

*Untersuchung der intramolekularen Signaltransduktion eines
Blaulichtrezeptors*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades *doctor rerum naturalium*

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Jennifer Mehlhorn, M. Sc.

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen: Prof. Dr. Peter Hegemann

Prof. Dr. Maria Andrea Mroginski

PD Dr. Tilman Kottke

Tag der mündlichen Prüfung: 13.09.2017

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Mehlhorn, J., Lindtner, T., Richter, F., Glaß, K., Steinocher, H., Beck, S., Hegemann, P., Kennis J.T.M. & Mathes, T. (2015) Light-Induced Rearrangement of the β 5-Strand in the BLUF Photoreceptor SyPixD (Slr1694). *The Journal of Physical Chemistry Letters* **6**(23):4749–4753

Fudim, R., Mehlhorn, J., Berthold, T., Weber, S., Schleicher, E., Kennis J.T.M., Mathes, T. (2015) Photoinduced formation of flavin radicals in BLUF domains lacking the central glutamine. *FEBS Journal* **282**:3161–3174

Richter, F., Scheib, U.S., Mehlhorn, J., Schubert, R., Wietek, J., Gernetzki, O., Hegemann, P., Mathes, T. & Möglich, A. (2015) Upgrading a microplate reader for photobiology and all-optical experiments. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **14**(2):270-279

Mehlhorn, J., Steinocher H., Beck S., Kennis J.T.M., Hegemann P. & Mathes T. (2013) A Set of Engineered *Escherichia coli* Expression Strains for Selective Isotope and Reactivity Labeling of Amino Acid Side Chains and Flavin Cofactors. *PLoS ONE* **8**(11):e79006

Posterbeiträge auf Konferenzen:

40th Congress of the Federation of the European Biochemical Societies (FEBS)
July 4 – 9, 2015 / Berlin – Germany

Mehlhorn, J., Lindtner, T., Glass, K., Beck, S., Kennis J.T.M., Hegemann, P. & Mathes, T. “A non-essential tryptophan residue reports structural changes of the protein backbone in a blue light photoreceptor”

18th International Symposium on Flavins and Flavoproteins
July 27 – August 01, 2014/ Phetchaburi – Thailand

Mehlhorn, J., Steinocher, H., Lindtner, T., Beck, S., Kennis J.T.M., Hegemann, P. & Mathes, T. “A bacterial *in vivo* system for selective isotope labeling and incorporation of unnatural amino acids or cofactors in flavoproteins”

Gordon Research Seminar & Gordon Research Conference – Photosensory Receptors & Signal Transduction, April 5-6, 2014/Lucca (Barga), Italy

Mehlhorn, J., Beck, S., Kennis, J.T.M., Hegemann, P. & Mathes, T. “Investigation of the hydrogen bond network around His72 of the Slr1694 BLUF domain”

Zusammenfassung

Das Cyanobakterium *Synechocystis* ist ein Modellorganismus für Photosynthese, dessen Bewegungsrichtung durch chemische Stimuli sowie Lichtqualität und -intensität beeinflusst wird. Die primären Akteure der Lichtwahrnehmung bilden sensorische Photorezeptoren, die in einem komplexen Netzwerk die optimale Energieversorgung der Zelle und gleichzeitig die Meidung schädlicher Strahlung gewährleisten. Einer dieser Photorezeptoren ist PixD (Slr1694), der den *sensors of blue light using FAD* (BLUF) Proteinen zugeordnet wurde und Licht mit einem Flavin-Chromophor absorbiert. Die Übertragung des Stimulus auf das Apoprotein erfolgt über eine Neuordnung des Wasserstoffbrückennetzwerkes um den Kofaktor, in das die strikt konservierten Reste Tyrosin-8 (Y8), Glutamin-50 (Q50) und möglicherweise das semi-konservierte Tryptophan-91 (W91) involviert sind. PixD bildet für die Untersuchung dieser speziellen Photochemie ein ausgezeichnetes Modell, weil sich in seinem Photozyklus verschiedene Intermediate auflösen lassen. Darüber hinaus besteht es ausschließlich aus der Sensordomäne mit einem nur kurzen C-terminalen Anhang und kann als cyanobakterielles Protein hoch-effektiv in *Escherichia coli* exprimiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, weitere Hinweise auf die Wasserstoffbrückenkonfiguration der Flavinbindetasche in Dunkel- und Lichtzustand zu erhalten, um eine bessere Vorstellung von der Stabilisierung des Lichtzustandes zu bekommen und mögliche Wege der Signaltransduktion an die Proteinoberfläche einzugrenzen. Dazu sollten systematische Isotopenmarkierungen von Apoprotein und Chromophor angefertigt werden, mit deren Hilfe eine Analyse von FT-IR Banden der statischen Zustände von PixD vereinfacht wird. Zur Herstellung dieser Isotopenmarkierungen wurden *Escherichia coli* Stämme mit Auxotrophien für Riboflavin und für ausgewählte Aminosäuren genutzt. Neuartig war darunter die vollständige *in vivo* Produktion inverser Apoproteinmarkierungen ohne Rekonstitution des Kofaktors im Anschluss an die Proteinaufreinigung.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich lichtaktivierte Interaktionsänderungen zwischen Apoprotein und Chromophor auf die Neubildung einer Wasserstoffbrücke zum Flavin C4-Carbonyl beschränken. In Übereinstimmung zu früheren Analysen liegt das Q50 im Dunkelzustand in seiner Amid-Form vor. Sein Seitenkettencarbonyl ist im Lichtzustand vermutlich zu Y8 ausgerichtet, wobei Hinweise auf eine Amid-Imidsäure-Tautomerisierung des Glutamins in PixD gefunden wurden. Außerdem positioniert Q50 die Seitenkette des W91 so, dass ein kompetitiver Elektronentransfer mit Y8 verhindert wird. Eine selektive Isotopenmarkierung dieses Tryptophans am Beginn eines Eckstranges des β -Faltblattes zeigte Anzeichen für eine Verlängerung des β 5-Stranges, die wahrscheinlich ein zentrales Element der Signalweiterleitung an die Proteinoberfläche darstellt.

Änderungen der β 5-Flexibilität, durch Substitutionen des W91, pflanzten sich bis in die Flavinbindetasche fort und könnten auf diesem Wege die Stabilität des Lichtzustandes beeinflussen. Möglicherweise erstreckt sich das Wasserstoffbrückennetzwerk dabei bis in die über dem β 5-Strang liegende α -Helix. Wird es gestört, scheint das Proteininnere für Imidazol zugänglich gemacht zu werden, wo es die Aktivierungsenergie für die Rückkehr in den Dunkelzustand beeinflusst.

Auch Substitutionen des H73 im gegenüberliegenden Eckstrang des β -Faltblattes beeinflussten die Geschwindigkeit der Dunkelrelaxation von PixD. Sie veränderten die IR-Absorption gegenüber dem Wildtyp jedoch nicht und unterstützen die Theorie einer Protonenleitung über das benachbarte H72. Imidazol wirkte auf die H73-Mutationen mit einem zweiten Mechanismus, der vermutlich auf eine Erhöhung der Aktivierungsentropie zurückzuführen ist.

Abstract

The cyanobacterium *Synechocystis* is an established model organism for photosynthesis. Among other stimuli, light of different quality and intensity influences the direction of cell movement. Sensors enabling this behavior are primarily sensory photoreceptors. They form a complicated network in order to balance optimal energy supply and protection against harmful wavelengths. One of those photoreceptors is PixD (Slr1694) which belongs to the sensors of blue light using FAD (BLUF) protein family. These photoreceptors propagate the signal by a rearrangement of hydrogen bonds surrounding the cofactor, involving the highly conserved residues tyrosine-8 (Y8), glutamine-50 (Q50) and perhaps the semi-conserved tryptophan-91 (W91). PixD is a perfect model for studying this special photochemistry since its photocycle intermediates are resolvable. An advantage is its rather simple structure which consists only of the BLUF sensor domain with a short C-terminal extension. Additionally recombinant protein expression in *Escherichia coli* is highly efficient.

One aim of the presented work was to gain a deeper insight into the hydrogen bond configuration of the flavin binding pocket in the light and dark state conformations. Thereby, knowledge of the stabilization mechanisms for the light state and the signal propagation to the protein surface could be acquired. A systematic isotope labeling of chromophore and apoprotein was used to pursue this objective. The approach simplifies the FT-IR signal analysis of the steady states of PixD. The labeling patterns were produced in *Escherichia coli* strains auxotrophic for riboflavin and selected amino acids. Among them, inverse labeling patterns in the apoprotein produced directly during protein biosynthesis, represent a novelty which outperforms *in vitro* reconstitution with the cofactor.

The results indicate a restriction of light induced changes in hydrogen bonding of the flavin to its C4-carbonyl. In agreement with former studies, the Q50 forms the amide isomer in the dark state. Its side chain carbonyl group most likely points towards Y8 in the active protein. Besides, the results support an amide-imidic acid-tautomerization of Q50 in PixD. Moreover, the glutamine affects the position of W91 in order to suppress an electron transfer competition with Y8. A selective isotope labeling of the tryptophan localized at the beginning of an edge strand of the β -sheet indicates an elongation of the secondary structure that may represent a central element of the signal propagation to the protein surface. Changing the flexibility of this β -strand also affects the flavin binding pocket and could thereby influence the dark state recovery. The secondary structure is possibly connected with an α -helix located above the β 5-strand by hydrogen bonds. A disturbance of this interaction probably allows the base catalyst imidazole to enter the protein core.

Substitutions of H73 in the opposing edge β -strand changed the rate of the PixD dark relaxation as well. However, they had no visible effect on the infrared absorbance compared to the wild type and hence support a putative involvement of the neighbouring H72 in proton transfer reactions. Imidazole affected the H73 mutants by a different mechanism that seems to arise from an increase of the activation entropy.

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
I.1	Flavine als Chromophore von Photorezeptoren.....	1
I.2	Die Familie der BLUF-Photorezeptoren.....	4
I.3	IR-spektroskopische Analyse der BLUF-Photoaktivierung.....	17
I.4	Zielstellung dieser Arbeit.....	20
II.	Material & Methoden.....	21
III.	Ergebnisse	39
III.1	Erweiterung einer Stammsammlung zur gezielten Isotopenmarkierung von Photorezeptoren	39
III.2	Die Wasserstoffbrückenkonfiguration der FAD-Bindetasche in Dunkel- und Signalzustand von PixD.....	48
III.3	Bildung und Zerfall des Signalzustandes in PixD	77
IV.	Diskussion.....	87
IV.1	Eine Plattform zur Isotopenmarkierung von (Flavo-)Proteinen	87
IV.2	Wasserstoffbrückenkonfiguration des Dunkel- und Signalzustandes von PixD	90
IV.3	Einfluss von Q50 und W91 auf die Bildung der Radikalintermediate und den Übergang nach P_{red}	102
IV.4	Mechanismen zur Modulation der Dunkelrelaxation von PixD.....	104
IV.5	Ein aktualisiertes Modell der PixD Photoaktivierung	114
IV.6	Perspektiven.....	120
V.	Anhang.....	123
VI.	Abkürzungsverzeichnis.....	150
VII.	Abbildungsverzeichnis	152
VIII.	Tabellenverzeichnis.....	154
IX.	Literaturverzeichnis.....	155
X.	Danksagung	175

I. Einleitung

„Es kommt nicht darauf an,
mit dem Kopf durch die Wand zu rennen,
sondern mit den Augen die Tür zu finden.“
(Werner von Siemens)

Auf den ersten Blick verfügt ein einzelliger Organismus wie das Cyanobakterium *Synechocystis* über kein komplexes Sehsinnesorgan. Die sphärische Zelle selbst kann jedoch im Ganzen als ursprünglicher optischer Apparat betrachtet werden (Nilsson & Colley, 2016), da sie auf Agarplatten ähnlich einer Linse Lichteinstrahlung auf die Membran der gegenüberliegenden Seite fokussiert (Schuergers *et al.*, 2016). Dort werden, wie bei komplexeren Organismen, vermehrt sensorische Photorezeptoren angeregt. Sie bilden die molekulare Basis der Photosensitivität und sind möglicherweise zum Teil aus den Cyanobakterien über Endosymbiosen in die basalen Stämme der Metazoen oder Pflanzen übertragen worden (Gehring, 2005; Rockwell *et al.*, 2014). Sensorische Photorezeptoren unterscheiden sich von den Lichtsammelkomplexen durch die Auslösung einer differenzierten physiologischen Antwort als Reaktion auf Lichteinstrahlung bestimmter Wellenlängen und Intensitäten. Dafür bindet das Proteingerüst oft ein organisches Molekül, mit konjugiertem π -Elektronensystem. Dieser sogenannte Chromophor ermöglicht die Absorption von Licht in einem spezifischen Bereich des elektromagnetischen Spektrums und bestimmt maßgeblich die spektroskopischen Eigenschaften des Photorezeptors (Möglich *et al.*, 2010). *Synechocystis* besitzt eine Reihe verschiedener Lichtsensoren (Ng *et al.*, 2003; Fiedler *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2011; Narikawa *et al.*, 2011), in denen der Lichtstimulus eine Isomerisierung des Chromophors initiiert. Anschließend überführt die auftretende intramolekulare Spannung das Protein in den Signalzustand (van der Horst & Hellingwerf, 2004). Daneben verfügt das Cyanobakterium aber auch über cytosolische Rezeptoren, die Flavine als Chromophore nutzen (Hitomi *et al.*, 2000; Masuda *et al.*, 2004). Flavine besitzen keine isomerisierbaren Bindungen und benötigen andere photochemische Mechanismen um die Ausbildung des Signalzustand einzuleiten (Gauden *et al.*, 2006). Die vorliegende Arbeit liefert einen Beitrag zur Aufklärung dieser speziellen Photoaktivierung.

I.1 Flavine als Chromophore von Photorezeptoren

Das erstmals aus Kuhmilch isolierte Riboflavin (Vitamin B₂, RF) (Blyth, 1879) ist Vorläufer der essenziellen Kofaktoren Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD). Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften vermitteln sie zwischen obligaten Zwei- und Ein-Elektronentransfer-Systemen in Redoxreaktionen (Walsh 1986). Proteine binden Flavin-Kofaktoren häufig nicht-kovalent, aber mit hoher Selektivität (Massey 2000). Flavoproteine sind an essenziellen Prozessen, wie der oxidativen Phosphorylierung, der Photosynthese phototropher Organismen (Medina, 2009) sowie der lichtabhängigen DNA-Reparatur (Essen & Klar, 2006; Glas *et al.*, 2009; Kiontke *et al.*, 2011) und Biolumineszenz (Lee, 1993) beteiligt.

I. Einleitung

Proteine, die das Derivat F₄₂₀ des strukturverwandten 8-Hydroxy-7-Desmethyl-5-Deazaflavins (8-HDF, auch F₀, Abb. I.1) binden, wirken dagegen bei der Methansynthese von Archaeaen mit und werden beispielsweise in *Streptomyces aureofaciens* für die Herstellung des antibiotisch wirksamen Tetrazyklins benötigt (Walsh, 1986).

Mit der Identifizierung des Kofaktors FAD in einem Cryptochrom, wurde erstmals die Funktion von Flavinen als Chromophore in sensorischen Photorezeptoren nachgewiesen (Ahmad & Cashmore, 1993). Freies Riboflavin absorbiert im ultravioletten (UV) Bereich mit Maxima bei 223 und 267 nm sowie im blauen Bereich bei 375 und 444 nm (Mahmood & Aminuddin, 2001). Die Wahrnehmung von höher energetischem Licht dient Organismen einerseits zur Meidung der schädlichen Strahlung, andererseits ermöglicht sie räumliche Orientierung. Letztere ist besonders für aquatische Lebensformen und Endoparasiten bedeutsam, da kurzwelliges Licht die Wassersäule am tiefsten durchdringt (Losi & Gärtner, 2011), während die Haut vieler Wirtsorganismen dafür undurchlässig ist (Bashkatov *et al.*, 2005). Blaulicht wird von Vertretern der meisten bekannten Photorezeptorfamilien absorbiert (Tab. I-A).

Tab. I-A- Bekannte Photorezeptorfamilien, in denen Blaulichtsensoren vorkommen

Neben der charakteristischen prosthetischen Gruppe ist für jede Proteinfamilie ein Beispiel angegeben. Mehrfachbenennungen sind in Klammern aufgeführt. Angelehnt an van der Horst & Hellingwerf, 2004.

Proteinfamilie	Kofaktor	Beispiel(e)	Referenz
Cryptochrome	Flavin	<i>Arabidopsis thaliana</i> CRY1 (HY4) <i>Synechocystis</i> Cry <i>Drosophila-Arabidopsis-Synechocystis-Homo</i> (cry-DASH) Ccry1 (Slr1629)	Cashmore <i>et al.</i> , 1999 Hitomi <i>et al.</i> , 2000
Light-Oxygen-Voltage-Sensoren (LOV)	Flavin	<i>Arabidopsis thaliana</i> Phototropin (NPH1) <i>Neurospora crassa</i> Vivid (VVD)	Christie <i>et al.</i> , 1999 Schwerdtfeger & Linden, 2003
Sensors of blue light using FAD (BLUF)	Flavin	<i>Synechocystis</i> PixD (Slr1694) <i>Rhodobacter sphaeroides</i> AppA	Gomelsky & Klug, 2002; Masuda <i>et al.</i> , 2004
Rhodopsine	Retinal	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Channelrhodopsin 2 (ChR2) Humanes Opsin 1 short-wave-sensitive (OPN1SW, S Pigment)	Schneider <i>et al.</i> , 2015 Deeb, 2006
Phytochrome	Bilin-Derivate	<i>Synechocystis</i> PixJ (TaxJ1)	Yoshihara <i>et al.</i> , 2004
B12-Rezeptoren	Cobalamin	<i>Myxococcus xanthus</i> CarH	Pérez-Marín <i>et al.</i> , 2007
Orange Carotenoid Proteins (OCP)	Carotinoid	<i>Synechocystis</i> Slr1963	Wilson <i>et al.</i> , 2008
Xanthopsine	Cumarinsäure	<i>Halorhodospira halophila</i> Photoactivated Yellow Protein (PYP)	McRee <i>et al.</i> , 1986

Neben Beispielen unter den sensorischen Rhodopsinen mit einem Retinal als Chromophor (Luck *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2015) und den Bilin-bindenden, cyanobakteriellen Phytochromen (Yoshihara *et al.*, 2004), finden sich darunter auch CarH (Pérez-Marín *et al.*, 2007; Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011) und die in Cyanobakterien vorkommenden, blau-grün-sensitiven *Orange Carotenoid Proteins* (Nudel & Hellingwerf, 2015). Zu den Familien, die nach bisherigen Erkenntnissen ausschließlich Blaulichtrezeptoren umfassen, gehören die Cumarinsäure-bindenden Xanthopsine sowie drei Klassen, deren prosthetische Gruppe von Riboflavin abgeleitet ist (van der Horst & Hellingwerf, 2004; Losi & Gärtner, 2012). Zu ihnen zählen, neben den bereits genannten Cryptochromen, die *Light Oxygen Voltage* (LOV) Sensoren und die *sensors of blue light using FAD* (BLUF).

Die Photoaktivierung der Flavine basiert auf Redoxreaktionen

Flavine können neben dem vollständig oxidierten und dem vollständig reduzierten Hydrochinon-Zustand auch teilreduzierte Semichinone bilden (Walsh, 1986). Semi- und Hydrochinone existieren abhängig vom Protonierungsgrad der Stickstoffe in Ring II und III in neutralem oder anionischem Zustand. Diese Redoxformen unterscheiden sich charakteristisch in ihren Absorptionsspektren (Abb. I-1).

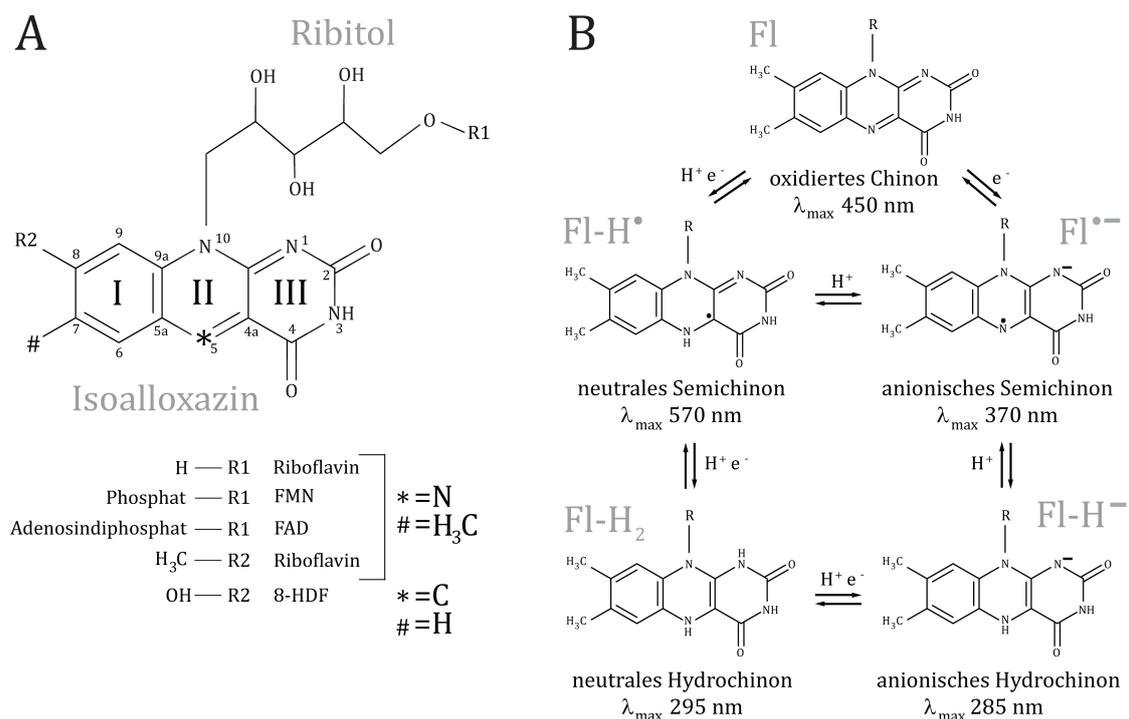


Abb. I-1- Strukturformel von Riboflavin, seinen Derivaten und Redoxzustände des Isoalloxazinringes

A) Riboflavin setzt sich aus dem Ringsystem des Isoalloxazins und der an N10 addierten Ribitylseitenkette zusammen (verändert nach Massey 2000). Durch Erweiterung der Zuckerkette (R1) entstehen FMN und FAD. Das auch als Antennenpigment auftretende 8-HDF (Essen & Klar 2006) besitzt im Gegensatz zu Riboflavin ein Kohlenstoffatom an Position 5 des Ring II, während die Methylgruppe an C7 entfernt, und die von C8 gegen eine Hydroxy-Gruppe ausgetauscht ist. Es ist Vorläufer des Coenzym F₄₂₀. B) Flavine (Fl) bilden fünf biologisch relevante Redoxzustände (verändert nach Senda *et al.* 2009). Jeder Zustand zeichnet sich durch charakteristische Absorptionseigenschaften aus (Ghisla 1980). R = Ribityl-Rest

I. Einleitung

In allen Zuständen stellen die Atome N5 und C4a des Isoalloxazins (Abb. I-1.B) die reaktivsten dar und bieten entsprechend eine Möglichkeit für nukleo- oder elektrophile Angriffe (Senda *et al.*, 2009). So kann durch Übertragung von Elektronen und Protonen aus der Proteinumgebung die Photoaktivierung betrieben werden. Nachfolgend werden kovalente Bindungen ausgebildet oder das Wasserstoffbrückennetzwerk um den Kofaktor neu geordnet. Jede der Flavin-bindenden Photorezeptorfamilien zeigt dabei eine einzigartige Reaktionsfolge: In LOV-Domänen weist der Grundzustand ein oxidiertes FMN auf, welches nach Lichtaktivierung in ein kovalentes Flavin-C4a-Cysteinyl-Addukt übergeht (Zoltowski & Gardner, 2011). Innerhalb der Cryptochromfamilie wird hingegen ein Signalzustand mit neutralem Flavinsemichinon (FADH•) diskutiert (Möglich *et al.*, 2010), wobei zusätzlich eine grünlichtgetriebene sekundäre Photochemie möglich ist (Liu *et al.*, 2010). Die BLUF-Domänen bilden unter den Flavophotorezeptoren eine Ausnahme. Ihr Chromophor befindet sich sowohl im Grund- als auch im Signalzustand in oxidiert Form (Kennis & Mathes, 2013).

I.2 Die Familie der BLUF-Photorezeptoren

Das erste entdeckte BLUF-Protein stammt aus *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. Es wurde erst mit dem Nachweis von FAD in seiner Amino-terminalen Domäne als Blaulichtphotorezeptor identifiziert (Gomelsky & Kaplan, 1998). Gomelsky und Klug ordneten später potenzielle Gene der neuen Familie BLUF zu (Gomelsky & Klug, 2002). In demselben Jahr beschrieben Iseki *et al.*, 2002 eine BLUF-kontrollierte Adenylatcyclase in *Euglena gracilis* (EuPAC, oder EgPAC, *Euglena's photoactivated adenylatcyclase*) und damit den ersten Vertreter dieser Photorezeptorfamilie aus einem Eukaryoten. Dieser und andere Sensoren aus *Naegleria gruberi* (nPACs) (Stierl, 2013; Tanwar *et al.*, 2014; Penzkofer *et al.*, 2014), *Naegleria australiensis* und *Naegleria fowleri* (Yasukawa *et al.*, 2013), sind die bisher einzigen nachweislich funktionalen, eukaryotischen Vertreter. Die Pfam Datenbank (*Protein Family Database*; Finn *et al.*, 2016) führt für einige weitere Eugleniden und wenige Basidiomyceten (u.a. *Ustilago maydis*, Brych *et al.*, 2015) putative BLUF-Domänen. Seit Beginn 2016 werden außerdem Sequenzen aus vier Metazoen dazu gerechnet. Ihre putativen Genprodukte scheinen jedoch, ähnlich wie das aus *Rubellimicrobium mesophilum* MSL-20 stammende Protein (Penzkofer *et al.*, 2016) aufgrund fehlender konservierter Reste nicht funktional zu sein. Da die meisten der bisher gefundenen Loci aus Vertretern der *Proteobacteria* stammen, sind BLUF-Domänen eher prokaryotischen Ursprungs und wurden durch Endosymbiosen oder horizontalen Gentransfer in eukaryotische Organismen übertragen (Mandalari *et al.*, 2013).

