen. Nimmt man an, dass es keine photochemische Rückreaktion gibt, so ist  $\alpha_2=0$  und man erhält

$$\frac{\epsilon'_2}{\epsilon'_1} = 1 - R = 0.16 \quad (7.12)$$

Das in Abbildung 6.1 gezeigte Spektrum zeigt allerdings ein deutlich geringeres Verhältnis von  $0 \leq \epsilon'_2/\epsilon'_1 \leq 0.06$  bei 475 nm. Unter Verwendung dieses Wertebereichs erhält man nun

$$0.12 \leq \frac{\alpha_2}{\alpha_1} \leq 0.19 \quad (7.13)$$

Zusammenfassend bedeutet dies, dass es einen deutlichen Hinweis auf eine photoinduzierte Rückreaktion gibt. Da allerdings nicht mit monochromatischem Licht belichtet wurde, kann aus dem Verhältnis der Koeffizienten  $\alpha_i$  kein Rückschluss auf das Verhältnis der Quantenausbeuten von Hin- und Rückreaktion gezogen werden. Weiterhin ist noch zu klären, in welchen Zeiträumen die Rückreaktion abläuft, ob also der Bindungsbruch aus einem Singulett- oder erneut aus einem Triplettzustand heraus erfolgt. Es stellt sich natürlich die Frage nach der physiologischen Relevanz einer photochemischen Rückreaktion. Prinzipiell kann so verhindert werden, dass der Photorezeptor vollständig konvertiert

und damit bis zum Ablauf der thermischen Rückreaktion funktionsunfähig ist. Dies könnte vor allem in Situationen mit hoher Lichtintensität einen Schutzmechanismus darstellen.

## 7.4 Photozyklus des Wildtyps im Überblick

In Abbildung 7.7 ist der Photozyklus des Wildtyps der LOV1-Domäne zusammengestellt (siehe Kapitel 4-7). Nach Anregung des FMN bildet sich der Triplettzustand LOV1-715 in zwei Konformationen. Diese reagieren mit unterschiedlichen Zeitkonstanten in das Photoaddukt LOV1-390. Ein Zerfall des Triplettzustands in den Grundzustand wie in der C57S-Mutante mit  $27 \mu\text{s}$  wird nicht beobachtet. Das Addukt kann sowohl thermisch als auch photochemisch induziert wieder in den Dunkelzustand zurück reagieren.

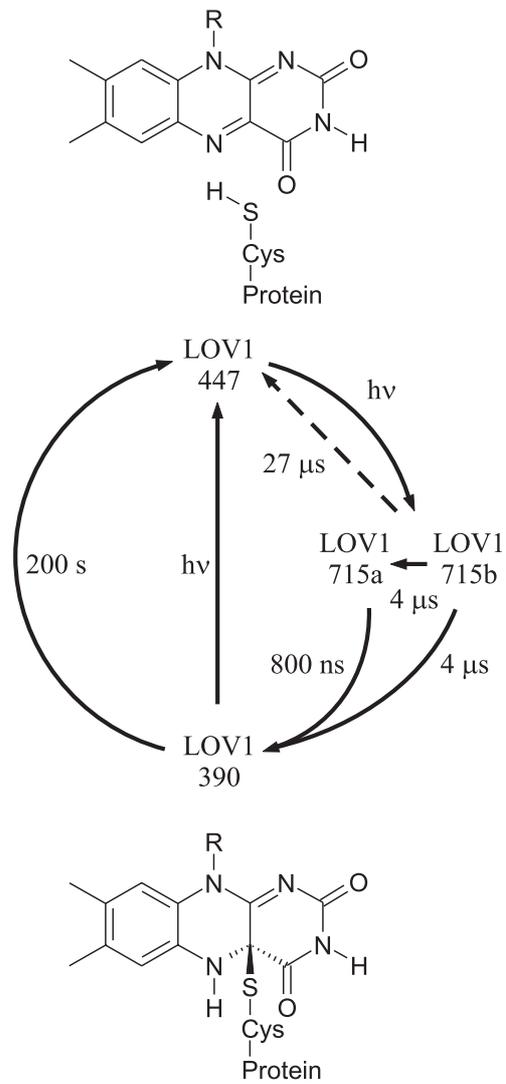


Abb. 7.7: Photozyklus des Wildtyps der LOV1-Domäne

# 8 Irreversible Photoreaktionen: Mutante LOV1-C57M

## 8.1 Ziel und Erwartungen

Das in der LOV1-Domäne gebildete Intermediat LOV1-390 ist nicht stabil. Für eine detaillierte Untersuchung wäre es erstrebenswert, eine Mutante zu generieren, in der das Addukt stark stabilisiert wird. So könnte nicht nur das Addukt genauer charakterisiert werden, es wäre auch möglich, den Signalzustand des Rezeptors „einzufrieren“ und damit zur Aufklärung der Signalweiterleitung beizutragen. Dabei bietet es sich an, das reaktive Cystein 57 zu einem Methionin zu mutieren (C57M). Bei einer dem Wildtyp entsprechenden Photoreaktion

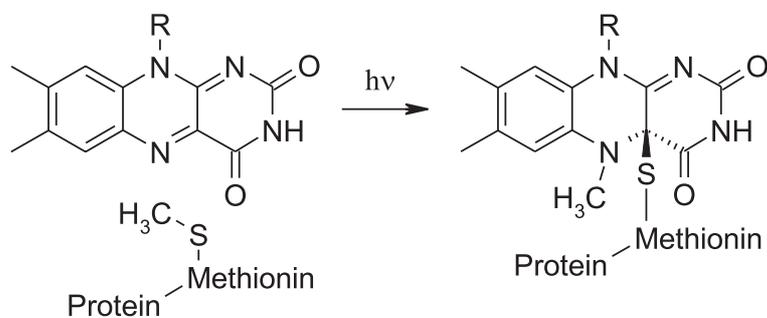


Abb. 8.1: Erwartete irreversible Photoreaktion der LOV1-C57M Mutante

würde sich ein an der N(5)-Position methyliertes Addukt bilden (siehe Abbildung 8.1). Dieses würde voraussichtlich eine höhere Stabilität aufweisen, da eine basenkatalysierte Abstraktion des N(5)-Protons nicht mehr möglich ist und eine homolytische Spaltung der N(5)-CH<sub>3</sub>-Bindung eine sehr hohe Aktivierungsbarriere aufweisen sollte. Eine derartige Reaktion würde auch Rückschlüsse auf den

Bildungsmechanismus des Addukts erlauben. Für den Wildtyp wurde ein ionischer Verlauf postuliert, bei dem im ersten Schritt das Thiol-Proton auf das Flavin übertragen wird [111]. Dieser müsste neu überdacht werden, da in der Mutante die Übertragung eines  $\text{CH}_3^+$ -Kations ohne Aktivierung des Methionins unwahrscheinlich ist. Ein Nachteil der Verwendung von Methionin ist, dass die Seitenkette der Aminosäure eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe länger ist als die des Cysteins. Dies muss bei der Interpretation berücksichtigt werden. Der Einbau eines methylierten Cysteins wäre sinnvoller, allerdings ist dies sehr aufwendig, da es sich nicht um eine natürlich vorkommende Aminosäure handelt.

## 8.2 Kraftfeldrechnungen zum Dunkelzustand

Entscheidend für eine erfolgreiche Photoreaktion der C57M-Mutante ist, dass sich die Thiomethylgruppe der Aminosäure in einem für die Reaktion geeigneten Abstand zum FMN-Chromophor befindet. Aus den Spektren des Dunkelzustands lässt sich dies nicht ableiten. So entspricht das Absorptionsspektrum der C57M-Mutante im Wesentlichen dem des Wildtyps (siehe Kapitel 4.2.2). Das Fluoreszenzspektrum der Mutante bei Anregung bei 350 nm zeigt ebenfalls keinerlei Unterschiede zu dem des Wildtyps. Eine Kristallstrukturanalyse des Dunkelzustands würde hier Aufschluss geben, ist aber für diese Fragestellung zu aufwendig. Daher wurden Kraftfeldrechnungen durchgeführt, um die Position der Thiomethylgruppe zu bestimmen. Ausgangspunkt für die Rechnungen war dabei die Kristallstruktur des Wildtyps (PDB Nr. 1N9L). Das Cystein 57 wurde mit Hilfe des Programms Swiss Pdb-Viewer Version 3.7 (GlaxoSmithKline) [89] durch Methionin ersetzt und die zehn dabei erzeugten Standardrotamere als Startgeometrien für die Energieoptimierung eingesetzt. Die Kraftfeldrechnung wurde mit dem Programmpaket Gromacs Version 3.1.4 durchgeführt [90,91]. In diesem ist das Kraftfeld Gromos 43B1 implementiert, das für Proteine im Vakuum parametrisiert ist [92]. Es wurde zunächst ein Steepest Descent Algorithmus angewandt und die resultierende Geometrie dann mit einem Conjugate Gradient Algorithmus bis auf eine Kraft  $< 0.7 \text{ kJ}/(\text{mol}\cdot\text{nm})$  optimiert. Dabei wurden dem Protein keinerlei Restriktionen von außen auferlegt, alle Aminosäuren und auch der Chromophor konnten sich frei bewegen. Um beurteilen zu können, ob

die Rechnungen sinnvolle Ergebnisse lieferten, wurde die Struktur des Wildtyps auf die gleiche Weise optimiert, wobei neun Standardrotamere des Cysteins 57 als Startgeometrien verwendet wurden.

Ausschnitte aus den optimierten Strukturen des Wildtyps und der C57M-Mutante sind in Abbildung 8.2 dargestellt. Die berechneten Energien der Konformere und die Abstände zwischen Flavin und Cystein sind in Tabelle 8.1 zusammengefasst. Die Nummerierung der als Startgeometrien verwendeten Rotamere aus dem Swiss Pdb-Viewer wurde dabei beibehalten. Betrachtet man zunächst die Strukturen des Wildtyps, so konvergierten alle Startgeometrien in zwei Konformere. Diese stimmen sehr gut mit den beiden in der Kristallstruktur des Wildtyps gefundenen Konformeren überein. Der Schwefel des Cysteins hat einen Abstand von 3.3 bzw. 4.5 Å zum C(4a)-Atom des Flavins im Vergleich zu den experimentell bestimmten 3.5 bzw. 4.5 Å [34]. Die Optimierung lieferte demnach realistische Geometrien der Konformere. Zusätzlich konnte noch der Abstand des Thiol-Protons zur N(5)-Position bestimmt werden, was durch die Kristallstrukturanalyse nicht möglich war. Sie beträgt in den beiden Konformeren 2.5 bzw. 3.4 Å, demnach befindet sich das Proton bereits in einer für die Reaktion günstigen Position.

Allerdings zeigt eine Betrachtung der Energien der Konformere des Wildtyps, dass auch bei gleicher Anordnung des Cysteins sehr unterschiedliche Gesamtenergien bestimmt wurden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die relativ kleinen Energieunterschiede zwischen den verschiedenen Rotameren des Cysteins stark überlagert werden durch sich aufsummierende Geometrieänderungen im Protein. So erfolgten bei der Optimierung im gesamten Protein kleinere Geometrieänderungen, da sich alle Aminosäuren ohne Beschränkungen frei bewegen konnten. Eine quantitative Auswertung und demnach eine Aussage über die relative Besetzung der Konformere bei Raumtemperatur ist daher nicht sinnvoll. Für den Dunkelzustand der C57M-Mutante erbrachte die Energieoptimierung sechs bevorzugte Konformere. Die Abstände zwischen Methionin und Flavin in den Konformeren betragen für S-C(4a) 3.5-4.7 Å und für CH<sub>3</sub>-N(5) 3.5-4.9 Å (siehe Tabelle 8.2). Dabei befindet sich bei zwei der sechs Konformeren (die Paare 2/7 und 4/9) die komplette Thiomethylgruppe in einer Entfernung von weniger als 4 Å vom Flavin, was eine Photoreaktion ohne weiteres ermöglichen sollte.

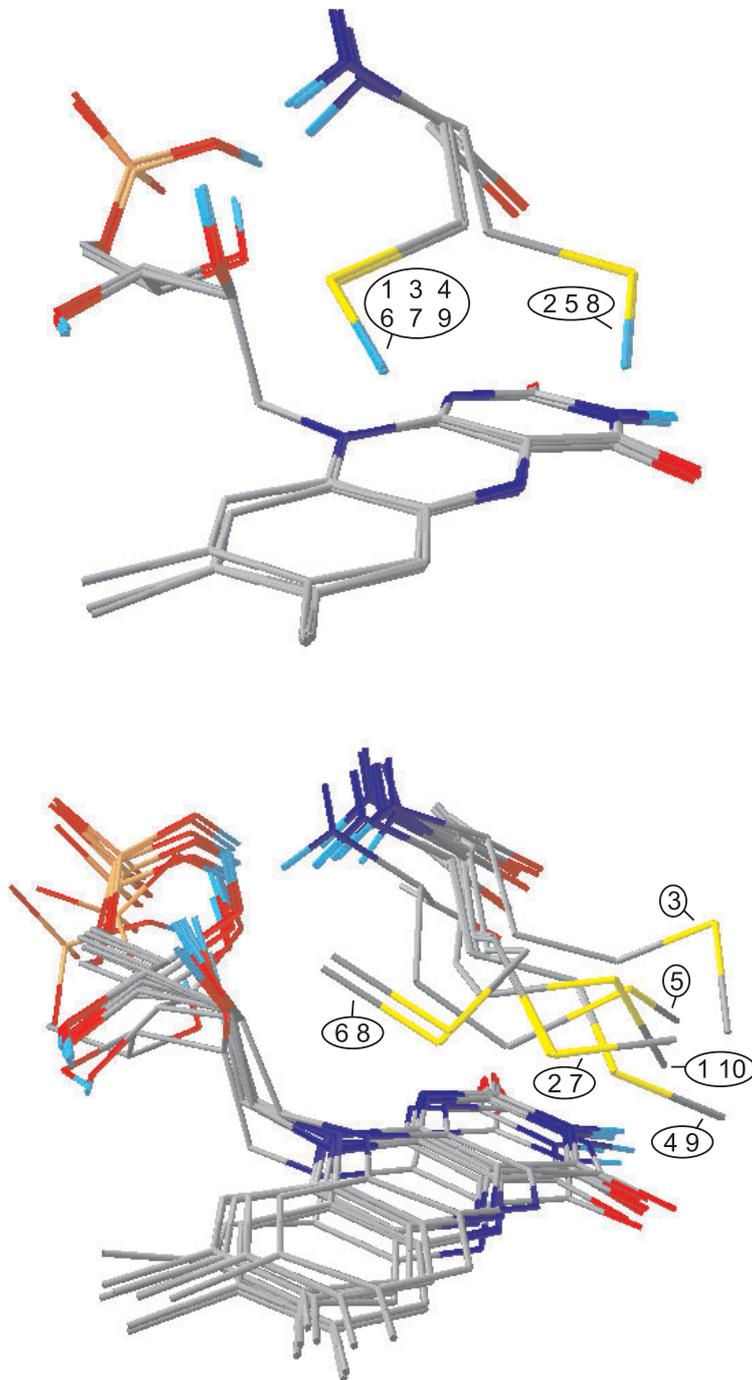


Abb. 8.2: Ausschnitte aus den mit Kraftfeldrechnung optimierten Strukturen möglicher Konformere von Wildtyp (oben) und C57M-Mutante (unten) der LOV1-Domäne

Tab. 8.1: Energien der optimierten Strukturen möglicher Konformere des Wildtyps und die Abstände zwischen Cystein und Flavin. Die Konformere wurden nach ihrer Energie geordnet, wobei die Nummerierung der Startgeometrien beibehalten wurde

Wildtyp				
Nr.	Energie (kJ/mol)	Abstand (Å)		
		S-C(4a)	H-N(5)	S-N(5)
2	-7566.2	3.34	2.52	3.20
5	-7566.3	3.36	2.54	3.18
8	-7566.3	3.34	2.52	3.20
3	-7541.5	4.52	3.42	3.93
7	-7536.7	4.52	3.42	3.93
6	-7532.7	4.50	3.41	3.92
4	-7529.4	4.59	3.49	3.98
1	-7529.3	4.59	3.49	3.98
9	-7521.7	4.56	3.48	3.96

Tab. 8.2: Energien der optimierten Strukturen möglicher Konformere der C57M-Mutante und die Abstände zwischen Methionin und Flavin

C57M-Mutante						
Nr.	Energie (kJ/mol)	Abstand (Å)				
		S-C(4a)	CH <sub>3</sub> -C(4a)	CH <sub>3</sub> -N(5)	CH <sub>2</sub> -C(4a)	CH <sub>2</sub> -N(5)
3	-7595.0	4.68	4.27	3.76	3.34	3.72
2	-7577.6	3.51	3.84	3.70	4.15	4.19
7	-7577.4	3.46	3.79	3.67	4.16	4.25
1	-7576.9	4.58	3.64	3.51	3.78	3.52
10	-7576.8	4.59	3.64	3.51	3.78	3.52
5	-7576.5	4.51	3.59	3.68	3.67	3.38
9	-7556.9	3.70	3.88	3.47	3.44	3.51
4	-7556.3	3.68	3.88	3.48	3.44	3.53
6	-7536.5	4.25	5.35	4.89	4.02	3.91
8	-7524.2	4.27	5.37	4.91	4.05	3.92

## 8.3 Untersuchung des Reaktionsablaufs

Belichtet man die LOV1-C57M Mutante mit einem Xenon-Blitz durch einen 435 nm Kantenfilter, so ändert sich das Absorptionsspektrum deutlich. In Abbildung 8.3 ist das Spektrum des Photoprodukts C57M-415 dargestellt. Es zeigt ein Maximum bei 350 nm und eine Schulter bei 415 nm und ähnelt damit dem Spektrum eines reduzierten Flavins [38]. Die Mutante ist demnach trotz Austausch des reaktiven Cysteins weiterhin photochemisch aktiv. Allerdings ist das Photoprodukt C57M-415 über längere Zeiträume nicht stabil, nach mehreren Stunden bildet sich ein Folgeprodukt, das im gesamten sichtbaren Bereich des Spektrums absorbiert. Das Photoprodukt C57M-415 konnte daher nicht rein isoliert werden, im abgebildeten Spektrum wurden geringe Anteile des Folgeprodukts durch Subtraktion entfernt. Das Folgeprodukt C57M-675 zeigt zwei Absorptionsmaxima bei 675 und 625 nm im roten spektralen Bereich und drei Maxima im blauen Bereich bei 450, 370 und 320 nm (siehe Abbildung 8.3). Um eine vollständige Konversion zu erreichen, wurde die Probe für 60 h bei 40 °C aufbewahrt.

