

Photochemie und Signaltransduktion von Blaulichtrezeptorproteinen aus photosynthetisierenden Mikroorganismen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dipl. Chem. Tilo Mathes

geboren am 3.12.1976 in Geislingen an der Steige

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Peter Hegemann
2. PD Dr. Annegret Wilde
3. Prof. Dr. Robert Bittl

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2007

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

ZIRAK, P., PENZKOFER, A., HEGEMANN, P. & MATHES, T. (2007): Photo dynamics of BLUF domain mutant H44R of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *Chemical Physics*, **335**, 15-27.

ZIRAK, P., PENZKOFER, A., LEHMPFUHL, C., MATHES, T. & HEGEMANN, P. (2007): Absorption and emission spectroscopic characterization of blue-light receptor Slr1694 from *Synechocystis sp. PCC6803*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **86**, 22-34.

COSIMO BONETTI, TILO MATHES, IVO H. M. VAN STOKKUM, KATHERINE M. MULLEN, MARIE-LOUISE GROOT, RIENK VAN GRONDELLE, PETER HEGEMANN, AND JOHN T.M. KENNIS (2007): Hydrogen bond switching among flavin and amino acid side chains in the BLUF photoreceptor probed by ultrafast infrared spectroscopy. In Vorbereitung

Vorträge und Poster auf Veranstaltungen der DFG:

„Heterologous expression of algal photoreceptors“, Jahrestagung der DFG-Forschergruppe FOR526 „Blaulicht-sensitive Photorezeptoren“, Berlin, Deutschland (2004)

„Progress on full length Phototropin from *Chlamydomonas reinhardtii*“, Jahrestagung der DFG-Forschergruppe FOR526 „Blaulicht-sensitive Photorezeptoren“, Marburg, Deutschland (2006)

„Investigation of signal transduction and primary photochemistry of blue light photoreceptors“, Jahrestagung der DFG-Forschergruppe FOR526 „Blaulicht-sensitive Photorezeptoren“, Bielefeld, Deutschland (2007)

als Poster:

Stierl, M., Mathes, T., Hegemann, P. „Primary processes and photoreceptor - enzyme interaction“, Jahrestagung der DFG-Forschergruppe FOR526 „Blaulicht-sensitive Photorezeptoren“, Bielefeld, Deutschland (2007)

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit zwischen August 2004 und September 2007 am Institut für Biologie der Humboldt Universität zu Berlin in der Arbeitsgruppe Experimentelle Biophysik unter der Anleitung von Prof. Dr. Peter Hegemann.

Mein großer und aufrichtiger Dank gilt vor allem Peter Hegemann für die Bereitstellung des herausfordernden und spannenden Themas sowie die vielfältigen Arbeitstechniken, die ich in der Zeit erlernen und anwenden konnte. Vielen Dank für den großen Rückhalt und die Ermunterung und Bereitschaft, neues auszuprobieren.

Ein ganz großer Dank gilt zu allererst den Mitarbeitern im Institut, vor allem Gabriele Reinke, für die tatkräftige Unterstützung und das große Interesse an meiner Arbeit. Besonders möchte ich mich auch bei Manuela Stierl und Cathrin Lehmpfuhl bedanken, die mit ihren Diplomarbeiten viel zu den Erkenntnissen in dieser Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank auch an Maila Reh für die Unterstützung mit den elektrophysiologischen Messungen und Sasha Kagansky für die Einführung in die Insektenzellkultur. Für die tolle Zusammenarbeit, aufgeschlossenen Diskussionen und das tolle Arbeitsklima möchte ich mich bei Jerry, Boris, Matthias, André, Berti, Tina, Meike, Peter Daldrop, Satoshi, Margrit, Rolf Hagedorn, Heide, Christina, Kyoko, Katja, Petra und Angela Piater bedanken.

Ein Großteil der Kooperationen, die in dieser Arbeit geführt wurden, entstammen der DFG Forschergruppe FOR 526. Ganz besonders möchte ich mich bei Anna Pfeifer und Tilman Kottke für das FTIR-Projekt, Erik Schleicher, Sylwia Kacprzak, Robert Bittl und Stefan Weber für die ESR-Messungen, Ilme Schlichting, Elisabeth Hartmann, Robert Shoeman, Julia Griese und Astrid Jung für Kristallographie, CD und AUZ Untersuchungen, Peyman Zirak und Alfons Penzkofer für die spektroskopische Zusammenarbeit sowie Karin Lanzl, Thomas Langenbacher und Bernhard Dick für die Kurzzeitspektroskopie bedanken. Der gesamten Forschergruppe bin ich sehr dankbar für das tolle Klima und die vielen Anregungen. Der DFG danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Ebenfalls danke ich dem Laserlab Europe an der VU Amsterdam für finanzielle Unterstützung und Cosimo Bonetti und John Kennis für die aufregende Zusammenarbeit und die Einführung in die ultraschnelle Spektroskopie.

Gleichfalls danke ich Marc Kaminski und Maria Mittag sowie Matthias Ziehe für die MS-Analysen, sowie Rainer Cramm für die Bereitstellung seines Spektrometers. Vielen Dank auch an die Mitarbeiter des Fraunhofer Instituts IBMT für die Beherbergung meiner Zellen und meines Schreibtisches zu Beginn der Doktorarbeit, vor allem an Thomas Leya und Beate Morgenstern.

Ein ganz spezieller Dank gebührt natürlich auch meinen Eltern, die mich immer ohne zu zögern in meinen Vorhaben unterstützt haben. Vielen Dank auch an alle meine Freunde und Freundinnen für die Ablenkung vom Forscheralltag.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	ii
Inhaltsverzeichnis.....	iv
Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	5
1.1 Photorezeptoren in biologischen Systemen.....	5
1.2 Blaulichtrezeptoren.....	6
1.3 Aufbau und Photochemie von LOV- und BLUF-Domänen	10
1.4 Mechanismen der Signaltransduktion in LOV- und BLUF-Photorezeptoren.....	15
2 Thema der Arbeit.....	18
3 Heterologe Expression von Volllängenphotorezeptoren.....	19
3.1 Expression in eukaryotischen Systemen.....	19
3.2 Expression von Phototropin in <i>Escherichia coli</i>	22
3.3 Untersuchung der Kinase Mutante X4G.....	36
3.4 Kofaktorzusammensetzung in Volllängen-Phototropin.....	38
3.5 Oligomerisierungsgrad und Stabilität von aufgereinigtem Phototropin.....	39
4 Spektroskopische Eigenschaften von Phototropin.....	42
4.1 Photodynamik des Signalzustandes und Photorezeptor-Kinase-Interaktion.....	42
4.2 Strukturelle Änderungen im Signalzustand von Phototropin.....	48
4.3 Triplett-Zustand in Volllängen-Phototropin.....	52
4.4 Bestimmung der Domänenanordnung in Phototropin.....	58
5 Untersuchungen zur Photochemie von BLUF-Domänen.....	62
5.1 Heterologe Expression von <i>slr1694</i>	62
5.2 Mutationen in der Flavinbindungstasche von Slr1694.....	62
5.3 Kofaktoranalyse von Slr1694.....	65
5.4 Verdrängung von Flavinen in Slr1694.....	68
5.5 Rekonstitution von Slr1694 mit Roseoflavin.....	69
5.6 Photodynamik des Signalzustands von Slr1694.....	71

5.7 Angeregter Zustand von Slr1694.....	72
5.8 Schwingungsspektroskopische Untersuchung des Photozyklus von Slr1694.....	74
6 Diskussion.....	80
6.1 Heterologe Expression von Photorezeptoren.....	80
6.2 Charakterisierung von heterolog aufgereinigtem Phototropin.....	82
6.3 Photochemie und Signaltransduktion von Phototropin.....	83
6.4 Photochemie und Signaltransduktion in BLUF-Photorezeptoren.....	87
7 Material und Methoden.....	96
7.1 Mikrobiologische Methoden und Zellkultur.....	96
7.2 Molekularbiologie.....	101
7.3 Proteinchemische Methoden.....	105
7.4 Spektroskopie.....	114
7.5 Elektrophysiologische Methoden.....	118
7.6 Bioinformatik.....	119
8 Anhang.....	121
8.1 Vektoren.....	121
8.2 Oligonukleotide.....	122
8.3 Chemikalien.....	124
8.4 Abkürzungen.....	125
8.5 Strukturvorhersage von <i>C. reinhardtii</i> Phototropin.....	126
8.6 ESI-MS-Analyse von Roseo-FMN.....	127
8.7 ESI-MS-Analyse von tryptischen Peptiden.....	128
8.8 Homologiesuche zu <i>E. coli</i> cAMP Rezeptorprotein in <i>C. reinhardtii</i>	130
8.9 Abbildungsverzeichnis.....	131
8.10 Tabellenverzeichnis.....	133
9 Literatur.....	134

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die lichtaktivierte Kinase Phototropin aus *Chlamydomonas reinhardtii*, die photoaktivierte Adenylatcyclase (PAC) aus *Euglena gracilis* und das BLUF-Protein Slr1694 aus *Synechocystis sp.* PCC 6803 in Hinblick auf die molekularen Details der primären photochemischen Prozesse sowie der Signalweiterleitung untersucht. Da bisher kein bekannter Volllängenphotorezeptor mit Flavin-Chromophor bestehend aus Rezeptor- und Effektordomäne in hinreichender Menge und Qualität hergestellt oder nativ isoliert werden konnte, wurden heterologe Expressionssysteme verwendet. Sowohl Phototropin als auch PAC konnten mit dem Baculovirus-Expressionssystem in Insektenzellen in geringer Ausbeute an löslichem Protein produziert werden. Durch Solubilisierung von Phototropin mit Hilfe von Arginin wurde die Löslichkeit verbessert und konnte auf die Überproduktion in *E. coli* übertragen werden. Die Kombination von gut regulierter Expression mit dem *tetA* Promotor, Verwendung des *E. coli* Stamms C43(DE3) sowie der Anwendung von Arginin ermöglichte erstmals die Isolierung von Phototropin über einen C-terminalen His-Tag in Milligramm Mengen und in hoher Reinheit (~95%). In Abwesenheit von Arginin wurde zudem eine schwache Assoziation eines globalen Expressionsaktivators von *E. coli* (cAMP Rezeptor Protein) beobachtet und weist auf eine Interaktion mit einer zu diesem homologen cAMP aktivierbaren Serin/Threonin-Kinase aus *C. reinhardtii* *in vivo* hin. Die Kristallisation des Proteins war bisher vermutlich aufgrund seiner Inhomogenität durch hohe Selbstaggregation nicht erfolgreich. Die Entfernung eines flexiblen Bereichs in der Kinasedomäne sowie die Inaktivierung der Kinase durch Entfernung einer Mg^{2+} -koordinierenden Carboxylgruppe (D547N) erreichten laut CD-Schmelzkurven zwar eine höhere thermische Stabilität der Sekundärstruktur, zeigten jedoch keine sonstigen Unterschiede zum Wildtyp.

Spektroskopisch verhielt sich das Volllängenprotein ähnlich wie einzelne LOV-Domänenkonstrukte ohne Kinasedomäne, tendenziell besaß das Volllängenprotein jedoch eine etwas schnellere Dunkeladaption nach Belichtung und eine kürzere Triplettlebensdauer der inaktivierten LOV2-C250S-Domäne. In Anwesenheit von ATP beschleunigte sich die Dunkeladaption und deutet auf eine Photorezeptor/Kinase-Interaktion hin. Der Effekt ist jedoch aufgrund von mangelnder (Auto-)Phosphorylierungsaktivität bzw. ATP-Hydrolyseaktivität auf eine kurzzeitige strukturelle Umordnung in Anwesenheit von ATP zurückzuführen, die noch nicht vollständig interpretiert werden konnte. Durch Anwendung von FTIR-Differenzspektroskopie

wurden strukturelle Änderungen nach Lichtaktivierung beobachtet, die ausschließlich der Kinasedomäne ohne Beteiligung der J α -Helix zugeordnet wurden. Proben, die in Anwesenheit von Arginin präpariert wurden, lieferten geringere und teilweise verschobene Differenzsignale. Aufgrund der Anwesenheit eines assoziierten Proteins in diesen Proben ist eine für die lichtinduzierte Kinaseaktivität notwendige Proteininteraktion wahrscheinlich. Als bisher einziger bekannter struktureller Parameter wurde der intramolekulare Abstand der beiden Photorezeptordomänen über gepulste ESR (ELDOR) Spektroskopie auf etwa 24.8 Å bestimmt.

Die erstmalige Verfügbarkeit von großen Mengen eines Vollängen-Phototropins und die in dieser Arbeit ausgeführte spektroskopische Analyse bietet einen Grundstein für die Aufklärung der Signalweiterleitung in einem modular aufgebauten Photorezeptor. Bis zur Verfügbarkeit einer Kristallstruktur können nun strukturelle Änderungen während der Lichtaktivierung über FTIR-Differenzspektroskopie auf der molekularen Ebene sowie die Domänenanordnung über ESR-Spektroskopie beobachtet werden.

Die Photochemie und Signaltransduktion in BLUF-Photorezeptoren wurden aufgrund seiner einzigartigen spektroskopischen Eigenschaften anhand von Slr1694 und wegen der messbaren lichtabhängigen Enzymaktivität an PAC untersucht. Mutationen in Slr1694 an den semikonservierten Aminosäuren S28, N31 und W91 belegten keine allgemeingültige Funktion dieser Aminosäuren innerhalb der verschiedenen BLUF-Domänen bezüglich der Lebensdauer des Signalzustands. Die Entfernung der Seitenkette von S28 führte zu einer 15 nm Rotverschiebung des Absorptionsspektrums, die vermutlich aus der Verstärkung von konkurrierenden Wasserstoffbrücken anderer Proteinseitenketten zu den Heteroatomen des Kofaktors resultiert. Die Einführung von geladenen Seitenketten an Stelle von N31 führte zu einer Selektivität für die Bindung von FMN und FAD in den aufgereinigten Proteinen und deutet auf eine höhere Stabilität der Kofaktorbindung hin. Die Mutation des konservierten M152 in PAC bestätigte dessen essentielle Rolle für die Signalweiterleitung anhand von indirekter Bestimmung der lichtaktivierten cAMP Synthese-Aktivität mit elektrophysiologischen Methoden.

Zur Herstellung von homogen rekonstituierten oder mit veränderten Kofaktoren ausgestattete BLUF-Domänen wurden Protokolle zur Rekonstitution mit FAD und Flavinanaloga erstellt. Die Rekonstitution von isoliertem Protein gelang mit FAD in Anwesenheit von chaotropen Salzen. Roseoflavin konnte durch Koexpression von Slr1694 mit einem prokaryoti-

schen Flavintransporters zu 60% eingeführt werden. Frühere Experimente mit *E. gracilis* deuteten auf eine Verschiebung des Aktionsspektrum der Phototaxis nach Inkubation mit Roseoflavin hin (Häder, D-P., Lebert, M., 1998), hier konnte jedoch keine lichtinduzierte Signalzustandsbildung beobachtet werden.

Die Beteiligung von Seitenketten an den photochemischen Reaktion in BLUF-Photorezeptoren wurde erstmals direkt durch ultraschnelle IR-Experimente gezeigt. Der Zerfall des angeregten Zustands erfolgt aufgrund der Inhomogenität des Grundzustands multiexponentiell, so dass die erhaltenen transienten IR-Daten mit einem mathematischen Modell auf der Basis von experimentellen Daten aus Pikosekunden-Fluoreszenzmessungen beschrieben werden mussten. Die erhaltenen IR-Differenzspektren zeigten neben der Signatur des Flavinkofaktors auch die Beteiligung der Seitenketten von Y8 sowie Q50. Anhand der zeitlichen Entwicklung der Spektren wurde der langlebige Zustand durch eine 180° Drehung der Amidgruppe von Q50 und einer neuen Wasserstoffbrücke zum C4=O, die vermutlich zwischen der Carbonylgruppe und N5 geteilt ist, sowie einer Wasserstoffbrücke von Y8 zu Q50 beschrieben. Insgesamt tritt eine Stärkung aller Wasserstoffbrücken zum Isoalloxazinring auf und könnte die Rotverschiebung des Signalzustandsspektrums erklären. Details zur Umordnung des Protonennetzwerkes konnten durch die Experimente nicht geklärt werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass sowohl das Elektron wie auch das Proton von Y8 stammt.

1 Einleitung

1.1 Photorezeptoren in biologischen Systemen

Der Großteil der belebten Natur ist von Stoffwechselkreisläufen abhängig, die ihren Ursprung in der Umwandlung von Licht in biologische Energie besitzen. Die Fixierung von Kohlenstoff aus Kohlendioxid in energiereichen Stoffen sowie die Erzeugung von Sauerstoff mit Hilfe des Sonnenlichts ist die Grundlage für die biologische Vielfalt unserer Umwelt. Der dem zu Grunde liegende Primärprozess in Pflanzen ist die Absorption von Licht durch Chlorophyll. Die Photosysteme I und II der Pflanzen nutzen die absorbierte Energie zur Bildung von Kohlenhydraten und Sauerstoff aus CO₂ und Wasser (Arnon, 1971). Die lichtabhängige Reaktion führt direkt zur Spaltung von Wasser und Bildung von NADPH in Photosystem II sowie zum Aufbau eines Protonengradienten über die Thylakoidmembran in Photosystem I. Unter Sauerstoffmangel verwenden einige Mikroorganismen wie das halophile Bakterium *Halobacter salinarium* und marine Eubakterien die lichtbetriebene Protonenpumpe Bakteriorhodopsin, um die oxidative Phosphorylierung zu unterstützen (Oesterhelt *et al.*, 1973). Der über die Membran erzeugte Protonengradient wird direkt zur Erzeugung von ATP verwendet.

Da die elektromagnetische Strahlung der Sonne auch energiereiche und somit schädliche UV-Strahlung beinhaltet, ist für phototrophe Organismen eine kontrollierte Nutzung des Lichtes überlebenswichtig. Für diesen Zweck hat die Natur ein breites Spektrum sensorischer Photorezeptoren entwickelt, die sowohl die Photosynthese optimieren wie auch den Organismus vor Schäden bewahren. Zu diesen zählen Rhodopsine (Grünlicht), Phytochrome (Rotlicht) und die Blaulichtrezeptoren der Cryptochrome, Phototropine (van der Horst *et al.*, 2004) und BLUF-(sensors of blue light using FAD) Photorezeptoren (Gomelsky *et al.*, 2002). Ebenfalls gibt es lichtaktivierte Reparaturproteine, die Photolyasen. Diese verwenden energiereiches Licht zur Spaltung von Pyrimidin-Dimeren in beschädigter DNA (Heelis *et al.*, 1993).

Das Verständnis der Mechanismen und der molekularen Besonderheiten von biologischen Photorezeptoren ist nicht nur für die Grundlagenforschung sondern auch für (bio-)technologische Anwendungen von großem Interesse. Die in der Natur vorkommenden Photorezeptoren zeichnen sich im Gegensatz zu künstlichen Photoelementen aus der Photovoltaik und Photosensorik durch bessere Quanteneffizienz, Sensitivität und hohe Stabilität aus.

1.2 Blaulichtrezeptoren

Blaues Licht reguliert viele Prozesse in höheren Pflanzen wie Phototropismus, Chloroplastenbewegung, Kontrolle von Stoma-Wächterzellen, Blütenentwicklung und Hypokotylwachstum (Briggs *et al.*, 1999). In phototrophen wie auch nicht phototrophen Mikroorganismen steuert blaues Licht Phototaxis und löst photophobe Reaktionen aus. Blaulichtrezeptoren werden in drei Klassen aufgeteilt: Phototropine, Cryptochrome und BLUF-Photorezeptoren. Bei den Cryptochromen handelt es sich um Photolyase-ähnliche Proteine, die jedoch keine DNA-Doppelstrang-Reparaturaktivität aufweisen. Phototropine und BLUF-Photorezeptoren werden in den folgenden Abschnitten tiefergehend erläutert.

1.2.1 Phototropine

Zur Familie der Phototropine zählen Proteine aus Pflanzen sowie aus verschiedenen Mikroorganismen. Phototropine sind in der Regel aus einer oder zwei amino-terminalen LOV-(light-oxygen-voltage) Domänen als Photorezeptoren sowie einer carboxy-terminalen Serin/Threonin- (Pflanzen) oder Histidin-Kinase (Bakterien; Swartz *et al.*, 2007) aufgebaut. Eine ungewöhnliche Variante wurde erstmals in *Adiantum capillus-veneris* gefunden, die zusätzlich zur pflanzlichen Phototropinarchitektur eine N-terminale Phytochrom-Domäne enthält und somit eine Chimäre aus Rot- und Blaulichtrezeptor darstellt (Nozue *et al.*, 1998).

Die am ausführlichsten physiologisch untersuchten Phototropine stammen aus Pflanzen. Dort sind diese Proteine für den Phototropismus sowie für Chloroplastenbewegung und das Öffnen von Stomata verantwortlich. In *Arabidopsis thaliana* und anderen Pflanzen wurde *in vivo* wie auch *in vitro* gezeigt, dass blaulichtinduzierte Phosphorylierung von Proteinen eine wichtige Rolle für die Signaltransduktion spielt. Ein umfassendes Bild der Phototropin-Signalkette ist bisher nicht vorhanden. In *A. thaliana* werden blaulichtinduzierte Ca^{2+} -Ströme (Harada *et al.*, 2006) als eine Komponente sowie die Dephosphorylierung des Proteins NPH3 als eine andere gefunden (Pedmale *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde *in vivo* wie auch *in vitro* eine Interaktion von Phototropin I und NPH3 mit dem Phytochrom-Kinase-Substrat 1 (PKS1) gefunden und deutet auf eine Verknüpfung von Phytochrom- und Phototropinsignalkette hin (Lariguet *et al.*, 2006).

Phototropin aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* besitzt im Gegensatz zu den höheren Pflanzen nur ein Phototropin (Huang *et al.*, 2002). Neben dem Cryptochrom CPH-1 (Reisdorph *et al.*, 2004), welches in zwei verschiedenen Transkripten desselben Gens auftritt, und einem ungewöhnlich blau verschobenen Kanalrhodopsin (ChR2; Nagel *et al.*, 2003), handelt es sich um den vierten bekannten Blaulichtrezeptor in diesem Organismus. Phototropin ist ein 749 Aminosäuren (82 kDa) großes Protein, welches wie seine Verwandten aus zwei N-terminalen LOV-Domänen und einer C-terminalen Serin/Threoninkinase (Proteinkinase A Familie) aufgebaut ist (Abb. 1-1). Im Vergleich zu Phototropinen aus höheren Pflanzen besitzt das Protein einen kürzeren Aminoterminus und einen geringeren Abstand der beiden LOV-Domänen. *C. reinhardtii* Phototropin wird in der löslichen, der Plasma- sowie mikrosomalen Membran- und der Flagellenfraktion gefunden (Huang *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2002). Eine aktuelle Untersuchung des Augenfleckproteoms bestätigte auch dort die Anwesenheit von Phototropin (Schmidt *et al.*, 2006).

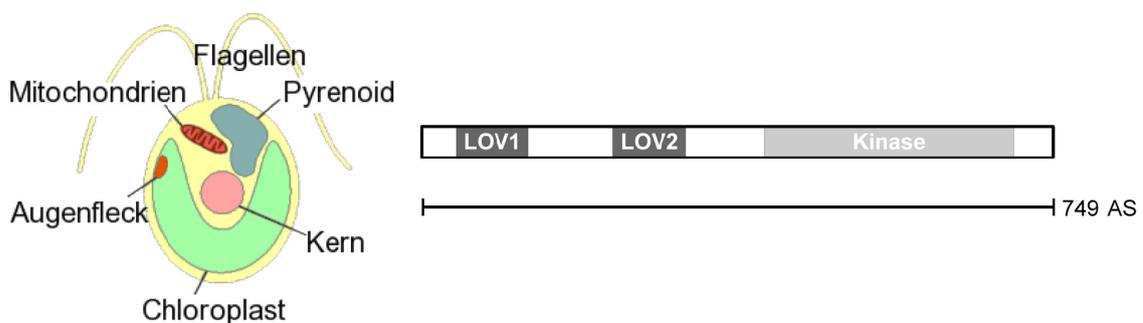


Abbildung 1-1: Aufbau von *Chlamydomonas reinhardtii* und Phototropin.

Phototropin wird in der löslichen, mikrosomalen Membran- und Flagellenfraktion sowie im Augenfleck gefunden. Es besteht aus zwei FMN bindenden LOV-Domänen und einer C-terminalen Serin/Threoninkinase.

In Pflanzen ist die Lokalisierung von Phototropin von den Lichtbedingungen abhängig. In *A. thaliana* befinden sich die Phototropine im Dunkeln an der Plasmamembran (Sakamoto *et al.*, 2002). Unter Blaulichteinwirkung löst sich Phototropin 1 von der Membran und wird im Cytoplasma beobachtet. Phototropin 2 bindet unter diesen Bedingungen über die Kinasedomäne an den Golgi-Apparat der Zelle (Kong *et al.*, 2006).

Physiologische Untersuchungen an *C. reinhardtii* Phototropin belegen mehrere Funktionen bei der geschlechtlichen Vermehrung (Huang *et al.*, 2003; Ermilova *et al.*, 2004). Prä-Gameten entwickeln sich durch Einwirkung von blauem Licht zu sexuell kompetenten, sogenannten reifen Gameten. Dunkeladaptation von reifen Gameten resultiert im Verlust der sexuellen Kompetenz. Ebenfalls wurde Phototropin eine aktivierende Rolle bei der Sporulierung von Zygoten zugewiesen (Yinghong Lu, 2006). Neuere Mikro-Array Daten weisen auf eine Beteiligung von Phototropin an der Regulation der Transkription von Genen für den Chlorophyll- und Carotinoidstoffwechsel hin (Im *et al.*, 2006). Außerdem wird durch Ausschalten von Phototropin eine ansonsten über Rotlicht regulierte Signalkette unterbrochen.

Die Homologie zu Phototropinen der höheren Pflanzen wurde funktionell durch Expression von *C. reinhardtii* Phototropin in einer Phototropin defizienten Mutante von *A. thaliana* nachgewiesen (Onodera *et al.*, 2005). Diese Mutante enthielt weder das endogene Phototropin 1 noch Phototropin 2 und zeigte keine phototropischen Reaktionen. Durch Komplementation mit *C. reinhardtii* Phototropin wurden typische Phototropismus-Reaktionen wie Öffnung von Stoma-Zellen sowie Hypokotyl- und Wurzel-Phototropismus wiederhergestellt. Die Prozesse erforderten jedoch höhere Lichtintensitäten, um dem Wildtyp vergleichbare Resultate zu erzielen.

1.2.2 Blaulichtrezeptoren mit BLUF-Domänen

BLUF-Domänen stellen eine neue Familie von flavinbindenden Domänen dar (Gomelsky & Klug, 2002). Diese wurden bisher nur in prokaryotischen Mikroorganismen mit Ausnahme einer photoaktivierten Adenylatcyclase (PAC) aus *Euglena gracilis* und verwandten Euglenida gefunden (Iseki *et al.*, 2002; Koumura *et al.*, 2004). BLUF-Photorezeptoren existieren als einfache, nur die BLUF-Domäne enthaltende Proteine (Slr1694 (Masuda *et al.*, 2004b), BlrB (Jung *et al.*, 2005), Tll0078 (Fukushima *et al.*, 2005)), als Proteine mit N-terminaler BLUF-Domäne und C-terminaler Effektor-domäne (AppA (Gomelsky & Klug, 2002), YcgF (Rajagopal *et al.*, 2004)) und als komplexe Proteine mit mehreren BLUF- und Effektor-domänen (PAC). Die Aufgaben reichen von der Regulierung der Expression photosynthetischer Gene (AppA) bis zu lichtinduzierter Biofilmbildung (YcgF; persönliche Mitteilung, John Kennis, VU Amsterdam), Phototaxis sowie photophoben Reaktionen (PAC (Ntefidou *et al.*, 2003)).

Die Photoaktivierte Adenylatcyclase (PAC) aus *Euglena gracilis*

Der einzellige, photosynthetisierende Flagellat *Euglena gracilis* und verwandte Euglenida besitzen als einzige bisher bekannte Eukaryoten Proteine mit BLUF-Domänen. Wolken *et al.* postulierten anhand von Aktionsspektren der photoinduzierten Bewegungsreaktion einen Signalweg, der primär von Flavoproteinen reguliert wird (Wolken, 1977). Die Photoaktivierte Adenylatcyclase wurde von Iseki *et al.* erstmals aus dem paraflagellaren Körper (Abb. 1-2) von *E. gracilis* aufgereinigt (Iseki *et al.*, 2002). Dieser zeichnet sich durch seine charakteristische, grüne Autofluoreszenz aus und weist somit auf die Anwesenheit von Flavinen hin (Brodhu *et al.*, 1990; Benedetti, P. A. & Lenci, F., 1977). In einigen photosynthetisch inaktiven Mutanten von *E. gracilis* und in der ebenfalls nicht photosynthetisierenden verwandten *Astasia longa* wurde PAC durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie teilweise entlang der gesamten Flagelle gefunden (Ntefidou *et al.*, 2005). Der Photorezeptor besteht aus zwei homolog aufgebauten Proteinen PAC α und PAC β , die jeweils zwei BLUF-Domänen und zwei Adenylatcyclasedomänen beinhalten (Abb. 1-2). Das Protein liegt als Heterotetramer mit je zwei Untereinheiten PAC α und PAC β vor.

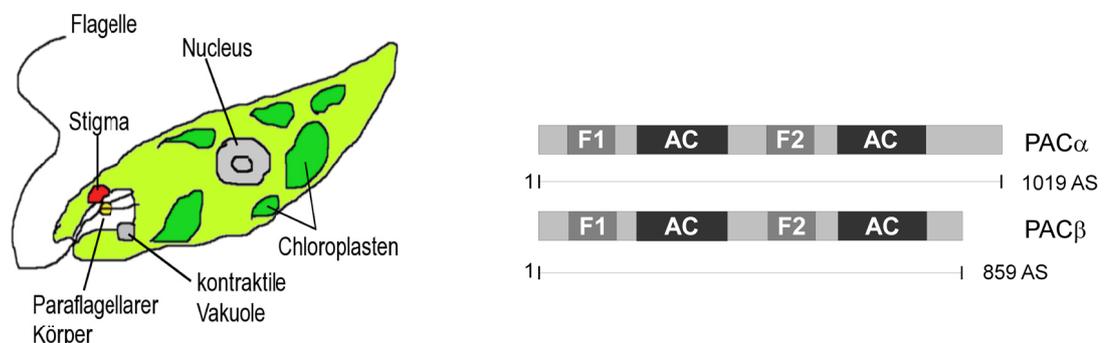


Abbildung 1-2: Aufbau von *Euglena gracilis* und dem Photorezeptor PAC.

Der paraflagellare Körper bildet eine kristalline Struktur die hauptsächlich aus PAC aufgebaut ist. PAC kann aus diesem als Heterotetramer bestehend aus je zwei Untereinheiten PAC α und PAC β isoliert werden. Jede Untereinheit besitzt zwei BLUF-Photorezeptor Domänen (F1/F2) sowie zwei Adenylatcyclasedomänen (AC).

Frühere elektronenmikroskopische Studien zur Struktur des paraflagellaren Körpers beschreiben diesen als geordnete kristalline Struktur (Wolken, 1977; Piccinni *et al.*, 1978). Verwendung von RNA-Interferenz zur Verringerung der Photorezeptormenge führte zu Zellen ohne paraflagellaren Körper. Es ist anzunehmen, dass PAC dort eine wichtige strukturelle Rolle einnimmt bzw. diesen größtenteils bildet. Gleichzeitig verschwanden Phototaxis und

photophobe Reaktionen auf plötzliche Erhöhung von Strahlungsintensität (step up) und identifizierten PAC als verantwortlichen Rezeptor (Iseki *et al.*, 2002).

Aufgrund der Möglichkeit zur lichtinduzierten Bildung von cAMP ist PAC Mittelpunkt einiger biotechnologischer Arbeiten. In Oozyten von *Xenopus laevis* (Schröder-Lang *et al.*, 2007) sowie in *Aplysia* Neuronen (Nagahama *et al.*, 2007) wurde PAC zur Manipulation des cAMP-Spiegels genutzt. In den neuronalen *Aplysia* Zellen wurde damit eine gezielte Veränderung der Form von Depolarisationswellen herbeigeführt.

Slr1694 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803

Slr1694 (PixD, 150 Aminosäuren) aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 besteht aus einer N-terminalen BLUF-Domäne und einem 40 Aminosäuren langen Anhang mit unbekannter Funktion. Die physiologische Funktion des Proteins ist weitgehend unbekannt, es wurde jedoch ein Bezug zum phototaktischen Verhalten des Cyanobakteriums hergestellt. Unter rotem Licht zeigt *Synechocystis* positive Phototaxis, die durch Ausschalten von *slr1694* invertiert wird (Okajima *et al.*, 2005). Wird *slr1694* zusammen mit einem Phytochrom (*cph2*) ausgeschaltet, zeigt das Cyanobakterium im Vergleich zu einer nur Phytochrom defizienten Mutante eine invertierte Phototaxis unter Blaulicht (Fiedler *et al.*, 2005). Eine zuvor angenommene Interaktion mit der Adenylatcyclase Cya1, die von blauem Licht reguliert wird aber keine eigene Photorezeptordomäne besitzt, wurde ausgeschlossen (Masuda *et al.*, 2004a).

Von allen einfachen BLUF-Proteinen wurde Slr1694 aufgrund seiner interessanten spektroskopischen Eigenschaften (Abschnitt 1.3) bisher am gründlichsten untersucht. Dazu zählen zahlreiche FTIR-Studien (Hasegawa *et al.*, 2005; Hasegawa *et al.*, 2004; Masuda *et al.*, 2004b), ultrakurzzeitspektroskopische Untersuchungen (Gauden *et al.*, 2006) und Röntgenstrukturanalyse (Yuan *et al.*, 2006).

1.3 Aufbau und Photochemie von LOV- und BLUF-Domänen

Während die BLUF-Domänenarchitektur eine eigene Familie bildet, die den Ferredoxin-ähnlichen Strukturen zugeordnet wird, gehören LOV-Domänen der Familie der Per-ARNT-SIM-(PAS)-Domänen an (Taylor *et al.*, 1999). Größe und Struktur von LOV- und BLUF-Domänen sind sich jedoch ähnlich (Abb. 1-3). Beide bilden einen hydrophoben Kern aus einem fünfsträngigen anti-parallelen β -Faltblatt und zwei α -Helizes, in den der Isoalloxazin-

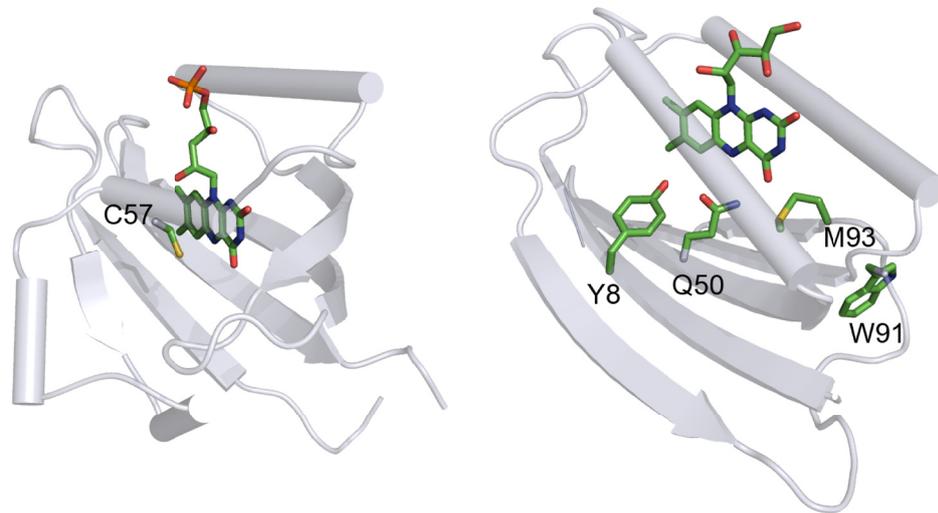


Abbildung 1-3: Struktur von LOV1 aus *C. reinhardtii* und der BLUF-Domäne von Slr1694 aus *Synechocystis*.

Links ist die Struktur von LOV1 aus *C. reinhardtii* (Fedorov *et al.*, 2003) und rechts die der BLUF-Domäne von Slr1694 aus *Synechocystis* (Yuan *et al.*, 2006) abgebildet. Die LOV-Struktur zeigt eine typische PAS-Faltung, in der das Flavin in einem hydrophoben Kern aus fünf β -Faltblättern und zwei α -Helizes eingebettet ist. Gezeigt ist außerdem das reaktive Cystein 57, welches nach Belichtung ein kovalentes Addukt mit der C4a-Position des Isoalloxazinrings bildet. Die BLUF-Domäne ist ebenfalls aus fünf β -Faltblättern und zwei α -Helizes aufgebaut, die einer typischen Ferredoxinanordnung entsprechen. Für die Photochemie der BLUF-Domänen ist Y8 als Elektronen- und möglicher Protonendonator nötig, sowie das konservierte Q50. M93 und W91 werden als kritische Aminosäuren für die Signalweiterleitung diskutiert.

ring des Flavins eingebettet ist. LOV-Domänen binden jedoch fast ausschließlich FMN (mit Ausnahme des *Neurospora crassa* Proteins VVD (Zoltowski *et al.*, 2007)), BLUF-Domänen dagegen hauptsächlich FAD.

LOV-Domänen bilden nach Anregung des Flavinkofaktors innerhalb von wenigen Nanosekunden (Holzer *et al.*, 2002) ein Flavin Triplet (LOV-715) aus dem innerhalb von 0.1 – 200 μ s die Bildung des LOV1 390 Intermediats erfolgt (Abb. 1-4). Bei diesem Intermediat handelt es sich um eine kovalente Bindung zwischen der C(4a) Position am Chromophor und dem Thiol-Schwefel einer Cysteinseitenkette des Proteins. Das kovalente Addukt ist sehr langlebig und zerfällt in einem Zeitraum von Sekunden (*C. reinhardtii* LOV1; *Bacillus subtilis* YtvA ($t_{1/2}$ = 2000s; Losi *et al.*, 2002)) bis mehreren Tagen (*A. thaliana* Flavin-binding Kelch repeat F-box Protein (FKF1; $t_{1/2}$ = 62 h; Zikihara *et al.*, 2006)). Die Quantenausbeute der Signalzustandsbildung schwankt innerhalb der bekannten LOV-

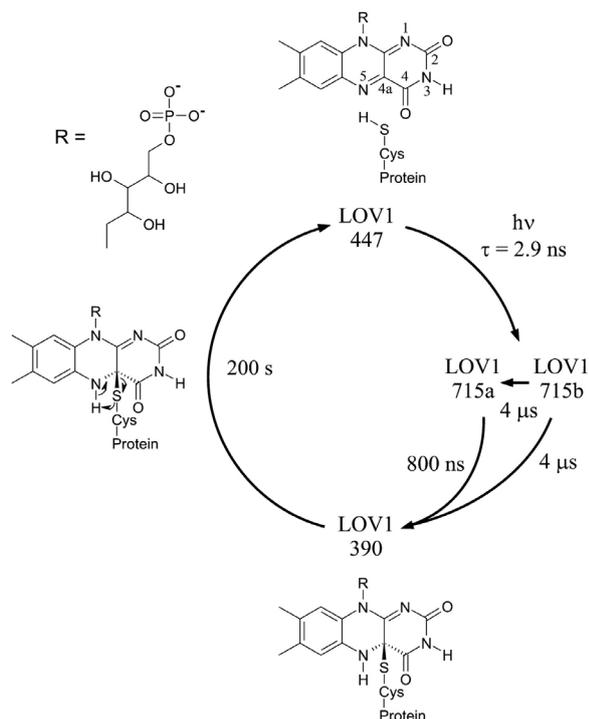


Abbildung 1-4: Photozyklus der LOV1-Domäne (Kottke *et al.*, 2003).

Nach Anregung mit blauem Licht bildet sich aus dem angeregten Zustand über Inter system crossing (ISC) innerhalb von wenigen Nanosekunden das Triplettsystem LOV1(715). Aus diesem wird das kovalente Photoprodukt LOV1(390) zwischen Cystein-Schwefel und Isoalloxazinring gebildet. Dieses Intermediat ist vergleichsweise langlebig und zerfällt thermisch zum Grundzustand unter Spaltung der kovalenten Bindung.

Domänen von weniger als 50% bis zu 90% bei der LOV2-Domäne aus *C. reinhardtii* (Losi *et al.*, 2004; Holzer *et al.*, 2005). Aufgrund der hohen Quantenausbeute in letzterer wird ein zweiter Reaktionsweg postuliert, der direkt aus dem S₁-Zustand erfolgt. Der Mechanismus der Adduktbildung ist nicht vollständig geklärt, jedoch ist entweder eine konzertierte Reaktion oder eine Wasserstoff-Atom Übertragung vom Cystein-Thiol an das Triplettsystem mit anschließender Radikalrekombination wahrscheinlich (Kottke *et al.*, 2003; Schleicher *et al.*, 2004). Der Photozyklus der LOV-Domänen ist weitgehend vollständig beschrieben, jedoch gibt es Hinweise auf weitere Intermediate im Mikrosekundenbereich aufgrund von zeitaufgelösten optischen Rotationsdispersions (ORD)-Experimenten (Chen *et al.*, 2007). Das dort beobachtete Intermediat wird einer partiellen Entfaltung der Domäne zugeschrieben und könnte für die Signalweiterleitung an eine Effektor-domäne wichtig sein.

Der Photozyklus der BLUF-Domänen dagegen erschien zunächst mit UV/vis-spektroskopischen Methoden weitaus undurchschaubarer. In den meisten BLUF-Domänen wird die Bildung eines langlebigen, um etwa 10 nm rotverschobenen Intermediates direkt aus dem angeregten Zustand beobachtet. FTIR-Studien an Slr1694 (Masuda *et al.*, 2004b; Hasegawa *et al.*, 2004), Tll0078 (Okajima *et al.*, 2006) und AppA (Masuda *et al.*, 2005b;

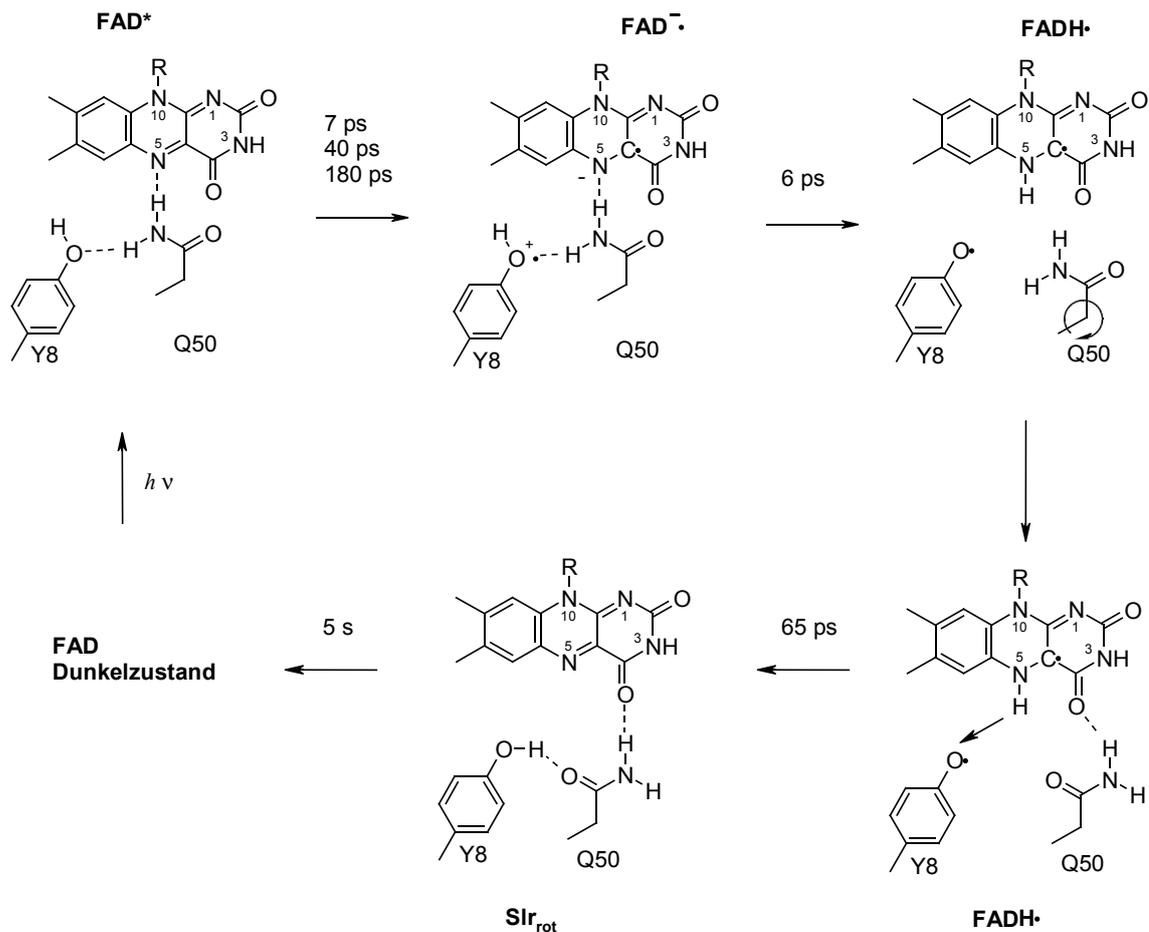


Abbildung 1-5: Photozyklus der BLUF-Domäne von Slr1694 (Gauden *et al.*, 2006).

Nach Belichtung des Chromophors zerfällt der angeregte Zustand (FAD*) multiexponentiell und es entsteht durch Elektronenübertragung von Tyrosin 8 ein anionisches Semichinon (FAD^{•-}). Durch Protonenumordnung in der Bindungstasche bildet sich innerhalb von wenigen Pikosekunden ein neutrales Semichinon (FADH[•]), welches in 65 Pikosekunden über Radikalrekombination und erneute Protonenumordnung in den langlebigen rot verschobenen Signalzustand (Slr_{rot}) übergeht. Während dieses Prozesses dreht sich die Seitenkette von Glutamin 50 um 180° und verändert das Wasserstoffbrückennetzwerk. Der Signalzustand zerfällt thermisch in wenigen Sekunden zum dunkeladaptierten Zustand.

Masuda *et al.*, 2004b) zeigten eine Schwächung der C2=O und C4=O Bindungen im rotverschobenen Zustand und wiesen damit erstmals auf die Bildung neuer Wasserstoffbrücken zum Flavin hin. Auf der ultraschnellen Zeitskala wurde der Photozyklus von Slr1694 durch zwei weitere, semichinonische Intermediate beschrieben (Abb. 1-5; Gauden *et al.*, 2006). Aus dem angeregten Zustand entsteht durch Elektronenübertragung vom Protein ein anionisches Flavinsemichinon, welches durch nachfolgende Protonenübertragung in ein neutrales Semichinon überführt wird. Die Quelle der Elektronen scheint ein konserviertes Tyrosin (Abb. 1-3/1-5) zu sein (Kraft *et al.*, 2003; Laan *et al.*, 2003; Hasegawa *et al.*, 2005), der Protonenspender ist bisher noch nicht eindeutig identifiziert. Durch die Protonierung an N5 wird

vermutlich die Wasserstoffbrücke zwischen Q50 und N5 des Flavins aufgehoben und gibt diesem konformationelle Freiheit (Anderson *et al.*, 2005). Das neutrale Semichinon recombiniert mit dem Radikal des Elektronenspenders und gibt sein Proton über nicht näher bestimmte Pfade wieder ab. In diesem Zuge rotiert die Amidgruppe des konservierten Glutamins um 180° und verändert somit das Wasserstoffbrückennetzwerk in der Flavinbindungstasche. Dabei entsteht eine neue Wasserstoffbrücke zum C4=O des Flavins. Dieser Zustand könnte das rotverschobene Intermediat darstellen, welches in Sekunden bis Minuten thermisch zerfällt.

Die mechanistischen Einzelheiten der Protonenübertragungen sowie das Zustandekommen der Rotverschiebung sind Themen der aktuellen Forschung. Spektroskopische Untersuchungen mit FTIR- und Ramanspektroskopie in Kombination mit theoretischen Berechnungen konnten zum bisherigen Stand beitragen (Unno *et al.*, 2006). Als mögliche Protonenquelle sind die Triade um H72, R71 und D69 (Teresa Majerus *et al.*, 2007) sowie die Aminosäuren S10, Y8 und S28 in der Diskussion (Abb. 1-6). Kompetitiver Elektronentransfer von W91 wurde in AppA gezeigt (Gauden *et al.*, 2007; Laan *et al.*, 2006). W91 und M93 treten in Kristallstrukturen in zwei verschiedenen Konformationen auf und sind möglicherweise für die

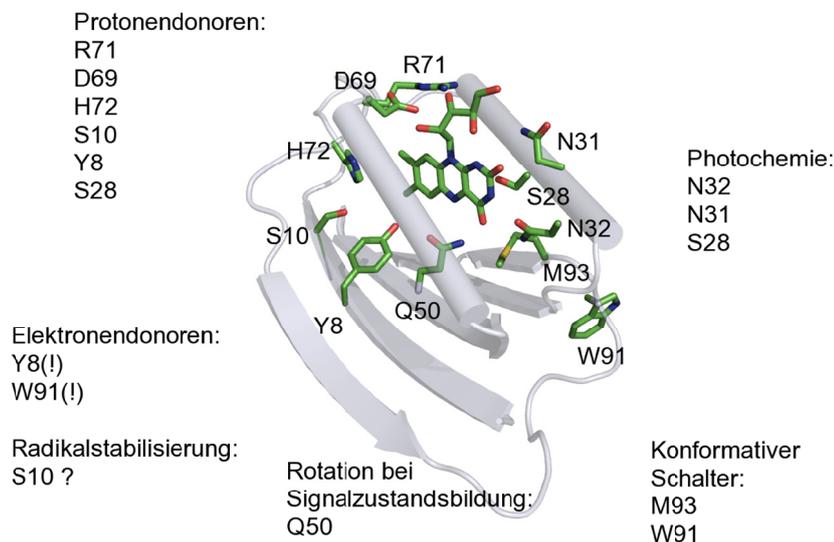


Abbildung 1-6: Umgebung der Flavinbindungstasche in Slr1694.

Neben den für die Photochemie essentiellen Aminosäuren Y8 und Q50 sind weitere möglicherweise relevante Aminosäuren abgebildet. H72, R71, D69, S10, S28 und Y8 sind mögliche Protonendonoren. Y8 und W91 wurden bereits als Elektronendonoren identifiziert. N31 und N32 in der Nähe der Carbonyl-Sauerstoffatome könnten die Photochemie beeinflussen sowie zur Signaltransduktion beitragen. W91 und M93 werden in zwei unterschiedlichen Konformationen gefunden und als Schalter für die Signalweiterleitung betrachtet.

Signalweiterleitung relevant. N31 sowie N32 befinden sich in der Nähe der Carbonylgruppen des Isoalloxazinringes und werden ebenfalls als Teilnehmer an Photochemie und Signaltransduktion (Jung *et al.*, 2005) gehandelt.

1.4 Mechanismen der Signaltransduktion in LOV- und BLUF-Photorezeptoren

Im Gegensatz zu Photorezeptoren der Photosynthese, Bakteriorhodopsin und Photolyasen nehmen die Kofaktoren der sensorischen Blaulicht-Photorezeptoren meist nicht direkt an den Reaktionen teil, sondern leiten das Signal über Veränderungen in der Proteinkonformation weiter. Die strukturellen Änderungen vor allem bei den LOV- und BLUF-Domänen sind dabei sehr klein und schwierig zu untersuchen bzw. zu bewerten.

In den LOV-Domänen werden zur Zeit mehrere Modelle besprochen (Abb. 1-7). Harper *et al.* schreiben auf der Basis von NMR-spektroskopischen Untersuchungen und *in vitro* Autophosphorylierungsversuchen der sogenannten $J\alpha$ -Helix, die der LOV2-Domäne in den Phototropinen anhängt, eine wichtige Rolle für die Signaltransduktion zu (Harper *et al.*, 2003). Nach Belichtung entfaltet sich diese und führt eventuell strukturelle Änderungen im Gesamtprotein herbei. Dies wird unterstützt durch zeitaufgelöste TG-(transient grating)-Messungen an LOV2 mit und ohne $J\alpha$, in denen eine Volumenzunahme der LOV-Domäne

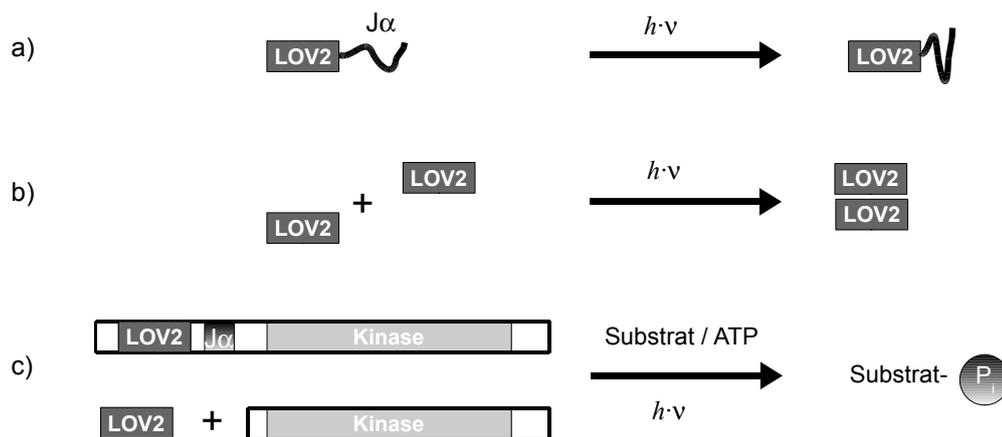


Abbildung 1-7: Modelle zur Signaltransduktion in Phototropin.

a) Lichtinduzierte Änderungen in der Sekundärstruktur und Übertragung auf die $J\alpha$ -Helix. b) Inter-/intramolekulare Interaktion von Photorezeptordomänen. c) Interaktion von Photorezeptordomäne und Effektdomäne ohne Beteiligung von $J\alpha$.

mit $J\alpha$ innerhalb von wenigen Millisekunden beobachtet wird (Nakasone *et al.*, 2007a). Ein anderes Modell von Matsuoka *et al.* (Matsuoka *et al.*, 2005) wiederum deutet aufgrund von Pull-down-Experimenten und Kinaseaktivitätsmessungen auf eine Interaktion und Regulierung von freier LOV2-Domäne und freier Kinasedomäne ohne Beteiligung von $J\alpha$ hin.