Die bisher gelösten Röntgenkristallstrukturen sieben verschiedener Proteine [TePixD Kita *et al.*, 2005; AppA Anderson *et al.*, 2005; Winkler *et al.*, 2013; (Sy)PixD Yuan *et al.*, 2006, BlrB Jung *et al.*, 2005, BlrP1 Barends *et al.*, 2009; OaPAC Ohki *et al.*, 2016 und bPAC Lindner *et al.*, 2017] zeigen eine hoch konservierte Ferredoxin-ähnliche Faltungsfolge mit $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta$ Motiv (Anderson *et al.*, 2005). Dagegen sind die Sequenzhomologie mit 20 % und die Anzahl strikt konservierter Reste mit 12 Aminosäuren vergleichsweise gering (Gomelsky & Klug, 2002; Park & Tame, 2017).

Sie existieren fast ausschließlich in der Chromophor-Bindetasche (Abb. I-2), die zwischen dem 5-strängigen β -Faltblatt und den zwei aufliegenden, parallel verlaufenden α -Helices entsteht (Abb. I-3). Darin wird der Kofaktor am Isoalloxazinring und an der Ribitylseitenkette nicht-kovalent gebunden. BLUF-Domänen inkorporieren daher neben dem natürlichen Chromophor FAD, unter limitierenden Bedingungen in der rekombinanten Überexpression, auch seine Vorläufer Riboflavin oder FMN (Mathes, 2008; Schroeder *et al.*, 2008; Penzkofer *et al.*, 2014). Fourier-Transformation Infrarot-spektroskopische (FT-IR) Untersuchungen an AppA zeigten allerdings keine strukturellen Unterschiede zwischen Proteinproben, die ausschließlich mit Riboflavin, FMN oder FAD rekonstituiert wurden (Masuda *et al.*, 2005b). Die Bindungstasche von PixD erlaubt zudem den Einbau von Roseoflavin (Mathes *et al.*, 2009).

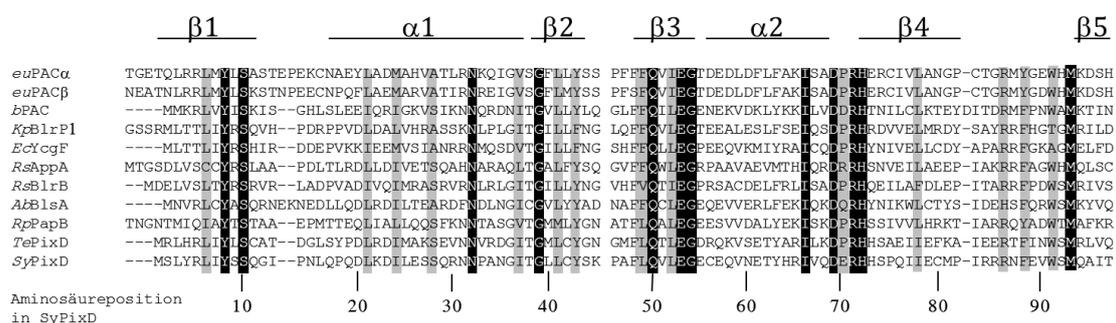


Abb. I-2 - Vergleich der Aminosäuresequenzen von 11 intensiv studierten BLUF-Kerndomänen

Gezeigt ist die Abfolge der Sekundärstrukturelemente. Die Aminosäurepositionen beziehen sich auf (Sy)PixD. Der Sequenzvergleich zeigt die hohe Variabilität der BLUF-Domänen mit nur wenigen, hauptsächlich mit dem Chromophor interagierenden, konservierten Resten (schwarz unterlegt). Grau unterlegt = semi-konserviert. Angefertigt mit ClustalW, Protein Weight Matrix: Blosum

Die kurze Kernstruktur der Chromophor-Bindetasche aus etwa 90 bis 100 Aminosäuren wird von einer oder zwei weiteren Helices am Carboxy-Terminus ergänzt. Sie können zu den N-terminalen Helices parallel oder, wie im Beispiel von PixD, senkrecht (Abb. I-3) angeordnet sein und dienen der Übertragung des Stimulus auf den Effektor (Ren *et al.*, 2012).

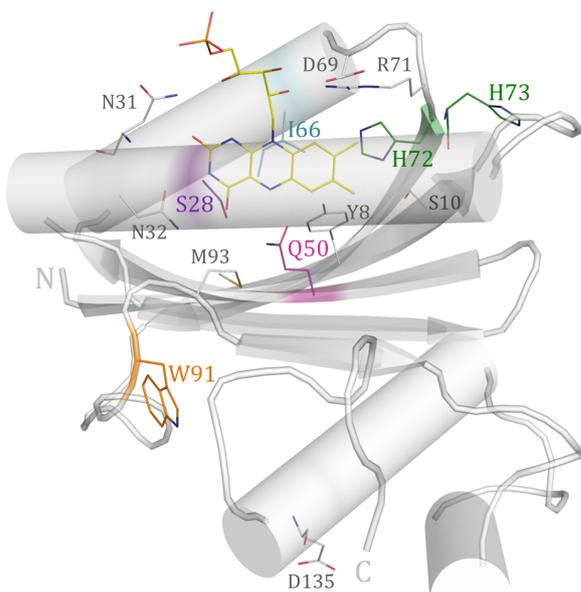


Abb. I-3 - Tertiärstruktur von PixD

In der Tertiärstruktur wird die Chromophor-Bindetasche zwischen den α -Helices und dem 5-strängigen β -Faltblatt sichtbar. Neben dem Flavin-Kofaktor (hier FMN) sind Aminosäureseitenketten mit erwiesener oder putativer Beteiligung an Photochemie und Signaltransduktion gezeigt. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die farblich hervorgehobenen Positionen 50, 91 sowie 72 und 73. PDB Eintrag 2HFN, Kette A Yuan *et al.*, 2006 (Protein Data Bank des Research Collaboratory for Structural Bioinformatics RCSB), PyMOL

I. Einleitung

Eine Einteilung in kurze und komplexe BLUF-Rezeptoren

Sowohl AppA als auch euPAC α und - β gehören zu den sogenannten „komplexen“, den Multidomänen BLUF-Proteinen (Gomelsky & Klug, 2002). Weitere bekannte Vertreter sind die aus *Beggiatoa sp.* stammende Adenylatzyklase bPAC (Stierl *et al.*, 2011) [auch als BlaC (Ryu *et al.*, 2010) oder BsPAC (Yasukawa *et al.*, 2012) beschrieben], LiPac und TpPAC aus *Leptonema illini* und *Turneriella parva* (Penzkofer *et al.*, 2014; Penzkofer *et al.*, 2015), die in *Oscillatoria acuminata* vorkommende OaPAC (Ohki *et al.*, 2016) sowie die von *Klebsiella pneumoniae* exprimierte Phosphodiesterase BlrP1, die zyklisches Diguanylatmonophosphat (c-di-GMP) abbaut (Tyagi *et al.*, 2008). YcgF (auch als Blrp beschrieben, Rajagopal *et al.*, 2004) besitzt, im Gegensatz zu BlrP1, eine nicht-funktionale Phosphodiesterase-Domäne. Daher übermittelt es das Lichtsignal, ebenso wie die „kurzen“ BLUF-Vertreter, durch Protein-Protein-Interaktion (Tschowri *et al.*, 2009).

BLUF-Domänen mit nur kurzem C-terminalen Anhang stellen mit 64 % Anteil die am häufigsten vorkommende Variante dar (Losi *et al.*, 2014). Neben dem aus dem mesophilen *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 isolierten TePixD (Tll0078, Kita *et al.*, 2005), gehören hierzu das ebenfalls aus *R. sphaeroides* stammende BlrB, sowie PapB, BlsA, ACIAD1499/2125/2129 und PixD. Sie leiten den Lichtstimulus vermutlich durch Protein-Protein-Interaktionen weiter. Für BLUF-DNA-Interaktionen oder der von Jung *et al.*, 2005 postulierten Erkennung des exponierten Adeninanteils durch ein Nukleotid-bindendes Protein existieren dagegen bisher keine Hinweise. Allerdings gelang bisher nur für PixD und PapB die Identifizierung der Interaktionspartner. So reguliert PapB den Abbau sekundärer Botenstoffe durch die Phosphodiesterase PapA, wodurch die Funktion des PapAB-Komplexes der von BlrP1 ähnelt. Kanazawa *et al.*, 2010 fanden durch Ko-elution eine lichtunabhängige Interaktion der isolierten Proteine PapA und PapB. Dies könnte auf die evolutionäre Spaltung einer einstigen Fusion, für die getrennte transkriptionelle Kontrolle beider Untereinheiten, hindeuten. Gingen kurze BLUF-Proteine aus ursprünglich komplexen Rezeptoren hervor, sind möglicherweise Teile der Signaltransduktion noch konserviert. Dann ließe sich ein allgemeingültiger Mechanismus aus Analysen eines kurzen BLUF-Vertreters ableiten. Wegen der häufigen Kopplung mit di-Guanylatzyklase- (GGDEF Motiv) und Phosphodiesterase-Domänen, (EAL Motiv) sowie der Verwandtschaft zwischen Guanylat- und Adenylatzyklasen (Pei & Grishin, 2001) ist ein ursprüngliches BLUF-Protein als blaulichtgesteuertes GGDEF-EAL-Protein denkbar.

Für eine Konservierung der Effektoraktivierung innerhalb der komplexen beziehungsweise (bzw.) kurzen BLUF-Domänen existieren bereits Hinweise. Han *et al.*, 2004 ersetzten die natürliche BLUF-Domäne von AppA durch die lichtsensitive Domäne von euPAC α 1 und stellten mit dem Fusionskonstrukt die Photopigmentsynthese in *appA* defizienten *R. sphaeroides* Mutanten wieder her. Zumindest *in vitro* behält auch eine Chimäre aus der BLUF-Kerndomäne von PixD und dem C-Terminus von PapB seine Interaktion mit der Phosphodiesterase PapA bei (Ren *et al.*, 2012). Darüber hinaus bewiesen Han *et al.*, 2004, dass trotz getrennter Expression der BLUF- und Effektor-Domäne von AppA eine Übertragung des Lichtsignals auf den abgekoppelten

C-Terminus erfolgt. Ob umgekehrt für die „kurzen“ Beispiele eine Fusion mit dem Interaktionspartner ein funktionales Konstrukt erzeugt, ist bisher nicht experimentell belegt worden. Eine Evolution verschiedener Mechanismen für die Freisetzung des Effektors unter den kurzen BLUF-Proteinen deuten PixD und TePixD, trotz der hohen Sequenzhomologie, an. So zerfällt TePixD nach Aktivierung von einer Untereinheit in ein Pentamer (Kuroi *et al.*, 2013, 2015), wohingegen das Decamer von PixD in 5 Dimere dissoziiert (Tanaka *et al.*, 2011).

BLUF-Proteine als Schalter zwischen Lebensweisen

Die physiologischen Funktionen der bisher untersuchten BLUF-Proteine können in zwei Gruppen eingeteilt werden (Abb. I-4) (Gomelsky & Hoff, 2011; Kennis & Mathes, 2013), die unabhängig von der kovalenten Verbindung mit einer Effektor-Domäne sind. Die Funktion der ersten Gruppe ließe sich als Schalter beschreiben wie dies für AppA erstmalig berichtet wurde (Braatsch *et al.*, 2002). Es ist zusammen mit seinem Interaktionspartner PpsR durch die Regulation von Photosynthese-Genen an der Kontrolle des Übergangs zwischen phototrophem und heterotrophem Metabolismus von *R. sphaeroides* beteiligt. Vergleichbar ist auch die Umschaltung zwischen motilem und sessilem Stadium, in die andere BLUF-Rezeptoren involviert sind. Hierzu zählt das aus *Escherichia coli* stammende YcgF. Zusammen mit seinem Effektor YcgE reguliert es Loci, welche über die Kontrolle eines *Phosphorelay*-Systems die Ausbildung von Curli Fimbrien inhibieren, sowie die Synthese der Colansäure und eine erhöhte Säureresistenz aktivieren (Tschowri *et al.*, 2009). Tschowri *et al.*, 2009 schrieben YcgF-YcgE daher eine Funktion bei der Reifung des Biofilms zu. Eine ähnliche Funktion von BLUF-Proteinen wurde auch in anderen Organismen beobachtet. Unter Anderem zeigt das opportunistische Humanpathogen *Acinetobacter baumannii* eine blaulichtabhängige Ausbildung von Biofilmen, bei der BlsA als Regulator dieses Virulenzfaktors gefunden wurde (Mussi *et al.*, 2010). Auch Sessilität des nicht-infektiösen *Rhodospseudomonas palustris* wird von einem BLUF-Protein kontrolliert. Hier verstärkt PapB die Degradation c-di-GMP mit Bindung der Phosphodiesterase PapA, wodurch die Formation von Biofilmen inhibiert wird (Kanazawa *et al.*, 2010). Biofilme weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika und Reinigungsmitteln auf (Mah & O'Toole, 2001), außerdem schützt die den Bakterienrasen umhüllende Matrix innerhalb eines Wirtes vor Angriffen des Immunsystems (Leid, 2009). Daher stellen sie einen kritischen Aspekt in der Nahrungsmittelindustrie (Kumar & Anand, 1998), der Medizin (Hall-Stoodley *et al.*, 2004), und bei biotechnologischen Anwendungen dar (Rosche *et al.*, 2009). Ein detailliertes Verständnis für die zur Biofilmbildung beitragenden Umweltfaktoren und den sie wahrnehmenden Rezeptoren kann neue Ansätze zur Prävention, Bekämpfung und Nutzung liefern. So wäre etwa eine Reduktion von Biofilmen auf Oberflächen durch Bestrahlung mit blauem Licht denkbar.

Der Wechsel zwischen amöboider und flagellarer Lebensweise von *N. gruberi* (Fulton & Dingle, 1967), fakultative Pathogenität unter *N. fowleri* oder *N. australiensis* (Scaglia *et al.*, 1983), und die Bildung filamentöser Matten durch *Beggiatoa sp.*, die abhängig von Sauerstoff, Schwefel und Lichtangebot migrieren, (Møller *et al.*, 1985), lassen auch für die PACs eine Beteiligung an der Anpassung an Umweltbedingungen oder an der Phototaxis vermuten.

I. Einleitung

Interessanterweise integrieren einige der genannten BLUF-Proteine mehrere Stimuli in ihre Signalwege. Beispielsweise reguliert *E. coli* die Expression von YcgF temperaturabhängig (Tschowri *et al.*, 2009) und auch die blaulichtinduzierte *Twitching* Motilität von *A. baylyi* ist wärmesensitiv (Bitrian *et al.*, 2013). Nur in dem Licht- und Sauerstoff-wahnehmenden AppA wird die Wahrnehmung des zweiten Reizes durch Addition einer zusätzlichen Sensordomäne realisiert (Gomelsky & Kaplan, 1998; Braatsch *et al.*, 2002; Masuda & Bauer, 2002).

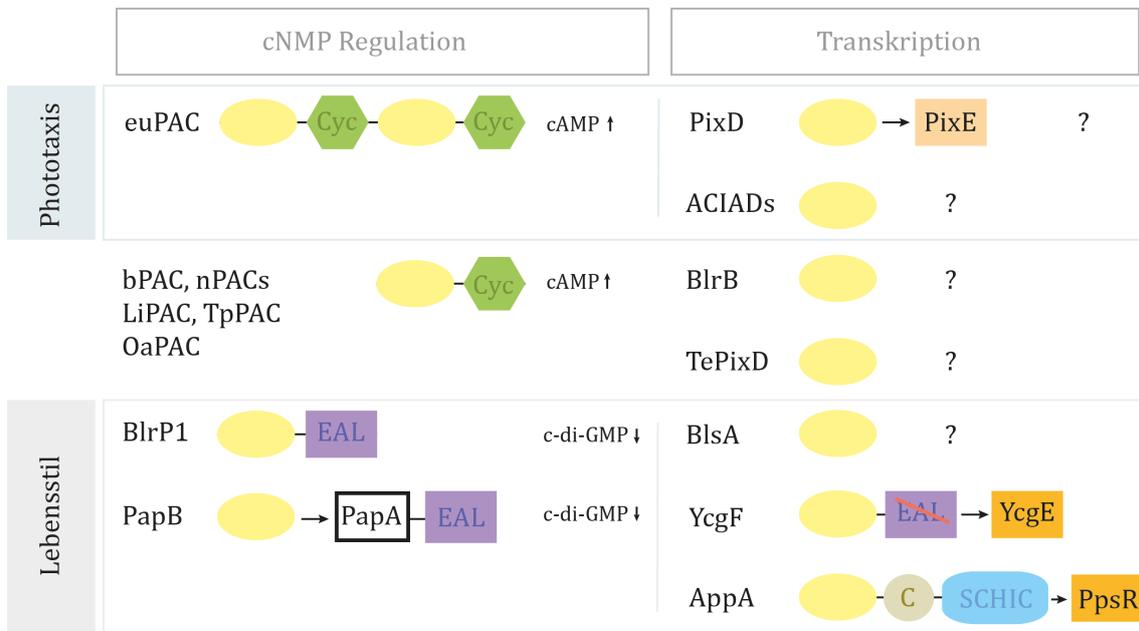


Abb. I-4 – Physiologische Funktion bisher untersuchter, natürlich vorkommender* BLUF-Proteine

Für einige Vertreter sind aktuell weder der Interaktionspartner noch der kontrollierte Signalweg bekannt. Unter Extrapolation der bisherigen Erkenntnisse lassen sich jedoch zwei Cluster aus Regulatoren sekundärer Botenstoffe und Repressoren von Transkriptionsfaktoren vermuten. Die vorliegenden Daten implizieren außerdem zwei funktionelle Gruppen. Eine die Phototaxis regulierende, und eine die Anpassung des Lebensstils regulierende. Gelbe Ellipse = BLUF-Domäne; C = Cystein-reiche Domäne; Cyc = Zyklase-Domäne; EAL = Phosphodiesterase-Domäne, deren fehlende Funktionalität in YcgF als roter Strich symbolisiert ist; SCHIC = Sauerstoffsensordomäne *sensor containing heme instead of cobalamin* (SCHIC) (Moskvin *et al.*, 2007)
*RmPAE aus *R. mesophilum* ist als genetisch verändertes BLUF-Protein (Penzkofer *et al.*, 2016) hier nicht aufgeführt.

Phototaxis regulierende BLUF-Rezeptoren

Im Gegensatz zur Regulation der Biofilmbildung kontrolliert die zweite Gruppe von BLUF-Rezeptoren die Phototaxis in verschiedenen Spezies (Kennis & Mathes, 2013) (Abb. I-4). So kann für *Acinetobacter baylyi* unter Blaulicht bei 24°C eine erhöhte Motilität beobachtet werden, an deren Auslösung gleich drei BLUF-Proteine (ACIAD1499/2125/2129) beteiligt sind (Bitrian *et al.*, 2013). Auch der *E. gracilis* BLUF-Rezeptor ist für lichtregulierte Bewegung verantwortlich. Ein Heterotetramer aus je zwei Untereinheiten euPAC α und - β steuert hier die photophobische Antwort bei Zunahme der Lichtintensität (*step-up response*) (Ntefidou *et al.*, 2003). Ein weiteres Beispiel repräsentiert PixD, welches in *Synechocystis* für die Orientierung zu rotem Licht verantwortlich gemacht wird (Okajima *et al.*, 2005; Masuda *et al.*, 2008).

Die Rolle von PixD in der Phototaxis von Synechocystis

Das einzellige Cyanobakterium *Synechocystis* dient unter anderem als Modellorganismus für Photosynthese und *Twitching* Motilität. Wie in vielen weiteren Cyanobakterien wird diese Bewegungsform durch die Ausbildung von Typ IV Pili ermöglicht (Yoshihara & Ikeuchi, 2004). Die Zellen können mit einer Geschwindigkeit von bis zu 2 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Choi *et al.*, 1999; Burriesci & Bhaya, 2008) über feste Oberflächen gleiten und dabei ungerichtete Photokinese, Photophobie sowie gerichtete positive und negative Orientierung ausführen (Bhaya *et al.*, 2001; Jékely, 2009). Die spektrale Sensitivität der Zellen zeigt Maxima bei (-)360, (-)470, (+)500, (+)645 und (-)704 nm, und ist abhängig von der Lichtintensität (Ng *et al.*, 2003; Okajima *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2011). Einige für Phototaxis benötigte Photorezeptoren wurden durch Sequenzvergleiche und Analysen von Deletionsmutanten im Isolat 6803 der *Pasteur Culture Collection* (PCC 6803) und Derivaten identifiziert (Ng *et al.*, 2003; Fiedler *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2011; Narikawa *et al.*, 2011). Nach bisherigen Erkenntnissen sind Vertreter der Cryptochrome, cyanobakteriellen Phytochrome und BLUF-Proteine beteiligt. Modelle des Signaltransduktionsnetzwerkes beziehen allerdings weitere putative Rezeptoren mit ein. So wurde von Terauchi und Ohmori, 2004 ein UV/Blaulicht-absorbierendes Flavoprotein als Aktivator der Adenylatzyklase Cya1 postuliert, da die Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) durch Zugabe von Phenyllessigsäure, welche irreversibel an das Flavin N5 bindet (Hemmerich *et al.*, 1967), inhibiert wird. Okajima *et al.*, 2005 fügten ihrem Modell aufgrund der Rotlichtaffinität von *Synechocystis* einen entsprechenden Rezeptor hinzu. Dagegen äußerten Sugimoto *et al.*, 2016 kürzlich, dass ein lichtabhängiger Metabolismus anstelle eines Photorezeptors für die Lokalisation einer Lichtquelle verantwortlich sein könnte.

Abb. I-5 führt die verschiedenen Signaltransduktionsmodelle zusammen und veranschaulicht die hohe Komplexität der phototaktischen Antwort. Das BLUF-Protein PixD fungiert in diesem Netzwerk als Repressor des PatA-ähnlichen *Response* Regulators PixE, der in *Yeast-Two-Hybrid* Experimenten als direkter Interaktionspartner identifiziert wurde (Okajima *et al.*, 2005). Yuan und Bauer, 2008 zeigten später die lichtabhängige Dissoziation eines PixD₁₀-PixE₅-Komplexes *in vitro*, durch analytische Ultrazentrifugation und isothermale Titrationskalorimetrie. Dagegen deuten *Blue native* PAGE Analysen von Ren *et al.*, 2013 auf einen Superkomplex aus zehn PixD- und vier PixE-Monomeren hin. In Abwesenheit von PixE liegt PixD in einem Equilibrium zwischen Dimer und Decamer vor (Abb. I-6.D, A). Durch Bindung von PixE wird das Gleichgewicht zu Gunsten des Multimers verschoben (Yuan & Bauer, 2008; Tanaka *et al.*, 2012). Ren *et al.*, 2013 zeigten in Sequenzvergleichen, dass der *Receiver* Domäne von PixE essenzielle Phosphorylierungsstellen fehlen und keine DNA-Bindemotive vorkommen, weshalb sie Protein-Protein-Interaktion als nachfolgenden Mechanismus postulierten. Über die Funktion von PixE und den nachfolgenden Signalweg bis zur Kontrolle der Phototaxis, ist nichts weiteres bekannt. Es konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass PixD die Adenylatzyklase Cya1 reguliert (Masuda & Ono, 2004).