Die Effizienz der Photoreaktion wurde im direkten Vergleich zu einer wildtypischen Probe untersucht. Dabei wurde die Abnahme der Absorption des Dunkelzustands bei 475 nm nach Belichtung mit dem Xenon-Blitz durch einen 435 nm Kantenfilter gemessen. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurden Temperatur (20 °C), pH (7.7), Volumen (350  $\mu$ L), Konzentration (OD 0.5) und Schichtdicke (1 cm) bei beiden Proben identisch gewählt. Geht man davon aus, dass der Chromophor FMN im Wildtyp und in der Mutante den gleichen Absorptionskoeffizienten zeigt, so ist die Absorptionsänderung bei Belichtung der Quantenausbeute der Photoreaktion proportional. Da im Wildtyp das gebildete Addukt zurückreagiert, wurde die Absorptionsänderung unmittelbar nach Belichtung aus einer Anpassung an die Rückkehrkinetik berechnet. Auf diese Weise wurde festgestellt, dass die Mutante C57M ein um den Faktor 10 verringertes Ausbleichen bei Belichtung zeigt. Die Photoreaktion ist demnach deutlich weniger effizient als im Wildtyp.

Betrachtet man nun die Kinetik der thermischen Folgereaktion in der Mutante, so lässt sich die Bildung des C57M-675 anhand der Absorption bei 675 nm verfolgen.

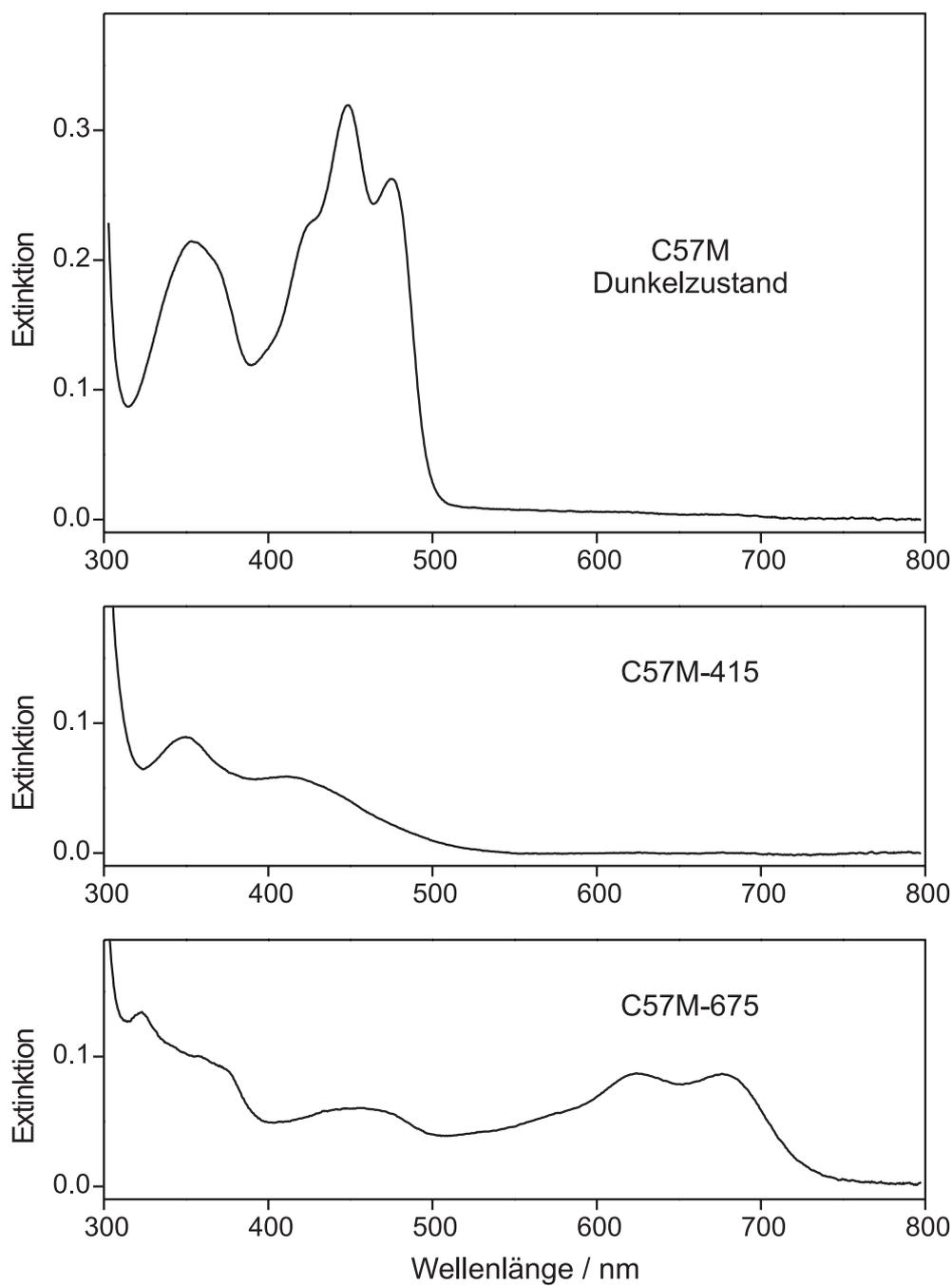


Abb. 8.3: Absorptionsspektren zum Reaktionsablauf der LOV1-C57M-Mutante. Abgebildet sind der Dunkelzustand (oben), das Photoprodukt C57M-415 (Mitte) und das Folgeprodukt C57M-675 (unten).

Das Folgeprodukt bildet sich demnach mit einer Zeitkonstante von 4 h bei 40 °C. Bei einer genaueren Betrachtung ist ein biexponentieller Verlauf erkennbar mit einer zweiten Zeitkonstante von 1 min und einem sehr geringen Anteil von 0.3%. C57M-675 ist das Endprodukt der Reaktion und ist selbst unter aeroben Bedingungen über mehrere Monate hinweg stabil.

Um Informationen für die Identifizierung der Reaktionsprodukte zu bekommen, wurde der Ablauf der Photoreaktion mit Hilfe der Massenspektrometrie untersucht. Da eine direkte Messung der Probe in Gegenwart von Puffersalzen nicht möglich ist, wurde sie vor der Einspritzung gegen Wasser dialysiert. Daraufhin wurden Teile der Probe in das Photoprodukt und das Folgeprodukt wie oben beschrieben umgesetzt, wobei das Photoprodukt erst unmittelbar vor der Messung aus dem Dunkelzustand erzeugt wurde. Die erfolgte Umsetzung wurde durch Aufnahme von Absorptionsspektren kontrolliert. Die Proben wurden mit einer 1:1 Mischung aus Methanol und Wasser mit 0.5% Anteil an Essigsäure auf 5-20 pmol/ $\mu$ L verdünnt. Die Messungen wurden an einem Single-Quadrupol-Massenspektrometer (SSQ7000, Thermo Finnigan) im Elektrospray-Modus durchgeführt (zu den Messbedingungen siehe [93]). Die Elektrospray-Methode erzeugt dabei mehrfach geladene Proteinionen. Die erhaltenen Massenspektren zeigen daher eine Serie von Signalen, die zu den verschiedenen  $m/z$ -Werten gehören, wobei sich benachbarte Signale jeweils um eine Ladung unterscheiden. Daraus lässt sich durch eine Dekonvolution die Molekülmasse des Proteins berechnen. Die entsprechend erzeugten Massenspektren des Dunkelzustands, von C57M-415 und von C57M-675 sind in Abbildung 8.4 dargestellt.

Das Spektrum des Dunkelzustands zeigt das intensivste Signal bei einer Masse von 14959 Da. Dies stimmt sehr gut mit der berechneten Masse des Apoproteins von 14963.0 g/mol überein. Da unter den Messbedingungen das Protein denaturiert, wird der Chromophor herausgelöst. Tatsächlich zeigt sich ein schwaches Signal bei 457.1 Da, das dem protonierten FMN entspricht. Die meisten Signale werden von zwei Satelliten mit 76 und 98 zusätzlichen Einheiten begleitet. Diese können auf eine Anlagerung von Natrium- bzw. Phosphationen an das Protein zurückgeführt werden. Das Spektrum des Photoprodukts C57M-415 zeigt ein dem Dunkelzustand entsprechendes Signal bei 14962 Da, das wohl auf eine unvollständige Umsetzung hinweist. Das Hauptsignal allerdings verschiebt sich durch die Belichtung der Probe um 460 Einheiten auf 15419 Da. Da das

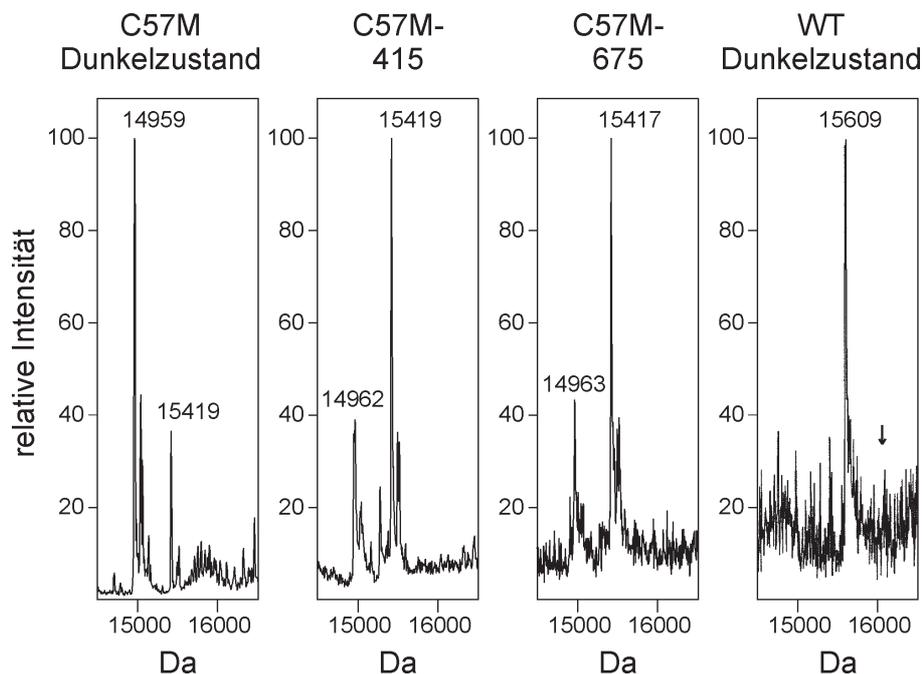


Abb. 8.4: Dekonvolvierte ESI-Massenspektren zu C57M-Mutante und Wildtyp. Die Spektren der Mutante zeigen eine kovalente Bindung zwischen Apoprotein und FMN nach Belichtung (Verschiebung um 460 Da). Im Wildtyp-Spektrum fehlt dieses Signal (mit einem Pfeil markiert)

FMN gerade eine Masse von 456 g/mol aufweist, ist dies ein starker Hinweis auf eine kovalente Bindung zwischen dem Chromophor und dem Apoprotein in C57M-415. Ein Signal für den Chromophor bei 457 Da wurde entsprechend nicht gefunden. Nach Umsetzung der Probe zum C57M-675 erhält man ein weitgehend identisches Massenspektrum mit einem Hauptsignal bei 15417 Da. Dies bedeutet, dass die Reaktion von C57M-415 nach C57M-675 trotz der drastischen Änderung im Absorptionsspektrum keine Auswirkung auf das Massenspektrum hat. Der Chromophor ist demnach auch in C57M-675 weiterhin an das Protein gebunden. Um zu zeigen, dass die Verschiebung der Signale nicht nur durch eine unvollständige Denaturierung verursacht wird und damit ein Artefakt der Messmethode ist, wurde der Dunkelzustand des Wildtyps auf die gleiche Weise untersucht (siehe Abbildung 8.4). Das Spektrum zeigt nur ein Signal bei einer Masse von 15609 Da. Dies liegt um 130 Einheiten unter der berechneten Masse des Apoproteins von 15739 g/mol, was auf eine Abtrennung des N-terminalen

Methionins hinweist. Die Apoproteine von Wildtyp und Mutante unterscheiden sich in ihrer Masse, da unterschiedliche Vektoren für die Herstellung verwendet wurden. Entscheidend ist aber, dass im Spektrum des Wildtyps kein weiteres Signal zu finden ist. Insbesondere fehlt ein Signal mit einer dem Addukt entsprechenden Verschiebung von 460 Einheiten, dessen erwartete Position in der Abbildung mit einem Pfeil markiert wurde. Das zweite Signal im Spektrum des Dunkelzustands der C57M-Mutante bei 15419 Da ist demnach darauf zurückzuführen, dass die Probe während der Herstellung bereits schwachem Licht ausgesetzt war.

Betrachtet man die Massenspektren der C57M-Mutante vor der Dekonvolution, so fällt auf, dass bei Messungen des Dunkelzustands eine bimodale Verteilung der geladenen Proteinionen auftritt. In den Produkten C57M-415 und C57M-675 hingegen zeigt sich eine monomodale Verteilung, bei der nur noch die geringer geladenen Ionen beitragen. Es ist bekannt, dass bei der ESI-Massenspektrometrie aus der Form der Verteilung auf die tertiäre Struktur des Proteins zurückgeschlossen werden kann [94]. So erzeugen denaturierte, entfaltete Proteine höhergeladene Ionen, wohingegen bei nativen Proteinen die geringer geladenen Ionen dominieren. Im Falle der C57M-Mutante gibt dies einen Hinweis darauf, dass bei kovalent gebundenem Chromophor die Entfaltung des Proteins unter den sauren Messbedingungen behindert wird.

Alle Proben wurden vor den Messungen gegen Wasser dialysiert, um den Phosphatpuffer zu entfernen. Dies ist problematisch, da das Protein bei der Dialyse leicht ausfällt. Daher wurden Messungen in einem 5 mM Ammoniumacetat-Puffer pH 8 mit 50% Methanol durchgeführt. Dies ermöglichte zwar direkte Messungen in Gegenwart des Puffers, führte aber leider auch zu einer starken Verringerung der Signalintensität. Als Alternative wäre eine Messung mit vorheriger chromatographischer Auftrennung denkbar (Liquid Chromatography and Mass Spectrometry LC-MS). Dies wurde allerdings nicht durchgeführt, da hier ein Spektrum nicht mehr die ganze Probe repräsentiert.

## 8.4 Intermediat C57M-415

Aus dem Massenspektrum des Intermediats C57M-415 kann geschlossen werden, dass sich in der Photoreaktion wie erwartet eine kovalente Bindung zwischen Chromophor und Apoprotein gebildet hat. Das Absorptionsspektrum mit seinem Maximum bei 350 nm und seiner Schulter bei 415 nm erlaubt Rückschlüsse auf die Art der Verknüpfung. Wie in Abbildung 8.3 gezeigt, ähnelt es nur eingeschränkt dem Adduktspektrum des Wildtyps. Dieses zeigt nur eine Absorptionsbande bei 390 nm, die für ein Flavin C(4a)-Thiol-Addukt charakteristisch ist. Hingegen spricht die Absorptionsbande des C57M-415 bei 350 nm eher für das Vorliegen einer N(5)- oder C(4a)-Alkylierung des Flavins [95]. Allerdings ist in den vergleichbaren, synthetisierten Addukten keine weitere Absorption bei 415 nm zu erkennen. In reduzierten Flavinen weist eine Absorptionsbande über 400 nm auf eine koplanare Geometrie des Flavins hin [96] und ist ein Maß für die  $sp^2$ -Hybridisierung des N(5) [97]. In einem C(4a)-alkylierten Addukt ist aufgrund der  $sp^3$ -Hybridisierung des N(5) demnach keine Absorption über 400 nm zu erwarten. Dies gilt ebenfalls für die N(5)-alkylierten Addukte, da diese eine sogenannte Schmetterlings-Konformation einnehmen, bei der das Flavin um die N(5)-N(10)-Achse geknickt vorliegt. Dabei wird grundsätzlich das stabilere Tautomer gebildet, bei dem sich das Proton nicht an C(4a), sondern an N(1) befindet.

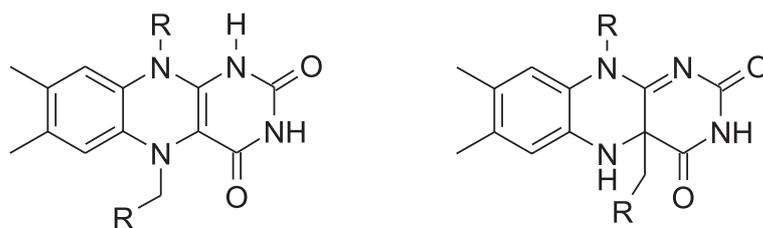


Abb. 8.5: Strukturvorschläge für das Intermediat C57M-415 im Vergleich: N(5)-alkyliertes und C(4a)-alkyliertes Addukt

Das Absorptionsspektrum des C57M-415 weist demnach darauf hin, dass es sich hierbei zwar um ein N(5)-alkyliertes Addukt handelt (siehe Abbildung 8.5), dieses aber nicht geknickt, sondern in einer koplanaren Geometrie vorliegt. Es ist vorstellbar, dass diese koplanare Geometrie durch die Proteinumgebung erzwan-

gen wird, da die langen Substituenten an N(5) wie auch an N(10) nicht frei beweglich sind. Das Proton muss sich dabei trotz der Wasserstoffbrückenbindung zu Glutamin 61 an der N(1)-Position befinden, da sonst keine planare Anordnung möglich ist. Die Analyse des Spektrums genügt allerdings nicht, um eine sichere Aussage über die Struktur zu machen, auch kann die zusätzliche Anwesenheit von C(4a)-alkyliertem Addukt nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde zunächst das Folgeprodukt C57M-675 genauer untersucht.