Ebenfalls nicht auszuschließen ist die Bildung von signaltransduktorisch aktiven Di- oder Multimeren. Studien an YtvA (Buttani *et al.*, 2007) und *A. thaliana* LOV2 (Nakasone *et al.*, 2006) weisen auf lichtinduzierte Dimerisierungen hin. Diese könnten den aktiven Zustand darstellen oder auf Wechselwirkung mit anderen Proteinen hindeuten. In YtvA wurden zudem in kristallographischen Untersuchungen lichtinduzierte Änderungen in der relativen Anordnung zweier Proteine in einem Dimer beobachtet (Möglich *et al.*, 2007).

Bei den BLUF-Domänen ist die Situation ebenfalls weitgehend unklar. Han *et al.* zeigten, dass der Austausch von BLUF-Domänen zwischen verschiedenen Proteinen keinen Einfluss auf deren Funktionalität hat (Han *et al.*, 2004). Die F1-Domäne von PAC α ersetzte die Funktion der AppA BLUF-Domäne in *Rhodobacter sphaeroides* und legt somit einen universellen Mechanismus der Signaltransduktion innerhalb der Rezeptorfamilie nahe. In AppA und YcgF wurden durch TG-Messungen Hinweise auf lichtinduzierte Tetramer- bzw. Dimerisierungen gefunden (Hazra *et al.*, 2006; Nakasone *et al.*, 2007b). Diese könnten auf eine mögliche inter- bzw. intramolekulare Interaktion der Photorezeptordomänen in PAC sowie auf die vermuteten Signalzustände in den kleineren BLUF-Proteinen hinweisen.

Strukturelle Untersuchungen an AppA und Slr1694 zeigten zudem mehrere unterschiedliche Konformationen, denen jedoch bisher kaum bzw. wenige physiologische Daten noch spektroskopisch beobachtete Zustände zugeordnet werden konnten (Jung *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2006). Befunde durch FTIR-Spektroskopie weisen auf eine wichtige Rolle eines semikonservierten Tryptophans (W91 in Slr1694, Abb. 1-6) am Rand der Bindungstasche hin (Masuda *et al.*, 2007; Masuda *et al.*, 2005a). Durch Mutation dieser Aminosäure wurde der Photozyklus erheblich beschleunigt und bestimmte Beiträge im Sekundärstrukturbereich in den Infrarotspektren wurden nicht mehr beobachtet. In den Strukturen der AppA-BLUF-Domäne von Jung *et al.* wurden zwei stark unterschiedliche Konformationen gezielt kristallisiert. Die Kristallstruktur von Slr1694 enthält ähnliche Abweichungen bei den einzelnen Molekülen der asymmetrischen Zelle. Die Unterschiede der zwei Konformationen sind besonders deutlich für die Orientierung des oben genannten Tryptophans, dessen Seitenkette einmal in die hydrophobe Bindungstasche des Chromophors ragt und einmal in Richtung hydrophile

Außenseite zeigt. Die Seitenkette des Tryptophans tauscht dabei mehr oder weniger den Platz mit einem hoch konservierten Methionin. Yuan *et al.* weisen der eingebetteten Tryptophan-konformation aufgrund von Messungen der Tryptophanfluoreszenz den Dunkelzustand zu.

Funktionelle Studien, die die Rolle dieser Aminosäuren bestätigen, sind bisher aus Mangel an geeigneten Experimenten kaum vorhanden. Masuda *et al.* schließen aufgrund von biochemischen Interaktionsstudien auf eine wichtige Rolle des Tryptophan 104 in AppA (Masuda *et al.*, 2007). Die meisten ausführlich spektroskopisch charakterisierten BLUF-Proteine besitzen, wenn überhaupt, keine leicht untersuchbare Effektordomäne.

Die α -Untereinheit der Photoaktivierten Adenylatcyclase dagegen besitzt eine messbare Aktivität, ist jedoch aufgrund des komplexen Aufbaus ein schwer durchschaubares System. Adenylatcyclasen der Klasse III sind in der Regel als (Hetero-)Dimere aktiv. Die zwei aktiven Taschen des Enzyms werden dabei aus zwei Adenylatcyclasedomänen gebildet. Die pH-aktivierte Cyclase Rv1264 aus *Mycobacterium tuberculosis* besitzt eine N-terminale pH-sensitive Domäne, die unter alkalischen Bedingungen die Interaktion der Untereinheiten des funktionalen Dimers stört und somit die Cyclase-Aktivität unterdrückt (Tews *et al.*, 2005).

Die Kombination von beiden PAC Untereinheiten α und β ist für die blaublichtinduzierte cAMP Bildung nicht nötig, so dass von einem für die Funktion nötigen Heterodimer abgesehen werden kann (Schröder-Lang *et al.*, 2007). Anhand von Aktivitätsmessungen an PAC mit mutierten Cyclasedomänen konnte gezeigt werden, dass beide Cyclasedomänen für die Aktivität notwendig sind und ein funktionelles Dimer bilden (persönliche Mitteilung, Georg Nagel, Universität Würzburg). Die Aktivität der Cyclasen wird dabei von beiden BLUF-Domänen reguliert. Die relative Gewichtung der Rezeptordomänen im Aktivierungsprozess ist dabei noch nicht eindeutig geklärt, die F2-Domäne scheint jedoch einen geringeren Beitrag zu leisten.

2 Thema der Arbeit

Modular aufgebaute Blaulichtrezeptoren wie Phototropine und PAC bestehen aus mehreren Photorezeptor- und Effektor-domänen, die das empfangene Signal in biochemische Informationen umwandeln. Diese Signalweiterleitung erfolgt unter anderem durch (Auto-)Phosphorylierungsreaktionen oder Bildung von Botenstoffen als Folge der Lichtanregung. Die Anwendung von solchen lichtaktivierten Enzymen besitzt ein großes Potential als nicht-invasives Werkzeug zur Manipulation von Zellen in der Grundlagenforschung sowie für Anwendungen auf dem Gebiet der Neurophysiologie und Neurobiotechnologie. Zur molekularen Betrachtung der photoinduzierten Signalweiterleitung und auch zur gezielten Anpassung der Proteine ist ein tieferes Verständnis der Interaktion von Photochemie und Signaltransduktion nötig. Die Mechanismen der Photoaktivierung in flavinoiden Blaulichtrezeptoren unterscheiden sich grundlegend von denen schon länger untersuchter Photorezeptoren wie Rhodopsinen und Phytochromen. Die Chromophore der Blaulichtrezeptoren nehmen meist nur indirekt an der Signalweiterleitung teil und sind auf die Beteiligung des umgebenden Proteins angewiesen. Die dabei auftretenden Änderungen der Proteinkonformation in den Rezeptordomänen sind sehr klein sowie schwierig nachzuweisen und zu interpretieren. Aufgrund der komplizierten und aufwendigen Herstellung ausreichender Mengen an solchen Vollängenrezeptoren wurden bislang nur einzelne Domänen untersucht. Um jedoch die Mechanismen der Signaltransduktion zu verstehen, sind biochemische und spektroskopische Untersuchungen am gesamten Protein zwingend notwendig.

Ziel der Arbeit war es, geeignete Expressionssysteme für die Herstellung der Vollängenproteine von Phototropin aus *C. reinhardtii* und PAC aus *E. gracilis* in ausreichender Qualität für die Kristallisation zu finden (Abschnitt 3). An diesen Proteinen sollten die molekularen Mechanismen der Signaltransduktion komplementär mit biochemischen und spektroskopischen untersucht werden (Abschnitt 4). Zur Aufklärung der bislang nur indirekt und unvollständig beschriebenen Beteiligung der Proteinumgebung an den photochemischen Prozessen in BLUF-Domänen sollten gezielte Veränderungen der Flavinbindungstasche untersucht, Rekonstitutionsprotokolle für die Einführung von Flavinanaloga etabliert und spektroskopische Methoden in verschiedenen spektralen Regionen angewendet werden. Die photochemischen Prozesse in BLUF-Domänen sollten anhand von Slr1694 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 mit ultraschnellen Infrarot Messungen aufgeklärt werden (Abschnitt 5).

3 Heterologe Expression von Vollängenphotorezeptoren

Um Proteine in geeigneter Menge für kristallographische und spektroskopische Untersuchungen herzustellen, kann auf verschiedene Methoden zurückgegriffen werden. Konstitutiv gebildete Proteine und solche, die zu bestimmten Zeitpunkten in großer Menge vorhanden sind, können in der Regel aus dem jeweiligen Organismus direkt gewonnen werden. Ein typisches Beispiel ist die Aufreinigung von Photosystem-Komplexen (Sane *et al.*, 1970) oder Proteinen der Atmungskette (Baillie *et al.*, 1971). Existieren molekularbiologische Protokolle für diese Organismen, können gezielt veränderte Proteine hergestellt und durch Anfügen von Affinitäts-Markierungen Aufreinigungsprozeduren vereinfacht werden. Viele Proteine, besonders solche mit sensorischen und regulierenden Aufgaben und Eigenschaften, existieren nur in geringer Zahl pro Zelle. In diesem Fall werden heterologe Expressionssysteme herangezogen, die eine Überexpression des jeweiligen Gens ermöglichen. Die heterologe Expression ist am erfolgreichsten, wenn das Wirtssystem dem ursprünglichen Organismus sehr ähnlich ist. Dies zeigt sich vor allem an der unterschiedlichen Kodonnutzung verschiedener Organismen wie auch an der Art der posttranslationalen Modifizierungen. In den folgenden Abschnitten wird die Expression von Vollängenphotorezeptoren in einem eukaryotischen sowie in einem prokaryotischen System beschrieben. Ein Großteil der Abhandlung wird auf die Überproduktion und Aufreinigung aus *E. coli* eingehen, die für die nachfolgenden Experimente verwendet wurde.

3.1 Expression in eukaryotischen Systemen

Ein gängiges System zur Überexpression in eukaryotischen Zellen stellen neben Hefen Insektenzellen dar (Doerfler, 1986). Diese besitzen im Vergleich zu Hefen und Bakterien einen posttranslationalen Modifizierungsapparat, der den meisten eukaryotischen Zellen sehr ähnlich ist. Die Kultivierung kann adhärent sowie in Suspension erfolgen. Insektenzellen wachsen bei Temperaturen von 4–28°C, optimal sind 27°C, und benötigen keine CO₂-Begasung. Dies und die leichte Anpassung an serumfreie Bedingungen ermöglichen eine im Vergleich zu anderen Zellkultursystemen unaufwendige Kultivierung. Als Wirte dienen Epithel-Zellen aus dem Darmgewebe von Mottenlarven (*Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*).

Die Überexpression wird über für diese Zellen spezifische Viren, den sogenannten Baculoviren (*Autographica californica multiple nucleopolyhedrovirus*), eingeleitet. Baculoviren enthalten ein etwa 130 kBp großes circuläres Genom, welches auch in *E. coli* vermehrt und molekularbiologisch bearbeitet werden kann. Durch Transposition eines Fremdgens unter die Kontrolle des Polyhedrin-Promotors in der baculoviralen DNA, kann diese durch liposomale Transfektion von Insektenzellen eingebracht werden und zur Herstellung von rekombinanten Baculoviren verwendet werden. Die Viren vermehren sich in einem zweistufigen Reproduktionszyklus. Im ersten werden unverhüllte, sogenannte Budding viruses (BV; Abknospung) über die Zellmembran ins Medium abgegeben und können durch Endocytose Nachbarzellen infizieren. Diese bestehen hauptsächlich aus der viralen DNA und einer Membranhülle. Im späten Zyklus werden sogenannte Okklusionskörperchen gebildet, die mehrere Viren mit Polyhedrin einhüllen. Dieser Zyklus ist lysogen und führt am Ende zur Zerstörung der Zelle. Der Polyhedrin-Promotor wird zu Beginn dieses Zyklus aktiviert und sorgt für eine hohe Überexpression des Fremdgens. Die überproduzierte Proteinmenge kann bis zu 30% der zellulären Gesamtproteinmenge betragen. Das Baculovirus-System verbindet die einfache Molekularbiologie von *E. coli* mit einer einfachen Kultivierung von höheren eukaryotischen Zellen.

3.1.1 Expression von Phototropin, PAC α und PAC β in Insektenzellen

Aufgrund der schlechten Löslichkeit von *C. reinhardtii* Phototropin nach Überproduktion in *E. coli* und der verschwindend geringen Expressionsrate von PAC in *E. coli* (nicht gezeigt) wurden anfänglich Insektenzellen als Expressionssystem verwendet. Für die Expression von *C. reinhardtii* Phototropin in Insektenzellen wurde das Gen aus pGEM-HeReg-*phot* mit *EcoRI* und *HindIII* ausgeschnitten und in den Donor-Vektor pFastBac-HTa eingefügt. *Pac α* wurde aus pGEM-HE-*pac α* mit *NotI* und *NcoI*, *pac β* aus pGEM-HE-*pac β* mit *SacII/NotI* ausgeschnitten und in pFastBac-HTa eingefügt. Zur Transposition der Gene in Baculovirus-DNA wurden DH10BacTM mit den Donor-Vektoren transformiert und über Blau/Weiß Selektionierung rekombinante Klone ausgewählt. Nach Überprüfung der Baculovirus-DNA durch PCR wurden Sf9-Zellen mit den rekombinanten Bacmiden liposomal transfiziert. Aus dem Medium wurde nach 72 h die erste rekombinante Baculoviruslösung gewonnen werden, deren Viruskonzentration durch wiederholte Infektion von frischen Zellen und Ernte des Mediums erhöht wurde. Expressionsversuche wurden mit High-FiveTM-Zellen in 24er Multiwell-Platten

durchgeführt. Verschiedene Verdünnungen der Viruslösung wurden getestet und Proben zu unterschiedlichen Zeiten nach der Infektion genommen. Die Proben wurden per SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abb. 3-1).

Die Expression von Phototropin war bereits nach 72 h durch Coomassie-Färbung sichtbar. Die Expressionsrate war sehr hoch und der Anteil an überproduziertem Protein wurde auf etwa 15 – 20% der zellulären Gesamtproteinmenge geschätzt. Die Zellen waren aufgrund der hohen Konzentration an proteingebundenen Flavinen gelb-grünlich gefärbt und zeigten eine typische LOV-Domänen Fluoreszenz. PAC α und PAC β wurden in geringeren Mengen hergestellt und konnten nur per Western Blot nachgewiesen werden. Die Antikörper gegen PAC α und vor allem PAC β zeigten mehrere Banden. Bei PAC α handelt es sich vermutlich um Abbauprodukte, die über die Dauer des Experiments zunahmen. Das Hauptprodukt lag in der erwarteten Größe. Der Antikörper für PAC β zeigte starke Kreuzreaktionen (s. Kontrolle). Es sind jedoch auch mehrere spezifische Banden erkennbar, bei denen es sich vermutlich ebenfalls um Abbauprodukte handelt. Aufgrund der geringen Expressionsrate wurden keine Aufreinigungsversuche mit PAC α /PAC β durchgeführt.

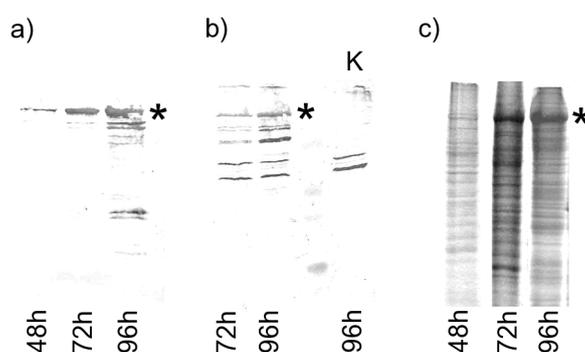


Abbildung 3-1: Expressionsanalyse von Baculovirus infizierten Insektenzellen.

In a) und b) sind Western Blots gegen C-terminale Peptide von PAC α bzw. PAC β in überproduzierenden High-Five™ Zellen (K = Kontrolle, nicht infizierte Zellen) abgebildet. Die Expression ist in beiden Fällen schon ab 72 h in der richtigen Größe von etwa 105 und 90 kDa (*) deutlich. Nach 96 h sind außerdem Abbauprodukte sichtbar. c) zeigt Coomassie-gefärbte SDS-PAGE Gele von Phototropin produzierenden Zellen. Nach 72 h ist bereits fast die höchste Expression des etwa 85 kDa großen Proteins erreicht (*).

Für die Aufreinigung von Phototropin wurden 20 ml (T-75) Kulturen angelegt. Die Zellen wurden entweder durch Einfrieren und langsames Auftauen oder durch Ultraschall aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt. Im Überstand wurde kein überproduziertes Protein gefunden. Solubilisierungsversuche mit 1 M Arginin und 0.7% CHAPS zeigten eine deutlich erhöhte Löslichkeit (Abb. 3-2). Die Ausbeute an löslichem Protein war jedoch für eine Aufreinigung in diesem Maßstab (1 – 2 g Zellmasse) und für die beabsichtigten Zwecke zu gering. Die Erkenntnisse zur Wirkung von Arginin und Detergenzien auf die Löslichkeit von heterolog überproduziertem Phototropin konnten, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, auch bei der Überproduktion in *E. coli* angewendet werden.

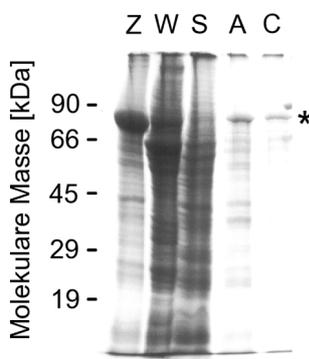


Abbildung 3-2: Solubilisierung von Phototropin aus Insektenzellen.

Das SDS-PAGE Gel zeigt die Proteinzusammensetzung von Baculovirus infizierten High-Five™ Insektenzellen (Z), dem überstehenden Medium (W) und der löslichen Fraktion (S). Erhöhung der Löslichkeit wurde durch Inkubation der unlöslichen Fraktion mit 1 M Arginin (A) und 0.7% CHAPS (C) erreicht.

3.2 Expression von Phototropin in *Escherichia coli*

Der bekannteste und meist eingesetzte Vertreter heterologer Expressionssysteme ist das Bakterium *Escherichia coli*. Aufgrund seiner einfachen Handhabung werden viele Proteine in diesem hergestellt. Die jeweiligen Gene werden dazu extrachromosomal auf Plasmiden unter Verwendung verschiedener Promotoren in einen geeigneten Stamm eingeführt. Für die stärkste Überexpression werden Phagenpromotoren in Verbindung mit Phagen-RNA-Polymerasen verwendet (Kay Terpe, 2006). Der Promotor des T7-Phagen wird dabei unter die Kontrolle eines modifizierten *E. coli lac*-Promotors (*lacUV5*) gestellt (Grossman *et al.*, 1998). Gleichzeitig wird chromosomal die T7-RNA-Polymerase, die ebenfalls unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors steht, eingeführt. Durch Zugabe von Laktose oder Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) ins Medium, wird der *lac*-Repressor von der DNA gelöst, die T7-RNA-Polymerase synthetisiert und von dieser anschließend die RNA des zu überexprimierenden Gens hergestellt. Das T7-System wird meist mit dem *lacUV5* Promotor aber auch mit

dem noch stärkeren *tac*-Promotor verwendet (Boer *et al.*, 1983). Letzterer ist ein Hybrid aus *lacUV5* und *trp* Promotor, der sich durch noch höhere Expressionsstärke auszeichnet. Die Expressionsstärke in diesen Systemen lässt sich nur geringfügig durch die Menge an Induktionsmittel steuern.

Die einfache Expression in einem prokaryotischen System hat jedoch auch Nachteile. Dadurch dass Transkription und Translation nicht durch Zellkompartimente getrennt sind, kommt es vor allem bei starker Überexpression zu einer lokalen Anhäufung von teilweise nicht zu Ende oder falsch gefalteten Proteinen (A. Villaverde, 2003). Diese können aggregieren und sogenannte Einschlusskörper (inclusion bodies) bilden und somit die Ausbeute deutlich senken. Die inclusion bodies bestehen neben den überproduzierten Proteinen auch aus ribosomalen Proteinen und Hitzeschockproteinen (Carrió *et al.*, 2002). Es ist jedoch auch möglich, dass Proteine aufgrund ihrer Beschaffenheit in ihrer nativen Form in die unlösliche Fraktion geraten (González-Montalbán *et al.*, 2007).

Ein weiterer Nachteil von *E. coli* im Vergleich zu eukaryotischen Systemen sind dessen wenig ausgeprägten Möglichkeiten zur posttranslationalen Modifizierung von Proteinen. Diese können ausschlaggebend für die Aktivität des Proteins sein.

3.2.1 Solubilisierung von Phototropin aus inclusion bodies mit Arginin

Da unlösliches Phototropin aus Insektenzellen durch Zugabe von Arginin solubilisiert werden konnte, lag es nahe, dieses Verfahren auch bei der Überproduktion von Phototropin in *E. coli* anzuwenden. Als Ausgangspunkt der Expression in *E. coli* diente ein bereits vorhandenes Konstrukt HisMal-*phot*. Das Konstrukt beinhaltet ein N-terminal fusioniertes Maltosebindeprotein. Zwischen Fusionsprotein und Phototropin befindet sich ein 12×His-Tag. Die Expression erfolgte in BL21(DE3) in der logarithmischen Wachstumsphase durch Induktion des *tac*-Promotors mit 0.3 mM IPTG bei 18°C. Nach 16 h wurden grünlich fluoreszierende Zellen geerntet, die auf eine erfolgreiche Überproduktion des Proteins hindeuteten. Da sich der Hauptteil des Proteins in der unlöslichen Fraktion befand, wurde der Überstand verworfen und der unlösliche Rest mit 2 M Arginin enthaltenden Puffer resuspendiert. Nach Rühren über Nacht wurde die lösliche Fraktion präpariert, die deutliche Flavin Fluoreszenz zeigte. Die Argininkonzentration wurde durch Dialyse gegen Arginin-freien Puffer auf etwa 50 mM verringert. Das Dialysat wurde auf eine Nickel-NTA-Säule aufgetragen und wie beschrieben präpariert. Ein signifikanter Anteil schien nicht an der Säule zu binden und wurde im Durch-

fluss gefunden. Da die gesammelten Fraktionen einen großen Anteil an Verunreinigungen durch andere Proteine zeigten, wurde das Eluat über die spezifischere Amylose-Säule weiter aufgereinigt. Die Reinheit verbesserte sich leicht, es konnten jedoch sehr deutlich drei Proteine per SDS-PAGE beobachtet werden (Abb. 3-3). Ein Anteil des Proteins bindet ebenfalls nicht an Amylose und wurde im Durchfluss gefunden, ein weiterer Teil verblieb auf der Säule und konnte nicht eluiert werden.

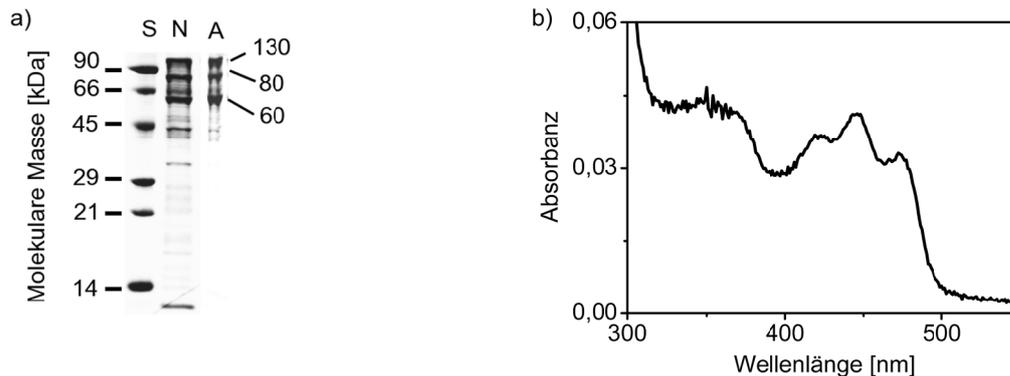


Abbildung 3-3: Aufreinigung von MBP fusioniertem Phototropin aus *E. coli*.

In a) ist die Proteinzusammensetzung (SDS-PAGE) des Eluats einer Nickel-NTA-Säule (N) und einer darauf folgenden Amylose-Säule abgebildet. Als Größenvergleich ist ein Massenstandard (S) mit den angegebenen Größen aufgetragen. Neben der Vollängenbande bei etwa 130 kDa sind noch weitere Banden bei 80 kDa und 60 kDa zu sehen. Das Eluat der Nickel-NTA Säule enthält außerdem noch weitere niedermolekulare Verunreinigungen. b) zeigt das Absorptionsspektrum des Eluats der Amylose-Säule.

Das UV/vis-Spektrum des Eluats (Abb. 3-3b) zeigt die charakteristische Form eines Spektrums von LOV-Domänen. Das Spektrum ist jedoch aufgrund von Streuung durch die Probe bei niedrigen Wellenlängen nach oben verzerrt. Dies deutet wiederum auf mangelnde Probenqualität durch starke Aggregation der Proteine hin. Die erhaltenen Proben neigten dazu, nach längerer Zeit auszufallen. Die Ausbeute aus etwa 20 g Zellen betrug nach der ersten Säule etwa $0.8 \text{ OD}_{450} \cdot \text{ml/cm}$ ($\sim 4 \text{ mg}$), nach der zweiten $0.2 \text{ OD}_{450} \cdot \text{ml/cm}$ ($\sim 1 \text{ mg}$).

3.2.2 Expression von Fusionskonstrukten zur Erhöhung der Löslichkeit von Phototropin

Eine gängige Möglichkeit zur Verbesserung der Löslichkeit und damit der Ausbeute von heterolog produzierten Proteinen ist die Fusion mit gut löslichen und gut herstellbaren Proteinen. Diese werden meist N-terminal an das Expressionskonstrukt angefügt. Als Fusionspro-

teine für Phototropin wurden Maltosebindeprotein (Mbp), NusA und GST verwendet. Das *phot*-Gen wurde aus pGEM-HeReg-*phot* über *EcoRI* und *HindIII* in pMal-p2x, pET28a(+), pASK-IBA-7p kloniert. Die Klonierung in pETM60 und pBADM30 erfolgte über *NcoI* und *HindIII*.

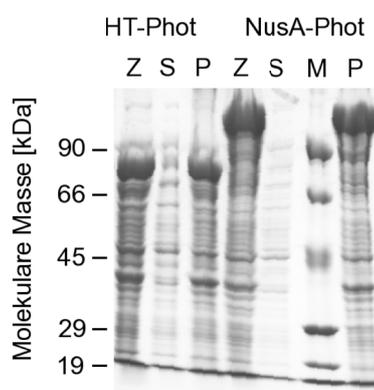


Abbildung 3-4: Überproduktion von Phototropin mit dem Fusionsprotein NusA.

Vergleich der Expression und Löslichkeit von Phototropin bei Expression mit pET28a(+)-*phot* (HT-Phot) und pETM60-*phot* (NusA-Phot). Das SDS-PAGE Gel zeigt die Proteinzusammensetzung der jeweiligen Zellen (Z), der löslichen Fraktion (S) und der unlöslichen Fraktion (P). Spur M zeigt einen Größenstandard. Bei HT-Phot (~ 85 kDa) sind im Gegensatz zu NusA-Phot (~ 140 kDa) lösliche Anteile erkennbar.

Die Expression aller Konstrukte wurde in vergleichbarer Stärke erreicht, die pET- und HispMal-Vektoren erreichten eine etwas höhere Überproduktion. Die Löslichkeit verbesserte sich jedoch mit keinem der verwendeten Fusionsproteine. In Abbildung 3-4 sind vergleichend die Expression und die Löslichkeit von Phototropin und NusA-fusioniertem Phototropin exemplarisch dargestellt. Die Expressionsrate ist vergleichbar hoch, die löslichen Anteile scheinen jedoch geringer als beim unfusioniertem Protein. Da auch das bis zu diesem Zeitpunkt verwendete Maltosebindeprotein keine Verbesserung in der Löslichkeit zeigte, wurde weiter ohne Fusionsproteine gearbeitet. Tabelle 3-1 zeigt eine Übersicht über Expression und Ausbeute von verschiedenen Konstrukten.

Vektor	Protein	Mr [kDa]	Expression	Ausbeute
HispMal- <i>phot</i>	Mbp-Xa-10×His-TEV-Phot	128	++	+
pMal-p2x- <i>phot</i>	Mbp-Xa-Phot	127	+	n.b.
pETM60- <i>phot</i>	NusA-6×His-TEV-Phot	139	++	n.b.
pBADM30- <i>phot</i>	6xHis-GST-TEV-Phot	111	+	n.b.
pET28a(+)- <i>phot</i>	6xHis-Thrombin-T7-Phot	85	++	++
pASK-IBA-7plus- <i>phot</i>	Strep-Tag II-Xa-Phot	85	+	++

Tabelle 3-1: Fusionskonstrukte zur Expression von Phototropin in *E. coli*.

Übersicht über Expressionskonstrukte und deren Expressionsstärke bzw. Ausbeute bei der Aufreinigung:

+ vorhanden, ++ gut, n.b. nicht bestimmt.

3.2.3 Solubilisierung von Phototropin aus inclusion bodies mit chaotropen Substanzen

Zur weiteren Optimierung der Ausbeute wurde die Wirkung von Arginin auf die Löslichkeit des Proteins untersucht. Teile der unlöslichen Fraktion wurden in Anwesenheit von 2 M Arginin, 2 M KCl und 2 M Guanidin über Nacht inkubiert. Nach Ultrazentrifugation wurden Proben der löslichen und unlöslichen Fraktion per SDS-PAGE (Abb. 3-5) analysiert. Der Überstand der mit Guanidin und Arginin behandelten Proben war im Gegensatz zu den KCl- und unbehandelten Proben deutlich gelb gefärbt. Die Solubilisierungsversuche zeigten, dass es sich bei der Löslichkeit in Anwesenheit von Arginin nicht um einen Salzeffekt sondern um einen Arginin-spezifischen Effekt handelt. In Anwesenheit des stark chaotropen Guanidins ist die Löslichkeit ebenfalls erhöht. Dieser Effekt könnte jedoch auch auf Denaturierung zurückzuführen sein.

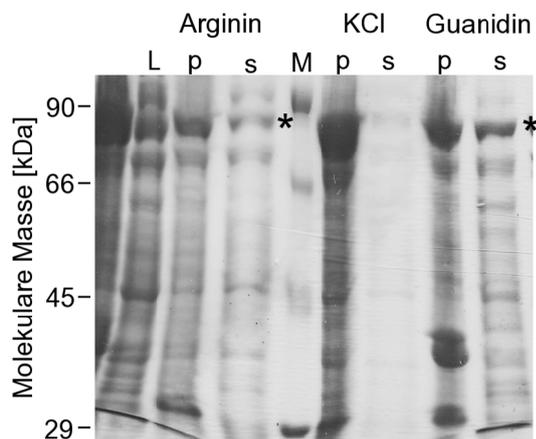


Abbildung 3-5: Solubilisierung von Phototropin (pET28a(+)-*phot*) aus inclusion bodies.

Das SDS-PAGE Gel zeigt das Lysat (L) und die unlöslichen (p) und löslichen (s) Fraktionen von inclusion bodies die mit 2 M Arginin, 2 M KCl und 2 M Guanidin behandelt wurden. Im Falle von Arginin und Guanidin ist im Gegensatz zu KCl eine deutliche Erhöhung der Löslichkeit der etwa 85 kDa großen Bande von Phototropin (*) zu beobachten (vgl. Größenstandard (M)).

3.2.4 Solubilisierung von Phototropin mit Detergenzien

Da in Insektenzellen eine Erhöhung der Löslichkeit von Phototropin in Anwesenheit des Detergenzes CHAPS (Abschnitt 3.1.1) beobachtet wurde, folgten Vorversuche zur Solubilisierung von Phototropin aus der unlöslichen Fraktion und der Membranfraktion von *E. coli*. Anhand von Emissionsspektren der solubilisierten Fraktionen können zum einen die Ausbeute sowie auch die Qualität der solubilisierten Proteine untersucht werden. In Anwesenheit von DDM und CHAPS zeigte der Überstand deutliche, charakteristische LOV-Domänen Emission und deutet somit auf eine erfolgreiche Solubilisierung von intakten LOV-Domänen hin (Abb. 3-6). Per SDS-PAGE konnte die verbesserte Löslichkeit aufgrund der geringeren Sensitivität im Vergleich zur Fluoreszenzspektroskopie nicht entdeckt werden. Die Steigerung der

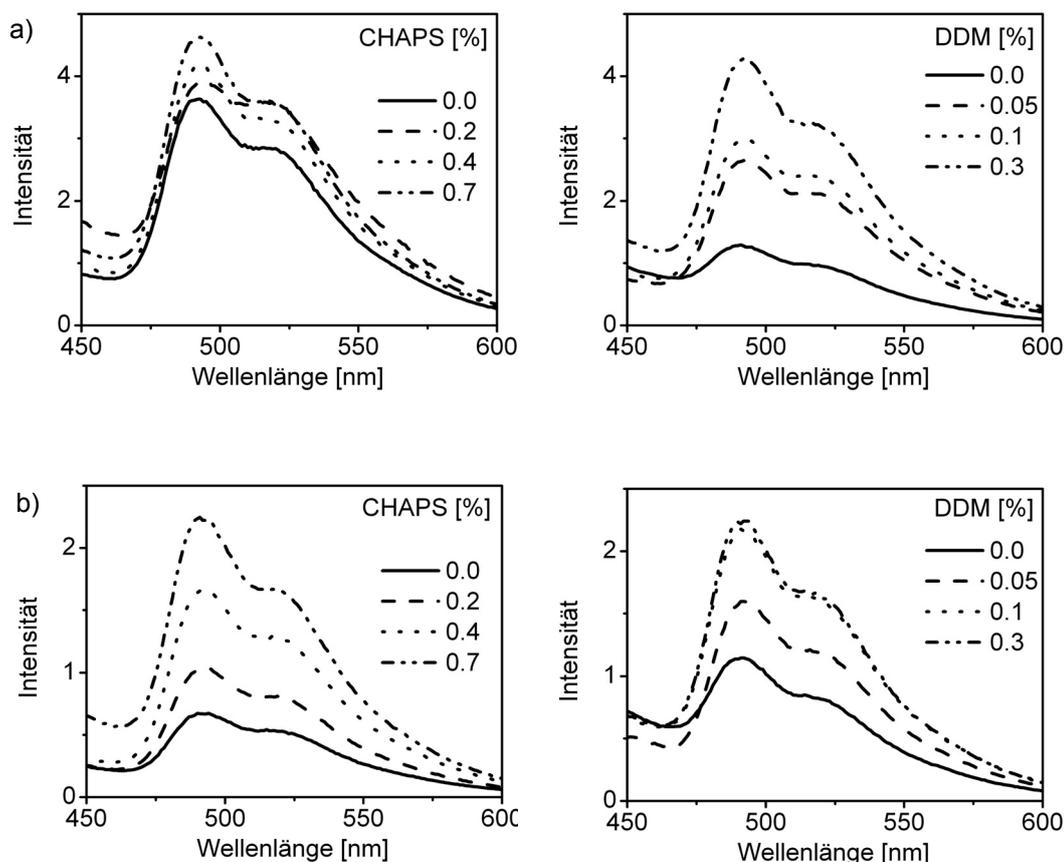


Abbildung 3-6: Solubilisierung von Phototropin mit Detergenzien.

Die Versuche wurden mit a) inclusion bodies und b) Plasmamembranen aus *E. coli* durchgeführt. Abgebildet sind die Fluoreszenz-Emissionsspektren der löslichen Fraktion bei einer Anregung von 350 nm nach Behandlung von inclusion bodies und Plasmamembranen mit CHAPS und DDM. Die Emissionsspektren zeigen die für LOV-Domänen typische Form mit einem Maximum bei 495 nm und einer Schulter bei etwa 525 nm. DDM wirkt im Gegensatz zu CHAPS solubilisierend auf Phototropin in inclusion bodies. Die Löslichkeit nach Inkubation der Plasmamembranen mit Detergenz ist vergleichsweise geringer, was unter anderem an der geringen Menge an Protein in dieser Fraktion liegt. Bei den Plasmamembranen scheint CHAPS das effektivere Solubilisierungsmittel zu sein.

Löslichkeit aus der unlöslichen Fraktion war mit DDM größer als bei CHAPS. Die Membranfraktionen hingegen zeigten eine vergleichbare Steigerung der Löslichkeit mit beiden Detergenzien.

Eine vollständige Präparation in Anwesenheit von 0.1% DDM nach dem Zellaufschluss brachte keine nennenswerte Erhöhung der Ausbeute. Zudem ließ sich beobachten, dass bereits aufgereinigtes Phototropin bei Zugabe von 0.01% – 0.1% DDM innerhalb von kurzer Zeit ausfiel. Die Zugabe von Detergenzien ist daher eine weniger optimale Methode zur Solubilisierung bzw. Stabilisierung des Proteins in Lösung.

3.2.5 Optimierung der Expressionsbedingungen

Aufgrund der Eigenschaften der bakteriellen Proteinbiosynthese (siehe oben) tragen die Stärke und Regulierbarkeit der verwendeten Promotoren ebenfalls zur Qualität des produzierten Proteins bei. Daher wurden Vektoren mit unterschiedlichen Promotoren in Hinblick auf die Ausbeute an löslichem Protein getestet.

Im Gegensatz zu *lacUV5* und *tac* Promotoren, die eine sehr hohe jedoch schwer regulierbare Expression ermöglichen, können ebenfalls Vektoren mit dem *E. coli* eigenen Arabinose-Promotor (Guzman *et al.*, 1995) oder dem *tetA*-Promotor (Skerra, 1994) verwendet werden. Beide benötigen keine chromosomal kodierte RNA-Polymerase, sondern können in jedem *E. coli* Stamm durch Zugabe von Arabinose bzw. Anhydrotetracyclin (AHT) gesteuert werden. Die Expressionsstärke des Arabinose-Promotors lässt sich sehr genau über einen sehr breiten Bereich über die Menge des Induktionsmittels regulieren. Der *tetA*-Promoter hat den großen Vorteil in *E. coli* sehr geringe Basalaktivität zu zeigen.

Bei der Expression mit laktoseinduzierbaren Promotoren wurde in LB Medien eine starke basale Expression festgestellt (Abb. 3-7). Die Verwendung von *tetA* Promotoren dagegen zeigte unter denselben Bedingungen eine strenge Regulierung der Expression.

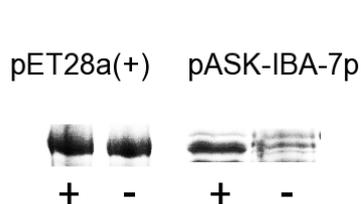


Abbildung 3-7: Überproduktion von Phototropin in *E. coli* BL21(DE3) mit verschiedenen Promotoren.

Ausschnitt aus SDS-PAGE Gelen nach Überexpression mit *lacUV5* Promoter in pET28a(+) und *tetA* Promotor in pASK-IBA-7p über Nacht bei 18°C. Die basale Expression in pET28a(+) ist in der Größenordnung der induzierten Expression. pASK-IBA-7p zeigt hingegen keine basale Expression.

Durch Verwendung von Autoinduktionsmedien für laktoseinduzierbare Promotoren (Studier, 2005) konnte die basale Expression ebenfalls unterdrückt und etwas mehr lösliches Protein erhalten werden (Tab. 3-2, S. 35). Solche Medien beinhalten Glucose, die reprimierend auf die Induktion durch ebenfalls vorliegende Laktose wirkt. Die Induktion erfolgt erst, nachdem die Glucose von den Bakterien verstoffwechselt wurde. Über das Verhältnis von Glucose zu Laktose wird der Induktionszeitpunkt auf eine möglichst hohe Zelldichte in der logarithmischen Wachstumsphase gelegt. Zudem enthalten die verwendeten Medien (ZYM)

einen Phosphat-Puffer, so dass eine Übersäuerung des Mediums verhindert wird und die Zellen zu höheren Dichten wachsen. Im Vergleich zu normalen LB Medien (2 g / 800 ml) wurde die Menge an Zellen in sogenannten ZYM Medien um das fünffache (10 g / 800 ml) gesteigert. Da die Verwendung des etwas schwächeren *tetA*-Promotors (pASK-IBA Vektoren) dennoch mehr lösliches Protein lieferte (Tab. 3-2), wurden die nachfolgend beschriebenen Expressionen mit einem *tetA*-Promotor in dem gepufferten, reichhaltigen ZYM-505 ohne Autoinduktion durchgeführt.

Da fremde Proteine oft toxisch auf den Wirt wirken können, wurden die Stämme C41(DE3) und C43(DE3) zur Expression verwendet (Miroux *et al.*, 1996). Es handelt sich dabei um Punktmutanten von BL21(DE3), die eine höhere Toleranz gegenüber toxischen Proteinen zeigen. Die Ausbeute an löslichem Protein konnte unter Verwendung von C43(DE3) um den Faktor 2 – 4 gesteigert werden (Tab. 3-2, S. 35).

3.2.6 Translations-Stopps bei der Überproduktion von Phototropin

Die Aufreinigung der pASK-IBA Konstrukte (Abb. 3-9) erfolgte zunächst über den N-terminalen Strep-Tag II. *E. coli* wurden in ZYM-505 kultiviert und die Proteinproduktion mit AHT bei 18°C induziert. Die optimierten Expressionsbedingungen ermöglichten eine Verkürzung der Aufreinigungsprozedur. Im Lysepuffer wurden direkt 250 mM Arginin bzw. teilweise kein Arginin (Abschnitt 3.2.8) zugesetzt. Die Aufreinigung erfolgte über den N-terminalen Strep-Tag II und ergab 0.5 – 1 OD₄₅₀·ml/cm (1.7 – 3.4 mg) aus 10 g Zellen.

N-terminal gereinigte Proben enthielten neben dem Volllängenprotein noch zwei weitere Proteine mit einer Größe von etwa 45 kDa und etwa 19 kDa (Abb. 3-8). Die Proteinfragmente sind vermutlich identisch zu den ebenfalls N-terminal aufgereinigten Proteinen von Mbp-fusioniertem Phototropin aus Abschnitt 3.2.1. Das Proteingemisch ließ sich mit Größenausschlusschromatographie trennen und lieferte vier Hauptfraktionen. Ein großer Teil des Volllängenproteins eluierte im Ausschlussvolumen der Säule als komplexes Gemisch mit der 45 kDa Verunreinigung. Nach etwa 45 ml wurde das Volllängenprotein eluiert. Die nachfolgenden zwei Fraktionen enthielten die kleineren Proteine. Beide Fraktionen enthielten Flavin und zeigten Photozyklusaktivität nach Belichtung mit blauem Licht. Es handelt sich also um LOV-Domänen enthaltende Proteine. Die 19 kDa Fraktion stellte im molaren Vergleich den größten Anteil dar. Die absoluten Mengen der einzelnen Fragmente variierten in verschiedenen Präparationen.

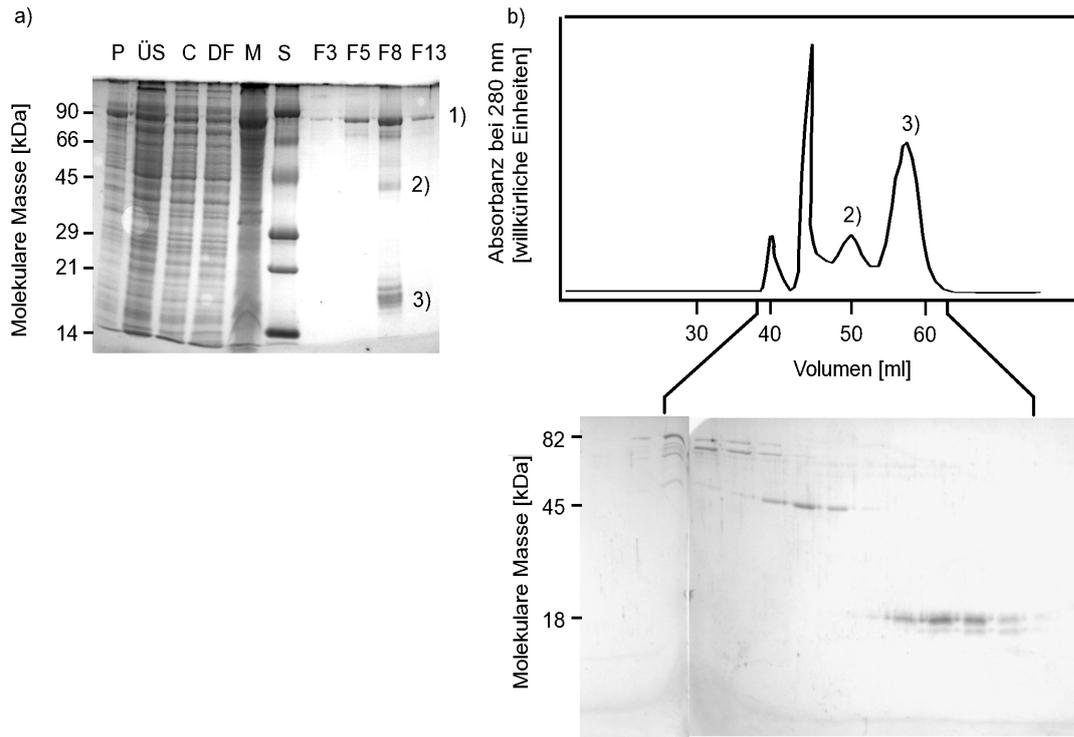


Abbildung 3-8: N-terminale Aufreinigung von Phototropin (pASK-IBA-7p-*phot*).

a) zeigt die Präparationsübersicht anhand von SDS-PAGE Proben der unlöslichen Fraktion (P), des Überstands nach Zentrifugation bei $16'000 \times g$ (ÜS), des Cytosols nach Ultrazentrifugation (C), des Durchflusses der Säule (DF) und der Membranfraktion (M). Die Fraktionen der Elution von der Nickel-NTA Säule (F3-F13) zeigen das aufgereinigte Protein (vgl. Größenstandard (S) bei 90 kDa). Volllängenprotein (1) wurde in großer Menge jedoch mit zwei deutlichen Verunreinigungen bei etwa 45 kDa (2) und 18 kDa (3) gewonnen (F8). b) zeigt das Chromatogramm einer Gelfiltration (Sephacryl S100HR) mit vier Hauptfraktionen. Die Proteinzusammensetzung der Fraktionen ist darunter abgebildet und zeigt nahe des Ausschlussvolumens bei etwa 40 ml ein Gemisch aus Volllängenprotein und 45 kDa Verunreinigung. Darauf folgen eine reinere Fraktion an Volllängenprotein, mehrere Fraktionen der Verunreinigung bei 45 kDa. Das 19 kDa Protein kann in größerer Menge deutlich abgetrennt werden. Alle Fraktionen zeigen LOV-Domänen Absorption und Emission sowie Photozyklusaktivität.

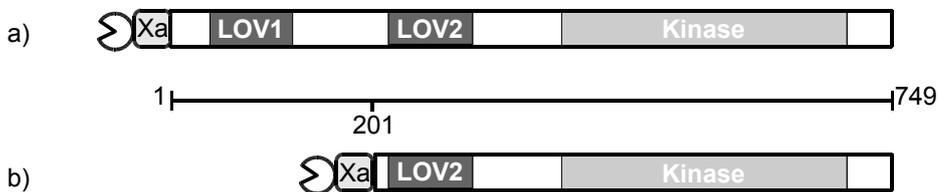


Abbildung 3-9: Aufbau eines um LOV1 verkürzten Phototropin-Konstruktes: LOV2-STK.

Das Gen für das Konstrukt wurde per PCR von Aminosäurenposition 201 bis 749 hergestellt und in pASK-IBA-7p kloniert. Beide Konstrukte enthalten einen N-terminalen Strep-Tag II (Σ) sowie eine Faktor Xa Schnittstelle.

Ein für die Untersuchung der Signaltransduktion zum Volllängenprotein gleichwertiges Konstrukt ohne LOV1-Domäne wurde per PCR ab Aminosäure 201 aus dem Wildtyp Gen hergestellt (LOV2-STK) und in pASK-IBA-7p kloniert (Abb. 3-9). Das Protein wurde wie das Volllängenprotein aufgereinigt. Die Expressionsrate sowie die Ausbeute ($0.3 - 0.5 \text{ OD}_{450} \cdot \text{ml/cm}$ pro 10 g Zellen ($1.5 - 2.5 \text{ mg}$)) waren geringer als beim Volllängenprotein. Ebenfalls war die Stabilität des Proteins in Lösung geringer und das Protein neigte zur irreversiblen Aggregation. SDS-PAGE Analyse zeigte außer einem assoziierten etwa 70 kDa großen Protein, das per Massenspektrometrie Hsp70 oder einer vermuteten Transformylase zugeordnet wurde (siehe Anhang), noch ein etwa 17 kDa großes Protein. Dieses konnte durch Gelfiltration abgetrennt werden und stellte sich neben dem hohen Flavin/Protein-Verhältnis anhand der Absorptionsspektren als LOV-Domäne heraus (Abb. 3-10).

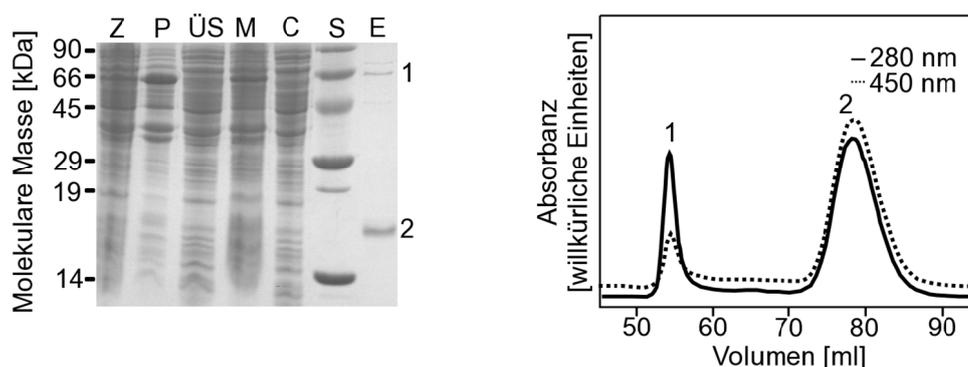


Abbildung 3-10: N-terminale Aufreinigung des LOV2-Kinase Proteins.

Die Präparationsübersicht anhand von SDS-PAGE Proben der unlöslichen Fraktion (P), des Überstands nach Zentrifugation bei $16'000 \times g$ (ÜS), des Cytosols nach Ultrazentrifugation (C) und der Membranfraktion (M). Das Eluat der Nickel-NTA Säule (E) zeigt das aufgereinigte Protein (vgl. Größenstandard bei 66 kDa (S)). Diese Präparation zeigt neben dem LOV2-Kinase Protein (a) eine große Menge eines kleinen etwa 17 kDa großen Proteinfragments (b), welches mit Gelfiltration (Sephacryl S100HR) abgetrennt werden kann. Die Detektion erfolgte bei 280 und 450 nm. Das Verhältnis der Absorption von 280/450 nm weist auf das Vorhandensein von viel Flavin pro Proteinmenge im Fragment im Gegensatz zum gesamten Protein hin.

Die Befunde der N-terminalen Aufreinigung von Volllängen- sowie des LOV2-Kinase-Konstruktes weisen auf diskrete Bruchstellen zwischen LOV1 und LOV2 sowie zwischen LOV2 und Kinasedomäne hin. Da bei der C-terminalen Aufreinigung komplementäre Fragmente nicht auftauchten (Abschnitt 3.2.7), handelt es sich vermutlich um ein Abbrechen der Translation in diesen Regionen (Abb. 3-11). Die Mischung aus Volllängenprotein und photochemisch funktionalen Bruchstücken nach N-terminaler Aufreinigung ist für eine spektrosko-

pische Charakterisierung ungeeignet. Ebenfalls sind solche Proben zu komplex für eine erfolgreiche Kristallisation.

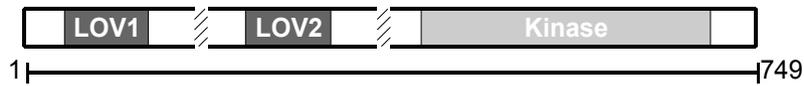


Abbildung 3-11: Abbruchstellen der Translation bei Überproduktion von Phototropin in *E. coli*.

Aus den Gelfiltrationsexperimenten von N-terminal aufgereinigtem Volllängenprotein und LOV2-Kinase Konstrukten wurden zwei mögliche Abbruchstellen für die Translation postuliert. Diese befinden sich zwischen LOV1 und LOV2 sowie LOV2 und Kinasedomäne.

3.2.7 Ein-Schritt Aufreinigung von Phototropin

Da die N-terminale Aufreinigung zu einem Gemisch aus N-terminalen Bruchstücken führte, wurden C-terminale Affinitätsmarkierungen eingeführt. Die Isolierung über das C-terminale Ende des Proteins sollte reines Volllängenprotein ergeben.

Ein C-terminaler Strep-Tag II wurde durch Verkürzung des C-terminus' um 22 Aminosäuren eingeführt (Abb. 3-12b). Dazu wurde ein Stück aus pET28(a)+*phot* mit *Pf123I* und *HindIII* ausgeschnitten und ein synthetisches Fragment eingeführt. Leider ließ sich das Konstrukt nicht in löslicher Form herstellen. Eine Umklonierung in den *tetA*-Vektor pASK-IBA-43 über *EcoRI* und *HindIII* lieferte ebenfalls keine Verbesserung (Abb. 3-12c).