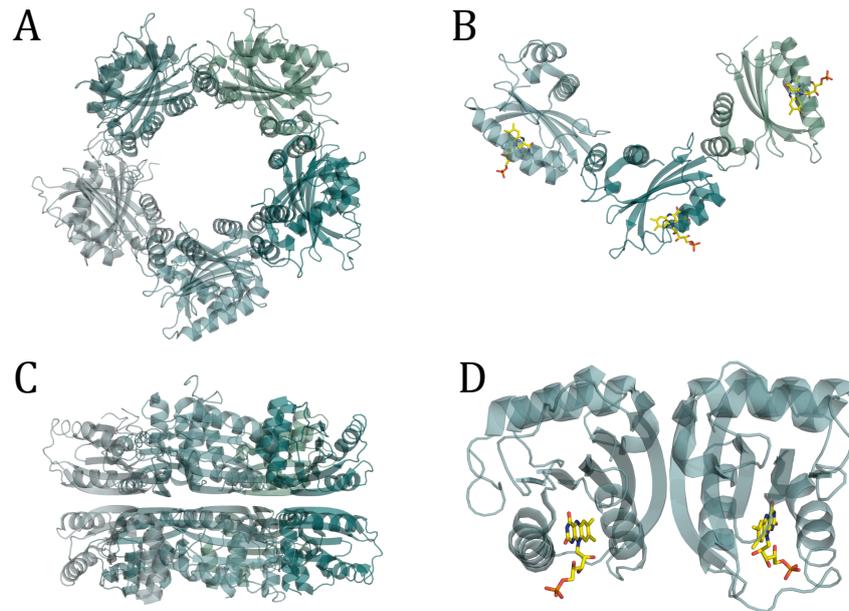


Abb. I-6 – Kristallstruktur des decameren Komplexes von PixD

A, C) zeigen die Frontal- und Seitenansicht auf den vollständigen Komplex. Dimer und Decamer existieren im Gleichgewicht (Tanaka *et al.*, 2011), welches Licht zu Gunsten des Dimers verschiebt. Laut *Docking-Simulationen* binden zwei Monomere PixE an einem PixD Pentamer-Ring (Ren *et al.*, 2013). In B) und D) sind die für die Ausbildung des Multimers erforderlichen Interaktionsstellen an jedem Monomer hervorgehoben. Hierfür sind insbesondere die β -Faltblätter (D), aber auch die C-terminalen Helices und die Linkerregion zwischen $\beta 4$ und $\beta 5$ (B) bedeutsam, in der W91 lokalisiert ist (Abb. I-2). PyMOL, PDB Eintrag 2HF0, Yuan *et al.*, 2006

Die BLUF-Photoaktivierung

Wie in Abschnitt I.1 beschrieben führt eine Lichtabsorption in vielen Photorezeptoren zu einer strukturellen Änderung am Chromophor. Entsprechend unterscheiden sich aktiver und inaktiver Zustand signifikant in ihren Absorptionseigenschaften. Da FAD in BLUF-Domänen jedoch sowohl im Grund- als auch im Signalzustand in seiner oxidierten Form vorliegt, ist die nach Belichtung beobachtbare Veränderung auf eine Reduktion der Fluoreszenzemission und eine Verschiebung der S_0 - S_1 und S_0 - S_2 Absorptionsbanden des Flavins um 10 - 15 nm zu höheren Wellenlängen beschränkt (Kraft *et al.*, 2003; Masuda *et al.*, 2004). Dieser bathochrome Effekt war zunächst der einzige Hinweis auf eine lichtinduzierte Konformationsänderung, wobei Tieftemperatur-Experimente (Fukushima *et al.*, 2005, 2007) und Absorptionsspektren von Proteinkristallen (Jung *et al.*, 2006) darauf hindeuten, dass die Gesamtverschiebung aus zwei Teilschritten mit je etwa 5 nm besteht. Röntgenkristallstrukturen sowie spektroskopische Analysen unterstützen die Hypothese, dass die lichtinduzierten Änderungen der Tertiärstruktur in BLUF-Domänen auf der beobachteten Zeitskala von Femto- bis Microsekunden sehr gering ausfallen oder mittels dieser Methoden nicht aufgelöst werden können (Gauden *et al.*, 2005). Erste Untersuchungen an AppA deuteten an, dass der Signalzustand ohne Auftreten weiterer Intermediate nach 10 ns aus dem einfach angeregten Zustand hervorgeht (Gauden *et al.*, 2005). Im Gegensatz zur Photochemie der LOV-Domänen stellt die Tripletbildung in der BLUF-Familie nur eine unproduktive Nebenreaktion dar, deren Ausbeute maßgeblich durch die Konformation von W91 beeinflusst wird (Mathes *et al.*, 2011).

I. Einleitung

Die Ausbildung des rotverschobenen Zustandes wurde bis dahin auf verstärkte aromatische Interaktionen zwischen dem Flavin und Proteinseitenketten, vor allem Y8, und der anschließenden Umordnung des Wasserstoffbrückennetzwerkes um den Kofaktor zurückgeführt (Kraft *et al.*, 2003). Gauden *et al.*, 2005 diskutierten allerdings bereits die Möglichkeit eines Radikal-Paar-Mechanismus, dessen Rekombinationsrate jedoch zu schnell für eine Detektion wäre. Nachfolgende Untersuchungen an PixD bestätigten diese Annahme durch Beobachtung von Intermediaten mit spektroskopischen Charakteristika anionischer und neutraler Semichinone auf der Picosekundenzeitskala (Gauden *et al.*, 2006). In Kombination mit Ergebnissen von Mutationsstudien und IR-Spektroskopie wurde ein Modell-Photozyklus entwickelt, dessen Grundprozesse bereits Hasegawa *et al.*, 2005 vorschlugen (Abb. I-7). Nach dieser These bildet das Flavin-N5 im Dunkelzustand Wasserstoffbrücken mit der Hydroxygruppe von Y8 und dem Seitenketten-Amid von Q50. Die Anregung des Chromophors induziert eine Erhöhung des Redoxpotenzials, wodurch dem Y8 ein Elektron entzogen wird (Bonetti *et al.*, 2008; Shibata *et al.*, 2009). Das entstehende anionische Flavinsemichinon wirkt als Base und akzeptiert ein Proton aus der Proteinumgebung, wobei Y8 ein möglicher Donor ist (Bonetti *et al.*, 2008). Der zentrale Prozess stellt damit einen gekoppelten Protonen-Elektronen-Transfer (engl. *proton coupled electron transfer* PCET) dar, der eine Ladungstrennung erzeugt (Kennis & Mathes, 2013). PCET ist ein ubiquitäres Reaktionsschema, das in essenziellen Prozessen wie denen des Photosystems II, der Respiration und der DNA-Reparatur vorkommt und der Vermeidung von hoch-energetischen Intermediaten oder dem Transport von Elektronen und Protonen über große Distanzen dient (Weinberg *et al.*, 2012). Mit Entstehung des Flavin-Tyrosyl-Radikalpaares würden die Interaktionen zu Q50 aufgehoben und die Seitenkette erhalte konformationelle Freiheit. In Übereinstimmung mit der auf der Kristallstruktur der AppA BLUF-Domäne basierenden Annahme von Anderson *et al.*, 2005 postulierten Gauden *et al.*, 2006 eine Rotation des Glutamins um 180°. Eine Glutamin-Rotation soll auch während der intramolekularen Signaltransduktion der LOV-Domänen auftreten, fände dort jedoch in der Proteinperipherie statt (Nash *et al.*, 2008).

Mit Wiederherstellung des oxidierten Flavins durch Rekombination der Radikalpaare würde die Ausbildung des rotverschobenen Zustandes abgeschlossen. Er wiese infolge der Rotation des Q50 Wasserstoffbrücken zwischen der Carbonylgruppe des Glutamins und Y8 auf, sowie eine neue Interaktion der Q50 Amidgruppe zu dem Flavin C4=O4 und N5. Die Quantenausbeute des Signalzustandes verschiedener BLUF-Domänen variiert zwischen 0,24 bis 0,9 (Losi, 2007). Sie korreliert unter anderem mit der konkurrierenden Triplettbildung und ist zumindest in BlrB auch durch die Bindung von RF, FMN oder FAD beeinflusst. Hier zeigten Untersuchungen eine Verdopplung der Quantenausbeute, wenn das Protein vollständig mit FAD rekonstituiert wurde (Zirak *et al.*, 2006; Losi, 2007). Ein sättigender FAD-Austausch beeinflusste die Quantenausbeute von PixD allerdings kaum (Zirak *et al.*, 2007b).

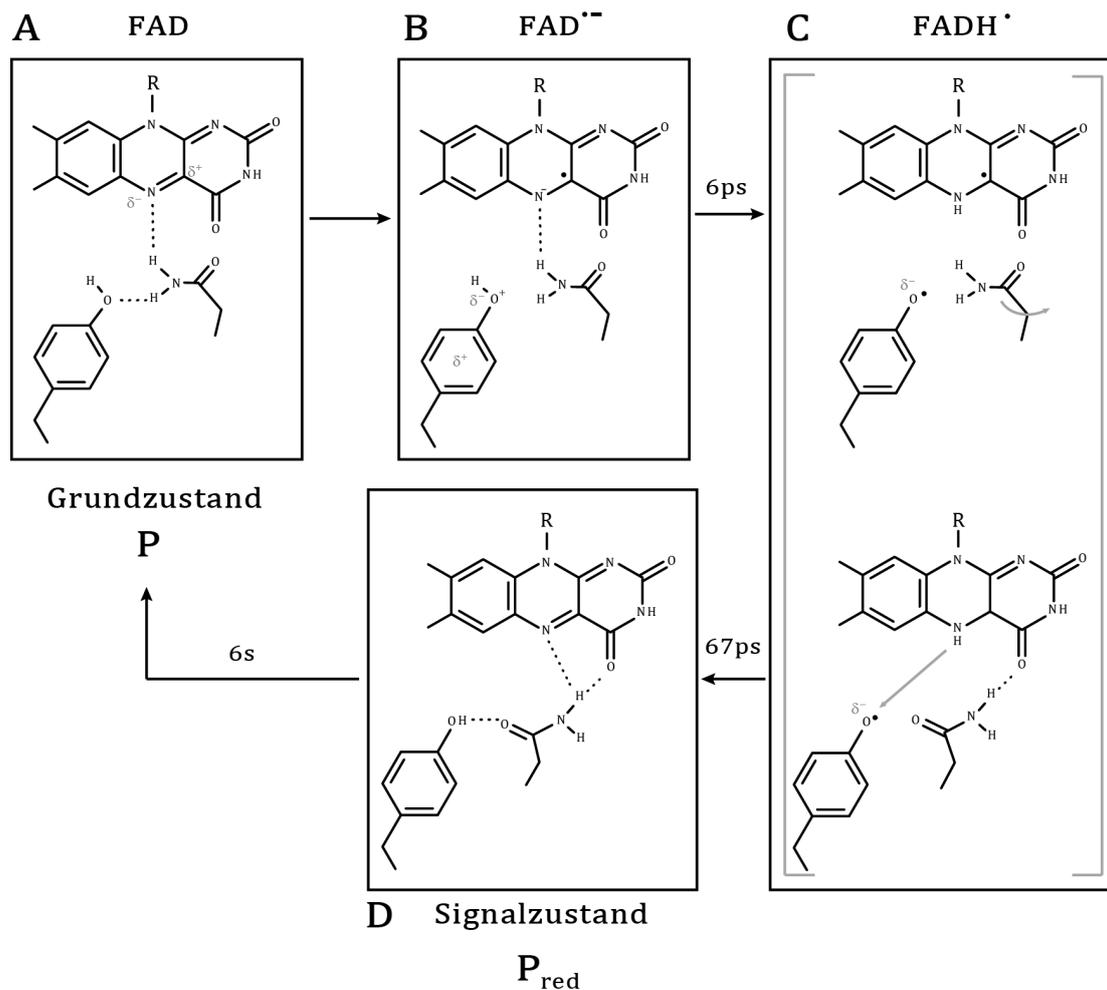


Abb. I-7 – Möglicher Photozyklus der BLUF-Domänen am Beispiel von PixD (Slr1694)

Nach Anregung mit blauem Licht konnte mit Hilfe transients IR- und UV/vis-Spektroskopie die Entstehung des anionischen (B) und neutralen Semichinons (C) aus dem angeregten Zustand (A) beobachtet werden. Hierfür wird zunächst dem Y8 ein Elektron entzogen, gefolgt von einer Protonierung des Flavins an N5. Mit Deprotonierung des Flavins wird der rotverschobene Zustand (D) „Slr_{RED}“ gebildet. Der Signalzustand relaxiert im Fall von PixD innerhalb mehrerer Sekunden thermal in den Grundzustand zurück. Die Ladungstrennung in den Intermediaten des Photozyklus soll zur Aufhebung der Wasserstoffbrückeninteraktion zwischen Q50, Y8 und Flavins N5 sowie O4 führen und damit eine Neuorientierung des streng konservierten Glutamins („Q50 flip“) ermöglichen. Abbildung nach Bonetti *et al.*, 2008

Grund- und Signalzustand der BLUF-Domänen

Das Modell nach Anderson *et al.*, 2005 und Gauden *et al.*, 2006 beinhaltet im Dunkelnzustand eine Orientierung der Carbonyl-Sauerstoffe von Flavins-C4 und dem Q50 in kurzer Distanz von 3,1 Å zueinander (Abb. I-8), welche aufgrund der elektrostatischen Abstoßung kein Energieminimum einer relaxierten Konformation darstellen sollte (Domratheva *et al.*, 2008). Stelling *et al.*, 2007 fiel in ultraschnellen IR-spektroskopischen Untersuchungen ein Signal bei 1666 cm⁻¹ auf. Sie ordneten diese Signatur dem strikt konservierten Glutamin zu. Überlagernde Flavinsignaturen erschwerten die Identifizierung des zugehörigen Lichtzustandsignals, welches bei 1686 cm⁻¹ vermutet wurde.

I. Einleitung

Eine mögliche Interpretation für diese putative Zunahme der Seitenkettenschwingungsfrequenz ist eine Amid-Imidsäure-Tautomerisierung des Q63, wobei die Imidsäure durch die Proteinumgebung stabilisiert würde (Stelling *et al.*, 2007). Dieses Reaktionsmodell löst die oben genannte Diskrepanz und wurde nachfolgend von theoretischen Kalkulationen gestützt (Sadeghian *et al.*, 2008, 2010). Eine zusätzliche Rotation des Glutamins wurde jedoch nicht gänzlich abgelehnt (Domratcheva *et al.*, 2008; Udvarhelyi & Domratcheva, 2013). Das Resonanz-Raman-Spektrum der dunkeladaptierten AppA-126 Q63L Mutante, welches dem des Wildtyps gleicht, schloss dabei eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Q63 und C404 im Grundzustand aus (Unno *et al.* 2006).

An der Ausbildung der aktiven BLUF-Proteinkonformation sind nach bisherigen Erkenntnissen auch W91 und M93 beteiligt. Sie werden direkt mit Umordnungen am Strang 5 des β -Faltblattes, der β 4 β 5-Schleife und der C-terminalen α -Helices verknüpft, die zu einer Zunahme des hydrodynamischen Radius des Proteins führen (Kraft *et al.*, 2003; Wu & Gardner, 2009; Tanaka *et al.*, 2011). Besonders umstritten ist dabei die Theorie eines Positionswechsels zwischen W91 und M93, der an eine Registerverschiebung zwischen den Faltblattsträngen β 2 und β 5 gebunden ist. Beide Reste kommen sowohl in lösungsmittlexponierter als auch dem Flavin zugewandter Form in den Röntgenkristallstrukturen vor (Anderson *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2006) und erfahren damit die deutlichste strukturelle Umordnung. Allerdings ist unklar, ob die Kristallstrukturen eine reale Proteinkonformation abbilden, und ob darunter einige Monomere den Dunkel- oder Lichtzustand widerspiegeln.

Während M93 unter allen bekannten BLUF-Domänen hoch konserviert ist und Mutationsstudien einheitlich einen Pseudo-Lichtzustand erzeugen, ist das Tryptophan nicht strikt konserviert (z.B. in YcgF und BlrP1, Abb. I-2) und eine W91A Substitution bleibt ohne Wirkung auf die physiologische Aktivität von PixD (Stierl, 2007; Masuda *et al.*, 2008; Mathes, 2008). Neben W91 und M93 wurden auch zwei Reste der α 1-Helix in den Photozyklus eingebunden, N32 und S28 (PixD Zählung, Abb. I-3). Austausch des N32 gegen Alanin führt zu einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsspektrums und beschleunigt die Dunkelrelaxation (Kita *et al.*, 2005), ist aber in PixD nicht möglich (Mathes, persönliche Mitteilung). Auch die Substitution des semi-konservierten S28 erzeugt eine Verschiebung der S_0 - S_2 und S_0 - S_1 Übergänge des Flavins zu höheren Wellenlängen (Bonetti *et al.*, 2009). Götze und Saalfrank, 2009 erweiterten das Y8-Q50-W91-M93 Cluster anhand von Strukturanalysen um die Position 28 und postulierten einen mit dem *Win/out*-Wechsel assoziierten Konformationstausch von S28 und I37. Obwohl den aktiven Zustand der BLUF-Domänen nur geringe strukturelle Änderungen kennzeichnen, kann seine Lebensdauer zwischen Sekunden (z.B. TePixD $\tau \sim 5$ s) bis mehreren Minuten (z.B. AppA $\tau \sim 17$ min) variieren (Zirak *et al.*, 2005; Kuroi *et al.*, 2014). Die thermale Dunkelrelaxation verläuft ohne detektierbare Intermediate und ist bisher wenig verstanden (Hasegawa *et al.*, 2005).

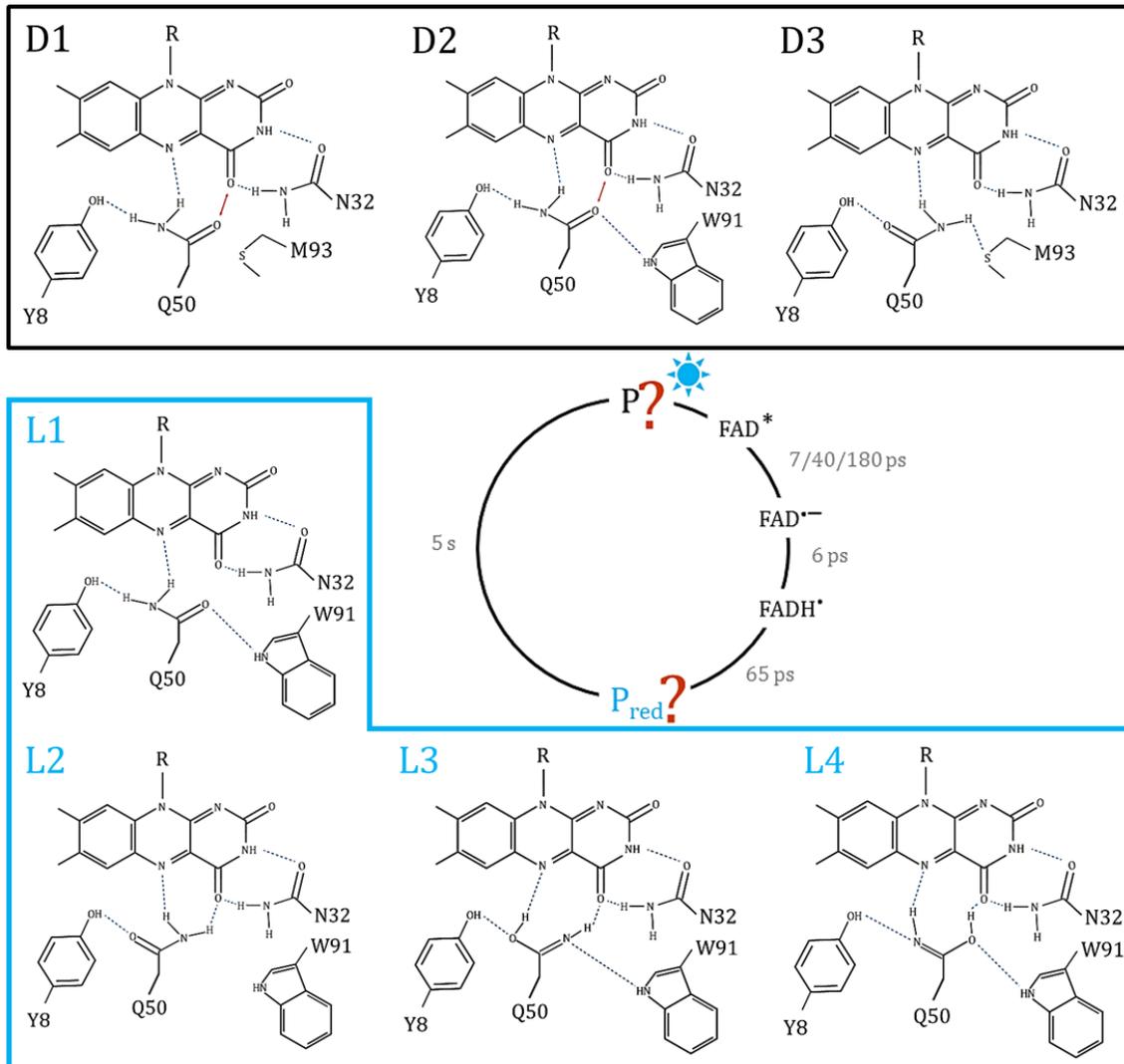


Abb. 1-8 – Mögliche Dunkel- und Lichtzustandskonformationen ausgewählter Aminosäurereste der Flavinbindetasche

Kern der Diskussion sind die Ausrichtung und die Wasserstoffbrückeninteraktionen des essenziellen Glutamins, die häufig im Zusammenhang mit dem putativen *in/out* Wechsel von W91 und M93 betrachtet werden. Die Modelle des Signalzustandes (L1-4) teilen sich in solche mit Rotamer oder Tautomer des Q50. (Anderson *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2006; Stelling *et al.*, 2007; Obanayama *et al.*, 2008; Domratheva *et al.*, 2008; Sadeghian *et al.*, 2008; Götze & Saalfrank, 2009; Kennis & Mathes, 2013). Verändert nach Khrenova *et al.*, 2010, mit dem bisherigen Verständnis des Photozyklus nach Gauden *et al.*, 2006. P = Grundzustand, P_{red} = physiologisch aktiver Zustand

BLUF-Photorezeptoren als optogenetische Werkzeuge

Neben der Untersuchung ihrer physiologischen Funktion, ihrer umstrittenen Photochemie und ihrer noch weitestgehend unverstandenen Signaltransduktion wird die optogenetische Anwendung der BLUF-Proteine intensiv verfolgt. Hierfür sind BLUF-gekoppelte Zyklasten von besonderem Interesse, da sie eine blaulichtinduzierte Steuerung der Synthese von cAMP in rekombinanten Systemen erlauben (Schröder-Lang *et al.*, 2007; Stierl *et al.*, 2011; Jansen *et al.*, 2015). In ausführlichen Verwandtschaftsanalysen von Mandalari *et al.*, 2013 schätzten die Autoren das Vorkommen von Adenylat- und Guanylatzyklasten unter Phytochromen, LOV- und BLUF-Rezeptoren als sehr selten ein.

I. Einleitung

Obwohl auch LOV- und Rhodopsin-assoziierte Zyklasten aus dem Cyanobakterium *Microcoleus chthonoplastes* PCC 7420 (Raffelberg *et al.*, 2013) und dem Pilz *Blastocladiella emersonii* (Scheib *et al.*, 2015) charakterisiert wurden, stellt die BLUF-Familie aktuell die meisten und am häufigsten verwendeten, lichtaktivierten Adenylatzyklen zur Verfügung. Eine neuartige Anwendung könnte dagegen die artifizielle, BLUF-gekoppelte Endonuklease III RmPAE erschließen (Penzkofer *et al.*, 2016), wenn eine Stabilisierung der Photoaktivierung mit weiteren Anpassungen gelingt. Neben diesen komplexen Vertretern, wurde allerdings auch ein kurzer Rezeptor erfolgreich für die Optogenetik adaptiert. Masuda *et al.*, 2013 entwickelten hierfür aus PixD und seinem Interaktionspartner PixE das Expressionssystem *PixD complex-dependent control of transcription* (PICCORO). Es bedient sich eines Fusionsproteins aus einem dominanten transkriptionellen Repressor sowie PixE, und konnte in Zebrafischembryos zur Transkriptionsregulation verwendet werden.

Die Vorteile von PixD

PixD eignet sich durch eine vergleichsweise gute rekombinante Expression, Stabilität und einen schnellen Photozyklus ($\tau_{\text{rec}} \sim 14$ s, Zirak *et al.*, 2007) für zeitaufgelöste Untersuchungen. Der Einsatz großer Proteinmengen verbessert das Signal-Rauschen-Verhältnis, während ein schneller Photozyklus viele experimentelle Wiederholungen mit geringem Zeitaufwand ermöglicht. Da es sich um einen Vertreter der kurzen BLUF-Proteine handelt, können anhand von PixD gewonnene Erkenntnisse auf die Mehrheit der Sensorfamilie (64 % der BLUF-Proteine sind kurz, Losi *et al.*, 2014) übertragen werden. Einen weiteren Vorteil stellt die vergleichsweise hohe Sequenzhomologie von etwa 43 % zu TePixD dar (Fukushima *et al.*, 2007), welches als temperaturstabile Variante angesehen werden kann. Außerdem bilden beide Proteine Multimer-Komplexe (Kita *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2006) (Abb. I-6), die als physiologisch aktive Form betrachtet werden (Masuda *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2011; Kuroi *et al.*, 2015). In der Folge weisen PixD und TePixD mehrere Stellen für Protein-Protein-Interaktionen auf, von denen einige auch in den komplexen BLUF-Vertretern relevant sein könnten.

Eine ausgezeichnete Basis für die Aufklärung der Umsetzung des Lichtstimulus bilden die Kristallstrukturen von Wildtyp-Protein (WT) und verschiedenen Mutanten in Volllänge sowie NMR-spektroskopische Untersuchungen (Yuan *et al.*, 2011). Entsprechend viele spektroskopische Analysen dieses Proteins sind publiziert, wobei Gauden *et al.*, 2006 erstmalig der Nachweis von Redoxintermediaten im Photozyklus der BLUF-Proteine gelang. Nur für das nahe verwandte TePixD konnten alle diese Intermediate bisher ebenfalls gezeigt werden (Stier, 2014).