## 8.5 Produkt C57M-675

### 8.5.1 Radikalischer Charakter

Das Absorptionsspektrum des Reaktionsprodukts C57M-675 zeigt eine ungewöhnliche Bande im roten Bereich des Spektrums mit Maxima bei 625 und 675 nm. Es ähnelt damit dem in Abbildung 5.1 gezeigten Spektrum des angeregten Triplettzustands des FMN. Allerdings schließt die lange Lebensdauer von C57M-675 diese Zuordnung aus. Auch Charge-Transfer-Komplexe des Flavins können zu einer Absorption in diesem Bereich des Spektrums führen. Diese zeigen jedoch eine breite Bande ohne Feinstruktur im Gegensatz zum Spektrum des C57M-675 [46]. Weitaus größer ist die Übereinstimmung der Spektren bei einem Vergleich mit der Neutralform eines Flavoproteinradikals [37]. Um einen direkten Vergleich zu haben, wurde ein entsprechendes Radikal durch Photo-reduktion mit EDTA in der LOV1-Domäne generiert. Diese Umsetzung ist in Kapitel 8.7.1 im Detail beschrieben. Als Ergebnis erhält man das charakteristische Spektrum eines Neutralradikals in einem Flavoprotein mit Maxima bei 570 und 610 nm. Eine Rotverschiebung von 65 nm zum C57M-675 lässt sich demnach nicht einfach durch den Einfluss des LOV1-Apoproteins erklären. Allerdings zeigt die Massenspektrometrie eine kovalente Verknüpfung zwischen Chromophor und Apoprotein in C57M-675. Gemäß dem Absorptionsspektrum des C57M-415 erfolgt diese vermutlich an der N(5)-Position. Tatsächlich zeigen N(5)-alkylierte Flavinradikale in unpolarer Lösung eine um 20 nm rotverschobene Absorption [98, 99] gegenüber den unsubstituierten Neutralradikalen [96]. Weiterhin ist die Übereinstimmung der Spektren mit C57M-675 auch im übrigen spektralen Bereich groß. Das Spektrum des C57M-675 weist demnach darauf

hin, dass es sich hierbei um ein N(5)-alkyliertes Neutralradikal des Flavins handelt. Um diese Interpretation zu belegen, wurde das Reaktionsprodukt mit Hilfe der Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) und Elektron-Kern-Doppelresonanz-Spektroskopie (ENDOR) untersucht [100]. In dieser Studie wurde gezeigt, dass es sich tatsächlich um ein Neutralradikal des Flavins handelt. Aus der Analyse der Hyperfeinkopplung wurde geschlossen, dass dieses Radikal an der N(5)-Position entweder eine CH<sub>2</sub>- oder eine CH-Gruppe trägt.

### 8.5.2 Kovalente Bindung zum Apoprotein

Die postulierte kovalente Bindung in C57M-675 sollte es weitgehend unmöglich machen, Apoprotein und Chromophor voneinander zu trennen. Denaturiert man das Protein und fällt es danach aus, so müsste sich der Chromophor im Rückstand befinden. C57M-675 wurde demnach mit 1% Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und in 90% Aceton gefällt. Zum Vergleich wurde dieselbe Prozedur mit einer Wildtyp-Probe durchgeführt. Nach Zentrifugation wurden Absorptionsspektren der Überstände aufgenommen. Es zeigte sich, dass in der Wildtyp-Probe FMN in geringer Menge nachgewiesen werden kann, wohingegen bei C57M-675 keinerlei Absorption zu erkennen ist. Führt man das Experiment mit 10% Trichloressigsäure (TCA) anstatt Aceton durch, so zeigen beide Proben eine Absorptionsbande bei 380 nm mit einer Schulter bei 450 nm. Dies lässt sich bei diesem sauren pH-Wert auf ein teilweise protoniertes FMN zurückführen. Zum Nachweis des FMN wurde eine Dünnschichtchromatographie mit 1-Butanol, Eisessig, Wasser (4:1:5) als Laufmittel durchgeführt. Dabei zeigte sich eine Übereinstimmung des R<sub>F</sub>-Wertes von 0.16 der Proben mit FMN in 10% TCA. Die Fällung in Aceton weist demnach auf eine kovalente Bindung in C57M-675 hin, wohingegen diese Bindung wohl unter den sehr sauren Bedingungen der TCA-Fällung gebrochen wird. Es ist vorstellbar, dass das Radikal protoniert wird und das gebildete Radikalkation unter Oxidation und Hydrolyse dealkyliert [95].

Da die Fällungen zu keinem klaren Ergebnis führten, wurde stattdessen zur Abtrennung des Chromophors eine massenselektive Ultrafiltration durchgeführt. Hierzu wurden die Proben unter Verwendung eines Filters mit einer Trenngrenze von 10 kDa (Millipore Centricon YM-10) bei 5000 g zentrifugiert.

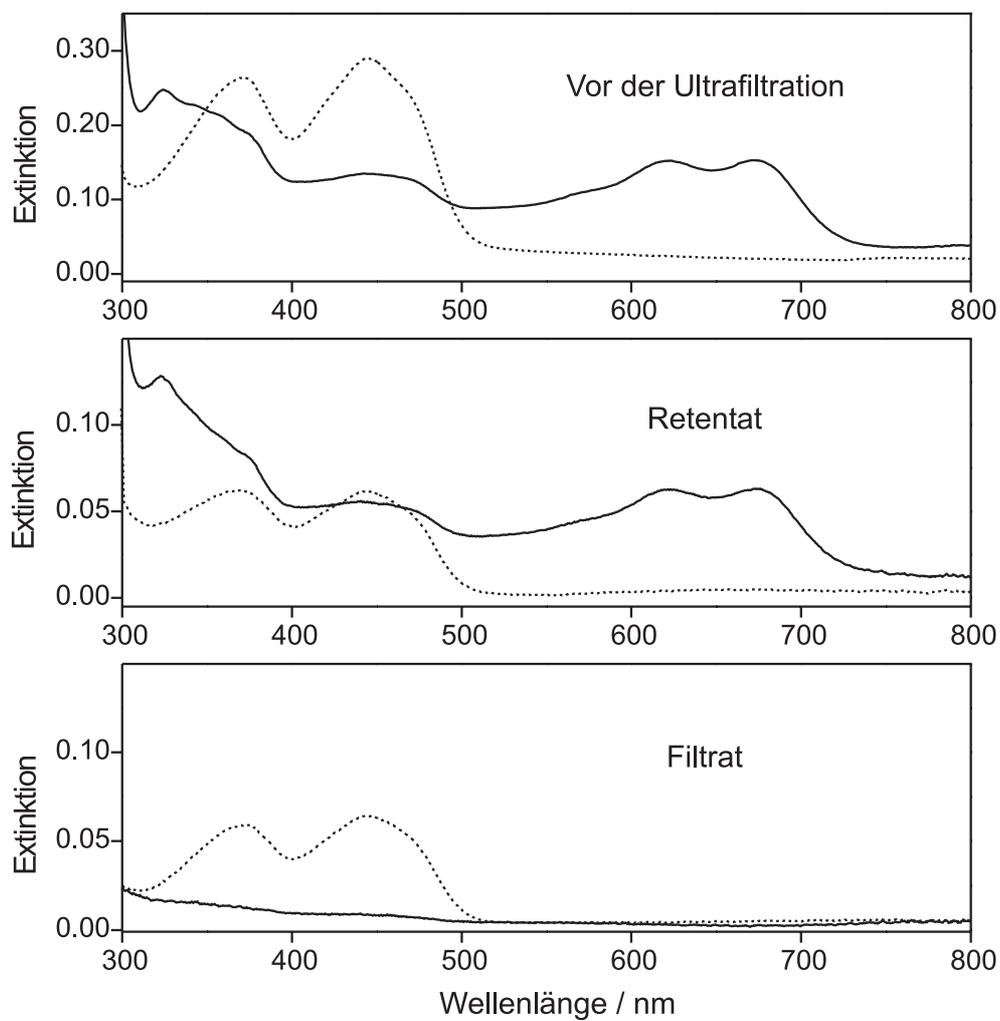


Abb. 8.6: Absorptionsspektren denaturierter Proben von C57M-675 (—) und Wildtyp (···) vor und nach der Ultrafiltration zur Abtrennung des Chromophors

Die Filtration wurde gestoppt, sobald 40% des Gesamtvolumens den Filter passiert hatten. Das Retentat und das Filtrat wurden verdünnt und mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie untersucht. Abbildung 8.6 zeigt die Spektren der Proben in 1% SDS vor und nach der Filtration. Beim Wildtyp erkennt man das Spektrum des durch die Denaturierung freigesetzten Flavins. Bei der Filtration passiert ein Teil des Flavins die Membran und ist im Filtrat nachweisbar. Bei C57M-675 hingegen ist im Filtrat keinerlei Absorption zu erkennen. Dies bedeutet, dass durch die kovalente Anbindung des Chromophors auch unter denaturierenden Bedingungen eine Abtrennung nicht möglich ist.

Sowohl die ESR- und ENDOR-Spektroskopie als auch die Absorptionsspektroskopie an C57M-675 ergaben nicht genug Informationen, um die Art der Verknüpfung zwischen FMN und Methionin zu bestimmen. Insbesondere blieb unklar, an welcher Position sich der Schwefel des Methionins befindet. Daher wurde eine Kristallstrukturbestimmung von C57M-675 mit einer Auflösung von 2.1 Å durchgeführt [93]. Es konnte gezeigt werden, dass tatsächlich eine Alkylierung an der N(5)-Position des Flavins stattgefunden hat. Das Methionin bleibt dabei vollständig erhalten, die Reaktion geht demnach im Unterschied zum Wildtyp nicht vom Schwefel sondern von der terminalen Methylgruppe aus. Diese entscheidende Information lässt nun eine Zuordnung sowohl des Endprodukts C57M-675 als auch des Photoprodukts C57M-415 zu. So bildet sich wie in Abbildung 8.7 gezeigt nach Anregung ein N(5)-alkyliertes Addukt von Flavin und Methionin. Dieses wird dann vermutlich durch Sauerstoff oxidiert und bildet das stabile Endprodukt C57M-675. Dieser Reaktionsweg ist im Einklang mit allen geschilderten, experimentellen Befunden. So lässt sich damit auch erklären, warum die beiden Reaktionsprodukte im Massenspektrum im Rahmen der Auflösung ein gleiches Signal zeigen. Es ist anzunehmen, dass die Photoreaktion wie im Wildtyp über den angeregten Triplettzustand des Flavins verläuft. Eine detaillierte Diskussion zum Bildungsmechanismus des Addukts in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp wird in Kapitel 9 vorgestellt.

Die Kristallstruktur von C57M-675 erlaubt aber nicht nur eine Zuordnung des Reaktionsprodukts, sondern liefert auch Informationen über Änderungen der Konformation des Proteins bei der Reaktion [93]. So zeigt sich, dass das Rückgrat des Proteins in C57M-675 und im Dunkelzustand des Wildtyps nahezu identisch ist. Nur die Seitenketten von Lysin 34 und Glutamin 120 sind verscho-

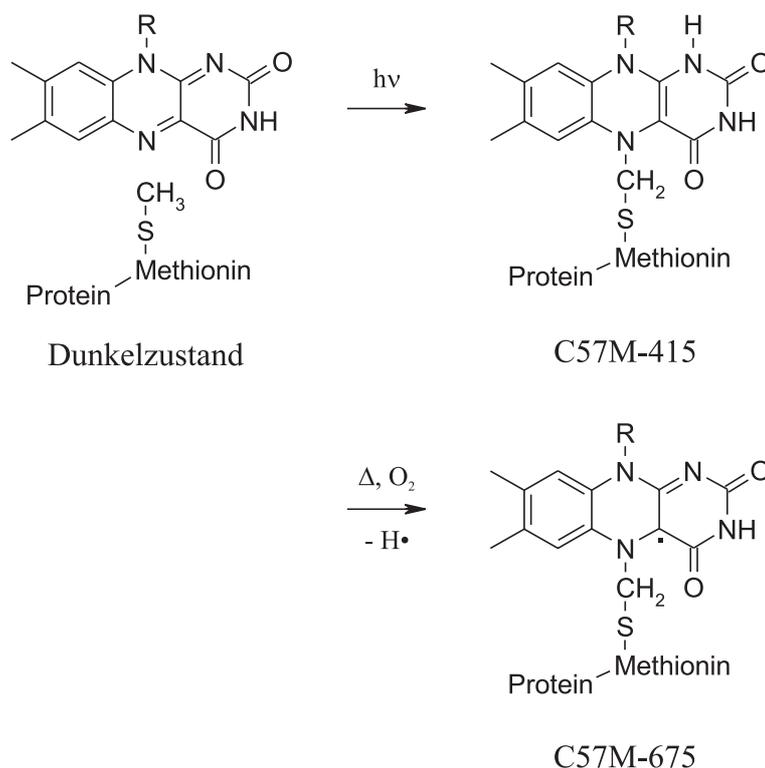


Abb. 8.7: Schrittweiser Verlauf der Photoreaktion der C57M-Mutante mit Bildung eines N(5)-Addukts und eines Flavinradikals

ben, um einen engen Kontakt mit dem Methionin zu vermeiden. Das Methionin selbst ist nicht in einer gespannten Konformation. Angesichts der geringen Änderungen in der Tertiärstruktur kann davon ausgegangen werden, dass in C57M-675 nicht der Signalzustand des Proteins vorliegt. Die Verlängerung der Verknüpfung zum Protein um zwei  $\text{CH}_2$ -Gruppen im Addukt der Mutante im Vergleich zum Wildtyp gewährleistet eine Photoreaktion ohne größere Auswirkungen auf die Umgebung.

### 8.5.3 Stabilität

Das Radikal C57M-675 zeigt eine ungewöhnlich hohe Stabilität in aerober Umgebung. So ist es noch nach 18 Monaten bei 4 °C unverändert. Selbst durch Einleiten von Sauerstoff in die Lösung wird das Radikal nicht oxidiert. Denaturierende Bedingungen wie 1% SDS führen ebenfalls nicht zu einem Verlust

der typischen Absorption des Radikals, wie in Abbildung 8.6 zu sehen ist. Noch nicht einmal die Feinstruktur in der Bande um 650 nm geht verloren, was bei einer vollständigen Denaturierung zu erwarten wäre. So zeigen N(5)-alkylierte Flavinradikale in Wasser nur ein breites Absorptionsmaximum bei 580 nm [98]. Daher wurden verschiedene weitere Denaturierungsbedingungen getestet. Die Gegenwart von 8 M Harnstoff führte nicht zu einer Änderung in der Bandenstruktur des C57M-675, wohingegen die C57M-Mutante im Dunkelzustand nach einigen Stunden denaturierte. Bei einer schrittweisen Zugabe von TCA bis auf 15 mmol/L verschwand nach und nach die Absorption des Radikals unter Bildung von FMN wie bereits bei den Fällungen beschrieben. Zu keinem Zeitpunkt ging allerdings die Feinstruktur der Bande um 650 nm verloren. Erhitzt man C57M-675 auf 70 °C, so bleibt die Probe unverändert, erst bei 80 °C änderte sich das Spektrum langsam über einen Zeitraum von Stunden. Zwei neue Banden bildeten sich, die dem freien FMN entsprechen. Das Protein wird dabei nicht zersetzt, wie durch eine diskontinuierliche Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nachgewiesen wurde.

Offensichtlich gewährleistet die kovalente Bindung zum Apoprotein einen Schutz vor einer vollständigen Denaturierung. Die wesentlichen Aminosäuren für die Einbindung des FMN befinden sich in Nachbarschaft zum Methionin 57 (Asn56, Arg58, und Gln61). Es ist demnach denkbar, dass diese Interaktionen auch unter denaturierenden Bedingungen bestehen bleiben und so eine weitgehend unpolare Umgebung für das FMN erzeugen. Dies gewährleistet die Erhaltung der Bandenstruktur um 650 nm. Ob bei höheren Temperaturen oder unter sauren Bedingungen zuerst die Bindung zum N(5) des Flavins gelöst wird oder eine vollständige Denaturierung zu einer Oxidation des Radikals führt, darüber lässt sich nur spekulieren.

Gezeigt werden konnte jedoch, dass die Proteinumgebung wesentlich zur Stabilisierung des Radikals beiträgt. Verdaut man C57M-675 enzymatisch mit 90 µg/L Proteinase K (Qiagen) bei 45 °C für 20 h in einem Tris-HCl-Puffer (pH 7.8) mit 5 mM EDTA und 0.5% SDS, so geht die Absorption des Radikals vollständig verloren und es bildet sich erneut eine FMN-ähnliche Spezies. Eine SDS-PAGE ergab, dass das pMal-Fusionsprotein in viele kleine Fragmente mit einer Masse von deutlich weniger als 14 kDa zerlegt wurde. Was dabei aus der Bindung zwischen Methionin und Flavin geworden ist, lässt sich nicht endgültig sagen.

Der unspezifische Verdau und die Anwesenheit von SDS in der Probenlösung verhinderten eine massenspektrometrische Untersuchung. Das Absorptionsspektrum spricht allerdings für eine Spaltung dieser Bindung.

Die Stabilität des Neutralradikals C57M-675 ist im Vergleich zu ähnlichen, bekannten Verbindungen außergewöhnlich hoch. Flavinradikale in Lösung lassen sich kaum isolieren, sie disproportionieren sofort [98]. Durch eine Alkylierung an der N(5)-Position werden die Radikale stabilisiert und können unter anaeroben Bedingungen charakterisiert werden [98]. Eine wesentlich höhere Stabilität besitzen die Flavinradikale durch die Einbindung in ein Protein. Dabei isoliert die Proteinumgebung das Flavin und verhindert damit eine Disproportionierung. Auch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur N(5)-Position beim neutralen Flavoproteinradikal leistet hier wohl einen Beitrag [101]. In den meisten Flavoproteinen führt die Anwesenheit von Sauerstoff zu einer sofortigen Oxidation des Radikals, wie es auch bei dem Neutralradikal in der LOV1-Domäne der Fall ist (siehe Kapitel 8.7.1). Unter aeroben Bedingungen sind die Radikale nur in sehr wenigen Flavoproteinen stabil, zu nennen sind hier die DNA-Photolyase aus *E. coli* [102] und die Trimethylamin-Dehydrogenase aus W3A1 [103]. Unter denaturierenden Bedingungen sind allerdings auch diese Radikale im Gegensatz zu C57M-675 nicht stabil, so zerfällt das Radikal in der DNA-Photolyase schon bei Zusatz von 0.8% SDS. Demnach scheint die Kombination aus N(5)-Alkylierung, isolierender Proteinumgebung und einer kovalenten Einbindung des Chromophors dazu zu führen, dass C57M-675 eine einzigartige Stabilität aufweist.