Ein C-terminaler 6×His-Tag wurde in pASK-IBA-7p-*phot* und pASK-IBA-7p-LOV2-STK auf dieselbe Weise ohne Verkürzung des Konstrukts eingefügt (Abb. 3-12d). Dieses Konstrukt wurde wie in Abschnitt 3.2.6 überproduziert und ließ sich in löslicher Form herstellen. Die Aufreinigung des Proteins über Nickel-NTA ergab sehr reines Protein in großer Ausbeute (Abb. 3-13). Die Ausbeute wurde im Vergleich zur N-terminalen Aufreinigung verdoppelt (Tab. 3-2, S. 35). Analytische Gelfiltration (Sephacryl S200HR) lieferte die Elution von zwei Hauptfraktionen mit identischer Proteinzusammensetzung nach SDS-PAGE (nicht gezeigt). Bei der ersten handelte es sich um höher-aggregiertes Protein nahe des Ausschlussvolumens. Die Ausbeute des LOV2-Kinase-Konstruktes wurde ebenfalls erhöht (Tab. 3-2, S. 35). Die Aufreinigung enthielt wie das N-terminal aufgereinigte Konstrukt eine etwa 70 kDa große Verunreinigung (Hsp70 oder eine Transformylase, siehe Anhang) (Abb. 3-14). Die Anwesenheit eines mit dem hergestellten Protein assoziierten Hitzeschock-

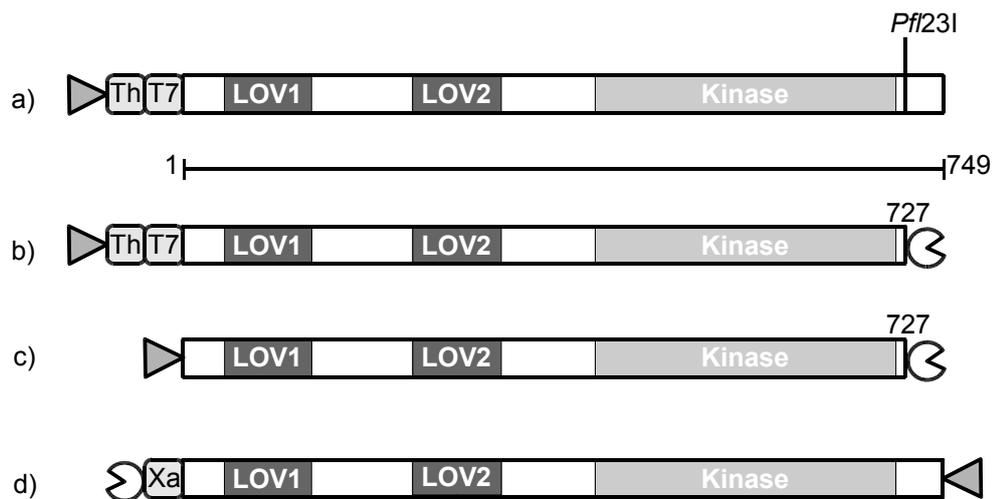


Abbildung 3-12: Expressionskonstrukte für die Überproduktion von Phototropin in *E. coli*.

a) pET28a(+)-*phot* besteht aus einem N-terminalen 6×His-Tag (▶) einer Thrombin-Schnittstelle (Th) und einem T7-Tag (T7). In a) wurde unter Verkürzung des C-Terminus ein Strep-Tag II (⊙) eingeführt und ergab Konstrukt b). Dieses Konstrukt wurde in pASK-IBA-43p umkloniert c). N-terminal gibt es in diesem Konstrukt nur einen 6×His-Tag. Für die C-terminale Aufreinigung wurde Konstrukt pASK-IBA-7p-*phot-HTc* verwendet d). Dieses Konstrukt beinhaltet einen N-terminalen Strep-Tag II und eine Faktor Xa Schnittstelle. C-terminal wurde ohne Verkürzung des Proteins ein 6×His-Tag eingeführt.

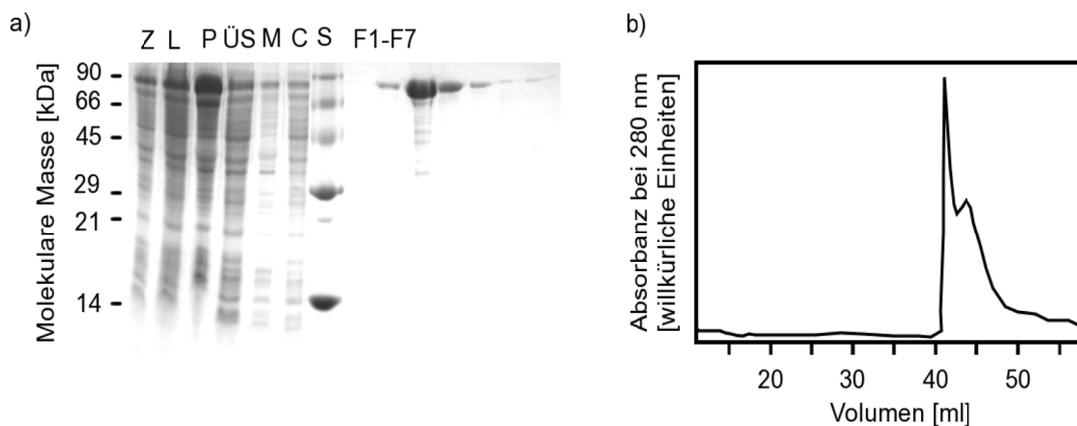


Abbildung 3-13: C-terminale Aufreinigung von Volllängen-Phototropin (pASK-IBA-7p-*phot-HTc*).

Das SDS-PAGE Gel a) zeigt die Proteinzusammensetzung von ganzen Zellen (Z), dem Lysat (L), unlöslicher Fraktion (P), Überstand nach Zentrifugation bei $16'000 \times g$ (ÜS), Membranfraktion (M) und Cytosol (C). Die Fraktionen des Eluats einer Nickel-NTA Säule F1-F7 zeigen eine hohe Menge an Volllängenprotein in hoher Reinheit (vgl. Größenstandard (S) bei 90 kDa). (b) Gelfiltration über eine Sephacryl S200HR Säule zeigt zwei Hauptfraktionen nahe des Ausschlussvolumens der Säule.

proteins weist auf Schwierigkeiten bei der Proteinfaltung hin. Ebenso wie im N-terminal gereinigten Konstrukt war das Protein weniger stabil als das Volllängenprotein und neigte zur Aggregation.

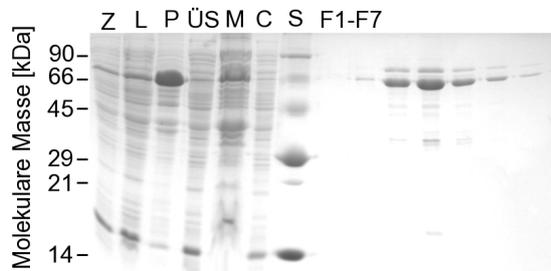


Abbildung 3-14: C-terminale Aufreinigung des LOV2-Kinase Konstrukts (pASK-IBA-7p-LOV2-STK_HTe).

Das SDS-PAGE Gel zeigt die Proteinzusammensetzung von ganzen Zellen (Z), dem Lysat (L), unlöslicher Fraktion (P), Überstand nach Zentrifugation bei $16'000 \times g$ (ÜS), Membranfraktion (M) und Cytosol (C). Die Fraktionen des Eluats einer Nickel-NTA Säule (F1-F7) zeigen eine hohe Menge an LOV2-Kinase-Protein in hoher Reinheit bei etwa 66 kDa (vgl. Größenstandard (S) bei 66 kDa). Zusätzlich ist ein 70 kDa großes Protein als Verunreinigung zu sehen.

3.2.8 Aufreinigung von Phototropin mit und ohne Arginin

Die in Abschnitt 3.2.7 beschriebenen Expressionsbedingungen produzierten genug lösliches Phototropin, um es ohne Zusatz von Arginin aus dem Cytosol der Bakterien zu isolieren. Die Ausbeuten waren dabei um etwa 30% niedriger als in Anwesenheit von 250 mM Arginin und die Reinheit der Proben war unter diesen Bedingungen meist schlechter. Das SDS-PAGE Gel in Abbildung 3-15 zeigt eine charakteristische, etwa 29 kDa große Verunreinigung. Die zugehörige Bande wurde im Gel tryptisch verdaut und massenspektrometrisch als cAMP Rezeptor Protein aus *E. coli* (Acc. #AAN82570) identifiziert (siehe Anhang). In *E. coli* übernimmt das Protein die Rolle eines globalen Aktivators der Genexpression nach Bindung von cAMP (De Crombrughe *et al.*, 1971). Das Protein konnte über Gelfiltration entfernt werden (nicht gezeigt). Die Interaktion des Proteins mit *E. coli* könnte einen Hinweis auf eine Interaktion mit ähnlichen genregulierenden Proteinen in *C. reinhardtii* darstellen. Eine Homologiesuche mit der Proteinsequenz des cAMP-Rezeptorproteins in einer EST-Datenbank ergab eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit einer durch zyklische Nukleotide aktivierbaren Serin/Threonin-Proteinkinase (Acc. #AB042714, siehe Anhang).

FTIR-spektroskopische Untersuchungen (Abschnitt 4.2, Seite 51) der strukturellen Änderungen in der Kinasedomäne von verschiedenen Präparationen zeigten deutliche Unterschiede

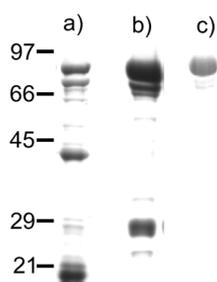


Abbildung 3-15: Vergleich der Reinheit von Präparationen mit und ohne Arginin.

a) zeigt ein N-terminal ohne Verwendung von Arginin gereinigtes Konstrukt, das einen sehr hohen Anteil einer etwa 19 kDa Verunreinigung enthält, bei der es sich um einzelne LOV-Domänen handelt. b) zeigt C-terminal gereinigtes Phototropin ohne Verwendung von Arginin und zeigt im Vergleich zu einer Reinigung mit Arginin (c) deutliche Verunreinigungen (Proteinmengen nicht identisch). Sehr deutlich ist eine etwa 29 kDa große Verunreinigung, bei der es sich um ein *E. coli* cAMP Rezeptor Protein (Acc. #AAN82570) handelt.

in deren Intensität. Sowohl relativ unreine N-terminale Präparationen wie auch C-terminal gereinigte Proben, die beide ohne Arginin hergestellt wurden, zeigten qualitativ ähnliche, jedoch deutlich größere lichtinduzierte Differenzsignale als sehr saubere Proben, die mit Arginin hergestellt wurden. Dies könnte darauf hinweisen, dass für die Aktivierung der Kinase zusätzlich interagierende Proteine nötig sind. Ebenfalls könnte es daher vorteilhaft sein, das Protein mit einem interagierenden Protein zusammen zu kristallisieren.

Zusammenfassend wurden mit den vorliegenden Experimenten Bedingungen gefunden und optimiert, die eine Aufreinigung von Phototropin und LOV2-STK in ausreichenden Mengen für kristallographische, spektroskopische und biochemische Experimente ermöglichten. In

Konstrukt	Zellen	Aufreini- gung	Arg	Ausbeute [OD·ml/cm]	Rein- heit [mg]	Rein- heit [%]
HispMal- <i>phot</i>	BL21(DE3)	N-His/Mbp	+	0.4 / 0.1	4 / 1	30
pET28a(+)- <i>phot</i>	BL21(DE3)	N-His	+	0.4	1.6	30–50
pET28a(+)- <i>phot</i>	BL21(DE3) autoind.	N-His	+	0.5–0.7	1.7–2.5	30–50
pASK-IBA-7p- <i>phot</i>	BL21(DE3)	N-Strep	+	0.5–1	1.7–3.4	30–50
pASK-IBA-7p- <i>phot</i> _HTc	BL21(DE3)	C-His	–	0.5–1.4	1.2–4	70
pASK-IBA-7p- <i>phot</i> _HTc	BL21(DE3)	C-His	+	1.5–2	4.1–6.8	95
pASK-IBA-7p-<i>phot</i>_HTc	C43(DE3)	C-His	+	4.5–6	12–20	95
pASK-IBA-7p-LOV2-STK	BL21(DE3)	N-Strep	+	0.3–0.5	1.5–2.5	30
pASK-IBA-7p-LOV2-STK_HTc	BL21(DE3)	C-His	+	1	2.5	85

Tabelle 3-2: Übersicht der Reinigungsstrategien von Phototropin.

Als Ausgangsmaterial dienen jeweils 10 g Zellen. Die Ausbeute in der optischen Dichte bezieht sich auf die Maximalabsorption des Kofaktors bei 450 nm. Die Spalte Arg bezeichnet die An- bzw. Abwesenheit von Arginin während der Isolierung. Die Reinheit wurde anhand von SDS-PAGE bestimmt.

Tabelle 3-2 sind die Ausbeuten aus je 10 g Zellmaterial in optischer Dichte und Menge aufgeführt. Als beste Variante in Hinblick auf Ausbeute und Reinheit (geschätzt nach SDS-PAGE) stellte sich die Expression mit dem gut regulierten pASK-Vektor in C43(DE3) und C-terminaler Affinitätsaufreinigung in Anwesenheit von Arginin heraus.

3.3 Untersuchung der Kinase Mutante X4G

Phototropine besitzen im Aktivierungsloop der Kinasedomäne im Vergleich zu homologen Kinasen einen zusätzlichen Bereich, der reich an Serinen und Lysinen ist. Computergestützte Analyse (NORS) weist diese Region als konformativ besonders flexibel und als mögliche Schalter-Region aus. Aufgrund dieser theoretischen Befunde ist es denkbar, dass dieser Bereich als konformativer Schalter oder als inter- bzw. intramolekulares Interaktionselement bei der Signaltransduktion innerhalb Phototropins bzw. zu anderen Proteinen dient. Bei Studien an homolog produziertem Phototropin in *C. reinhardtii* wurde zudem gezeigt, dass ein normalerweise beobachteter lichtinduzierter Abbau des Proteins durch Entfernung dieser Region verhindert werden konnte (Yinghong Lu, persönliche Mitteilung). Dieser Befund könnte möglicherweise zur Schaffung eines konformativ stabileren Proteins beitragen.

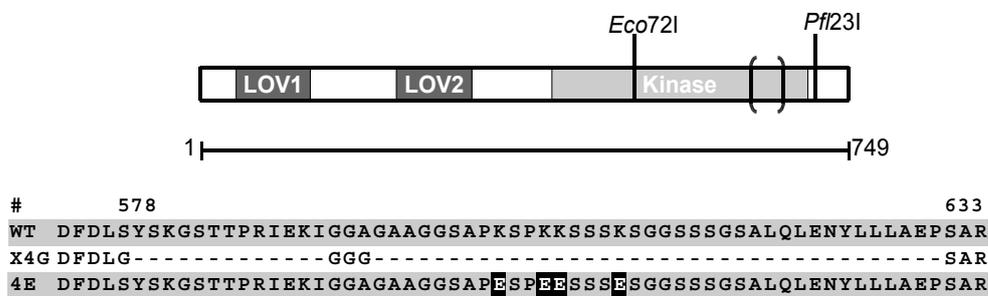


Abbildung 3-16: Kinase-Region von *C. reinhardtii* Phototropin.

C. reinhardtii Phototropin besitzt eine Serin- und Lysin-reiche Region im nicht katalytischen Teil der Kinase. Phototropin-X4G konnte durch Austausch von Aminosäure 578 bis 632 durch vier Glycine heterolog produziert und aufgereinigt werden. Der Austausch von vier Lysin in dieser Region gegen Glutamat lieferte ebenfalls lösliches Protein (nicht gezeigt).

Aufgrund der vorhergesagten Flexibilität dieses ungewöhnlichen Bereichs in der Kinasedomäne von Phototropin sowie der möglichen funktionalen Relevanz wurde dieser durch überlappende PCR entfernt (Yinghong Lu). Dazu wurden die Aminosäuren 578 bis 632 durch vier Glycine ersetzt (Abb. 3-16). In einem zweiten Ansatz wurde die vornehmlich positive Ladung

durch Austausch von vier Lysinen durch vier Glutamate verändert. Der die Deletion bzw. Mutation enthaltende Teil des Gens wurde aus pKS-*phot_4G* bzw. pKS-*phot_4E* (Yinghong Lu) über *Eco72I* und *Pfl23I* in pASK-IBA-7p-*phot_HTc* und pASK-IBA-7p-*LOV2-STK_HTc* kloniert. Die Expression und Aufreinigung der Konstrukte erfolgte analog zum Wildtyp und lieferte Protein in vergleichbarer Ausbeute und Qualität (nicht gezeigt). Die spektroskopischen und photodynamischen Eigenschaften der beiden Konstrukte unterschieden sich nicht wesentlich von Wildtyp Proben. Ebenfalls wurden keine Unterschiede zum Wildtyp in der Autophosphorylierungsaktivität entdeckt.

Um die Flexibilität und mögliche Struktur des zusätzlichen Bereichs zu untersuchen, wurden Strukturen der Kinasedomäne berechnet. Dazu wurden die Kristallstruktur 1O6K

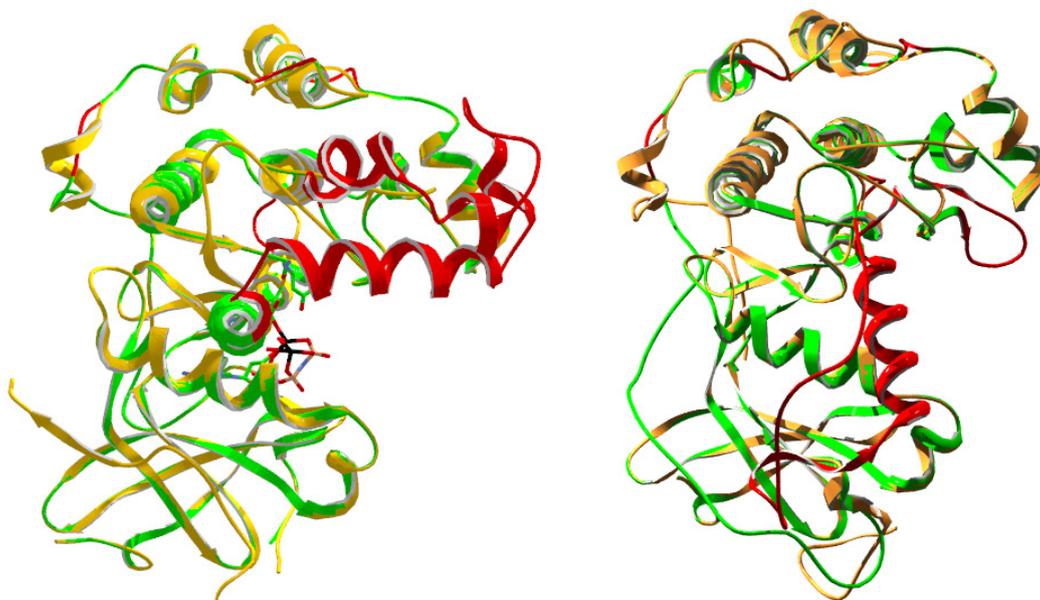


Abbildung 3-17: Berechnete Strukturen der Kinasedomäne von *C. reinhardtii* Phototropin.

In gelb sind die Ausgangsstrukturen gezeigt, die berechneten Strukturen sind in grün überlagert. Rote Bereiche kennzeichnen starke Abweichungen von der Ausgangsstruktur. Links wurde die Struktur 1O6K (*Homo sapiens* Protein Kinase B S474D (Yang *et al.*, 2002)) als Vorlage verwendet, rechts die Struktur 1FOT (cAMP-abhängige Protein Kinase A aus *Saccharomyces cerevisiae* (Mashhoon *et al.*, 2001)). Die linke Struktur hat AMP-PNP gebunden und stellt eine aktive Form dar. Die rechte Struktur besitzt keine Liganden und geringe Aktivität. Die Gesamtstruktur ist sehr ähnlich, jedoch ist die Sekundärstruktur und die relative Anordnung des zusätzlichen Bereichs zur aktiven Tasche unterschiedlich. Der Zugang für das Substrat befindet sich auf der Rückseite der Ansicht im unteren Teil des Proteins.

(*Homo sapiens* Protein Kinase B S474D (Yang *et al.*, 2002)) als Vorlage für eine aktive Form der Kinase sowie die Struktur 1FOT (cAMP-abhängige Protein Kinase A aus *Saccharomyces cerevisiae* (Mashhoon *et al.*, 2001)) als Vorlage für eine inaktive bzw. wenig aktive Form verwendet (Abb. 3-17). Bis auf kleinere Unterschiede in Loop-Regionen (rot) ist der nicht-homologe Bereich nicht durch die Ausgangsstrukturen beschrieben. In der aktiven Form besteht der nicht-homologe Bereich aus vier helikalen Segmenten und ist damit im Gegensatz zur inaktiven Form, die nur eine Helix besitzt, geordneter. Ebenfalls ist die nicht-homologe Domäne in der aktiven Form von der β -Faltblatt-reichen Domäne (unten) weiter entfernt. Eine mögliche direkte Blockierung der Substratbindetasche ist damit jedoch nicht gegeben. Diese befindet sich auf der Rückseite des Proteins in dieser Darstellung.

Da die Modellierung der nicht homologen Region ohne eine entsprechende strukturelle Vorlage entstehen musste, sind die abgebildeten Strukturen sehr kritisch zu betrachten. Die großen Unterschiede in beiden Strukturen belegen jedoch die Flexibilität der Region. Aus diesem Grund könnte ein wie hier hergestelltes Konstrukt ohne diesen Bereich konformativ stabiler und daher für die Kristallisation des Proteins von Vorteil sein.

3.4 Kofaktorzusammensetzung in Vollängen-Phototropin

Zur Einschätzung der Qualität für die Kristallisation und für spektroskopische Experimente ist es wichtig eine homogene Kofaktorzusammensetzung im Protein zu besitzen. Phototropin ist neben der Bindung der Flavine in den Photorezeptor Domänen ebenfalls in der Lage, Adenosin-Phosphate in der Kinasedomäne zu binden. Flavine und mögliche Adenosin-Phosphate (AMP, ADP, ATP) wurden aus Vollängen Proben durch Hitzedenaturierung extrahiert

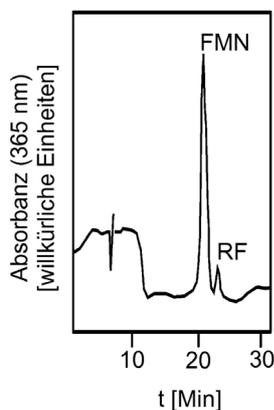


Abbildung 3-18: Kofaktorzusammensetzung von heterolog produziertem Phototropin.

HPLC Analyse der Flavinzusammensetzung von C-terminal gereinigtem Phototropin aus *E. coli*. Nach 21 Minuten eluierte der Hauptbestandteil FMN. Etwa $12 \pm 4\%$ der Probe bestand aus Riboflavin, welches nach 23 Minuten eluierte.

und per Umkehrphasen-HPLC analysiert. Die Proben bestanden in der Regel aus etwa 88% FMN und 12% Riboflavin (Abb. 3-18). Das Verhältnis ist im Vergleich zur einzeln produzierten LOV1-Domäne, die zu 99% FMN bindet (nicht gezeigt), etwas schlechter aber beschreibt dennoch eine relativ homogene Probe. In den aufgereinigten Proteinproben wurden keine gebundenen Adenosin-Phosphate gefunden (nicht gezeigt).

3.5 Oligomerisierungsgrad und Stabilität von aufgereinigtem Phototropin

Im Hinblick auf eine erfolgreiche Kristallisation von Proteinen ist die Qualität und Stabilität des Proteins von entscheidender Bedeutung. Proteine müssen idealerweise in homogener Form in Bezug auf Konformation, Oligomerisierungsgrad und Kofaktoren vorliegen und je nach Kristallisationsdauer möglichst lange stabil sein. Wie in den chromatographischen Untersuchungen (Abb. 3-13) beobachtet wurde, liegt Phototropin als Gemisch verschiedener Oligomere in Lösung vor. Da Gelfiltrationsexperimente eine sehr konzentrierte Probe erfordern und somit unter Umständen eine Aggregation begünstigen, wurden die Proteinproben zusätzlich durch analytische Ultrazentrifugation untersucht (nicht gezeigt). Die Proben zeigten auch dort ein heterodisperses Verhalten mit einem sehr geringen Anteil an mono- oder dimeren Formen. Verschiedene Präparationsbedingungen (+/- DDM; +/- Arginin) sowie verschiedene Konstrukte (WT, X4G, D547N) konnten keine deutlichen Verbesserungen der Homogenität erreichen. Auch die Zugabe von Arginin zu den Puffern während der AUZ bewirkte keine Deaggregation.

Als Maß für die Stabilität von Phototropin kann das Auflösen der Sekundärstruktur anhand von CD-Schmelzkurven herangezogen werden. Dabei wurden verschiedene Konstrukte, Mutanten und Präparationen verwendet und unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Die Messungen wurden von Elisabeth Hartmann in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ilme Schlichting (MPI für biomedizinische Forschung, Heidelberg) durchgeführt. Die Proteinproben wurden für die Messung in 20 mM KP_i pH 8.0, 200 mM NaCl überführt und mit verschiedenen Zusätzen versetzt. Tabelle 3-3 zeigt die somit erhaltenen Schmelzpunkte. Alle Schmelzpunkte liegen unterhalb 44°C und beschreiben eine geringe thermische Stabilität der Proteine.

Die Zugabe von zweiwertigem Magnesium, sowie von nicht hydrolysierbaren Substraten sollte gegebenenfalls zur Stabilisierung von bestimmten Konformationen der Kinasedomäne beitragen und dem Protein zusätzliche strukturelle Stabilität geben. Wildtyp Phototropin

wurde in zwei unterschiedlichen Präparationen untersucht. Unter Standardbedingungen zeigte das Protein wie erwartet eine höhere Stabilität in Anwesenheit von Magnesium, ADP und AMP-PCP. Eine zusätzliche Zugabe von 10 mM Arginin trug kaum zur Schmelzpunktserhöhung bei. Wurde das Protein während der Präparation ständig in Anwesenheit von 50 mM Arginin (WT + Arginin) gehalten, zeigte sich insgesamt eine erhöhte Stabilität (+ 2°C), die jedoch nicht von anderen Zusätzen beeinflusst wurde. Weitere Zugabe von Arginin wirkte sich dagegen destabilisierend aus. Gleichermäßen verhielt sich die doppelt inaktivierte Mutante C57S/C250S, der destabilisierende Effekt von Arginin war bei dieser Probe jedoch am ausgeprägtesten.

Protein (5 µM)	T _m [°C] - Mg ²⁺	10 mM Mg ²⁺	7.5 µM ADP	7.5 µM AMP-PCP	+ 10 mM Mg ²⁺ + 10 mM Arginin
	WT	37.7	38.2	38.9	39.5
WT+Arginin	39.8	39.6	39.8	39.9	38.2
C57S/C250S	39.3	39.3	39.0	39.3	36.6
X4G	42.3	44.0	43.1	43.3	41.4
D547N	42.7	42.2	42.4	42.5	42.4

Tabelle 3-3: Thermische Stabilität von Phototropin.

Die Schmelzpunkte wurden durch Aufnahme von CD-Schmelzkurven erhalten ($\pm 0.1^\circ\text{C}$). Verschiedene Phototropin-Konstrukte und Präparationen wurden unter verschiedenen Bedingungen gemessen.

Auffallend stabiler sind wie erwartet die Mutanten X4G sowie D547N. Der Schmelzpunkt ist im Vergleich zu den anderen Proben um etwa 3°C erhöht. Die Deletionsmutante X4G zeigt eine geringe Stabilisierung bei der Zugabe von Mg²⁺ und ADP und einen signifikant erhöhten Schmelzpunkt bei der Zugabe von AMP-PCP (+ 1°C). Die Mutante D547N besitzt eine verminderte Fähigkeit zur Bindung von Mg²⁺ in der aktiven Tasche und zeigt daher wie erwartet keine Stabilisierung durch Mg²⁺ und Nukleotide. Im Gegensatz zur X4G Mutante findet keine Destabilisierung durch Arginin statt.

Im Hinblick auf Stabilität eignen sich die X4G und D547N Konstrukte am besten für eine möglicherweise langwierige Kristallisation. Ebenfalls scheint es günstig, Arginin in moderaten Mengen über die gesamte Präparation beizubehalten. Zusätzliche Zugabe von Arginin scheint in manchen Fällen jedoch ungünstig. Der Zusatz von nicht hydrolysierbarem ATP

(AMP-PCP) bewirkt in manchen Fällen ebenfalls eine Stabilisierung, wirkt sich jedoch in keinem Fall ungünstig aus und sollte daher bei der Kristallisation von Wildtypproteinen verwendet werden. Versuche mit diesen Konstrukten und Bedingungen waren jedoch bislang erfolglos (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ilme Schlichting, Heidelberg). Unter verschiedenen Kristallisationsbedingungen verhalten sich die Proteine jedoch sehr unterschiedlich, was eine mögliche Optimierung der Kristallisation in Aussicht stellt. Aufgrund der Heterogenität der Proteine in Bezug auf Oligomerisierung sind vermutlich weitere Versuche zur Deaggregation für eine erfolgreiche Kristallisation notwendig.

4 Spektroskopische Eigenschaften von Phototropin

Aufgrund ihrer optischen Eigenschaften können molekulare Eigenheiten und dynamische Prozesse von Photorezeptorproteinen mit einer Vielzahl von spektroskopischen Methoden untersucht werden. Die Absorptionsspektroskopie im sichtbaren Bereich (390 – 800 nm) bis zum nahen UV (320 – 390 nm) besonders für die Charakterisierung der Kofaktoren der Photorezeptoren. Zeitaufgelöste Messungen können zusätzlich Informationen über die Dynamik von photoaktivierten Prozessen liefern. Für Messungen im Sekunden- bis Minutenbereich genügen in der Regel einfache Ein- oder Zweistrahlphotometer, die monochromatisch bei einer festen Wellenlänge Änderungen in der Absorption verfolgen. Für die Aufnahme von vollständigen Spektren werden Diodenarraydetektoren und polychromatisches Messlicht benötigt. Aufgrund der höheren Energiemenge des weißen Messlichts kann dieses unter Umständen bereits photodynamische Prozesse induzieren. Je nach Fragestellung und zu betrachtendem Objekt muss abgeschätzt werden, welche Messmethode sinnvoll ist.

4.1 Photodynamik des Signalzustandes und Photorezeptor-Kinase-Interaktion

Zur Untersuchung der Photodynamik von Vollängen-Phototropin wurden zeitaufgelöste Absorptionsmessungen an heterolog produzierten Proteinproben (Abschnitt 3-13) durchgeführt. Um die Funktion der Photorezeptordomänen unabhängig voneinander zu untersuchen, wurden per ortsgerechter Mutagenese die reaktiven Cysteine C57 und C250 gegen Serin ausgetauscht. Die UV/vis-Spektren der dunkeladaptierten Proben zeigen kleine Unterschiede in der Lage der S_0 - S_1 Bande (Abb. 4-1). Die Bande ist vom Wildtyp von 445 nm bis zu 443 nm bei der Doppelmutante verschoben. Unterschiede im Verhältnis von S_0 - S_1 - und S_0 - S_2 -Bande sind auf unterschiedlich starke Streuung der Proben zurückzuführen. Abbildung 4-2 zeigt die Anregungs- und Emissionsspektren einer Wildtyp-Probe.

Der Zerfall des LOV 390 Intermediats wurde nach Belichtung der Proben mit blauem Licht monochromatisch bei 477 nm verfolgt (Abb. 4-6). Aufgrund der geringen Stabilität bei höherer Temperatur, wurden alle Messungen bei 12°C – 18°C durchgeführt. Die Analyse der Zerfallsgeschwindigkeiten lieferte ähnliche Ergebnisse wie die Untersuchung von Einzel- und Doppeldomänen Konstrukten ohne den Kinaseteil (Tab. 4-1; Kottke *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2005). Insgesamt scheint der Zerfall der Vollängen-Proben tendenziell schneller zu sein als bei den Konstrukten ohne Kinase.

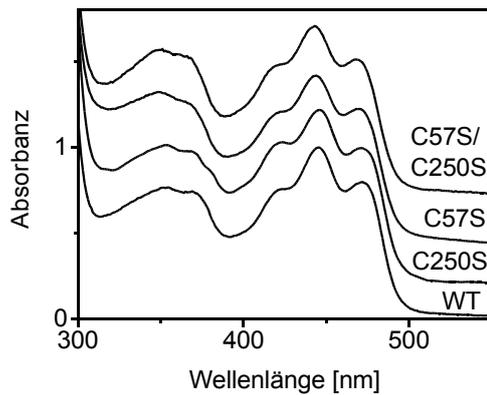


Abbildung 4-1: Absorptionsspektren von Voll-längen-Phototropin

Abgebildet sind die Absorptionsspektren von dunkeladaptierten Wildtyp Phototropin und Mutanten mit LOV1-(C57S) und/oder LOV2-(C250S) inaktivierten Photorezeptordomänen. Die Spektren unterscheiden sich geringfügig in der Lage der Maxima des S_0 - S_1 -Übergangs

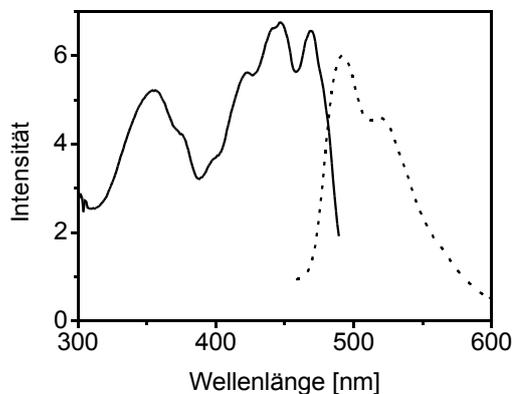


Abbildung 4-2: Fluoreszenzspektren von Voll-längen-Phototropin.

Die durchgezogene Linie zeigt das Exzitationsspektrum bei einer Emissionswellenlänge von 496 nm. Die gestrichelte Linie zeigt die Emission bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm.

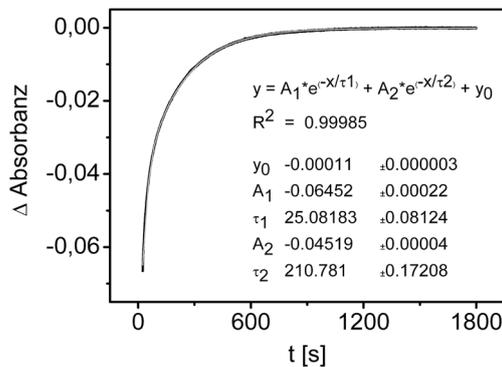


Abbildung 4-3: Kinetische Betrachtung des Zerfalls des Signalzustandes in Voll-längen-Phototropin.

Der Zerfall des Signalzustandes LOV 390 in Voll-längen-Phototropin wurde nach Anregung mit einer 460 nm LED über die Absorption bei 477 nm beobachtet. Eine biexponentielle Beschreibung liefert zwei Zeitkonstanten in etwa 3:2 Verhältnis.

Im Vergleich zu den Tandemkonstrukten tauchen bei Phototropin mit einzeln inaktivierten LOV-Domänen zu geringeren Anteilen längere Zeitkonstanten auf. Die Verhältnisse und die Werte der Zeitkonstanten sind sehr variabel von Messung zu Messung. Die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit unter Verwendung eines monomolekularen Modells bleibt jedoch konstant. Einflüsse von pH-Wert oder Salzkonzentration konnten nicht ermittelt werden, da die Proben unter leicht veränderten Bedingungen stärker zur Aggregation neigen und schnell ausfallen. Bei pH-Werten unter 8 fällt das Protein aus.

Probe	τ_1 [s]	τ_2 [s]
Wildtyp	25 (64%)	211 (36%)
Phot-C57S	40 (31, 80%)	(132, 20%)
Phot-C250S	204 (163, 80%)	(407, 20%)
LOV2-STK	20 (90%)	79 (10%)
LOV1*	45 (15%)	320 (85%)
LOV2*	30 (25%)	270 (75%)
LOV1-LOV2*	25 (30%)	270 (70%)
LOV1-C57S-LOV2*	15	-
LOV1-LOV2-C250S*	260	-

Tabelle 4-1: Photodynamik des Signalzustandes in Phototropin.

Zeitkonstanten und Amplituden von mono- und biexponentieller (in Klammer) Beschreibung des Zerfalls von LOV 390 von Phototropin, LOV1 (C57S) und LOV2 (C250S) inaktivierten Proben sowie des LOV2-Kinase Konstrukts bei 477 nm und $T = 12^\circ\text{C}$ in 50 mM Tris pH 8, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 5% (v/v) Glycerin. *Als Vergleich sind die Zeitkonstanten von LOV-Domänen sowie LOV1-LOV2-Tandemkonstrukten aus der Literatur aufgeführt (Kottke *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2005). Diese Messungen wurden jedoch in 10 mM NaP_i pH 8, 10 mM NaCl und bei $T = 20^\circ\text{C}$ durchgeführt.

Da die Photorezeptordomänen von Phototropin eine Kinase regulieren, sollte eine gegenseitige Beeinflussung von Rezeptor- und Effektor-domänen vorhanden sein. Aus diesem Grund wurden zeitaufgelöste Messungen in Anwesenheit von Kinase-Substraten wie ATP und verwandten Nukleotiden durchgeführt. Ein signifikanter Einfluss auf die Geschwindigkeit der Dunkeladaptation wurde durch die Zugabe von ATP erreicht (Abb. 4-4). In Anwesenheit von 100 μM ATP ist die Rückkehr zum dunkeladaptierten Zustand schneller. Der Dunkelzustand war nach etwa 20 – 30 Minuten vollständig erreicht. Eine Folgemessung ohne weitere Zugabe von ATP verhielt sich wie eine Kinetik ohne vorherige Zugabe von ATP. Dies deutet auf eine vollständige Hydrolyse des zugegebenen ATPs innerhalb der Dauer eines Experiments hin. Um den Effekt zu charakterisieren, wurden ADP und ATP-Derivate als Substrate verwendet und deren Einfluss auf die Photochemie untersucht.

In Anwesenheit von ADP (Abb. 4-5a), AMP-PNP (Abb. 4-5b) und ATP- γ -S (nicht gezeigt) wurde die Rückkehrkinetik nicht beeinflusst. Durch weitere Zugabe von ATP in gleichem

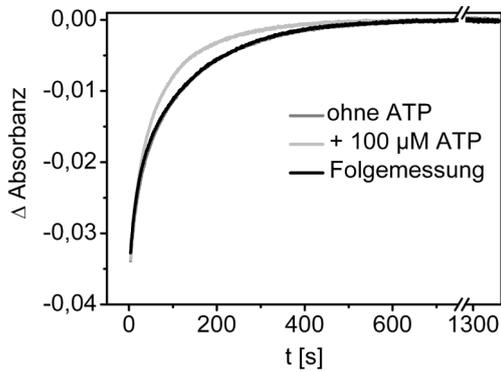


Abbildung 4-4: Einfluss von ATP auf den Zerfall des Signalzustandes in Phototropin.

In Anwesenheit von 100 μM ATP beschleunigt sich die Rückkehr in den dunkeladaptierten Zustand von Phototropin. Eine darauf folgende Messung zeigt einen identischen Verlauf mit einer Messung ohne Zugabe von ATP.

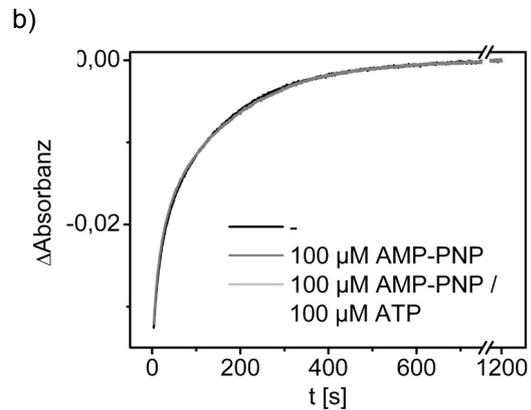
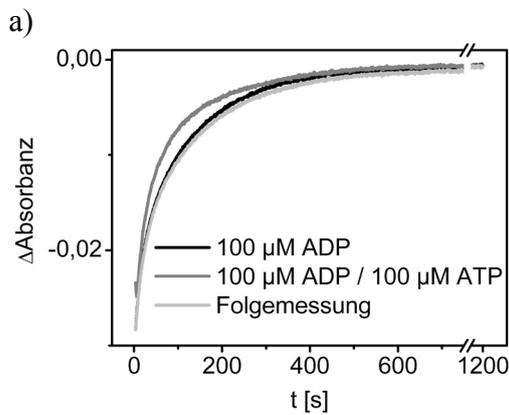


Abbildung 4-5: Einfluss von ATP-Derivaten auf den Zerfall von LOV 390 in Phototropin.

a) Zerfall von LOV 390 in Phototropin in Anwesenheit von ADP. ADP zeigt keinen sichtbaren Einfluss auf die Geschwindigkeit des Zerfalls. Zusätzliche Zugabe von ATP beschleunigt die Reaktion. b) Zerfall von LOV 390 in Phototropin in Anwesenheit von AMP-PNP. Der beschleunigende Effekt von ATP ist durch die Anwesenheit von AMP-PNP gehemmt.

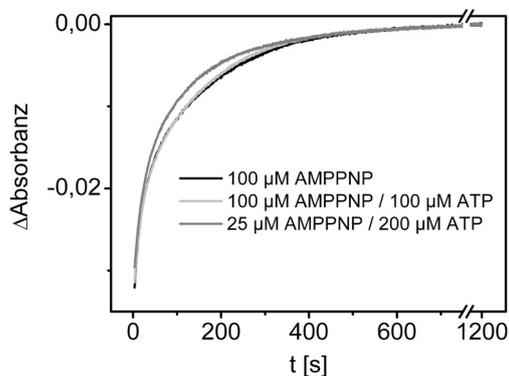


Abbildung 4-6: Einfluss von AMP-PNP auf den Zerfall von LOV 390 in Phototropin.

Die Beschleunigung des Zerfalls von LOV 390 in Phototropin durch ATP wird durch AMP-PNP bis zu einem Verhältnis von 1:8 gehemmt.

molaren Verhältnis wurde die Reaktion im Falle von ADP beschleunigt, bei AMP-PNP wurde keine Änderung beobachtet. Erst bei einem achtfachen Überschuss an ATP wurde die Reaktion in Anwesenheit von AMP-PNP wieder sichtbar beschleunigt (Abb. 4-6).

Die Befunde deuten darauf hin, dass die Beschleunigung nicht durch die Bindung von ATP oder dem entstehenden ADP sondern durch ATP-Hydrolyse zustandekommt. Um den Effekt quantitativ zu beschreiben, wurden die Amplituden und Zeitkonstanten der bimolekularen Zeitverläufe verglichen (Tab. 4-2). Beide Zeitkonstanten erhöhten sich um etwa 20%, gleichzeitig erhöhte sich jedoch die Amplitude der kleineren Zeitkonstante im Vergleich zur größeren Zeitkonstante. Insgesamt wird dadurch die Reaktion beschleunigt.

	τ_1 [s]	A_1 [%]	τ_2 [s]	A_2 [%]
- ATP	21	36	144	64
+ ATP	28	57 (↑)	162	43 (↓)
Folgemessung	22	39	159	61

Tabelle 4-2: Photodynamik des Signalzustands in Phototropin in Abhängigkeit von ATP.

Zeitkonstanten und zugehörige Amplituden von biexponentiellen Funktionen zur Beschreibung der Zerfallsreaktionen von LOV 390 in Phototropin in An- und Abwesenheit von ATP bei $T = 15^\circ\text{C}$. Die Zeitkonstanten nehmen in Anwesenheit von ATP zu, gleichzeitig verändern sich die Amplitudenverhältnisse, so dass insgesamt eine Beschleunigung auftritt. Die Folgemessung ist dem Zustand ohne Zugabe von ATP ähnlich.

Die Messungen wurden mit den einzeln inaktivierten Konstrukten wiederholt und ebenfalls eine ATP-Abhängigkeit beobachtet (Abb. 4-7). Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Beteiligung von beiden Photorezeptordomänen bei der Signalübertragung. Bei den Deletionskonstrukten LOV2-STK und X4G (Abschnitt 3.3) wurde ein relativ schwacher Effekt beobachtet, der jedoch reproduzierbar erzeugt werden konnte (Abb. 4-8). Um die Vermutung der ATP-Hydrolyse zu bestätigen, wurde durch ortsgerichtete Mutagenese die Mutation D547N eingefügt und so ein Kinase-inaktives Konstrukt geschaffen. Dadurch sollte die Mg^{2+} -Koordination in der aktiven Tasche der Kinase geschwächt werden. In Anwesenheit von ATP beschleunigte sich jedoch auch bei diesem Protein die Rückkehr in den Dunkelzustand (Abb. 4-9). Bestimmung der Nukleotid-Zusammensetzung von Wildtyp-Proben 20 Minuten nach Belichtung über Umkehrphasen-HPLC zeigte keine Anwesenheit von ADP oder AMP und somit auch keine Bestätigung der vermuteten ATP-Hydrolyse (nicht gezeigt).

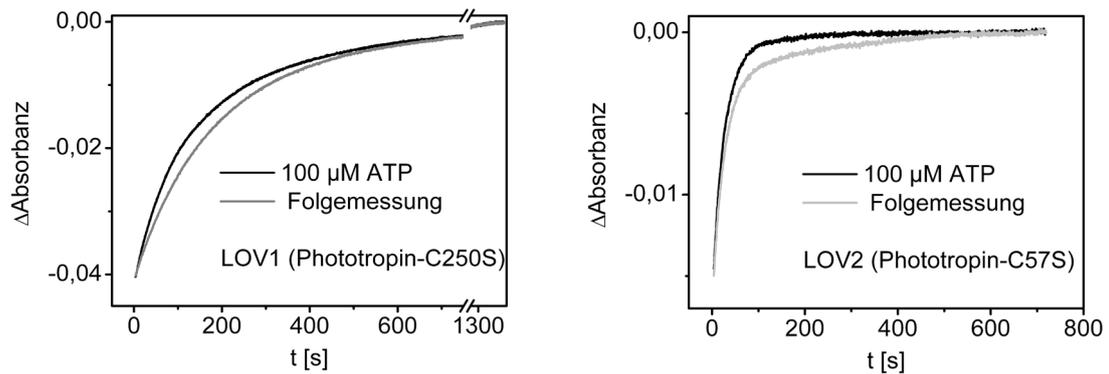


Abbildung 4-7: Zerfall von LOV1 390 in Phototropin-C250S sowie von LOV2 390 in Phototropin-C57S in Anwesenheit von ATP.

Beide Konstrukte zeigen eine Beschleunigung der Rückreaktion, wobei in der LOV1-Domäne eher der kurze Zeitbereich betroffen ist, in der LOV2-Domäne eher der längere Zeitbereich.

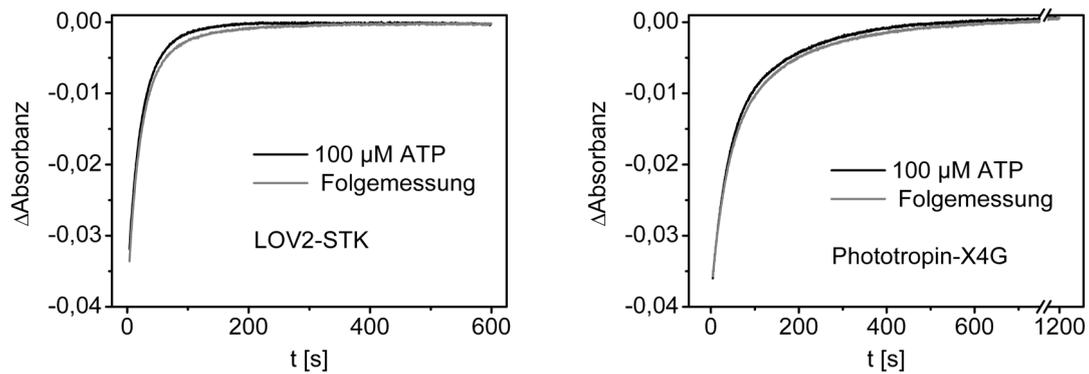


Abbildung 4-8: Zerfall von LOV2 390 in LOV2-STK und LOV 390 in Phototropin-X4G in Anwesenheit von ATP.

Im Vergleich zu Messungen an Wildtypproteinen sind die Auswirkungen etwas geringer.

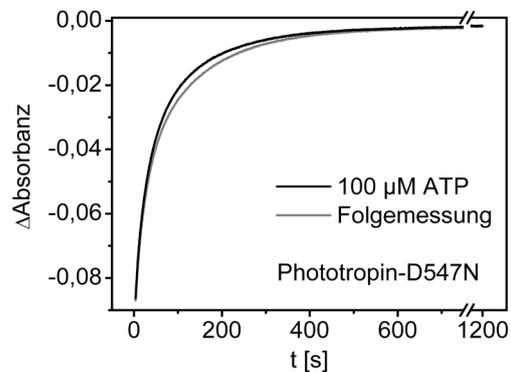


Abbildung 4-9: Zerfall von LOV 390 in Phototropin-D547N in Anwesenheit von ATP.

Die Reaktion ist wie im Wildtyp in Anwesenheit von ATP deutlich beschleunigt.

4.2 Strukturelle Änderungen im Signalzustand von Phototropin

Im vorigen Abschnitt wurde über die Messung des Zerfalls des vermeintlichen Signalzustandes indirekt eine Interaktion von Photorezeptor- und Kinaseteil des Proteins beobachtet. Dabei wurde über Änderungen im Verhalten des Kofaktors auf Vorgänge im für die UV/vis-Spektroskopie unsichtbaren Teil des Proteins geschlossen. Um diese Prozesse direkt zu beobachten, sind andere Methoden notwendig.

Zum Verständnis der Aktivierungsmechanismen und der Signalweiterleitung in komplex aufgebauten Photorezeptoren wie Phototropin ist es nötig, strukturelle Informationen über das Protein zu gewinnen. Die informativste Methode zum molekularen Aufbau von Proteinen ist die Röntgenstrukturanalyse. Unter der Voraussetzung, dass von einem Protein geordnete Kristalle gezüchtet werden können, lässt sich je nach Qualität der Kristalle eine atomare Auflösung der Struktur erzielen. Dabei können theoretisch durch Neutronenbeugung sogar Wasserstoffatome sichtbar gemacht werden. Eine große Einschränkung jedoch ist die begrenzte Möglichkeit zur Betrachtung von dynamischen Prozessen. Ist es möglich, bestimmte Intermediate durch die äußeren Bedingungen zu stabilisieren, können diese getrennt untersucht werden und die Reaktionsabläufe interpoliert werden. Es ist auch möglich zeitaufgelöste Röntgendiffraktion durchzuführen, jedoch sind die Intermediate photochemischer Prozesse dafür meist zu kurzlebig. Da bis zu diesem Zeitpunkt keine Kristalle von Phototropin zur Verfügung stehen, muss auf andere Methoden zurückgegriffen werden.

Die Anwendung von Schwingungsspektroskopie ist nicht wie die Kristallographie auf ein System mit Fernordnung angewiesen und ermöglicht die (zeitaufgelöste) Beobachtung von strukturellen Veränderungen im Protein in Lösung bzw. in einer amorphen Struktur (Vogel *et al.*, 2003). Die Absorption im mittleren infraroten Bereich ($4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$) wird durch das Peptidrückgrat ($1500 - 1750 \text{ cm}^{-1}$: Amid I und II) und die Seitenketten der Aminosäuren hervorgerufen. Weiterhin absorbiert auch der Chromophor in diesem Bereich. Beiträge von Seitenketten sind im IR schwierig zuzuordnen und erfordern Vergleichsmessungen mit gezielt molekularbiologisch veränderten oder isotope markierten Proteinen. In der Regel werden Fourier-Transformation-IR (FTIR) Spektren aufgenommen, da diese ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis ermöglichen. Dabei wird mit schwachem breitbandigem Licht gemessen und über ein sogenanntes Michelson-Interferometer Interferogramme aufgenommen. Aus den Interferogrammen werden dann per Fourier-Transformation die IR-Absorptions-Spektren gewonnen.

Als Grundlage für zukünftige strukturelle Untersuchungen zur Signaltransduktion und Aktivierung der Kinasedomäne an Phototropin wurden FTIR (Licht-minus-Dunkel)-Differenzspektren von Anna Pfeifer in der Gruppe von Dr. Tilman Kottke aufgenommen. Da die LOV1 Domäne vermutlich nur eine feinregulatorische Rolle bei der Lichtaktivierung der Kinase spielt (Matsuoka & Tokutomi, 2005) und um die Betrachtung der Spektren zu vereinfachen, wurden LOV1-inaktivierte Konstrukte (C57S) verwendet (Abb. 4-10). Die Beiträge der strukturellen Änderungen nach Lichtinduktion im Photorezeptor-Teil des Proteins wurden durch Referenzmessungen an einem LOV1-C57S-LOV2-Tandemkonstrukt (Guo *et al.*, 2005; Abb. 4-10c) und einem gleich aufgebauten Konstrukt, das zusätzlich die J α -Helix beinhaltet (Abb. 4-10d), von den Beiträgen des Kinaseteils getrennt. Das J α -Tandemkonstrukt wurde per PCR aus dem Phototropin-Gen mit den Primern LOV2eco und Jalpha1_rv amplifiziert und über *EcoRI* und *HindIII* in Hisp2x kloniert. Nach Expression in *E. coli* wurde das Protein über Nickel-NTA gereinigt.