1.3 IR-spektroskopische Analyse der BLUF-Photoaktivierung

Die Photoaktivierung der BLUF-Domänen initiiert unter geringen strukturellen Änderungen eine Umordnung des Wasserstoffbrückennetzwerks in der Flavinbindetasche. Die dabei auftretenden Bindungsänderungen können mit Hilfe der Schwingungsspektroskopie identifiziert und aus ihnen ein Aktivierungsmechanismus des Proteins abgeleitet werden. IR-Spektroskopie erwies sich daher als geeignete Methodik, um lichtabhängige Strukturänderungen der BLUF-Domänen zu charakterisieren (Masuda *et al.*, 2004; Bonetti *et al.*, 2008). Sie erlaubt die Analyse des Photozyklus in Lösung, auf einer breiten Zeitskala, benötigt moderate Proteinnengen und ist vergleichsweise wenig kostenintensiv. Die durch die Infrarot-Absorption angeregte Schwingung chemischer Bindungen verursacht eine Änderung des Dipolmoments, wobei die absorbierte Energie von der Kraftkonstante K zwischen den Atomen (Länge und Stärke der Bindung) und der reduzierten Masse μ abhängt (Barth & Zscherp, 2002). Im einfachsten Fall kann eine Molekülschwingung als zwei-atomischer Oszillator mit der Resonanzfrequenz ν_0 beschrieben werden:

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}} \quad \text{wobei} \quad \mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (1).$$

Meist handelt es sich jedoch um komplexere Systeme, in denen eine Vielzahl von Valenz- (ν_{as} antisymmetrisch, ν_s symmetrisch) und Deformationsschwingungen (δ Biege-, ρ Kipp-, ω Wipp-, t -Dreh-schwingungen) auftreten, die zusätzlich von benachbarten Bindungen beeinflusst sind. Die Betrachtung des Holoproteins erzeugt daher komplexe Datensätze. Der Einsatz von Schwerisotopen erhöht die reduzierte Masse eines Oszillators und verringert dadurch die Schwingungsfrequenz spezifischer Bindungen. Die Kombination verschiedener Markierungsmuster für dasselbe Protein, ermöglicht anschließend eine detaillierte Analyse der IR-Spektren und Zuordnung der Signale. Nach der von Ohki und Kainosho genutzten Nomenklatur können folgende Markierungen erzielt werden (Ohki & Kainosho, 2008):

- I) Globale (auch uniforme oder Vollmarkierungen, in dieser Arbeit kurz „u“) Markierungen,
- II) *Amino Acid Type Selective* (auch Reste-spezifische) Markierungen,
- III) selektive Markierungen (in dieser Arbeit kurz „s“),
- IV) durch Verwendung von autospleißenden Inteininen mögliche segmentelle Markierungen (Minato *et al.*, 2012) sowie
- V) reverse (auch inverse, in dieser Arbeit kurz „i“) Markierungen.

Dazu werden hauptsächlich die langlebigen Schwerisotopen von Stickstoff (^{15}N) und Kohlenstoff (^{13}C) eingesetzt. Des Weiteren wird der Ersatz von Protonen gegen Deuteronen sowohl global, als auch zufällig parziell und an austauschbaren Protonen genutzt, um Seitenketten vom Proteinerückgrat zu unterscheiden oder ^1H -Signale aus NMR Spektren zu löschen. Durch Reste-spezifische Isotopenmarkierungen kann außerdem auf Substitutionsmutationen verzichtet werden, deren Effekte in IR Spektren oftmals schwer zu deuten sind.

I. Einleitung

In *E. coli* erfolgreich umgesetzte Isotopenmuster für verschiedene BLUF-Proteine umfassen bereits ^{15}N - und ^{13}C -Markierungen des Holo-proteins, Reste-spezifische mit ^{13}C -Tyrosin sowie ^{13}C - und ^{15}N -Riboflavin (^{13}C - / ^{15}N -RF)-Inkorporationen (Masuda *et al.*, 2004, 2005; Unno *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2007). Daraus abgeleitete Bandenzuordnungen sind für das Licht-minus-Dunkel-(LmD)-Differenzspektrum von PixD im mittleren Infrarot zwischen $1000 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ in Abb. I-9.A gezeigt. Es setzt sich aus den Schwingungen des Chromophors, des Proteinrückgrats (Amid I und Amid II $1500 - 1700 \text{ cm}^{-1}$, Barth & Zscherp, 2002) und der Aminosäureseitenketten (akkumulieren in der *Fingerprint* Region $\sim 1000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$, Csernaton *et al.* 2013) zusammen. Die Differenzsignale von Grund- und Lichtzustand bilden Paare von Signalen einzelner Schwingungen in beiden Proteinkonformationen. Mit Einführung von Schwerisotopen werden das Auffinden dieser Bandenpaare anhand der induzierten Signalverschiebung ermöglicht und Bindungsänderungen dargestellt (Abb. I-9.B).

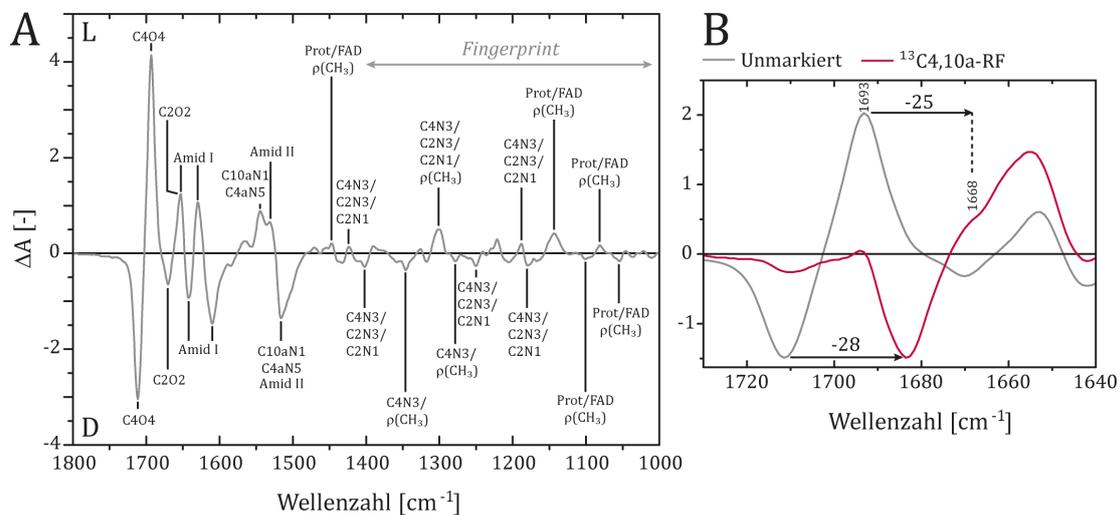


Abb. I-9 – Licht-minus-Dunkel-Differenzspektrum von PixD und Signalverschiebung durch schwere Isotopen
Gezeigt ist ein Spektrum des PixD Wildtyps, das im Rahmen dieser Arbeit aufgenommen wurde. (A) Die geringfügigen Unterschiede der IR-Absorption von inaktivem und aktivem Zustand können nur durch Verrechnung beider Datensätze herausgestellt werden. Mit Bildung eines Differenzspektrums erscheinen die spezifischen Schwingungsfrequenzen des Dunkel- (D) und Lichtzustandes (L) als negative und positive Banden wie hier am Beispiel von PixD im Bereich des mittleren Infrarots gezeigt. Die angegebene Bindungszuordnung entspricht dem Kenntnisstand ohne Einbezug der in dieser Arbeit vorgestellten Daten. Sie basiert auf Vergleichen mit Modellmolekülen und der Einbringung schwerer Isotopen in das Protein und/oder den Kofaktor. Die Frequenzverschiebung zwischen D und L spiegelt dabei die Schwingungsänderung der Bindung wieder und gibt Hinweise auf Änderungen der intra- und intermolekularen Wechselwirkungen. B) Isotopenmarkierung erleichtert die Zuordnung von Banden des Dunkelzustandes zu den entsprechenden Banden des Lichtzustandes, wenn die induzierte Reduktion der Schwingungsfrequenz beide Signale etwa gleichstark verschiebt (wie hier um 25 und 28 Wellenzahlen).

Vorstellung der CmpX13-Stammsammlung

Zusammen mit der NMR-Spektroskopie gibt die IR-Spektroskopie Einblicke in die strukturelle Organisation von Molekülen und erlaubt eine nicht-invasive Betrachtung Stimulus-aktivierter Konformationsänderungen von Proteinen. Wie im vorhergehenden Abschnitt dargelegt, profitiert die Datenanalyse beider Methodiken von gezielter Isotopenmarkierung, wobei die Minimierung des Einsatzes teurer Substrate und ein möglichst reines Markierungsmuster angestrebt werden. Zur Umsetzung dieser Ziele bietet das Expressionssystem *E. coli* einige Vorteile, unter denen Kosteneffektivität und reiche genomische und proteomische Kenntnisse hervorzuheben sind. Speziell für die Biosynthese und Untersuchung von Flavoproteinen besitzt es jedoch noch einen weiteren Vorzug. So ist es wie Pflanzen und ein Großteil der Mikroorganismen, zur Riboflavinsynthese fähig (Fischer & Bacher, 2008). Den Kofaktor stellt es daher endogen bereit. Auch die Synthese aller bisher untersuchten BLUF-Proteine gelang in *E. coli* (Gomelsky & Kaplan, 1998; Masuda *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2005; Okajima *et al.*, 2005; Barends *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2010; Mussi *et al.*, 2010; Stierl *et al.*, 2011; Penzkofer *et al.*, 2014, 2015; Ohki *et al.*, 2016).

Das Enterobakterium konnte jedoch durch die Integration eines passiven Riboflavin Transporters noch weiter verbessert werden (Mathes *et al.*, 2009). Resultat ist der *E. coli* Stamm CmpX13. Mit ihm wird einerseits die Verringerung der Proteinausbeute aufgrund der potenziell limitierenden Kofaktor-Konzentration umgangen. Andererseits wurde die Grundlage für selektive und inverse Chromophormarkierungen von Proteinen gelegt, die den Kofaktor kovalent binden. Hierfür nutzten Mathes *et al.*, 2009 die neuen Fähigkeiten von CmpX13, um einen Riboflavin-auxotrophen Stamm, genannt CpXribF, zu entwickeln. Ihre Abstammung von *E. coli* C41(DE3) und die damit verbundene Toleranz gegenüber toxischen Proteinen sowie die genomisch codierte T7-RNA-Polymerase (Miroux & Walker, 1996) machen die CmpX13-Abkömmlinge zu hervorragenden Wirten für die Flavoproteinexpression. Durch die geringe Selektivität des RibM-Transmembran-Komplexes ist darüber hinaus die *in vivo* Konstitution des Zielproteins mit sterisch und chemisch akzeptierten Flavin-Derivaten möglich (Mathes *et al.*, 2009). Die Δ manX::ribM Substitution gewährleistet zusätzlich eine schnelle Identifikation mittels PCR (siehe Abschnitt II.3.4) oder fehlender Rotfärbung auf McConkey-Indikatorplatten mit Mannose (Stolz *et al.*, 1993; Huber & Erni, 1996).

Aufgrund dieser Charakteristika wurde der Stamm CmpX13 bereits für die Entwicklung des pDusk-pDawn-Systems und der röntgenkristallografischen Strukturauflösung dessen Kernelements, der artifiziellen LOV-Histidin-Kinase YF1 (Ohlendorf *et al.*, 2012; Diensthuber *et al.*, 2013) ausgewählt. Des Weiteren konnte Deborah Stier TePixD erfolgreich in CmpX13 exprimieren (Stier, 2014), während ihn andere Gruppen für die Untersuchung der Regulation des Riboflavinsynthesewegs von *E. coli* und beteiligten Enzymen aus Pflanzen nutzen (Hasnain *et al.*, 2013; Pedrolli *et al.*, 2015).

I. Einleitung

I.4 Zielstellung dieser Arbeit

Wie in den vorhergehenden Abschnitten dargelegt, stellt die BLUF-Domäne aus mehreren Gründen ein wertvolles Studienobjekt dar. Bisher sind ihre physiologischen Funktionen sowie die intermolekulare und die intramolekulare Signalweiterleitung der BLUF-Proteine jedoch nur schwach verstanden. Offene Fragen zum BLUF-Photozyklus wurden in der Einleitung angedeutet und sind im Folgenden zusammengefasst:

- 1) Wie sind der Dunkel- und der Signalzustand aufgebaut und welche Aminosäureseitenketten sind am Übergang beteiligt?
- 2) Wie wird das Signal vom Chromophor ausgehend an die Proteinoberfläche geleitet und anschließend auf den Effektor übertragen?
- 3) Wie wird der Signalzustand stabilisiert?
- 4) Sind diese Prozesse unter den BLUF-Proteinen konserviert?

Um sich einer Beantwortung dieser Fragen anzunähern, wurde eine Erweiterung der CmpX13-Stammsammlung verfolgt. Mit ihrer Hilfe sollten selektive und inverse Isotopenmuster von Apoprotein oder Chromophor um Reste-spezifische Markierungen der Glutamine, Tryptophane und Histidine in PixD ergänzt werden. Ziel war es anhand von FT-IR Spektroskopie Strukturunterschiede zwischen Dunkel- und Lichtzustand aufzuschlüsseln. Dabei lag der Fokus insbesondere auf Aufklärung des Tautomerzustandes von Q50 und dessen Wasserstoffbrückenbindungen zum Flavin sowie des putativen *in/out*-Wechsels von W91. Zusätzlich sollten Protonierungsstatus und strukturelle Änderungen des H72 näher beleuchtet werden. Ferner wurden Analysen von FT-IR Spektren der W91A/F- und S28A-Mutanten angestrebt, um nähere Informationen über Auswirkungen der Substitutionen auf die Proteinstruktur und Mechanismen zur Geschwindigkeitsregulation der Dunkelrelaxation zu erhalten.

Ein tieferes Verständnis der BLUF-Funktionsweise wird vor allem das Design optogenetischer Werkzeuge vereinfachen, einen breiteren Anwendungsbereich für etablierte Enzyme erschließen und die Anwendung der BLUF-Domäne als Modellsystem für PCET-Reaktionen unterstützen.

II. Material & Methoden

II.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die Basis für inverse Isotopenmarkierungen von Flavoproteinen wurde mit der Erzeugung des *E. coli* Stammes CmpX13 gelegt (Mathes *et al.*, 2009). Dieses Derivat entstand durch die genomische Integration eines Riboflavin-Transporter-codierenden Locus aus *Corynebacterium glutamicum* in den C41(DE3) Hintergrund. Es vereint damit eine erhöhte Toleranz gegenüber der heterologen Expression toxischer Proteine (Miroux & Walker, 1996), mit der Fähigkeit zur Aufnahme von externem Riboflavin (RF). Nur in diesem Stamm ist daher auch die Unterbrechung der RF-Synthese möglich, welche für die Einführung von isotopenmarkiertem Flavin oder Flavin-Derivaten essenziell ist. Zur Verbesserung des passiven RF-Transports wurde der Abkömmling CpXribF entworfen. Durch Substitution des RF-Synthase Gens *ribC* gegen *ribF*, welches für die Flavokinase codiert, besitzt dieser RF-auxotrophe Stamm zwei *ribF* Kopien (Mathes *et al.*, 2009). Die Aktivität des Genproduktes führt zur Verringerung der intrazellulären RF-Konzentration und unterstützt auf diese Weise den Transport entlang des Gradienten.

Alle in dieser Arbeit angefertigten Deletionen zur Unterbrechung von Aminosäuresynthesen und Degradationen erfolgten im CmpX13 oder CpXribF Hintergrund. Die verwendeten Stämme und erzeugten Derivate sind in Tab. II-A zusammengefasst.

Tab. II-A – Im Rahmen dieser Arbeit benutzte Bakterienstämme und Mutanten

Angeführt sind ihre Genotypen sowie die Urheber des jeweiligen Stammes. Resistenzen sind unterstrichen, während das Kürzel FRT die Deletionsnarbe mit der verbleibenden FLP Rekombinase-Erkennungssequenz bezeichnet (Abschnitt II.3.4).

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Auxotrophien	Referenz
MG1655	Derivat von W1485; F ⁻ , lambda ⁻ , <i>rph-1</i>	Leichte Pyrimidin Unterversorgung	Bachmann, 1972; Jensen, 1993
XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> Phage F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10 Tet^R</i>	-	Stratagene
DH10b	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15</i> <i>ΔlacX74 endA1 recA1 deoR* Δ(ara,leu)7697 araD139</i> <i>galU* galK* nupG rpsL λ- Strep^R</i>	-	Durfee <i>et al.</i> , 2008 * möglicherweise nicht defizient für die markierten Loci
CmpX13	C41(DE3): BL21(DE3) [F ⁻ <i>ompT hsdSB (rB- mB-) gal</i> <i>dcm</i> (DE3)], mit einer uncharakterisierten Mutation welche den Zelltod bei der Expression toxischer Proteine herabsetzt, <i>ΔmanX::ribM (pnuX)</i>	-	Miroux & Walker, 1996; Mathes <i>et al.</i> , 2009
CpXribF	CmpX13, <i>ΔribC::ribF</i>	RF	Mathes <i>et al.</i> , 2009

II. Material & Methoden

Fortsetzung Tab. II-A

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Auxotrophien	Referenz
CpXΔH	CmpX13, Δ <i>hisD</i> ::FRT	H	Mehlhorn <i>et al.</i> , 2013
CpXΔM	CmpX13, Δ <i>metE</i> ::FRT	M	Diese Arbeit
CpXFΔM	CpXribF, Δ <i>metE</i> ::FRT	M, RF	Diese Arbeit
CpXΔQ	CmpX13, Δ <i>glnA</i> ::FRT	Q	Mehlhorn <i>et al.</i> , 2013
CpXΔQv2	CmpX13, Δ <i>glnA</i> ::FRT, Δ <i>asnB</i> ::FRT	Q	Mehlhorn <i>et al.</i> , 2013
CpXFΔQ 12	CmpX13, Δ <i>ribC</i> :: <i>ribF</i> , Δ <i>glnA</i> ::FRT	Q, RF	Mehlhorn <i>et al.</i> , 2013
CpXFΔQv2	CpXribF, Δ <i>glnA</i> ::FRT, Δ <i>asnB</i> ::FRT	Q, RF	Mehlhorn <i>et al.</i> , 2013
CpXFΔQv3	CpXribF, Δ <i>glnA</i> ::FRT, Δ <i>asnB</i> ::FRT, Δ <i>ybaS</i> ::FRT	Q, RF	Diese Arbeit
CpXFΔQv4	CpXribF, Δ <i>glnA</i> ::FRT, Δ <i>asnB</i> ::FRT, Δ <i>ybaS</i> ::FRT, Δ <i>gltB</i> ::FRT	Q, RF	Diese Arbeit
CpXFΔQv5*	CpXribF, Δ <i>glnA</i> ::FRT, Δ <i>asnB</i> ::FRT, Δ <i>ybaS</i> ::FRT, Δ <i>gltB</i> ::FRT Δ <i>yneH</i> ::FRT- <u>Kan^R</u>	Q, RF	Diese Arbeit
CpXFΔQv2ΔY	CpXribF, Δ <i>glnA</i> ::FRT, Δ <i>asnB</i> ::FRT, Δ <i>tyrA</i> ::FRT	Q, RF, Y	Diese Arbeit
CpXFΔQv2ΔYΔW	CpXribF, Δ <i>glnA</i> ::FRT, Δ <i>asnB</i> ::FRT, Δ <i>tyrA</i> ::FRT, Δ <i>trpA</i> ::FRT	Q, RF, Y, W	M. Meiworm
CpXFΔQv3ΔYΔW	CpXribF, Δ <i>glnA</i> ::FRT, Δ <i>asnB</i> ::FRT, Δ <i>ybaS</i> ::FRT; Δ <i>tyrA</i> ::FRT, Δ <i>trpA</i> ::FRT	Q, RF, Y, W	Diese Arbeit
CpXFΔQv4ΔYΔW	CpXribF, Δ <i>glnA</i> ::FRT, Δ <i>asnB</i> ::FRT, Δ <i>ybaS</i> ::FRT; Δ <i>gltB</i> ::FRT, Δ <i>tyrA</i> ::FRT, Δ <i>trpA</i> ::FRT	Q, RF, Y, W	Diese Arbeit
CpXFΔQv5*ΔYΔW	CpXribF, Δ <i>glnA</i> ::FRT, Δ <i>asnB</i> ::FRT, Δ <i>ybaS</i> ::FRT; Δ <i>gltB</i> ::FRT, Δ <i>yneH</i> :: <u>Cam^R</u> , Δ <i>tyrA</i> ::FRT, Δ <i>trpA</i> ::FRT	Q, RF, Y, W	Diese Arbeit
CpXΔR	CmpX13, Δ <i>argA</i> ::FRT	R	Mehlhorn <i>et al.</i> , 2013
CpXΔN11ribF 3	CmpX13, Δ <i>asnA</i> ::FRT, Δ <i>asnB</i> ::FRT, Δ <i>ribC</i> :: <i>ribF</i>	N, RF	Steinocher, 2013
CpXFΔNv2	CmpX13, Δ <i>asnA</i> ::FRT, Δ <i>asnB</i> ::FRT, Δ <i>ribC</i> :: <i>ribF</i> , Δ <i>iaaA</i> ::FRT	N, RF	Diese Arbeit
CpXFΔWv2	CpXribF, Δ <i>trpA</i> ::FRT, Δ <i>tnaA</i> ::FRT,	W, RF	Lindtner, 2016
CpXΔF	CmpX13, Δ <i>pheA</i> ::FRT	F	Diese Arbeit
CpXΔFv2	CmpX13, Δ <i>pheA</i> ::FRT Δ <i>ilvE</i> ::FRT		Diese Arbeit
CpXFΔF	CpXribF, Δ <i>pheA</i> ::FRT	F, RF	Diese Arbeit
CpXFΔFv2	CpXribF, Δ <i>pheA</i> ::FRT Δ <i>ilvE</i> ::FRT		Diese Arbeit

Zur heterologen Expression von Genen und Aufreinigung der kodierten Proteine, oder zur genomischen Modifikation des Trägerstammes wurden die in Tab. II-B aufgeführten Plasmide verwendet.

Tab. II-B- *Verwendete Plasmide und Vektoren*

Mit Angabe ihrer Genotypen und der Urheber. Plasmide mit den Replikationsursprüngen pBR322 werden der Kompatibilitätsgruppe colE1 zugeordnet, während solche mit pSC101 und p15 Replikationsursprüngen eigene Gruppen bilden. Zu beachten sind die vermittelten Kreuzresistenzen. Angeführt sind nur die Antibiotika, die zur Selektion für diese Arbeit verwendet wurden. Amp = Ampicillin, Kan = Kanamycin, Cam = Chloramphenicol

Plasmid	Genotyp	Resistenzen	Literatur
pET28a-Slr1694	<i>ori</i> pBR322, <i>nptII</i> , <i>lacI</i> , <i>f1 ori</i> , T7 Promotor und Terminator, <i>slr1694</i> aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, N-terminal 6xHis, Thrombin Schnittstelle und T7-Tag	Kan	Gauden <i>et al.</i> , 2006; Zirak <i>et al.</i> , 2007
pET28a-SlrH73A	pET28a-Slr1694, Punktmutation	Kan	Diese Arbeit
pET28a-SlrH73S	pET28a-Slr1694, Punktmutation	Kan	Diese Arbeit
pET28a-SlrW91F	pET28a-Slr1694, Punktmutation	Kan	Bonetti <i>et al.</i> , 2009
pET28a-SlrQ50A W91A	pET28a-Slr1694 Punktmutationen	Kan	Fudim <i>et al.</i> , 2015
pET21a-Slr1694	<i>ori</i> pBR322, <i>bla</i> , <i>lacI</i> , <i>f1 ori</i> , T7 Promotor und Terminator, <i>slr1694</i> aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 mit N-terminalem 6xHis, Thrombin site und T7-Tag	Amp	Diese Arbeit
pET28-ec-bPAC	<i>ori</i> pBR322, <i>nptII</i> , <i>lacI</i> , <i>f1 ori</i> , T7 Promotor und Terminator, <i>E. coli</i> Codon optimiertes bPAC (Zugangsnr. GU461307), N-terminal 6xHis, Thrombin Schnittstelle und T7-Tag	Kan	Stierl, 2013
pET21-UVR8-HS	<i>ori</i> pBR322, <i>nptII</i> , <i>lacI</i> , <i>f1 ori</i> , T7 Promotor und Terminator, <i>uvr8</i> cDNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Smt3p, Strep-Tag II, 7xHis	Kan	Christie <i>et al.</i> , 2012, #SI
pKD4	<i>ori</i> γ <i>rgnB</i> <i>bla</i> FRT- <i>nptII</i> -FRT	Amp Kan	Datsenko & Wanner, 2000
pKD3	<i>ori</i> γ <i>rgnB</i> <i>bla</i> FRT- <i>cat</i> -FRT	Amp Cam	Datsenko & Wanner, 2000
pSIM6	<i>ori</i> pSC101 repA ^{ts} *, P _R O _R Promotor, λ cI857, P _L O _L Promotor, <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> , <i>bla</i>	Amp	Datta <i>et al.</i> , 2006
pCP20	<i>ori</i> pSC101 repA ^{ts} *, λ cI857, <i>nptII</i> -5' <i>nptII</i> -3', <i>cat</i> , <i>bla</i> , λ P _R , FLP Rekombinase (<i>Sacharomyces cerevisiae</i>)	Amp	Cherepanov & Wackernagel, 1995

* ts = temperatursensitiv, #SI = Supporting Information

II.2 Mikrobiologische Methoden

II.2.1 Kultivierung von *E. coli* Zellen

Die Anzucht der verwendeten *E. coli* Stämme erfolgte in komplexem LB-Medium oder definiertem M9*-Minimalmedium (Zusammensetzung siehe Tab. II-C) unter aeroben Bedingungen, bei 190 - 230 rpm und 37 °C. Zur Aufrechterhaltung der Plasmidinkorporation wurde entsprechend der kodierten Antibiotikaresistenzen selektiert und im Falle von temperaturabhängigen Replikons (Tab. II-B) bei 30 °C inkubiert. Bei den gleichen Temperaturen erfolgte auch die Bebrütung von Agar-Platten (Inkubator Innova 4200, New Brunswick Scientific; Labtherm Lab Shaker, Adolf Kühne AG).

II. Material & Methoden

Tab. II-C - Für die *E. coli* Kultivierung verwendete Komplex- und Minimalmedien

Auflistung ihrer Zusammensetzung mit optionalen Zusätzen und der Hersteller der für diese Arbeit verwendeten Chemikalien. Als Lösungsmittel diente, wenn nicht anders angegeben, Wasser. Das verwendete M9*-Medium weicht in seiner Zusammensetzung von M9-Medium ab, um bessere Fermentationsbedingungen zu schaffen. Bei Angaben von Isotopen ist die natürliche Verteilung nicht berücksichtigt.