## 8.6 Modellverbindung für C57M-415

Wie in Kapitel 6.2.3 beschrieben, ist es schwierig, die Reaktion der LOV1-Domäne in Lösung zu simulieren. Ein Weg, um wenigstens die vom Protein gewährleistete geometrische Ausrichtung der Reaktionspartner zu erreichen, ist eine intramolekulare Reaktion. Hierfür wurden Derivate des Flavins verwendet, bei denen eine lange Alkylkette die reaktive Schwefelgruppe trägt. Zwei dieser Modellsubstanzen wurden dabei näher untersucht (die Derivate wurden freundlicherweise von R. Procházka, Universität Regensburg zur Verfügung gestellt). Die in Abbildung 8.8 gezeigten Substanzen wurden in Dichlormethan gelöst

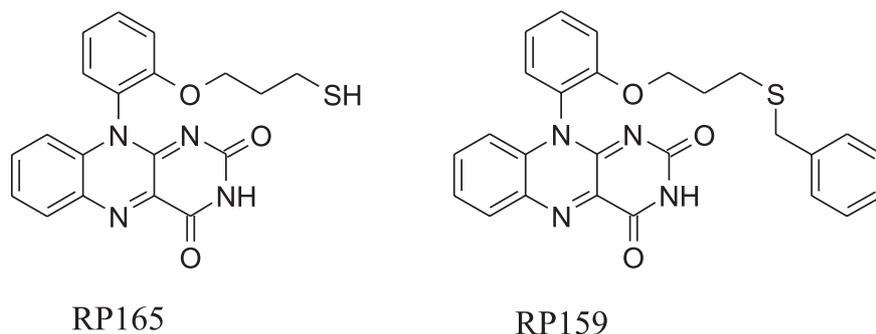


Abb. 8.8: Strukturen der Modellsubstanzen RP165 und RP159

und durch Einleiten von Argon von Sauerstoff befreit. Die Absorptionsspektren zeigten eine für oxidiertes Flavin in unpolare Umgebung zu erwartende Bandenstruktur mit drei Maxima bei 443, 336 und 269 nm und einer Feinstruktur in der langwelligen Bande. Belichtet wurde mit einer 100 W Wolframlampe durch einen 435 nm Kantenfilter. RP165 sollte dabei ein dem Wildtyp entsprechendes C(4a)-Thiol-Addukt bilden. Es zeigte nach 30 Minuten Belichtungszeit keinerlei Änderung des Absorptionsspektrums. Ist die Photoreaktion allerdings wie im Wildtyp reversibel und ist die Rückreaktion schnell gegenüber der Messzeit von mehreren Minuten, so kann das Addukt ohne entsprechende Zeitauflösung nicht nachgewiesen werden. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass das Flavin zumindest keine Reaktion mit dem Lösungsmittel einging. In aerober Umgebung fand dagegen eine Umsetzung von RP165 statt. Um Nebenreaktionen zu vermeiden, wurden die Messungen daher alle in anaerober Lösung durchgeführt. Die der Mutante LOV1-C57M nachempfundene Verbindung RP159 mit einer Benzylgruppe anstelle einer Methylgruppe am Schwefel zeigte auch unter anaeroben Bedingungen eine Umsetzung (siehe Abbildung 8.9). Diese irreversible Reaktion führte zu einem Verlust der Absorption des oxidierten Flavins mit zwei isosbestischen Punkten bei 317 und 283 nm. Aus dem Anfangs- und Endspektrum lässt sich ein Produktspektrum berechnen, wenn man annimmt, dass die Absorptionsbande um 443 nm nicht im Produkt enthalten ist. Im Inset der Abbildung 8.9 ist das berechnete Spektrum abgebildet. Es zeigt kaum charakteristische Strukturen, nur eine leichte Bande um 280 nm und die Andeutung einer Bande um 360 nm. Das Spektrum weist auf die Bildung eines reduzierten

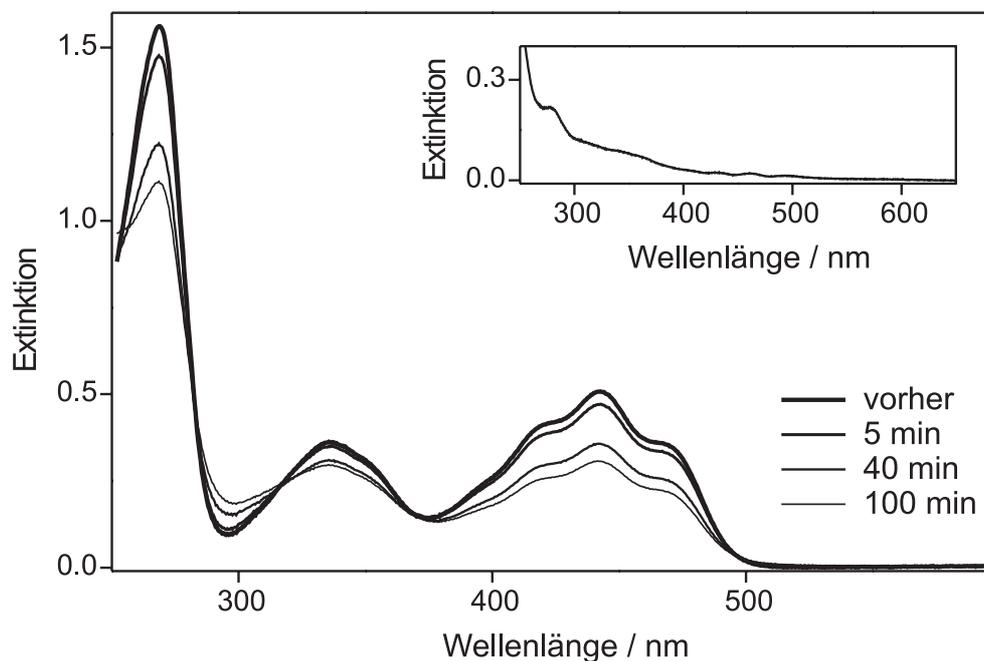


Abb. 8.9: Spektrensequenz zur Belichtung von RP159. Der Inset zeigt das berechnete Produktspektrum der Photoreaktion

Flavins hin. Es ähnelt dem Spektrum eines Dihydroflavins, das jedoch in einem unpolaren Lösungsmittel sowohl in seinem neutralen wie anionischen Zustand bei 300 nm absorbiert [38]. Da sich die Reaktion im Bereich von 50% Umsatz stark verlangsamt, kann ein deutlicheres Spektrum wohl auch bei höheren Lichtintensitäten nicht gewonnen werden. Der begrenzte Umsatz spricht für eine Reaktion, bei der nur die Hälfte des oxidierten Flavins eine Redoxreaktion eingeht und dabei die andere Hälfte inaktiviert wird. Zu diesem Verhalten würde es passen, wenn die Thiobenzylgruppe an das Flavin addiert, so dass ein Alkyl- oder Thiobenzyl-Addukt an C(4a) und N(5) entsteht (siehe Abbildung 8.10). Diese Reaktion würde durch die verhältnismäßig hohe Reaktivität des Benzylrests begünstigt, da hier sowohl anionische als auch radikalische Intermediate konjugativ stabilisiert werden können. Der Ringschwefel könnte durch einen zweiten Thioether nukleophil attackiert werden, wodurch sich ein C(4a)- oder N(5)-Benzyl-Addukt des Flavins und eine Disulfidbrücke bilden würden. Dieses Addukt sollte eine Absorptionsbande bei 340-365 nm aufweisen [95]. Ein der-

artiger Verlauf der Reaktion ist aber sehr spekulativ. Zum Beleg müssten Umsetzungen an größeren Substanzmengen durchgeführt werden und diese durch NMR oder Massenspektrometrie untersucht werden. Auch würde ein Wechsel zu höhersiedenden Lösungsmitteln wie Acetonitril die Durchführung der Messungen erleichtern. Eine Aufklärung der komplizierten Photoreaktionen der Modellspezies geht aber über den Rahmen dieser Arbeit hinaus.

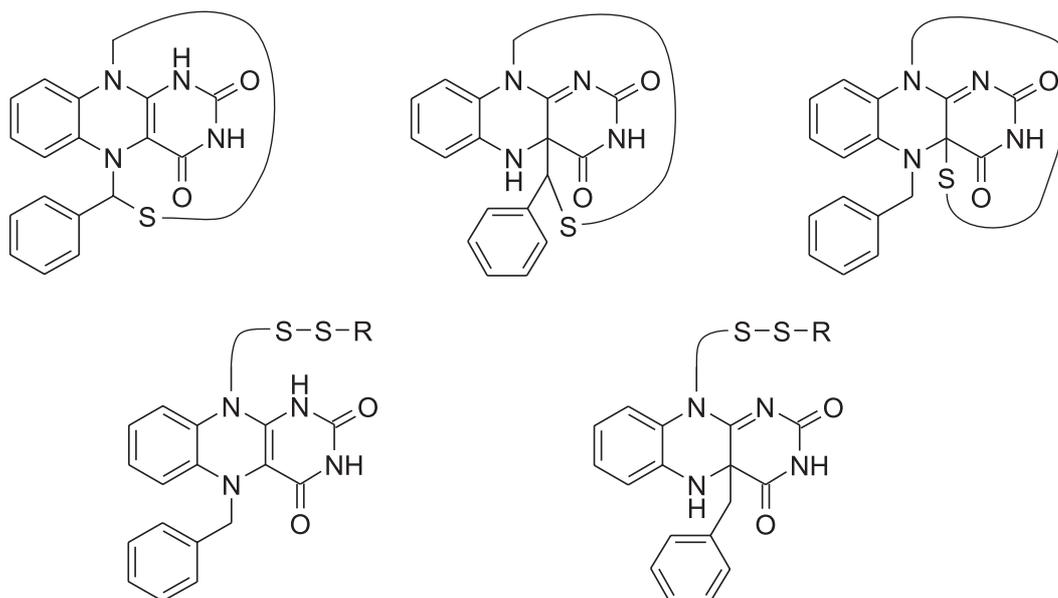


Abb. 8.10: Drei der möglichen Photoprodukte von RP159 (oben) und denkbare Folgeprodukte (unten)

## 8.7 Generierung eines Radikals in der LOV1-Domäne

### 8.7.1 Photoreduktion der LOV1-C57S-Mutante

Bei der Identifizierung der Radikalspezies C57M-675 stellte sich die Frage, wie das Absorptionsspektrum eines nicht-kovalent gebundenen Radikals in der LOV1-Domäne aussieht. Die meisten Flavoproteine lassen sich durch eine Reihe an Reduktionsmitteln zum Radikal oder zum Dihydroflavin reduzieren, wie z. B. Dithionit, Borhydrid oder Wasserstoff [104]. Möchte man aber die Lösungen

spektroskopisch untersuchen, so sind diese Verfahren zumeist problematisch, da die Reagenzien oder benötigte Redoxvermittler und Katalysatoren im spektralen Bereich unter 350 nm absorbieren oder sogar mit Flavin zu Addukten reagieren. Eine sehr elegante Methode dagegen ist die Photoreduktion, bei der die Reaktivität des angeregten Flavins ausgenutzt wird, um Elektronen von einem externen Donator zu abstrahieren. Seit langem etabliert ist dabei die Photoreduktion in Gegenwart von EDTA [37]. Eine Photoreduktion des Wildtyps der LOV1-Domäne ist allerdings problematisch, da in Konkurrenz dazu immer auch die sehr schnelle Adduktbildung stattfinden wird. Um dieses Problem zu umgehen, wurde stattdessen die LOV1-C57S-Mutante verwendet, bei der die Adduktbildung unterbunden ist (siehe Kapitel 5.2.1). Hierzu wurde eine Lösung der Mutante in 100 mM Phosphatpuffer pH 7.5 in Gegenwart von 9 mM EDTA durch 30-minütiges Einleiten von Argon von Sauerstoff befreit. Daraufhin wurde mit einer 100 W Wolframlampe durch einen 435 nm Kantenfilter belichtet (siehe Abbildung 8.11).

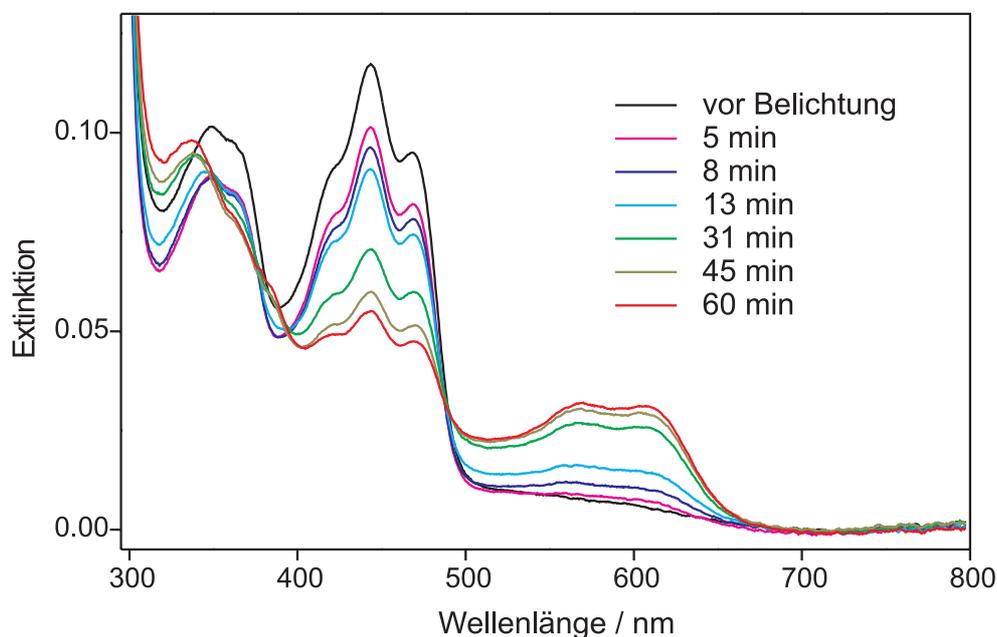


Abb. 8.11: Bildung des Neutralradikals durch Belichtung der LOV1-C57S-Mutante in Gegenwart von EDTA

In den ersten fünf Minuten nahm die Absorption des oxidierten Flavins ab, ohne dass größere Mengen an Radikal gebildet wurden. Vermutlich wurde in dieser Initiationsphase freies Flavin in der Lösung zum Dihydroflavin reduziert, das in diesem spektralen Bereich nur eine sehr schwache Absorption zeigt [38]. Bei weiterer Belichtung bildete sich eine Absorptionsbande mit Maxima bei 570 und 610 nm heraus, die dem Neutralradikal des Flavoproteins zugeordnet werden kann [37]. Ein anionisches Radikal würde dagegen ein Maximum bei 490 nm zeigen. Man erkennt vier isosbestische Punkte bei 487, 395, 375 und 349 nm, die darauf hinweisen, dass zunächst nur eine Umsetzung vom oxidierten zum radikalischen Zustand stattfand. Erst nach 45 Minuten begann langsam die vollständige Reduktion zum Dihydroflavin, was an der verhältnismäßig starken Zunahme der Absorption unter 350 nm zu erkennen ist. Da die Radikalbildung nach 60 Minuten weitgehend abgeschlossen war, wurde die Belichtung beendet. Das Einleiten von Luft in die Lösung führte zu einer vollständigen Regenerierung der Absorption des unbelichteten Zustands.

Die Messung zeigt, dass die LOV1-Domäne zu einer Gruppe von Flavoproteinen gehört, bei denen das Neutralradikal gegenüber dem anionischen Radikal bevorzugt gebildet wird [37]. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass ungeladene Zustände in der unpolaren Bindungstasche der LOV1-Domäne besser stabilisiert werden. Auch eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung des N(5)-Protons zu Glutamin 120 könnte hier einen Einfluss haben. Das Absorptionsspektrum des Radikals unterscheidet sich nicht von dem anderer Neutralradikale in Flavoproteinen. Die starke Rotverschiebung der langwelligen Bande in C57M-675 wird demnach nicht durch die LOV1-Domäne verursacht. Auch ESR-Messungen an dem Radikal der C57S-Mutante ergaben das zu erwartende, charakteristische Signal [100].

Direkt vergleichen lässt sich das Verhalten mit einem Neutralradikal in der LOV2-C450A-Mutante aus *A. sativa* Phototropin [105, 106]. Absorptions- und ESR-Spektren sind dabei sehr ähnlich, allerdings wird das Radikal in der LOV2-Domäne auch ohne Gegenwart eines externen Elektronendonators gebildet. Die Autoren erklären dies über eine Protein-interne Reduktion durch eine nicht identifizierte, redoxaktive Aminosäure, vermutlich ein Tryptophan, Histidin oder Tyrosin. Im Gegensatz dazu verläuft die Photoreduktion mit Elektronendonator zunächst über die Reduktion von freiem Flavin in der Lösung durch ED-

TA zum Dihydroflavin [107]. Dieses reduziert wiederum in einer Dunkelreaktion das Protein-gebundene Flavin. Der dafür notwendige Elektronentransfer verläuft wohl über eine redoxaktive Aminosäure. Die Voraussetzung für diese Reaktion ist die Anwesenheit von freiem Flavin in der Lösung. Da der Chromophor in den LOV-Domänen nicht kovalent gebunden ist, kann davon ausgegangen werden, dass selbst bei hoher Bindungsaffinität zum Protein einige Flavin-Moleküle für die Katalyse zur Verfügung stehen.

Der Unterschied in der Reaktivität zwischen den Mutanten der LOV1- und LOV2-Domäne ist schwierig zu erklären. In der Sequenz zeigen sich für *A. sativa* LOV2 im Vergleich zu *C. reinhardtii* LOV1 zwei zusätzliche potentielle Redoxpartner, das Histidin 498 und das Tyrosin 511 (siehe Abbildung 3.2). Mit einem Abstand von 10 Å zum Chromophor zeigen allerdings beide keine bevorzugte Nähe oder geometrische Ausrichtung im Vergleich zu anderen Kandidaten (bestimmt unter Verwendung der Kristallstruktur von LOV2 aus *A. capillus-veneris* Phy3, PDB Nr. 1G28).