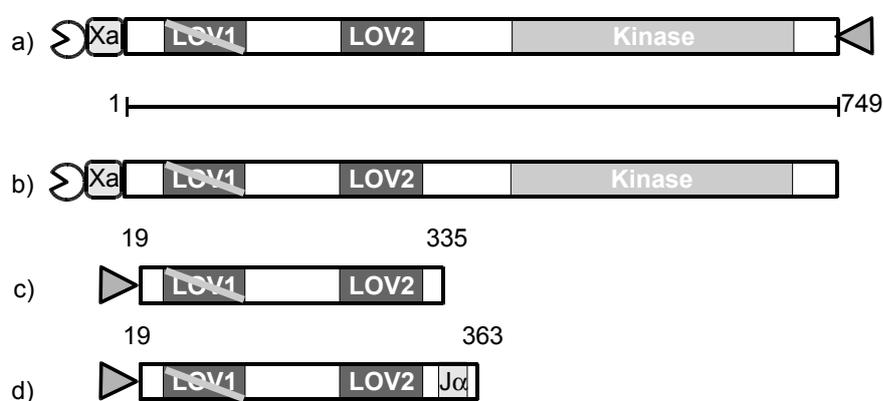


Abbildung 4-10: Phototropin-Konstrukte und Referenzproteine für die FTIR-Spektroskopie:

a) Konstrukt aus pASK-IBA-7p-*phot*-C57S-HTc mit N-terminalem Strep-Tag II (⊕) und Faktor Xa Schnittstelle sowie C-terminalem 6xHis-Tag (▶). b) ist das analoge Konstrukt aus pASK7-IBA-p-*phot* ohne C-terminalen 6xHis-Tag. c) und d) zeigen die Tandemkonstrukte aus Hisp2x-LOV1-LOV2 und Hisp2x-LOV1-LOV2-J α mit N-terminalem 12xHis-Tag und J α -Helix(d).

Bei den Tandemkonstrukten mit und ohne J α konnten durch Bildung von Doppeldifferenzspektren aus den (Licht-minus-Dunkel)-Differenz-Spektren keine wesentlichen Beiträge der J α -Helix beobachtet werden (nicht gezeigt). Unterschiede in den Differenzspektren zwischen Tandemkonstrukt und Volllängeprotein können also weitgehend den strukturellen Ände-

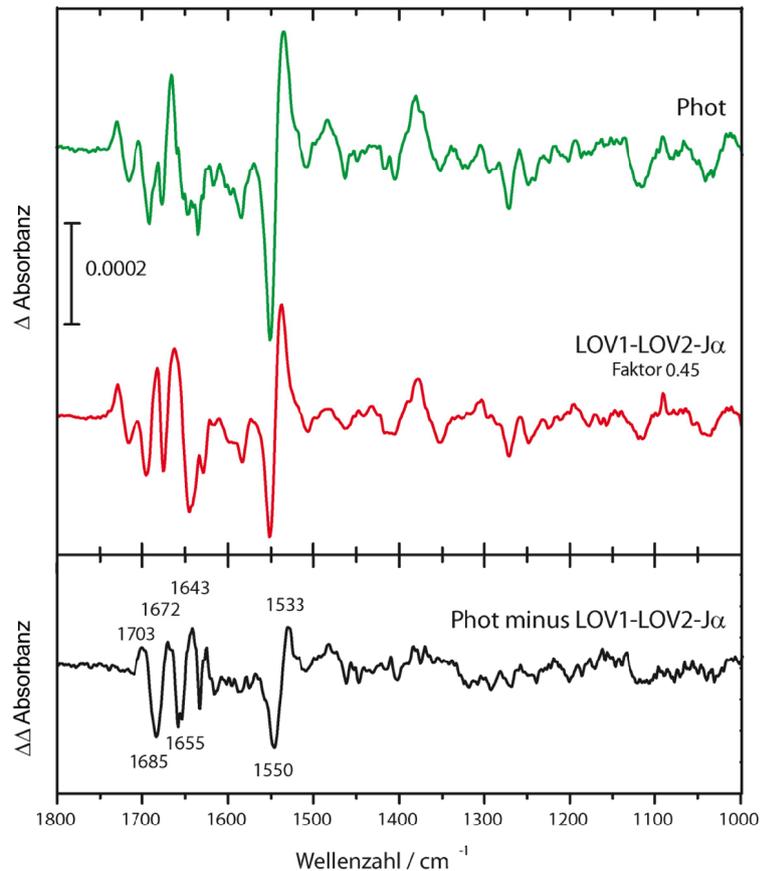


Abbildung 4-11: (Licht-minus-Dunkel)-FTIR-Differenzspektren von Phototropin-C57S*.

FTIR-(Licht-minus-Dunkel)-Differenzspektren von Phototropin-C57S und LOV1-C57S-LOV2-J α . Die Banden werden durch lichtinduzierte Änderungen im Chromophor und in der Proteinumgebung hervorgerufen. Es zeigen sich Intensitäts- und Positionsunterschiede der Banden der beiden Proteine im Bereich der Amid I (1700 bis 1600 cm^{-1}) und Amid II (1600 bis 1500 cm^{-1}) Schwingungen des Proteinerückgrats. Im unteren Teil ist ein FTIR-Doppeldifferenzspektrum aus den (Licht-minus-Dunkel)-Differenzspektren von Phototropin-C57S und LOV1-C57S-LOV2-J α nach Skalierung auf die Differenzbande des FMN bei 1730 / 1716 cm^{-1} abgebildet. Die Banden bei 1703(+), 1685(-), 1672(+), 1655(-), 1643(+), 1550(-) und 1533(+) cm^{-1} zeigen licht-induzierte, strukturelle Änderungen in der Kinasedomäne.

* (freundlicherweise überlassen von Anna Pfeifer, Universität Bielefeld)

rungen in der Kinasedomäne zugeordnet werden. Positive Signale entsprechen dabei dem lichtaktivierten Zustand, negative dem dunkeladaptierten Zustand. In den Doppeldifferenzspektren einer N-terminal gereinigten Probe (Abb. 4-11) lassen sich die Banden bei 1703(+), 1685(-), 1672(+), 1655(-), 1643(+), 1550(-) und 1533(+) cm^{-1} als strukturelle Änderungen in der Kinasedomäne nach Lichtinduktion zuordnen, da diese im Bereich der Amid I und Amid II Absorption liegen. Zusätzlich zur Änderung in ihrer Intensität weisen einige Banden in den jeweiligen Differenzspektren Verschiebungen in ihrer Position auf. Damit unterscheiden sich die detektierten, lichtinduzierten Strukturänderungen in der Kinase nicht nur in

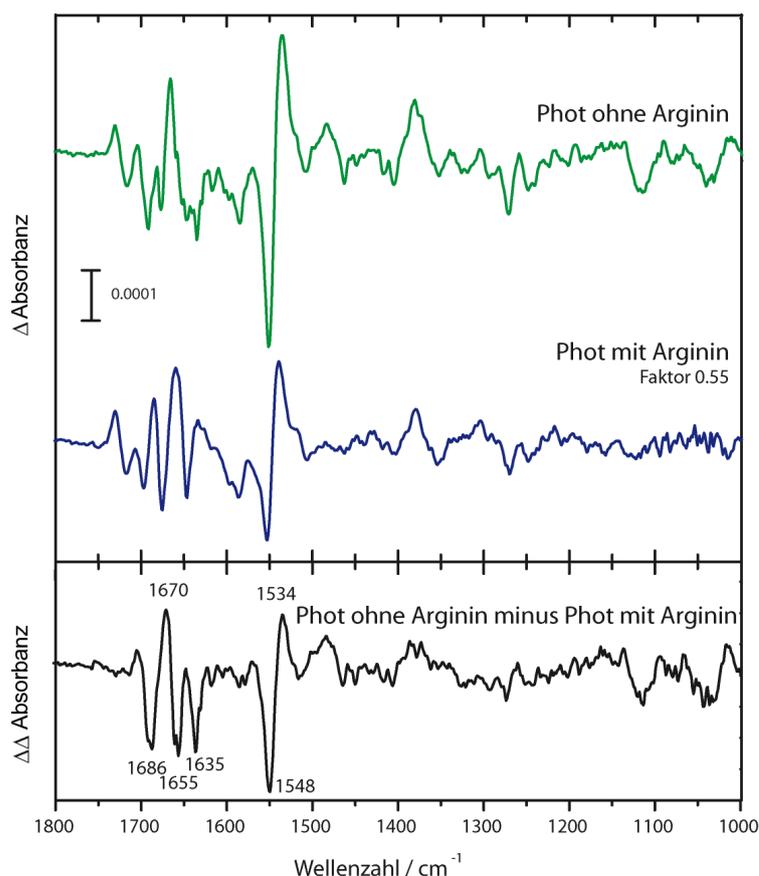


Abbildung 4-12: (Licht-minus-Dunkel)-FTIR-Differenzspektren von verschiedenen Präparationen von Phototropin-C57S*.

(Licht-minus-Dunkel)-FTIR-Differenzspektren von Phototropin-C57S aus Präparationen mit und ohne Verwendung von Arginin. Bis auf die offensichtlichen Intensitätsunterschiede sind die Spektren qualitativ ähnlich, es können jedoch durch Bildung von Doppeldifferenzspektren (unten) konkrete Banden erhalten werden, die die Unterschiede beschreiben. Die Banden bei 1686(-), 1670(+), 1655(-), 1635(-), 1548(-) und 1535(+) cm^{-1} beschreiben strukturelle Unterschiede der Lichtaktivierung in den verschiedenen präparierten Proben.

* (freundlicherweise überlassen von Anna Pfeifer, Universität Bielefeld)

ihrer Intensität sondern auch in ihrem Charakter von denen des kürzeren Konstrukts. Die genaue Zuordnung dieser Banden ist jedoch sehr schwierig und erfordert weitere Experimente. Durch Bindung von Substraten könnten die Beiträge von bestimmten Aminosäuren isoliert und bestimmt werden.

Eine weitere Schwierigkeit ergab sich durch Unterschiede von Experimenten mit verschiedenen Proteinpräparationen (Abschnitt 3.2.8). Unterschiedliche Präparationen (Abb. 4-12) zeigten zwar qualitativ ähnliche (Licht-minus-Dunkel)-Differenzspektren, die Intensität der Differenzsignale ist jedoch wesentlich geringer bei Proben, die mit Arginin präpariert wurden. Über den N- und C-Terminus gereinigte Proben (Abschnitt 3.2.6 bzw. 3.2.7) zeigen dabei ein

sehr ähnliches Doppeldifferenzspektrum im Amid I und Amid II Bereich auf. Durch Bildung von Doppeldifferenzspektren von mit und ohne Arginin präparierten Proben wurden diskrete Unterschiede anhand der Banden bei 1686(-), 1670(+), 1655(-), 1635(-), 1548(-) und 1535(+) cm^{-1} gefunden. Es zeigt sich im Vergleich mit Abbildung 4-11, dass die mit Arginin präparierten Proben ähnlich geringe oder sogar noch weniger Aktivität zeigen, als das Protein ohne Kinase-Domäne.

FTIR-Spektroskopie bietet ein geeignetes Werkzeug, um die molekularen Prozesse der Lichtaktivierung zu betrachten. Die Zuordnung der erhaltenen Schwingungsbanden zu einzelnen molekularen Gruppen stellt jedoch eine große Herausforderung dar und konnte im Zeitraum dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden. Gleichfalls konnten durch diese Methode interessante und möglicherweise entscheidende Einblicke zur Qualität von unterschiedlich präparierten Proben erhalten werden (Abschnitt 3.2.8).

4.3 Triplet-Zustand in Vollängen-Phototropin

Die Verfügbarkeit von ausreichenden Mengen an Vollängen-Phototropin ermöglicht erstmals eine vollständige spektroskopische Betrachtung der Photodynamik des gesamten Proteins. Für die Charakterisierung der Triplet-Zustände der LOV-Domänen sind zeitaufgelöste Messungen im Mikrosekundenbereich notwendig. Da die Proteinproben über längere Zeit zur Aggregation neigen, ist zudem eine Methode sinnvoll, die in möglichst kurzer Zeit durchführbar ist.

Für Messungen im Nanosekunden- bis Millisekundenbereich werden in der Regel Blitzlichtphotolyse Experimente durchgeführt (R. Bonneau, 1997). Die Photoreaktion wird dabei mit einem 5 – 10 ns Laserblitz induziert und die Absorptionsänderungen betrachtet. Die Detektion erfolgt monochromatisch mit einem Photomultiplier, welcher von einem schnellen Oszilloskop ausgelesen wird. Komplette Spektren können mit einer CCD (charge coupled device) Kamera oder einer Streak-Kamera aufgenommen werden. Hierfür wird polychromatisches Licht benötigt, jedoch eine Anregung der Probe durch das intensive Messlicht ist nicht ausgeschlossen. Vorteile dieser Messmethoden sind, dass zu jedem Zeitpunkt bzw. Zustand ein komplettes Spektrum der Probe vorhanden ist. Um über monochromatische Detektion an einen vergleichbaren Datensatz zu kommen, müssen die Messungen bei verschiedenen Wellenlängen wiederholt werden. Verändert sich die Probe zwischen den Messungen, ist die Erstellung eines zusammenhängenden Bildes nicht gegeben.

Der Unterschied zwischen Messungen mit einer CCD Kamera und einer Streak-Kamera besteht darin, dass CCD Kameras aufgrund ihrer Elektronik in kurzen Zeiträumen nicht kontinuierlich ausgelesen werden können. In variablen Abständen kann der Zeitpunkt und die Zeitspanne des Messpunktes gewählt werden. Um diese Daten auszulesen werden in der Regel mehrere Millisekunden benötigt. Erst dann ist die Kamera für eine weitere Messung bereit. Für die Erfassung eines bestimmten Zeitraumes sind also ebenfalls mehrere Messungen nötig.

Die Streak-Kamera arbeitet nach einem anderen Prinzip. Das Messlicht wird nach Passieren der Probe über ein Gitter spektral aufgetrennt und auf eine Photokathode projiziert. Dort werden über den photoelektrischen Effekt Elektronen ausgeschlagen und in einem elektrischen Feld beschleunigt. Orthogonal zur spektralen Aufspaltung wird ein zeitlich variierendes elektrisches Feld angelegt, welches die Elektronen nach ihrer Ankunftszeit trennt. Früh ankommende Elektronen werden dabei weniger stark abgelenkt als später ankommende. Die Elektronen werden somit spektral und zeitlich getrennt und auf einen Phosphoreszenzschirm projiziert. Dieser Schirm wird dann von einer CCD-Kamera ausgelesen. Meistens ist die Anhäufung von mehreren Messungen notwendig um ein ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, die einzelnen Messungen beschreiben jedoch spektral und zeitlich eine einheitliche Probe.

Die Dynamik der Triplet-Zustände der LOV-Domänen in Phototropin wurde durch zeitaufgelöste Absorptionsspektren (337 – 763 nm) nach Anregung mit einem Laserblitz von 450 nm unter Anleitung von Thomas Langenbacher im Labor von Prof. Dr. B. Dick (Universität Regensburg) beobachtet. Da die Proteinproben über längere Zeit zur Aggregation neigen, wurden Absorptionsdifferenzspektren mit einer Streak-Kamera in einem 200 μ s Zeitfenster aufgenommen. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurden jeweils 100 Messungen gemittelt. Die Rohdaten wurden in Berlin von Hand um die Beiträge durch Laserstreuung und Fluoreszenz bereinigt und mit Singulärwertzerlegung (SVD) analysiert bzw. von Basislinienrauschen befreit (Abb. 4-13). In der Doppelmutante C57S/C250S konnten die Triplet-Zustände ohne Bildung des Signalzustandes betrachtet werden. Die Analyse der Daten ergab eine spektrale Komponente, die biphasisch mit den Zeitkonstanten 23 und 138 μ s zerfällt (Abb. 4-14). Das Spektrum des Intermediates ähnelt stark dem Triplettspektrum der LOV1 Domäne von Kottke *et al.* (Kottke *et al.*, 2003). Auch dieses zeigt ein Ausbleichen der Grundzustandsabsorption der LOV-Domänen bei etwa 450 nm mit der charakteristischen Feinstruktur sowie eine breite neue Absorption von 480 nm bis zum Ende der beobachteten Wellenlängen bei etwa 763 nm. Die breite Absorption wird von drei charakteristischen

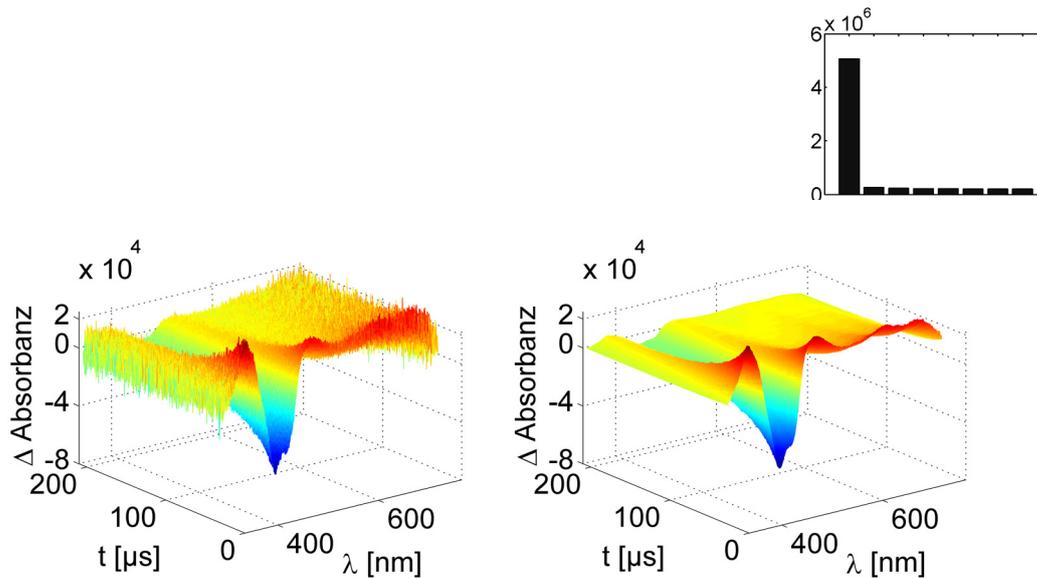


Abbildung 4-13: Zeitaufgelöste Differenzspektren der Triplet-Zustände in Phototropin-C57S/C250S.

Abgebildet sind Roh- (links) und SVD-behandelte (rechts) Daten von Blitzlichtmessungen an Phototropin-C57S/C250S. Die Rekonstruktion der Daten erfolgte mit einem Singulärwert (oben rechts). Das Diagramm zeigt eine Übersicht über die zeitaufgelösten Absorptionsänderungen nach Anregung mit 450 nm. Bei etwa 480 nm ist das Ausbleichen des Grundzustandes zu sehen. Zwischen 550 und 750 nm ist die charakteristische Tripletabsorption erkennbar. Die Differenzabsorption geht in diesem Zeitfenster fast vollständig zurück.

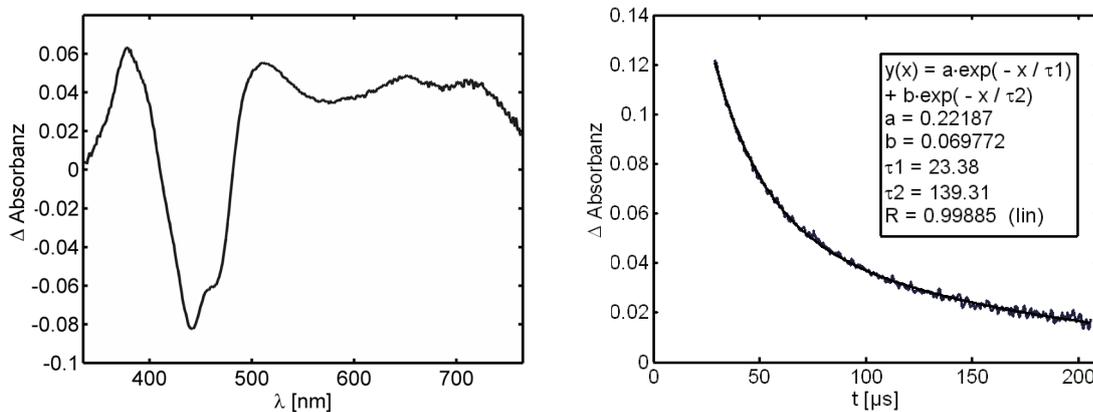


Abbildung 4-14: (Licht-minus-Dunkel)-Differenzspektrum des Triplet-Zustandes von Phototropin-C57S/C250S.

Das Spektrum zeigt das Ausbleichen des Grundzustandes bei etwa 450 nm und eine Zunahme der Absorption zwischen 600 und 750 nm. Dieser Bereich weist die für Flavin-Triplets charakteristischen beiden Maxima auf. Der zeitliche Verlauf dieser Komponente wurde biphasisch beschrieben und ergab die Zeitkonstanten 23 µs (75%) und 139 µs (25%).

Maxima bei 500, 650 und 715 nm als Flavin Tripletts beschrieben. Zusätzlich tritt eine neue positive Absorption bei 390 nm auf, die zusammen mit der negativen Absorption bei 450 nm große Ähnlichkeit mit dem Differenzspektrum des LOV 390 Intermediates besitzt. Da dieses jedoch in der betrachteten Probe aufgrund der Mutationen nicht auftreten kann, befindet sich das Flavin Tripletts vermutlich in einem ähnlichen elektronischen Zustand wie ein LOV 390 Photoprodukt.

Zur genaueren Zuordnung der Zeitkonstanten zu den LOV-Domänen ist es sinnvoll, nur einfach inaktivierte Phototropin-Proben zu untersuchen. Die Tripletts-Zustände in Wildtyp LOV-Domänen sind in der Regel aufgrund der Bildung des LOV 390 Photoprodukts sehr viel kurzlebiger, so dass in diesen Proben die Beiträge der inaktivierten Domänen getrennt betrachtet werden können.

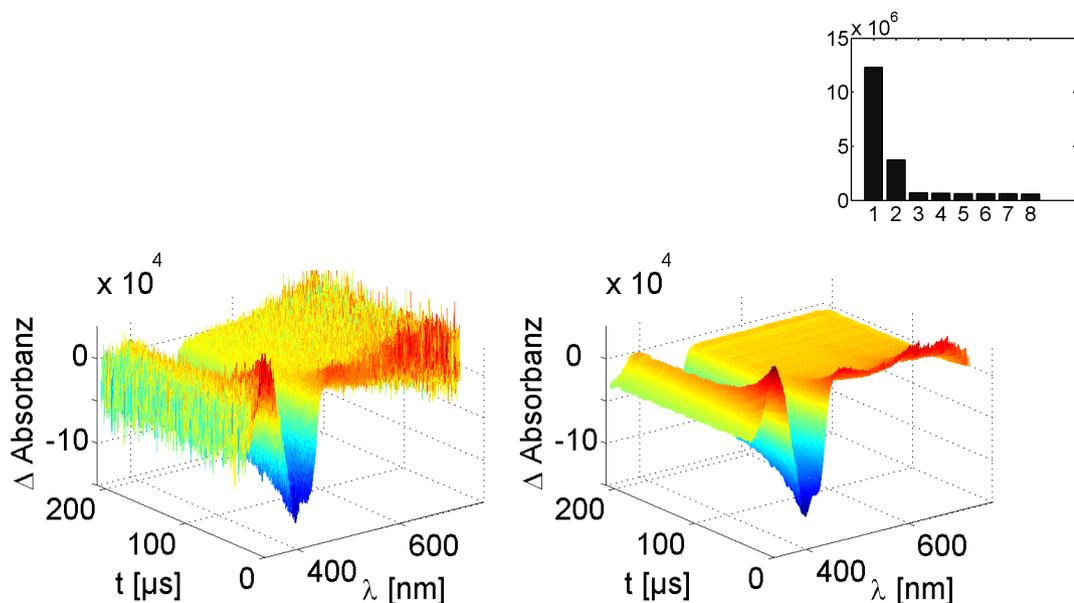


Abbildung 4-15: Zeitaufgelöste Spektren der Tripletts-Zustände in Phototropin-C57S.

Die Rekonstruktion der Rohdaten (links) erfolgte mit zwei Singulärwerten (siehe oben rechts). Die Daten beinhalten im Vergleich zu den Daten der C57S/C250S-Mutante (Abb. 4-14) mehr Rauschen und weniger Signal in der charakteristischen Triplettsabsorption zwischen 550 und 750 nm im Vergleich zum Ausbleichen des Grundzustandes. Dieses geht im Gegensatz zur Triplettsabsorption in diesem Zeitfenster nicht auf Null zurück und spiegelt die Bildung des Signalzustandes in der LOV2-Domäne wieder. Dieser zerfällt in diesem Zeitbereich nicht.

Die Untersuchung der einfach inaktivierten Probe C57S ermöglichte im vorliegenden Zeitfenster die Betrachtung des Tripletts-Zustands der inaktivierten LOV1 Domäne. Die Rohdaten zeigen mehr Hintergrundsignale als die Messungen an der doppelt inaktivierten Probe

(Abb. 4-15). Ebenfalls ist die Triplettabsorption erwartungsgemäß weniger stark ausgeprägt. Auffallend ist auch, dass die Differenzsignale im niederwelligen Bereich unter 480 nm im betrachteten Zeitfenster nach kurzer Zeit einen konstanten Wert annehmen. Singulärwertzerlegung der Daten ergab zwei signifikante Komponenten, die ähnliche Zeitkonstanten (32 und 33 μs ; Abb. 4-16) besitzen und spektral sehr ähnlich sind (Abb. 4-17). Die Spektren in Abbildung 4-17 unterscheiden sich im Verhältnis der Ausbleichung des Grundzustandes und der Zunahme der oben beschriebenen Triplettabsorption. Aufgrund der Ähnlichkeit der Zeitkonstanten und Spektren, liegt es nahe, dass die Spektren durch die SVD nicht sauber getrennt wurden. Die Rekonstruktion der Daten erfolgte mit zwei Singulärwerten (Abb. 4-15).

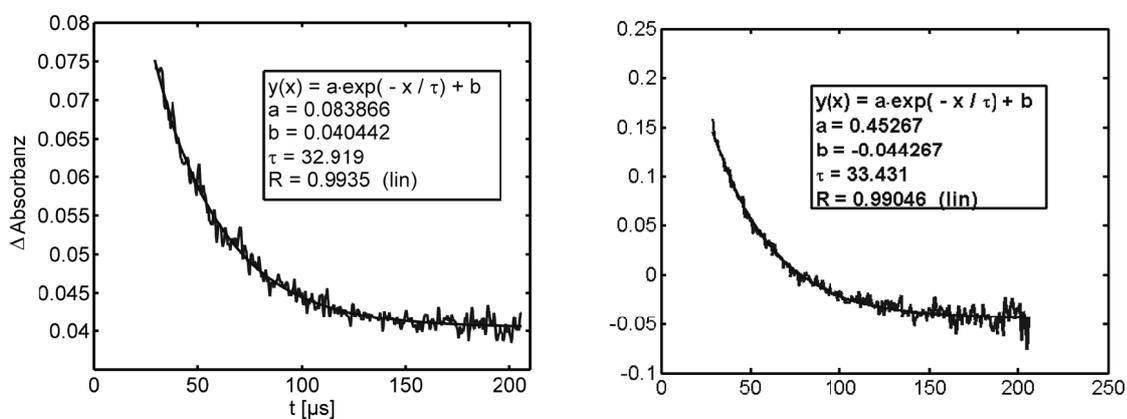


Abbildung 4-16: Zeitlicher Verlauf der ersten beiden Komponenten aus der SVD Analyse der Messung an Phototropin-C57S.

SVD Analyse der kinetischen Daten lieferte zwei signifikante Komponenten. Beide Komponenten lassen sich monophasisch beschreiben und besitzen ähnliche Zeitkonstanten um 33 μs .

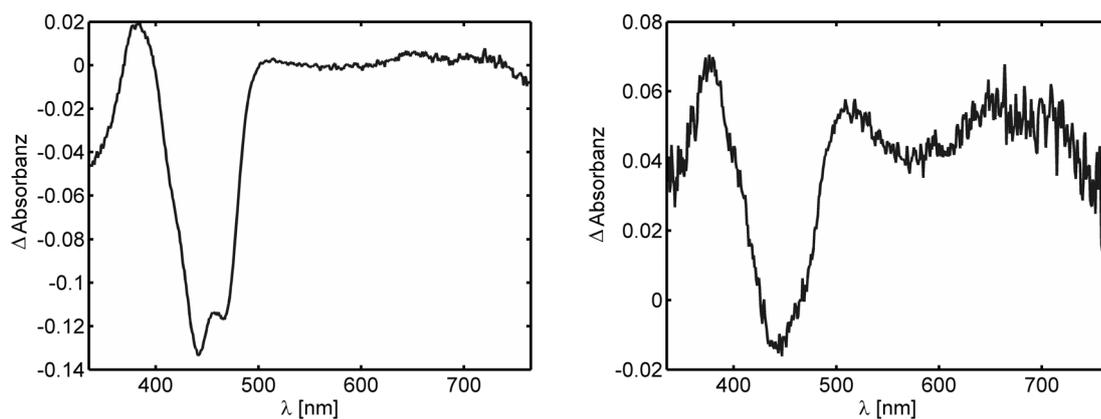


Abbildung 4-17: Zugehörige Spektren der ersten zwei Singulärwerte der Messung an Phototropin-C57S.

Die Spektren ähneln sich qualitativ, jedoch besitzt Komponente 1 (rechts) einen höheren Anteil an Triplettabsorption (>500 nm) im Vergleich zum Ausbleichen des Grundzustandes (<500 nm) als Komponente 2 (links). Dies deutet auf eine Mischform der beiden Komponenten hin.

Aufgrund der Beschaffenheit der Probe ist zu erwarten, dass die LOV1-Domäne nur das Triplet, die LOV2-Domäne dagegen zusätzlich das LOV 390 Photoprodukt bildet. Dieses sollte im betrachteten Zeitfenster nicht zerfallen und als konstante Differenzabsorption in den Daten vorliegen. Durch Projektion eines einfachen Modells laut den Gleichungen in Abbildung 4-18 wurden die wirklichen Spektren ermittelt. Das Modell beschreibt einen monophasischen Zerfall einer Komponente A mit der per SVD erhaltenen Zeitkonstante und spiegelt somit den Zerfall des langlebigen Triplets der LOV1-Domäne wieder. Die zweite Komponente B wird als konstant gedeutet und stellt das Ausbleichen der LOV2-Domäne bzw. deren Bildung des Signalzustands dar, welcher im vorliegenden Zeitfenster konstant bleiben soll. Die somit erhaltenen Spektren sind in Abbildung 4-18 zu sehen. Komponente B zeigt im Vergleich zu vorher keine Beiträge in der Tripletabsorption mehr. Das Spektrum scheint jedoch aufgrund der konstanten negativen Absorption im Tripletbereich in der Basislinie verschoben zu sein. Durch Korrektur mit einem konstanten Wert ergibt sich eine negative Absorption um 450 nm und eine positive bei etwa 390 nm, welche die Bildung des Cysteinyladduktes beschreibt. Die Komponente A besitzt dagegen ein ähnliches Spektrum wie die Triplets der doppelt inaktivierten Probe.

$$A = e^{\frac{-1}{\tau}}$$

$$B = \textit{konstant}$$

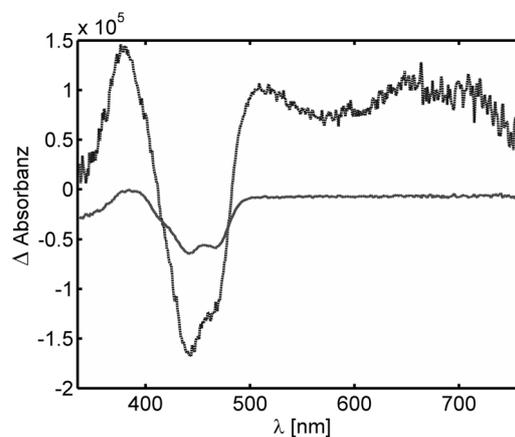


Abbildung 4-18: Spektren der beiden Komponenten der Messung an Phototropin-C57S

Nach Projektion des Modells (links) wurden die Spektren der Komponenten (rechts) erhalten. Die erste Komponente (A) zeigt ein typisches Tripletspektrum, wobei die zweite (B) nur das Ausbleichen des Grundzustandes bei etwa 450 nm und Zunahme der Absorption bei 390 nm zeigt.

Auf die Messung einer LOV2 inaktivierten Probe oder einer Wildtypprobe wurde zu diesem Zeitpunkt aufgrund der langen Erholungszeit (Abschnitt 4.1) verzichtet. Aus den erhaltenen Zeitkonstanten der doppelt und LOV1 inaktivierten Probe kann die kurze Zeitkonstante von 27 μ s (33 μ s im LOV1 inaktivierten Konstrukt) der LOV1 Domäne zugeordnet

werden. Die längere Zeitkonstante beschreibt daher die LOV2-Domäne. Im Vergleich zu Messungen an einzelnen LOV-Domänen oder LOV1-LOV2-Tandemkonstrukten, verhält sich das Triplet von LOV1-C57S im Volllängenkonstrukt sehr ähnlich (Tabelle 4-3). Die kleinere Zeitkonstante von 3 μs wurde hier nicht beobachtet und erfordert eventuell weitere Messungen mit höherer Zeitauflösung. Die Zeitkonstante des Triplets von LOV2-C250S in Phototropin erscheint dagegen mit 140 μs deutlich kürzer als in vergleichbaren verkürzten Konstrukten (253 – 287 μs). Aus den Messungen ergab sich ebenfalls kein Hinweis auf eine vergleichbare kurze Zeitkonstante (12 μs).

Protein	τ_1 [μs]	τ_2 [μs]	τ_3 [μs]
Phot-C57S	-	33	-
LOV1-C57S-LOV2 ^{a)}	5	30	0.4
LOV1-C57S ^{b)}	3	27	-
Phot-C57S/C250S	140	23	-
LOV2-C250S ^{a)}	287	12	-
LOV1-LOV2-C250S ^{a)}	253	4	0.6

Tabelle 4-3: Lebensdauer des Triplet-Zustandes in Phototropin bei RT.

Zum Vergleich sind die Ergebnisse der Blitzlichtphotolyse-Messungen bei 715 nm an einzelnen LOV-Domänen sowie an LOV1-LOV2-Tandemkonstrukten von ^{a)}Guo et al. (Guo *et al.*, 2005) und ^{b)}Kottke et al. (Kottke *et al.*, 2003) aufgeführt

4.4 Bestimmung der Domänenanordnung in Phototropin

Aufgrund von fehlenden Röntgenkristallstrukturen ist die dreidimensionale Anordnung der Photorezeptor- und Kinasedomänen nicht bekannt. Strukturelle Informationen sind jedoch für das genaue Verständnis von intermolekularen Wechselwirkungen und Mechanismen der Signalweiterleitung zwingend notwendig. Da es bisher nicht möglich war, einen geordneten Kristall für die Röntgenstrukturanalyse zu züchten, wurde auf andere Methoden zurückgegriffen, die keine Fernordnung der Moleküle benötigen.

Neben bioenergetischen Prozessen treten auch in sensorischen Photorezeptoren Intermediate mit ungepaarten Elektronen auf. Diese können mit ESR-Spektroskopie charakterisiert werden. ESR-Experimente können sowohl deren atomare als auch die weiter entfernte

Umgebung ($< 50 \text{ \AA}$) beschreiben (Jeschke, 2005). So ist es möglich, neben der atomaren Umgebung der Radikale auch Interaktionen zwischen mehreren Radikalzentren zu untersuchen. Durch Verwendung von mehrfach-Puls Experimenten (Electron-Electron-Double-Resonance, ELDOR (Jeschke, 2002)) ist es möglich, den Abstand sowie die relative Orientierung zweier Radikalzentren aus deren dipolarer Wechselwirkung zu bestimmen. Flavin enthaltende Proteine lassen sich in Anwesenheit von EDTA durch Belichtung quantitativ in die Radikalform überführen (Massey *et al.*, 1966). Dabei wird EDTA unter Elektronenübertragung an das Flavin photochemisch decarboxyliert. Über ESR-Experimente lassen sich aus solch einer Probe strukturelle Parameter des Proteins in Lösung bestimmen.

Der Abstand der Flavin Kofaktoren wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Erik Schleicher und Dr. Sylwia Kacprzak in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert Bittl (FU Berlin) mit Elektronenspinresonanz an Flavinradikalen einer LOV1- und LOV2-inaktivierten Probe von Voll-längen-Phototropin bestimmt. Voll-längenproben wurden, wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben, präpariert und durch mehrfaches Aufkonzentrieren und Verdünnen in einen Puffer mit 50% (v/v) Glycerin überführt. Flavinradikale wurden durch Belichtung in Anwesenheit von EDTA erzeugt und bei 80 K charakterisiert.

Durch Anwendung von 3 und 4-Pulsexperimenten (Abb. 4-19) im X-Band wurde die dipolare Wechselwirkung der Radikale in der Probe bestimmt. Nach Einstrahlung eines $\pi/2$ Puls (90°) präzessieren die Magnetisierungsvektoren in der xy-Ebene orthogonal zum äußeren magnetischen Feld mit verschiedenen Geschwindigkeiten. Nach einer bestimmten Verzögerungszeit τ wird ein π Puls (180°) ausgelöst, der die Bewegungsrichtung der Vektoren umkehrt, so dass diese sich aufeinander zubewegen und bei Aufeinandertreffen nach τ ein Echo erzeugen (Abb. 4-19 a oben). Sind mehrere radikalische Zentren vorhanden, die sich gegenseitig beeinflussen, kann durch Einstrahlung einer zweiten Mikrowellenfrequenz, die idealerweise nur die Elektronenspins eines der Radikale anregt, eine Modulation des Echos erzeugt werden. Dazu wird zu verschiedenen Zeiten T ein zweiter Puls eingestrahlt (Abb. 4-19 a unten) und die Veränderung in der Intensität des Echos registriert. Die Modulation des Echos in Abhängigkeit von T spiegelt dabei die Frequenz der dipolaren Kopplung wieder. Bei 4-Pulsexperimenten wird durch einen weiteren 180° Puls das Signal zusätzlich fokussiert und erweitert den Meßbereich durch Überwindung von instrumentell bedingter Totzeit.

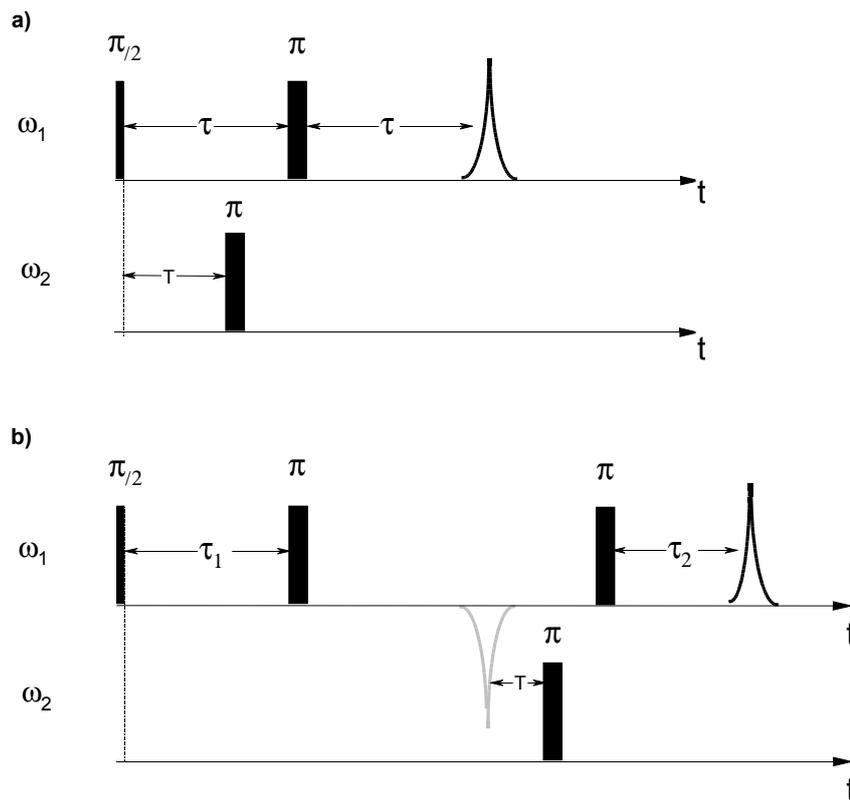


Abbildung 4-19: Pulsfolge eines ELDOR Experiments (Milov *et al.*, 1981):

a) zeigt eine 3-Pulsfolge, b) eine 4-Pulsfolge. Durch Einstrahlung mit der Mikrowellenfrequenz (ω_1) wird ein Echo erzeugt. Eine zeitversetzte Einstrahlung eines Pulses mit einer leicht anderen Frequenz (ω_2) stört die Refokussierung des Echos und erzeugt eine Modulation in Abhängigkeit von T , die der Frequenz der dipolaren Wechselwirkung zweier Elektronenspins entspricht.

Beide Experimente bestätigten unabhängig voneinander dieselbe Frequenz der dipolaren Wechselwirkung von 3.4 ± 0.3 Mhz (Abb. 4-21). Diese entspricht laut Gleichung 4-20 einem Abstand von $24.8 \pm 0.7 \text{ \AA}$ und beschreibt die Distanz der Schwerpunkte der Elektronenspindichte der Radikale, die vermutlich am C4a der Flavine lokalisiert sind.

$$r = \sqrt[3]{\frac{52,04}{\nu_A (\text{MHZ})}} \text{ nm}$$

Abbildung 4-20: Vereinfachte Gleichung zur Berechnung des Abstands aus der Frequenz der dipolaren Wechselwirkung ν_{\perp} zweier Elektronen (Schweiger, A., Jeschke, G., 2001).

Um mögliche intermolekulare Beiträge auszuschließen, wurde ein Kontrollexperiment mit einer LOV1-inaktivierten Volllängenprobe durchgeführt. Das Protein bildet unter den gegebenen Bedingungen nur ein Radikal der LOV1-Domäne, da die LOV2-Domäne durch die Belichtung in das LOV 390 Intermediat überführt wird. Für dieses Protein konnte keine Oszil-

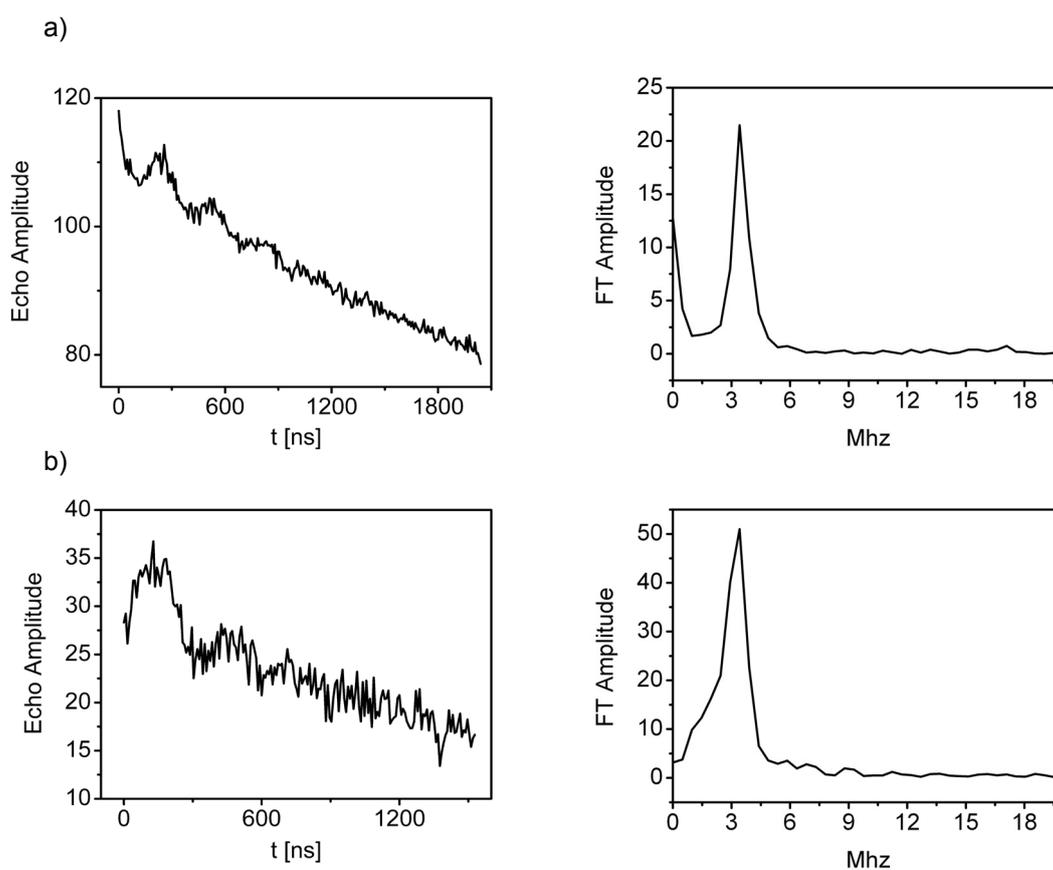


Abbildung 4-21: ELDOR Spektroskopie an LOV1-C57S und LOV2-C250S inaktiviertem Phototropin.

a) zeigt die oszillierende Echo-Amplitude nach einer 3-Puls-Sequenz und rechts daneben die Daten nach Basislinienkorrektur und Fourier-Transformation. b) zeigt dieselben Daten nach einem 4-Puls-Experiment. Beide Fourier-Transformationen geben dieselbe Modulationsfrequenz von 3.4 ± 0.3 MHz.

lation des Spin-Echos erzeugt werden (nicht gezeigt) und damit eine definierte intermolekulare Wechselwirkung ausgeschlossen werden. Der somit erhaltene Abstand aus den X-Band Experimenten gibt also den Abstand der zwei Radikale der LOV-Domänen im Volllängenprotein wieder. Durch Verwendung von höheren Mikrowellenfrequenzen kann aufgrund der Anisotropie des g -Tensors der Radikale eine Orientierungsselektion vorgenommen werden und eine relative Orientierung der Radikalzentren bestimmt werden (Polyhach *et al.*, 2007; Denysenkov *et al.*, 2006). Da die Experimente im Q-Band (nicht gezeigt) nur den über X-Band ermittelten Abstand bestätigten aber nicht weiter zur relativen Orientierung der Flavinradikale beitragen konnten, werden in Zukunft Versuche im höherfrequenten W-Band durchgeführt.

5 Untersuchungen zur Photochemie von BLUF-Domänen

Aufgrund seiner bisher einzigartigen spektroskopischen Eigenschaften und hoher Probenqualität wurde in dieser Arbeit Slr1694 als Modellprotein für Untersuchungen zur Photochemie von BLUF-Domänen verwendet.

5.1 Heterologe Expression von *slr1694*

Slr1694 wurde wie bereits beschrieben heterolog in *E. coli* hergestellt (Gauden *et al.*, 2006; Zirak *et al.*, 2007b). Die Expression in BL21(DE3) stellte sich als wenig reproduzierbar heraus, so dass auf die besser regulierten BL21(DE3)pLyS zurückgegriffen wurde. Die Induktion wurde dabei von 0.7 mM auf 1 mM IPTG erhöht, um die Ausbeute beizubehalten. Slr1694 wurde über Nickel-NTA Chromatographie in hoher Reinheit (Abb. 5-1) und Ausbeute (10 OD₄₅₀·ml/cm pro 3 g Zellen; ~ 18 mg) aufgereinigt.

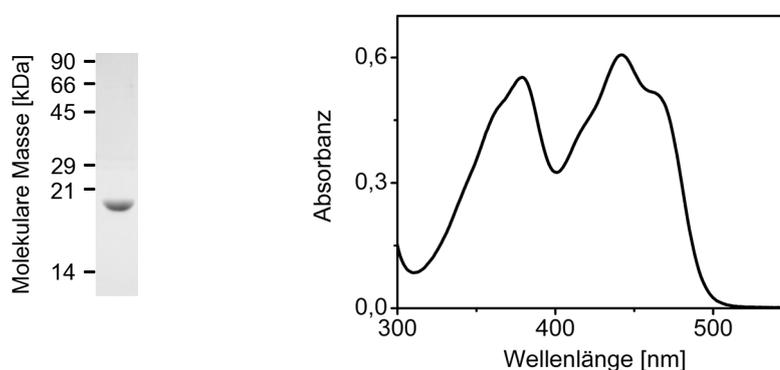


Abbildung 5-1: Aufreinigung und UV/vis-Spektrum von Slr1694.

Slr1694 wurde in hoher Reinheit (siehe SDS-PAGE links) und guter Qualität hergestellt (pET28a(+)-*slr1694*). Das Spektrum zeigt ein typisches BLUF-Absorptionsmuster im Dunkelzustand. Das Maximum der S₀-S₁ Bande liegt bei 441 nm und liegt im Vergleich zu anderen BLUF-Proteinen weit im kurzwelligen Bereich.

5.2 Mutationen in der Flavinbindungstasche von Slr1694

Um ein besseres Bild von den primären photochemischen Prozessen, den Mechanismen der Signalweiterleitung sowie der Kofaktorumgebung zu bekommen, wurden einzelne konser-

vierte Aminosäuren (Abb. 5-2) über ortsgerichtete Mutagenese-PCR ausgetauscht. Die Herstellung und Charakterisierung der mutierten Proteine wurden größtenteils von Manuela Stierl durchgeführt. Die mutierten Proteine wurden in gleicher Weise wie der Wildtyp aufgereinigt. Tabelle 5-1 zeigt eine Übersicht der Absorptionseigenschaften der mutierten Proteine.

	1	10	20	30	40	50								
<i>Slr1694</i>	MSLYRLI	YS	SQGIPNL	--QPQDLKDILES	SQRNN	PANGITGLLCYSKPAFLQ								
<i>AppA</i>	SDLVSCC	YR	S	LAAPDL	--TLRDLLDIVET	SQAHN ARAQLTGALFYSSQGVFFQ								
<i>Tl10078</i>	MGLHRLI	YL	S	CATDGL	--SYPDLRDIMAK	SEVNN LRDGITGMLCYGNMFLQ								
<i>BlrB</i>	DELVSLT	YR	S	RVRLAD	--PVADIVQIMRA	SRVRN LRRLGITGILLYNGVHFVQ								
<i>YcgF</i>	-MLTTLI	YR	S	HIRGDE	--PVKKIEEMVSI	ANRRN MRSDVTGILLFNGSHFFQ								
<i>PACα-F1</i>	TQLRRLM	YL	S	ASTEPEKCN	AEYLADMAHV	ATLRN KQIGVSGFLLYSSPFFQ								
<i>PACα-F2</i>	--LITLT	YI	S	QAAHPM	--SRLDLASIQRI	AFAFN ESSNITGSLLYVSGLFVQ								
Identität	*	*	*		:	'	:	:	*	*	:	*	'	*

	60	70	80	90	100			
<i>Slr1694</i>	VLEGECEQVNETYHRIVQ	D	ERHHS	PQIIECMP	IRRRNF	EV- WSM QAITVND		
<i>AppA</i>	WLEGRPAAVAEVMTHIQR	D	RRHSN	VEILAE	EPIAKRRF	AG- WHM QLSCSEA		
<i>Tl10078</i>	TLEGDRQKVSEYARILK	D	PRHSA	EIVFEF	KAIEERT	FIN- WSM RLVQLGE		
<i>BlrB</i>	TIEGPRSACDELFRILISA	D	PRHQE	ILAFD	LEPITARR	FPD- WSM RIVSRKE		
<i>YcgF</i>	LLEGPEEQVQMIYRAICQ	D	PRHYN	IVELL	CDYAPARR	FGK- AGM ELFDLRL		
<i>PACα-F1</i>	VIEGTDDEDLDFLFAKISA	D	PRHER	CIVL	ANGPCTGR	MYGE- WHM KDSHIDN		
<i>PACα-F2</i>	TLEGPKGAVVSLYLKIRQ	D	KRHKD	VVAVF	MAPIDER	VYGSPL- LD MTSATEEM		
Identität	: **	*	*	**	'	*	:	*

Abbildung 5-2: Vergleich der Primärstruktur von verschiedenen BLUF-Domänen.

Die Nummerierung erfolgt nach der *Slr1694*-Sequenz. Konservierte Aminosäuren sind mit * gekennzeichnet, schwächer konservierte mit : bzw. ' Aminosäuren die in dieser Arbeit untersucht wurden sind schwarz unterlegt.

Der Austausch von S10C, D69E sowie N32D lieferte kein rekonstituiertes Protein und weist auf eine strukturelle Bedeutung des nicht in unmittelbarer Nähe des Kofaktors befindlichen D69 sowie eine Destabilisierung des Kofaktors durch die Mutationen an den näher am Flavin gelegenen Aminosäuren S10 und N32 hin (Abb. 1-6). Serin 10 ist möglicherweise in der Lage entstehende Radikale zu stabilisieren. Einbau eines Schwefelatoms sollte diesen Effekt noch verstärken, um radikalische Intermediate zu stabilisieren und zu untersuchen. Aspartat 69 ist möglicherweise Teil einer Protonen-Transportkette (R71, D69, H72, S10), die als Protonenquelle für die Umordnung des Wasserstoffbrückennetzwerkes während des Photozyklus dienen könnte. N32 steht in Wechselwirkung mit dem C4=O und N3 des Isoalloxazinringes und wird als wichtige Aminosäure für die Signaltransduktion diskutiert (Jung *et al.*, 2006). Die Einführung einer Gruppe mit austauschbarem Proton, sollte zeigen, ob

die Gruppe an der Umordnung des Protonennetzwerks beteiligt ist.

Die Absorptionsspektren der funktional erhaltenen, mutierten Proteine sind in Abbildung 5-3 dargestellt. Die Spektren unterscheiden sich in der Lage der Absorptionsmaxima der Absolut- und der Differenzspektren. Ziel der Mutation Y8W war es, aufgrund der molekularen Eigenschaften der Tryptophan-Seitenkette im Vergleich zu Tyrosin, eines der frühen semichinonischen Photozyklusintermediate für eine ausführliche spektroskopische Analyse zu stabilisieren. Die Mutation ergab wie erwartet ein Protein, welches keinen messbaren rotverschobenen Signalzustand bildet. Leider war es auch unter sauerstofffreien Bedingungen und Zugabe externer Elektronendonoren nicht möglich, die Intermediate zu stabilisieren.