Medium	Chemikalie	Endkonzentration	Hersteller	
LB	Trypton	1 % (w/v)	Becton Dickinson	
	Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)	Becton Dickinson	
	Natriumchlorid	1 % (w/v)	Roth	
M9*	D-Glukose (+)	0,8 % (w/v)	Roth	
	Ammoniumchlorid	37,4 mM	Roth	
	<u>Spurenelemente (1000x Konzentrat verwendet):</u>			
	Eisen-(III)-chlorid Hexahydrat in 0,12M HCL	50 µM	Reanal	
	Calciumchlorid Dihydrat	20 µM	Roth	
	Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat	10 µM	Fluka	
	Zinksulfat	10 µM	Merck	
	Cobalt-(II)-chlorid	2 µM	Fluka	
	Natriumselenit	2 µM	Sigma	
	Borat	2 µM	Merck	
	Kupfer-(II)-chlorid	2 µM	Merck	
	Nickel-(II)-chlorid	2 µM	Merck	
	Natriummolybdän	2 µM	Sigma	
	Magnesiumsulfat Heptahydrat	2 mM	Merck	
	Calciumchlorid Dihydrat	0,3 mM	Roth	
	<u>M9-Salze (10x Konzentrat verwendet) pH 7,4 bei RT:</u>			
		2-fach		
	Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	90 mM	Roth	
	Kalium-di-Hydrogenphosphat	59 mM	Roth	
	Natriumchlorid	17,2 mM	Roth	
	Thiaminhydrochlorid	0,003 mg/ml	Fluka	
	D(+)-Biotin	0,003 mg/ml	Sigma	
Zusätze	Riboflavin (RF)	10-50 µM		
	Uniform ¹² C ¹⁴ N	10-50 µM	Sigma	
	2x ¹³ C _{4a,10}	10-50 µM	Dr. T. Mathes	
	Uniform ¹⁵ N	10-50 µM	Dr. T. Mathes	
<u>Aminosäuren:</u>				
	L-Histidin, uniform ¹² C ¹⁴ N	0,008 % (w/v)	Sigma	
	L-Glutamin, uniform ¹² C ¹⁴ N	8 % (w/v)	Serva	
	L-Asparagin, uniform ¹² C ¹⁴ N	0,032 % (w/v)	Acros Organics	
	L-Tryptophan, uniform ¹² C ¹⁴ N	0,00012 % (w/v)	Roth	
<u>Antibiotika (1000x Konzentrate verwendet):</u>				
	Ampicillin	100 µg/ml	Sigma	
	Choramphenicol, gelöst in 70 % Ethanol	35 µg/ml	Sigma	
	Kanamycin	50 µg/ml	Sigma	
<u>Induktor:</u>				
	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	1 mM	Roth	

II.2.2 Wachstumsassays

Die erzeugten auxotrophen Stämme wurden vor dem Einsatz zur Proteinexpression zunächst auf ihren Aminosäureverbrauch untersucht. Dazu wurde über Verdünnungsreihen die kritische Konzentration bestimmt, bei welcher ein vollständiger Verbrauch der eingesetzten Glukose noch gewährleistet ist. Die Korrelation von Aminosäure- und Kohlenstoffquellekonsum erlaubt neben der indirekten Bestimmung des Aminosäureverbrauchs über einen Glukoseschnelltest (Macherey-Nagel) auch die Garantie des kompletten Verbrauchs bei Beendigung der Kultivierung und einen sparsamen Einsatz von Substrat. Die Stämme wurden hierfür über 4 - 6 h auf M9*-Medium mit 0,2 % (w/v) Glukose und Zusatz der Aminosäure (sterilfiltriert 0,22 µm) adaptiert. Um einer Verfälschung der Messung durch Aminosäureeintrag aus dem Kulturmedium vorzubeugen, wurden die Zellen zunächst zweimal in 1ml M9* ohne Aminosäurezusatz gewaschen und anschließend über 1 h bei 37 °C und 850 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf) ausgehungert. Die mit dieser Zellsuspension angesetzten Wachstumsassays wurden in technischen Duplikaten in einer Mikrotiterplatte (96 Well Greiner, Nunc, TPP) mit 150 µl Volumen angesetzt. Enthalten waren außerdem eine Wildtyp- und eine Leerkontrolle. Je Stamm wurden mindestens drei biologische Replikate angefertigt. Die Verdünnung der Aminosäurekonzentration erfolgte 1:2 oder 1:10, abhängig von der jeweiligen AS in einem Bereich zwischen 0 - 4 % (w/v). Zur automatisierten Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) wurden der monochromatische oder der Filter Plate Reader Infinite F200 Pro (Tecan) mit einer Parameter-festlegenden Routine für Tecan i.control (siehe Abb. II-1) verwendet.

1	Plate Greiner / Nun96Ut (Nunc 96, U, transparent)
2	Temperature on 37°C
3	Wait for temperature min. 36,5°C max. 37°C
4	Part of plate Manuelle Auswahl
5	Kinetic cycle Duration 16:01:00 (h:min:s)
6	Shaking Duration 600 s Amplitude 1 mm Mode Orbital Frequency 432 rpm
7	Absorbance Wavelength 600nm Read nr. of flashes 25 Label 1
8	Wait Timer wait time 00:10:00

Abb. II-1 – Routine für die Software Tecan i.Control zur OD-Bestimmung in Wachstumsassays

Mit ihr wurden die Wachstumsassays im Plate Reader angefertigt. Neben Rahmenparametern wie Temperatur, Dauer und Auslenkung wird unter Punkt 7 die Datenaufnahme festgelegt. Die OD₆₀₀ wird für jeden Messzeitpunkt und jedes Well in einer Exceltabelle erfasst.

II.2.3 Schüttelkultur zur Proteinexpression

Zur Biosynthese der Proteine wurde der gewünschte Stamm zunächst wie in Abschnitt II.3.3 beschrieben transformiert und positive Klone zur Proteinexpression in Schüttelkultur ausgewählt. Anschließend wurde aus einer Übernachtskultur, die in Anwesenheit der fünffachen Antibiotikakonzentration wuchs, mit 1:70 bis 1:100 in Komplexmedium inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 190 - 230 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von ~0,6. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Temperatur auf 16 - 18 °C abgesenkt, über 1 h bei 165 rpm weiter geschüttelt und anschließend die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG in Endkonzentration induziert.

II. Material & Methoden

Die Expressionsdauer betrug zwischen 14 und 18 h, mit abschließender Ernte bei 4000 x g und 4 °C über 30 min. Nasse Zellpellets wurden gewogen und anschließend bei -20 °C eingefroren, wenn kein sofortiger Zellaufschluss erfolgte.

II.2.4 Hochzelllichtfermentation

Testexpressionen und die anschließenden Isotopenmarkierungen wurden *in vivo* in einem Multifors Fermentationssystem (Infors) mit einem maximalen Fassungsvermögen von zweimal 500 ml bei hohen Zelldichten durchgeführt. Der *fed-batch*-Prozess verlief dabei zweistufig, mit einer der Expressionsphase vorangehenden Biomassephase. In der Regel wurde für die Biomasseproduktion isotopenfreies Substrat eingesetzt. Für inverse Markierungsmuster war es jedoch aufgrund des geringen Abbaus von Flavinen notwendig, die Kultur mit markiertem Riboflavin zu beginnen.

Tab. II-D – Weitere Zusätze und Lösungen für die Fermentation von *E. coli* Zellen

Zusätzlich zu M9*-Medium wurden die hier aufgeführten Lösungen benutzt. Für die Antischaum- und Natronlauge-Lösungen können keine Endkonzentrationen angegeben werden. Die Zugabe war abhängig von dem pH-Wert und der Schaumbildung der Kulturen und schwankte zwischen den einzelnen Fermentationen. Bei Angaben von Isotopen ist die natürliche Verteilung nicht berücksichtigt.

Lösung	Chemikalie	Endkonzentration	Hersteller
Konzentrierte Nährlösung	D-Glukose (+), uniform ¹² C/ ¹³ C (99 %)	30 % (w/v)	Roth/Cambridge Isotopes
	Ammoniumchlorid, uniform ¹⁴ N/ ¹⁵ N (99 %)	7,5 % (w/v)	Roth/Cambridge Isotopes
	Thiaminhydrochlorid	0,009 mg/ml	Siehe Tab. 2.3
	D(+)-Biotin	0,009 mg/ml	Siehe Tab. 2.3
	10-fach M9-Salze pH 7,4	10-fach	Siehe Tab. 2.3
	Antibiotika	Siehe Tab. 2.3	Siehe Tab. 2.3
Aminosäuren in Abhängigkeit des jeweiligen Stammes verwendet	<u>Aminosäuren:</u> L-Gln, ¹⁵ N-Amid (99 %) L-His, 6x ¹³ C (98 %) 3x ¹⁵ N (98 %) L-Trp 11x ¹³ C (97 %) 2x ¹⁵ N (95 %)	1 % (w/v) 0,008 % (w/v) 0,00012 % (w/v)	CortecNet CortecNet CortecNet
Antischaum-Lösung	1,5 % Breox FMT 30	-	ILCO Chemikalien GmbH
Lauge zur pH-Regulation	2 M Natronlauge (NaOH)	-	Roth

Eine 400 ml Vorkultur wurde zunächst bei Raumtemperatur (RT) unter 4000 x g über 30 min pelletiert und gegebenenfalls in 150 mM NaCl gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei 100 rpm auf dem Orbitalschüttler bei RT in 25-50 ml Medium (siehe Tab. II-D) resuspendiert und die OD₆₀₀ der Zellsuspension bestimmt. Bei der Inokulation wurde eine OD₆₀₀ von ~0,7 angestrebt. Das Fermentationssystem lief vollautomatisiert unter Kontrolle einer Iris Sequenz (V 5.0 - V 5.3, Infors). Diese regulierte Temperatur, Rührgeschwindigkeit, Zugabe von Antischaum und 2 M Natronlauge sowie die Induktion der Proteinexpression und die Zufuhr der konzentrierten Nährlösung mit dem isotopenmarkierten Substrat, in Abhängigkeit von Schaumbildung, pH-Wert und Sauerstoffpartialdruck (pO₂) der Zellkultur (pH Einstabmessketten 405-DPAS-SC-K8S/225 und Sauerstoffsonden InPro 6820/12/220, Mettler Toledo). Dabei diente der pO₂ als Indikator für die metabolische Aktivität und die Verfügbarkeit von Substrat.

Er wurde jeweils vor der Inokulation des Reaktors bei laufendem Rührer und 37 °C als 100 % definiert. Bei einem Abfall des pO₂ unter 30 % für einen festgelegten Zeitraum, mit einem folgenden sprunghaften Anstieg über 60 % startete das System die langsame Zugabe der konzentrierten Nährlösung mit dem isotope-markierten Substrat und applizierte um 30 min zeitverzögert die Induktionslösung. Die Expressionsphase dauerte zwischen 14 und 16 h bei 25 °C. Anschließend wurde die Temperatur auf 8 °C (Umlaufkühler, Julabo) abgesenkt und die Rührgeschwindigkeit auf ein Minimum reduziert. In der Folge stieg der pO₂ erneut und deutete damit das Ende der Kultivierung an.

II.3 Molekularbiologische Methoden

II.3.1 Polymerase-Ketten-Reaktion und Agarose-Gelelektrophorese

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der von Mullis *et al.*, 1992 entwickelten Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durchgeführt. Als Matrize diente gereinigte, doppelsträngige Plasmid-DNA, oder eine Bakterienkolonie für die Vermehrung genomischer DNA. Die Reaktionsansätze mit 25-50 µl umfassten dabei 1-fach Reaktionspuffer (Repro Fast, Genaxxon), 200 µM dNTPs (2 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP Stocklösung, 99 % rein, Fermentas), je 0,4 µM Oligo 1 und 2 (Invitrogen, Sigma) sowie 2,5 - 5 U DNA-Polymerase (*Pfu* basiert, Repro Fast, Genaxxon). Die Reaktion verlief in PCR-Maschinen der Firmen Biometra (T-Gradient) und peQlab (peQStar 2x Gradient, 96 Universal). Nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C über 4 - 5 min, folgten 30 Zyklen mit 95 °C für 45 s, einem anschließenden Schritt zur Anlagerung der Primer für 45 s und dem Elongationsschritt mit 1 min/1 kb bei 72 °C. Abschließend endete das Programm mit einer finalen Elongation über 4 - 5 min bei 72 °C. Die Reaktion wurde daraufhin auf 4 - 8 °C abgekühlt und teilweise über Nacht gelagert. Die Temperatur zur Anlagerung an die Matrizen wurde für jedes Oligonukleotid-Paar nach der Kalkulation vom *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) gewählt. Bei Verwendung von unterschiedlichen Primer-Paaren lief das PCR-Programm jeweils mit der niedrigsten Hybridisierungstemperatur. Bei Verwendung längerer Oligonukleotide und solcher mit Überhängen wurde dem Ansatz 1 M Betain (Roth) hinzugefügt. Zur Herstellung der PCR-Produkte für die *One-step Inactivation* (Abschnitt II.3.6) wurden die ersten 10 Zyklen dagegen mit 45 s Denaturierung bei 95 °C, Hybridisierung über 45 s bei 50 °C und einer Elongation bei 72 °C mit 1 min/1 kb programmiert. Die folgenden 20 Zyklen beinhalteten nur noch 2 Schritte mit der Denaturierung bei 95 °C für 45 s und direkt folgend dem Elongationsschritt bei 72 °C für 1 min/1 kb.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung in 1 % Agarose (peQlab, Roth) in TAE bei 90 V mit UV-Licht illuminiert und die Ergebnisse dokumentiert (312 nm, Intas UV-Systeme). Die verwendeten Farbstoffe waren Ethidiumbromid (Roth) und Sybr Safe (*life Technologies*). Sie wurden der Gellösung vor dem Erkalten mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml bzw. 1:10.000 verdünnt zugesetzt.

II. Material & Methoden

II.3.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und PCR-Reaktionen

PCR-Amplifikate und Restriktionsfragmente wurden nach Angaben des Herstellers mit dem NucleoSpin „Gel and PCR Clean-up“ Kit (Macherey-Nagel) gereinigt. Eluiert wurde in 30 - 50 µl auf 70 °C erhitztem Puffer für 15 - 20 min und abschließend die DNA-Konzentration bestimmt (Biospectrometer basic, Eppendorf).

II.3.3 Transformation von *E. coli*

Herstellung chemisch-kompetenter Zellen und Hitzeschocktransformation

Chemisch-kompetente *E. coli* Zellen von DH10b oder XL1-blue wurden aus einer Kultur mit OD₆₀₀ 0,1 - 0,4 hergestellt. Hierfür wurde aus einer, über die Nacht inkubierte, Kultur (ÜN Kultur) mit einer Verdünnung von 1:1000 inokuliert und bei 37 °C und 165 - 190 rpm bis zum Erreichen der gewünschten OD₆₀₀ geschüttelt. Nach Entfernung des Mediums durch Zentrifugation über 10 min bei 4000 x g und 4 °C wurde das Pellet in kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen. Verwendet wurden 0,4 Volumen (Vol) CaCl₂-Lösung bezogen auf das Kulturvolumen bei der Anzucht. Anschließend wurden die Zellen zum Waschen bei 4 °C und 4000 x g über 30 min pelletiert und in frischer CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach der Resuspension wurde die Suspension 30 min bei 4 °C inkubiert und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen in 0,03 Vol 0,1 M CaCl₂ mit 15 % Glycerol aufgenommen und zu 50 µl Aliquots tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Zur Transformation wurden 50 µl Zellsuspension mit 30-100 ng DNA vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C über 90 s, woraufhin der Ansatz erneut 10 min auf Eis gelagert wurde. Nach einem Zusatz von 500 µl LB-RF wurde zur Wiederherstellung der Zellintegrität und Ausbildung der Antibiotikaresistenz für 1 h bei 37 °C und 850 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf) geschüttelt und zum Abschluss auf selektivem LB-Agar ausplattiert.

Herstellung elektrokompenter Zellen und Elektroporation

Elektrokompetente Zellen wurden vor der Transformation aus einer 35 - 50 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,6 - 1 gewonnen. Hierfür wurden die Zellen nach der Zentrifugation, mit 4000 x g bei 4 °C über 10 min, in 25 ml kaltem, 10 %-igem Glycerol (Roth) resuspendiert. Drei weitere Waschschrte mit Glycerol erfolgten in 1 ml bei 11.000 rpm und 2 - 4 °C in 1 min. Das Volumen zur abschließenden Resuspension betrug zwischen 400 - 1000 µl. Die Transformation von *E. coli* Zellen durch einen elektrischen Puls erfolgte mit 1500 V, 150 Ω und 50 µF (ECM 630, BTX Harvard Apparatus) in gekühlten Küvetten mit 1 mm Spaltbreite (VWR). Eingesetzt wurden 80 µl Zellsuspension und 30 - 150 ng DNA. Im Anschluss an den Puls wurde der Ansatz in 500 µl LB-RF aufgenommen und zur Wiederherstellung der Zellintegrität und Expression des Resistenzgens für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf LB-RF-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Hierfür wurde der Ansatz für 1 min bei 11.000 - 15.000 rpm pelletiert und der Überstand dekantiert.

Nach Resuspension in der Restflüssigkeit, wurden die Zellen auf den Platten ausgebracht. Bei der Transformation von Plasmiden wurden hingegen direkt 50 µl Zellsuspension entnommen und ausplattiert.

II.3.4 Genomische Modifikation von *E. coli*

Die gezielte Deletion von Genen erfolgte nach der von Wanner und Datsenko entwickelten *One-step inactivation* Methode (Datsenko & Wanner, 2000). Sie basiert auf der Substitution einer selektierbaren Resistenzkassette gegen den Ziellocus mit einer anschließenden Entfernung der Antibiotikaresistenz. Hierfür wurden in einer PCR die Resistenzkassetten der Matrizen pKD3 oder pKD4 mit homologen Bereichen zur gewünschten Sequenz versehen. Die Primer umfassten dafür je 70 Basenpaare (bp) mit 50 bp Homologie zu Beginn oder Ende des Zielgens und 20 bp Homologie zu den Matrizen-Plasmiden, positioniert am 3'-Ende (Tab. II-E). Protokollen von Dr. T. Mathes folgend wurde für die Amplifikation eine zweistufige Reaktion gewählt (siehe Abschnitt II.3.1). 100 - 200 ng der erhaltenen DNA dienten zur Transformation elektrokompenter Zellen. In diesen Trägern des Helferplasmids pSIM6 wurde durch einen 15-minütigen Hitzeschock bei 42 °C die Expression der λ Red Gene induziert, bevor sie für die Elektroporation vorbereitet wurden (Abschnitt II.3.3).

Tab. II-E – Oligonukleotide zum Knock-out ausgewählter Loci des *E. coli* Chromosoms

Diese 70 Basenpaare umfassenden Primer beinhalten 50 Basen, die homolog zum Anfang bzw. Ende des Zielgens sind sowie 20 Basenpaare, welche die Amplifikation der Resistenzkassette von pKD3 oder pKD4 ermöglichen (unterstrichen). Bezogen wurden diese Oligonukleotide PAGE-gereinigt von Sigma.

Bezeichnung	Basenfolge in 5' - 3' Orientierung
DargA-3'	CGCATGTCGC ATCCGACGAT TTTCATCGCT TACCCTAAAT CCGCCATCAA <u>CggCTgACAT gggAATTA</u> gC
DargA-5'	AgAATAAAAA TACACTAATT TCGAATAATC ATGCAAAGAG GTGTGCCGTG <u>gTgTAggCTg gAgCTgCTTC</u>
DiaaA-rev	CCGCCAGCAC ATTACCGGCA TCAAGTTCAT CACTGTGTGG AACGGTGTC <u>CggCTgACAT gggAATTA</u> gC
DiaaA-fwd	TGATATTTA TAGCAAAAAGT GGCGAACCACC CTTAATGGAC GAATACTATG <u>gTgTAggCTggAgCTgCTTC</u>
DilvE-3'	GACGGTGCGT GCCGTCCCAT TTTTGTATT TATTGATTAA CTTGATCTAA <u>CggCTgACAT gggAATTA</u> gC
Dilve-5'	AACCACATCA CAACAAATCC GCGCCTGAGC GCAAAAGGAA TATAAAAATG <u>gTgTAggCTg gAgCTgCTTC</u>
BL21DmetE-r	TGCAATTTACAATGACTCGTTAATACTCATCATCCCCGACGCAAATTCTG <u>CggCTgACAT gggAATTA</u> gC
DpheA-rev	CCGCCAGCAC ATTACCGGCA TCAAGTTCAT CACTGTGTGG CAACGGTGTC <u>CggCTgACAT gggAATTA</u> gC
DpheA-fwd	CTCCCAAATC GGGGGGCCTT TTTTATTGAT AACAAAAAGG CAACACTATG <u>gTgTAggCTg gAgCTgCTTC</u>
DybaS-rev	ACCGTTATTA CCTTCCGTGT TCATCATGAT CAGCCCTTAA ACACGTTATA <u>CggCTgACAT gggAATTA</u> gC
DybaS-fwd	GGGTGAGGA ATTACCTCCC GCATCTATAA AAAGGAGTTA ACAAAGATG <u>gTgTAggCTg gAgCTgCTTC</u>
DyneH-rev	CTGATATACT CGCAGGTCTT TTCAGACCTG CGGTCCAGGA GTAGAAAGTG <u>CggCTgACAT gggAATTA</u> gC
DyneH-fwd	ACGCGGAAG AGTGGATCGA GAGACTGCAT TAATAAACCG AACGCCCTAA <u>gTgTAggCTg gAgCTgCTTC</u>

II. Material & Methoden

Tab. II-F – Oligonukleotide zum Nachweis korrekter Gendeletion in Knock-out Mutanten

pKD4cs-3' diente zur Überprüfung der Substitution der Kan^R-Kassette gegen das Zielgen, während die anderen Primer sowohl für diesen Zweck als auch beim abschließenden Test auf die Entfernung des Resistenzgens angewandt wurden. Die Paare ribCH-3'/5' und manXH-3'/5' dienen dem Nachweis der Δ ribC::ribF bzw. Δ manX::ribM Substitution. Alle Oligonukleotide wurden entsalzen von den angegebenen Herstellern bezogen.

Bezeichnung	Basenfolge in 5' – 3' Orientierung	PCR-Produkt im Wildtyp	Hersteller
manXH-3'	CTTAAGTGTG AAAACTGAGTG		Operon
manXH-5'	GAATCGATTC GATTGTGGAC	1089 bp	Operon
HargA-3'	GACGGTACAT AAATCGCAGG		Sigma
HargA-5'	CCCTTGAGTA CCGAGTTCAG	2101 bp	Sigma
HasnA-3'	GACGACGTGA CGAGTAA		Operon
HasnA-5'	GGATTTTCTT ATGCGGAT	1315 bp	Operon
HasnB-3'	GGAATTTAAC AATAGTGGTGG		Operon
HasnB-5'	CAATAAATAT ATCCTCACACC	2000 bp	Operon
cysEsq-3'	CTGGCGGCAG TTGGGGTATC		Sigma
cysEsq-5'	GAAAAAACGC GCGAGGCAG	1065 bp	Sigma
glnAsq-3'	CTTTTGACAG ATGGTGC GCA TG		Sigma
glnAsq-5'	CTCACCTGCT CCGGCCTAC	1698 bp	Sigma
HgltB-rev	GGAAAACGGCTCGTAAATTTTC		Invitrogen
HgltB-fwd	GCTTGCCATTTGACCTGTATC	4839 bp	Invitrogen
HiaaA-rev	CAATTGCCAG CGTCTCACCG		Invitrogen
HiaaA-fwd	GCCACAGACT GTATGCCACC	1245 bp	Invitrogen
ilvEsq-3'	GAGCACCCGC CATATTAC		Sigma
ilvEsq-5'	CACGGTCGGT CGACTTACTG	1172 bp	Sigma
HmetE-fwd	GTGTAACATCTGGACGGC		Invitrogen
BL21HmetE-rev	CATACATAGCAAAATGGCTTCC	2491 bp	Invitrogen
HpheA-rev	CGTACTATA AGCGTTTCGG		Invitrogen
HpheA-fwd	GGGTA CTAAAGTCAC	1551 bp	Invitrogen
ribCH-3'	CTCCGGGGC GATTTCAGA		Operon
ribCH-5'	TGATTCAGG AGTTGTAAGT	681 bp	Operon
trpAsq-3'	GACGTAAGTT GACGTTTCGAC		Sigma
trpAsq-5'	CACGCCCTGG CCCATGCG	1070 bp	Sigma
tyrAsq-3'	CAGCGAAAT GCAAAAAG		Sigma
tyrAsq-5'	CAACCGGCA GTGAAATG	1410 bp	Sigma
DtnaA-fwd	CCGCCCTTGATTTGCCCTTC		Invitrogen
DtnaA-rev	CAGGCACCGCAAGATCAAC	1849 bp	Invitrogen
HyneH-rev	GGAAGTGGCTAATGATAGTG		Invitrogen
HyneH-fwd	CGGAATGTTATGCCACTTAG	1503 bp	Invitrogen
HybaS-rev	CATAACCGAAAAACATCGCC		Invitrogen
HybaS-fwd	GTAAACCTTCCAGCAAGGG	1342 bp	Invitrogen
pKD4cs-3'	GAATAGCCTC TCCACCCAAG	-	Operon

Nach Einbringen der linearen dsDNA wurden die Zellen wie unter II.3.3 beschriebenen behandelt und ausplattiert. Die Verifikation der Substitution des Zielgens gegen das Resistenzgen erfolgte in zwei Schritten. Neben dem Wachstum in Anwesenheit des Antibiotikums diente eine PCR, in der eines der Oligonukleotide innerhalb der Resistenzkassette bindet, als Nachweis. Bestätigten beide Tests den Klon als positiv, erfolgte im Anschluss die Entfernung der Kassette nach Transformation mit dem Helferplasmid pCP20. Dieses ebenfalls temperatursensitive Replikon kodiert die FLP Rekombinase von *Sacharomyces cerevisiae* unter Kontrolle eines hitzeinduzierbaren Promotors. Für die Expression der Rekombinase wurden daher 500 µl LB-RF mit 70 - 100 µl Zellsuspension einer ÜN Kultur inokuliert und über 6 - 7 h bei 43 °C und 850 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf) geschüttelt. Anschließend wurde eine Impföse der Suspension auf LB-RF-Agar in 3-Strich-Technik ausgestrichen, um möglichst viele separierte Einzelkolonien zu erhalten. Diese wurden in einer Replikaplattierung auf Amp^R und Kan^R geprüft und Antibiotika-sensitive Klone weiter vereinzelt. Nach der Bestätigung der Exzision der Resistenzkassette über eine PCR (Primer Tab. II-F) wurde das für den *Knock-out* Stamm erhaltene Produkt zur Sequenzanalyse eingereicht und deren Ergebnis mit der von Wanner und Datsenko, 2000 erstellten Deletionsnarbe verglichen. Enthielt das PCR-Produkt die erwarteten Elemente, erfolgte die Lagerung der neuen Mutante als Kryostock bei -80 °C. Dieser setzte sich aus 500 µl einer dichten ÜN Kultur und 300 µl 86 % Glycerol zusammen.