Neben einem Elektron muss zur Bildung eines Neutralradikals auch ein Proton auf das FMN übertragen werden. Dieses muss allerdings nicht vom Protein stammen, sondern kann auch aus der Lösung kommen, da die Bindungstasche prinzipiell für Protonen zugänglich ist. So wurde durch Schwingungsspektroskopie gezeigt, dass in D<sub>2</sub>O das Cystein 57-Thiol-Proton der LOV1-Domäne gegen Deuterium ausgetauscht wird [47].

### 8.7.2 Photoreduktion von freiem Flavin

Auch freies Flavin lässt sich in Gegenwart von EDTA photoreduzieren. Der Reaktionsmechanismus wurde bereits im Detail untersucht [52, 108]. Die wesentliche Eigenschaft des EDTA, die es ermöglicht das Flavin zu photoreduzieren, ist die Umlagerung des EDTA-Radikals. Nach der Elektronenübertragung auf das angeregte Flavin bildet sich Kohlendioxid und ein weiteres Radikal, das nun erneut ein oxidiertes Flavin reduzieren kann (siehe Abbildung 8.12). Somit wird eine Rückübertragung des Elektrons vom radikalischen Flavin im elektronischen Grundzustand auf das EDTA verhindert. Die Flavinradikale disproportionieren dann zum reduzierten und oxidierten Zustand.

Um unter den hier gewählten Bedingungen einen direkten Vergleich zur Reakti-

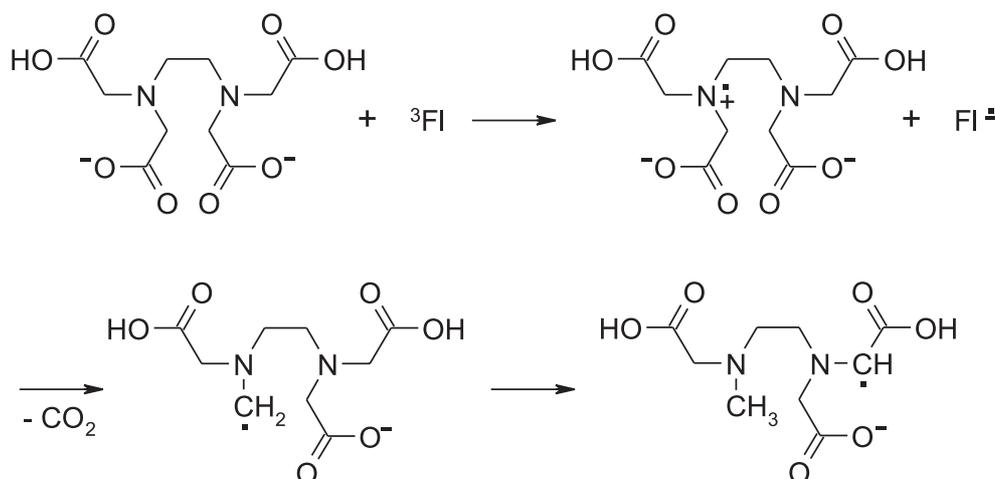


Abb. 8.12: Zerfall und Umlagerung des EDTA-Radikals nach Elektronenübertragung auf das Flavin

on im Protein anstellen zu können, wurde  $65 \mu\text{M}$  FMN in einem  $90 \text{ mM}$  Phosphatpuffer pH 7.5 mit  $10 \text{ mM}$  EDTA durch 30-minütiges Einleiten von Argon von Sauerstoff befreit. Die Belichtung erfolgte mit einer  $100 \text{ W}$  Wolframlampe durch einen  $435 \text{ nm}$  Kantenfilter. Wie in Abbildung 8.13 zu sehen ist, änderte sich das Absorptionsspektrum der Lösung bereits nach  $5 \text{ s}$  Belichtungsdauer. Daher wurden in diesem Zeitabstand weitere Spektren aufgenommen, bis nach  $85 \text{ s}$  keine weitere Änderung mehr zu beobachten war. Die Absorptionsbanden des oxidierten FMN bei  $445$ ,  $373$  und  $266 \text{ nm}$  verschwanden dabei vollständig und wurden durch eine weitgehend bandenlose Struktur mit zwei Schultern bei  $343$  und  $285 \text{ nm}$  ersetzt. Das Endspektrum entspricht wie erwartet dem reduzierten Dihydroflavin [38], das bei diesem pH-Wert in seinem anionischen Zustand vorliegt. Die Reaktion verläuft über drei isosbestische Punkte bei  $331$ ,  $288$ , und  $261 \text{ nm}$ . Dies weist darauf hin, dass im Gegensatz zur Photoreduktion des Proteins kein Radikal in der Lösung stabilisiert wird, sondern dass dieses sofort nach Bildung disproportioniert. Die Photoreaktion des FMN in Lösung verläuft wesentlich schneller als die Reaktion des FMN im Protein. Der notwendige Elektronentransfer durch die Proteinumgebung verringert demnach deutlich entweder die Effizienz oder die Geschwindigkeit der Reaktion. Wahrscheinlich ist nur ein kleiner Teil des generierten Dihydroflavins tatsächlich in der Lage, katalytisch ein Protein-gebundenes FMN zu reduzieren.

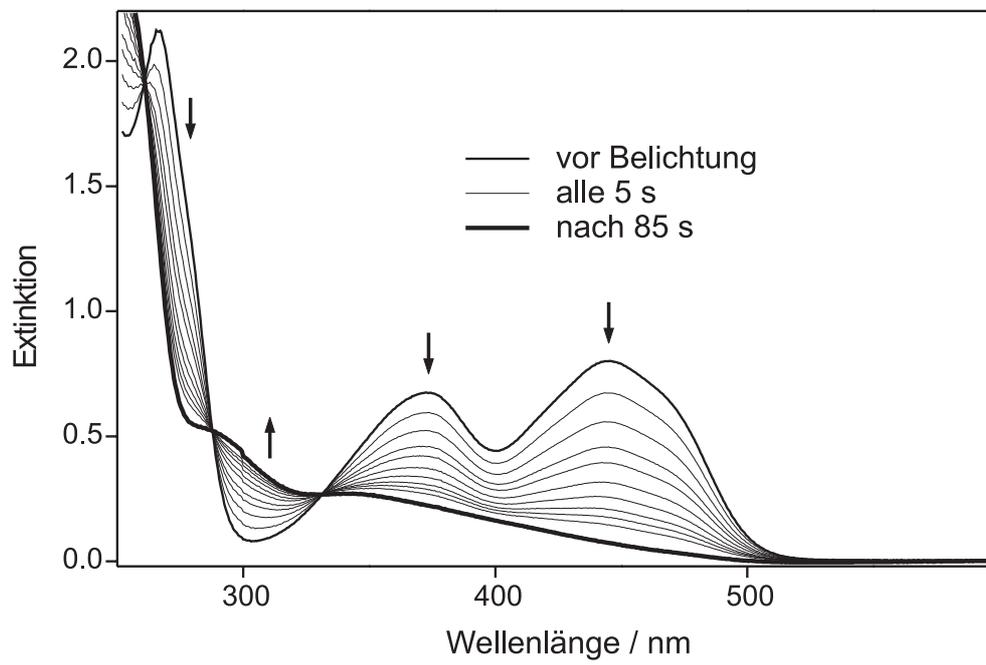


Abb. 8.13: Reduktion des freien FMN in Wasser durch Belichtung in Gegenwart von EDTA

# 9 Mechanismus der Addukt-Bildung

## 9.1 Wildtyp

Im Photozyklus der LOV-Domänen wurden bisher zwei Intermediate identifiziert und charakterisiert, der Triplettzustand des Chromophors FMN und ein Addukt des FMN mit einem benachbarten Cystein. Für weitere Intermediate gibt es noch keine gesicherten, spektroskopischen Befunde. Daher stellt sich die Frage, wie der Reaktionspfad der Adduktbildung verläuft. Es lassen sich vier Reaktionswege unterscheiden: ein ionischer und ein radikalischer Verlauf, eine Reaktion mit Gruppenübertragung und eine konzertierte Reaktion ohne ein definiertes Intermediat (siehe Abbildung 9.1).

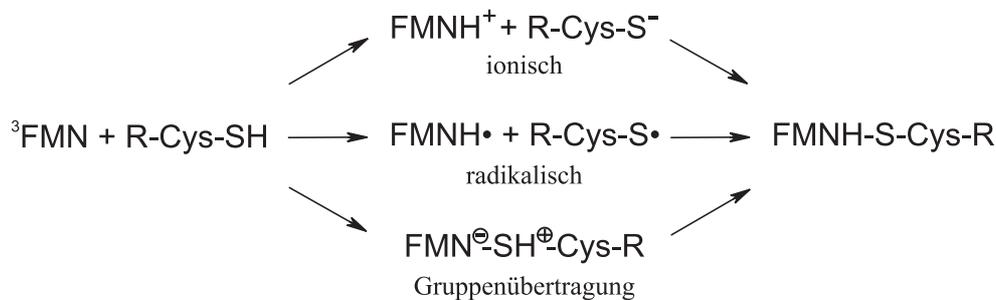


Abb. 9.1: Mögliche Reaktionspfade für die Adduktbildung in den LOV-Domänen

Bekannt ist, dass die Adduktbildung in der LOV2-Domäne aus *A. sativa* Phot1 einen Isotopeneffekt zeigt, was den Bruch oder die Bildung einer Bindung zu einem Wasserstoff als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt impliziert [109]. Im Folgenden sollen Hinweise und Argumente für die verschiedenen Reaktionswege des Wildtyps diskutiert werden.

### 9.1.1 Ionischer Verlauf

In der ersten detaillierten, spektroskopischen Studie zu einer LOV2-Domäne aus *A. sativa* Phot1 postulierten die Autoren einen ionischen Mechanismus der Adduktbildung [48]. Sie gingen davon aus, dass das Cystein bereits im Dunkelzustand deprotoniert vorliegt. Das angeregte FMN wird von einer nicht identifizierten Aminosäure des Apoproteins am N(5) protoniert und daraufhin vom Thiolat an der C(4a)-Position nukleophil angegriffen. Spätere Untersuchungen zeigten allerdings, dass das reaktive Cystein sowohl in LOV1 als auch in LOV2 im Dunkelzustand in seiner protonierten Form vorliegt [47, 67, 110] (siehe auch Kapitel 4.2.1).

Hinweise auf ein protoniertes FMN im Triplettzustand lieferte die zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie [50]. Die Autoren analysierten die Feinstruktur der langwelligen Absorptionsbande des Triplettzustands in LOV2 aus *A. capillus-veneris* Phy3. Durch einen Vergleich mit protoniertem und neutralem  $^3\text{FMN}$  in Wasser berechneten sie, dass ein Gemisch aus 60% protoniertem und 30% neutralem Triplettzustand im Protein vorliegt. Die übrigen 10% Absorption weisen sie einem Flavinradikal zu. Da sie von einer Quantenausbeute der Triplettbildung von 60% und der Adduktbildung von 30% ausgehen, ist demnach der protonierte Zustand das reaktive Intermediat. Ein entsprechendes Reaktionsschema ist in Abbildung 9.2 dargestellt [50, 111]. Die Protonierung des  $^3\text{FMN}$  erfolgt dabei an der N(5)-Position im Einklang mit theoretischen Studien, die eine erhöhte Basizität des N(5) im Triplettzustand zeigen [63].

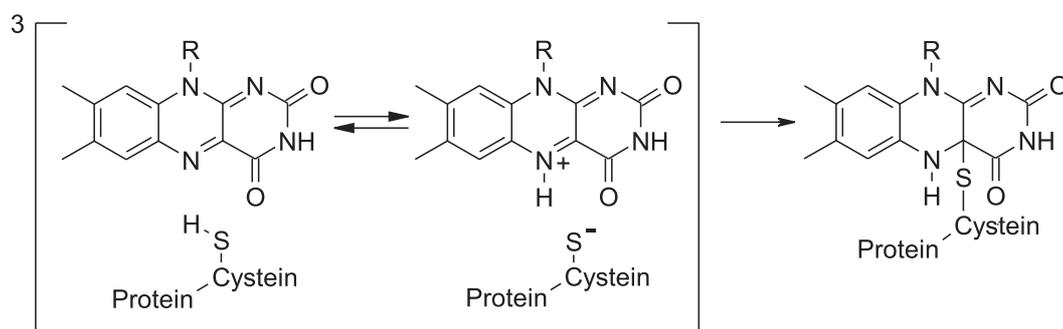


Abb. 9.2: Ionischer Reaktionsweg zum Addukt über einen protonierten Triplettzustand des FMN

Problematisch an der Interpretation der Feinstruktur im Triplettenspektrum ist der Vergleich mit FMN in Wasser, da das Spektrum eines protonierten  $^3\text{FMN}$  im Protein nicht zur Verfügung steht. Auch stützen sich die Autoren bei der Berechnung der Triplettquantenausbeute in ihrer Domäne auf ein falsches Zitat [50]. Die gemessenen Quantenausbeuten für den Triplettzustand [48, 53, 69] und das Addukt [27, 51, 67] variieren bei den LOV-Domänen und sind daher für eine Argumentation bisher nicht geeignet. Dies ist eine generelle Schwierigkeit bei den Photorezeptoren, wie auch anhand des Photoactive Yellow Protein (PYP) [112] oder des Bacteriorhodopsin [113] festgestellt werden kann. Grundsätzlich ist anzumerken, dass die positive Ladung des protonierten Triplettzustands vom Heterozyklus des FMN selbst nicht wesentlich stabilisiert werden kann, weshalb er bisher nur in einem sauren, polaren Medium (Wasser, pH unter 4.4) beobachtet wurde. Es ist daher fraglich, ob die Voraussetzungen für eine Protonierung durch das Cystein auch durch die eher unpolare Proteinumgebung erfüllt werden können. Für die Adduktbildung des freien Flavins wurde bisher kein entsprechender ionischer Mechanismus postuliert [52].

### 9.1.2 Radikalischer Verlauf

Durch Blitzlichtphotolyse von Flavin in Lösung konnte bereits vor längerer Zeit gezeigt werden, dass sich bei der Photoreaktion mit vielen Substraten, unter anderem auch Aminosäuren, zunächst ein Flavinradikal bildet. Diese Bildung erfolgt direkt aus dem Triplettzustand und ist oft quantitativ [74, 76]. Aus seinen Studien schließt Heelis, dass auch die Adduktbildung generell über eine Radikalpezies verläuft [52], allerdings ohne die Addukte näher zu untersuchen. Auch bei den LOV-Domänen wurde ein radikalischer Mechanismus postuliert [105, 106]. Dabei bildet sich das Neutralradikal durch einen Elektronentransfer vom Cystein zum Flavin gefolgt von einem Protonentransfer. Das Addukt wird dann durch Rekombination des Radikalpaares erzeugt (siehe Abbildung 9.3). Der notwendige Schritt des Intersystem Crossing vom Triplett- zum Grundzustand erfolgt dabei während der Lebensdauer der Radikale.

Eine theoretische Studie auf der Basis eines *ab-initio*-Formalismus zeigt, dass aufgrund energetischer Gesichtspunkte tatsächlich ein radikalischer Reaktionsverlauf gegenüber einer ionischen Reaktion bevorzugt abläuft [63]. Die Spindich-

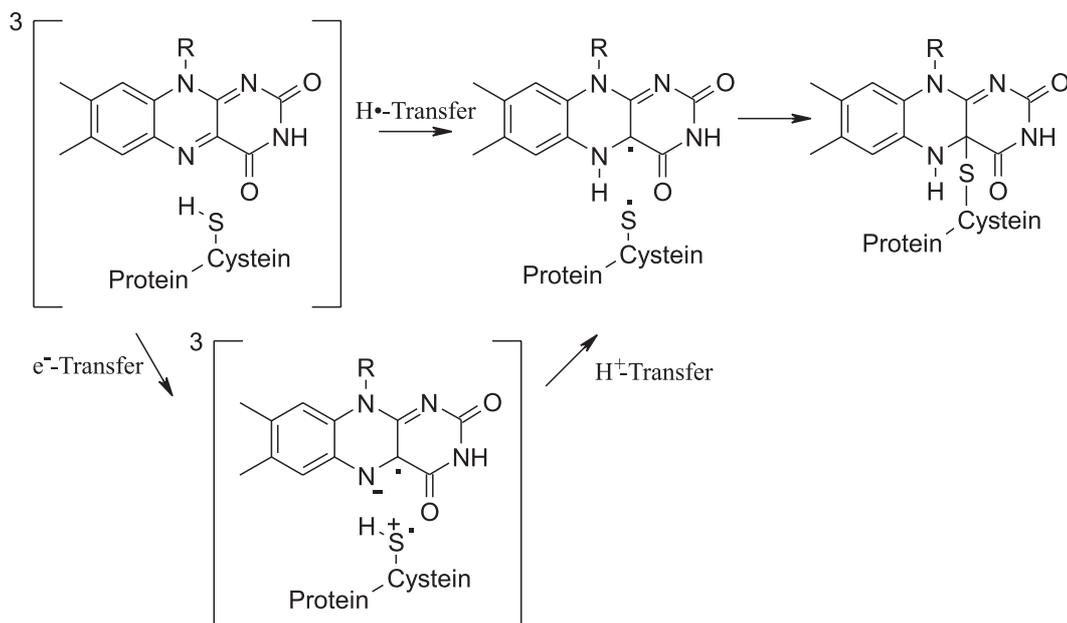


Abb. 9.3: Bildung eines radikalischen Intermediats in einem oder zwei Schritten und Rekombination zum Addukt

te am N(5), dem Zielatom des Transfers, ist dabei im Triplettzustand erhöht. Allerdings ergaben die Rechnungen, dass die günstigste Route über die direkte Übertragung eines Wasserstoff-Radikals verläuft und nicht über einen Elektronentransfer. Dagegen spricht, dass die Übertragung eines Wasserstoff-Radikals auch im Falle eines Serins exotherm ist, wie weitere quantenmechanische Rechnungen zeigen konnten [93]. In der C57S-Mutante wird aber kein Addukt gebildet. Geht man hingegen von einem primären Elektronentransfer aus, so lässt sich die erhöhte Aktivierungsenergie im Falle des Serins damit erklären, dass die Ionisierungsenergie des Serins viel höher ist als die des Cysteins.

Aus Untersuchungen zu Flavon in Lösung ist bekannt, dass tatsächlich beide Mechanismen auftreten können. Der Verlauf hängt dabei von der Dielektrizitätskonstante des Mediums ab. Ist das Medium leicht polar ( $\epsilon > 10-15$ ), so läuft der Elektronentransfer zum Flavon bevorzugt ab [114]. Da man aber annimmt, dass die Dielektrizitätskonstante in Proteinen zwischen 2 und 25 variieren kann, stellt dies kein weiteres Argument dar.