Der Aminosäureaustausch an dem semikonservierten N31 hatte mehrere Ziele. N31 steht vermutlich in Wechselwirkung mit C2=O des Isoalloxazinringes. Für eine genaue Identifika-

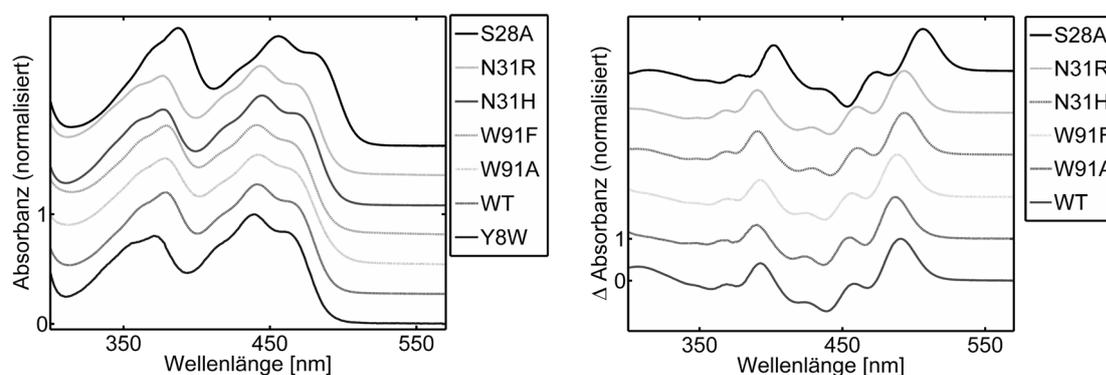


Abbildung 5-3: UV/vis-Spektren von Slr1694 und Mutanten*.

Links ist der Dunkelzustand abgebildet, rechts die zugehörigen (Licht-minus-Dunkel)-Differenzspektren. Die Spektren unterscheiden sich in der Lage der Absorptionsmaxima. Y8W ist blauverschoben im Vergleich zum Wildtyp, alle anderen Mutationen erzeugen eine Rotverschiebung, die besonders bei S28A (15 nm) ausgeprägt ist. In den Differenzspektren verschiebt sich dementsprechend das Maximum der Differenzabsorption.

* (freundlicherweise überlassen von Manuela Stierl)

	WT	Y8W	S28A	N31H	N31R	W91A	W91F
A(max) [nm] S ₀ -S ₂	379	372	387	377	377	378	379
A(max) [nm] S ₀ -S ₁	441	440	456	445	444	442	441
ΔA(max) [nm]	490	-	506	493	493	487	489

Tabelle 5-1: Absorptionseigenschaften von Slr1694 und Mutanten.

ΔA(max) beschreibt die größte Differenzabsorption in den (Licht-minus-Dunkel)-Differenzspektren.

tion der Signatur dieser Carbonyl-Gruppe in FTIR- und ultraschnellen IR-Spektren ist eine gezielte Veränderung der lokalen Umgebung nötig. Zum anderen sollte die Bedeutung dieser Aminosäure für die unterschiedliche Dynamik der Dunkeladaption in verschiedenen BLUF-Domänen verwendet werden. Durch die Mutation N31H wird ein AppA-ähnliches, durch N31R ein BlrB-ähnliches Protein geschaffen (Abb. 5-2). Die Absorptionsmaxima wurden durch die Mutationen erwartungsgemäß in Hinblick auf AppA und BlrB langwellig verschoben.

S28 ist ebenfalls eine mögliche Protonenquelle, die jedoch nicht in allen BLUF-Domänen vorkommt. Die Entfernung der Hydroxylgruppe durch S28A resultierte in einer stark (15 nm) langwellig verschobenen Absorption im Vergleich zum Wildtyp. YcgF und F2 von PAC α besitzen ebenfalls kein Serin an dieser Stelle und sind ähnlich rotverschoben (Rajagopal *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2005).

Die Mutationen an W91 sind eher für die Signaltransduktion von Interesse und wurden hier als Referenz für Untersuchung von Mutationen in PAC hergestellt. Der Austausch von W91 gegen Alanin und Phenylalanin sollte wie in AppA in einer starken Beschleunigung der Dunkeladaption resultieren. Dies wäre vor allem für die Anwendung von Step-Scan-FTIR Untersuchungen von erheblichem Vorteil, die auf ein sich schnell erholendes Objekt angewiesen sind.

5.3 Kofaktoranalyse von Slr1694

Für spektroskopische Untersuchungen ist es wichtig, genaue Informationen über die Zusammensetzung der absorbierenden Stoffe in der betrachteten Probe zu besitzen oder eine möglichst homogen rekonstituierte Probe zu untersuchen. Da BLUF-Domänen, die heterolog produziert wurden, bekannterweise neben FAD auch FMN und Riboflavin binden (Laan *et al.*, 2004), wurde die Chromophorzusammensetzung von Slr1694 über HPLC bestimmt (Manuela Stierl, HU Berlin). Abbildung 5-4 zeigt ein Chromatogramm des Wildtyps. Slr1694 bindet bei Überproduktion in *E. coli* FAD, FMN und Riboflavin (Tab. 5-2). Der Austausch der Aminosäure N31 gegen R oder H erhöht den Anteil an FAD und FMN und resultiert in einer verschwindend geringen Bindung von RF. Dies deutet auf eine bevorzugte Bindung von geladenen Flavinen und damit auf eine stabilere Protein-Kofaktor-Bindung hin. Diese Eigenschaft ist vorteilhaft für spektroskopische Untersuchungen im Hinblick auf Homogenität und Stabilität der Probe.

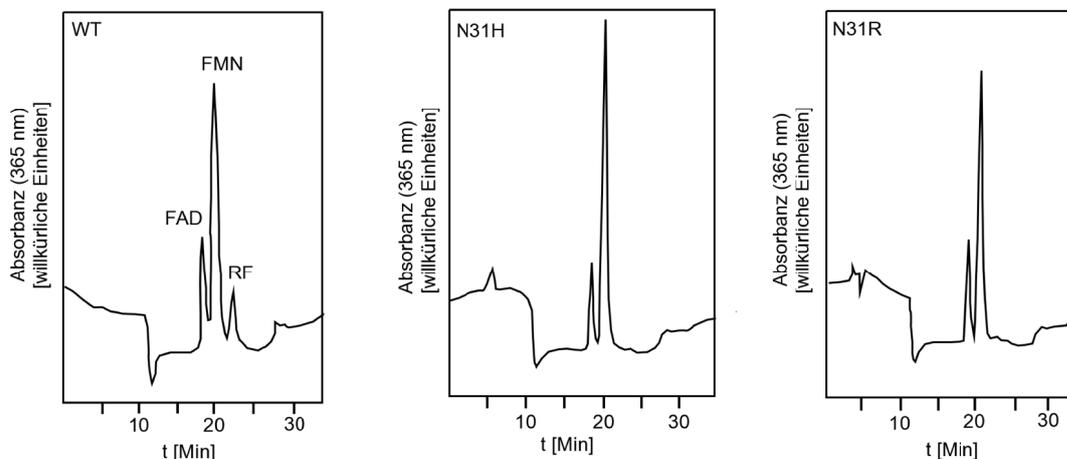


Abbildung 5-4: Chromophorzusammensetzung von Slr1694 und den Mutanten N31H/N31R.

Aus den HPLC-Chromatogrammen* der extrahierten Kofaktoren wurde im Vergleich zum Wildtyp bei den Mutanten N31H und N31R nur eine verschwindend geringe Menge Riboflavin gefunden.

(* freundlicherweise überlassen von Manuela Stierl)

Slr1694 FAD [%]* FMN [%]* RF [%]*

			(* ± 1)
WT	25	62	13
Y8W	46	25	29
N31H	21	78	1
N31R	27	71	2
S28A	26	68	6
W91F	34	55	11
W91A	23	69	8

Tabelle 5-2: Chromophorzusammensetzung von Slr1694 und mutierten Proteinen.

Mögliche Ursachen für die höhere Stabilität von phosphorylierten Flavinen zeigt die Röntgenkristall-Struktur von Slr1694 (Abb. 5-5). Die Phosphatgruppe des Flavinkofaktors wird über eine Salzbrücke durch die Guanidinogruppe von Arginin 30 koordiniert. Ein weiter entferntes Arginin (R71) ist über ein Wassermolekül indirekt mit dem Phosphat verknüpft (nicht abgebildet) und leistet vermutlich keinen signifikanten Beitrag zur Koordinierung.

Proteinstrukturen der Mutanten N31H und N31R wurden ausgehend von der Struktur von Yuan *et al.* (2HFN, Protein Data Base; Yuan *et al.*, 2006) berechnet. Der Kofaktor wurde bei der Berechnung nicht berücksichtigt. Der Austausch des ungeladenen Asparagins durch die geladenen Aminosäuren Histidin und Arginin ermöglicht Konformationen dieser Seitenketten, die zu Salzbrücken mit dem Phosphat des Kofaktors führen. Asparagin im unveränderten Protein wäre zu solch einer Wechselwirkung nicht fähig. Dies könnte der Grund einer bevorzugten Bindung von geladenen Flavinen wie FAD und FMN in den veränderten Proteinen darstellen.

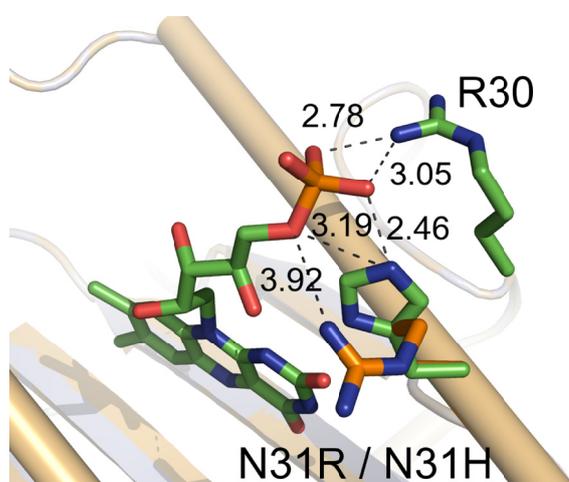


Abbildung 5-5: Berechnete Strukturen der mutierten Slr1694-BLUF-Domänen N31R/N31H.

Die Strukturen von N31H und N31R wurden auf der Basis von der Struktur 2HFN (Yuan *et al.*, 2006) erstellt und sind übereinandergelegt dargestellt. Die ausgewählten interatomaren Abstände sind in Å angegeben. Die Position von R30 ist durch den Austausch N31R und N31H nicht verändert. Einführung von Histidin resultiert in einer möglichen Wechselwirkung mit dem Phosphat über ein freies Sauerstoffatom und über den Phosphoestersauerstoff. Arginin kann an dieser Stelle nur mit dem Phosphoestersauerstoff in Wechselwirkung treten.

Untersuchung einer ähnlichen Mutation an derselben Stelle in der BLUF-Domäne von AppA (H44R) zeigte eine Destabilisierung des Kofaktors und eine vergleichsweise schlechte Selektivität für geladene Flavine (Abb. 5-6). In spektroskopischen Experimenten wurde zudem eine hohe Dissoziation des Kofaktors vom Protein festgestellt (Zirak *et al.*, 2007a). Die Probe enthält laut HPLC zudem noch einen unpolaren Bestandteil, der ebenfalls bei 365 nm absorbiert. Es könnte sich dabei um Lumichrom oder ein ähnliches photochemisches Abbauprodukt der Kofaktoren handeln (W. Holzer *et al.*, 2005). Das Auftreten solcher Abbauprodukte deutet ebenfalls auf eine hohe Dissoziation der Kofaktoren aus der schützenden Umgebung des Proteins hin. AppA besitzt im Gegensatz zu Slr1694 an der homologen Stelle zu R30 keine geladene Aminosäure (Abb. 5-7). Kristallstrukturen von AppA zeigen eine Koordinierung des Phosphats durch das zu R71 homologe Arginin (R84). Dieses ist in Slr1694 nur in schwacher Wechselwirkung mit dem Phosphat (siehe oben). Die Seitenkette von H44 ist in der Kristallstruktur nicht in Wechselwirkung mit der Phosphatgruppe sondern

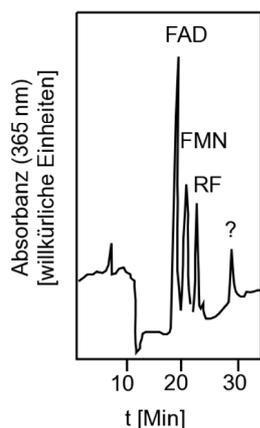


Abbildung 5-6: HPLC Chromatogramm der Chromophorzusammensetzung von AppA H44R.

Das Protein enthielt etwa 51% FAD, 27% FMN und 22% Riboflavin ($\pm 4\%$). Eine unpolare Substanz, die ebenfalls bei 365 nm absorbiert, eluiert nach etwa 30 Minuten. Es handelt sich vermutlich um Lumichrom.

mit C2=O (Jung *et al.*, 2006). Die Einführung einer geladenen Aminosäure mit größerer Reichweite in Position 44 führt daher möglicherweise zu einer konkurrierenden Interaktion der Phosphatgruppe mit Position 44 und Schwächung der Wechselwirkung mit R84 und somit zu einer insgesamt Destabilisierung des Kofaktors.

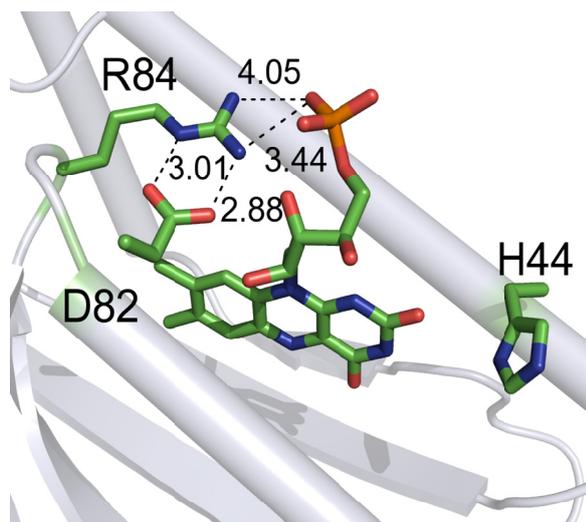


Abbildung 5-7: Koordination der Phosphatgruppe des Flavins in AppA.

Die Abbildung zeigt die Struktur von AppA nach Jung *et al.* (2IYG, Protein Data Base (Jung *et al.*, 2006)) mit ausgewählten interatomaren Abständen (in Å). R84 wird durch D82 in seiner Position fixiert. Gleichzeitig gibt es eine schwache Wechselwirkung von R84 mit der Phosphatgruppe des Kofaktors.

5.4 Verdrängung von Flavinen in Slr1694

Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, ist es für die spektroskopische Betrachtung günstig, ein Protein mit möglichst homogener Kofaktorzusammensetzung zu verwenden. Effiziente Rekonstitutionsprotokolle für BLUF-Proteine würden nicht nur diesem Zweck dienen, sondern können auch zur Ausstattung der Proteine mit künstlichen Kofaktoren (Isotopenmarkierung, Flavin-Analoga) beitragen. Die Chromophor-Analyse von heterolog produzierten BLUF-Proteinen sowie spektroskopische Untersuchungen weisen auf eine wenig spezifische

und relativ schwache Kofaktorbindung in den BLUF-Domänen hin. Daher sollte es möglich sein, eine homogen rekonstituierte Probe durch Verdrängung der gebundenen Kofaktoren mit einem Überschuss an Chromophor in Lösung zu erhalten. Für Slr1694 war es jedoch nötig, zusätzlich chaotrope Salze während der Verdrängung zu verwenden.

Eine chromophorenreine Probe von Slr1694 wurde in der Diplomarbeit von Cathrin Lehmpfuhl durch Dialyse der Probe gegen 2 M KBr enthaltenden Puffer und anschließende Verdrängung der Flavine mit einem 100fachen Überschuss an FAD hergestellt (Zirak *et al.*, 2007b). Nach Entfernung von freiem Flavin durch Dialyse wurde eine etwa 91%ige Rekonstitution erreicht (Tab. 5-3). Dasselbe Verfahren für eine FMN-/RF- oder Roseoflavin-reine Probe war nicht erfolgreich.

Slr1694	FAD [%]*	FMN [%]*	RF [%]*
	(* ± 2)		
Nicht rekonstituiert	37	38	25
rekonstituiert	91	6	3

Tabelle 5-3: Rekonstitution von Slr1694 mit FAD.

Vergleich der Chromophorzusammensetzung von frisch präpariertem und mit FAD rekonstituiertem Slr1694.

5.5 Rekonstitution von Slr1694 mit Roseoflavin

Da die Rekonstitution von bereits isoliertem Slr1694 mit Riboflavin, FMN oder Roseoflavin (8-Demethyl-8-(dimethylamino)-riboflavin) nicht gelang, wurde versucht, den künstlichen Kofaktor bereits bei der Proteinproduktion einzuführen. In früheren physiologischen Arbeiten an *E. gracilis* wurde eine Rotverschiebung des Aktionsspektrums der Phototaxis nach Inkubation der Zellen mit Roseoflavin (RoF) beobachtet (Häder, D-P., Lebert, M., 1998). Dies deutet auf eine Rekonstitution von PAC mit Roseoflavin hin. Aufgrund dessen, der charakteristischen Absorption von Roseoflavin und seinen von den normalen Flavinen unterschiedlichen Eigenschaften wurde eine roseoflavinhaltige Proteinprobe hergestellt. Da *E. coli* Flavine selbst produzieren kann und nicht auf dessen Aufnahme aus der Umgebung angewiesen ist, besitzt das Bakterium keine Möglichkeit, Flavine aus dem Medium aufzunehmen.

Daher wurde Slr1694 zusammen mit dem Riboflavin Transporter PnuX aus *Corynebacterium glutamicum* (pET21a(+)-pnuX: C. Vogl, Universität Regensburg (Vogl *et al.*, 2007)) in C43(DE3) hergestellt. Vor der Induktion der Überexpression wurde dem Medium Roseoflavin (40 mg/l) zugegeben. Die Aufreinigung erfolgte wie in Abschnitt 5.1 über Nickel-NTA-Sepharose.

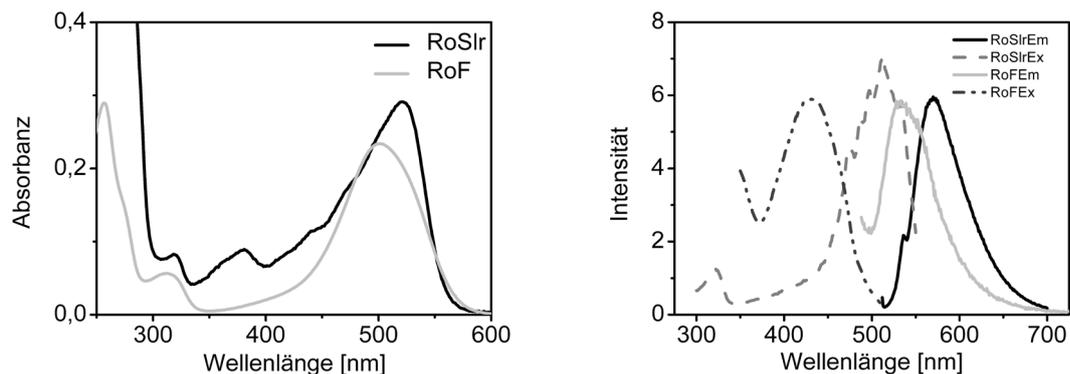


Abbildung 5-8: Absorptions- und Emissionsspektren von freiem und in Slr1694 gebundenem Roseoflavin (RoSlr).

Die Absorption und Emission ist im gebundenen Zustand deutlich langwellig verschoben. Die Absorptionsspektren zeigen zusätzlich eine geringe Absorption zwischen 350 und 450 nm, die von FMN/FAD/RF stammt.

Das Absorptionsspektrum der erhaltenen Proteinprobe (RoSlr) zeigte eine Maximalabsorption bei 521 nm und ein lokales Maximum bei 318 nm (Abb. 5-8). Freies Roseoflavin absorbiert dagegen bei 502 und 312 nm. Ebenfalls ist die Form der Maxima schärfer als bei freiem Roseoflavin. Die Fluoreszenz des Roseoflavin rekonstituiertem Protein ist im Vergleich zu freiem Roseoflavin (533 nm) bei 570 nm maximal. Die stärkste Anregung erfolgt bei 520 nm (430 nm bei Roseoflavin). Die Absorption zwischen 350 und 450 nm hat ihren Ursprung in Proteinen, die die nativen Chromophore enthalten. Da der Extinktionskoeffizient von Roseoflavin ($\epsilon_{505 \text{ nm}} = 31'000$ (Otto *et al.*, 1981)) mehrfach größer als der von Riboflavin, FMN und FAD ($\epsilon_{445 \text{ nm}} \sim 11'000 - 12'500$ (Macheroux, 1999)) ist, erscheint der Beitrag der nativen Flavine geringer. Unter Berücksichtigung der Extinktionskoeffizienten erhält man eine Rekonstitutionseffizienz von Roseoflavin von etwa 60%.

Zur Analyse der Chromophorzusammensetzung musste auf eine modifizierte HPLC-Säule zurückgegriffen werden, da mit dem bisher verwendeten System (Abschnitt 5.3) keine Trennung von Roseoflavin und Riboflavin möglich war. Aufgrund der geringen Absorption

von Roseoflavin bei 365 nm wurde die Detektion bei 260 nm durchgeführt. Das Chromatogramm (Abb. 5-9) zeigte fünf Hauptkomponenten (b – f) sowie ein Nebenprodukt (a). Substanz a) und d) konnten anhand von Vergleichsmessungen mit reinen Flavinstandards nicht zugewiesen werden. Bei d) handelt es sich aufgrund der roten Farbe um ein Derivat von Roseoflavin, welches in den Bakterien entstanden sein muss. Dieses wurde per MS als das FMN-Analogon identifiziert (siehe Anhang). Das Protein zeigte auf einer Sekundenzeitskala keine merkbare Photoreaktion nach Belichtung mit 510 nm (LED, Lumiled).

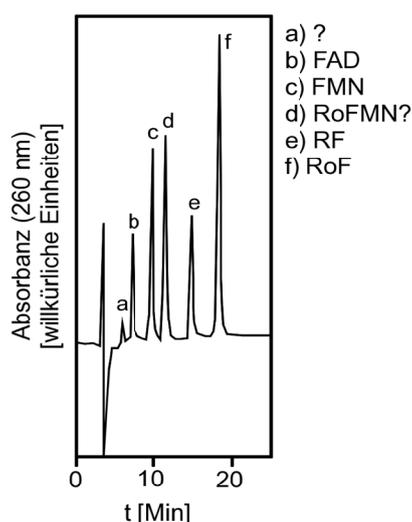


Abbildung 5-9: HPLC-Analyse von roseoflavinhaltigem Slr1694.

Die Probe enthält neben FAD, FMN und RF eine große Menge Roseoflavin (f), sowie zweier unbekannter Substanzen. Die Farbe und Retentionszeit von Fraktion d) deutet auf ein Roseoflavinderivat hin und wurde per MS als Roseo-FMN identifiziert.

5.6 Photodynamik des Signalzustands von Slr1694

Die kinetische Untersuchung des Signalzustands von mutiertem Slr1694 gibt Hinweise auf die Proteindynamik während der Dunkeladaption. Unterschiede in den Geschwindigkeiten können indirekt auf die Beteiligung von funktionellen Gruppen der Proteinseitenketten deuten. Um den Einfluss der Mutationen auf die Dynamik des Signalzustands zu untersuchen, wurde der Zerfall des Signalzustandes von Slr1694 nach Anregung mit einer LED (460 nm) durch Messung der Absorptionsänderung bei 493 nm verfolgt. Die Kinetiken lieferten hauptsächlich monoexponentielle Zerfälle, die jedoch teilweise eine längere Zeitkonstante mit einem Anteil von unter 15% enthalten (Tab. 5-4). Das Verhältnis der beiden Zeitkonstanten ist nicht nennenswert von pH, Pufferzusammensetzung und Belichtungsdauer abhängig (nicht gezeigt). Bei zunehmender Temperatur konvergieren die beiden Zeitkonstanten.

Die Zeitkonstanten der N31H und N31R Proteine waren im Vergleich zum Wildtyp geringfügig langsamer. Für den Fall von N31H (AppA) war eine deutlichere Verlangsamung, bei

N31R (BlrB) eine deutliche Beschleunigung der Reaktion erwartet worden. Somit kann eine für BLUF-Domänen allgemein gültige Funktion der Aminosäuren an der Position von N31 für die Stabilität des Signalzustandes ausgeschlossen werden. Die Mutationen an W91 sollten wie in AppA beide zu einer Beschleunigung der Reaktion führen. Dies war jedoch nur beim Austausch W91A der Fall, W91F dagegen hatte eine etwa zehn mal langsamere Kinetik als der Wildtyp. S28A zeigte ebenfalls eine kürzere Dunkeladaption und weist auf eine Destabilisierung des Signalzustandes in Slr1694 hin.

Slr1694	τ [s]	τ_1 [s]	τ_2 [s]
WT	19.7 ± 0.1	14.6 ± 0.3 (85%)	53.5 ± 4.8 (15%)
S28A	4.5 ± 0.1	3.9 ± 0.1 (98%)	24.9 ± 4.6 (2%)
N31H	27.9 ± 0.1	24.8 ± 0.2 (92%)	73.7 ± 7.4 (8%)
N31R	29.9 ± 0.1	25.3 ± 0.1 (89%)	85.4 ± 7.0 (11%)
W91A	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1 (99.8%)	22.9 ± 0.6 (0.2%)
W91F	192.9 ± 3.8	223.3 ± 2.1 (85%)	47.9 ± 5.5 (15%)

Tabelle 5-4: Kinetische Daten der Dunkeladaption von Slr1694 und Mutanten.

5.7 Angeregter Zustand von Slr1694

Da Fluoreszenz aus dem angeregten elektronischen Zustand erfolgt, ist die Lebensdauer der Fluoreszenz einer Substanz ein Indikator für ihre molekulare Umgebung. Auslöschung der Fluoreszenz kann unter anderem durch Elektronen- oder Protonentransfer aus der Umgebung des Fluorophors erfolgen. Die Dynamik solcher Prozesse schlägt sich in einer Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer nieder.

Neben dem vergleichsweise langsamen Zerfall des Signalzustands ist dessen Bildung innerhalb einer Nanosekunde abgeschlossen. Zum besseren Verständnis der primären Photochemie wurden ultraschnelle Absorptions- und Emissionsexperimente an Wildtyp Slr1694 durchgeführt. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Cosimo Bonetti und Dr. John Kennis an der VU Amsterdam durchgeführt. Die Analyse und Modellierung der Daten erfolgte durch Cosimo Bonetti (van Stokkum *et al.*, 2004).

Die Dynamik des angeregten Zustands des Kofaktors in Slr1694 wurde über das Abklingen

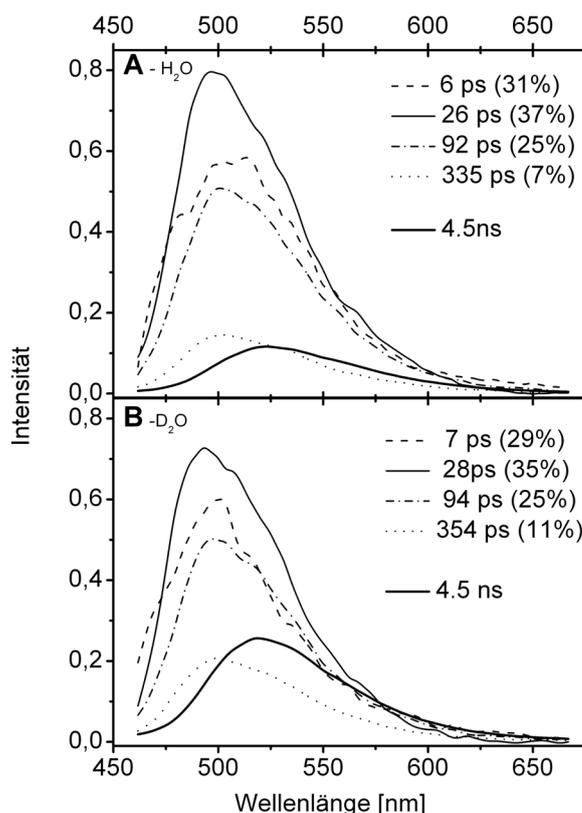


Abbildung 5-10: Zeitliche Entwicklung der Fluoreszenz von Slr1694 nach Laserblitzanregung bei 450 nm*.

Die erhaltenen Emissionsspektren klingen mit fünf unabhängigen Zeitkonstanten ab. Die lange Zeitkonstante von 4.5 ns wird einer kleinen Fraktion von freiem Flavin zugeordnet, welches während der Messung durch Denaturierung der Probe freigesetzt wird. Die übrigen vier Zeitkonstanten beschreiben den Zerfall des angeregten Zustandes des Flavins in der BLUF-Domäne. Da kein kinetischer Isotopeneffekt in D₂O (B) im Vergleich zu H₂O (A) auftritt, muss die Fluoreszenz durch Elektronentransfer vom Protein ausgelöscht werden.

* (freundlicherweise überlassen von C. Bonetti, VU Amsterdam)

der Fluoreszenzemission nach Laseranregung mit einer Streak-Kamera im Pikosekundenbereich zwischen 450 und 670 nm betrachtet (Abb. 5-10). Die Daten zeigen ein mehrfach exponentielles Abklingen der Emission in D₂O wie auch in H₂O und können als Parallelreaktion mit fünf von einander unabhängigen Zeitkonstanten in den angegebenen Verhältnissen beschrieben werden. Die längste Zeitkonstante von 4.5 ns wurde freiem Flavin zugeordnet, das während der Messung durch Denaturierung der Probe freigesetzt wird bzw. im Gleichgewicht mit gebundenem Flavin steht. Die Ergebnisse weisen keinen nennenswerten kinetischen Isotopeneffekt auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Fluoreszenz im Protein allein durch Elektronenübertragung ausgelöscht wird. Das multiexponentielle Verhalten ist vergleichbar mit den Fluoreszenzmessungen an AppA (Gauden *et al.*, 2005b) sowie den ultraschnellen Absorptionmessungen an Slr1694 (Gauden *et al.*, 2006). Die hier erhaltenen Informationen zur Dynamik des Signalzustandes sind notwendig für die Interpretation der ultraschnellen Messungen im IR im folgenden Abschnitt.

5.8 Schwingungsspektroskopische Untersuchung des Photozyklus von Slr1694

Die bisher vorhandenen Daten zum Photozyklus von Slr1694 aus Absorptionsmessungen im UV/vis und der im vorigen Abschnitt beschriebenen Emissionsmessungen beschreiben nur die zeitlichen Veränderungen im Chromophor (Gauden *et al.*, 2006). Die Beteiligung des Proteins kann aus diesen Daten nur indirekt betrachtet werden. Um zusätzlich direkte Informationen über die Beteiligung der Proteinumgebung von Slr1694 an den photochemischen Primärprozessen zu erhalten, wurden ultraschnelle IR-Absorptionsmessungen durchgeführt.

Zur Messung von primären photochemischen Prozessen wie die Elektronenanregung und Prozesse im Subnanosekundenbereich sind spezielle Methoden nötig. Da solche Prozesse mit den verfügbaren elektronischen Aufnahmeggeräten nicht kontinuierlich erfasst werden können, werden einzelne Zeitpunkte mit der Pump-Probe-Methode abgetastet. Kurze Laserpulse im Bereich von Femto- bis Pikosekunden werden dabei sowohl als Anregungsquelle wie auch als Messlicht verwendet. Dazu wird der Puls räumlich und somit auch zeitlich geteilt. Ein Teil wird über optische Elemente in die entsprechende Wellenlänge überführt und dient als Anregungspuls. Der zweite Teil wird über optische Elemente in eine bestimmte Wellenlänge oder ein Kontinuum überführt und dient als Messpuls. Durch die räumliche Trennung ist aufgrund der Lichtgeschwindigkeit eine Verzögerung eines der beiden Pulse gegenüber dem anderen möglich. Durch Messung der Probe mit und ohne Anregungspuls können (Licht-minus-Dunkel)-Differenzspektren für einen bestimmten Zeitpunkt aufgenommen werden. Durch Änderung der relativen Pfadlänge der Pulse wird der Messzeitpunkt verändert und ein bestimmter Zeitbereich kann erfasst werden. Da für jeden Zeitpunkt eine Messung erfolgen muss, benötigt man eine Probe, die eine hinreichend schnelle Erholung zum Ausgangszustand besitzt. Zirkulation der Probe in Kombination mit der schnellen Rückkehr zum Dunkelzustand verhindert Mehrfachanregungen und macht Slr1694 zu einem guten Objekt für Pump-Probe-Spektroskopie.

Die gängig eingesetzte FTIR-Spektroskopie (Abschnitt 4.2) ist für zeitaufgelöste Messungen ungünstig, da für Aufnahme der Interferogramme ein Spiegel mechanisch bewegt werden muss und somit entsprechend Zeit für die Aufnahme eines Spektrums benötigt. Schnelle, zeitaufgelöste Messungen sind daher nur unter bestimmten Voraussetzungen möglich. Im sogenannten Rapid-Scan Modus kann etwa alle 20 ms ein Spektrum aufgenommen werden, indem sich das Interferometer extrem schnell bewegt. Die Step-Scan Methode dagegen erlaubt Zeitbereiche ab 5 ns. Dazu wird zu jeder Position des Interferome-

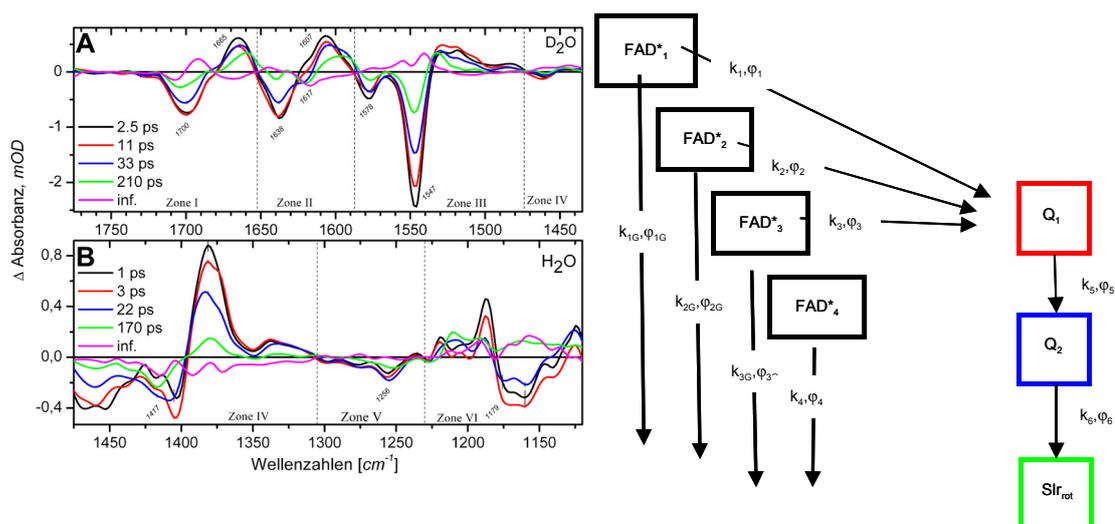


Abbildung 5-11: IR-Differenzspektren aus der sequentiellen Beschreibung der spektralen Änderungen in Slr1694*.

In A und B sind die jeweiligen Messfenster für H₂O und D₂O abgebildet. Das erste Differenzspektrum (schwarz) zerfällt in 1 ps (2.5 ps in D₂O) in das rote Spektrum. Dieses entwickelt sich nach 3 ps (11 ps) über das blaue in 22 ps (33 ps) in das grüne Spektrum. Aus diesem entsteht in 170 ps (210 ps) ein in diesem Zeitbereich dauerhaftes Differenzspektrum. Die Anwendung einer sequentiellen Beschreibung kann die wirklichen Spektren der Intermediate nicht trennen, da das erste Intermediat, der angeregte Zustand, multiexponentiell zerfällt. Nur dieses (schwarz) sowie das Spektrum des langlebigen Zustands kann aufgrund des Betrachtungszeitpunkts als reines FAD*- sowie reines Signalzustandsspektrum interpretiert werden. Rechts ist das auf die Daten projizierte Modell abgebildet, welches die Darstellung der Spektren der Intermediate (Abb. 5-12) ermöglicht. Das Modell beinhaltet den multiexponentiellen Zerfall des angeregten Zustands, sowie die sequentielle Reaktion über Q₁ und Q₂ in den langlebigen Signalzustand Slr_{rot}.

* (freundlicherweise überlassen von C. Bonetti, VU Amsterdam)

ters ein Zeitverlauf bis zum Erreichen des Ausgangszustands aufgenommen und anschließend für die Fouriertransformation zusammengesetzt. Da die Gesamtmessung auf jede Einzelmessung angewiesen ist und Einzelmessungen nicht gesondert betrachtet werden können, ist diese Methode meist sehr störanfällig. Da die primäre Photochemie der BLUF-Domänen bereits im Subnanosekundenbereich abgeschlossen ist, wurde in dieser Arbeit auf Pump-Probe Spektroskopie zurückgegriffen.

Zeitaufgelöste IR-Spektren von Slr1694 wurden in Wasser und D₂O in Pikosekundauflösung bis zu einer Nanosekunde aufgenommen. Um die hohe IR Absorption von Wasser und D₂O im Vergleich zur Absorption des Proteins zu verringern, wurde eine hoch konzentrierte Probe in möglichst geringer Schichtdicke (20 μm) verwendet. Ebenso war es aufgrund des geringen Absorptionskoeffizienten des Kofaktors notwendig, eine Probe mit möglichst hoher Absorption für eine ausreichende Anregung durch den Laserpuls zu erhalten. Da zusätzlich mit dem hier verwendeten experimentellen Aufbau pro Messung nur 180 cm⁻¹ spektral abge-

deckt werden konnten, waren sehr große Mengen an Protein für das Experiment notwendig. Die Zuordnung der IR-Banden erfolgte, soweit nicht anders vermerkt, nach den Literaturwerten von Barth (Barth, 2000).

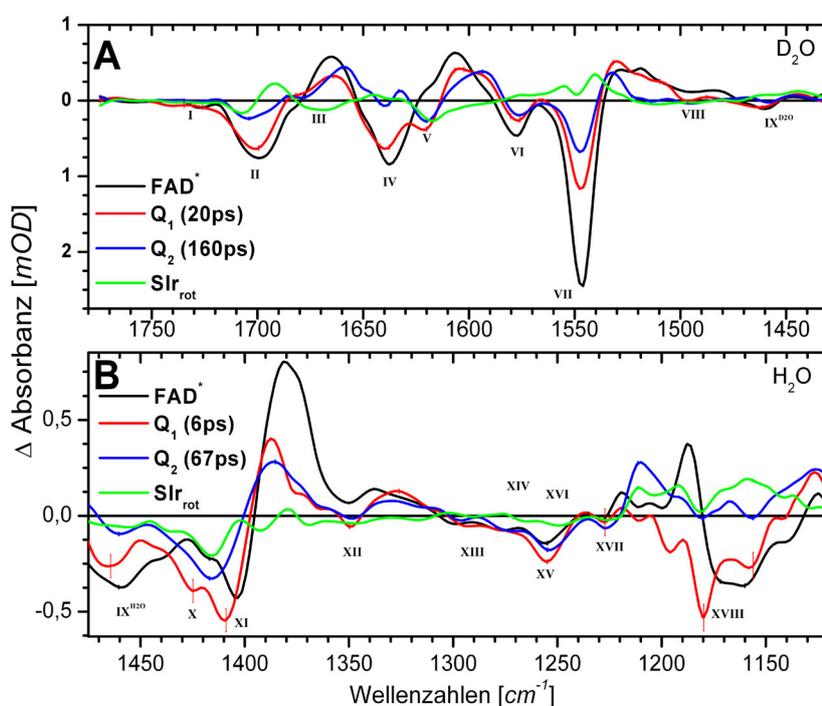


Abbildung 5-12: IR-Differenzspektren der Photozyklusintermediate von Slr1694*.

Die Beschreibung der ultraschnellen Daten erfolgte durch Projektion eines Modells unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Fluoreszenzdaten (Abb. 5-10) und von ultraschnellen vis-Messungen (Gauden *et al.*, 2006). Die Abbildung zeigt die vier Komponenten und die zugehörigen Zeitkonstanten. Die Banden V und XVIII erscheinen als neue negative Beiträge nach dem Spektrum des angeregten Zustandes und können daher Änderungen in der Nähe des Kofaktors zugeordnet werden. Die Region der Banden I – III wird Carbonyl-Streckschwingungen, VI und VII C=N Schwingungen zugeordnet.

* (freundlicherweise überlassen von C. Bonetti, VU Amsterdam)

Eine globale Analyse der erhaltenen Daten mit einem sequentiellen Modell ($A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow \dots$) lieferte eine Beschreibung mit vier Zeitkonstanten und einer im Beobachtungszeitraum nicht zerfallenden Komponente. Aufgrund des mehrfach exponentiellen Zerfalls des angeregten Zustandes sind die mit diesem Modell beschriebenen Spektren in Abb. 5-11, als gemischte Formen der wirklichen Spektren der Intermediate zu betrachten. Das Spektrum zu Beginn der Messung sowie das Spektrum des langlebigen Zustandes kann jedoch als reine FAD*- bzw. reine Signalzustandssignatur gesehen werden. Die Projektion eines Modells unter Berücksich-

tigung der Daten aus den Emissionsmessungen (Abschnitt 5.7) und der Daten der ultraschnellen Messungen von Gauden *et al.* (Gauden *et al.*, 2006) ermöglichte die Trennung der Spektren der vier postulierten Intermediate (Abb. 5-12). Ein Teil der angeregten Flavine kehrt dabei ohne Photoreaktion in den Grundzustand zurück und wurde in die Modellierung mit einbezogen (Abb. 5-11).

Zunächst entsteht angeregtes Flavin (FAD*), welches innerhalb von 6 – 100 ps in Q_1 übergeht. Dieser Vorgang zeigt keinen Isotopeneffekt und deutet auf einen rein elektronischen Prozess hin. Diese Beschreibung stimmt mit den Beobachtungen aus den Fluoreszenzlebensdauer-Messungen (Abschnitt 5.7) überein. Q_1 geht innerhalb von 6 ps (20 ps in D_2O) in einer Isotopen-abhängigen Reaktion in Q_2 über. Dieser Zustand zerfällt innerhalb von 67 ps (160 ps) in den rotverschobenen Signalzustand. Die Zeitkonstanten sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen ultraschneller Messungen im sichtbaren Bereich (Gauden *et al.*, 2006). Zusätzlich entwickelt sich bei 1617 cm^{-1} (V) und $1179/1157\text{ cm}^{-1}$ (XVIII) ein neues Ausbleichen, welches nicht dem angeregten Flavin zugewiesen werden kann und somit auf einen Beitrag von Proteinseitenketten hindeutet. Die Zuordnung des Großteils der Banden ist nicht eindeutig, von daher wird in den folgenden Abschnitten nur auf die sicher zugewiesenen Beiträgen eingegangen.

Das Spektrum von angeregtem Flavin entspricht weitgehend dem IR Spektrum von FAD* in Lösung nach Kondo *et al.* (Kondo *et al.*, 2006). Die ersten beiden Intermediate Q_1/Q_2

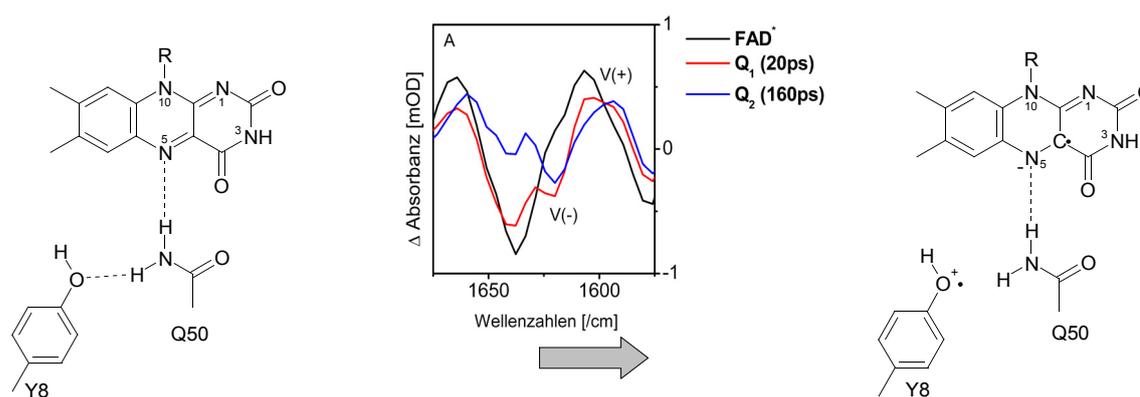


Abbildung 5-13: Protonennetzwerk in der BLUF-Domäne im postulierten Dunkelzustand (links) und nach erfolgtem photoinduziertem Elektronentransfer (rechts):

In Q_1 taucht Bande V als neues Signal auf und ist damit auf Änderungen außerhalb des Kofaktors zurückzuführen. Aufgrund der Position der Bande wird sie C=C Schwingungen von Y8 zugewiesen. Die induzierte Absorption der Bande verschiebt sich im Reaktionsverlauf zu kleineren Frequenzen und deutet auf den Verlust des Elektrons und des Protons der Tyrosinseitenkette hin.

entsprechen in der C=N-Region (VI / VII) weitgehend den Spektren des anionischen Radikals von Riboflavintetraacetat (RBTA) in Acetonitril (Martin *et al.*, 2002) bzw. des neutralen Radikals. Die Banden V und XVIII im Spektrum des ersten Intermediats sind charakteristisch für Tyrosine in Rhodopsin, Photosystem II, PYP, *p*-Cresol und Tyrosin in Lösung und können daher Y8 zugewiesen werden. Bande V beschreibt C=C Streckschwingungen des aromatischen Rings und ist vermutlich von Schwingungen des Isoalloxazinringes überlagert. XVII kann der C-OH Beugeschwingung des Tyrosins zugeordnet werden. Die kontinuierliche Verschiebung der induzierten Absorption von V zu kleineren Wellenzahlen während der spektralen Entwicklung spiegelt den Verlust von Elektron und Proton der Tyrosin-Seitenkette wider (Abb. 5-13).

Die Verschiebung zu geringeren Wellenzahlen der C4=O Bande (III) von 1665 cm^{-1} zu 1659 cm^{-1} im Spektrum von Q₂ deutet auf eine neue Wasserstoffbrücke zwischen Q50 und C4=O und somit auf eine bereits erfolgte Drehung der Glutaminseitenkette um 180° hin (Abb. 5-14). Dem Spektrum des Signalzustandes nach 160 ps konnten wichtige Unterschiede in der Interpretation von bisherigen FTIR Untersuchungen entnommen werden (Masuda *et al.*, 2004b). C=N Schwingungen im Grundzustand werden anhand des Spektrums des angeregten Zustands eindeutig durch die Banden VI und VII bei 1578 und 1547 cm^{-1} beschrieben und nicht durch eine Bande bei 1507 cm^{-1} . Die Banden verschieben sich im langlebigen Zustand zu kleineren Frequenzen und deuten auf eine neue H-Brücke zu N5 hin. Vermutlich ist diese zwischen C4=O und N5 geteilt (Unno *et al.*, 2006). Die bisherige Zuordnung von Bande II zu Änderungen im Peptidrückgrat von Masuda *et al.* ist aufgrund der Geschwindigkeit (160 ps) ihrer Bildung ungültig und eher der C=O Streckschwingung einer Carbonylgruppe in der Nähe des Flavins, vermutlich Q50, zuzuordnen. Aufgrund der an der zugehörigen induzierten Absorption (+) sichtbaren starken Verschiebung im langlebigen Intermediat um etwa 30 Wellenzahlen ist eine neue starke Wasserstoffbrücke am Sauerstoff der Seitenkette wahrscheinlich, die von Y8 stammen könnte. Deutlich wird dies auch an der zeitlich kontinuierlichen Verschiebung von Bande V zu kleineren Wellenzahlen. Y8 verwandelt sich von einem H-Brückenakzeptor zu einem H-Brückendonator (Abb. 5-13/5-14).

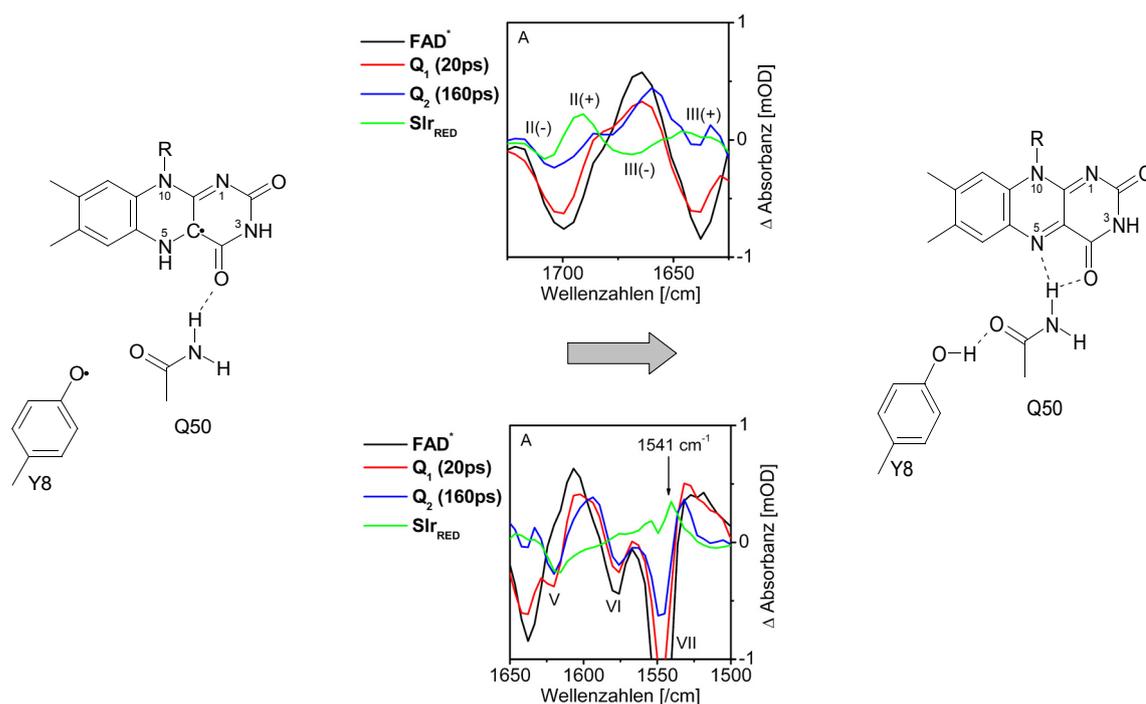


Abbildung 5-14: Protonennetzwerk der BLUF-Domäne im Intermediat Q_2 (links) und im langlebigen Signalzustand (rechts).

In Q_2 verschiebt sich Bande V weiter zu kleineren Frequenzen und spiegelt den Verlust des Protons wider. Gleichzeitig weist die Verschiebung von Bande II (C4=O) auf die Ausbildung einer neuen starken Wasserstoffbrücke an C4=O hin. Dazu muss die Glutaminseitenkette bereits eine 180° Drehung durchgeföhrt haben. Im langlebigen Zustand wird eine Wasserstoffbrücke von Tyrosin zum Glutamin C=O gebildet (III), die sich durch eine starke Verschiebung der induzierten Absorption deutlich macht. Bande V ist immer noch zu sehen, besitzt jedoch keine erkennbare induzierte Absorption. Aus der spektralen Signatur der Carbonylgruppe von Q50 (Bande II) ist eine starke H-Brücke vermutlich von Y8 naheliegend. Die Verschiebung der C=N Schwingungen (VI und VII) des Kofaktors zu 1541 cm⁻¹ weist auf eine H-Brückenkoordinierung von N5 hin. Vermutlich bildet die Amidgruppe von Q50 eine geteilte H-Brücke zwischen N5 und C4=O.

6 Diskussion

6.1 Heterologe Expression von Photorezeptoren

Die heterologe Expression von Proteinen im allgemeinen und von eukaryotischen Proteinen im besonderen stellt eine große Herausforderung an den Experimentator dar. Erfahrungen bei der Expression von anderen Proteinen lassen sich meistens nicht generell auf das eigene Forschungsobjekt übertragen. Viele Bedingungen sind empirisch für das jeweilige Problem optimiert und müssen somit für jedes neue Projekt erneut evaluiert werden. In dieser Arbeit gelang es zwei eukaryotische Photorezeptoren aus phototrophen Organismen mit Hilfe von verschiedenen Expressionssystemen herzustellen. Die Verwendung eines eukaryotischen Systems wie Insektenzellen ermöglichte zumindest für *C. reinhardtii* Phototropin eine hohe Überexpression. Die Expression von PAC α und PAC β konnte nur per Western Blot nachgewiesen werden und war für die beabsichtigten Zwecke zu gering. Ntefidou et al. gelang es PAC aus Insektenzellen einzeln und koexprimiert zu isolieren (Ntefidou *et al.*, 2006). Die spezifische Aktivität des Proteins war jedoch im Vergleich zu nativ aufgereinigtem (Iseki *et al.*, 2002) sehr gering und die isolierte Proteinmenge ermöglichte keine spektroskopischen Untersuchungen.