II.3.5 Plasmid isolation und Restriktionsanalyse

Plasmide wurden aus *E. coli* Zellen mit Hilfe des NucleoSpin „Plasmid“ Protokolls und dem NucleoBond *Xtra plasmid purification* Kit (Macherey-Nagel) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse isoliert. Zur Bestätigung der Plasmididentität oder der Klonierung neuer Plasmide, wurde die erhaltene, zirkuläre DNA mit ausgewählten Restriktionsendonukleasen (*Fast Digest*, Thermo Scientific) enzymatisch gespalten. Für die Reaktion wurden 0,5 - 1 µg DNA mit 0,5 µl Enzym in einfachem *FastDigest Green* Puffer bei 37 °C über 1 h inkubiert. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente in einer analytischen Agarosegelelektrophorese und Färbung der Nukleinsäuren konnte unter UV-Licht ein Abgleich des entstandenen Bandenmusters durchgeführt werden. Gegebenenfalls wurden Fragmente zur Gel-Elution gewonnen und wie in Abschnitt II.3.2 beschrieben gereinigt.

II.3.6 Substitutionsmutagenese

Die Einführung von Substitutionsmutationen in Plasmid-kodierte Gene erfolgte nach dem *QuickChange II Site-directed mutagenesis* Protokoll (Stratagene). Primer für diese PCR-basierte Methodik waren homolog und wurden mit Hilfe des Programmes PrimerX (Lapid, Gao) nach Möglichkeit mit einer Restriktionsschnittstelle generiert (siehe Tab. II-G). Der Reaktionsansatz wurde nach Angaben des Herstellers angefertigt und die PCR durchgeführt. Vom Protokoll abweichend wurde mit der *Repro Fast DNA-Polymerase* und deren Puffer gearbeitet (Genaxxon). Vor der Transformation von 2,5 µl des Ansatzes wurde die methylierte PCR-Matrize mit 1 µl *DpnI* (*Fast Digest*, Thermo Scientific) gespalten.

II. Material & Methoden

Tab. II-G – Oligonukleotide zur Einführung von Punktmutationen

Die aufgeführten Primer wurden für Substitutionsmutagenese im Gen *slr1694*, kodiert auf pET28a(+), genutzt. Die unterstrichenen Bereiche markieren das betroffene Kodon, während die Bezeichnung der Mutanten Position und Substitution innerhalb der BLUF Domäne angibt. Einige Plasmide können durch neu eingeführte Restriktionsschnittstellen vom Ausgangskonstrukt unterschieden werden.

Bezeichnung	Basenfolge in 5' – 3' Orientierung	Eingeführte Schnittstelle	Hersteller
SlrH73A-rev	CACTCAATGA TCTGGGGGCT <u>AGCGTGGCGT</u> TCATCTTGC	<i>NheI</i>	Sigma
SlrH73A-fwd	CAAGATGAAC GCCAC <u>GCT</u> AG CCCCCAGATC ATTGAGTG		Sigma
SlrH73S-rev	CAATGATCTG GGGGCT <u>CGAG</u> TGGCGTTCAT CTTGC	<i>XhoI</i>	Sigma
SlrH73S-fwd	CAAGATGAAC GCCAC <u>TCGAG</u> CCCCCAGATC ATTG		Sigma
SlrW90r	GAAGAACTT CGAGGT <u>TGCG</u> TCTATGCAAG CGATC	-	Operon
SlrW90f	GATCGCTTGC ATAGAC <u>CGCAA</u> CCTCGAAGTT TCTTC	-	Operon

II.3.7 Sequenzanalysen

Zum Abschluss von Klonierungen oder genomischen Modifikationen wurden die betroffenen Loci mittels PCR amplifiziert (siehe Abschnitt II.3.1) oder Plasmide aus den Zellen isoliert (Abschnitt II.3.5) und mit angebotenen (Tab. II-H) oder eigenen Oligonukleotiden bei den Firmen „GATC“, „LGC Genomics“ oder „SMB Services in Molecular Biology GmbH“ zur Sequenzierung eingereicht. Die Auswertung der Analysen erfolgte mit Hilfe der Programme GENTle (Magnus Manske), Serial Cloner (Serial Basics, Frank Perez) und NCBI-BLAST. Neben den in Tab. II-H aufgelisteten, wurden auch Oligonukleotide aus Tab. II-F zur Bestätigung korrekter Gendelektionen in *E. coli* genutzt.

Tab. II-H – Oligonukleotide zur Sequenzanalyse

Nach Klonierung neuer pET Konstrukte wurden sie für die Überprüfung der korrekten Basenfolge verwendet und von der jeweiligen Sequenzier-Firma bezogen.

Bezeichnung	Basenfolge in 5' – 3' Orientierung	Matrizen
T7-Promotor	TAATACGACT CACTATAGGG	pET-Vektoren
T7-Terminator	CTAGTTATTG CTCAGCGG	

II.4 Biochemische Methoden

II.4.1 Zellaufschluss

Die Aufreinigung von heterolog exprimiertem, nativem Protein aus *E. coli* erfolgte über eine Affinitätschromatographie zum Histidin-Tag. Hierfür wurde zunächst das Zellpellet in Lysispuffer (Tab. II-I) vollständig resuspendiert. Anschließend konnte der Zellaufschluss im Homogenisator Emulsiflex C3 oder B15 (Avestin) bei 1100 - 1500 bar und 4 °C in zwei Durchläufen erfolgen. Die erhaltene Suspension wurde bei 4 - 8 °C und 40.000 rpm (Sorvall Ultrazentrifuge, Rotor Beckmann Coulter 45.Ti) über 1 h lang zentrifugiert.

Tab. II-I – Pufferzusammensetzungen für die Proteinisolation

Für die Aufreinigung von 6-fach Histidin-addierten Konstrukten mittels Metallionen-Affinitätschromatographie wurden die aufgeführten Lösungen verwendet. Als Lösungsmittel diente Wasser, wobei die Stocklösung von PMSF mit 99,9 % Isopropanol (Roth) angesetzt wurde. Angegeben sind außerdem die Quellen, von denen die Chemikalien bezogen wurden. Die bPAC-Puffersysteme entsprechen den Angaben im *Handbook for high level expression and purification of 6xHis tagged proteins*, 5th Edition, Qiagen. Für UVR8 wurden die Lösungen nach Christie *et al.*, 2012, SI angesetzt.

Puffer	Zusammensetzung	Protein			Hersteller
		PixD	bPAC	UVR8	
Lysis	TRIS-Cl	50 mM, pH 8,0	-	50 mM, pH 8,0	Merck
	Natrium-Di-Hydrogenphosphat	-	50 mM, pH 8,0	-	Roth
	Natriumchlorid	100 mM	300 mM	500 mM	Roth
	Kaliumchlorid	50 mM	-	20 mM	Roth
	Imidazol	25 mM	10 mM	Imidazol	Sigma
	Phenylmethylsulfonylfluorid	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM	Sigma
	Antischaum Konzentrat	1 Tropfen	1 Tropfen	1 Tropfen	Sigma
	DNase I	1 Spatelspitze	1 Spatelspitze	1 Spatelspitze	Roche
Waschen	β-Mercaptoethanol	-	-	1 mM	Roth
	TRIS-Cl	50 mM, pH 8,0	-	50 mM, pH 8,0	Merck
	Natrium-Di-Hydrogenphosphat	-	50 mM, pH 8,0	-	Roth
	Natriumchlorid	300 mM	300 mM	500 mM	Roth
	Imidazol	25 mM	20 mM	-	Sigma
	Magnesiumchlorid	-	-	2,5 mM	Merck
	Adenosin-tri-Phosphat	-	-	10 mM	Sigma
Elution	TRIS-Cl	50 mM, pH 8,0	-	50 mM, pH 8,0	Merck
	Natrium-Di-Hydrogenphosphat	-	50 mM, pH 8,0	-	Roth
	Natriumchlorid	100 mM	300 mM	500 mM	Roth
	Kaliumchlorid	50 mM	-	-	Roth
	Imidazol	500 mM	250 mM	250 mM	Sigma
	β-Mercaptoethanol	-	-	1 mM	Roth
Dialyse	TRIS-Cl	10 mM, pH 8,0	-	25 mM, pH 7,5	Merck
	Natrium-Di-Hydrogenphosphat	-	50 mM, pH 8,0	-	Roth
	Natriumchlorid	10 mM	300 mM	100 mM	Roth
	β-Mercaptoethanol	-	-	1 mM	Roth

II.4.2 Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Zur Vorbereitung der Säule wurde zunächst ein Volumen *Nickel-Nitrilotriacetic acid* (Ni-NTA, Qiagen) in eine Glassäule (Qiagen) geladen und mit 100-fachem Vol MQ H₂O unter Gravitationsfluss gespült. Im Anschluss erfolgte die Equilibrierung in mindestens 2 Vol Puffer, bevor der Überstand der Zentrifugation auf die Säule aufgetragen wurde. Nachdem mit 1 l Waschpuffer (Tab. II-I) unspezifisch gebundene Proteine entfernt wurden, konnte das Protein durch Bindekompetition mit 500 mM Imidazol in Puffer remobilisiert werden. Das Imidazol wurde durch Dialyse gegen mindestens ein 100-faches Volumen Dialysepuffer, unter Rühren bei 8 °C über mindestens 17 h entfernt. Verwendet wurde ein Schlauch mit 10 - 14 kDa *Molecular Weight Cut Off* (MWCO, Sigma-Aldrich, Roth). Zur Reduktion des Probenvolumens und der damit verbundenen Erhöhung der Proteinkonzentration je Volumeneinheit, wurde die dialysierte Proteinlösung in einer Amicon Filter Einheit mit MWCO 10 kDa (Millipore) durch mehrfaches

II. Material & Methoden

Zentrifugieren über 10 - 15 min bei 4 °C und 4000 x g eingengt. Mit einem Endvolumen von < 600 µl konnte die Probe anschließend bei -80 °C gelagert werden.

II.4.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinexpressionen und Bestimmung der Reinheit von isoliertem Protein wurden Proben in einer analytischen SDS-PAGE nach Laemmli, 1970 aufgetrennt und die Proteinbanden anschließend mit Hilfe der Coomassie-Färbung detektiert. Die verwendeten SDS-Gele setzten sich aus einem 10 - 12-prozentigen Trenngel und einem 5,5-prozentigen Sammelgelanteil zusammen. Für Ganzzelllysate wurde 1 ml Zellsuspension auf eine $OD_{600} \approx 1$ verdünnt, bei 13 000 x g über 5 min pelletiert und anschließend in 100 µl 1-fach SDS-Probenpuffer resuspendiert. Für isoliertes Protein wurden verschiedene Verdünnungen angesetzt. Die Ansätze wurden über 10 min bei 95 °C denaturiert und auf RT abgekühlt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einfachem Laemmli-Laufpuffer bei 30 mA je Gel, bis die Farblauffront herauslief. Als Größenstandard diente der *PAGE Ruler Prestained Plus* (ThermoFisher). Anschließend wurde das Sammelgel entfernt und die Trenngele bei RT in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde bei 800 W mehrfach in Wasser aufgekocht. Die Konservierung erfolgte durch Einschweißen in einen Gelfilm (Sigma) unter Vakuum bei 70 °C über 2 h (*Gel Dryer*, Sigma).

Tab. II-J – Lösungen für SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung

Bei Angabe konzentrierter Stocklösungen von Probenpuffer und Laufpuffer wurden diese vor Benutzung verdünnt, als Lösungsmittel diente Wasser.

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
Trenngel 10 % / 12 %	10 % / 12 % (v/v) Acrylamid Roti Gel 30	Roth
	375 mM TRIS pH 8,8 (RT)	Merck, Roth
	0,1 % (v/v) SDS	Roth
	0,05 % (v/v) TEMED	Roth
	0,07 % (v/v) APS	Sigma
	33,3 % (v/v) MQ H ₂ O	-
Sammelgel 5,5 %	5,5 % (v/v) Acrylamid Roti Gel 30	Roth
	78 mM TRIS pH 8,8 (RT)	Merck, Roth
	0,1 % (v/v) SDS	Roth
	0,5 % (v/v) TEMED	Roth
	0,05 % (v/v) APS	Sigma
	75,4 % (v/v) MQ H ₂ O	-
4-fach SDS Probenpuffer	100 mM TRIS pH 6.8 (RT)	Merck, Roth
	4 % (m/v) SDS	Roth
	0.08 % (m/v) Bromphenolblau	Sigma
	40 % (m/v) Glycerin	Roth
	100 mM DTT	Sigma
10-fach Laemmli-Laufpuffer	500 mM TRIS pH 8,8 (RT)	Merck, Roth
	1,5 % (v/v) SDS	Roth
	2 M Glycin	Roth
Coomassie-Färbelösung	0,1 % (m/v) Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
	50 % (v/v) Ethanol	Roth
	10 % (v/v) Essigsäure	Roth

II.4.4 Massenspektrometrie

Zur Präparation von Peptiden für die massenspektrometrische Analyse wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt (wie unter II.4.3 beschrieben). Nach Entfärbung des Hintergrundes konnte die Proteinbande mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in circa 1 mm³ große Stücke zerteilt werden. Zunächst wurde in 3 Waschschrritten mit 300 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat, 50 % Acetonitril (v/v) bei RT über 30 min entfärbt. Anschließend wurden die Gelstücke in 100 µl 100 % Acetonitril für 10 min bei RT inkubiert und nach Abnahme des Überstandes in der DNA120 SpeedVac® (ThermoSavant) komplett getrocknet. Zur Vorbereitung des tryptischen Verdaus wurden die Proben auf Eis gekühlt und mit 20 µl 12,5 ng/µl Trypsin (*sequencing grade*, Promega) in 50 mM Ammoniumbicarbonat überschichtet. Nach 30 min wurden die Gelstücke mit 50 mM Ammoniumbicarbonat komplett bedeckt. Der Verdau erfolgte über 12 - 16 h bei 37 °C. Zur Extraktion der Peptide wurde der Überstand abgenommen und mit 50 - 100 µl 5 % Ameisensäure, 60 % Acetonitril bei RT über 30 min weiter extrahiert. Nach 3-maliger Wiederholung dieses Schrittes, wurde der vereinte Überstand in der SpeedVac® auf mittlerer Heizstufe über mehrere Stunden vollständig getrocknet. Zur Isolation des Chromophors wurde der Proteinprobe 99,9 % Methonal (Roth) zu einem Finalvolumen von 75 % v/v zugesetzt und das Gemisch anschließend für 1 h bei -20 °C inkubiert. Das präzipitierte Apoprotein wurde anschließend über 30 min bei 16.000 x g und 4 °C pelletiert und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß in der SpeedVac® auf mittlerer Heizstufe vollständig getrocknet.

Messung und Analyse der Daten wurden freundlicherweise von Dr. Sebastian Beck (Institut für Chemie, HU Berlin) durchgeführt. Hierfür wurden die getrockneten Proben in 10 µl eines 50 % Methanol-0,1 % Ameisensäure-Gemisches gelöst und zu gleichen Teilen mit einer Lösung aus 3 mg/ml α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure in 84 % Acetonitril 13 % Ethanol 0,003 % Trifluoressigsäure versetzt. Die Messung erfolgte in einer MALDI-Orbitrap XL (Thermo Scientific) mit einem spektralen Auflösungsvermögen von 60.000. Durch Vergleich der Signalintensitäten zwischen markierten und unmarkierten Proben konnte die Markierungseffizienz abgeschätzt werden.

II.4.5 Gelfiltration

Zur weiteren Aufreinigung von PixD, wurde das nach der IMAC erhaltene Protein gegebenenfalls mit Hilfe der Gelfiltration von verbliebenen Verunreinigungen getrennt. Genutzt wurde eine Sephacryl S-100 HiPrep 16/60 Säule (GE Healthcare), die in Kombination mit der ÄktaprimePlus (GE Healthcare) halb-automatisiert beladen wurde. Vor Auftragung der Proteinprobe wurde die Säule mit 1,5 *Column Volumes* (CV) filtriertem MQ H₂O mit 0,3 ml/min (maximaler Druck 1 MPa) bei 8 °C gespült. Anschließend wurde mit 1,5 CV Dialysepuffer (Tab. II-J) äquilibriert. Die Proteinproben wurden vor Aufnahme in den 2 ml Loop bei 11.000 g für 10 min zentrifugiert und nur der Überstand verwendet. Aufgetragen wurde mit 0,5 ml/min (max. 0,5 MPa), einem Äquilibrierungsvolumen von 10 ml, 3 ml Probeninjektion und 180 ml Elutionsvolumen. Bei Anstieg der Absorption bei 280 nm wurde das System zur Sammlung von 500 µl Fraktionen

II. Material & Methoden

eingestellt und der Lauf bei Rückgang der Absorbanz auf null beendet. Die gesammelten Fraktionen wurden durch SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion auf ihre Reinheit überprüft. Solche Fraktionen, die eine Gelbfärbung und keine verbliebenen Verunreinigungen zeigten, wurden vereint, wie unter II.4.1 beschrieben eingeengt und bei -80 °C gelagert.

II.5 Spektroskopische Methoden

II.5.1 UV/vis Spektroskopie

Die Messung der Absorption des dunkeladaptierten Zustandes zwischen 200-800 nm erfolgte mit dem Cary300bio Spectrophotometer (Varian), in Quarzküvetten (10 mm Schichtdicke, Starna GmbH), mit einer Auflösung von 0,1 nm, bei einer Spaltbreite von 2 - 4 nm. Die Probe konnte über einen Umlaufthermostaten temperiert werden. Soweit nicht anders angegeben, wurde bei RT gemessen. Proben mit einer maximalen Absorption über 1 wurden für eine exakte Messung entsprechend verdünnt.

Zur Bestimmung der Zeitkonstante τ des Zerfalls des lichtadaptierten Zustandes wurde die Änderung der Absorption nach Belichtung der Probe verfolgt. Die Akkumulation des aktivierten Proteins erfolgte über 5 s Belichtung mit einer Leuchtdiode (455 nm Emission, 1 W Royal Blue, Luxeon Star, 90 mW/cm²) in einer 3-Fenster-Quarzküvette (10 mm Schichtdicke, Starna GmbH). Über die gesamte Messdauer wurde dabei die Änderung der Absorption bei 490 nm mit einer Auflösung von 0,1 s aufgezeichnet. Die Spaltbreite betrug 2 nm. Streulicht der LED wurde durch Anbringen eines Filters (Thorlabs Inc., 480 nm, plus-minus 10 nm) vor dem Detektor verringert. Mehrfachmessungen wurden durch Nutzung einer Diodensteuerung in Kombination mit einem ADL-Shell (Varian) Skript automatisiert. Die Abhängigkeit der Rückkehrkinetik von der Temperatur konnte durch Einsatz eines Umlaufthermostaten zwischen 10 - 70 °C gemessen werden. Soweit nicht anders angegeben, wurde auf RT temperiert.

Für die Berechnung von τ wurden mit Origin V8.5.1G Fits der folgenden Gleichungen angewandt:

$$\text{Monoexponentiell: } y = A_1 \cdot \exp^{\frac{-x}{\tau_1}} \quad (2)$$

$$\text{Biexponentiell: } y = A_1 \cdot \exp^{\frac{-x}{\tau_1}} + A_2 \cdot \exp^{\frac{-x}{\tau_2}} + y_0, \quad \text{wobei } t = \tau. \quad (3)$$

Waren mehrere Zeitkonstanten nötig, um die Daten ausreichend zu beschreiben, wurde τ_{gesamt} unter Wichtung der Komponentenanteile wie folgt berechnet:

$$\tau_{\text{gesamt}} = \exp\left(\frac{A_1}{A_1+A_2} \cdot t_1 + \frac{A_2}{A_1+A_2} \cdot t_2\right). \quad (4)$$

II.5.2 Hochdurchsatzassay

Um den Einfluss von Imidazol auf die Aktivierungsenergie des Lichtzustandes für ausgewählte Slr-Mutanten zu bestimmen, wurden 100 μ M Proteinlösungen mit verschiedenen Imidazol-Konzentrationen (0, 5, 25, 50, 100, 170 und 250 mM) hergestellt. Um je ein *Well* versetzt erfolgte anschließend die Beladung der 96 μ Clear Mikrotiterplatte (Nunc) mit 100 μ l Lösung. Die Messung der Dunkeladaptation nach Anregung mit 470 nm wurde mit der von (Richter *et al.* 2015) entwickelten Aufrüstung für den monochromatischen Plate Reader M200 Pro durchgeführt. Die Absorptionsänderung bei 490 nm wurde dabei abhängig von der Mutante über 2 - 15 min bei aufsteigender Temperatur (27, 29, 31, 33, 35 und 37 °C) verfolgt.

II.5.3 Fourier-Transformation-Infrarot (FT-IR) Spektroskopie

Die FT-IR spektroskopische Analyse von isotopenmarkiertem PixD oder von Substitutionsmutanten wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. John Kennis an der VU Amsterdam unter Betreuung von Dr. Tilo Mathes durchgeführt. Vor Aufnahme der Infrarotspektren, wurde die Proteinlösung zunächst in Filtereinheiten (Millipore, 10 kDa MWCO, Fassungsvermögen 250 μ l) zur Konzentrationserhöhung bei 4 °C und 13.000 rpm mehrfach zentrifugiert. Angestrebt wurde eine OD der Lösung von 0,5 - 0,6 bei 1650 cm^{-1} . Proben mit bis zu $\text{OD}_{1650} = 1$ wurden verwendet, höher konzentrierte Lösungen wurden gegebenenfalls verdünnt. Mit 5 - 15 μ l Proteinlösung wurde anschließend ein eingeschlossener, dünner Probenfilm zwischen zwei Calciumfluorid-Plättchen geschaffen. Die Messung der Infrarotlichtabsorption der stationären Zustände zwischen 1000 - 1800 cm^{-1} erfolgte in einem IFS66/S Spektrometer (Bruker) mit einer Auflösung von 3 cm^{-1} . Die Absorption des lichtadaptierten Zustandes wurde unter Belichtung mit einer Luxeon Diode (460 nm, 1 W) aufgenommen. Zwischen der nachfolgenden Messung des Dunkelzustandes wurde abhängig von der Probe ein Zeitintervall für die Dunkelrelaxation eingeräumt. Zur Elimination experimentell bedingter Fluktuationen diente die zusätzliche Aufnahme von Dunkel-minus-Dunkel-Spektren. Die finalen Differenzspektren setzen sich aus 10 Wiederholungen zusammen, deren Mittel mit dem der 10 mal 100 Scans der Dunkel-minus-Dunkel-Spektren abschließend verrechnet wurde.

II. Material & Methoden

III. Ergebnisse

III.1 Erweiterung einer Stammsammlung zur gezielten Isotopenmarkierung von Photorezeptoren

Obwohl unter anderem auch Säugetierzelllinien, *Pichia pastoris*, *Lactobacillus casei*, Zellen von *Spodoptera frugiperda* oder *Brevibacillus coshensis* erfolgreich zur Biosynthese isotopenhaltiger Proteine Verwendung finden (Ohki & Kainosho, 2008; Tanio *et al.*, 2009; Takahashi & Shimada, 2010), wird *E. coli* nach Möglichkeit bevorzugt zu diesem Zweck eingesetzt. Dabei weisen existierende Sammlungen Aminosäure-auxotropher Derivate des Enterobakteriums hauptsächlich Einzelgenmutationen auf (McIntosh *et al.*, 1987; Waugh, 1996; Baba *et al.*, 2006) und werden vorrangig für Kernspinresonanz-Studien (NMR) eingesetzt (Strauss *et al.*, 2003; Chen, 2012; Brockerman *et al.*, 2014). Isotopenmarkierungen für IR-spektroskopische Untersuchungen sind mit diesen Stämmen nur bedingt umsetzbar. Die Erweiterung der CmpX13-Sammlung sollte diese Lücke füllen. Ziel war es die Grundlage für *in vivo* Isotopenmarkierungen der Aminosäuren Arginin, Asparagin, Glutamin, Methionin, Phenylalanin und Tryptophan zu schaffen. Außerdem wurde die Eignung von CmpX13 als Expressionssystem für zwei weitere Photorezeptoren geprüft.