Spektroskopisch gibt es für ein radikalisches Intermediat im Photozyklus der LOV-Domänen bisher keinen Nachweis sondern nur Hinweise. So zeigt das Spek-

trum des Triplettzustands in der LOV1-Domäne aus *C. reinhardtii* Phot eine ungewöhnlich hohe Extinktion im Bereich von 500 nm [67]. Auch zur Interpretation des Triplettpektrums von LOV2 aus *A. capillus-veneris* Phy3 wird eine Radikalspezies mit einem Anteil von 10% benötigt [50]. Ein Grund für den fehlenden Nachweis eines Radikals könnte in der kurzen Lebensdauer dieser Spezies liegen.

### 9.1.3 Reaktion mit Gruppenübertragung

Unter einer Reaktion mit Gruppenübertragung versteht man einen nukleophilen Angriff auf das Flavin als ersten Schritt. Eine derartige Reaktion wurde von Hemmerich für die Adduktbildung von freien Flavinen postuliert [115]. Dabei attackiert ein deprotonierter Rest  $R^-$  das Flavin unter Bildung des substituierten, anionischen Dihydroflavins, das dann protoniert werden kann. Der Triplettzustand des Flavins könnte auch durch ein Hydrid nukleophil angegriffen werden, dieser Verlauf wurde aber bisher nur im Falle des Borhydrids nachgewiesen [116]. Gegen eine Gruppenübertragung in den LOV-Domänen sprechen quantenmechanische Rechnungen zur Ladungsverteilung im FMN-Cystein-Komplex der LOV1-Domäne im Triplettzustand [34]. Demnach nimmt die negative Ladung am N(5) und die positive Ladung am C(5a) im Vergleich zum Grundzustand deutlich zu, wohingegen das C(4a) weitgehend neutral bleibt. Einem nukleophilen Angriff am C(4a) fehlt demnach die energetische Grundlage einer Ladungsänderung bei Anregung.

### 9.1.4 Konzertierte Reaktion

Der erste Vorschlag für einen Reaktionsmechanismus der Adduktbildung in den LOV-Domänen beinhaltete eine konzertierte Reaktion [30]. Dabei wird die N(5)-Position des Flavins durch das Thiol protoniert, wobei gleichzeitig der Schwefel die C(4a)-Position angreift. Die Autoren revidierten diesen Vorschlag später zugunsten eines echten ionischen Intermediats [111]. Allerdings weist auch eine auf den Kristallstrukturen von LOV1 basierende theoretische Studie auf einen konzertierten Mechanismus hin [34]. Nach der Vorstellung der Autoren bewegt sich das Thiol-Proton während der Lebensdauer des Triplettzustands zur N(5)-

Position hin, während gleichzeitig die Orbitalüberlappung des Schwefels mit dem C(4a) zunimmt und das Addukt gebildet wird. Dies ist im Gegensatz zum Befund anderer Rechnungen, die zeigen, dass die Adduktbildung im Triplettzustand unwahrscheinlich ist [63]. Demnach müsste vor Adduktbildung ein Intersystem Crossing stattfinden. Diese Kontroverse lässt sich wohl nur durch die Berechnung des gesamten Reaktionspfades auf der Energiehyperfläche lösen. Aus Sicht der experimentellen Befunde ist anzumerken, dass die Grenze zwischen einer konzertierten Reaktion und der Bildung eines definierten Intermediats fließend ist, sobald die Lebensdauer des Intermediats sehr kurz wird. Ein experimenteller Nachweis eines Intermediats wäre dann weitgehend unmöglich.

## 9.2 Mutante LOV1-C57M

Die Diskussion zur Adduktbildung in den LOV-Domänen wurde bisher auf der Basis zeitaufgelöster Messungen und quantenmechanischer Rechnungen geführt. Um weitere Argumente für einen der Mechanismen zu finden, bietet es sich an, den Reaktionspartner Cystein durch eine Mutation zu ersetzen. In der LOV1-C57M-Mutante wurde ein Methionin eingeführt und damit die reaktive Thiolgruppe durch eine Methylgruppe geschützt. Dies macht eine Reaktion unter Beteiligung des Thiolprotons unmöglich. Dennoch fand eine Adduktbildung zum C57M-415 statt, wobei das Flavin nicht mehr mit dem Thiol (S-H), sondern mit der endständigen Methylgruppe des Methionins ( $\text{H}_2\text{C-H}$ ) reagierte. Im Einklang mit dieser Änderung in der Reaktivität steht die Beobachtung, dass die Quantenausbeute für die Adduktbildung im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 10 abnimmt. Allerdings würde man zunächst erwarten, dass in der Mutante statt der Methylgruppe die zum Schwefel benachbarte  $\text{CH}_2$ -Gruppe reagiert (siehe Abbildung 9.4), da diese in der Seitenkette dieselbe Position einnimmt wie die Thiolgruppe im Wildtyp. Dies ist nicht der Fall, wie die Kristallstruktur des Oxidationsprodukts des C57M-415 zeigt [93]. Aus der Kristallstrukturanalyse folgt weiterhin, dass das Methionin in C57M-675 in einer spannungsfreien Konformation vorliegt. Bei einer Reaktion der  $\text{CH}_2$ -Gruppe dagegen wäre die Bildung einer wahrscheinlich gespannten Konformation wie beim Signalzustand des Wildtyps erforderlich, was energetisch gesehen ungünstiger ist. Auch besteht

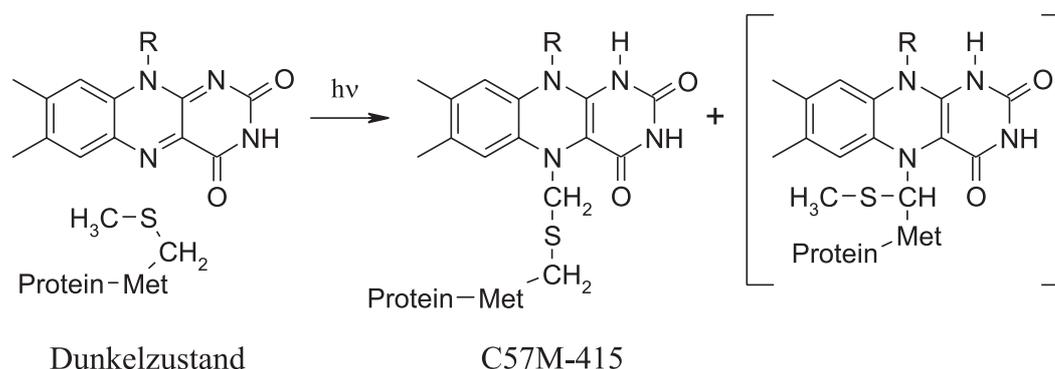


Abb. 9.4: Bei der Photoreaktion der C57M-Mutante gebildetes Addukt C57M-415 und ein nicht beobachtetes Konkurrenzprodukt

bei dieser Art der Addukte die Gefahr einer  $\beta$ -H-Eliminierung zum Dihydroflavin [71], die beim Addukt C57M-415 nicht möglich ist. Die Kraftfeldrechnungen zum Dunkelzustand der Mutante ergaben leider keine bevorzugte Orientierung der Konformere (siehe Kapitel 8.2). Die Abstände der  $\text{CH}_2$ -Gruppe zu C(4a) und N(5) liegen in einem Bereich von 3.3 bis 4.3 Å und unterscheiden sich damit wenig vom Abstand der  $\text{CH}_3$ -Gruppe mit Werten zwischen 3.5 und 5.4 Å. Im Unterschied zu den Thiol-Addukten sind bei alkylierten Dihydroflavinen sowohl C(4a)-Addukte als auch N(5)-Addukte bekannt [71]. Dabei kann auch eine Umlagerungsreaktion zwischen den C(4a)- und N(5)-Addukten stattfinden, wobei die Lage des Gleichgewichts von den Reaktionsbedingungen und dem Substituenten abhängt [95, 117]. Diese verläuft vermutlich in zwei Schritten, wobei der eigentlichen Umlagerung noch eine Tautomerisierung folgt. Im Falle des C57M-415 zeigt das Absorptionsspektrum, dass überwiegend N(5)-Addukt gebildet worden ist (siehe Kapitel 8.4). Dies scheint die bevorzugte Position in den Reaktionsprodukten von Thioethern zu sein, wie auch die Reaktion von Thiolan mit Flavin zeigt [71].

Nun stellt sich die Frage, ob das N(5)-Addukt direkt gebildet wird, oder ob zunächst ein C(4a)-Addukt entsteht, das dann eine Umlagerungsreaktion eingeht. Um diese Frage zu beantworten, muss man zunächst den Reaktionsmechanismus diskutieren. Die erste Möglichkeit ist hierbei die einer ionischen Reaktion. Dabei müsste sich allerdings ein endständiges Carbanion bilden, was aus energetischer Sicht sehr unwahrscheinlich ist. Auch ist die C-H-Azidität der Me-

thylgruppe sicher nicht hoch genug, um durch das  $^3\text{FMN}$  deprotoniert werden zu können. Eine vorhergehende Protonierung des Flavins aus der Bindungstasche ist ebenfalls unwahrscheinlich, da sich keine entsprechenden Aminosäuren oder Wassermoleküle in der Nähe des Reaktionszentrums befinden [34, 93]. Gegen eine Gruppenübertragung als ersten Schritt sprechen die gleichen Argumente wie bei der Wildtypreaktion, so zeigt der FMN-Triplettzustand keine geeignete Polarität für einen nukleophilen Angriff. Die Ladungsverteilung im Triplettzustand erlaubt hingegen einen konzertierten Mechanismus, bei diesem würde sich wohl bevorzugt das C(4a)-Addukt bilden. Da sich hier aber das Problem einer Adduktbildung im Triplettzustand stellt, ist der überzeugendste Reaktionsweg in der Mutante ein radikalischer Verlauf (siehe Abbildung 9.5). Dabei bildet sich bevorzugt das stabilste Neutralradikal, in diesem Falle das

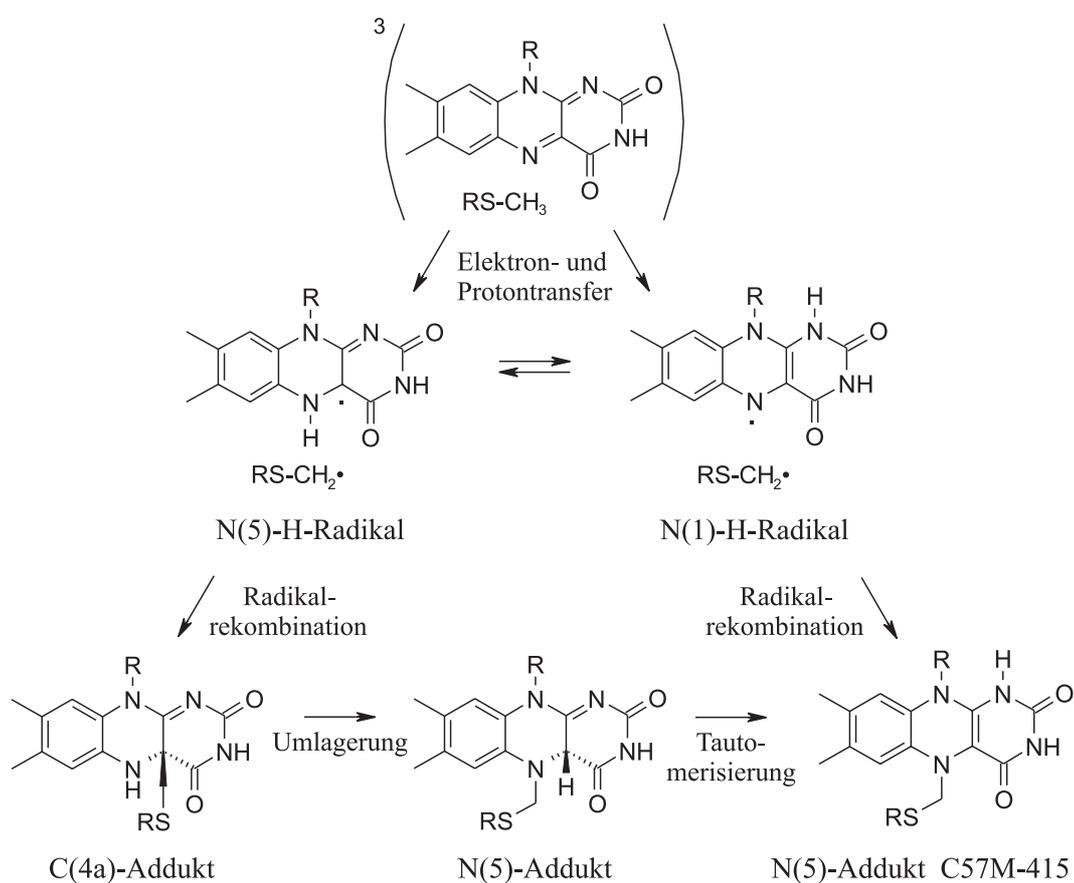


Abb. 9.5: Zwei mögliche Wege zur radikalischen Bildung des Addukts in der C57M-Mutante

N(5)-H-Radikal [101]. Durch Rekombination der Radikale wird dann das C(4a)-Addukt generiert, aus dem folglich erst durch eine Umlagerungsreaktion das N(5)-Addukt C57M-415 entsteht. Allerdings ist auch eine direkte Reaktion vorstellbar. So zeigen zwar quantenmechanische Rechnungen an einem Modellsystem zur LOV1-C57M-Mutante, dass von den möglichen Radikalisomeren das N(5)-H-Radikal das stabilste ist [93]. Das Isomer mit dem Proton an der N(1)-Position liegt aber energetisch nahe genug am N(5)-H-Radikal, um bei Raumtemperatur in geringer Menge populiert zu werden. Eine Bildung dieses Radikals aber führt direkt zum N(5)-Addukt. Die geringe Population des N(1)-H-Radikals würde auch eine weitere Erklärung für die geringe Quantenausbeute der Adduktbildung in der Mutante liefern.

Offen ist dabei, ob im ersten Schritt der Reaktion ein Elektron oder ein Wasserstoff-Radikal übertragen wird. In Lösung jedenfalls reagiert Methionin mit Flavin zunächst über einen Elektronentransfer [118]. Allerdings zersetzt sich das Methionin daraufhin über eine Decarboxylierung, die im Protein durch die Einbindung in die Polypeptidkette nicht möglich ist. Für einen Elektronentransfer spricht weiterhin, dass beim Methionin wie beim Cystein die Ionisierungsenergie deutlich niedriger ist als beim Serin. Damit lässt sich erklären, warum in der C57S-Mutante im Gegensatz zu Wildtyp und C57M-Mutante keine Adduktbildung stattfindet. Im Falle einer Übertragung des Wasserstoff-Radikals bleibt diese Frage unbeantwortet.

### 9.3 Fazit

Nur einer der oben beschriebenen Reaktionsmechanismen kann zugleich die Reaktion des Wildtyps wie auch die der C57M-Mutante erklären. Dabei handelt es sich um den in Kapitel 9.1.2 vorgestellten radikalischen Verlauf. Es ist natürlich möglich, dass sich bei einem Austausch des reagierenden Thiols durch einen Kohlenwasserstoff in der Mutante der Reaktionsmechanismus ändert. Daher kann ein ionischer Verlauf der Reaktion im Wildtyp nicht völlig ausgeschlossen werden. Ein konzertierter Reaktionsweg bleibt aber unwahrscheinlich, solange nicht durch Rechnungen gezeigt werden kann, wie hierbei das Intersystem Crossing ablaufen soll.

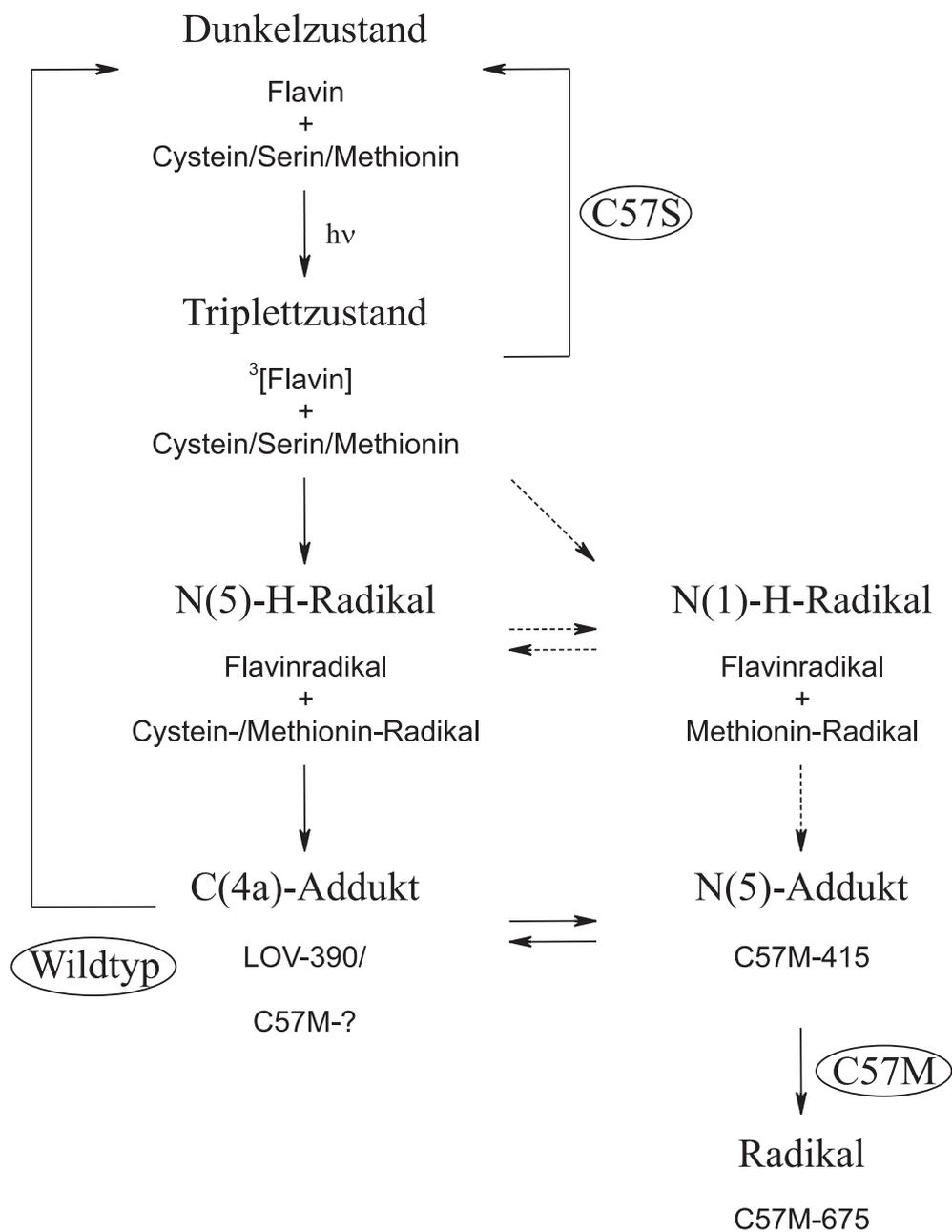


Abb. 9.6: Übersicht über den Reaktionspfad von Wildtyp, C57S- und C57M-Mutante unter Annahme eines radikalischen Verlaufs der Reaktion

In Abbildung 9.6 ist zusammenfassend der Photozyklus des Wildtyps mit einem radikalischen Reaktionsverlauf im Kontext der beiden Mutanten C57M und C57S dargestellt. Die C57S-Mutante wird nur zum Triplettzustand angeregt und kehrt dann wieder in den Dunkelzustand zurück. Die C57M-Mutante dagegen reagiert über ein N(5)-H-Radikal zum C(4a)-Addukt. Dieses lagert sich dann zum wesentlich stabileren N(5)-Addukt C57M-415 um und wird am Ende zum Radikal C57M-675 oxidiert. Der Wildtyp reagiert entsprechend, nur bildet dieser bevorzugt das C(4a)-Addukt, welches langsam wieder zum Dunkelzustand zerfällt. Die alternative Route über das N(1)-H-Radikal könnte ebenfalls von Wildtyp wie C57M-Mutante begangen werden, spielt aber nur in der Reaktion der Mutante möglicherweise eine Rolle.