Trotz der hohen Überexpression von *C. reinhardtii* Phototropin in Insektenzellen war der Anteil an löslichem Protein wie in den Experimenten von Christie *et al.* (Christie *et al.*, 1998) für eine Aufreinigung zu gering. Die unlöslichen Bestandteile zeigten eine hohe, für LOV-Domänen charakteristische grüne Fluoreszenz. Es konnte also von einer zumindest teilweisen richtigen Faltung ausgegangen werden. In Anwesenheit des mild chaotropen Arginins oder eines Detergenzes wurde die Löslichkeit deutlich erhöht. In den Studien von Umetsu *et al.* (Umetsu *et al.*, 2005) konnte durch Arginin eine Erhöhung der Löslichkeit von leicht aggregierenden Proteinen ohne Verlust ihrer nativen Struktur durch Denaturierung herbeigeführt werden. Arginin wirkt selbst in Konzentrationen bis zur Sättigung (~ 2 M) nicht denaturierend (Tsumoto *et al.*, 2003). Der Effekt wird teilweise durch die chemische Verwandtschaft mit dem Chaotrop Guanidin erklärt. Über die Guanidino-Gruppe kann Arginin sowohl polare wie auch π - π Wechselwirkungen mit Proteinseitenketten eingehen und zur Aggregation führende Protein-Protein Interaktionen unterbinden (Arakawa *et al.*, 2007). In Präparationen aus Insektenzellen und aus *E. coli* wurden ebenfalls Anzeichen auf eine Erhöhung der Löslichkeit in

Anwesenheit von Detergenzien beobachtet. Da sich dennoch keine Erhöhung der Ausbeute durch Anwendung von Detergenzien ergab, ist anzunehmen, dass in *E. coli* eventuell nur LOV-Domänen enthaltende Fragmente, wie zuvor bei N-terminalen Aufreinigungen beobachtet, solubilisiert wurden.

Die Anwendung von Arginin bei der Aufreinigung von in *E. coli* produziertem Phototropin ermöglichte die Isolierung ausreichender Mengen für spektroskopische sowie kristallographische Experimente. Die Verwendung von Arginin könnte eine generelle Strategie zur Solubilisierung von leicht aggregierenden Proteinen darstellen. Dies ist besonders im Hinblick auf eine Aufreinigung von Proteinen wie PAC interessant, die *in vivo* kristallin auftreten. Allerdings wäre dafür erst ein geeignetes Überexpressionssystem nötig.

Die Aufreinigung von Phototropin über eine N-terminale Affinitätsmarkierung resultierte in der Anreicherung von N-terminalen Fragmenten. Diese wurden per Gelfiltration und Spektroskopie als funktionale LOV-Domänen identifiziert und deuten auf Translations-Stopps während der Proteinproduktion hin. Solche Phänomene sind bei der starken Überexpression in *E. coli* ungewöhnlich und lassen auf eine teilweise Aggregation des entstehenden Proteins während der Translation schließen. Eine C-terminale Aufreinigung dagegen lieferte ausschließlich Volllänge-Phototropin, welches im Beobachtungszeitraum keine Abbauprodukte bildete. Ebenfalls ist keine Verbindung zu den C-terminalen Abbauprodukten *in vivo* (Yinghong Lu, 2006) auszumachen.

Um die Ausbeute zu erhöhen wurden außerdem Veränderungen an den Expressionskonstrukten sowie bei den Expressionsbedingungen vorgenommen. Die Fusion von Phototropin mit leicht löslichen bzw. die Löslichkeit beeinflussenden Proteinen wie Maltosebindeprotein, NusA und GST bewirkte keine Verbesserung. Die Ausbeute wurde jedoch gesteigert, indem autoinduzierende Medien für *lacUV5* und *tac*-Promotor Konstrukte bzw. das *tetA*-Promotor System verwendet wurden. Beide Methoden erzielten eine Unterdrückung der basalen Expression. Autoinduzierende Medien enthalten Glucose, welche die Aktivierung des Promotors durch etwaige Kontamination des Mediums mit Laktose verhindert. Das *tetA*-System dagegen ist ein etwas schwächerer Promotor im Vergleich zu *lacUV5* und zeigt keine nennenswerte basale Expression in *E. coli*. Als weiterer Vorteil erwies sich die Verwendung von besonderen *E. coli* Stämmen. Die Zelllinien C41(DE3) und C43(DE3) sind Abkömmlinge von BL21(DE3) und enthalten nicht näher charakterisierte Punktmutationen (Miroux & Walker, 1996). Diese zeichnen sich durch eine höhere Toleranz gegenüber toxischen Proteinen aus

und eignen sich zudem für die Herstellung von Membranproteinen. Ein Grund dafür könnten bessere Faltungskapazitäten sein. Die Verwendung von C43(DE3) steigerte die Ausbeute an löslichem Phototropin um Faktor 2 – 3.

6.2 Charakterisierung von heterolog aufgereinigtem Phototropin

Da heterolog gewonnenes Phototropin nach gewisser Zeit leicht aggregierte und unlöslich ausfiel, wurden Gelfiltrationsexperimente sowie analytische Ultrazentrifugationen durchgeführt. In Gelfiltrationen eluierte ein Großteil des Proteins im Ausschlussvolumen der Säulen. Des Weiteren wurden Fraktionen kleinerer Größe und geringerer Menge beobachtet. Insgesamt deutet dies auf eine sehr heterodisperse Zusammensetzung der Probe hin. Um Konzentrationseffekte auszuschließen wurden Proben in geringeren Konzentrationen in einer AUZ analysiert. Auch dort zeigte sich kein homogenes Verhalten. Ein Großteil des Proteins wurde als hohes Aggregat gefunden, eine kleine Fraktion als Monomer sowie nur ein kleinerer Anteil an dimerem Protein. Die Heterodispersität der Proben erschwerten die Fortschritte bei der Kristallisation des Proteins. In Vorversuchen konnten zwar kleine Kristalle gebildet werden, jedoch war es bisher nicht möglich, einen Kristall in Diffraktionsqualität zu züchten. Da sich das Protein sehr unterschiedlich unter verschiedenen Kristallisationsbedingungen verhielt, ist anzunehmen, dass durch weitere Optimierung eine Kristallisation möglich sein sollte.

Untersuchungen zur Stabilität von verschiedenen Konstrukten über CD-Schmelzkurven zeigten eine geringe Thermostabilität der Proben. Eine Erhöhung der konformationellen Stabilität konnte durch Entfernung einer flexiblen Domäne in der Kinase-Region sowie durch Entfernung eines Mg^{2+} -komplexierenden Glutamats erreicht werden. Je nach Probenpräparation zeigten sich ebenfalls stabilisierende Effekte durch Zugabe von Mg^{2+} sowie Adenosin-Phosphaten. Aufgrund der hohen Selbstaggregation der Proteinproben ist anzunehmen, dass Phototropin in *C. reinhardtii* auch starke Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eingeht. Da dieses Problem im Vergleich zu den einzelnen Photorezeptordomänen und LOV1-LOV2-Tandemkonstrukten sehr groß ist, ist vermutlich die Kinasedomäne für die Interaktion größtenteils verantwortlich. Dies ist auch der Fall für die Lokalisierung von *A. thaliana* Phototropin 2 am Golgi-Apparat und an der Membran, die ebenfalls über die Kinasedomäne bewerkstelligt wird (Kong *et al.*, 2007).

Ein weiterer Hinweis ist die unterschiedliche Reinheit von Präparationen, die mit und ohne Arginin durchgeführt wurden. Wurde Arginin nicht verwendet, waren die Proben in der Regel

weniger rein und zeigten sogar spezifische Interaktionen mit *E. coli* Proteinen wie einem cAMP-Rezeptor. Diese Verunreinigung ließ sich zwar durch Größenausschlusschromatographie entfernen, war jedoch bei Affinitätsaufreinigung mit Phototropin assoziiert. Die Interaktion mit einem regulatorischen Element der Genexpression in *E. coli* könnte ein Hinweis auf eine Interaktion mit einem homologen Protein in *C. reinhardtii* sein. Ein möglicher Interaktionspartner könnte eine durch zyklische Nukleotide aktivierbare Serin/Threonin-Proteinkinase aus *C. reinhardtii* sein, die eine hohe Homologie zu dem beobachteten cAMP-Rezeptorprotein aufweist. Ebenso könnte diese Kinase für die *in vivo* beobachtete Phosphorylierung von Phototropin verantwortlich sein. Bei FTIR-Experimenten wurde gezeigt, dass die lichtinduzierten Änderungen in der Kinasedomäne durch die Verwendung von Arginin während der Aufreinigung stark verringert sowie leicht verändert wurden. Eventuell sind gewisse Interaktionen mit anderen Proteinen notwendig, um bestimmte strukturelle Änderungen herbeizuführen und zur Aktivität des Proteins beitragen.

6.3 Photochemie und Signaltransduktion von Phototropin

Die erstmalige Zugänglichkeit eines Volllängen-Phototropins ermöglichte die Untersuchung von Interaktion von Photorezeptor und Effektor-domänen. Bisher war es aufgrund der ungünstigen Aggregation des Proteins nicht möglich, Kristalle in Diffraktionsqualität herzustellen bzw. zu analysieren. Als ebenfalls ungünstig stellte sich die geringe Kinaseaktivität bzw. die nicht deutliche Lichtaktivierung der Kinase heraus (Abb. 6-1). Aus (Auto-)Phosphorylierungsexperimenten konnten leider keine deutlichen Resultate gewonnen werden.

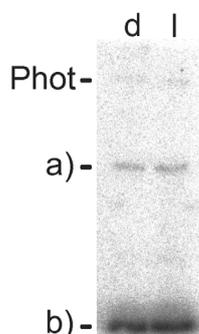


Abbildung 6-1: Autophosphorylierung von *C. reinhardtii* Phototropin.

Die N-terminal gereinigte Probe wurde nach Beendigung der Phosphorylierung per SDS-PAGE getrennt und mit einem Phosphoimager analysiert. Das Volllängenprotein (Phot) zeigt geringe Aktivität und nur einen geringen Unterschied zwischen nicht belichteter Probe (d) und belichteter Probe (l). Des Weiteren sind niedermolekulare phosphorylierte Fragmente a) bei etwa 50 kDa und b) in der Nähe der Lauf-front des Gels zu sehen, die ebenfalls keine Unterschiede zwischen belichtet und unbelichtet zeigen. C-terminale gereinigte Konstrukte, LOV2-STK und X4G zeigten ähnliche Aktivitäten und ebenfalls Phosphorylierung einer etwa 50 kDa großen Verunreinigung.

Die experimentellen Befunde in dieser Arbeit weisen auf die Abwesenheit von lichtaktivierter Autophosphorylierungsaktivität hin. *C. reinhardtii* Phototropin hat im Gegensatz zu *A. thaliana* Phototropin eine geringere bzw. nicht vorhandene Aktivität bezüglich der Autophosphorylierung. Auch den Arbeiten von Onodera *et al.* mit *C. reinhardtii* Phototropin aus Insektenzellextrakten konnte entnommen werden, dass weder die Aktivität noch die Lichtaktivierung in *C. reinhardtii* Phototropin besonders ausgeprägt sind (Onodera *et al.*, 2005). Aufgrund der geringeren Größe des N-terminalen Bereichs sowie des Verbindungsstücks zwischen LOV1 und LOV2 besitzt *C. reinhardtii* Phototropin dort weniger phosphorylierbare Serine und Threonine. Im überproduzierten Protein wurden sowohl vor als auch nach Durchführung einer Autophosphorylierung keine Phosphopeptide gefunden (nicht gezeigt). In der Arbeit von Yinghong Lu (Yinghong Lu, 2006) wurden bei homolog produziertem Phototropin mehrere Phosphorylierungen im J α -Bereich, sowie im flexiblen Bereich der Kinasedomäne gefunden. Es ist jedoch nicht nachgewiesen, ob diese durch Autophosphorylierung oder eine andere Kinase durchgeführt wurden.

Die Autophosphorylierung von *A. thaliana* Phototropin ist bisher noch keinem physiologisch wichtigem Zustand zugeordnet. Protein Kinasen dieser Klasse zeigen in der Regel höhere Aktivität, wenn sie im sogenannten Aktivierungsloop phosphoryliert sind (Adams, 2003). Diese Phosphorylierung kann vom selben Protein ausgehen oder durch eine aktivierende Kinase bewerkstelligt werden. Wenn die Autophosphorylierung als Selbstregulierungsmechanismus betrachtet wird, ist davon auszugehen, dass dieser in *C. reinhardtii* Phototropin nicht vorhanden ist. Gleichzeitig ist zu bedenken, dass Überphosphorylierungen von Proteinen oft auch einen Deaktivierungsmechanismus darstellen (Fankhauser *et al.*, 1999). Es ist also nicht unbedingt anzunehmen, dass die *in vitro* beobachtete Autophosphorylierung eine physiologische Rolle für die Signaltransduktion bei Phototropinen einnimmt.

Phototropine besitzen im Vergleich zu den verwandten Proteinkinasen A/B/C einen erweiterten Bereich in der Nähe des Aktivierungsloops der Kinase. Strukturvorhersagen weisen diesen Bereich als besonders flexibel aus und deuten auf eine mögliche Funktion als konformativer Schalter hin. Dieser Bereich ist in der Regel reich an polaren Seitengruppen wie Lysin und Serin. In *C. reinhardtii* Phototropin ist dieser Bereich besonders groß. Die Entfernung der Domäne erhöhte wie erwartet die thermische Stabilität des Proteins, ergab jedoch keine Veränderungen der Kinaseaktivität oder bei den spektroskopischen Eigenschaften. Die ähnlich

schwache Autophosphorylierung ist jedoch nur begrenzt aussagekräftig, da der Wildtyp ebenfalls nur eine geringe Aktivität besitzt. Berechnungen der theoretischen Struktur auf der Basis von homologen Proteinkinasestrukturen zeigten unterschiedliche Ordnungsgrade der Domäne in aktiven und inaktiven Formen der Kinase an. Der Bereich ist jedoch nicht in der Lage, die Substratbindung durch Blockierung der aktiven Tasche zu regulieren. Möglicherweise dient er als Erkennungsdomäne für interagierende Proteine. In regulatorischen Proteinen werden oft ungeordnete Bereiche gefunden, die sich in Anwesenheit eines Interaktionspartners ordnen, um dann einen funktionalen Komplex zu bilden (Eliezer *et al.*, 2007).

Der einzige Befund zur Interaktion von Kinase und Photorezeptor-Domänen wurde in der UV/vis-spektroskopischen Untersuchung der Rückkehrreaktion aus dem lichtaktivierten Zustand gefunden. Experimente zum thermischen Zerfall der LOV 390 Photoprodukte ergaben ein weitgehend ähnliches Verhalten im Vergleich zu LOV1-LOV2-Tandemkonstrukten. Generell waren die Reaktionen schneller als die vergleichbaren Tandemkonstrukte. Jedoch ergab sich kein grundlegend anderes Verhalten. Da die Volllängenproben sich als sehr anfällig für Änderungen im pH-Wert und in der Ionenstärke erwiesen und leicht ausfielen, konnten zu diesen Punkten keine vergleichbaren Experimente durchgeführt werden. Der Zusatz von ATP und ATP-Derivaten deutete zunächst auf eine Beschleunigung des Zerfalls durch ATP Hydrolyse hin. Derselbe Effekt trat jedoch auch bei einer Mutante auf, die durch die Mutation D547N eine verminderte Fähigkeit zur Mg^{2+} -Komplexierung in der aktiven Tasche besitzt. Dieses Protein sollte zur ATP-Hydrolyse nicht fähig sein. Außerdem konnten keine vermeintlichen Hydrolyseprodukte wie ADP oder AMP chromatographisch nachgewiesen werden. Es muss sich also bei dem Effekt um ATP-spezifische Wechselwirkungen mit dem Protein handeln, die nach einer gewissen Zeit abgeschlossen sind. Vermutlich führt eine kurzfristige Erhöhung der ATP-Konzentration zu kleinen konformationellen Änderungen, die sich mit der Zeit in ein Gleichgewicht begeben. Die Auswirkung von ATP auf den Photozyklus wurde sowohl bei LOV1- wie auch LOV2-inaktivierten Konstrukten beobachtet und weist auf die Beteiligung beider Photorezeptordomänen an der Signalweiterleitung hin.

Die Lebensdauer der Triplet-Zustände in Volllängen-Phototropin unterschied sich kaum von der der LOV1-LOV2-Tandemkonstrukte. Einzig der Triplet-Zustand der inaktivierten LOV2-Domäne besitzt eine deutlich kürzere Lebensdauer als im Tandemkonstrukt. Aus diesen vorläufigen Messungen ist anzunehmen, dass die primären Prozesse im Mikrose-

kunden-Bereich in der LOV-Domäne von der Signaltransduktion weitgehend abgetrennt sind. Die kürzere Lebensdauer des LOV2-Tripletts deutet womöglich auf strukturelle Beeinflussung der Domäne durch die anhängende Kinasedomäne bzw. durch den verknüpfenden Bereich. Der bisher einzige konkrete Hinweis auf mögliche strukturelle Prozesse in dieser Zeitskala kommt aus zeitaufgelösten ORD Messungen an LOV2 von Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2007). Diese sind mit den hier angewandten Methoden nicht zugänglich.

Zusätzlich zu den spektroskopischen Messungen im sichtbaren Spektrum wurde auch Infrarotspektroskopie angewendet. Durch Vergleichsmessungen mit LOV1-LOV2-Tandemkonstrukten mit und ohne J α wurden Absorptionsänderungen in den Vollängenproben strukturellen Änderungen in der Kinasedomäne zugeschrieben. Das unterschiedliche Verhalten von verschieden präparierten Proben könnte auf eine mögliche falsche Faltung unter bestimmten Präparationsbedingungen hinweisen, jedoch wurden UV/vis-spektroskopisch oder über Kina-sektivitätsmessungen keine Unterschiede gefunden. Eventuell ist, wie oben bereits diskutiert, die Anwesenheit von interagierenden Proteinen notwendig, um bestimmte strukturelle Änderungen zu erreichen. Das Fehlen von Beiträgen der J α -Helix deutet auf einen geringen Einfluss dieser bei Änderungen in der Sekundärstruktur hin, schließt aber eine konformative Änderung in diesem Bereich nicht grundsätzlich aus. Um die Strukturänderungen in der Kinasedomäne näher zu beschreiben sind weitere Experimente notwendig.

Klarere strukturelle Einblicke konnten über ESR-Experimente erzielt werden. Durch photochemische Behandlung erzeugte Flavin-Radikale in den LOV-Domänen von Phototropin wurden zur Bestimmung der Domänenanordnung herangezogen. Durch geeignete Puls-Experimente (ELDOR) konnte der Abstand der Radikalzentren über deren dipolare Wechselwirkung bestimmt werden. Zusätzliche Information zur Orientierung der Flavine anhand der *g*-Tensor-Anisotropie sollten durch ELDOR Experimente bei höheren Feldstärken möglich sein. Im X- und Q-Band konnten die Komponenten der Anisotropie nicht gut getrennt werden, so dass auf Experimente im W-Band zu hoffen ist. Mit der zusätzlichen Information könnten dann mehrere wahrscheinliche Strukturen modelliert werden, die Informationen zu Kontaktflächen liefern könnten. Ebenfalls sollte es möglich sein, durch gezielte Einführung von Radikal-Markierungen (Spin label) das Protein zu vermessen.

Der im Vergleich zur räumlichen Ausdehnung der LOV-Domäne geringe Abstand von

etwa 24.8 Å legt eine gut definierte Anordnung der Domänen nahe. Da nur ein Abstand erhalten und keine intermolekulare Wechselwirkung zwischen den LOV1 Domänen gefunden wurde, kann davon ausgegangen werden, dass das Protein in der Photorezeptor-inaktivierten Form vermutlich keine fest definierten intermolekularen Wechselwirkungen über die LOV1-Domänen eingeht, wie von Salomon *et al.* für *Avena sativa* Phototropin 1 postuliert wird (Salomon *et al.*, 2004). In Salomon's Studien wurde jedoch nicht das Gesamtprotein, sondern nur die Dimerisierung einer einzelnen LOV-Domäne untersucht. Obwohl ob die durch Cystein-Serin Mutationen inaktivierte Form vermutlich einen dunkeladaptierten Zustand darstellt, kann über die Situation *in vivo* nur spekuliert werden. Berücksichtigt man die unklare Autophosphorylierung in *C. reinhardtii* Phototropin, ist es wahrscheinlich, dass die Signaltransduktion auf dem Phototropin-Pfad über eine Wechselwirkung mit anderen Proteinen stattfindet und nicht notwendigerweise auf Autophosphorylierung oder LOV-Domänen Dimerisierung angewiesen ist. Möglicherweise spielen die LOV-Domänen eine strukturelle Rolle in der Bildung eines Signaltransduktionskomplexes zusammen mit anderen Proteinen.

In Anbetracht der funktionalen Homologie zu Phototropinen aus höheren Pflanzen stellt *C. reinhardtii* Phototropin ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der primären Prozesse der Phototropin-Signalkette dar. Aufgrund der ungünstigen Eigenschaften des Proteins gelang es bisher nicht, das Protein zu kristallisieren und weiterreichende Einblicke in die molekularen Details der Signalweiterleitung zu erlangen. Die FTIR- sowie die ESR-spektroskopischen Experimente stellen Grundsteine zur Untersuchung der molekularen Änderungen (FTIR) sowie der Domänenanordnung (ESR) dar. Durch weitere Verbesserung der Probenqualität sowie die Anwendung von komplementären spektroskopischen und strukturellen Untersuchungen sollte in naher Zukunft ein detailliertes Bild der molekularen Gegebenheiten vorliegen, welches den Ausgangspunkt für neue, zielgerichtete Experimente stellt.

6.4 Photochemie und Signaltransduktion in BLUF-Photorezeptoren

Um sowohl Photochemie wie auch Signaltransduktion in BLUF-Photorezeptoren zu untersuchen, musste auf zwei verschiedene Systeme zurückgegriffen werden. Slr1694 eignet sich aufgrund seiner einzigartigen Photozyklus-Eigenschaften zu einem idealen Anschauungsobjekt für primäre photochemische Prozesse. Durch ortsgerichtete Mutagenese und biochemi-

sche sowie spektroskopische Experimente konnten neue Einblicke in die Wechselwirkung zwischen Protein und Kofaktor gewonnen werden.

Im Vergleich zu den LOV-Domänen von *C. reinhardtii* binden BLUF-Domänen in der Regel außer ihrem eigentlichen Kofaktor FAD noch FMN und Riboflavin. Dies ist vermutlich auf die relativ lockere Bindung des Kofaktors in BLUF-Domänen zurückzuführen. Spektroskopische Untersuchungen an Slr1694 und BlrB weisen auf ein Gleichgewicht zwischen freiem und gebundenem Flavin hin (Zirak *et al.*, 2006; Zirak *et al.*, 2007b).

In der ausschließlich FMN-bindenden LOV1-Domäne von *C. reinhardtii* wird die FMN-Phosphatgruppe von zwei Argininen, R58 und R74, über Salzbrücken koordiniert. In den BLUF-Domänen wird dagegen je nach Protein eine weniger starke Komplexierung gefunden. In AppA koordiniert R84 eine Phosphatgruppe des Flavins. Das homologe R71 in Slr1694 tritt mit dem Phosphat nur entfernt über ein Wassermolekül in Wechselwirkung. Stattdessen wird die Koordination vom gegenüberliegenden R30 übernommen. Dieses ist von den bislang untersuchten BLUF-Domänen nur in Slr1694 und YcgF vorhanden (Abb. 5-2). Andere BLUF-Proteine haben an dieser Stelle unpolare Reste wie Alanin, Leucin oder Valin.

Für spektroskopische Interpretationen ist es in der Regel günstiger eine einheitliche Chromophorzusammensetzung zu haben. Daher wurden für die Untersuchungen an AppA Zellextrakte mit dem überproduzierten Protein mit einem großen Überschuss an FAD inkubiert und so eine annähernd 100%ige Rekonstitution mit FAD bewerkstelligt (Laan *et al.*, 2004). Zirak *et al.* verwendeten aufgereinigte Proteinproben von BlrB und rekonstituierten ebenfalls erfolgreich mit FAD (Zirak *et al.*, 2006). In Slr1694 war es dagegen nötig, chaotrope Salze wie NaBr für eine erfolgreiche Rekonstitution zu verwenden (Zirak *et al.*, 2007b). Alternativ gelang es, den zu rekonstituierenden Kofaktor bei der Proteinproduktion einzuführen. Dazu wurde der Kofaktor aus dem Medium mit Hilfe des Flavintransporters PnuX in *E. coli* eingeführt (Vogl *et al.*, 2007). Dieses Verfahren wurde mit Roseoflavin erfolgreich angewendet und stellt eine neue effiziente Methode zur Herstellung von beliebig rekonstituierten Flavoproteinen für spektroskopische und funktionelle Studien dar. Da zudem das phosphorylierte Roseoflavin (Roseo-FMN) in den Proben gefunden wurde, ist *E. coli* offensichtlich in der Lage, Riboflavin-Analoga zu phosphorylieren. Somit ist theoretisch auch eine Rekonstitution von ansonsten FMN-haltigen Proteinen wie den LOV-Domänen möglich.

Die roseoflavinhaltige Probe bildete jedoch nicht wie Slr1694 mit FAD/FMN/RF ein rotverschobenes, langlebiges Intermediat. Es ist vermutlich davon auszugehen, dass die *in vivo* Rekonstitution in *E. gracilis* und die damit verbundene Verschiebung des Aktionspek-

trums der Phototaxis nicht auf die Ausstattung von PAC mit Roseoflavin zurückzuführen ist (Häder, D-P., Lebert, M., 1998).

Der Austausch von N31 durch Histidin (AppA) und Arginin (BlrB) sollte Hinweise auf die photodynamischen Unterschiede der drei Proteine geben. Bis auf eine geringe Rotverschiebung (2 – 3 nm) der Maximalabsorption und einer geringfügigen Verlangsamung des Photozyklus wurde keine Veränderung in Hinblick auf AppA bzw. BlrB beobachtet. Unerwarteterweise zeigten sich deutliche Veränderungen in der Flavinzusammensetzung gegenüber dem Wildtyp. Die Einführung einer weiteren geladenen Gruppe in dieser Region führte zu einer bevorzugten Bindung von geladenen Flavinen. Im Gegensatz dazu wurde in der Mutante AppA H44R anhand von spektroskopischen und chromatographischen Untersuchungen eine Destabilisierung der Kofaktorbindung beobachtet (Zirak *et al.*, 2007a). Die Einführung einer möglichen koordinierenden Gruppe scheint dort dagegen zur Schwächung der Koordination zu führen. Zusammenfassend ist aufgrund der obigen Befunde anzunehmen, dass Slr1694 sowie vermutlich YcgF aufgrund von R30 (bzw. R29 in YcgF) eine stärkere Koordination der mit der Ribitylgruppe verknüpften Phosphatgruppe aufweisen und somit eine stabilere Kofaktorbindung besitzen. Die relativ starke Veränderung von Seitenketten an Position 31 führte zu keinen größeren Veränderungen bei Spektroskopie oder Photodynamik und ist somit für die Photochemie und Signaltransduktion von geringerer Bedeutung. In Kombination mit R30 und geladenen Gruppen an Position 31 wurde jedoch die Selektivität für geladene Kofaktoren erhöht und kann in Zukunft zur Herstellung homogener Proben für die Spektroskopie verwendet werden.

Durch verschiedene Mutationen in der Bindungstasche von Slr1694 wurde eine Beschleunigung der Dunkeladaption durch die Mutationen W91A und S28A, eine geringfügige Verlangsamung durch N31H, N31R bzw. eine starke Verlangsamung durch W91F erzielt. Die meisten kinetischen Daten wie auch die Literatur (Masuda *et al.*, 2004b) weisen auf eine mehrphasische Erholungsreaktion hin, in der eine zusätzliche Komponente mit einem Anteil unter 15% auftritt. Abhängigkeiten von pH-Wert, Temperatur oder Belichtungszeit wurden nicht beobachtet, so dass es sich vermutlich um eine unbestimmte Heterogenität im Protein handelt, die eventuell auf leicht unterschiedliche Konformationen zurückzuführen ist.

Die Entfernung der Hydroxylgruppe durch die Mutation S28A führte außerdem zu einer 15 nm Rotverschiebung in dunkel- wie auch lichtadaptiertem Zustand. S28 ist eine semikonservierte Aminosäure, deren Position in YcgF und in den BLUF-Domänen von PAC durch ein

Alanin besetzt ist. Die Lage der Absorptionsmaxima von YcgF (Rajagopal *et al.*, 2004) stimmt gut mit denen der S28A Mutante in Slr1694 überein. Es ist also anzunehmen, dass außer F2 (Ito *et al.*, 2005) auch die F1-Domäne von PAC eher rotverschoben absorbiert. Ebenso ist es vermutlich möglich durch eine entsprechende Mutation das Absorptionsspektrum niederwellig zu verschieben. Dies könnte vor allem bei der Modifizierung der Sensitivität in Hinblick auf biotechnologische Anwendungen ein wichtiges Detail sein.

Die molekulare Ursache der Verschiebung ist nicht eindeutig zu bestimmen. In den Strukturen von Slr1694 befindet sich diese Aminosäure jedoch annähernd in Wasserstoffbrücken-Distanz zu N3, C4=O, N5 sowie etwas weiter entfernt zu N1. Eine ähnliche Positionierung wurde von Anderson *et al.* in der Struktur von AppA gefunden (Anderson *et al.*, 2005). Tendenziell führte die Einführung von unpolaren Aminosäuren in die BLUF-Bindungstasche (Y8W, W91F) eher zu einer Verschiebung in Richtung kürzerer Wellenlängen. Dies wurde auch bei AppA durch die Mutationen Y21I (Laan *et al.*, 2003) und Y21F (Kraft *et al.*, 2003) beobachtet.

Es ist denkbar, dass die Wechselwirkung der Hydroxylgruppe von S28 mit den Flavinkoordinierenden Aminosäuren auf der gegenüberliegenden Seite des Isoalloxazinrings (Y8, N31, N32, Q50) in Konkurrenz tritt. Somit würde ein Fehlen der polaren Wechselwirkung zu einer Verstärkung der übrigen Wechselwirkungen führen. In YcgF wurde von Hasegawa *et al.* eine relativ zu anderen BLUF-Proteinen stärkere Wasserstoffbrücke zwischen Q50 und der C4=O Gruppe des Flavins für die Verschiebung der Absorption verantwortlich gemacht (Hasegawa *et al.*, 2006). Für die Funktion des Photorezeptors scheint diese Aminosäure jedoch nicht nötig zu sein. Ebenfalls scheint die Aminosäure nicht allein für die verkürzte Lebensdauer des Signalzustands verantwortlich zu sein, da der Signalzustand von YcgF eine deutlich längere Lebensdauer besitzt (Rajagopal *et al.*, 2004). Eventuell kann sie jedoch als

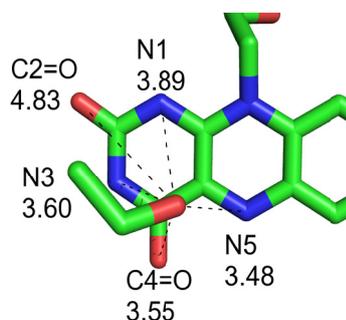


Abbildung 6-2: Mögliche Interaktion von S28 in Slr1694 mit dem Isoalloxazinring.

Die Abbildung zeigt die Abstände (in Å) des Hydroxylsauerstoffs von S28 zu den Heteroatomen des Rings. S28 befindet sich in etwa gleichem Abstand zu N3, C4=O und N5. N1 ist weiter entfernt. Eine Wechselwirkung mit C2=O ist aufgrund der Entfernung unwahrscheinlich.

Teil eines Protonenpools für die lichtinduzierten Umordnungen des Protonennetzwerks fungieren.

Mit Hilfe von zeitaufgelösten Fluoreszenz- und ultraschnellen IR Methoden wurde das bisherige Modell zum Photozyklus bestätigt und erweitert. Die isotopenunabhängige Lebensdauer der Fluoreszenz bestätigte eindeutig die Abfolge der primären Reaktionswege. Somit ist der primäre Prozess, wie bisher angenommen, eine Elektronenübertragung. Der multiexponentielle Prozess ist vereinbar mit den von Gauden *et al.* aufgenommenen zeitaufgelösten Absorptionsspektren (Gauden *et al.*, 2006). Vermutlich ist dies auf eine Heterogenität im Grundzustand aufgrund der relativ lockeren Bindung der Flavine zurückzuführen. Ein Zusammenhang mit der normalerweise inhomogenen Chromophorzusammensetzung ist unwahrscheinlich, da FAD-reine Proben von AppA dasselbe multiexponentielle Verhalten aufweisen (Gauden *et al.*, 2005b).

Ultraschnelle IR-Untersuchungen konnten zum ersten Mal die Schwingungsspektren der semichinonischen Photozyklusintermediate identifizieren sowie die Beteiligung einer Tyrosin- und einer Glutaminseitenkette nachweisen. Das bestehende Modell einer Umordnung im Wasserstoffbrückennetzwerk wurde weitgehend bestätigt und erweitert. In den Infrarotspektren wurde aufgrund des zeitlichen Verlaufs und der spektralen Signaturen die Beteiligung von Y8 und Q50 bestätigt. Im Dunkelzustand koordiniert Q50 sowohl N5 des Isoalloxazinrings sowie den Sauerstoff der Tyrosin-Seitenkette. Nach Anregung wird durch Elektronenübertragung von Y8 das anionische Semichinon gebildet und die H-Brücke zu Q50 gelockert. Die genauen Reaktionswege der nachfolgenden Protonenumordnung konnten mit diesen Messungen aufgrund der nicht beobachteten Tyrosin-C-O \cdot Schwingungsbande nicht nachvollzogen werden. Gleichzeitig muss sich die Amid-Gruppe von Q50 um $\sim 180^\circ$ drehen und koordiniert dann C4=O über eine Wasserstoffbrücke. Diese wird im rotverschobenen Zustand vermutlich, wie von Unno *et al.* beobachtet, zwischen N5 und C4=O geteilt (Unno *et al.*, 2006). Gleichzeitig entwickelt sich eine Wasserstoffbrücke vom Tyrosin-Hydroxyl zum amidischen Sauerstoff des Glutamins (Abb. 6-3). Insgesamt tritt eine Verstärkung der hier besprochenen Wasserstoffbrücken zum Flavon auf. Diese molekulare Situation könnte die Ursache für die Rotverschiebung der Absorption des Signalzustands darstellen, vermutlich sind jedoch noch andere Reste beteiligt.

Das Spektrum des langlebigen Zustandes in den ultraschnellen Messungen ermöglichte eine genauere Interpretation von bisher durch FTIR erhaltene Daten zum Signalzustand. Die

interpretierte Stärkung der C=N Schwingungen des Isoalloxazinrings (Masuda *et al.*, 2004b) konnte über die temporale Entwicklung als eine Schwächung der Schwingung durch Bildung einer neuen H-Brücke näher beschrieben werden. Die Beiträge, die zuvor dem Proteinrückgrat (Amid I) zugeordnet wurden (Masuda *et al.*, 2004b), wurden aufgrund der zeitlichen Entwicklung eindeutig Änderungen einer Seitenkette (vermutlich Q50) zugewiesen.

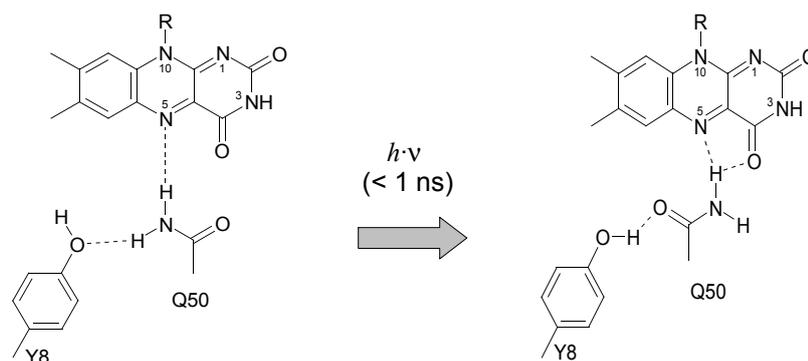


Abbildung 6-3: Modell des Protonennetzwerks im Dunkel- (links) und Lichtzustand (rechts).

Mit Hilfe von ultraschnellen IR-Messungen wurde das bestehende Modell des Protonennetzwerks erweitert. Y8 entwickelt sich von einem H-Brücken-Akzeptor zu einem H-Brücken-Donor im lichtadaptierten Zustand. Die Ausbildung einer neuen Wasserstoffbrücke an C4=O stammt wahrscheinlich von der amidischen Gruppe von Q50. Diese Wasserstoffbrücke ist vermutlich zwischen N5 und C4=O geteilt. Insgesamt erhöht sich die Stärke der Wasserstoffbrücken zum Flavin.

Die Unterschiede zwischen den Spektren nach 300 ps und den stationären Spektren legen weitere Veränderungen im Protein nach Bildung des rotverschobenen Zustandes nahe. Ein kürzliche veröffentlichte FTIR-Studie zu AppA zeigte eine Entwicklung im IR-Spektrum im Mikrosekundenbereich, die einer Deprotonierung von D82 (D69 in Slr1694) zugeschrieben wird (Teresa Majerus *et al.*, 2007). Die damit verbundenen strukturellen Änderungen könnten eventuell zu der aktiven Form des Signalzustandes führen. Die Rolle dieser Aminosäure konnte anhand von Mutagenesestudien nicht erörtert werden, da an dieser Stelle veränderte Proteine nicht gefaltet und isoliert werden konnten (Abschnitt 5.2). Dies wiederum spricht für eine hauptsächlich strukturell wichtige Rolle dieser Aminosäure. Die entsprechende Bande in den hier gemessenen Spektren (I in Abbildung 5-14) wird bereits im angeregten Zustand beobachtet, ist jedoch aufgrund der geringen Intensität schwierig zu interpretieren. Vermutlich handelt es sich um eine Überlagerung von Flavin- und Seitenkettenabsorption.

Als kritische Aminosäuren für die Signalweiterleitung werden in der Literatur das semi-konservierte Tryptophan 91 und das stark konservierte Methionin 93 diskutiert (Abb. 6-4). Im Gegensatz zur Beschleunigung der Dunkeladaption durch W104A und W104F in AppA (Gauden *et al.*, 2007; Laan *et al.*, 2006; Masuda *et al.*, 2005a) führten die homologen Mutationen in Slr1694 zu einem stark unterschiedlichen Verhalten. Die kleinere Seitenkette von Alanin beschleunigte die Reaktion wie in AppA, während sich die Reaktion in Anwesenheit des größeren Phenylalanins stark verlangsamte. Phenylalanin ist im Gegensatz zu Tryptophan nur aromatisch unpolar und ist nicht in der Lage, polare Wechselwirkungen wie der Indol-Ring einzugehen. Wenn dieses Tryptophan aufgrund seiner Fähigkeit zu verschiedenartigen Wechselwirkungen in zwei sehr unterschiedlichen Konformationen vorliegen kann, ist es denkbar, dass Phenylalanin eine der beiden Konformationen bevorzugt und somit auch dem Protein ein starrere Konformation auferlegt. Aus vorhandenen Strukturdaten ist eine Vorzugs-umgebung nicht direkt erkennbar. In der eingebetteten Konformation sollte die Umgebung

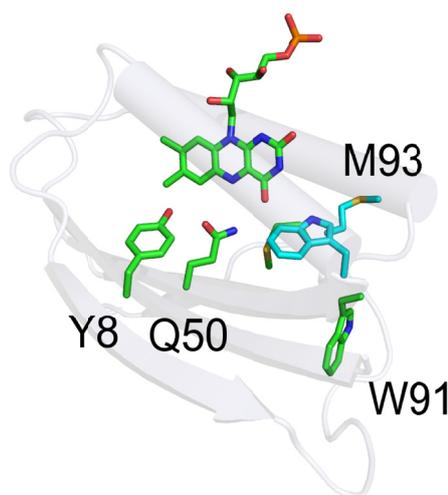


Abbildung 6-4: „Klapp“-Mechanismus in BLUF Domänen.

Die Position von W91 und M93 in Slr1694 im vermeintlichen Dunkel- (türkis) und Lichtzustand (grün) nach Yuan *et al.* (Yuan *et al.*, 2006). Die Position von M93 im Dunkelzustand wird im Lichtzustand von W91 besetzt.

hydrophober sein, jedoch ist der Indolring in der ausgeklappten Position näher an der hydrophoben Seitenkette von V90 und kann polare Wechselwirkungen mit Q94 eingehen. Eine Wasserstoffbrücke von W91 mit Q50 wie von Masuda *et al.* (Masuda *et al.*, 2007) in der eingebetteten Konformation in AppA postuliert wird, ist aus den Kristallstrukturen von Slr1694 nicht ersichtlich. Der Austausch von W91 gegen Alanin gibt Slr1694 vermutlich eine höhere konformationelle Freiheit und somit mehr Möglichkeiten, den Signalzustand thermisch abzubauen. Die Bewegung dieser Aminosäuren als Teil der primären Photochemie würde eine sehr schnelle Umordnung eines großen Teils der Sekundärstruktur erfordern und ist eher

unwahrscheinlich. Falls das Umordnen dieser Aminosäuren für die Signalweiterleitung notwendig ist und nicht nur zwei mögliche Konformationen darstellt, läuft dieser Prozess im Nanosekunden- bis Millisekundenbereich ab und konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

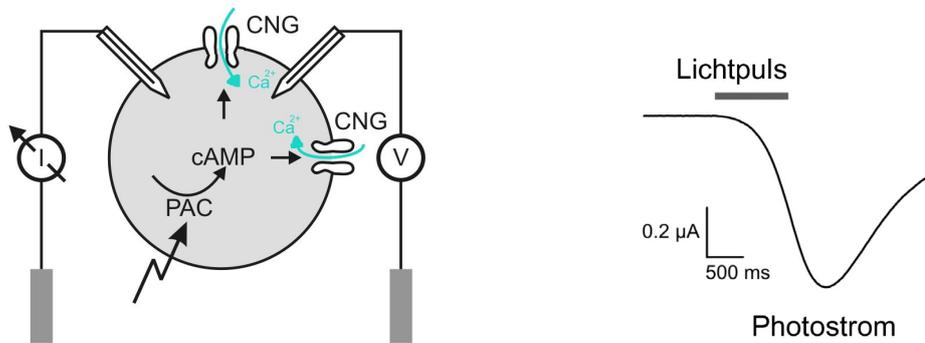


Abbildung 6-5: TEVC Experiment zur Charakterisierung der Aktivität von PAC.

Über die Spannungselektrode wird ein konstantes Potential angelegt. Über die Stromelektrode wird der fließende Strom über die Membran kompensiert und kann somit quantifiziert werden. Die Koexpression von PAC und einem cAMP aktiviertem Kationenkanal in *Xenopus laevis* Oozyten führt zu lichtaktivierten Photoströmen. Diese können zeitaufgelöst betrachtet werden und zur Charakterisierung der Dynamik und der Funktion von verschiedenen PAC Proteinen verwendet werden.

Da das diskutierte Tryptophan in der F2-Domäne von PAC wie auch in der BLUF-Domäne von YcgF nicht vorhanden ist, ist seine Notwendigkeit für die Signaltransduktion sehr umstritten. Die von Masuda *et al.* (Masuda *et al.*, 2007) gezeigten Bindungsexperimente von AppA und dem Transkriptionsregulator PpsR postulieren eine für die Funktion wichtige Wasserstoffbrücke zwischen W104 und Q63. Da Slr1694 keine Effektordomäne besitzt und sein Interaktionspartner *in vivo* unbekannt ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit die photoaktivierte Adenylatcyclase aus *E. gracilis* zur Untersuchung von Rezeptor-Effektor Interaktion betrachtet. PAC lässt sich in großen funktionalen Mengen durch *Xenopus laevis* Oozyten im Gegensatz zu Insektenzellen und *E. coli* herstellen und kann dort zur Untersuchung der Cyclaseaktivität beobachtet werden. Schröder-Lang *et al.* zeigten erstmals eine Möglichkeit zur indirekten Messung der Aktivität unter Zuhilfenahme eines koexprimierten cAMP aktivierten Kationenkanals (Abb. 6-5). Mit Hilfe von TEVC kann die cAMP Konzentration mit dem über die Membran fließenden Strom in Verbindung gebracht werden.

Der Austausch von Methionin durch Alanin (Manuela Stierl) in der F1 Domäne von PAC resultierte in ausbleibenden lichtinduzierbaren Strömen (Abb. 6-6). Die Dunkelströme der Zellen waren jedoch im Vergleich zu „Wildtyp“-Messungen höher. Somit ist davon auszu-

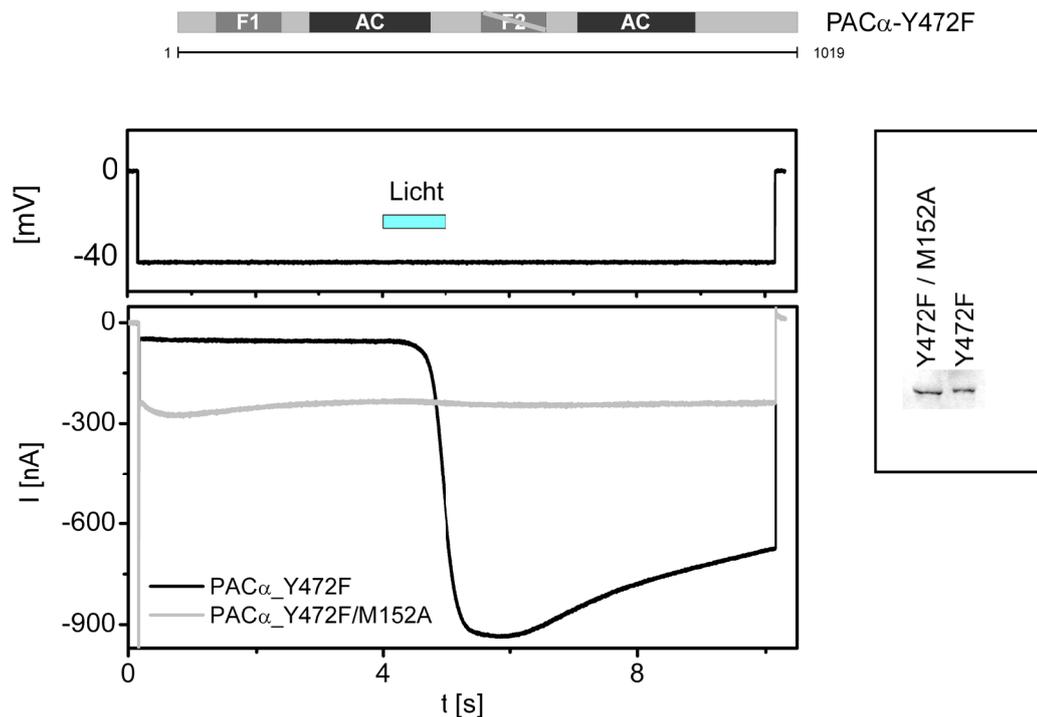


Abbildung 6-6: Einfluss von M152A auf die Photoaktivierung von PAC.

Die Abbildung zeigt photoinduzierte Ströme in Oozyten nach Injektion von PAC α -Y472F und CNG-A2 mRNA. Die F2-inaktivierte Mutante Y472F zeigt einen schnellen Stromanstieg sowie eine langsame Erholung nach Ende der Belichtung. Die Doppelmutante Y472F/M152A dagegen zeigt einen höheren Dunkelstrom sowie kein lichtinduziertes Verhalten. Beide Proteine sind nach Western Blot in vergleichbarer Menge in der Zelle vorhanden.

(Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Maila Reh)

gehen, dass die Lichtaktivierung gestört sowie eine höhere basale Cyclaseaktivität oder eine permanente Aktivierung vorhanden ist. Der Austausch von Methionin resultiert damit in einem zumindest „gelockertem“ Dunkelzustand, der nicht durch Licht aktivierbar ist. Die experimentellen Befunde bestätigen die essentielle Rolle dieses Methionins, können jedoch keine weiteren Einblicke in die molekularen Prozesse während der Lichtaktivierung liefern.

7 Material und Methoden

7.1 Mikrobiologische Methoden und Zellkultur

7.1.1 Zellkultur

Zelllinie	Organismus	Medium	Herkunft
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Grace's Insect Medium + 10% FKS (Biochrom)	Invitrogen (Karlsruhe)
High-Five™	<i>Trichoplusia ni</i>	Express Five™ (Invitrogen)	Invitrogen (Karlsruhe)

Tabelle 7-1: Insektenzelllinien

7.1.1.1 Einfrieren und Auftauen von Insektenzellen

Für die Herstellung von Stammkulturen wurden aus der logarithmischen Wachstumsphase $1 \cdot 10^7$ Zellen Sf9 in 60% Grace's Insect Medium mit 30% fötalem Kälberserum (FKS) und 10% DMSO bzw. $3 \cdot 10^6$ Zellen High-Five™ in 42.5% frischem Medium, 42.5% konditioniertem Medium mit 5% FKS und 10% DMSO in einem Kühlblock (Nalgene) bei -80°C über Nacht eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff eingelagert.

Um eine frische Zellkultur zu starten, wurde eine tiefgefrorene Stammkultur in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und sofort in 15 ml entsprechendem Medium (Tab. 7-1) in einem T25 Zellkulturgefäß ausgesät. Nach 1 h bei 27°C wurde das Medium gewechselt und nach 24 h erneut gegen frisches Medium getauscht.

7.1.1.2 Anzucht von Insektenzellen

Insektenzellen wurden im entsprechenden Medium (Tab. 7-1) mit Gentamicin ($10 \mu\text{g/ml}$) bei 27°C in einem befeuchteten Brutschrank ohne CO_2 -Begasung in adhärenter Form kultiviert. Wenn die Zellen den Gefäßboden fast komplett bedeckten, wurden diese durch vorsichtiges Abspülen vom Boden gelöst und im Verhältnis 1:5 in frischem Medium ausgesät.

7.1.1.3 Transfektion von Insektenzellen

Etwa $9 \cdot 10^5$ Zellen (Sf9) in der logarithmischen Wachstumsphase wurden in 2 ml Medium ausgesät und für 1 h bei 27°C inkubiert. 1 µg Bacmid DNA wurde in 100 µl Medium ohne FKS verdünnt und mit 6 µl Cellfectin™ (Invitrogen) in 100 µl Medium ohne FKS vorsichtig gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die ausgesäten Zellen wurden mit serumfreiem Medium gewaschen und mit 800 µl serumfreiem Medium versetzt. Nach Zugabe der Transfektionsmischung wurden die Zellen bei 27°C inkubiert. Nach 5 h wurde das Medium durch frisches serumhaltiges Medium ersetzt. Die Zellen wurden täglich auf Anzeichen von Infektion beobachtet und nach etwa 72 h wurde die erste virushaltige Stammlösung gewonnen. Das Medium wurde abgenommen und bei $500 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt die rekombinanten Baculoviren.

7.1.1.4 Vermehrung von rekombinanten Baculoviren

Um die Viren-Konzentration zu erhöhen, wurden ~90% konfluente Zellkulturen (Sf9) mit der oben gewonnenen Virenlösung versetzt und bis zu Anzeichen von viraler Infektion kultiviert. Das Medium wurde, wie oben beschrieben, zentrifugiert und als Infektionslösung verwendet. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis die gewünschte Virenkonzentration erreicht war. Virenlösungen wurden bei 4°C lichtgeschützt bis zu 12 Monaten gelagert. Für eine Langzeit-Lagerung wurden 1 ml Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

7.1.1.5 Expression mit dem Baculovirussystem

Zur Herstellung von Proteinen wurden High-Five™ Zellen unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Ca. 90% konfluente Zellkulturen wurden mit einer Infektionsmultiplizität (MOI) von etwa 1.5 mit dem entsprechenden Virus infiziert und nach 72 – 96 h geerntet. Der Fortschritt der Infektion wurde mikroskopisch beobachtet. Das überstehende Medium wurde entfernt, die Zellen mit frischem Medium versetzt und durch Abspülen gelöst. Die Zellen wurden bei $500 \times g$ für 5 min zentrifugiert und bei -20°C gelagert.

7.1.2 Kultivierung von *E. coli*

Medium	Zusammensetzung	Medium	Zusammensetzung
Luria-Bertani (LB)	1% (w/v) Bacto-Trypton 0.5% (w/v) Hefe-Extrakt 1% (w/v) NaCl	ZYM-5052	ZY 2% (v/v) M 2% (v/v) 5052
ZY	1% (w/v) Bacto-Trypton 0.5% (w/v) Hefe-Extrakt	SOB	2% (w/v) Bacto-Trypton 0.5% (w/v) Hefe-Extrakt 10 mM NaCl 10 mM KCl 10 mM MgSO ₄ 10 mM MgCl ₂
50 × M	1.25 M Na ₂ HPO ₄ 1.25 M KH ₂ PO ₄ 2.5 M NH ₄ Cl 2.5 M Na ₂ SO ₄	SOC	SOB 20 mM Glucose
50 × 5052	25% Glyzerin 2.5% Glucose 10% α-D-Laktose-Monohydrat	TfbI	30 mM K-Acetat 50 mM MnCl ₂ 100 mM KCl 15% (v/v) Glyzerin
100 × 505	50% Glyzerin 5% Glucose	TfbII	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15% (v/v) Glyzerin
ZYM-505	ZY 2% (v/v) M 1% (v/v) 505		

Tabelle 7-2: Medien und Puffer für *E. coli*.

Trypton, Hefeextrakt und Agar wurde von BD Biosciences bezogen. Festen Medien wurde 1.6% Bacto-Agar zugesetzt.