CmpX13 eignet sich zur Expression weiterer Photorezeptoren in der Hochzelllichtfermentation

Zum Test der Biosynthese komplexerer Photorezeptoren in CmpX13 wurden die BLUF-regulierte Adenylatzyklase bPAC und der UV-B Rezeptor AtUVR8 aus *Arabidopsis thaliana* ausgewählt. bPAC ist im Gegensatz zu PixD für die Studie der Effektoraktivierung durch die lichtsensitive Domäne geeignet, während AtUVR8 aufgrund seines eukaryotischen Ursprunges und des intrinsischen Chromophors aus Tryptophanseitenketten mechanistisch interessant ist (Christie *et al.*, 2012; Di Wu *et al.*, 2012). Für die Aufklärung der Signaltransduktion beider Proteine werden seit kurzem IR-Studien durchgeführt (Stierl *et al.*, 2014; Heilmann *et al.*, 2015), wobei ihre Synthese bisher in *E. coli* BL21(DE3) und BL21(DE3)-pLysS erfolgt (Stierl *et al.*, 2011; Christie *et al.*, 2012; Di Wu *et al.*, 2012). Wie die hier gezeigten Testexpressionen belegen (Abb. III-1.A), können bPAC und AtUVR8 auch in CmpX13 exprimiert werden. Die IMAC-gereinigten Proteinlösungen wurden dabei ohne weitere Anpassungen des Hochzelllichtfermentationsprotokolls für PixD gewonnen. Ihre elektrophoretische Analyse zeigte jedoch für beide Photorezeptoren starke Kontaminationen, die in weiteren Reinigungsschritten abgetrennt werden müssen (Abb. III-1.A). Um die Ausbeuten in CmpX13 zu erhöhen und genügend Ausgangsmaterial für folgende Reinigungsschritte zu erhalten, können Variationen der Temperatur, der Konzentration des Induktors und der Expressionsdauer getestet werden.

Das AtUVR8-Signal wurde sicher identifiziert, da seine Dimere (ca. 120 kDa) erst unter Applikation von UV-B Licht oder Inkubation bei 95 °C zerfallen (Rizzini *et al.*, 2011). Die Anwesenheit von bPAC konnte hingegen anhand seiner UV/*vis* Absorption gezeigt werden. Sie ähnelt der von PixD sehr und ist nur um wenige Nanometer blauverschoben (Abb. III-1.B). Die gewonnenen Proteinmengen wurden mit Hilfe der Absorptionsintensitäten bei 290 bzw. 440 nm unter Berücksichtigung des Molekulargewichts abgeschätzt.

III. Ergebnisse

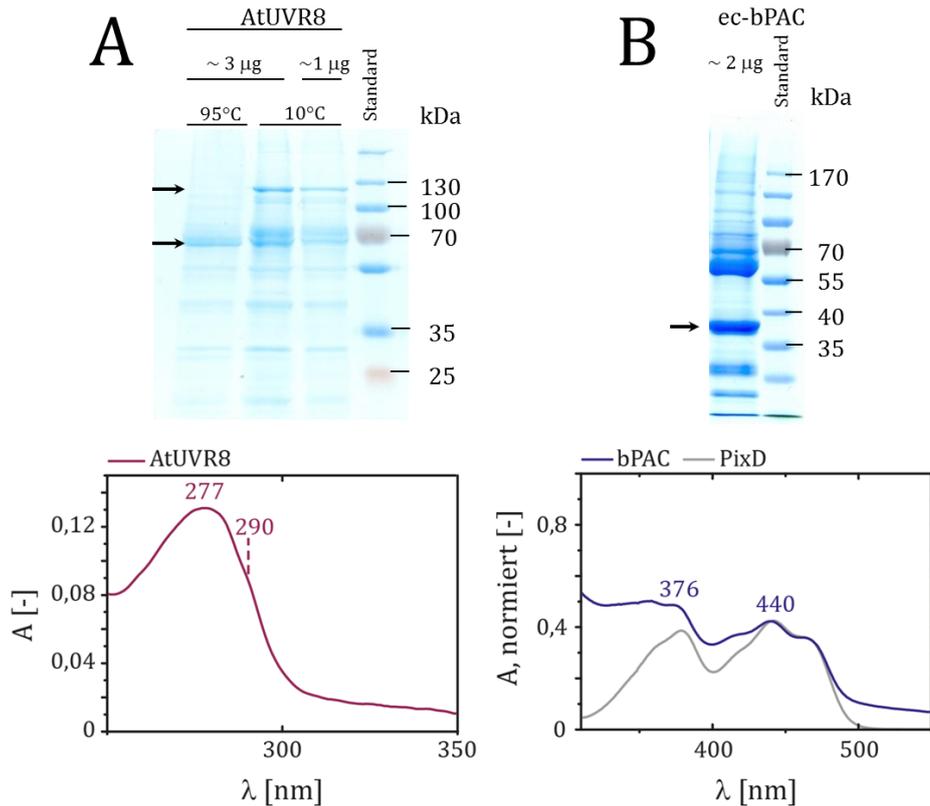


Abb. III-1 – Expression von AtUVR8 und bPAC in *E. coli* CmpX13 unter Hochzelldichtebedingungen

Gezeigt sind die SDS-PAGE und das UV/*vis*-Spektrum je eines Isolates der Photorezeptoren. A) Die Dimere des UV-Rezeptors AtUVR8 können in der SDS-PAGE durch den Vergleich von aufgekochten und unaufgekochten Proben identifiziert werden. Das UV/*vis*-Spektrum zeichnet sich durch eine Schulter bei 290 nm aus. B) Die Präparation von bPAC erreichte nicht die Reinheit, die Dr. Stierl mit dem Stamm BL21(DE3) erzielt (Stierl, 2013). Außerdem wies die Absorption ab 350 nm auf eine erhöhte Streuung der Probe hin. Die verwendeten Plasmide pET21-UVR8-HS und pET28a-ec-bPAC (ec = Codon adaptiert für *E. coli*) wurden freundlicherweise von Manuela Stierl (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Hegemann, Berlin) und Monika Heilmann zur Verfügung gestellt (Arbeitsgruppe von Dr. Gareth Jenkins, Glasgow).

Die Erweiterung der CmpX13-Stammsammlung

Um IR-spektroskopische Untersuchungen zu unterstützen sind Isotopenmarkierungen von allen kanonischen Aminosäuren erstrebenswert. Dr. Mathes gelang mit Anlegung der CmpX13-Sammlung bereits die Abdeckung von sechs (C, H, N, Q, W, Y) der 21 proteinogenen Aminosäuren in *E. coli*, wovon zwei (Q, W) mit einer RF-Auxotrophie kombiniert sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen die Glutamin- und Asparagin-defizienten Stämme weiterzuentwickeln. In Zusammenarbeit mit Tom Lindtner wurde außerdem eine Verbesserung des Tryptophan-Auxotrophen angestrebt. Ziel war es, die Isotopenstreuung dieser Aminosäuren zu unterbinden, um Doppelmarkierungen von Aminosäuren und Chromophor, sowie reinere Markierungsmuster zu ermöglichen. Darüber hinaus wurde die Sammlung um CmpX13-Derivate ergänzt, die kein Arginin, Methionin, oder Phenylalanin synthetisieren können. Mit Herstellung der Multimutante CpXFΔQWYv5* sollte dagegen die Basis für eine simultane Markierung wichtiger Reste in BLUF-Domänen geschaffen werden. Anhand eines solchen Datensatzes könnten theoretische Kalkulationen getestet und optimiert werden. Die Genotypen aller Stämme sind in Tab. II-A zu finden.

Tab. III-A fasst die erzeugten Stämme und ihre Wachstumseigenschaften zusammen. Während die Eigenschaften von CpXΔH in der vorliegenden Arbeit erstmals bestimmt und für Isotopenmarkierungen genutzt wurden, diente CpXFΔW Tom Lindtner als Vergleich mit dessen Derivat (Lindtner, 2016). In Wachstumstests ermittelte Charakteristika waren der Aminosäurekonsum pro Glukosemenge (beschrieben in Abschnitt II.2.2) und die Verdopplungszeit t_d des jeweiligen Stammes im Bereich dieser kritischen Konzentration (Tab. III-A). Gezeigt ist außerdem die Auftragung der Zelldichte in der stationären Phase (OD_{600}) gegen die Aminosäurekonzentration zur Bestimmung des Verbrauchs für alle untersuchten Stämme (Abb. III-2).

Tab. III-A - *Eigenschaften der auxotrophen E. coli Stämme*

Die erzeugten Bakterienstämme gehen entweder auf CmpX13 oder seinen Abkömmling CpXribF zurück. Zur Verdeutlichung der Stammesbezeichnung sind die Auxotrophien separat aufgeführt. Aus dem ermittelten Aminosäurekonsum wurde die für die Fermentation benötigte Menge errechnet. Daneben lassen sich im Vergleich von Mono- und Multideletionen Beeinträchtigungen des Katabolismus der Aminosäure abschätzen. Zum Vergleich der Auxotrophen mit ihrem Vorläufer CmpX13 wurde die Verdopplungszeit (t_d) der logarithmischen Wachstumsphase unter Supplementierung der ermittelten kritischen Aminosäurekonzentration für drei biologische Replikate ($n=3$) graphisch bestimmt, gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. CpXΔH und CpXFΔW wurden von Dr. Mathes zur Verfügung gestellt.

Stamm	Auxotrophien	Verbrauch (g AS / g Glukose)	Verdopplungszeit t_d [h]	
			CmpX13	Mutante
CpXΔH	His	0,00025	$3,5 \pm 0,5$	$3,2 \pm 1,5$
CpXFΔNv2	RF, Asn	0,05	$2,33 \pm 0,74$	$1,9 \pm 0,12$
CpXFΔQv2	RF, Gln	1	$2,0 \pm 0,19$	$2,6 \pm 0,49$
CpXFΔQv3	RF, Gln	1	$2,0 \pm 0,19$	$2,4 \pm 0,47$
CpXFΔQv4	RF, Gln	1	$2,0 \pm 0,19$	$1,8 \pm 0,55$
CpXFΔQv5 ¹ (Glutamator)	RF, Gln	0,5	$2,0 \pm 0,19$	$1,87 \pm 0,09$
CpXΔR	Arg	0,5	$2,5 \pm 0,23$	$2,1 \pm 0,25$
CpXFΔW ²	RF, Trp	0,007	$2,1 \pm 0,09$	$2,5 \pm 0,07$
CpXFΔWv2 ²	RF, Trp	0,0155	$2,1 \pm 0,09$	$2,0 \pm 0,27$
CpXΔF	Phe	0,013	$1,85 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,06$
CpXΔFv2	Phe, Ile	0,013; 0,008	$1,85 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,23$
CpXΔM	Met	0,01	$2,23 \pm 0,4$	$1,84 \pm 0,09$
CpXFΔM	Met	0,01	$2,23 \pm 0,4$	$1,84 \pm 0,09$
CpXFΔQWYv5 ¹	RF, Gln, Trp, Tyr	Nicht bestimmt	-	-

¹Besitzen chromosomal integrierte Resistenzgene, welche nicht durch Expression der Flp-Rekombinase entfernt werden konnten, ²Von Tom Lindtner charakterisiert (Lindtner, 2016)

III. Ergebnisse

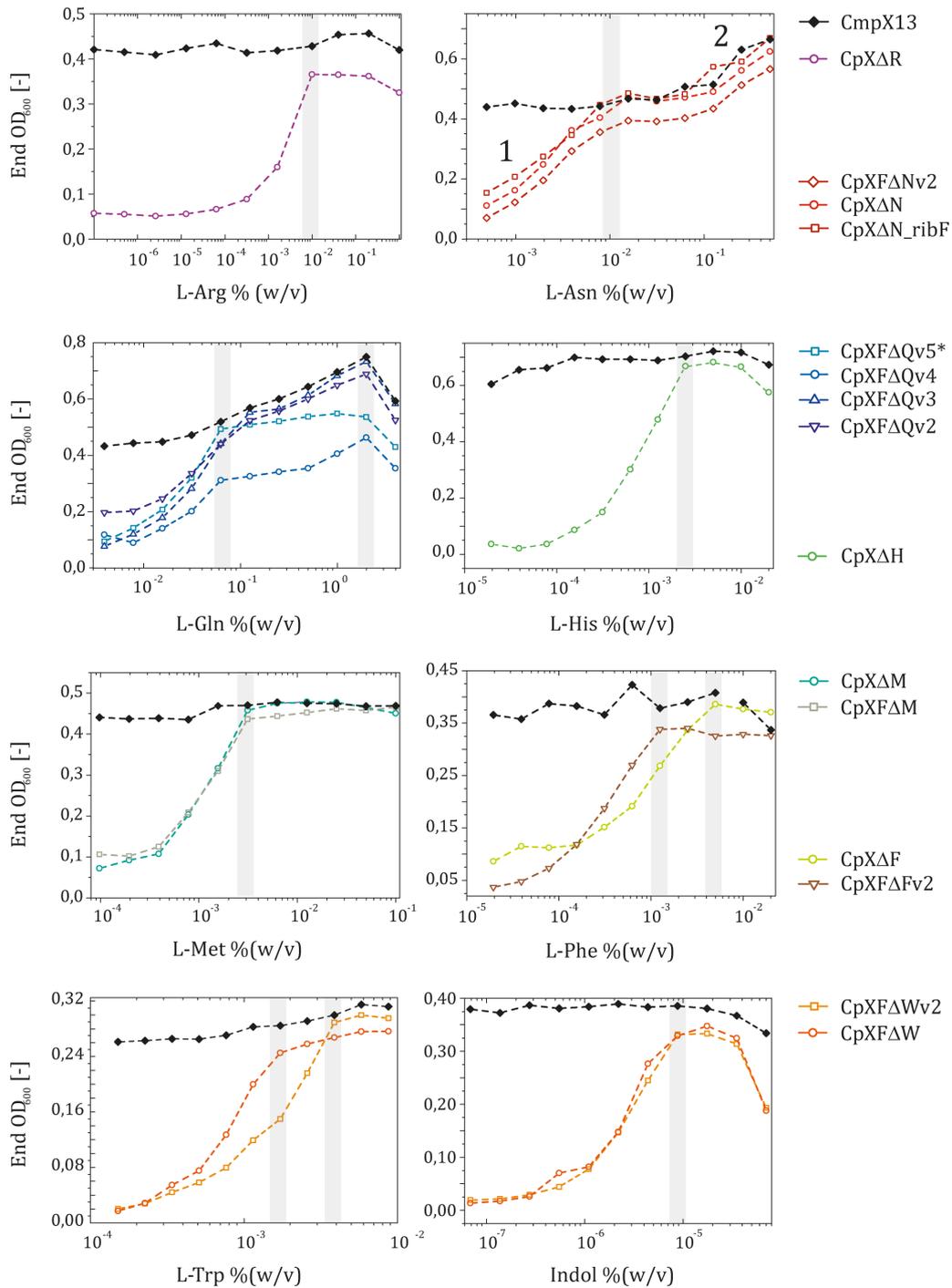


Abb. III-2 – Aminosäureverbrauch der charakterisierten *E. coli* Mutanten

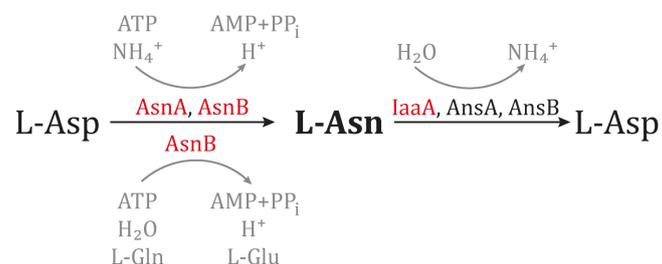
Das Wachstum der Stämme wurde unter über-Nacht-Inkubation bei 37°C und Schütteln im Plate Reader in 96-Well Mikrotiterplatten mit einem Kulturvolumen von 150 µl durch Messung der OD₆₀₀ ermittelt. Für die Bestimmung des Aminosäurebedarfs wurde eine Verdünnungsreihe eingesetzt, die durch eine Kontrolle mit 0 mM der Aminosäure ergänzt war. Aufgetragen ist die erreichte OD₆₀₀ jedes Ansatzes gegen die Konzentration der Aminosäure. Die zum vollständigen Verbrauch der Glukose benötigte Aminosäuremenge kann am Erreichen des Plateaus der Graphen abgelesen werden. Nur für die Asparagin-Auxotrophen wurde keine Sättigung erreicht. Das diauxische Verhalten dieser Kurve (1 und 2) basiert auf der Verwendung von Asparagin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle (Spring *et al.*, 1986), welche durch die vorgenommenen Deletionen nicht unterbunden wurde. Die Wachstumskurven von CpXΔN und CpXΔN_ribF stammen von Helena Steinocher (Steinocher, 2013). Das Wachstum von CpXFΔW und CpXFΔWv2 wurde von Tom Lindtner gemessen (Lindtner, 2016).

Wie aus Tab. III-A hervorgeht war die Generationszeit der Auxotrophen unter limitierenden Bedingungen weitestgehend unbeeinflusst, wobei ihr Aminosäureverbrauch um etwa 0,01 (w/w) schwankte. Eine Ausnahme bildeten Arginin und Glutamin, deren Konsum um das 50- bis 100-fache höher lag. Die Supplementierung von Histidin erreichte dagegen bereits in geringen Mengen maximale Zelldichten (Tab. III-A). Insgesamt liegen diese Ergebnisse im Bereich publizierter Wachstumsbedingungen für auxotrophe *E. coli* Stämme (Anhang Tab. V-A), obwohl in einigen Stämmen sukzessive Mehrfachmutationen eingeführt wurden. Sie sind mit dem Kürzel „v“ (für Version) und einer Zahl gekennzeichnet, welche die steigende Anzahl deletierter Gene wiedergibt (Tab. III-A, grau unterlegt).

Zwar genügen in der Regel Einzelgenmutationen für die Erzeugung einer Aminosäure-Auxotrophie in *E. coli*, ein sauberes Markierungsmusters wird jedoch häufig durch katabolische Prozesse und Umwandlungsreaktionen verhindert. Problematisch ist etwa die Aktivität von Trans- und Desaminasen mit bidirektionaler Katalyse. Unter den bearbeiteten Auxotrophien sind Phenylalanin, Tryptophan und besonders Glutamin sowie Asparagin von Isotopenstreuung betroffen. Da drei dieser Aminosäuren als Ziel für Isotopenmarkierungen in PixD ausgewählt wurden, soll auf die Eigenschaften der Stämme kurz näher eingegangen werden.

Asparagin

Im Fall von Asparagin wurden die Enzyme Asparagin-Synthetase A (AsnA) und Asparagin-Synthetase B (AsnB) sowie die Asparaginase III (IaaA) aus dem Genom entfernt (Tab. II-A). Ihre Aktivitäten führen zur Isotopenstreuung von Glutamin in Asparagin bzw. von Asparagin in Aspartat. Zusätzlich besitzt *E. coli* die Asparaginase II (AnsB), welche nur unter anaeroben Bedingungen mit geringer Zuckerversorgung exprimiert wird und die Asparaginase I (AnsA). Letztere ist für die Nutzung von Asparagin als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle verantwortlich (Del Casale *et al.*, 1983). Wie das diauxische Wachstumsverhalten der auxotrophen Stämme zeigt (Abb. III-2), konnte die Versorgung mit Ammonium den Abbau der Aminosäure durch AnsA nicht verhindern, der später in Versuchen zur Isotopenmarkierung von PixD bestätigt wurde (Anhang Abb. V-12).

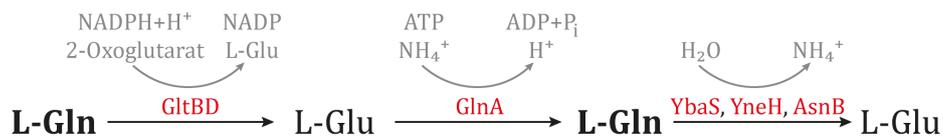


Glutamin

Für die Unterdrückung von Isotopenstreuung stellt Glutamin als zentraler Metabolit im Stoffwechsel, ebenso wie Asparagin, Aspartat und Glutamat, eine besondere Herausforderung dar. So besteht ein Nachteil genetischer Modifikationen darin, dass multiple Gendelektionen Auswirkungen auf die Wachstumsansprüche der Bakterien ausüben und zu Kreuzdefizienzen führen können (z.B. Phenylalanin und Isoleucin Tab. III-A).

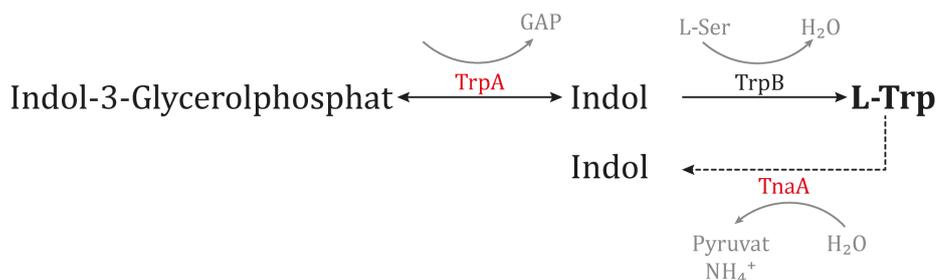
III. Ergebnisse

Um vorerst zusätzliche Auxotrophien zu verhindern, fokussierten die addierten *Knock-outs* im Glutamin-auxotrophen CpXFΔQv2 auf die Glutaminasen YneH, YbaS und die Glutamat-Synthase GltB. Der finale Stamm CpXFΔQv5* wurde daher als "Glutamator" bezeichnet. Er zeigte einen um etwa 50 % reduzierten Aminosäureverbrauch (Abb. III-2), besitzt jedoch eine Chloramphenicol-Resistenzkassette im *yneH* Locus (Tab. II-A). Aufgrund der chromosomalen Akkumulation von FRT-Erkennungssequenzen in Multimutanten führte die Expression der FLP-Rekombinase ab einer Maximalanzahl vermutlich zur Entfernung ganzer Chromosomenteile und zerstörte die genetische Integrität der Klone. Infolgedessen konnten die Resistenzkassetten im Glutamator und dem Multiauxotrophen CpXFΔQWYv5* nicht entfernt werden (Tab. III-A). Letzterer wurde für Kombinationsmarkierungen von Y8, Q50, W91 und dem Flavin-Chromophor entworfen.



Tryptophan

Anders als Asparagin und Glutamin kann Tryptophan als terminale Aminosäure eingestuft werden. Für seine Synthese wird der Enzymkomplex TrpAB benötigt, der zwei Teilreaktionen katalysiert (Miles & Moriguchi, 1977). Der Abbau durch die Tryptophanase TnaA führt zur Freisetzung von Ammonium und Pyruvat (Li & Young, 2013). Hier wird nur die initiale Abspaltung der Seitenkette enzymatisch unterstützt. Pyruvat wird dagegen unter spontanem Zerfall gebildet (Keseler *et al.*, 2013), weshalb die Degradation von Tryptophan zu Indol im Reaktionsschema mit einer gestrichelten Linie dargestellt ist. Da diese Reaktion eine relativ hohe katabolische Isotopenstreuung für diese Aminosäure erzeugen kann, sollte sie mit der Entwicklung des *tnaA*-defizienten CpXFΔWv2 durch Tom Lindtner unterbunden werden (Lindtner, 2016). Interessanterweise verdoppelte die zusätzliche Deletion den Tryptophankonsum, im Vergleich zum Vorgänger CpXFΔW (Abb. III-2). Die für optimales Wachstum benötigte Menge an Indol war jedoch in beiden Stämmen gleich. Es ist anzunehmen, dass diese Beobachtungen aus der physiologischen Rolle des Indols resultieren. Das Molekül reguliert unter anderem die Zellteilung und dient als Kommunikationssignal (Hu *et al.*, 2010). Die fehlende Produktion von Indol kann daher Einfluss auf die globale Genexpression nehmen und auf diese Weise zu einem erhöhten Tryptophan-Bedarf führen.



Proteinausbeuten und Markierungseffizienz der auxotrophen Stämme

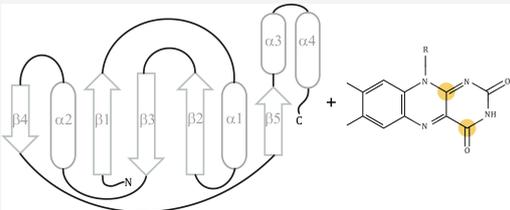
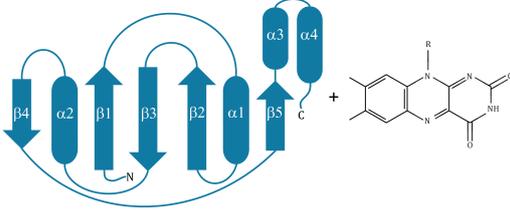
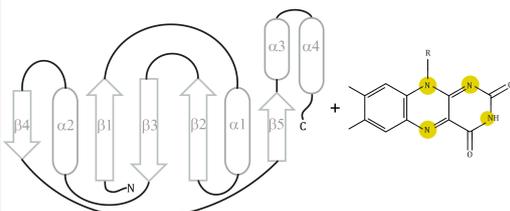
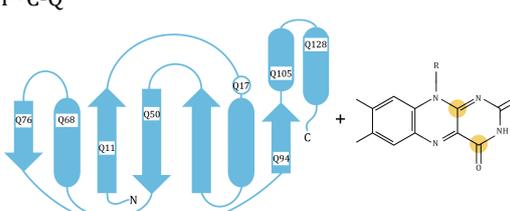
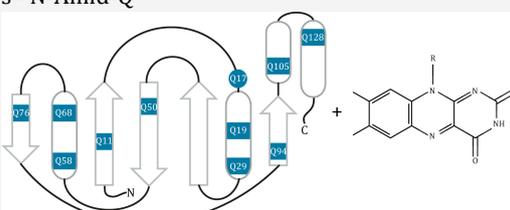
Im Anschluss an die Verifizierung der chromosomalen Veränderungen und der Bestimmung der optimalen Wachstumsbedingungen der Auxotrophen erfolgte die Prüfung ihrer Proteinexpression. CpXribF und CpXΔH eingeschlossen, wurden sieben der erzeugten auxotrophen *E. coli* Stämme für die nachfolgend vorgestellten Isotopenmarkierungen von PixD verwendet (Tab. III-B). Wie in den Abschnitten II.2.4 und II.4.1 beschrieben, waren für eine Kofaktor-Markierung die jeweiligen RF-Isotopomere von Beginn an in der Fermentation zugesetzt. Für inverse Muster erfolgte die ¹³C- bzw. ¹⁵N-Zugabe erst nach dem vollständigen Verbrauch des unmarkierten Substrats, um hohe Zelldichten beim Start der Proteinexpression zu erhalten. Da aufgrund fehlender Schnelltests für Aminosäuren deren Verbrauch mit der Glukosemenge korreliert wurde, leitete das Fermentationssystem auch isotopenmarkierte Aminosäuren erst in die Bakterienkultur, wenn keine Glukose mehr vorhanden war. Mit diesen Strategien wurden die in Tab. III-B aufgeführten Proteinausbeuten und Markierungseffizienzen erzielt. Die Ausbeuten schwankten dabei stark, in Abhängigkeit von Stamm, Vitalität der Zellen und den gewählten Substratbedingungen, zwischen 200 µg und 8 mg je Gramm nasser Zellmasse.