# 10 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Photozyklus einer lichtempfindlichen Domäne des Phot-Blaulichtrezeptors mit Hilfe der transienten Absorptionsspektroskopie untersucht. Dabei handelt es sich um die LOV1-Domäne aus dem Phot-Protein der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Die Domäne enthält ein Flavin-Mononucleotid als Chromophor, welches mit einem benachbarten Cystein bei Belichtung reversibel zu einem Photoaddukt reagiert.

Zunächst wurde das Verhalten der Domäne im Dunkelzustand charakterisiert (Kapitel 4). Dabei wurde festgestellt, dass das reaktive Cystein 57 im protonierten Zustand vorliegt. Bei Belichtung geht der Chromophor in den angeregten Triplettzustand LOV1-715 über, der im roten Bereich des Spektrums bei 650 und 715 nm absorbiert (Kapitel 5). Dieser klingt mit zwei Zeitkonstanten von 800 ns und 4  $\mu$ s ab, die sich einer effizienten Reaktion in das Photoprodukt zuordnen lassen. Die beiden Reaktionskanäle werden wohl durch unterschiedliche Konformere des Cysteins verursacht. Um den Triplettzustand näher zu untersuchen, wurde die Mutante C57S eingeführt. In dieser Mutante kann das Photoaddukt durch den Austausch des reaktiven Cysteins gegen ein Serin nicht mehr gebildet werden. Das Abklingen des Triplettzustands in der Mutante zum elektronischen Grundzustand zeigt zwei Zeitkonstanten mit 3  $\mu$ s und 27  $\mu$ s. Die schnellere Komponente hat dabei einen Anteil von 25% und wurde einer Löschung durch Sauerstoff zugeordnet. Messungen in Gegenwart von Xenon zeigten keinen Schweratomeffekt auf die Lebensdauer des Triplettzustands.

Bei der Reaktion des Triplettzustands mit dem Cystein 57 bildet sich das Photoaddukt LOV1-390 (Kapitel 6). Das Absorptionsspektrum des Intermediats zeigt einen für Flavin-C(4a)-Thiol-Addukte charakteristischen Verlauf mit einem breiten Maximum bei 390 nm. Das Addukt ist nur metastabil und reagiert mit einer Zeitkonstante von 200 s wieder in den Dunkelzustand zurück (Kapitel 7). Die Kinetik der Rückreaktion hängt deutlich von den Umgebungsbedin-

gungen wie pH-Wert und Salzkonzentration der Lösung ab. Aus dem Verlauf der pH-Abhängigkeit lässt sich ein  $pK_a$ -Wert des beteiligten Säure-Base-Paars zwischen 5 und 6 bestimmen. Als Kandidat für eine Protonierung kommt hierbei der Phosphatrest des FMN in Frage. Dabei würde die Wasserstoffbrückenbindung zur benachbarten Aminosäure Arginin 58 geschwächt, was zu einem Verlust an konformativer Spannung im Addukt führen könnte. Dieses wiederum würde die deutlich langsamere Rückreaktion bei saurem pH-Wert erklären. Um den Einfluss des Arginin 58 näher zu untersuchen, wurde dieses gegen ein Lysin ausgetauscht. In der R58K-Mutante verläuft die Rückreaktion deutlich schneller mit einer Zeitkonstante von 73 s. Geht man davon aus, dass die  $NH_3^+$ -Gruppe des Lysins mit dem Phosphat des FMN eine starke Wechselwirkung eingeht, so würde eine erhöhte Spannung im Addukt die Beschleunigung der Rückreaktion erklären. Bei der detaillierten Untersuchung der thermischen Rückreaktion wurden deutliche Hinweise darauf gefunden, dass die Rückreaktion auch photochemisch induziert abläuft.

Um den Mechanismus der Adduktbildung aufzuklären, wurde in einer Mutante das reaktive Cystein durch ein Methionin ausgetauscht (Kapitel 8). Die C57M-Mutante zeigt trotz Methylierung der Thiol-Gruppe weiterhin eine Photoreaktion unter Bildung des Addukts C57M-415. Dabei handelt es sich um ein N(5)-Addukt, das aus einer Reaktion der terminalen Methylgruppe des Methionins mit dem Flavin entsteht. Das Addukt wird in einer langsamen, thermischen Folgereaktion zu einem Neutralradikal des Flavins oxidiert, welches bei 625 und 675 nm absorbiert. Das Produkt C57M-675 beinhaltet dabei weiterhin eine kovalente Bindung zwischen Chromophor und Apoprotein und ist daher selbst unter aeroben und denaturierenden Bedingungen stabil. Damit unterscheidet es sich deutlich von anderen Flavoproteinradikalen wie einem durch Photoreduktion generierten Radikal in der LOV1-Domäne.

In der C57M-Mutante kann ein ionischer Mechanismus der Adduktbildung über eine Deprotonierung des Methionins und eine Protonierung des  $^3\text{FMN}$  weitgehend ausgeschlossen werden (Kapitel 9). Weitaus plausibler ist hier ein radikalischer Mechanismus, bei dem zunächst nacheinander ein Elektron und ein Proton auf das Flavin übertragen werden. Das gebildete, intermediäre Neutralradikal reagiert dabei mit dem Methioninradikal zum C(4a)-Addukt, welches sich zum stabileren N(5)-Addukt C57M-415 umlagert. Geht man davon aus, dass die Mu-

tation keinen wesentlichen Einfluss auf den Mechanismus der Adduktbildung hat, so kann geschlossen werden, dass auch im Wildtyp ein radikalischer Verlauf der Reaktion dominiert.

Die Aufklärung des Photozyklus der LOV1-Domäne konnte keinen Nachweis für ein radikalisches Intermediat in der Wildtyp-Reaktion erbringen, welches den Mechanismus der Adduktbildung endgültig klären würde. Hier sind weitere zeitaufgelöste Messungen und quantenmechanische Rechnungen nötig. Nach der Untersuchung einer einzelnen, isolierten LOV-Domäne gilt es nun, sich auf größere Abschnitte des Phot-Proteins zu konzentrieren. Die hier vorgestellten Daten stellen den Ausgangspunkt dar für die Untersuchung der Interaktionen der LOV1-Domäne mit der LOV2-Domäne und anderen Abschnitten des Proteins.

# A Anhang

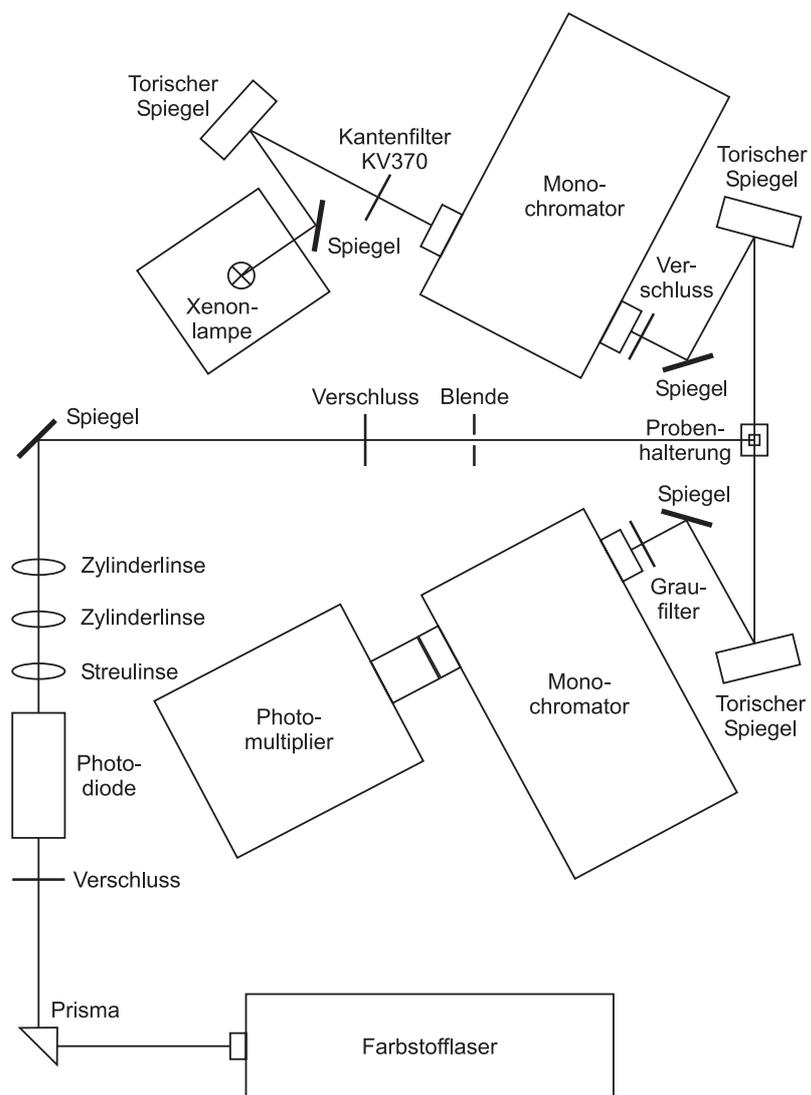


Abb. A.1: Schematischer Aufbau der Blitzlichtphotolyseapparatur

# Literaturverzeichnis

- [1] Stryer, L. (1995) Photosynthesis, in: *Biochemistry* pp. 653-682, Freeman, New York.
- [2] Bèjà, O., Spudich, E. N., Spudich, J. L., Leclerc, M., und DeLong, E. F. (2001) Proteorhodopsin phototrophy in the ocean, *Nature (Lond.)* *411*, 786-789.
- [3] Christie, J. M., Reymond, P., Powell, G. K., Bernasconi, P., Raibekas, A. A., Liscum, E., und Briggs, W. R. (1998) *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism, *Science* *282*, 1698-1701.
- [4] Liscum, E., und Briggs, W. R. (1995) Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli, *Plant Cell* *7*, 473-485.
- [5] Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Han, E., Larsen, I. S., und Briggs, W. R. (1997) *Arabidopsis* NPH1: A protein kinase with a putative redox-sensing domain, *Science* *278*, 2120-2123.
- [6] Jarillo, J. A., Gabrys, H., Capel, J., Alonso, J. M., Ecker, J. R., und Cashmore, A. R. (2001) Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light, *Nature (Lond.)* *410*, 952-954.
- [7] Kagawa, T., Sakai, T., Suetsugu, N., Oikawa, K., Ishiguro, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, K., und Wada, M. (2001) *Arabidopsis* NPL1: a Phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response, *Science* *291*, 2138-2141.

- 
- [8] Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T. E., Christie, J. M., Briggs, W. R., Wada, M., Okada, K. (2001) Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 6969-6974.
- [9] Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M., und Shimazaki, K. I. (2001) Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening, *Nature (Lond.)* 414, 656-660.
- [10] Huang, K., und Beck, C.F. (2003) Phototropin is the blue-light receptor that controls multiple steps in the sexual life cycle of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 6269-6274.
- [11] Norrish, R. G., und Porter, G. (1949) Chemical reactions produced by very high light intensities, *Nature* 164, 658.
- [12] Schober, W. (2000) Zeit- und frequenz aufgelöste Spektroskopie an Intermediaten in Photoreaktionszyklen, Dissertation, Universität Regensburg.
- [13] Holzer, W., Penzkofer, A., Fuhrmann, M., und Hegemann, P. (2002) Spectroscopic characterization of flavin mononucleotide bound to the LOV1 domain of Phot1 from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Photochem. Photobiol.* 75, 479-487.
- [14] Hendler, R. W., und Shrager, R. I. (1994) Deconvolutions based on singular value decomposition and the pseudoinverse: a guide for beginners, *J. Biochem. Biophys. Methods* 28, 1-33.
- [15] Dick, B. (2002) BDFA18.for, Programm zur Faktoranalyse, Universität Regensburg.
- [16] Hampp, N. (2000) Bacteriorhodopsin as a photochromic retinal protein for optical memories, *Chem. Rev.* 100, 1755-1776.
- [17] Grigorieff, N., Ceska, T. A., Downing, K. H., Baldwin, J. M., und Henderson, R. (1996) Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin, *J. Mol. Biol.* 259, 393-421.

- [18] Lozier, R. H., Bogomolni, R. A., und Stoeckenius, W. (1975) Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium halobium*, *Biophys. J.* 15, 955-962.
- [19] Sharkov, A. V., Pakulev, A. V., Chekalin, S. V., und Matveets, Y. A. (1985) Primary events in bacteriorhodopsin probed by subpicosecond spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 808, 94-102.
- [20] Zimányi, L., Keszthelyi, L., und Lanyi, J. K. (1989) Transient spectroscopy of bacterial rhodopsins with an optical multichannel analyzer. 1. Comparison of the photocycle of bacteriorhodopsin and halorhodopsin, *Biochemistry* 28, 5165-5172.
- [21] Chizhov, I., Chernavskii, D. S., Engelhard, M., Mueller, K. H., Zubov, B. V., und Hess, B. (1996) Spectrally silent transitions in the Bacteriorhodopsin photocycle, *Biophys. J.* 71, 2329-2345.
- [22] Schober, W. (1995) Untersuchungen zur Kinetik photochromer Reaktionen mit Hilfe der Laser-Blitzlicht-Photolyse, Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- [23] Gillbro, T. (1978) Flash kinetic study of the last steps in the photoinduced reaction cycle of bacteriorhodopsin *Biochim. Biophys. Acta* 504, 175-186.
- [24] Briggs, W. R., und Christie, J. M. (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors, *Trends Plant Sci.* 7, 204-210.
- [25] Briggs, W. R., Beck, C. F., Cashmore, A. R., Christie, J. M., Hughes, J., Jarillo, J. A., Kagawa, T., Kanegae, H., Liscum, E., Nagatani, A., Okada, K., Salomon, M., Rüdiger, W., Sakai, T., Takano, M., Wada, M., und Watson, J. C. (2001) The Phototropin family of photoreceptors, *Plant Cell* 13, 993-997.
- [26] Christie, J. M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M., und Briggs, W. R. (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor Phototropin (nph1): Binding sites for the chromophore flavin mononucleotide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8779-8783.