Stamm	Genotyp	Hersteller
BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
BL21(DE3)pLysS	F- <i>ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm</i> (DE3) pLysS (CmR)	Novagen
DH10b	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL nupG</i>	Invitrogen
DH10Bac™	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL nupG/bMON14272/pMON7124</i>	Invitrogen
C41(DE3)	F- <i>ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm</i> (DE3) (Miroux & Walker, 1996)	Overexpress
C43(DE3)	F- <i>ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm</i> (DE3) (Miroux & Walker, 1996)	Overexpress

Tabelle 7-3: *E. coli* Stämme

Für die DNA-Präparation, Stammkulturen und feste Medien wurde LB mit entsprechendem Antibiotikum verwendet. *E. coli* Kulturen bis 50 ml wurden mit Kolonien von festem Medium oder von Stammkulturen angeimpft. Dazu wurde mit einem sterilen Zahnstocher eine Kolonie berührt bzw. an der Oberfläche einer gefrorenen Stammkultur gekratzt und dieser in ein entsprechendes Gefäß mit Medium gegeben. Kulturen von mehr als 50 ml wurden mit 1/100 Volumen einer Übernachtskultur angeimpft.

Für die Proteinproduktion wurden frisch transformierte Kulturen von BL21(DE3), C41(DE3), C43(DE3) bzw. BL21(DE3)pLysS verwendet. Die Zellen wurden bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0.5 – 0.7 kultiviert und unter Schütteln auf 18°C abgekühlt. Nach 2 h bei 18°C wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von IPTG / Arabinose / Anhydrotetracyclin (Tab. 7-4) induziert und die Kultur weiter für 16 – 17 h bei 18°C geschüttelt. Zellen wurden bei 4'000 × g (Avanti™, Beckmann, Rotor JLA 8.1000) und 4°C geerntet und mit geeignetem Puffer gewaschen. Die Zellen wurden bei -80°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

Vektor	Induktionsmittel	Konzentration	Medium	Resistenz
Hisp2x / HispMal	IPTG / Autoinduktion	0.3 mM	LB / ZYM-5052	Ampicillin
pASK-IBA	AHT	0.2 µg/ml	LB / ZYM-505	Ampicillin
pBAD	Arabinose	0.004 – 0.1% (w/v)	LB	Ampicillin
pET	IPTG / Autoinduktion	0.7 – 1 mM	LB / ZYM-5052	Kanamycin

Tabelle 7-4: Expressionsbedingungen

7.1.2.1 Autoinduktion

Für die automatische Induktion der Proteinproduktion wurde aus einer Vorkultur in ZYM-505 eine Hauptkultur in ZYM-5052 angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer OD_{600} von ~ 0.8 bei 30°C kultiviert und für weitere 16 h bei 18°C geschüttelt.

7.1.2.2 Stammkulturen

Zur Herstellung von Stammkulturen wurden 500 µl Übernachtskultur mit 500 µl sterilem Glycerin (87% (v/v)) gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

7.1.2.3 Herstellung von kompetenten Zellen: Calciumchlorid Methode

Aus einer Übernachtskultur von 50 ml SOB wurden 200 ml SOB angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600} ~ 0.3 – 0.4 kultiviert. DH10Bac™ wurden in Anwesenheit von Tetracyclin (10 µg/µl) und Kanamycin (50 µg/µl) kultiviert. Nach 7minütiger Zentrifugation bei $2400 \times g$ (Megafuge 1.0 R, Ausschwingrotor, Thermo) und 4°C wurden die Zellen in 45 ml TfbI resuspendiert und 10 min (DH10b/DH10Bac™) bzw. 90 min (BL21/C41/C43) auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde 5 min bei $2000 \times g$ und 4°C zentrifugiert und vorsichtig in 8 ml TfbII resuspendiert. Die Zellen wurden in 110 µl Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

7.2 Molekularbiologie

7.2.1 Transformation von *E. coli*

50 µl (DH10b) / 100 µl (BL21/C41/C43) kompetente Zellen wurden mit 50 – 100 ng Plasmid-DNA oder 20 µl Ligationsansatz gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach 90 s Hitzeschock bei 42°C wurde der Ansatz 2 min auf Eis inkubiert und mit 500 µl SOC / LB versetzt. Nach 1 h Schütteln bei 37°C wurde der Ansatz auf festem Medium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

Die Transformation von DH10Bac™ wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt. Die Inkubationszeit nach dem Hitzeschock betrug 4 h.

7.2.2 DNA-Präparation

Plasmid-DNA wurde aus 2 – 5 ml DH10b Übernachtskulturen per alkalischer Lyse und Säulenaufreinigung nach Herstellerangaben (Nucleospin Plasmid, Macherey&Nagel) durchgeführt. Für größere Mengen wurde DNA aus 50 ml Kultur präpariert (Nucleospin Plasmid Midi-Kit, Macherey&Nagel).

7.2.3 Herstellung von rekombinanter Baculovirus DNA

DH10Bac™ wurden, wie oben beschrieben, mit Donor-Plasmiden transformiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Agar mit 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamicin, 10 µg/ml Tetracyclin, 100 µg/ml Bluo-Gal und 40 µg/ml IPTG ausplattiert. Nach 24 – 48 h bei 37°C wurden einige weiße Kolonien erneut auf frische Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Von dieser Platte wurden weiße Kolonien ausgewählt und für die Bacmid-DNA Präparation in LB (50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamicin, und 10 µg/ml Tetracyclin) angezogen.

7.2.4 Isolierung von Bacmid-DNA

Die Zellen von 2 ml einer Übernachtskultur wurden 30 s bei 11'000 × g (Mikrozentrifuge MiniSpin®, Eppendorf) zentrifugiert und in 250 µl Puffer A1 (Macherey&Nagel) resuspendiert. Die Suspension wurde mit 250 µl A2 vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe und vorsichtigem Mischen mit 300 µl A3 wurde die Lösung

10 min bei $13'000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein mit 800 μ l Isopropanol (p.A.) überführt, vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Bacmid DNA wurde 15 min bei $13'000 \times g$ gefällt und vorsichtig mit 70% (v/v) Ethanol (p.A.) gewaschen. Nach 15 min Zentrifugation bei $13'000 \times g$ wurde die gefällte DNA 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und in sterilem Wasser vorsichtig gelöst.

7.2.5 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme und Puffer wurden, falls nicht anderweitig vermerkt, von MBI Fermentas verwendet. Für analytische Restriktion wurden etwa 0.5 μ g DNA mit 3 U Restriktionsenzym und entsprechendem Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 μ l 1 h bei 37°C inkubiert. Präparative Reaktionen wurden mit etwa 5 μ g DNA und 5 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 50 μ l durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 3 h oder über Nacht. Der Verdau wurde per Agarose-Gelelektrophorese analysiert bzw. die gewünschten Fragmente isoliert.

7.2.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Etwa 1 μ g geschnittenes Plasmid oder PCR-Produkt wurde mit 5 U Antarktischer Phosphatase (NEB) in entsprechendem Puffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wurde für 10 min bei 65°C inaktiviert. Der Ansatz wurde direkt für Ligationen verwendet.

7.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

100 ng geschnittener und gegebenenfalls dephosphorylierter Vektor wurde im Verhältnis 1:3 mit geschnittenem Fragment / PCR-Produkt gemischt und mit 5 U (Weiss Units) T4-Ligase (Fermentas) in einem Gesamtvolumen von 20 μ l für 2 h bei 18°C ligiert. Der Ligationsansatz wurde vollständig für die Transformation verwendet.

7.2.8 Einfügen von synthetischen DNA-Fragmenten

Zur Herstellung von synthetischen doppelsträngigen DNA Fragmenten wurden PAGE-gereinigte Oligonukleotide verwendet. Je 2 μ g der Oligonukleotide wurden in T4-Ligase

Puffer (Fermentas) 2 min bei 95°C denaturiert und mit 0.05°C/s auf 50°C abgekühlt (TGradient Thermocycler, Biometra®). Das hybridisierte Fragment wurde zur Ligation in den entsprechenden Vektor in 50 – 100fachem Überschuss eingesetzt.

7.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle Reaktionen wurden in einem TGradient Thermocycler (Biometra®) durchgeführt. Zur Vervielfältigung von DNA Fragmenten wurden entsprechende Primerpaare synthetisiert (siehe Anhang). Für alle präparativen Reaktionen wurde eine modifizierte fehlerkorrigierende Polymerase (Reprofast, Genaxxon) verwendet. 50 ng DNA Template, 100 pmol Primer, 200 µM dNTPs (MBI) und 2.5 U Polymerase wurden in 50 µl Gesamtvolumen mit entsprechendem Puffer angesetzt. Die PCR-Programme waren wie folgt konstruiert:

1.	5 min	95°C	Initiale Denaturierung
2.	45 s	95°C	Denaturierung
3.	45 s	55 – 65°C	Annealing, Temperatur 5 – 10°C unter T_m (Primer)
4.	x min	72°C	Elongation; x = 1 min / kb

Die Schritte 2 bis 4 wurden zwischen 20 und 30 mal wiederholt.

7.2.10 Analyse von rekombinanter Baculovirus DNA

50 ng Bacmid DNA, 100 pmol je M13fw und M13rv Primer, 200 µmol dNTPs und 2.5 U Taq-Polymerase (Qiagen) wurden in 50 µl Gesamtvolumen in entsprechendem Puffer angesetzt.

1.	3 min	93°C	Initiale Denaturierung
2.	45 s	94°C	Denaturierung
3.	45 s	55°C	Annealing
4.	5 min	72°C	Elongation
6.	7 min	72°C	Abschließende Elongation

Die Schritte 2 bis 4 wurden 30 mal wiederholt. Die Größe des PCR-Produkts wurde mit

Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

7.2.11 Ortsgerichtete Mutagenese mittels Quikchange®-PCR

Zur Einführung von Punktmutationen wurden entsprechende komplementäre HPLC gereinigte Primerpaare synthetisiert. 50 ng Template DNA wurden mit 10 pmol Primern, 200 μ mol dNTPs, 3 μ l Quik-Solution und 2.5 U *Pfu*-Turbo® Polymerase (Stratagene) mit entsprechendem Puffer in 50 μ l Gesamtvolumen angesetzt. Das PCR Programm war wie folgt konstruiert:

1.	5 min	95°C	Initiale Denaturierung
2.	50 s	95°C	Denaturierung
3.	50 s	60°C	Annealing
4.	x min	68°C	Elongation; x = 1 min / kb
6.	7 min	68°C	Abschließende Elongation

Die Schritte 2 bis 4 wurden 18 mal wiederholt.

Template-DNA im Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von 10 U *DpnI* (Stratagene) für 1 h bei 37°C verdaut. Für die Transformation von DH10b wurden 2 μ l dieses Ansatzes verwendet.

7.2.12 *In vitro* Transkription

Ein 20 μ l *in-vitro*-Transkriptionsansatz wurde nach den Angaben des mMACHINE R T7 Ultra Kits (Ambion) aus 1 μ g linearisierter DNA, 10 μ l T7 2 xNTP/ARCA, 2 μ l 10xT7 Reaktionspuffer und 2 μ l T7 Enzym Mix in einem Gesamtvolumen von 20 μ l nukleasefreiem Wasser hergestellt. Nach Inkubation des Ansatzes für 1 – 2 Stunden bei 37°C wurde die RNA durch Zugabe von 50 μ l LiCl-Lösung gefällt und nach 30 min bei -20°C durch Zentrifugation bei 16'000 \times g und 4°C entfernt. Der Rückstand wurde anschließend mit 1 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet. Die RNA wurde in nukleasefreiem Wasser gelöst und spektrometrisch quantifiziert. Zusätzlich wurde die Qualität und Größe der RNA durch Agarose-Gelelektrophorese nach Denaturierung der Probe für 10 min

bei 75°C überprüft. Die RNA wurde bis zur Injektion bei -80 °C aufbewahrt.

7.2.13 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA Fragmenten wurden 0.8 – 1%ige (w/v) Agarose-Gele in TAE-Puffer (40 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.11% (v/v) Essigsäure) mit 0.1 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Proben wurden mit Ladepuffer (MBI, 6×Orange Loading Dye Solution) gemischt und nach Auftragung im Gel mit etwa 5 V/cm getrennt. Die DNA wurde durch Ethidiumbromid mit einem UV-Transilluminator (312 nm) sichtbar gemacht und mit einer CCD-Kamera (8-Bit, Intas) aufgezeichnet.

7.2.14 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen und PCR-Produkten

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mit dem Nucleospin-Extract Kit (Macherey&Nagel) aufgereinigt. PCR-Produkte wurden in abgewandelter Form nach Herstellerangaben (Macherey&Nagel) aufgereinigt.

7.2.15 Bestimmung von DNA-Konzentration und Reinheit

DNA Konzentrationen wurden mit einem UV/vis-Photometer (Ultrospec 1100pro, Amersham Biosciences) bestimmt. Dazu wurde die Absorption von 100 µl einer 1:50 Verdünnung bei 260 und 280 nm in einer Mikroküvette gemessen. Über das Verhältnis der Absorptionen von 260/280 nm wurde die Qualität der Proben bestimmt.

7.3 Proteinchemische Methoden

7.3.1 Aufschluss von *E. coli*

Für den Zellaufschluss wurden die Zellen in dem gewünschten Puffer (~10 ml / g Zellen) mit einer Spatelspitze Antischaum A (Sigma) resuspendiert. Der Zellaufschluss per Ultraschall (SONIFIER II 250 Digi, Branson) wurde in einem Rosettengefäß unter Eiskühlung durchgeführt. Der Aufschluss erfolgte durch Beschallung für 15 – 20 min bei etwa 50 – 60 W mit einer Mikrospritze (Ø = 3 mm). Die Beschallung wurde alle 3 s für 6 s unterbrochen, um eine Überhitzung der Probe zu verhindern.

Für den Zellaufschluss per Druckentspannung wurde zusätzlich eine Spatelspitze DNase I (Roche) in den Puffer gegeben. Die homogene Zellsuspension wurde in einem Mikrofluidizer (EmulsiFlexC3, Avestin) bei 1000 – 1500 bar in einem Durchgang aufgeschlossen.

7.3.2 Präparation von inclusion bodies, Membranen und Cytosol

Nach Aufschluss der Zellen wurde die Suspension für 30 min bei $16'000 \times g$ (Avanti™, Beckmann, Rotor JA 25.50) und 4°C zentrifugiert. Der Rückstand enthält nicht aufgeschlossene Zellen, Zelltrümmer und inclusion bodies. Der Überstand wurde 1 h bei $100'000 \times g$ und 4°C (Sorvall®, Discovery™ 90SE, Hitachi) zentrifugiert. Der Überstand enthielt das Cytosol, der Rückstand die Plasmamembranen.

7.3.3 Chromatographie

Alle verwendeten Puffer wurden durch 0.45 µm Filter filtriert. Für Gelfiltrationen wurden die Puffer außerdem bei 20 mbar (Membranpumpe MZ 2C, Vacuubrand) für 3 h unter Rühren von gelösten Gasen befreit. Die Aufreinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie wurde mit einer peristaltischen Pumpe (Microperplex®, LKB Bromma) auf Plastiksäulen mit Fritte (Sigma) durchgeführt. Der Verlauf der Trennung wurde mit einem Durchflussphotometer (Uvicord-II, LKB) bei 260 nm aufgezeichnet und Fraktionen mit einem Fraktionensammler (Frac-920, Amersham Biosciences) gesammelt.

Gelfiltrationsäulen wurden an einer Äkta-Prime (Amersham Biosciences) betrieben. Säulen wurden nach Herstellerangaben gepackt und betrieben. Säulendimensionen und Flussgeschwindigkeiten sind bei den jeweiligen Experimenten angegeben. Säulenmaterialien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von Amersham Biosciences bezogen. Gelfiltrationen mit Detektion bei mehreren Wellenlängen wurden an einem FPLC System bestehend aus Pumpe (HPLC Pump K1001, Knauer), UV Detektor (K2600, Knauer), Mischkammer (Dynamic Mixing Chamber, Knauer) und Online-Entgaser (Degasser, Knauer) durchgeführt.

7.3.4 Isolierung Slr1694 / LOV / LOV-Tandemkonstrukte

Puffer	Slr1694	LOV-Konstrukte
Lysepuffer	50 mM Tris/HCl pH 8.0	50 mM NaP _i
	100 mM NaCl	300 mM NaCl
	50 mM KCl	1 mM PMSF
	1 mM PMSF	
Waschpuffer	50 mM Tris/HCl pH 8.0	50 mM NaP _i
	300 mM NaCl	300 mM NaCl
	25 mM Imidazol	0.1 mM PMSF
	0.1 mM PMSF	
Elutionspuffer	50 mM Tris/HCl pH 8.0	50 mM NaP _i
	100 mM NaCl	300 mM NaCl
	50 mM KCl	500 mM Imidazol
	500 mM Imidazol	0.1 mM PMSF
	0.1 mM PMSF	
Dialyse-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8.0	10 mM NaP _i
	10 mM NaCl	10 mM NaCl

Tabelle 7-5: Verwendete Puffer zur Aufreinigung von Slr1694 und LOV-Domänenkonstrukten

10 g Zellen wurden in entsprechendem Puffer (Tab. 7-5) resuspendiert und per Mikrofluidizer oder Ultraschall aufgeschlossen. Das Cytosol wurde präpariert und mit einer Pumpe mit 1 ml/min auf eine 10 ml Nickel-NTA Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 1 l Waschpuffer über Nacht mit etwa 1 ml/min gewaschen. Stoßelution mit 500 mM Imidazol setzte das Protein von der Säule frei, welches fraktioniert aufgefangen wurde. Imidazol wurde durch Dialyse gegen 2×1000 faches Volumen imidazolfreien Puffer entfernt.

7.3.5 Isolierung von Phototropin über Nickel-NTA

Das Cytosol von 10 g Zellen in Lysepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, gegebenenfalls mit 250 mM Argininhydrochlorid) wurde präpariert und mit einer Pumpe mit 0.5 ml/min auf eine 10 ml Nickel-NTA Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 300 ml Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 – 15 mM Imidazol, 0.1 mM PMSF) mit etwa 1 ml/min gewaschen. Stoßelution mit Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 500 mM Imidazol, 5% (w/v) Glycerin, 0.1 mM PMSF) setzte das Protein von der Säule frei, welches fraktioniert aufgefangen wurde. Imidazol wurde anschließend durch Dialyse gegen 2 × 1000faches Volumen imidazolfreien Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10% (w/v) Glycerin, 0.1 mM PMSF) entfernt.

7.3.6 Isolierung von Phototropin über Strep-Tactin

Das Cytosol von 10 g Zellen in entsprechendem Puffer (s. Isolierung über Nickel-NTA) wurde mit 1 mg Avidin versetzt und mit einer Pumpe mit 0.5 ml/min auf eine 5 ml Strep-Tactin Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 300 ml Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM PMSF) mit etwa 1 ml/min gewaschen. Stoßelution mit Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2.5 mM Desthio-biotin, 10% (w/v) Glycerin, 0.1 mM PMSF) setzte das Protein von der Säule, welches fraktioniert aufgefangen wurde.

7.3.7 Isolierung an Amylose

50 ml Cytosol oder Proteinlösung wurden auf eine 3 ml Amylose-Säule (NEB) mit 1 ml/min gegeben. Nach Waschen der Säule mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM PMSF) mit 1 ml/min wurden die Proteine mit 10 mM Maltose enthaltendem Puffer eluiert und fraktioniert.

7.3.8 Solubilisierung von Phototropin aus inclusion bodies

Die inclusion bodies Fraktion aus 5 g Zellen wurde mit einem Glas-Homogenisator mit

dem entsprechenden Puffer in Anwesenheit von 2 M Arginin-HCl homogenisiert und unter schwachem Rühren über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Suspension wurde 30 min bei $16'000 \times g$ (Avanti™, Beckmann, Rotor JA 25.50) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für 1 h bei $100'000 \times g$ und 4°C (Sorvall®, Discovery™ 90SE, Hitachi) zentrifugiert. Die lösliche Fraktion wurde 1×4 h gegen das 50fache Volumen Arginin-freien Puffer dialysiert und auf eine 5 ml Nickel-NTA Säule aufgetragen.

7.3.9 Solubilisierung von Phototropin mit Detergenzien

100 mg der inclusion bodies Fraktion und der Membranfraktion wurden in einem Eppendorf Gefäß mit einem Plastikhomogenisator in 1 ml Puffer mit entsprechenden Mengen an Detergenz homogenisiert und 1 h im Dunkeln bei 4°C mit gelegentlichem Durchmischen inkubiert. Nach 30 min Zentrifugation bei $16'100 \times g$ und 4°C (Kühlzentrifuge 5415 R, Eppendorf) wurde der Überstand anhand der Fluoreszenzemissionsspektren untersucht.

7.3.10 Analyse von Cytosol und Membran von *Xenopus laevis* Oozyten

Oozyten wurden wie in Abschnitt 7.5 vorbereitet und nach den elektrophysiologischen Messungen bei -80°C gelagert oder sofort, wie nachfolgend beschrieben, verarbeitet. Eine Oozyte wurde in 50 µl HbA-Puffer (20 mM Tris pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 80 mM Sucrose, 0.1 mM PMSF) mit einer 200 µl Pipettenspitze homogenisiert und 10 min bei $200 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert, bis sich kein Dotterprotein mehr absetzte. Zur Trennung von Membran und Cytosol wurde der Überstand 30 min bei $16'000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand bzw. der Membranrückstand wurde in entsprechenden Mengen SDS-PAGE-Probenpuffer denaturiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

7.3.11 SDS-PAGE

Proteinproben wurden mit Polyacrylamid-Gelen bestehend aus einem 3%igen Sammel- und 12 – 15%igem Trenngel nach Laemmli (Laemmli UK, 1970) analysiert. Pro 20 µl Probe wurden 5 µl Protein-Auftragspuffer (2% (w/v) SDS, 0.5 M Saccharose, 0.1% (w/v) Bromphenolblau, 0.1 M Tris-Acetat, 2.5 mM EDTA, 3.5 mM DTE) zugegeben und 10 min bei 95°C unter Schütteln inkubiert. Die Trennung erfolgte bei RT bei einem konstanten Strom von 30 mA (Biometra). Die Protein wurden in Coomassie-Färbelösung (0.1% (w/v) CBB-R250, 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure) 3 min bei 300 W in der Mikrowelle gefärbt und durch mehrmaliges Aufkochen in Wasser entfärbt.

7.3.12 Western Blot

Antikörper	Beschreibung	Herkunft	Verdünnung
PAC α	Antikörper gegen C-terminales Peptid 105ct (Iseki <i>et al.</i> , 2002)	Hase	1:500
PAC β	Antikörper gegen C-terminales Peptid 90ct (Iseki <i>et al.</i> , 2002)	Hase	1:100
Anti-His	His-Tag Antikörper	Maus	1:1500
Anti-Hase-IgG	Sekundärer Antikörper gegen Hase-IgG	Ziege	1:2000
Anti-Maus-IgG	Sekundärer Antikörper gegen Maus-IgG	Ziege	1:2000
Anti-Myc	Myc-Tag Antikörper	Hase	1:2000

Tabelle 7-6: Antikörper für Western Blot Analyse

SDS-PAGE Gele wurden in Blot-Puffer gewaschen und die Proteine mit einem Semi-dry Blotter (Blue-flash, Serva) für 1 – 2 h bei 15 V auf eine Membran (Nitrocellulose, HyBond, Amersham Biosciences) übertragen. Die Membran wurde für 1 h mit 7% (w/v) Magermilchpulver in PBS blockiert und über Nacht bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper (Tabelle 7-6) in der entsprechenden Verdünnung in PBS mit 0.5% (w/v) Magermilchpulver inkubiert. Die Membran wurde dann 2 × 10 min in PBST, 1 × 10 min in PBS und 1 × 10 min in Detektionspuffer (100 mM Tris, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) gewaschen. Zur

Detektion wurde die Membran mit 5 ml Detektionspuffer mit 3.5 µl NTB (53 mg/ml in 70% (v/v) DMF) und 15 µl BciP (50 mg/ml in DMF) überschichtet. Die Färbereaktion wurde durch Entfernen der Flüssigkeit gestoppt.

7.3.13 Massenspektrometrische Analyse von tryptisch verdauten Proteinproben

MS-Analytische Verfahren wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Maria Mittag an der Universität Jena durchgeführt. Proteine wurden per SDS-PAGE getrennt und die zu untersuchende Bande nach Coomassie-Färbung aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde mit destilliertem Wasser gewaschen und entfärbt und in einer Vakuumzentrifuge (DNA 120 SpeedvacTM, ThermoSavant) getrocknet. Das Protein wurde im Gel proteolytisch über Nacht bei 37°C verdaut (30 – 40 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat mit 60 ng/µl Trypsin). Das Gelstück wurde getrocknet und mit 100 µl Acetonitril/Wasser (3:2) für 2 – 3 h stark geschüttelt. Die überstehende Lösung wurde mit einer Vakuumzentrifuge eingeeengt und der Rückstand mit 3 – 5 µl HPLC-Puffer (0.1% Ameisensäure in 95/5 (v/v) H₂O/Acetonitril) aufgenommen und mit einem ESI-Massenspektrometer (Thermo Finnigan LTQ; Finnigan Dynamic nano spray ionization source; New Objective PicoTip Emitter (FS360-25-10-N-XX-CT) ESI Nadel; 1.7 kV; Software Xcalibur 1.4 (SR1) Thermo Finnigan) analysiert. Aus den erhaltenen Massen wurden mit einer Datenbank die Fragmente identifiziert.

Proteinlösungen wurden 10 min bei 95°C denaturiert und lyophilisiert. Der Rückstand wurde mit 1:20 (w/w) Trypsin (modified, sequencing grade, Promega) über Nacht, wie oben beschrieben, verdaut.

7.3.14 Massenspektrometrische Analyse von Flavin Kofaktoren

Flavine wurden wie in 7.3.15 getrennt und fraktioniert aufgefangen. Die Proben wurden in einer Vakuumzentrifuge eingeeengt und zur Analyse 1:10 in Methanol/Wasser (1:1) mit 0.1 FA verdünnt. Die Analyse erfolgte von Matthias Ziehe am Institut für Chemie (Analytische und Umweltchemie/Strukturanalytik und Umweltchemie; Prof. Dr. Linscheid) mit einem ESI-Massenspektrometer (Finnigan LTQ FTMS ausgestattet mit einem 6 T supraleitendem Magneten; NSI (nano-ESI) TriVersa NanoMate, Advion Biosystems). Zur Identifizierung der Substanzen wurden diese durch CID (Collision Induced Dissociation) mit Helium als Stoßgas fragmentiert. Die Masse wurde mit einem Massenbereich von 2 Da isoliert.

7.3.15 HPLC Analyse von Flavinen und Nukleotiden

Zur Analyse der Kofaktorzusammensetzung der hergestellten Proteine wurden etwa 500 μl einer Probe mit einer $\text{OD}_{450/510} \sim 0.3$ für 3 min bei 95°C denaturiert und auf Eis gekühlt. Nach 1 min Zentrifugation bei $11'000 \times g$ und Raumtemperatur wurde der Überstand durch einen $0.45 \mu\text{m}$ PVDF-Spritzenvorsatzfilter von Partikeln befreit und etwa 50 – 100 μl auf eine entsprechende Säule aufgetragen. Standardflavinanalyse und Nukleotidanalyse wurde mit einer ProntoSil C-18-aq ($250 \times 4.6 \text{ mm}$, 4 mm Porengröße, Bischoff) durchgeführt. Flavine wurden mit dem Programm und den Puffern in Tabelle 7-7 getrennt und bei 365 nm detektiert. Die Trennung von Nukleotiden erfolgte isokratisch in 50 mM KPi pH 6.8 mit 1.0 ml/min und Detektion bei 260 nm.

Roseoflavinhaltige Proben wurden mit einer Synergi 4u Polar-22 RP 80A ($250 \times 4.6 \text{ mm}$, # 00G-4336-E0, Phenomenex) mit einer Flussrate von 0.85 ml/min isokratisch mit 40% (v/v) Methanol, 100 mM Ameisensäure, 100 mM Ammoniumformiat pH 3.7 getrennt. Die Detektion erfolgte wie oben bei 260 nm. Die Identifikation erfolgte anhand von Retentionszeiten bekannter Substanzen.

Das HPLC System bestand aus einer Gradientenpumpe (Hochdruckpumpe Modell 480, GynkoteK) mit Online-Entgaser (Degasser erc.3315n, Erc inc.). Die Detektion erfolgte bei 365 nm mit einem Durchflussphotometer (Uvicord-II, LKB) mit den entsprechenden Filtern und Lichtquellen. Das Chromatogramm wurde mit einem Schreiber (L250, Linseis) aufgezeichnet. Alle verwendeten Puffer wurden durch einen $0.45 \mu\text{m}$ Filter von Partikeln befreit.

Time [Min]	Flow [$\mu\text{l}/\text{Min}$]	A [%]	B [%]
0	630	100	0
20	630	60	40
25	800	60	40
43	630	100	0
44	0	100	0

Tabelle 7-7: HPLC Programm zur Trennung von Flavinen.

A: 50 mM NH_4Ac pH 6.0 (HCl) 0.1% NaN_3 ; B: 70% Acetonitril in A

7.3.16 Chromophorverdrängung in Slr1694

Für die Herstellung von chromophorenreinen Proben wurde eine konzentrierte Probe ($OD_{450} \sim 2$) dreimal gegen das 3000fache Volumen 250 mM KP_i , 2 M KBr für insgesamt 48 h bei 4°C dialysiert. Die Flavine der Probe wurde durch Inkubation in hundertfachem molaren Überschuss an FAD bei Raumtemperatur über Nacht verdrängt. Überschüssiges FAD wurde durch zweimalige Dialyse gegen 10 mM NaP_i , 10 mM NaCl, pH 8.0 bei 4°C über Nacht entfernt.

7.3.17 Autophosphorylierung

Zur Untersuchung von Phosphatgruppenübertragung wurde ein am γ -Phosphat ^{32}P markiertes ATP (GE Healthcare) verwendet. Alle Schritte wurden unter schwachem Gelb- bzw. Rotlicht durchgeführt. Alle Proben wurden zuvor 2 h auf Eis im Dunkeln inkubiert. 10 μ g Zellextrakt bzw. 1 μ g reines Protein wurden in einem Gesamtvolumen von 10 μ l verdünnt und mit 1 μ l verdünntem ATP-Mix aus 5:1 10 μ M MgATP und radioaktivem ATP (10 μ Ci/ μ l) versetzt. Die Proben wurden für 3 s mit einer blauen LED (1 W Royal Blue, 460 nm, Luxeon Star, effektive Leistung 90 mW/cm²) bestrahlt und die Reaktion für 2 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5×SDS-PAGE Ladebuffer gestoppt. Die Ansätze wurden dann über SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Auswertung wurden die Gele in einer Filmkassette 30 – 60 min mit einer Imaging Platte (Imaging plate BAS-MS 2325, Fujifilm) entwickelt und mit einem Phosphoimager (Bio-Imaging Analyzer, FLA-3000, Fujifilm) ausgelesen.

7.3.18 Substratphosphorylierung

Phosphorylierung von Casein wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt. Zu den Reaktionsansätzen wurden 10 μ g dephosphoryliertes Casein (Sigma) zugesetzt.

7.3.19 Analytische Ultrazentrifugation

Sedimentationsgleichgewichts-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ilme Schlichting am MPI für medizinische Biochemie in Heidelberg durchgeführt. Die Analyse erfolgte durch Dr. Robert Shoeman mit einem ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter) AUZ

System, ausgestattet mit sowohl Absorptions- als auch Interferenzoptik. Die verwendeten Doppel-Zellen bestanden aus einem mit Epon gefüllten Mittelteil mit Saphir Fenstern. Die Mittelteile wurden mit 390 µl Probe sowie mit 400 µl Referenzpuffer gefüllt und bei 20°C und 25'000 Upm (An60 Ti Rotor) gemessen. Wellenlängenabtastung (240 – 500 nm) wurden mit 3'000 Upm bei einem Radius von 6.5 cm in 2 nm Schritten durchgeführt. Alle 3 min (150 scans) wurden die Zellen von 6.0 – 7.3 cm in 0.003 cm Intervallen bei 270 nm abgetastet. Molekulare Massen wurden mit dem Programm Sedfit (Schuck *et al.*, 1998) berechnet.

7.4 Spektroskopie

7.4.1 UV/vis-Spektroskopie

Stationäre UV/vis-Spektren wurden mit einem Cary300bio (Varian) durchgeführt. Soweit nicht anders vermerkt wurde das Gerät im Zweistrahlmodus bei einer spektralen Bandbreite von 2 nm betrieben. In der Regel wurde 1 Messpunkt/nm mit einer Integrationszeit von 0.5 s aufgenommen. Der Küvettenhalter verfügte über einen Durchflussthermostat und wurde, soweit nicht anders vermerkt, verwendet, um Temperaturschwankungen zu unterbinden.

UV/vis-Spektren von lichtadaptierten Proben wurden mit einem Diodenarray-Spektrometer (MCS-UVNIR/500-3 Rapid Diode Array Spectrometer, BioLogic) mit einer Integrationszeit von 15 ms und einer spektralen Auflösung von 0.7 nm aufgenommen. Das Gerät wurde von Dr. Rainer Cramm am Lehrstuhl für Mikrobiologie (Humboldt Universität zu Berlin) bereitgestellt.

7.4.2 Fluoreszenzspektroskopie

Emissions- und Exzitationsspektren wurden mit einem Aminco-Bowman AB2 (Thermo) aufgenommen. Soweit nicht anders vermerkt wurden Anregungs- und Emissionsspalt auf 2 nm eingestellt. Der Küvettenhalter verfügt über einen Durchflussthermostat und wurde bei den Messungen verwendet.

7.4.3 Kinetische Messungen

Für die Messung von blaulichtinduzierten Reaktionen wurde eine LED (1 W Royal Blue, Luxeon Star; effektive Leistung 90 mW/cm²) mit einer Emission bei 460 nm verwendet. Die

Diodensteuerung wurde mit dem Cary300bio per TTL angesprochen. Die Messungen wurden automatisiert mit einem ADL-Skript durchgeführt. Zeitaufgelöste Messungen wurden je nach Geschwindigkeit mit Integrationszeiten zwischen 33 ms und 0.5 s aufgenommen. Die spektrale Bandbreite betrug in der Regel 4 nm. Der Zerfall des Signalzustands von Slr1694 wurde bei 493 nm aufgenommen, der Zerfall des Signalzustands von LOV-Proteinen (Volllängen-Phototropin, LOV2-STK, LOV-Tandemkonstrukte) bei 477 nm.

7.4.3.1 Zerfall des LOV 390 Intermediates in Anwesenheit von ATP

Zur Bestimmung des Einflusses von ATP auf den Zerfall des LOV 390 Intermediats wurden kinetische Messungen durchgeführt. In einer Mikroküvette wurde eine Probe mit einer $OD_{447} \sim 0.1$ vorgelegt und die Rückkehrkinetik des Signalzustands nach 0.5 s Belichtung gemessen. Nach Zugabe von 1 – 100 μM Substrat (ATP, ADP, AMP-PNP, ATP- γ -S) wurden erneut die Rückkehrkinetik und 1 – 2 Folgemessungen unter den gleichen Bedingungen aufgenommen.

7.4.4 Kurzzeitspektroskopie

Kurzzeitspektroskopische Untersuchungen (10 ns – 200 μs) wurden in Zusammenarbeit mit Karin Lanzl und Dr. Thomas Langenbacher am Institut für Physikalische Chemie der Universität Regensburg durchgeführt. Der Aufbau bestand aus einem Blitzlichtphotolyse-system mit einem 20 Hz NdYAg-Laser (Surelite II mit Surelite OPO Plus, Continuum; Pulsenergie(450 nm) ~ 35 mJ) und einem Streak-Kamera Detektionssystem (Spektrograph Chromex250is; Kamera C4742-95-12ER, Hamamatsu). Messlichtblitze (3 ms) wurden mit einer Osram XBO 150 W/4 Lampe in einem selbstgebauten Gehäuse erzeugt.

In einer Halbmikroküvette wurden etwa 500 μl einer Probe mit $OD_{447} \sim 0.5 / \text{cm}$ von 337.0833 – 762.9167 nm gemessen. Als Referenz wurden jeweils eine Aufnahme ohne Laserpuls und eine ohne Messlicht durchgeführt. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden in der Regel 100 Messungen gemittelt. Daten der Streak-Kamera wurden in 512×512 Matrizes erhalten und von Hand um Beiträge der Laserstreuung und der Fluoreszenz bereinigt. Die bereinigten Daten wurden per Singulärwertzerlegung, SVD (MatLab, MathWorks, Inc), von Basislinienrauschen befreit und ausgewertet.

7.4.5 Fourier-Transformations-Infrarot-(FTIR)-Spektroskopie

FTIR-Spektroskopie wurde durch Anna Pfeifer in der Arbeitsgruppe von Dr. Tilman Kottke am Institut für Biophysikalische Chemie an der Universität Bielefeld durchgeführt. Proben wurden auf $OD_{450} \sim 5 - 10$ aufkonzentriert. 2 μ l Proteinlösung wurden auf einem BaF_2 Fenster im leichten Unterdruck weiter aufkonzentriert. Messungen wurden bei 20°C mit einem Bruker IFS66v FTIR-Spektrometer mit einer spektralen Auflösung von 2 cm^{-1} durchgeführt. Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses und zum Abtrennen des Streulichts wurde ein Bandpassfilter (OCLI) eingesetzt (2000 – 900 cm^{-1}). Zur Aufnahme von Differenzspektren wurden die Proben nach einer Hintergrundmessung des Dunkelzustands 2 s mit einer LED mit Emission bei 455 nm (1 W Royal Blue, Luxeon Star; effektive Leistung 40 mW/cm²) belichtet. 4-10 Differenzspektren mit je 1024 Scans wurden gemittelt. Zur Bildung von Doppeldifferenzspektren wurde auf die reine FMN-Differenzbande bei 1730 / 1716 cm^{-1} skaliert.

7.4.6 Elektronenspinresonanz (ESR) Spektroskopie

ESR-spektroskopische Experimente wurden von Dr. Erik Schleicher und Dr. Sylwia Kacprzak in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert Bittl an der Freien Universität Berlin durchgeführt. Durch Cystein-Serin Mutationen inaktivierte Proben wurden in einer Konzentration von 200 μ M pro Kofaktormolekül in 50 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 50% (v/v) Glycerin in einem mit Argon gespültem EPR-Röhrchen (\varnothing 3 mm) in Anwesenheit von 10 mM EDTA mit blauem Licht (420 – 470 nm Filter (Schott, Mainz); Lichtquelle Halolux 100HL (Streppel, Wermelskirchen)) auf Eis in den Radikalzustand überführt. Die Probe wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Gepulste X-band ELDOR Spektren wurden mit einem Bruker E580 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten) in Verbindung mit einem dielectric-ring ENDOR resonator Bruker ER 4118X-MD5-EN aufgenommen. 3-Puls Experimente wurden mit der Pulsfolge $\pi/2 - \tau - \pi$ mit $\tau = 2300$ ns und einem 32 ns π -Pump-/Abfragepuls. 4-Puls Experimente wurden mit der Pulsfolge $\pi/2 - T - \pi - \tau - \pi$ mit $T = 200$ ns und $\tau = 1500$ ns. Der Abfragepuls wurde auf 40 ns gegenüber dem 32 ns Pumpuls verlängert. Um Sättigungseffekte aufgrund der langen Relaxationszeit zu verhindern, wurden die Pulssequenzen nur mit 200 Hz wiederholt. Gepulste Q-band ELDOR Spektren wurden, wie oben beschrieben, durchgeführt. Das 4-Puls Experiment wurde mit

einem 56 ns π -Puls als Pump-/Abfragepuls mit $T = 200$ ns und $\tau = 2000$ ns durchgeführt.

ELDOR Spektren wurden anhand der Fourier Transformation der erhaltenen Zerfallskurven nach Abzug eines exponentiellen Zerfalls und Filterung (Hamming, Zerofilling) analysiert.

7.4.7 Circular-Dichroismus-Spektroskopie

CD-Spektroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ilme Schlichting von Elisabeth Hartmann am MPI für medizinische Biochemie in Heidelberg durchgeführt. CD-Schmelzkurven wurden mit einem Spektralphotometer J-810 (Jasco) bei 222 nm in 20 mM KP_i pH 8.0, 200 mM NaCl von 20 – 60°C mit 1°C / min aufgenommen. Protein wurde, soweit nicht anders vermerkt, 5 μM eingesetzt.

7.4.8 Ultrakurzzeitspektroskopie

Ultrakurzzeitspektroskopie an Slr1694 wurde in Zusammenarbeit mit Cosimo Bonetti und Dr. John Kennis im Laserlab Europe an der Vrije Universiteit Amsterdam durchgeführt. Alle Messungen wurden in 10 mM Tris pH/pD 8.0, 50 mM NaCl durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte in Amsterdam durch Cosimo Bonetti unter Anwendung von globaler Analyse und Modellierung der Daten (van Stokkum *et al.*, 2004).

7.4.8.1 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren wurden mit einer Streak-Kamera (Hamamatsu C5680 synchroscan streak camera; Chromex 250IS Spektrograph; Hamamatsu C4880 CCD camera (-55°C)) nach Anregung mit einem 100 fs (50 kHz) 10 nJ Laserpuls (frequenzverdoppelter Ti:Saphir (Coherent Vitesse-Rega)), wie in der Literatur beschrieben, aufgenommen (Gobets *et al.*, 2001; Gauden *et al.*, 2005a). Die Detektion erfolgte 90° zur Anregungsrichtung und wurde über einen Polarisator im magischen Winkel (54.7°) beobachtet. Um eine komplette zeitliche Übersicht zu bekommen, wurden jeweils drei Zeitfenster (200 ps, 500 ps, 2 ns) aufgenommen. Die Probe wurde auf eine $\text{OD}_{400} = 0.6/\text{cm}$ gebracht und über eine peristaltische Pumpe umgewälzt, um Doppelanregungen zu vermeiden.

7.4.8.2 Femtosekunden vis-Pump-IR-Probe Spektroskopie

Um die relative Absorption von H₂O/D₂O gering zu halten, wurden Proteinproben auf OD₄₇₀ = 125/cm konzentriert und zwischen zwei CaF₂-Fenster mit einem 20 µm Teflon-Abstandshalter plaziert. Das Zellenvolumen betrug etwa 40 µl. Die Zelle wurde mit einem Lissajousmotor bewegt, um Mehrfachanregungen zu verhindern. Messungen wurde aufgrund der starken Absorption der OH/OD Beugungsschwingungen in H₂O (1475 – 1100 cm⁻¹) und D₂O (1775 – 1430 cm⁻¹) aufgenommen. Für jedes Fenster wurden drei überlappende Messungen mit je 180 cm⁻¹ Breite aufgenommen.

Der verwendete Messaufbau wurde bereits von Groot *et al.* beschrieben (Groot *et al.*, 2003). Mit einem Ti:saphir-Laser (Hurricane, Spectra Physics) (0.65 mJ, 1 kHz, 85fs) wurde sowohl Anregung als auch Messlicht generiert. Das IR-Messlicht wurde über einen OPA (TOPAS, Light Conversion, Vilnius, Litauen) erzeugt und konnte ein Fenster von etwa 200 cm⁻¹ umfassen. Die Energie betrug etwa 1 nJ. Die Anregung wurde über einen selbstgebauten NOPA generiert und erzeugte einen Anregungspuls bei 470 nm mit etwa 450 nJ Energie. Polarisierung von Anregungs- und Messpuls wurden auf den magischen Winkel (54.7°) eingestellt. Das Messlicht wurde in einen Spektrograph (Chromex 250IS) kollimiert und auf einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten 32-Kanal HgCdTe-Detektor dispergiert. Die Messungen erfolgten in Verzögerungen von Anregungs- und Messpuls von -16 ps und 1 ns in 135 Punkten mit einer IRF von 160 fs aufgenommen.

7.5 Elektrophysiologische Methoden

Elektrophysiologische Experimente wurden von Maila Reh durchgeführt. Follikelzellen und Vitellinmembran von frisch entnommenen *Xenopus laevis* Oocyten wurden 2 h bei 18°C in 20 ml ORI-Puffer (96 mM NaCl, 5.5 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂ 5.5 MOPS pH 7.5) unter Zugabe von 4 mg Collagenase IA (Sigma) und 2 mg Trypsin (Sigma) bei 200 Upm entfernt. Es wurden ausschließlich Oocyten der Reifungsstadien IV bis VI verwendet, und diese in Messpuffer (ORI + 2 mM CaCl₂) mit 0.05 mg/l Streptomycin und 50 U/l Penicillin (Penicillin-Streptomycin-Solution, Sigma) bis zur Injektion am folgenden Tag bei 18°C und 70 Upm aufbewahrt (Inkubator M-153, Sanjo).

Injektionsnadeln wurden aus Glaskapillaren (Glass Replacement 3.5 nl, Ø_{außen} 1.14 mm, Ø_{innen} 0.5 mm, World Precision Instruments) mit einem Micropipette Puller (P-97, Sutter Instruments) in die entsprechende Form (Ø 10 – 30 µm) gebracht. Die Injektion erfolgte

blasenfrei mit einem Mikroinjektor (Nanoliter 2000, World Precision Instruments) von der vegetativen Seite der Zelle. Pro Zelle wurden etwa 50.6 nl injiziert. Soweit nicht anders vermerkt wurden 20 ng CNG-Kanal (*Rattus norvegicus* CNGA2) und 200 pg PACa mRNA injiziert. Bis zur Messung wurden die Zellen in 96×Multiwellplatten bei 18°C und 70 Upm inkubiert.

Messungen erfolgten in einem Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp Aufbau bestehend aus einem TURBO-TEC-03X (npi electronic GmbH) und einer Xenon-Lichtquelle (U-ULS75SXE, 75W XBO, 450 nm Interferenzfilter, Olympus). Die Elektroden bestanden aus einer ausgezogenen Mikropipette (Ø 0.1 µm) mit einem chlorierten Silberdraht und Agar-Brücke. Lichtinduzierte Ströme wurden bei einer Lichtintensität von 7.6 W/cm² und Spannungen von -40 bis -60 mV durchgeführt.

7.6 Bioinformatik

7.6.1 Erstellung von theoretischen Strukturen

Theoretische Proteinstrukturen wurden durch Homologie-Modelling mit dem Swiss-PDB Viewer (<http://expasy.org/spdbv/>) erstellt (Guex *et al.*, 1997). Die Primärsequenz wurde vorgegeben und über den SwissModel-Server (<http://swissmodel.expasy.org/>) geeignete Strukturen gesucht. Die Sequenz wurde entsprechend ihrer Übereinstimmungen übereinander gelegt und zur Berechnung der theoretischen Strukturen an den SwissModel-Server übertragen.

7.6.2 Computergestützte Proteinanalyse

Zur Analyse der Struktur von Proteinen wurde die Software „predictor of Non-Regular Secondary Structure“ (NORS) auf www.predictprotein.org verwendet (Rost *et al.*, 2004). Die Primärstruktur wird damit auf „switch“-Regionen und Zugänglichkeit von einzelnen Aminosäuren (Cysteine) untersucht.

7.6.3 Computergestützte Molekularbiologie

Plasmidkarten, Primer-Design, Klonierungsstrategien, DNA- und Protein-Sequenz Alignments wurden mit GENTle (<http://gentle.magnusmanske.de/>) erstellt.

8 Anhang

8.1 Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pET28(a)+	Expressionsvektor mit <i>lacUV5</i> Promotor und N-terminalem 6×His-Tag mit anschließender Thrombinschnittstelle sowie T7-Tag	Novagen
pASK-IBA-7plus	Expressionsvektor mit <i>tet</i> -Promotor und N-terminalem Strep-Tag II sowie Faktor Xa Schnittstelle	IBA
pASK-IBA-43plus	Expressionsvektor mit <i>tet</i> -Promotor und N-terminalem 6×His-Tag sowie C-terminalem Strep-Tag II	IBA
pMal-p2x	Expressionsvektor mit <i>tac</i> -Promotor und mit periplasmatischem Leaderpeptid versehenen N-terminalem Maltosebindeprotein und Faktor Xa Schnittstelle	NEB
HispMal- <i>phot</i>	Hergestellt aus pMal-c2x (NEB) durch Einfügen eines 12×His-Tags zwischen N-terminalem Maltosebindeprotein und Phototropinexpressionskonstrukt	(Song <i>et al.</i> , 2005)
Hisp2x	Hergestellt aus HispMal durch Entfernen des Maltosebindeproteins	(Song <i>et al.</i> , 2005)
pGEM-HeReg- <i>phot</i>	Ausgangsvektor für Phototropin Konstrukte	(Holzer <i>et al.</i> , 2002)
pGEM-HE- <i>pacα</i>	Ausgangsvektor für PACα Konstrukte	Watanabe, NIBB Okazaki
pGEM-HE- <i>pacβ</i>	Ausgangsvektor für PACβ Konstrukte	Watanabe, NIBB Okazaki
pGEM-HeReg- <i>pacα_cMyc_His</i>	Vektor zur Herstellung von PACα-mRNA mit C-terminalem Myc- sowie 6×His-Tag	Nagel, Universität Würzburg
pGEM-He-CNG-A2-C460W/E583M	Vektor zur Herstellung von mRNA für den Kanal CNG-A2-C460W/E583M (<i>Rattus norvegicus</i> CNGA2)	Karpen, Oregon Health & Science University, Portland
pETM60	Expressionsvektor mit <i>lacUV5</i> Promotor und N-terminalem NusA-Protein sowie 6×His-Tag und TEV-Schnittstelle	EMBL, Heidelberg
pBADM30	Expressionsvektor mit <i>ara</i> Promotor und N-terminalem 6×His-Tag, GST-Protein sowie TEV-Schnittstelle	EMBL, Heidelberg
pFastBac-HTa	Shuttle-Vektor zur Transposition in Baculovirus-DNA	Invitrogen
pET21(a)+- <i>pnuX</i>	Expressionsvektor für den Riboflavintransporter PnuX	Stolz, Universität Regensburg
pKS- <i>phot_4G</i>	Ausgangsvektor für die Klonierung von Phototropin-X4G	Yinghong Lu
pKS- <i>phot_4E</i>	Ausgangsvektor für die Klonierung von Phototropin-4E	Yinghong Lu

Tabelle 8-1: Verwendete Vektoren

8.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden soweit nicht anders vermerkt von Sigma Genosys synthetisiert. Mutagenese-Primer wurden HPLC gereinigt, Oligonukleotide mit mehr als 50 Basen wurden über PAGE gereinigt.

Bezeichnung	Sequenz (5'->3')	Reinheit
LOV2Eco	AAAGAATTCCGTGTGGCGCTGGAT	entsalzt
nph1r(hind)	AAAAAGCTTTCAGTAGTTGTCTGAACGC	entsalzt
Phot-C-HT-fw	P _i - GTACGTGCCGCGCCGCGCCAGCAAGGCGGGCGGCAGCAGCACCGGCG - GCGCGGGCGTTCGACAACACTACAGAGGATCGCACCATCACCATCACCATTA	PAGE
Phot-C-HT-rv	P _i - AGCTTAATGGTGATGGTGATGGTGCGATCCTCTGTAGTTGTCTGAACGCCG - CGCCGCCGGTGCTGCTGCTGCCGCCCGCCGCTTGCTGGCGGGCGCGGCAC	PAGE
Phot-30+ST-f	P _i - GTACGGCGCTGCTTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAATAA	HPLC
Phot-30+ST-r	P _i - AGCTTTATTTTTTCGAAGTGCAGGTTGGCTCCAAGCAGCGCC	HPLC
Jalpha1_rv	AAAAGCTTAGGCGGTGGTGGGCGCAGCCATG	entsalzt

Tabelle 8-2: Allgemein verwendete Oligonukleotide.

Restriktionsschnittstellen sind kursiv abgedruckt. Phosphorylierte Stellen sind mit P_i bezeichnet.

Bezeichnung	Sequenz(5'->3')	Bemerkung
C57S_Tilo_fw	GTGCTTGGTCACAAC AG CCGCTTCCTCCAAG	HPLC
C57S_Tilo_rv	CTTGGAGGAAGCGG CT GTTGTGACCAAGCAC	HPLC
C250Sf	GGCCGCAACT CC CGCTTCCTG	entsalzt
C250Sr	CAGGAAGCGG GAG TTGCGGCC	entsalzt
D547N_fw	GACACGTCCTGCTCACC AA CTTCGACCTGTCGTACAG	HPLC
D547N_rv	CTGTACGACAGGTCGAAG T TGGTGAGCAGGACGTGTC	HPLC
Y8W_fw	GTTTGTACCGTTT GATTTG GAGCAGTCAGGGCATTCCC	HPLC
Y8W_rv	GGGAATGCCCTGACTGCT CC AAATCAAACGGTACAAAC	HPLC
Slr_S10C_f	CGTTT GATTT TACAGC T GT CAG GGCATTCCC	HPLC
Slr_S10C_r	GGGAATGCCCTGAC AG CTGTAAATCAAACG	HPLC
Slr_S28A_fw	GATATCTTAGAATCT G CCCAAAGAAATAATCCGGC	HPLC
Slr_S28A_rv	GCCGGATTATTTCTTTGGG CAG ATTCTAAGATATC	HPLC
Slr_N31R	CTTAGAATCTTCCCAAAG ACG TAATCCGGCCAATGGC	HPLC
Slr_N31R_r	GCCATTGGCCGGATT ACG TCTTTGGGAAGATTCTAAG	HPLC
Slr_N31H	CTTAGAATCTTCCCAAAG AC ATAATCCGGCCAATGGC	HPLC
Slr_N31H_r	GCCATTGGCCGGATT ATG TCTTTGGGAAGATTCTAAG	HPLC
Slr_N32D	GAATCTTCCCAAAGAA ATG ATCCGGCCAATGGCATTAC	HPLC
Slr_N32D_r	GTAATGCCATTGGCCGG AT CATTTCTTTGGGAAGATTC	HPLC
Slr_D69E_fw	CGGATTGTGCAAGA AGA ACGCCACCACAGC	HPLC
Slr_D69E_rv	GCTGTGGTGGCGTT CT TCTTGACAATCCG	HPLC
Slr_W90A	GAAGAACTTCGAGGTT GCG TCTATGCAAGCGATC	HPLC
Slr_W90A_r	GATCGCTTGCATAG ACG CAACCTCGAAGTTTCTTC	HPLC
Slr_W90F	GAAGAACTTCGAGGTTT TC TCTATGCAAGCGATC	HPLC
Slr_W90A_r	GATCGCTTGCATAG AG AAACCTCGAAGTTTCTTC	HPLC
PAC_Y472F	CAGCTCATC AT TGACAT T CATTTCCCAAGCA	HPLC
PAC_Y472F_r	TGCTTGGGAAAT GA ATGTCAATGTGATGAGCTG	HPLC
PAC_M152A	GTATGGGGAGTGGC ACG CAAAGACTCCCAATTG	HPLC
PAC_M152A_r	CAATGTGGGAGTCTTT GCG TGCCACTCCCCATAC	HPLC

Tabelle 8-3: Primer für die ortsgerichtete Mutagenese.

Nicht komplementäre Basen sind fett gedruckt.

8.3 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden soweit nicht anders vermerkt von Merck oder von den aufgeführten Firmen bezogen:

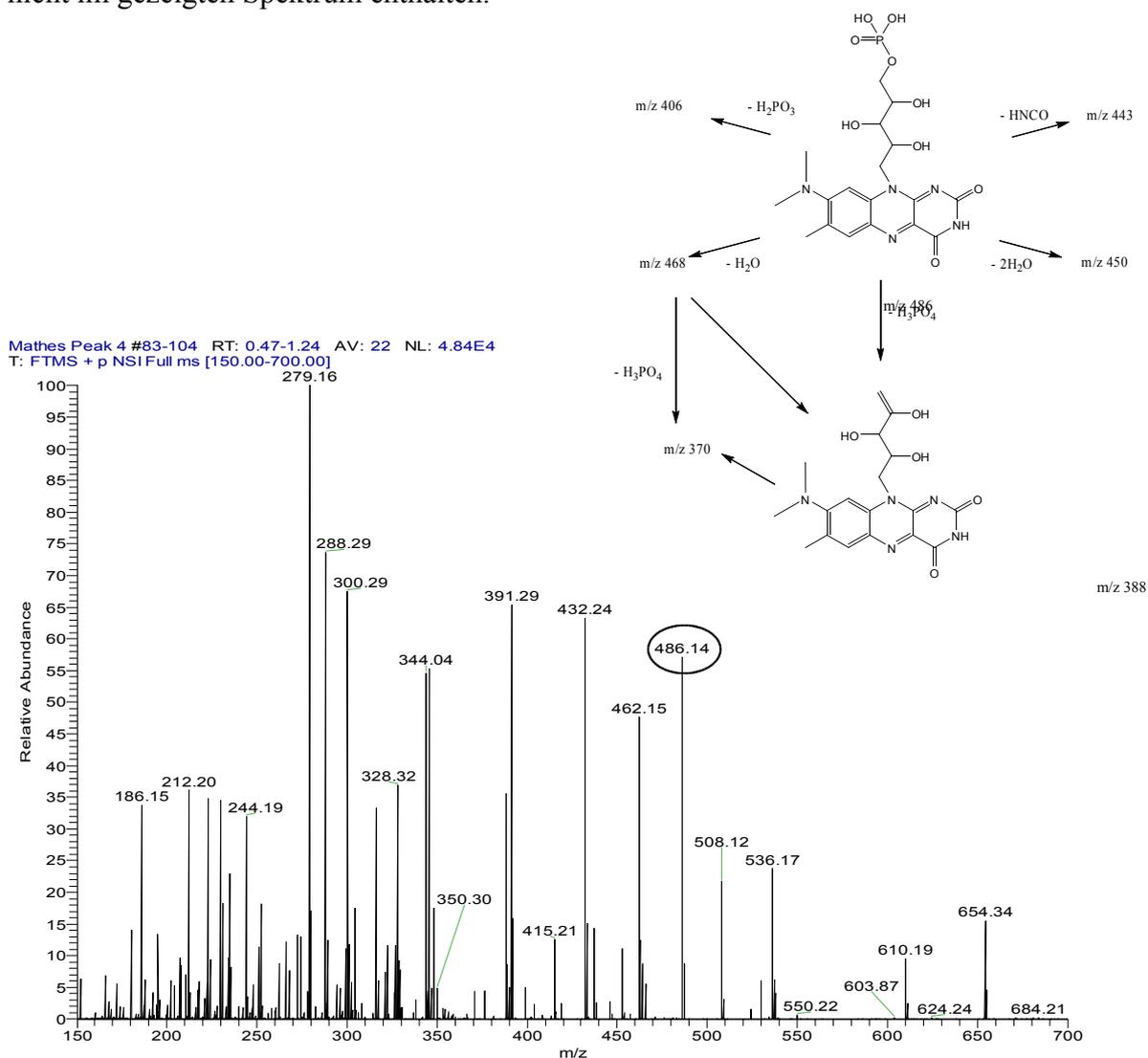
ADP	Sigma
AMP	Sigma
Ampicillin	Roth
AMP-PCP	Sigma
ATP- γ -S	Sigma
Anhydrotetracyclin	IBA
Argininhydrochlorid	Acros
Arabinose	Acros
ATP	Sigma
BciP	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Desthiobiotin	IBA
DMSO	Sigma
EDTA	Sigma
FAD	Sigma
FMN	Sigma
Gentamicin	Gibco
Imidazol	Sigma
IPTG	Sigma
Kanamycin	Roth
NTB	Sigma
PMSF	Serva
Riboflavin	Sigma
Roseoflavin	MP Biomedicals
Tetracyclin	Roth
Tris	USB
Tween20	Sigma

8.4 Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMP-PCP	Adenylylmethylenediphosphonat
AMP-PNP	Adenosine 5'-(β,γ -imido)triphosphat
ATP- γ -S	Adenosine 5'-(3-thiotriphosphat)
ATP	Adenosintriophosphat
Bp	Basenpaar
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
ChR	Kanalrhodopsin
CNG	durch zyklisches Nukleotid aktivierbar
CD	Circulardichroismus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
FMN	Flavin Mononukleotid
FKS	Fötale Kälber Serum
g	Erdbeschleunigung
HPLC	High performance liquid chromatography
IR	Infrarot
ISC	Inter system crossing
M	Molar [mol/l]
MS	Massenspektrometrie
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
P _i	Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RF	Riboflavin
RoF	Roseoflavin
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
STK	Serin/Threonin-Kinase
SVD	Singularwertzerlegung
TEVC	Two Electrode Voltage Clamp
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
vis	Visuell (sichtbar)

8.6 ESI-MS-Analyse von Roseo-FMN

Die HPLC-Fraktion enthält neben sehr vielen Verunreinigungen die charakteristische Masse von 486 für phosphoryliertes Roseoflavin (links). Die Verunreinigungen waren in den übrigen Fraktionen neben den entsprechenden Flavin-Signalen ebenfalls vorhanden. Durch Fragmentierung wurde Roseo-FMN eindeutig identifiziert (rechts). Die Fragmentierung ist nicht im gezeigten Spektrum enthalten.



8.7 ESI-MS-Analyse von tryptischen Peptiden

Die Tabelle zeigt die identifizierten Peptide mit ihrer Ladung z sowie dem Korrelationsfaktor X_c . Die Proteine wurden anhand einer *E. coli* K21 Datenbank identifiziert und Proteinen zugewiesen.

70 kDa Protein aus Abbildung 3-11/3-14:

Protein	Gefundene Peptide	z	X_c
Putative transformylase (Acc. # AAG57386)			270,39
	R.LLREDHYEVYGLDIGSDAISR.F	3	7,72
	K.IDMQETIDETLDFFLR.T	2	6,99
	R.APLNWVLVNGETETGVTLHR.M	3	6,97
	K.IDM*QETIDETLDFFLR.T	2	6,97
	R.EDHYEVYGLDIGSDAISR.F	2	6,54
	R.IAQLSPDVIFSFYR.H	2	6,37
	K.YFDEDHNSLIVGPVVKPR.W	3	5,93
	R.AITQLILNLVEGSPK.L	2	5,65
	R.AVADPWPGAFSYVGNQK.F	2	5,48
	R.VLILGVNGFIGNHLTER.L	2	5,35
	R.GIPVYAPDNVNHPLWVER.I	2	5,03
	K.RADAGAIVAQLR.I	2	4,69
	R.HLIYDEILQLAPAGAFNLHGSLPK.Y	3	4,46
	R.ADAGAIVAQLR.I	2	4,42
	R.VFELDFEENLR.I	2	3,97
	K.HGNILEIAQR.E	2	3,96
	R.QLLEQTLPAIK.H	2	3,47
	K.PASVLHNMVR.A	2	3,04
	R.TVDLTDKPS.-	1	2,97
	R.TPDDSFLEWHK.P	2	2,95
	R.DGIEALYR.I	2	2,87
	R.VIWAYGEK.E	1	2,83
	R.VVESSYYGK.G	1	2,79
	R.LDNLNAAR.I	2	2,67
	K.EGLQFTLFRPFNWM*GPR.L	3	2,67
	K.EGLQFTLFR.P	2	2,52
	R.IIENAGNR.C	2	2,26
Chaperone Hsp70 (Acc. # AAA18300)			100,28
	K.HSQVFSTAEDNQSAVTIHVLQGER.K	3	5,57
	K.IIADNGDAWVEVK.G	2	4,32
	K.MQELAQVSQK.L	2	2,58
	K.SLGQFNLDGINPAPR.G	2	4,15
	K.VALQDAGLSVSDIDDVILVGGQTR.M	2	3,70
	R.AKLESLVEDLVNR.S	2	3,54
	R.IINEPTAAALAYGLDK.G	2	4,40
	R.KFEELVQTR.N	2	2,00
	R.NDPLAMQR.L	2	2,37
	R.QAVTNPQNTLFAIK.R	2	4,15

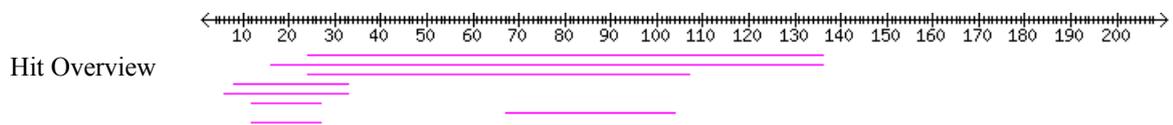
29 kDa Protein aus Abschnitt 3.2.8:

Protein	Gefundene Peptide	z	Xc
cyclic AMP receptor protein (Acc. #AAN82570)			210,28
	K.STLIHQGEKAETLYYIVK.G	2	5,68
	R.LQVTSEKVGNLAFDVTGR.I	2	5,53
	R.IAQTLNLAQPDAMTHPDGMQIK.I	3	5,23
	K.VGNLAFDVTGRIAQTLNLAQ.Q	3	5,16
	R.RLQVTSEKVGNLAFDVTGR.I	3	5,11
	K.EM*ILSYLNQGDFIGELGLFEEGQER.S	2	4,87
	K.VGNLAFDVTGR.I	2	4,54
	K.MLEDQNLISAHGK.T	2	4,32
	K.GSVAVLIKDEEGK.E	2	4,26
	R.ILKMLEQNLISAHGK.T	3	4,10
	K.FRQLIQVNPDILM*R.L	3	4,01
	R.QLIQVNPDILM.R.L	2	3,90
	R.IAQTLNLAQ.Q	2	3,65
	K.ITRQEIGQIVGCS#R.E	3	3,10
	K.QPDAMTHPDGMQIK.I	2	2,97
	K.TACEVAEISYK.K	2	2,66
	K.AETLYYIVK.G	2	2,60

8.8 Homologiesuche zu *E. coli* cAMP Rezeptorprotein in *C. reinhardtii*

Die Primärstruktur des *E. coli* cAMP Rezeptorproteins (Acc. #AAN82570) wurde auf www.chlamy.org mit dem Programm TBLASTN (Altschul *et al.*, 1997) mit der Volvocales (non-EST) Datenbank verglichen. Die Abbildung zeigt die homologen Bereiche zur Primärsequenz des *E. coli* Proteins. Die größte Übereinstimmung wurde mit der mRNA einer durch zyklische Nukleotide aktivierbare Proteinkinase (*Chlamydomonas reinhardtii* CL-PK1 mRNA for cyclic nucleotide dependent protein kinase; Acc. # AB042714) gefunden.

TBLASTN Search Report for TBLASTN 2.2.8 [Jan-05-2004]



Query= (210 letters)

(Database: /local/usr_local/blastdb/volvocales.fa 3,220 sequences; 7,455,130 total letters)

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E-value
dbj AB042714.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CL-PK1 mRNA for cyclic nucle...	40	0.0002
dbj AB042715.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CL-PK2 mRNA for cyclic nucleoti...	38	0.001
gb AY605666.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cGMP-dependent protein kinase (...)	37	0.003
gb AC090436.37 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> clone cr-3h1, complete sequence	26	5.2
gb AC090434.43 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> clone cr-1j6, complete sequence	26	5.2
gb AF013109.1 AF013109 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> gamma tubulin (TBG1) gen...25		8.9
emb AJ242525.1 CRE242525 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> partial dhc10 gene for 1 ...25		8.9
gb U31545.1 CRU31545 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> gamma-tubulin gene, complet...25		8.9

8.9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Aufbau von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> und Phototropin.....	7
Abbildung 1-2: Aufbau von <i>Euglena gracilis</i> und dem Photorezeptor PAC.....	9
Abbildung 1-3: Struktur von LOV1 aus <i>C. reinhardtii</i> und der BLUF-Domäne von Slr1694 aus <i>Synechocystis</i> ..	11
Abbildung 1-4: Photozyklus der LOV1-Domäne (Kottke et al., 2003).	12
Abbildung 1-5: Photozyklus der BLUF-Domäne von Slr1694 (Gauden et al., 2006).....	13
Abbildung 1-6: Umgebung der Flavinbindungstasche in Slr1694.....	14
Abbildung 1-7: Modelle zur Signaltransduktion in Phototropin.....	15
Abbildung 3-1: Expressionsanalyse von Baculovirus infizierten Insektenzellen.....	21
Abbildung 3-2: Solubilisierung von Phototropin aus Insektenzellen.....	22
Abbildung 3-3: Aufreinigung von MBP fusioniertem Phototropin aus <i>E. coli</i>	24
Abbildung 3-4: Überproduktion von Phototropin mit dem Fusionsprotein NusA.....	25
Abbildung 3-5: Solubilisierung von Phototropin (pET28a(+)-phot) aus inclusion bodies.....	26
Abbildung 3-6: Solubilisierung von Phototropin mit Detergenzien.....	27
Abbildung 3-7: Überproduktion von Phototropin in <i>E. coli</i> BL21(DE3) mit verschiedenen Promotoren.....	28
Abbildung 3-8: N-terminale Aufreinigung von Phototropin (pASK-IBA-7p-phot).....	30
Abbildung 3-9: Aufbau eines um LOV1 verkürzten Phototropin-Konstruktes: LOV2-STK.....	30
Abbildung 3-10: N-terminale Aufreinigung des LOV2-Kinase Proteins.....	31
Abbildung 3-11: Abbruchstellen der Translation bei Überproduktion von Phototropin in <i>E. coli</i>	32
Abbildung 3-12: Expressionskonstrukte für die Überproduktion von Phototropin in <i>E. coli</i>	33
Abbildung 3-13: C-terminale Aufreinigung von Vollängen-Phototropin (pASK-IBA-7p-phot-HTc).....	33
Abbildung 3-14: C-terminale Aufreinigung des LOV2-Kinase Konstrukts (pASK-IBA-7p-LOV2-STK_HTc)..	34
Abbildung 3-15: Vergleich der Reinheit von Präparationen mit und ohne Arginin.....	35
Abbildung 3-16: Kinase region von <i>C. reinhardtii</i> Phototropin.....	36
Abbildung 3-17: Berechnete Strukturen der Kinasedomäne von <i>C. reinhardtii</i> Phototropin.....	37
Abbildung 3-18: Kofaktorzusammensetzung von heterolog produziertem Phototropin.....	38
Abbildung 4-1: Absorptionsspektren von Vollängen-Phototropin.....	43
Abbildung 4-2: Fluoreszenzspektren von Vollängen-Phototropin.....	43
Abbildung 4-3: Kinetische Betrachtung des Zerfalls des Signalzustandes in Vollängen-Phototropin.....	43
Abbildung 4-4: Einfluss von ATP auf den Zerfall des Signalzustandes in Phototropin.....	45
Abbildung 4-5: Einfluss von ATP-Derivaten auf den Zerfall von LOV 390 in Phototropin.....	45
Abbildung 4-6: Einfluss von AMP-PNP auf den Zerfall von LOV 390 in Phototropin.....	45
Abbildung 4-7: Zerfall von LOV1 390 in Phototropin-C250S sowie von LOV2 390 in Phototropin-C57S in Anwesenheit von ATP.....	47
Abbildung 4-8: Zerfall von LOV2 390 in LOV2-STK und LOV 390 in Phototropin-X4G in Anwesenheit von ATP.....	47
Abbildung 4-9: Zerfall von LOV 390 in Phototropin-D547N in Anwesenheit von ATP.....	47
Abbildung 4-10: Phototropin-Konstrukte und Referenzproteine für die FTIR-Spektroskopie:.....	49

Abbildung 4-11: (Licht-minus-Dunkel)-FTIR-Differenzspektren von Phototropin-C57S*.....	50
Abbildung 4-12: (Licht-minus-Dunkel)-FTIR-Differenzspektren von verschiedenen Präparationen von Phototropin-C57S*.....	51
Abbildung 4-13: Zeitaufgelöste Differenzspektren der Triplett-Zustände in Phototropin-C57S/C250S.....	54
Abbildung 4-14: (Licht-minus-Dunkel)-Differenzspektrum des Triplett-Zustandes von Phototropin-C57S/C250S.....	54
Abbildung 4-15: Zeitaufgelöste Spektren der Triplett-Zustände in Phototropin-C57S.....	55
Abbildung 4-16: Zeitlicher Verlauf der ersten beiden Komponenten aus der SVD Analyse der Messung an Phototropin-C57S.....	56
Abbildung 4-17: Zugehörige Spektren der ersten zwei Singulärwerte der Messung an Phototropin-C57S.....	56
Abbildung 4-18: Spektren der beiden Komponenten der Messung an Phototropin-C57S.....	57
Abbildung 4-19: Pulsfolge eines ELDOR Experiments (Milov et al., 1981):.....	60
Abbildung 4-20: Vereinfachte Gleichung zur Berechnung des Abstands aus der Frequenz der dipolaren Wechselwirkung v_{\perp} zweier Elektronen (Schweiger, A., Jeschke, G., 2001).....	60
Abbildung 4-21: ELDOR Spektroskopie an LOV1-C57S und LOV2-C250S inaktiviertem Phototropin.....	61
Abbildung 5-1: Aufreinigung und UV/vis-Spektrum von Slr1694.....	62
Abbildung 5-2: Vergleich der Primärstruktur von verschiedenen BLUF-Domänen.....	63
Abbildung 5-3: UV/vis-Spektren von Slr1694 und Mutanten*.....	64
Abbildung 5-4: Chromophorzusammensetzung von Slr1694 und den Mutanten N31H/N31R.....	66
Abbildung 5-5: Berechnete Strukturen der mutierten Slr1694-BLUF-Domänen N31R/N31H.....	67
Abbildung 5-6: HPLC Chromatogramm der Chromophorzusammensetzung von AppA H44R.....	68
Abbildung 5-7: Koordination der Phosphatgruppe des Flavins in AppA.....	68
Abbildung 5-8: Absorptions- und Emissionsspektren von freiem und in Slr1694 gebundenem Roseoflavin (RoSlr).....	70
Abbildung 5-9: HPLC-Analyse von roseoflavinhaltigem Slr1694.....	71
Abbildung 5-10: Zeitliche Entwicklung der Fluoreszenz von Slr1694 nach Laserblitzanregung bei 450 nm*.....	73
Abbildung 5-11: IR-Differenzspektren aus der sequentiellen Beschreibung der spektralen Änderungen in Slr1694*.....	75
Abbildung 5-12: IR-Differenzspektren der Photozyklusintermediate von Slr1694*.....	76
Abbildung 5-13: Protonennetzwerk in der BLUF-Domäne im postulierten Dunkelzustand (links) und nach erfolgtem photoinduziertem Elektronentransfer (rechts):.....	77
Abbildung 5-14: Protonennetzwerk der BLUF-Domäne im Intermediat Q2 (links) und im langlebigen Signalzustand (rechts).....	79
Abbildung 6-1: Autophosphorylierung von <i>C. reinhardtii</i> Phototropin.....	83
Abbildung 6-2: Mögliche Interaktion von S28 in Slr1694 mit dem Isoalloxazinring.....	90
Abbildung 6-3: Modell des Protonennetzwerks im Dunkel- (links) und Lichtzustand (rechts).....	92
Abbildung 6-4: „Klapp“-Mechanismus in BLUF Domänen.....	93
Abbildung 6-5: TEVC Experiment zur Charakterisierung der Aktivität von PAC.....	94
Abbildung 6-6: Einfluss von M152A auf die Photoaktivierung von PAC.....	95

8.10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Fusionskonstrukte zur Expression von Phototropin in <i>E. coli</i>	25
Tabelle 3-2: Übersicht der Reinigungsstrategien von Phototropin.....	35
Tabelle 3-3: Thermische Stabilität von Phototropin.....	40
Tabelle 4-1: Photodynamik des Signalzustandes in Phototropin.....	44
Tabelle 4-2: Photodynamik des Signalzustands in Phototropin in Abhängigkeit von ATP.....	46
Tabelle 4-3: Lebensdauer des Triplet-Zustandes in Phototropin bei RT.....	58
Tabelle 5-1: Absorptionseigenschaften von Slr1694 und Mutanten.....	64
Tabelle 5-2: Chromophorzusammensetzung von Slr1694 und mutierten Proteinen.....	66
Tabelle 5-3: Rekonstitution von Slr1694 mit FAD.....	69
Tabelle 5-4: Kinetische Daten der Dunkeladaptation von Slr1694 und Mutanten.	72
Tabelle 7-1: Insektenzelllinien.....	96
Tabelle 7-2: Medien und Puffer für <i>E. coli</i>	98
Tabelle 7-3: <i>E. coli</i> Stämme.....	99
Tabelle 7-4: Expressionsbedingungen.....	100
Tabelle 7-5: Verwendete Puffer zur Aufreinigung von Slr1694 und LOV-Domänenkonstrukten.....	107
Tabelle 7-6: Antikörper für Western Blot Analyse.....	110
Tabelle 7-7: HPLC Programm zur Trennung von Flavinen.....	112
Tabelle 8-1: Verwendete Vektoren.....	121
Tabelle 8-2: Allgemein verwendete Oligonukleotide.....	122
Tabelle 8-3: Primer für die ortsgerichtete Mutagenese.....	123

9 Literatur

- A. VILLAVERDE, M. C. (2003): Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.* , **25** , 1385–1395.
- ADAMS, J. A. (2003): Activation loop phosphorylation and catalysis in protein kinases: is there functional evidence for the autoinhibitor model? *Biochemistry*, **42**, 601-607.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-3402.
- ANDERSON, S., DRAGNEA, V., MASUDA, S., YBE, J., MOFFAT, K. & BAUER, C. (2005): Structure of a novel photoreceptor, the BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, **44**, 7998-8005.
- ARAKAWA, T., EJIMA, D., TSUMOTO, K., OBEYAMA, N., TANAKA, Y., KITA, Y. & TIMASHEFF, S.N. (2007): Suppression of protein interactions by arginine: a proposed mechanism of the arginine effects. *Biophys Chem*, **127**, 1-8.
- ARNON, D. I. (1971): The light reactions of photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 2883-2892.
- BAILLIE, R. D., HOU, C. & BRAGG, P.D. (1971): The preparation and properties of a solubilized respiratory complex from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, **234**, 46-56.
- BARTH, A. (2000): The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog Biophys Mol Biol*, **74**, 141-173.
- BENEDETTI, P. A. & LENCI, F. (1977): In vivo microspectrofluorometry of photoreceptor pigments in *Euglena gracilis*. *Photochem. Photobiol.* , **26**, 315-318.
- BOER, H. A. D., COMSTOCK, L. J. & VASSER, M. (1983): The tac Promoter: A Functional Hybrid Derived from the trp and lac Promoters. *PNAS*, **80**, 21-25.
- BRIGGS, W. R. & HUALA, E. (1999): Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 33-62.
- BRODHU, B. & HÄDER, D. (1990): Photoreceptor proteins and pigments in the paraflagellar body of the flagellate *Euglena gracilis*. *Photochem Photobiol*, **52**, 865-871.
- BUTTANI, V., LOSI, A., EGGERT, T., KRAUSS, U., JAEGER, K., CAO, Z. & GÄRTNER, W. (2007): Conformational analysis of the blue-light sensing protein YtvA reveals a competitive interface for LOV-LOV dimerization and interdomain interactions. *Photochem Photobiol Sci*, **6**, 41-49.
- CARRIÓ, M. M. & VILLAVERDE, A. (2002): Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol*, **96**, 3-12.

- CHEN, E., SWARTZ, T. E., BOGOMOLNI, R. A. & KLIGER, D.S. (2007): A LOV Story: The Signaling State of the Phot1 LOV2 Photocycle Involves Chromophore-Triggered Protein Structure Relaxation, As Probed by Far-UV Time-Resolved Optical Rotatory Dispersion Spectroscopy. *Biochemistry*, **46**(15), 4619-4624.
- CHRISTIE, J. M., REYMOND, P., POWELL, G. K., BERNASCONI, P., RAIBEKAS, A. A., LISCUM, E. & BRIGGS, W.R. (1998): *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science*, **282**, 1698-1701.
- DE CROMBRUGGHE, B., CHEN, B., ANDERSON, W., NISSLEY, P., GOTTESMAN, M., PASTAN, I. & PERLMAN, R. (1971): Lac DNA, RNA polymerase and cyclic AMP receptor protein, cyclic AMP, lac repressor and inducer are the essential elements for controlled lac transcription. *Nat New Biol.*, **231**(22), 139-142.
- DENYSENKOV, V. P., PRISNER, T. F., STUBBE, J. & BENNATI, M. (2006): High-field pulsed electron-electron double resonance spectroscopy to determine the orientation of the tyrosyl radicals in ribonucleotide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 13386-13390.
- DOERFLER, W. (1986): Expression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome in insect cells: homologous viral and heterologous vertebrate genes--the baculovirus vector system. *Curr Top Microbiol Immunol*, **131**, 51-68.
- ELIEZER, D. & PALMER, A.G.3. (2007): Biophysics: proteins hunt and gather. *Nature*, **447**, 920-921.
- ERMILOVA, E. V., ZALUTSKAYA, Z. M., HUANG, K. & BECK, C.F. (2004): Phototropin plays a crucial role in controlling changes in chemotaxis during the initial phase of the sexual life cycle in *Chlamydomonas*. *Planta*, **219**, 420-427.
- FANKHAUSER, C. & CHORY, J. (1999): Light receptor kinases in plants! *Curr Biol*, **9**, R123-6.
- FEDOROV, R., SCHLICHTING, I., HARTMANN, E., DOMRATCHEVA, T., FUHRMANN, M. & 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.
- FIEDLER, B., BÖRNER, T. & WILDE, A. (2005): Phototaxis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: role of different photoreceptors. *Photochem Photobiol*, **81**, 1481-1488.
- FUKUSHIMA, Y., OKAJIMA, K., SHIBATA, Y., IKEUCHI, M. & ITOH, S. (2005): Primary intermediate in the photocycle of a blue-light sensory BLUF FAD-protein, Tll0078, of *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Biochemistry*, **44**, 5149-5158.
- GAUDEN, M., GRINSTEAD, J. S., LAAN, W., STOKKUM, I. H. M. V., AVILA-PEREZ, M., TOH, K. C., BOELEN, R., KAPTEIN, R., GRONDELLE, R. V., HELLINGWERF, K. J. ET AL. (2007): On the Role of Aromatic Side Chains in the Photoactivation of BLUF Domains. *Biochemistry*, **46**, 7405-7415.

GAUDEN, M., VAN STOKKUM, I. H. M., KEY, J. M., LUHRS, D. C., VAN GRONDELLE, R., HEGEMANN, P. & KENNIS, J.T.M. (2006): Hydrogen-bond switching through a radical pair mechanism in a flavin-binding photoreceptor *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10895-10900.

GAUDEN, M., YEREMENKO, S., LAAN, W., VAN STOKKUM, I. H. M., IHALAINEN, J. A., VAN GRONDELLE, R., HELLINGWERF, K. J. & KENNIS, J.T.M. (2005a): Photocycle of the flavin-binding photoreceptor AppA, a bacterial transcriptional antirepressor of photosynthesis genes. *Biochemistry*, **44**, 3653-3662.

GAUDEN, M., YEREMENKO, S., LAAN, W., VAN STOKKUM, I. H. M., IHALAINEN, J. A., VAN GRONDELLE, R., HELLINGWERF, K. J. & KENNIS, J.T.M. (2005b): Photocycle of the flavin-binding photoreceptor AppA, a bacterial transcriptional antirepressor of photosynthesis genes. *Biochemistry*, **44**, 3653-3662.

GOBETS, B., VAN STOKKUM, I. H., RÖGNER, M., KRUIP, J., SCHLODDER, E., KARAPETYAN, N. V., DEKKER, J. P. & VAN GRONDELLE, R. (2001): Time-resolved fluorescence emission measurements of photosystem I particles of various cyanobacteria: a unified compartmental model. *Biophys J*, **81**, 407-424.

GOMELSKY, M. & KLUG, G. (2002): BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem Sci*, **27**, 497-500.

GONZÁLEZ-MONTALBÁN, N., GARCÍA-FRUITÓS, E. & VILLAYERDE, A. (2007): Recombinant protein solubility-does more mean better? *Nat Biotechnol*, **25**, 718-720.

GROOT, M. L., VAN WILDEREN, L. J. G. W., LARSEN, D. S., VAN DER HORST, M. A., VAN STOKKUM, I. H. M., HELLINGWERF, K. J. & VAN GRONDELLE, R. (2003): Initial steps of signal generation in photoactive yellow protein revealed with femtosecond mid-infrared spectroscopy. *Biochemistry*, **42**, 10054-10059.

GROSSMAN, T. H., KAWASAKI, E. S., PUNREDDY, S. R. & OSBURNE, M.S. (1998): Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*, **209**, 95-103.

GUEx, N. & PEITSCH, M.C. (1997): SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **18**, 2714-2723.

GUO, H., KOTTKE, T., HEGEMANN, P. & DICK, B. (2005): The phot LOV2 domain and its interaction with LOV1. *Biophys J*, **89**, 402-412.

GUZMAN, L., BELIN, D., CARSON, M. & BECKWITH, J. (1995): Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol.*, **177**(14), 4121-4130.

HÄDER, D-P., LEBERT, M. (1998): The photoreceptor for phototaxis in the photosynthetic flagellate *Euglena gracilis*. *Photochemistry and Photobiology*, **68**(3), 260-265.

- HAN, Y., BRAATSCH, S., OSTERLOH, L. & KLUG, G. (2004): A eukaryotic BLUF domain mediates light-dependent gene expression in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 12306-12311.
- HARADA, A. & SHIMAZAKI, K. (2006): Phototropins and Blue Light-dependent Calcium Signaling in Higher Plants. *Photochem Photobiol*, **83(1)**, 102-111.
- HARPER, S. M., NEIL, L. C. & GARDNER, K.H. (2003): Structural basis of a phototropin light switch. *Science*, **301**, 1541-1544.
- HASEGAWA, K., MASUDA, S. & ONO, T. (2004): Structural intermediate in the photocycle of a BLUF (sensor of blue light using FAD) protein Slr1694 in a Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochemistry*, **43**, 14979-14986.
- HASEGAWA, K., MASUDA, S. & ONO, T. (2005): Spectroscopic analysis of the dark relaxation process of a photocycle in a sensor of blue light using FAD (BLUF) protein Slr1694 of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol*, **46**, 136-146.
- HASEGAWA, K., MASUDA, S. & ONO, T. (2006): Light Induced Structural Changes of a Full-length Protein and Its BLUF Domain in YcgF(Blrp), a Blue-Light Sensing Protein That Uses FAD (BLUF). *Biochemistry*, **45**, 3785-3793.
- HAZRA, P., INOUE, K., LAAN, W., HELLINGWERF, K. & TERAZIMA, M. (2006): Tetramer Formation Kinetics in the Signaling State of AppA monitored by the time-resolved diffusion. *Biophys J*, **91(2)**, 654-661.
- HEELIS, P. F., KIM, S. T., OKAMURA, T. & SANCAR, A. (1993): The photo repair of pyrimidine dimers by DNA photolyase and model systems. *J Photochem Photobiol B*, **17**, 219-228.
- HOLZER, W., PENZKOFER, A. & HEGEMANN, P. (2005): Absorption and emission spectroscopic characterisation of the LOV2-His domain of phot from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemical Physics*, **308**, 79-91.
- HOLZER, W., PENZKOFER, A., FUHRMANN, M. & HEGEMANN, P. (2002): Spectroscopic characterization of flavin mononucleotide bound to the LOV1 domain of Phot1 from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photochem Photobiol*, **75**, 479-487.
- HUANG, K. & 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 U S A*, **100**, 6269-6274.
- HUANG, K., KUNKEL, T. & BECK, C.F. (2004): Localization of the blue-light receptor phototropin to the flagella of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Biol Cell*, **15**, 3605-3614.
- HUANG, K., MERKLE, T. & BECK, C. (2002): Isolation and characterization of a *Chlamydomonas* gene that encodes a putative blue-light photoreceptor of the phototropin family. *Physiol Plant*, **115**, 613-622.

- IM, C., EBERHARD, S., HUANG, K., BECK, C. F. & GROSSMAN, A.R. (2006): Phototropin involvement in the expression of genes encoding chlorophyll and carotenoid biosynthesis enzymes and LHC apoproteins in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, **48**, 1-16.
- ISEKI, M., MATSUNAGA, S., MURAKAMI, A., OHNO, K., SHIGA, K., YOSHIDA, K., SUGAI, M., TAKAHASHI, T., HORI, T. & WATANABE, M. (2002): A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature*, **415**, 1047-1051.
- ITO, S., MURAKAMI, A., SATO, K., NISHINA, Y., SHIGA, K., TAKAHASHI, T., HIGASHI, S., ISEKI, M. & WATANABE, M. (2005): Photocycle features of heterologously expressed and assembled eukaryotic flavin-binding BLUF domains of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), a blue-light receptor in *Euglena gracilis*. *Photochem Photobiol Sci*, **4**, 762-769.
- JESCHKE, G. (2002): Distance measurements in the nanometer range by pulse EPR. *Chemphyschem*, **3**, 927-932.
- JESCHKE, G. (2005): EPR techniques for studying radical enzymes. *Biochim Biophys Acta*, **1707**, 91-102.
- JUNG, A., DOMRATCHEVA, T., TARUTINA, M., WU, Q., KO, W., SHOEMAN, R. L., GOMELSKY, M., GARDNER, K. H. & SCHLICHTING, I. (2005): Structure of a bacterial BLUF photoreceptor: insights into blue light-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12350-12355.
- JUNG, A., REINSTEIN, J., DOMRATCHEVA, T., SHOEMAN, R. L. & SCHLICHTING, I. (2006): Crystal structures of the AppA BLUF domain photoreceptor provide insights into blue light-mediated signal transduction. *J Mol Biol*, **362**, 717-732.
- KAY TERPE (2006): Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **72,2**, 211-222.
- KONDO, M., NAPPA, J., RONAYNE, K. L., STELLING, A. L., TONGE, P. J. & MEECH, S.R. (2006): Ultrafast vibrational spectroscopy of the flavin chromophore. *J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys*, **110**, 20107-20110.
- KONG, S., KINOSHITA, T., SHIMAZAKI, K., MOCHIZUKI, N., SUZUKI, T. & NAGATANI, A. (2007): The C-terminal kinase fragment of *Arabidopsis* phototropin 2 triggers constitutive phototropin responses. *Plant J*, **51(5)**, 862-873.
- KONG, S., SUZUKI, T., TAMURA, K., MOCHIZUKI, N., HARA-NISHIMURA, I. & NAGATANI, A. (2006): Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus. *Plant J*, **45**, 994-1005.
- KOTTKE, T., HEBERLE, J., HEHN, D., DICK, B. & HEGEMANN, P. (2003): Phot-LOV1: photocycle of a blue-light receptor domain from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys J*, **84**, 1192-1201.

- KOUMURA, Y., SUZUKI, T., YOSHIKAWA, S., WATANABE, M. & ISEKI, M. (2004): The origin of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), the *Euglena* blue-light receptor: phylogenetic analysis of orthologues of PAC subunits from several euglenoids and trypanosome-type adenylyl cyclases from *Euglena gracilis*. *Photochem Photobiol Sci*, **3**, 580-586.
- KRAFT, B. J., MASUDA, S., KIKUCHI, J., DRAGNEA, V., TOLLIN, G., ZALESKI, J. M. & BAUER, C.E. (2003): Spectroscopic and mutational analysis of the blue-light photoreceptor AppA: a novel photocycle involving flavin stacking with an aromatic amino acid. *Biochemistry*, **42**, 6726-6734.
- LAAN, W., BEDNARZ, T., HEBERLE, J. & HELLINGWERF, K.J. (2004): Chromophore composition of a heterologously expressed BLUF-domain. *Photochem Photobiol Sci*, **3**, 1011-1016.
- LAAN, W., GAUDEN, M., YEREMENKO, S., VAN, G. R., KENNIS, J. & HELLINGWERF, K. (2006): On the Mechanism of Activation of the BLUF Domain of AppA. *Biochemistry*, **45**, 51-60.
- LAAN, W., VAN DER HORST, M. A., VAN STOKKUM, I. H. & HELLINGWERF, K.J. (2003): Initial characterization of the primary photochemistry of AppA, a blue-light-using flavin adenine dinucleotide-domain containing transcriptional antirepressor protein from *Rhodobacter sphaeroides*: a key role for reversible intramolecular proton transfer from the flavin adenine dinucleotide chromophore to a conserved tyrosine? *Photochem Photobiol*, **78**, 290-297.
- LAEMMLI UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227(5259)**, 680-685.
- LARIGUET, P., SCHEPENS, I., HODGSON, D., PEDMALE, U. V., TREVISAN, M., KAMI, C., DE CARBONNEL, M., ALONSO, J. M., ECKER, J. R., LISCUM, E. ET AL. (2006): PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 is a phototropin 1 binding protein required for phototropism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10134-10139.
- LOSI, A., KOTTKE, T. & HEGEMANN, P. (2004): Recording of blue light-induced energy and volume changes within the wild-type and mutated phot-LOV1 domain from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys J*, **86**, 1051-1060.
- LOSI, A., POLVERINI, E., QUEST, B. & GARTNER, W. (2002): First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes. *Biophys J*, **82**, 2627-2634.
- MACHEROUX, P. (1999): UV-visible spectroscopy as a tool to study flavoproteins, in: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ.
- MARTIN, C. B., TSAO, M., HADAD, C. M. & PLATZ, M.S. (2002): The reaction of triplet flavin with indole. A study of the cascade of reactive intermediates using density functional theory and time resolved infrared spectroscopy. *J Am Chem Soc*, **124**, 7226-7234.
- MASHHOON, N., CARMEL, G., PFLUGRATH, J. W. & KURET, J. (2001): Structure of the unliganded cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys*, **387**, 11-19.

MASSEY, V. & 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.

MASUDA, S. & ONO, T. (2004a): Biochemical characterization of the major adenylyl cyclase, Cya1, in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett*, **577**, 255-258.

MASUDA, S., HASEGAWA, K. & ONO, T. (2005a): Tryptophan at Position 104 is Involved in Transforming Light Signal into Changes of {beta}-sheet Structure for the Signaling State in the BLUF Domain of AppA. *Plant Cell Physiol*, **46**, 1894-1901.

MASUDA, S., HASEGAWA, K. & ONO, T. (2005b): Light-induced structural changes of apoprotein and chromophore in the sensor of blue light using FAD (BLUF) domain of AppA for a signaling state. *Biochemistry*, **44**, 1215-1224.

MASUDA, S., HASEGAWA, K., ISHII, A. & ONO, T. (2004b): Light-induced structural changes in a putative blue-light receptor with a novel FAD binding fold sensor of blue-light using FAD (BLUF); Slr1694 of *synechocystis* sp. PCC6803. *Biochemistry*, **43**, 5304-5313.

MASUDA, S., TOMIDA, Y., OHTA, H. & TAKAMIYA, K. (2007): The critical role of a hydrogen bond between Gln63 and Trp104 in the blue-light sensing BLUF domain that controls AppA activity. *J Mol Biol*, **368**, 1223-1230.

MATSUOKA, D. & TOKUTOMI, S. (2005): Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 13337-13342.

MILOV, A. D., K. M. SALIKHOV & M. D. SHIROV (1981): Application of the double resonance method to electron spin echo in a study of the spatial distribution of paramagnetic centers in solids. *Sov. Phys. Solid State.*, **23**, 565-569.

MIROUX, B. & WALKER, J.E. (1996): Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels *J Mol Biol*, **260**, 289-298.

MÖGLICH, A. & MOFFAT, K. (2007): Structural Basis for Light-dependent Signaling in the Dimeric LOV Domain of the Photosensor YtvA. *J Mol Biol*, **373**(1), 112-126.

NAGAHAMA, T., SUZUKI, T., YOSHIKAWA, S. & ISEKI, M. (2007): Functional transplant of photoactivated adenylyl cyclase (PAC) into *Aplysia* sensory neurons. *Neurosci Res*, **59**(1), 81-88.

NAGEL, G., SZELLAS, T., HUHN, W., KATERIYA, S., ADEISHVILI, N., BERTHOLD, P., OLLIG, D., HEGEMANN, P. & BAMBERG, E. (2003): Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13940-13945.

NAKASONE, Y., EITOKU, T., MATSUOKA, D., TOKUTOMI, S. & TERAZIMA, M. (2006): Kinetic measurement of transient dimerization and dissociation reactions of *Arabidopsis* phototropin 1 LOV2 domain. *Biophys J*, **91**(2), 645-653.

- NAKASONE, Y., EITOKU, T., MATSUOKA, D., TOKUTOMI, S. & TERAZIMA, M. (2007a): Dynamics of conformational changes of *Arabidopsis* phototropin 1 LOV2 with the linker domain. *J Mol Biol*, **367**, 432-442.
- NAKASONE, Y., ONO, T., ISHII, A., MASUDA, S. & TERAZIMA, M. (2007b): Transient Dimerization and Conformational Change of a BLUF Protein: YcgF. *J Am Chem Soc*, **129**, 7028-7035.
- NOZUE, K., KANEGAE, T., IMAIZUMI, T., FUKUDA, S., OKAMOTO, H., YEH, K. C., LAGARIAS, J. C. & WADA, M. (1998): A phytochrome from the fern *Adiantum* with features of the putative photoreceptor NPH1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15826-15830.
- NTEFIDOU, M. & HÄDER, D. (2005): Photoactivated adenylyl cyclase (PAC) genes in the flagellate *Euglena gracilis* mutant strains. *Photochem Photobiol Sci*, **4**, 732-739.
- NTEFIDOU, M., ISEKI, M., WATANABE, M., LEBERT, M. & HÄDER, D. (2003): Photoactivated adenylyl cyclase controls phototaxis in the flagellate *Euglena gracilis*. *Plant Physiol*, **133**, 1517-1521.
- NTEFIDOU, M., LÜDTKE, T., AHMAD, M. & HÄDER, D. (2006): Heterologous expression of photoactivated adenylyl cyclase (PAC) genes from the flagellate *Euglena gracilis* in insect cells. *Photochem Photobiol*, **82**, 1601-1605.
- OESTERHELT, D. & STOECKENIUS, W. (1973): Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **70**, 2853-2857.
- OKAJIMA, K., FUKUSHIMA, Y., SUZUKI, H., KITA, A., OCHIAI, Y., KATAYAMA, M., SHIBATA, Y., MIKI, K., NOGUCHI, T., ITOH, S. ET AL. (2006): Fate Determination of the Flavin Photoreceptions in the Cyanobacterial Blue Light Receptor TePixD (Tll0078). *Journal of Molecular Biology*, **363**, 10-18.
- OKAJIMA, K., YOSHIHARA, S., FUKUSHIMA, Y., GENG, X., KATAYAMA, M., HIGASHI, S., WATANABE, M., SATO, S., TABATA, S., SHIBATA, Y. ET AL. (2005): Biochemical and functional characterization of BLUF-type flavin-binding proteins of two species of cyanobacteria. *J Biochem (Tokyo)*, **137**, 741-750.
- ONODERA, A., KONG, S., DOI, M., SHIMAZAKI, K., CHRISTIE, J., MOCHIZUKI, N. & NAGATANI, A. (2005): Phototropin from *Chlamydomonas reinhardtii* is functional in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **46**, 367-374.
- OTTO, M. K., JAYARAM, M., HAMILTON, R. M. & DELBRÜCK, M. (1981): Replacement of riboflavin by an analogue in the blue-light photoreceptor of *Phycomyces*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 266-269.
- PEDMALE, U. V. & LISCUM, E. (2007): Regulation of phototropic signaling in *Arabidopsis* via phosphorylation state changes in the phototropin 1-interacting protein NPH3. *J Biol Chem*, **282(27)**, 19992-20001.

PICCINI, E. & MAMMI, M. (1978): Motor apparatus of *Euglena gracilis*: ultrastructure of the basal portion of the flagellum and the paraflagellar body. *Boll. Zool.*, **45**, 405-415.

POLYHACH, Y., GODT, A., BAUER, C. & JESCHKE, G. (2007): Spin pair geometry revealed by high-field DEER in the presence of conformational distributions. *J Magn Reson*, **185**, 118-129.

R. BONNEAU, J. W. A. A. D. Z. (1997): Methods for the analysis of transient absorbance data (Technical Report). *Pure & Applied Chemistry*, **69**, 979.

RAJAGOPAL, S., KEY, J. M., PURCELL, E. B., BOEREMA, D. J. & MOFFAT, K. (2004): Purification and initial characterization of a putative blue light-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli*. *Photochem Photobiol*, **80**, 542-547.

REISDORPH, N. A. & SMALL, G.D. (2004): The CPH1 gene of *Chlamydomonas reinhardtii* encodes two forms of cryptochrome whose levels are controlled by light-induced proteolysis. *Plant Physiol*, **134**, 1546-1554.

ROST, B., YACHDAV, G. & LIU, J. (2004): The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res*, **32**, W321-6.

SAKAMOTO, K. & BRIGGS, W.R. (2002): Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell*, **14**, 1723-1735.

SALOMON, M., LEMPERT, U. & RUDIGER, W. (2004): Dimerization of the plant photoreceptor phototropin is probably mediated by the LOV1 domain. *FEBS Lett*, **572**, 8-10.

SANE, P. V. & PARK, R.B. (1970): Purification of photosystem I reaction centers from spinach stroma lamellae. *Biochem Biophys Res Commun*, **41**, 206-210.

SCHLEICHER, E., KOWALCZYK, R. M., KAY, C. W. M., HEGEMANN, P., BACHER, A., FISCHER, M., BITTL, R., RICHTER, G. & WEBER, S. (2004): On the reaction mechanism of adduct formation in LOV domains of the plant blue-light receptor phototropin. *J Am Chem Soc*, **126**, 11067-11076.

SCHMIDT, M., GESSNER, G., LUFF, M., HEILAND, I., WAGNER, V., KAMINSKI, M., GEIMER, S., EITZINGER, N., REISSENWEBER, T., VOYTSEKH, O. ET AL. (2006): Proteomic analysis of the eyespot of *Chlamydomonas reinhardtii* provides novel insights into its components and tactic movements. *Plant Cell*, **18**, 1908-1930.

SCHRÖDER-LANG, S., SCHWÄRZEL, M., SEIFERT, R., STRÜNKER, T., KATERIYA, S., LOOSER, J., WATANABE, M., KAUPP, U. B., HEGEMANN, P. & NAGEL, G. (2007): Fast manipulation of cellular cAMP level by light in vivo. *Nat Methods*, **4**, 39-42.

SCHUCK, P., MACPHEE, C. E. & HOWLETT, G.J. (1998): Determination of sedimentation coefficients for small peptides. *Biophys J*, **74**, 466-474.

SCHWEIGER, A., JESCHKE, G. (2001): Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance. Oxford University Press.

- SKERRA, A. (1994): Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene*, **151**, 131-135.
- SONG, S., DICK, B., ZIRAK, P., PENZKOFER, A., SCHIEREIS, T. & HEGEMANN, P. (2005): Absorption and emission spectroscopic characterisation of combined wildtype LOV1-LOV2 domain of phot from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Photochem Photobiol B*, **81**, 55-65.
- STUDIER, F. W. (2005): Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*, **41**, 207-234.
- SWARTZ, T. E., TSENG, T., FREDERICKSON, M. A., PARIS, G., COMERCI, D. J., RAJASHEKARA, G., KIM, J., MUDGETT, M. B., SPLITTER, G. A., UGALDE, R. A. ET AL. (2007): Blue-Light-Activated Histidine Kinases: Two-Component Sensors in Bacteria. *Science*, **317**, 1090-1093.
- TAYLOR, B. L. & ZHULIN, I.B. (1999): PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**, 479-506.
- TERESA MAJERUS, TILMAN KOTTKE, WOUTER LAAN, KLAAS HELLINGWERF & JOACHIM HEBERLE (2007): Time-Resolved FT-IR Spectroscopy Traces Signal Relay within the Blue-Light Receptor AppA. *ChemPhysChem*, **8(12)**, 1787-1789.
- TEWS, I., FINDEISEN, F., SINNING, I., SCHULTZ, A., SCHULTZ, J. E. & LINDER, J.U. (2005): The structure of a pH-sensing mycobacterial adenylyl cyclase holoenzyme. *Science*, **308**, 1020-1023.
- TSUMOTO, K., UMETSU, M., KUMAGAI, I., EJIMA, D. & ARAKAWA, T. (2003): Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine. *Biochem Biophys Res Commun*, **312**, 1383-1386.
- UMETSU, M., TSUMOTO, K., NITTA, S., ADSCHIRI, T., EJIMA, D., ARAKAWA, T. & KUMAGAI, I. (2005): Nondenaturing solubilization of beta2 microglobulin from inclusion bodies by L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun*, **328**, 189-197.
- UNNO, M., MASUDA, S., ONO, T. & YAMAUCHI, S. (2006): Orientation of a Key Glutamine Residue in the BLUF Domain from AppA Revealed by Mutagenesis, Spectroscopy, and Quantum Chemical Calculations. *J Am Chem Soc*, **128**, 5638-5639.
- VAN DER HORST, M. A. & HELLINGWERF, K.J. (2004): Photoreceptor proteins, "star actors of modern times": a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Acc Chem Res*, **37**, 13-20.
- VAN STOKKUM, I. H. M., LARSEN, D. S. & VAN GRONDELLE, R. (2004): Global and target analysis of time-resolved spectra. *Biochim Biophys Acta*, **1657**, 82-104.
- VOGEL, R. & SIEBERT, F. (2003): Fourier transform IR spectroscopy study for new insights into molecular properties and activation mechanisms of visual pigment rhodopsin. *Biopolymers*, **72**, 133-148.

VOGL, C., GRILL, S., SCHILLING, O., STÜLKE, J., MACK, M. & STOLZ, J. (2007): Characterization of riboflavin (vitamin B2) transport proteins from *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol*, **Vol. 189**, No. 20, 7367–7375.

W. HOLZER, J. SHIRDEL, P. ZIRAK, A. PENZKOFER, P. HEGEMANN, R. DEUTZMANN & E. HOCHMUTH (2005): Photo-induced degradation of some flavins in aqueous solution. *Chem. Phys.*, **308**, 69-78.

WOLKEN, J. J. (1977): *Euglena*: the photoreceptor system for phototaxis. *J Protozool*, **24**, 518-522.

YANG, J., CRON, P., GOOD, V. M., THOMPSON, V., HEMMINGS, B. A. & BARFORD, D. (2002): Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat Struct Biol*, **9**, 940-944.

YINGHONG LU (2006): *Functional analysis of phototropin in Chlamydomonas reinhardtii*. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.

YUAN, H., ANDERSON, S., MASUDA, S., DRAGNEA, V., MOFFAT, K. & BAUER, C. (2006): Crystal structures of the *Synechocystis* photoreceptor Slr1694 reveal distinct structural states related to signaling. *Biochemistry*, **45**, 12687-12694.

ZIKIHARA, K., IWATA, T., MATSUOKA, D., KANDORI, H., TODO, T. & TOKUTOMI, S. (2006): Photoreaction cycle of the light, oxygen, and voltage domain in FKF1 determined by low-temperature absorption spectroscopy. *Biochemistry*, **45**, 10828-10837.

ZIRAK, P., PENZKOFER, A., HEGEMANN, P. & MATHES, T. (2007a): Photo dynamics of BLUF domain mutant H44R of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *Chemical Physics*, **335**, 15-27.

ZIRAK, P., PENZKOFER, A., LEHMPFUHL, C., MATHES, T. & HEGEMANN, P. (2007b): Absorption and emission spectroscopic characterization of blue-light receptor Slr1694 from *Synechocystis* sp. PCC6803. *J Photochem Photobiol B*, **86**, 22-34.

ZIRAK, P., PENZKOFER, A., SCHIEREIS, T., HEGEMANN, P., JUNG, A. & SCHLICHTING, I. (2006): Photo-dynamics of the small BLUF protein BlrB from *Rhodobacter sphaeroides*. *J Photochem Photobiol B*, **83**, 180-194.

ZOLTOWSKI, B. D., SCHWERDTFEGGER, C., WIDOM, J., LOROS, J. J., BILWES, A. M., DUNLAP, J. C. & CRANE, B.R. (2007): Conformational Switching in the Fungal Light Sensor Vivid. *Science*, **316**, 1054-1057.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe verfasst und nur die angegebene Literatur verwendet zu haben.

Ich besitze keinen entsprechenden Doktorgrad und habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben.

Die dem Promotionsverfahren zugrundeliegende Promotionsordnung vom 01. Oktober 2002 ist mir bekannt.

Tilo Mathes