- [27] Salomon, M., Christie, J. M., Knieb, E., Lempert, U., und Briggs, W. R. (2000) Photochemical and mutational analysis of the FMN-Binding Domains of the Plant Blue Light Receptor, Phototropin, *Biochemistry* *39*, 9401-9410.
- [28] Salomon, M., Eisenreich, W., Dürr, H., Schleicher, E., Knieb, E., Massey, V., Rüdiger, W., Müller, F., Bacher, A., und Richter, G. (2001) An optomechanical transducer in the blue light receptor Phototropin from *Avena sativa*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *98*, 12357-12361.
- [29] Harper, S. M., Neil, L. C., und Gardner, K. H. (2003) Structural basis of a Phototropin light switch, *Science* *301*, 1541-1544.
- [30] Crosson, S., und Moffat, K. (2001) Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: Insights into light-mediated signal transduction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *98*, 2995-3000.
- [31] Crosson, S., und Moffat, K. (2002) Photoexcited structure of a plant photoreceptor domain reveals a light-driven molecular switch, *Plant Cell* *14*, 1067-1075.
- [32] Stoelzle, S., Kagawa, T., Wada, M., Hedrich, R., und Dietrich, P. (2003) Blue light activates calcium-permeable channels in Arabidopsis mesophyll cells via the Phototropin signaling pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 1456-1461.
- [33] Huang, K., Merkle, T., und Beck, C. F. (2002) Isolation and characterization of a *Chlamydomonas* gene that encodes a putative blue-light photoreceptor of the Phototropin family, *Physiol. Plantarum* *115*, 613-622.
- [34] Fedorov, R., Schlichting, I., Hartmann, E., Domratcheva, T., Fuhrmann, M., und Hegemann, P. (2003) Crystal structures and molecular mechanism of a light induced signaling switch: the Phot-LOV1 domain from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biophys. J.* *84*, 2474-2482.
- [35] Pellequer, J. L., Wager-Smith, K. A., Kay, S. A., und Getzoff, E. D. (1998) Photoactive yellow protein: a structural prototype for the three-

- dimensional fold of the PAS domain superfamily, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *95*, 5884-5890.
- [36] Massey, V. (2000) The chemical and biological versatility of riboflavin, *Biochem. Soc. Trans.* *28*, 283-296.
- [37] Massey, V., und Palmer, G. (1966) On the existence of spectrally distinct classes of flavoprotein semiquinones. A new method for the quantitative production of flavoprotein semiquinones, *Biochemistry* *5*, 3181-3189.
- [38] Ghisla, S. (1974) Fluorescence and optical characteristics of reduced flavins and flavoproteins, *Biochemistry* *13*, 589-597.
- [39] Bidwell, J., Thomas, J., und Stuehr, J. (1986) Thermodynamic and kinetic study of the interactions of Ni(II) with FMN and FAD, *J. Am. Chem. Soc.* *108*, 820-825.
- [40] Heelis, P. F. (1982) The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines), *Chem. Soc. Rev.* *11*, 15-39.
- [41] Weber, G., und Teale, F. W. J. (1957) Determination of the absolute quantum yield of fluorescent solutions, *Trans. Faraday Soc.* *53*, 646-655.
- [42] Drössler, P., Holzer, W., Penzkofer, A., und Hegemann, P. (2002) pH dependence of the absorption and emission behaviour of riboflavin in aqueous solution, *Chem. Phys.* *282*, 429-439.
- [43] Kotaki, A., Naoi, M., und Yagi, K. (1970) Effect of proton donors on the absorption spectrum of flavin compounds in apolar media, *J. Biochem.* *68*, 287-292.
- [44] Macheroux, P. (1999) UV-visible spectroscopy as a tool to study flavoproteins, in: *Methods in Molecular Biology* (Chapman, S. K., und Reid, G. A., Ed.) Vol. 131, pp. 1-7, Humana Press, Totowa, NJ.
- [45] Miller, S. M., Massey, V., Ballou, D., Williams, Jr., C. H., Distefano, M. D., Moore, M. J., und Walsh, C. T. (1990) Use of a site-directed mutant to trap intermediates: Demonstration that the flavin C(4a)-thiol adduct

- and reduced flavin are kinetically competent intermediates in mercuric ion reductase, *Biochemistry* *29*, 2831-2841.
- [46] Williams, C. H., Jr. (1992) Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase, and mercuric ion reductase - a family of flavoenzyme transhydrogenases, in: *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* (Mueller, F., Ed.) Vol. III, pp. 121-211, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [47] Ataka, K., Hegemann, P., und Heberle, J. (2003) Vibrational spectroscopy of an algal Phot-LOV1 domain probes the molecular changes associated with blue-light reception, *Biophys. J.* *84*, 466-474.
- [48] Swartz, T. E., Corchnoy, S. B., Christie, J. M., Lewis, J. W., Szundi, I., Briggs, W. R., und Bogomolni, R. A. (2001) The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor Phototropin, *J. Biol. Chem.* *276*, 36493-36500.
- [49] Eweg, J. K., Müller, F., Visser, A. J. W. G., Veeger, C., Bebelaar, D., und van Voorst, J. D. W. (1979) Molecular luminescence of some isoalloxazines in apolar solvents at various temperatures, *Photochem. Photobiol.* *30*, 463-471.
- [50] Kennis, J. T. M., Crosson, S., Gauden, M., van Stokkum, I. H. M., Moffat, K., und van Grondelle, R. (2003) Primary reactions of the LOV2 domain of Phototropin, a plant blue-light receptor, *Biochemistry* *42*, 3385-3392.
- [51] Kasahara, M., Swartz, T. E., Olney, M. A., Onodera, A., Mochizuki, N., Fukuzawa, H., Asamizu, E., Tabata, S., Kanegae, H., Takano, M., Christie, J. M., Nagatani, A., und Briggs, W. R. (2002). Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the Phototropins from Arabidopsis, rice, and *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* *129*, 762-773.
- [52] Heelis, P. F. (1991) in *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes* (Müller, F., Ed.) Vol. I, pp. 171-193, CRC Press, Boca Raton, FL.

- [53] Islam, S. D. M., Penzkofer, A., und Hegemann, P. (2003) Quantum yield of triplet formation of riboflavin in aqueous solution and of flavin mononucleotide bound to the LOV1 domain of Phot1 from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chem. Phys.* *291*, 97-114.
- [54] Moore, W. M., McDaniels, J. C., und Hen, J. A. (1977) The photochemistry of riboflavin - VI. The photophysical properties of isoalloxazines, *Photochem. Photobiol.* *25*, 505-512.
- [55] Fife, D. J., und Moore, W. M. (1979) The reduction and quenching of photoexcited flavins by EDTA, *Photochem. Photobiol.* *29*, 43-47.
- [56] Losi, A., Polverini, E., Quest, B., und Gärtner, W. (2002) First evidence for Phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes, *Biophys. J.* *82*, 2627-2634.
- [57] van den Berg, P. A. W., Widengren, J., Hink, M. A., Rigler, R., und Visser, A. J. W. G. (2001) Fluorescence correlation spectroscopy of flavins and flavoenzymes: photochemical and photophysical aspects, *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* *57*, 2135-2144.
- [58] Heelis, P. F., Parsons, B. J., und Phillips, G. O. (1979) The pH dependence of the reactions of flavin triplet states with amino acids, *Biochim. Biophys. Acta* *587*, 455-462.
- [59] Naman, S. A., und Tégner, L. (1986) Decay kinetics of the triplet excited state of lumiflavin, *Photochem. Photobiol.* *43*, 331-333.
- [60] Fritz, B. J., Matsui, K., Kasai, S., und Yoshimura, A. (1987) Triplet lifetimes of some flavins, *Photochem. Photobiol.* *45*, 539-541.
- [61] Bowd, A., Byrom, P., Hudson, J. B., und Turnbull, J. H. (1968) Excited states of flavine coenzymes-III. Fluorescence and phosphorescence emissions, *Photochem. Photobiol.* *8*, 1-10.
- [62] Schreiner, S., Steiner, U., und Kramer, H. E. A. (1975) Determination of the pK values of the lumiflavin triplet state by flash photolysis, *Photochem. Photobiol.* *21*, 81-84.

- [63] Neiss, C., und Saalfrank, P. (2003) *Ab initio* quantum chemical investigation of the first steps of the photocycle of Phototropin: a model study, *Photochem. Photobiol.* *77*, 101-109.
- [64] Sakai, M. und Takahashi, H. (1996) One-electron photoreduction of flavin mononucleotide: time-resolved resonance Raman and absorption study, *Journal of Molecular Structure* *379*, 9-18.
- [65] Penzer, G. R. (1970) The chemistry of flavins and flavoproteins: aerobic photochemistry, *Biochem. J.* *116*, 733-743.
- [66] Fukuzumi, S., Tanii, K., und Tanaka, T. (1989) Flavin-sensitized photooxidation of unsaturated fatty acids, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* *12*, 2103-2108.
- [67] Kottke, T., Heberle, J., Hehn, D., Dick, B., und Hegemann, P. (2003) Phot-LOV1: Photocycle of a blue-light receptor domain from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biophys. J.* *84*, 1192-1201.
- [68] Melø, T. B., Ionescu, M. A., Haggquist, G. W., und Naqvi, K. R. (1999) Hydrogen abstraction by triplet flavins. I: Time-resolved multi-channel absorption spectra of flash-irradiated riboflavin solutions in water, *Spectrochim. Acta, Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* *55*, 2299-2307.
- [69] Losi, A. (2003) Persönliche Mitteilung, Max-Planck-Institut für Strahlenchemie, Mülheim an der Ruhr.
- [70] Li, Y. F., Heelis, P. F., und Sancar, A. (1991) Active site of DNA photolyase: Tryptophan-306 is the intrinsic hydrogen atom donor essential for flavin radical photoreduction and DNA repair in vitro, *Biochemistry* *30*, 6322-6329.
- [71] Knappe, W. R., und Hemmerich, P. (1976) Reductive photoalkylation of the flavin nucleus; structure und reactivity of the photoproducts, *Liebigs Ann. Chem.* *11*, 2037-2057.
- [72] Gladys, M., und Knappe, W. R. (1974) Intramolekulare Photodealkylierung von 10-Alkylisoalloxazinen, eine Modellreaktion für den Riboflavin-Photoabbau, *Chem. Ber.* *107*, 3658-3673.

- [73] Heelis, P. F., und Sancar, A. (1986) Photochemical properties of *Escherichia coli* DNA photolyase: a flash photolysis study, *Biochemistry* *25*, 8163-8166.
- [74] Heelis, P. F., Parsons, B. J., Phillips, G. O., und McKellar, J. F. (1978) A laser flash photolysis study of the nature of flavin mononucleotide triplet states and the reactions of the neutral form with amino acids, *Photochem. Photobiol.* *28*, 169-173.
- [75] Loechler, E. L., und Hollocher, T. C. (1980) Reduction of flavins by thiols. 1. Reaction mechanism from the kinetics of attack and breakdown steps, *J. Am. Chem. Soc.* *102*, 7312-7321.
- [76] Heelis, P. F., Parsons, B. J., Phillips, G. O., und McKellar, J. F. (1979) The photoreduction of flavins by amino acids and EDTA. A continuous and flash photolysis study, *Photochem. Photobiol.* *30*, 343-347.
- [77] Shichida, Y. und Imai, H. (1998) Visual pigment: G-protein-coupled receptor for light signals, *Cell. Mol. Life Sci.* *54*, 1299-1315.
- [78] Shinomura, T., Nagatani, A., Hanzawa, H., Kubota, M., Watanabe, M., und Furuya, M. (1996) Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 8129-8133.
- [79] Christie, J. (2003) Persönliche Mitteilung, Glasgow University, United Kingdom.
- [80] Kolbe, M., Besir, H., Essen, L. O., und Oesterhelt, D. (2000) Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution, *Science* *288*, 1390-1396.
- [81] Richard, S., Madern, D., Garcin, E., und Zaccai, G. (2000) Halophilic adaptation: novel solvent protein interactions observed in the 2.9 and 2.6 Å resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*, *Biochemistry* *39*, 992-1000.

- [82] Bieger, B., Essen, L. O., und Oesterhelt, D. (2003) Crystal structure of halophilic dodecin: a novel, dodecameric flavin binding protein from *Halobacterium salinarum*, *Structure* 11, 375-385.
- [83] Carey, F. C., und Sundberg, R. J. (1995) Reaktionen von Carbonylverbindungen, in: *Organische Chemie* (Schäfer, H. J., Hoppe, D., Erker, G., Ed.) pp. 425-482, VCH, Weinheim.
- [84] Ormos, P., Dér, A., Gergely, C., Kruska, S., Száraz, S., und Tokaji, Z. (1997) The effect of azide on the photocycle of bacteriorhodopsin, *J. Photochem. Photobiol. B* 40, 111-119.
- [85] Tittor, J., Soell, C., Oesterhelt, D., Butt, H. J., und Bamberg, E. (1989) A defective proton pump, point-mutated bacteriorhodopsin Asp96 → Asn is fully reactivated by azide, *EMBO J.* 8, 3477-3482.
- [86] Tittor, J., Wahl, M., Schweiger, U. und Oesterhelt, D. (1994) Specific acceleration of de- and reprotonation steps by azide in mutated bacteriorhodopsins, *Biochim. Biophys. Acta* 1187,191-197.
- [87] Neiss, C. (2003) Quantenchemische und molekulardynamische Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus von Phototropin, Dissertation, Universität Regensburg.
- [88] Mager, H. I. X., und Addink, R. (1984) On the role of some flavin adducts as one-electron donors, in: *Flavins and Flavoproteins* (Bray, R. C., Ed.) pp. 37-40, de Gruyter Verlag, Berlin.
- [89] Guex, N., und Peitsch, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- [90] Lindahl, E., Hess, B., und van der Spoel, D. (2001) GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis, *J. Mol. Mod.* 7, 306-317.
- [91] Berendsen, H. J. C., van der Spoel, D., und van Drunen, R. (1995) GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation, *Comp. Phys. Comm.* 91, 43-56.

- [92] van Gunsteren, W. F., Billeter, S. R., Eising, A. A., Hünenberger, P. H., Krüger, P., Mark, A. E., Scott, W. R. P., und Tironi, I. G. (1996) Biomolecular simulation: The GROMOS96 manual and user guide, Vdf Hochschulverlag, Zürich.
- [93] Kottke, T., Dick, B., Fedorov, R., Schlichting, I., Deutzmann, R., und Hegemann, P. (2003) Irreversible photoreduction of flavin in a mutated Phot-LOV1 domain, *Biochemistry* 42, 9854-9862.
- [94] Chowdhury, S. K., Katta, V., und Chait, B. T. (1990) Probing conformational changes in proteins by mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* 112, 9012-9013.
- [95] Walker, W. H., und Hemmerich, P. (1970) Light-induced alkylation and dealkylation of the flavin nucleus, *Eur. J. Biochem.* 13, 258-266.
- [96] Dudley, K. H., Ehrenberg, A., Hemmerich, P., und Müller, F. (1964) Spektren und Strukturen der am Flavin-Redoxsystem beteiligten Partikeln, *Helv. Chim. Acta* 47, 1354-1383.
- [97] Moonen, C. T. W., Vervoort, J., und Müller, F. (1984) Reinvestigation of the structure of oxidized and reduced flavin: Carbon-13 and nitrogen-15 nuclear resonance study, *Biochemistry* 23, 4859-4867.
- [98] Müller, F., Brüstlein, M., Hemmerich, P., Massey, V., und Walker, W. H. (1972) Light-absorption studies on neutral flavin radicals, *Eur. J. Biochem.* 25, 573-580.
- [99] Nanni, E. J., Jr., Sawyer, D. T., Ball, S. S., und Bruice, T. C. (1981) Redox chemistry of N5-ethyl-3-methylflavinium cation and N5-ethyl-4a-hydroperoxy-3-methylflavin in dimethylformamide. Evidence for the formation of the N5-ethyl-4a-hydroperoxy-3-methylflavin anion via radical-radical coupling with superoxide ion, *J. Am. Chem. Soc.* 103, 2797-2802.
- [100] Bittl, R., Kay, C. W. M., Weber, S., und Hegemann, P. (2003) Characterization of a flavin radical product in a C57M mutant of a LOV1 domain by electron paramagnetic resonance, *Biochemistry* 42, 8506-8512.

- [101] Müller, F., Hemmerich, P., Ehrenberg, A., Palmer, G., und Massey, V. (1970) The chemical and electronic structure of the neutral flavin radical as revealed by electron spin resonance spectroscopy of chemically and isotopically substituted derivatives, *Eur. J. Biochem.* *14*, 185-196.
- [102] Jorns, M. S., Sancar, G. B. und Sancar, A. (1984) Identification of a neutral flavin radical and characterization of a second chromophore in *Escherichia coli* DNA photolyase, *Biochemistry* *23*, 2673-2679.
- [103] Steenkamp, D. J., und Gallup, M. (1978) The natural flavoprotein electron acceptor of trimethylamine dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* *253*, 4086-4089.
- [104] Ghisla, S. (1980) Fluorescence and optical characteristics of reduced flavins and flavoproteins, *Methods Enzymol.* *66*, 360-373.
- [105] Kay, C. W. M., Kuppig, A., Schleicher, E., Bacher, A., Richter, G., und Weber, S. (2002) Photochemistry of a C450A mutant of the LOV2 domain in Phototropin: Detection of a light-induced neutral flavin radical by EPR spectroscopy, in: *Flavins and Flavoproteins 2002* (Chapman, S., Perham, R. und Scrutton, N., Ed.) pp. 707-712, Rudolf-Weber Agency for Scientific Publications, Berlin.
- [106] Kay, C. W. M., Schleicher, E., Kuppig, A., Hofner, H., Rüdiger, W., Schleicher, M., Fischer, M., Bacher, A., Weber, S., und Richter, G. (2003) Blue light perception in plants. Detection and characterization of a light-induced neutral flavin radical in a C450A mutant of Phototropin, *J. Biol. Chem.* *278*, 10973-10982.
- [107] Massey, V., Stankovich, M., und Hemmerich, P. (1978) Light-mediated reduction of flavoproteins with flavins as catalysts, *Biochemistry* *17*, 1-8.
- [108] Traber, R., Kramer, H. E. A., und Hemmerich, P. (1982) Mechanism of light-induced reduction of biological redox centers by amino acids. A flash photolysis study of flavin photoreduction by EDTA and nitrilotriacetate, *Biochemistry* *21*, 1687-1693.
- [109] Corchnoy, S. B., Swartz, T. E., Lewis, J. W., Szundi, I., Briggs, W. R., und Bogomolni, R. A. (2003) Intramolecular proton transfers and structural

- changes during the photocycle of the LOV2 domain of Phototropin 1, *J. Biol. Chem.* *278*, 724-731.
- [110] Iwata, T., Tokutomi, S., und Kandori, H. (2002) Photoreaction of the cysteine S-H group in the LOV2 domain of *Adiantum* phytochrome3, *J. Am. Chem. Soc.* *124*, 11840-11841.
- [111] Crosson, S., Rajagopal, S., und Moffat, K. (2003) The LOV domain family: Photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains, *Biochemistry* *42*, 2-10.
- [112] Hellingwerf, K. J., Hendriks, J., und Gensch, T. (2003) Photoactive yellow protein, a new type of photoreceptor protein: Will this "Yellow Lab" bring us where we want to go?, *J. Phys. Chem. A* *107*, 1082-1094.
- [113] Tittor, J., und Oesterhelt, D. (1990) The quantum yield of bacteriorhodopsin, *FEBS Lett.* *263*, 269-273.
- [114] Ahmad, I., und Tollin, G. (1981) Solvent effects on flavin electron transfer reactions, *Biochemistry* *20*, 5925-5928.
- [115] Hemmerich, P. (1976) The present status of flavin and flavocoenzyme chemistry, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* *33*, 451-527.
- [116] Traber, R., Kramer, H. E. A., und Hemmerich, P. (1982) One and two electron transfer pathways in the photoreduction of flavin, *Pure Appl. Chem.* *54*, 1651-1665.
- [117] Walker, W. H., Hemmerich, P., und Massey, V. (1967) Reduktive Photoalkylierung des Flavinkerns und flavinkatalysierte Photodecarboxylierung von Phenylacetat, *Helv. Chim. Acta* *50*, 2269-2279.
- [118] Yang, S. F., Ku, H. S., und Pratt, H. K. (1967) Photochemical production of ethylene from methionine and its analogues in the presence of flavin mononucleotide, *J. Biol. Chem.* *242*, 5274-5280.