Der Markierungsgrad aller Proben wurde in massenspektrometrischen Messungen von Dr. Sebastian Beck (Institut für Chemie, Humboldt-Universität zu Berlin) untersucht. Seine Ergebnisse sind in Tab. III-B zusammengefasst. Da im Peptidmassefingerabdruck nicht alle zu erwartenden Peptide detektiert wurden, sind im Mittel etwa 48 % des Gesamtproteins von der Analyse abgedeckt. Die Effizienz entspricht der durchschnittlichen Abundanz des massenspektrometrischen Signals mit dem gewünschten Isotopenmuster. Nur die selektiven Markierungen von Apoprotein, Riboflavin oder Histidin zeigten keine Streuung der Isotopen in andere Reste des Photorezeptors. Für die Isotopenmuster von Asparagin, Glutamin und Tryptophan fand Dr. Beck, trotz Verwendung der weiterentwickelten Stämme, verbleibende Streuung in andere Aminosäuren (Anhang Abb. V-5 – 7, Abb. V-12). Dadurch entstanden sowohl Über- als auch Untermarkierungen der spezifischen Reste. Außerdem war unter den gefundenen Peptiden der Glutaminmarkierungen überraschenderweise keine einheitliche Isotopenverteilung feststellbar (Anhang Abb. V-5, Abb. V-6). Zur Bewertung der Signifikanz isotopeninduzierter Bandenverschiebungen im IR wurden daher Vergleiche zu reinen Protein- oder Flavinmarkierungen herangezogen (Abschnitt III.2).

III. Ergebnisse

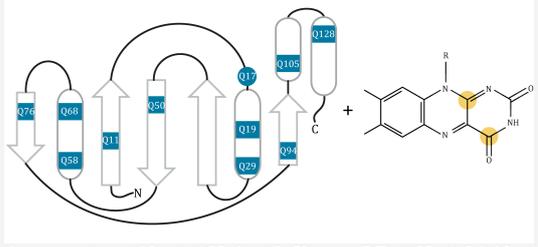
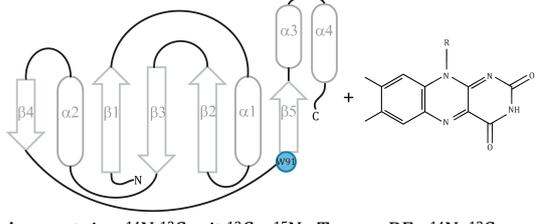
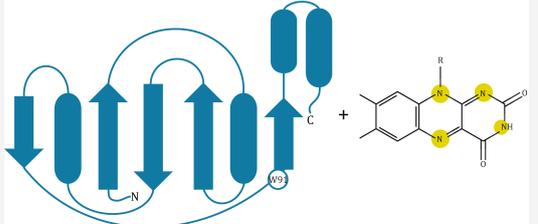
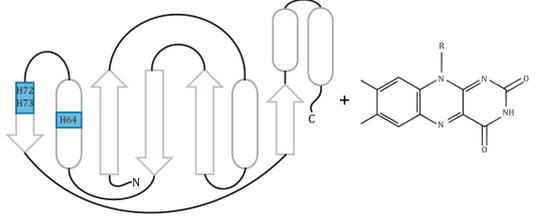
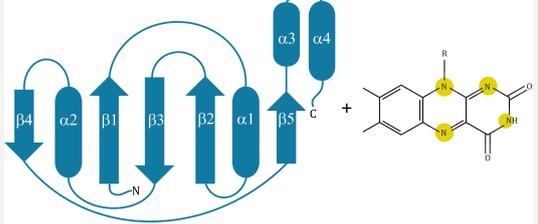
Tab. III-B - Angefertigte Isotopenmuster für PixD

Aufgeführt sind die Bezeichnung der Proben und die Form der Isotopenmarkierung. Zur Verdeutlichung des jeweiligen Musters wurden die markierten Anteile des Apoproteins in der BLUF-Topologiekarte (blau) und des Isoalloxazinringes vom Chromophor (gelb) gekennzeichnet. Daneben sind die Ausbeute der gemessenen Proteinprobe in Milligramm Protein je Gramm nasser Zellmasse sowie eine Zusammenfassung der massenspektrometrischen Resultate angegeben.

Isotopenmuster	Ausbeute [mg/g]	Massenspektrometrie		
		Abdeckung	Effizienz	Streuung
<p>s¹³C₄,10a-RF</p> 	1,53	41 %	> 90 %	Nein
<p>Apoprotein u¹²C i¹⁵N-RF</p> <p>RF u¹⁴N ¹³C₄,10a</p> 	4,12	32 %	> 90 %	Nein
<p>Apoprotein u¹⁵N u¹⁵N-RF¹</p> <p>RF u¹⁴N, ¹²C</p> 	ca. 4	-	> 90 %	Nein
<p>Apoprotein u¹⁴N i¹³C-Q</p> 	0,94	44 %	70 - 80 %	Ja
<p>Apoprotein ¹³C mit ¹²C-Gln s¹⁵N-Amid-Q</p> <p>RF u¹⁴N, ¹³C₄,10a</p> 	1	26 %	< 50 %	Ja
<p>Apoprotein u¹⁴N mit ¹⁵N-Amid-Gln</p> <p>RF u¹⁴N, u¹²C</p>				

¹ Von Helena Steinocher und Tom Lindtner unter Anleitung hergestellt.

Fortsetzung Tab. III-B

Isotopenmuster	Ausbeute [mg/g]	Massenspektrometrie		
		Abdeckung	Effizienz	Streuung
<p>$s^{13}C4,10a$-RF, ^{15}N-Amid-Q</p> 	0,2	42 %	< 50 %	Ja
<p>Apoprotein $u^{14}N$ mit ^{15}N-Amid-Gln RF $u^{14}N$, $^{13}C4,10a$</p>				
<p>sW</p> 	8,1	99,5 %	> 70 %	Ja
<p>Apoprotein $u^{14}N,^{12}C$ mit $^{13}C11,^{15}N_2$-Trp $i^{15}N$-W1 RF $u^{14}N$, ^{12}C</p>				
	ca. 4	37 %	> 70 % ²	Ja
<p>Apoprotein $u^{15}N$ mit ^{14}N-Trp RF $u^{15}N$, ^{12}C</p>				
	0,28	69 %	~ 87 %	Nein
<p>Apoprotein $u^{14}N,^{12}C$ mit $^{13}C_6,^{15}N_3$-His $u^{15}N^1$ RF $u^{14}N$, ^{12}C</p>				
	ca. 2	>95 % ³	> 70 %	Nein
<p>Apoprotein $u^{15}N$ RF $u^{15}N$, ^{12}C</p>				

¹ Von Helena Steinocher und Tom Lindtner unter Anleitung hergestellt.

² Im Massenspektrum überlagerten unspezifische Signale (Lindtner 2016), die Markierungseffizienz wurde daher von der sW -Markierung abgeleitet

³ Die massenspektrometrische Analyse schlug fehl, daher kann der Markierungsgrad nur am FT-IR Spektrum abgeschätzt werden. Das Spektrum stimmt jedoch weitestgehend mit dem der iW -Probe überein, wodurch die Effizienz ebenfalls über 70 % betragen sollte.

III.2 Die Wasserstoffbrückenkonfiguration der FAD-Bindetasche in Dunkel- und Signalzustand von PixD

Die aktuelle Zuteilung der Schwingungssignaturen des LmD-Differenzspektrums von PixD basiert auf der Analyse uniformer Markierungen des Chromophors oder des Apoproteins in H₂O und D₂O (Masuda *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*, 2005). Dies ermöglicht zunächst die Zuordnung von Chromophor- und Apoproteinsignalen mit Eingrenzung auf kohlenstoff- und stickstoffhaltige Bindungen. Für eine Feinzuordnung werden die FT-IR Spektren von Mutanten herangezogen (Masuda *et al.*, 2008). Um die teils globalen strukturellen Effekte von Aminosäuresubstitutionen zu umgehen, stützte sich diese Arbeit auf Reste-spezifische Isotopenmuster und ergänzte uniforme und selektive Markierungen des Chromophors sowie des Apoproteins. Eine Identifizierung von Bindungen mit Kopplung an Hydroxy- und Amino-Gruppen wurde durch Deuterierung des PixD-Wildtyps wiederholt. Dafür wurde der möglichst vollständige Austausch zugänglicher Protonen durch Deuteronen mit Hilfe einer 1000-fachen Verdünnung der Protonen angestrebt. Anhand dieser umfassenden Datensätze und den publizierten FT-IR Spektren ließen sich bestehende Schwingungszuordnungen des Absorptionsspektrums von PixD im mittleren Infrarot zwischen 1000 - 1800 cm⁻¹ neu evaluieren und weitere Signale interpretieren.

III.2.1 Zuordnung von Signalen des Chromophors und des Apoproteins

Die erzeugten Proben umfassten neben einer ¹⁵N-Inkorporation in das Apoprotein i¹⁵N-RF, die uniforme ¹⁵N-Markierung des Holo proteins u¹⁵N* sowie des Chromophors u¹⁵N-RF*, (*von Helena Steinocher unter Anleitung hergestellt; Steinocher, 2013), und eine selektive mit schweren Isotopen an den Atomen C4 und C10a des Flavins s¹³C4,10a-RF (Tab. III-B). In die Auswertung wurden außerdem LmD-Differenzspektren einer uniformen ¹³C-Markierung des Kofaktors u¹³C-RF von selektiven Mustern mit schweren Isotopen an Flavin C2 und N5 s¹³C2-RF, s¹⁵N5-RF (Anhang Abb. V-10) sowie einer Probe mit ¹³C-markiertem Apoprotein ¹³C-RF einbezogen (alle Daten freundlicherweise von Dr. Tilo Mathes zur Verfügung gestellt). Es wäre auch möglich selektive Isotopenmarkierung des Flavins für PixD durch Rekonstitution mit dem Kofaktor *in vitro* zu erzielen (Zirak *et al.*, 2007b). Mit diesem Verfahren hergestellte Markierungen wurden für PixD allerdings bisher nicht publiziert. Signalverschiebungen sind nachfolgend in einigen Abbildungen mit z.B. „a“ für Position unmarkiert und „a“ für Position markiert gekennzeichnet.

Carbonylschwingungen des Chromophors und des Apoproteins

Die vorrangig der Flavin $\nu(\text{C4O4})$ zugeordneten Signale um (-)1712/(+)1693 cm⁻¹ im LmD-Differenzspektrum von PixD bilden die Absorptionsmaxima mit höchster Intensität (Abb. III-3.A a). Vergleichbare Banden treten in den IR-Absorptionsspektren aller untersuchten BLUF-Proteine auf (Masuda *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2007; Masuda *et al.*, 2005a; Ren *et al.*, 2012; Brust *et al.*, 2013) und weisen auf die Stärkung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen Protein und Flavin C4O4 hin, die mit der gleichen Zerfallskonstante abklingt wie der rotverschobene Zustand (Hasegawa *et al.*, 2005). Jedes hier betrachtete Isotopenmuster unterstützt diese Zuordnung.

Wie aus Abb. III-3.C ersichtlich ist, wurden die C4O4-Banden erwartungsgemäß bei selektiver Markierung der Kohlenstoffe C4 und C10a des Chromophors ($s^{13}C4,10a$ -RF) nach (-)1685 und (+)1669 verschoben (Abb. III-3.C a'). Das zur Verfügung gestellte Spektrum der uniformen ^{13}C -Markierung des Flavins (Dr. T. Mathes) zeigt im Vergleich eine nur um 2 cm^{-1} stärkere Frequenzverringering (Abb. III-3.A b). Dabei kommt es durch die Verschiebung der (+)1693 Bande nach (+)1667 cm^{-1} zu einer Überlagerung mit dem Signal bei (-)1670 cm^{-1} , was in einem starken Intensitätsverlust des Lichtzustandsignals resultiert (Abb. III-3.A c). Neben diesen Markierungen bestätigte auch die Substitution austauschbarer Protonen gegen Deuteronen in einer unmarkierten Probe die Identität der C4O4-Bindung, da sie mit den Flavin-N3H-Schwingungen gekoppelt ist (Abb. III-3.D d). Die lichtinduzierte Ausbildung oder Stärkung einer Wasserstoffbrücke zum Flavin C4O4 wurde hingegen durch die uniforme Markierung aller Stickstoffatome des Apoproteins ($i^{15}N$ -RF) widergespiegelt, welche eine Frequenzverringering der $\nu(C4O4)$ auf (+)1690 cm^{-1} (e) hervorrief (Abb. III-3.B).

Zwischen 1690 und 1700 cm^{-1} scheint jedoch nicht nur die Flavin $\nu(C4O4)$ zu absorbieren. Bei $u^{13}C$ - und $s^{13}C4,10a$ -RF-Markierung werden überdeckte Proteinschwingungen mit kleinen Amplituden um (-)1710 und (+)1694 cm^{-1} (Abb. III-3.C f) sichtbar (in Zusammenarbeit mit Dr. Mathes gezeigt, Abb. III-3.A, C). Diese Signale beschreiben möglicherweise eine Bindung in Grund- und Lichtzustand, da die Deuterierung der $u^{13}C$ -RF-Probe beide Absorptionsbanden verschwinden lässt (Dr. Mathes, persönliche Mitteilung). Demnach ist die Aminosäureseitenkette, deren Schwingungen bei (+)1694 und (-)1710 cm^{-1} absorbieren, an funktionelle Gruppen mit austauschbaren Protonen gekoppelt. Außerdem erfährt die Bindung mit 16 cm^{-1} eine ähnlich starke Frequenzverringering bei Blaulichtillumination wie die $\nu(C4O4)$ des Flavins. Solche Schwingungsänderungen können auf der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke oder einer Konformationsänderung beruhen, welche Einfluss auf die Elektronendichte der Bindung oder die Kopplung mit anderen Schwingungen nimmt (Barth & Zscherp 2002). Das $u^{13}C$ -Spektrum lässt vermuten, dass um 1694 cm^{-1} noch mindestens eine weitere flache Bande überlagert (Abb. III-3.C g). Die hohe Schwingungsfrequenz der verdeckten Signale stimmt mit Seitenkettensignaturen von Arginin, Asparagin, Aspartat, Glutamin oder Glutamat überein (Barth 2000; Wolpert & Hellwig 2006). Unter ihnen liegen vermutlich nur Arg, Asn und Gln unter den experimentellen Bedingungen bei pH 8,0 protoniert vor und würden die, von Dr. Mathes beobachtete, Deuterierungssensitivität aufweisen.

In den ersten FT-IR Studien an PixD postulieren Masuda *et al.*, 2004, dass die Flavinkoordination im P_{red} Zustand auch am C2-Carbonyl verstärkt wird. Diese Annahme resultiert aus ihrer Interpretation der Signale (-)1670/(+)1653 als C2-Carbonyl-Streckschwingungen, welche auf früheren theoretischen Kalkulationen und Raman-spektroskopischen Untersuchungen basiert (Masuda *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*, 2004). $^{13}C2$ -RF induziert im gesamten Amid I Bereich des PixD-Spektrums jedoch keine Frequenzverschiebungen (Anhang Abb. V-10.A) und steht damit im Widerspruch zu großen Änderungen der $\nu(C2O2)$.

III. Ergebnisse

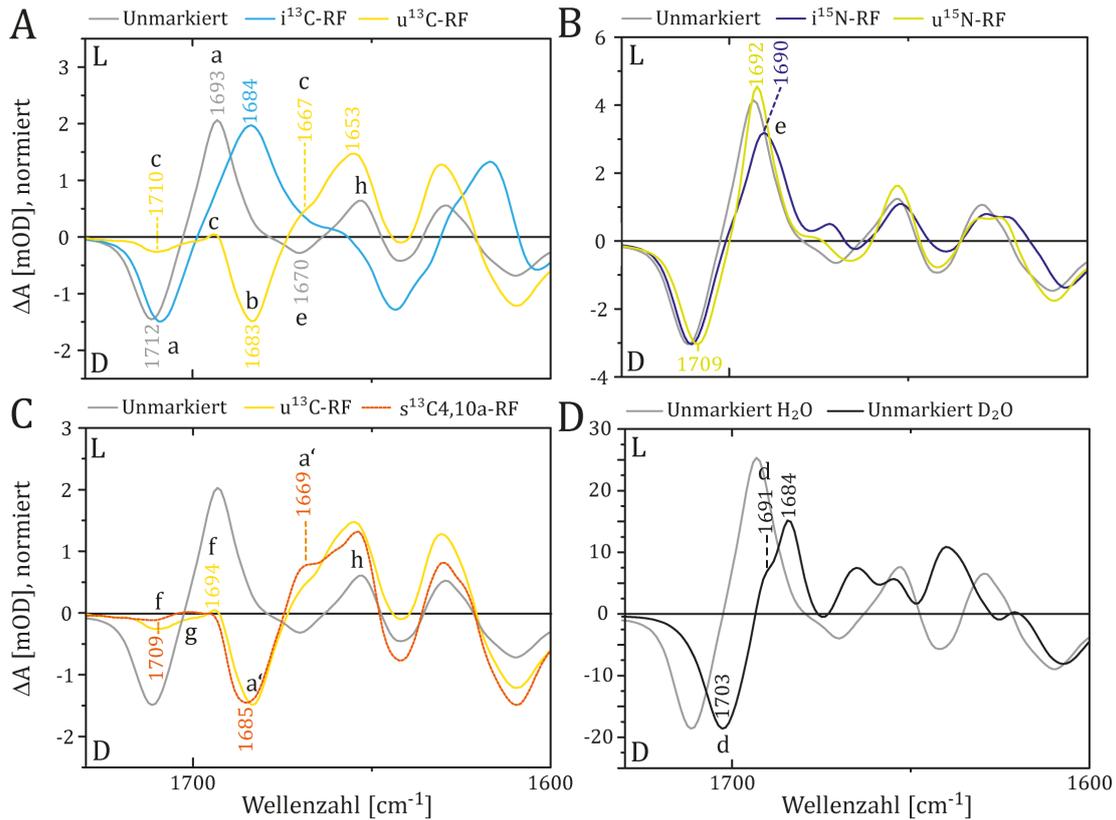


Abb. III-3 – Frequenzbereich 1600 - 1730 cm^{-1} von uniformen und inversen Isotopenmarkierungen des Chromophors in PixD

Ein Vergleich selektiver und inverser ^{13}C - bzw. ^{15}N -Markierungen diente der Unterscheidung von kohlenstoff- und stickstoffhaltigen oder gekoppelten Schwingungen des Apoproteins (A, B) und des Kofaktors A, B, C), während der Ersatz austauschbarer Protonen gegen Deuteronen (D) eine Beteiligung von Hydroxy- und Aminogruppen an den Banden anzeigte. Im hochfrequenten Teil des Messbereiches erscheinen die prominenten (-)1712/(+)1693 Signale der Flavin $\nu(\text{C4O4})$ mit einer geringen Beteiligung der C4N3-Schwingung. Allerdings wurden in den Spektren der u^{13}C -RF und $^{13}\text{C}_{4,10\text{a}}$ -RF-Proben auch Signale bei (-)1709/1710 und (+)1694 cm^{-1} sichtbar (c), die dem Apoprotein zugeordnet werden können. Die Banden der Amid I Region um 1650 cm^{-1} repräsentieren hauptsächlich C=O-Streckschwingungen des Proteinrückgrates (Barth & Zscherp, 2002). Die Spektren wurden auf die Dunkelzustandsschwingung der unmarkierten Probe bei 1712 cm^{-1} normiert. Die Datensätze u^{13}C -RF und i^{13}C -RF wurden von Dr. Tilo Mathes zur Verfügung gestellt. Helena Steinocher ist Urheberin des u^{15}N -RF Spektrums (Steinocher, 2013).

Bei selektiver Isotopenmarkierung von C4 und C10a oder allen Kohlenstoffatomen im Flavin erschien die (-)1670 Bande von der (+)1667 Bande überlagert (Abb. III-3.A, Abb. III-4.A a), wodurch die Analyse einer potenziellen Änderung unmöglich wurde. Eine Interpretation als Schwingung des Isoalloxazinringes könnte die Verschiebung um -4 cm^{-1} in einer u^{15}N -RF-Markierung erlauben (Abb. III-4.B b). Deutlich stärkere Frequenzminderungen der (-)1670 Bande, um wahrscheinlich 27 cm^{-1} , induzierte allerdings eine uniforme ^{13}C -Markierung des Apoproteins (Abb. III-4.A c), während das Minimum in der entsprechenden ^{15}N -Variante bei (-)1664 absorbierte (Abb. III-4.B d). Das Signal repräsentiert daher entweder eine Überlagerung von stickstoffgekoppelten Protein-CC/CO- mit Flavin-CC/CN-Schwingungen oder ein reines Apoproteinsignal, das durch eine starke Wasserstoffbrücke an Oszillationen der Flavin-Atome gekoppelt ist. Als Ursprung kommen das Proteinrückgrat oder das Q50 in Frage.

Eine Zusammengehörigkeit der (-)1670 und (+)1653 Banden ließ sich anhand der gezeigten Markierungsmuster ausschließen. Das positive Signal erschien in allen Flavin-Mustern an gleicher Position wie in der Kontrolle (Abb. III-3.B, C h; Anhang Tab. V-C). Nur die Intensität war erhöht, wahrscheinlich durch dorthin versetzte Banden aufgrund der ^{13}C -Isotope im Kofaktor. In ihrer Studie von 2004 führen Masuda *et al.* zusätzlich eine Beteiligung der Amid I Schwingung an der (+)1653 cm^{-1} Bande ein. Diese Zuordnung wurde durch die starke Frequenzminderung des Signals um -36 cm^{-1} in der $i^{13}\text{C}$ -RF-Markierung unterstützt (Abb. III-4.A e; Anhang Tab. V-C). Neben (+)1653, zeigten auch die Banden (-)1642 [f \rightarrow f'], (+)1631 [g \rightarrow g'], die Schulter bei (+)1623 cm^{-1} [h \rightarrow h'] sowie die bei (-)1610 [i \rightarrow i'] absorbierende Schwingung Verschiebungen um rund -40 cm^{-1} durch ^{13}C -Markierung des Apoproteins, mit leichter Kopplung an Stickstoffatome (Abb. III-4.B; Anhang Tab. V-C). Zusammen bilden sie die Amid I Signaturen von PixD, die auf eine von α -Helices dominierte Struktur hinweisen (Masuda *et al.*, 2004). Außerdem werden bei $i^{13}\text{C}$ -Markierung des Apoproteinanteils zwischen 1620 - 1640 cm^{-1} Schultern sichtbar, deren Signale im unmarkierten Wildtyp offenbar verdeckt sind. Sie stammen entweder von weiteren Schwingungen des Proteinrückgrats, oder stellen Signaturen von Aminosäureseitenketten dar. In diesem Frequenzbereich treten beispielsweise Arginin- und Lysin- Schwingungen auf (Barth & Zscherp, 2002).

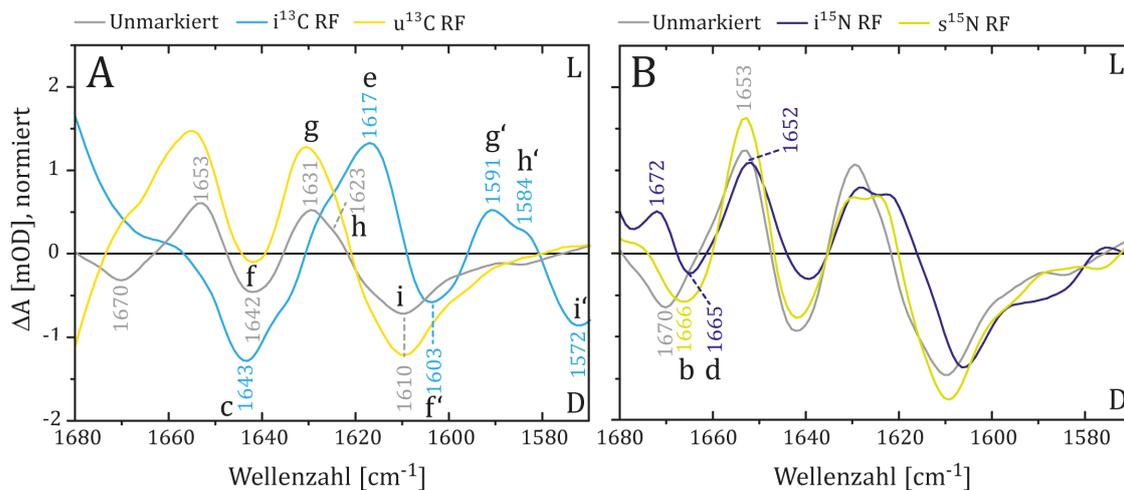


Abb. III-4 – Detailsicht für die Frequenzänderungen der Signale (-)1670 und (+)1653 cm^{-1}

Ausschnitte der LmD-Differenzspektren von PixD mit (A) ^{13}C -Markierungen und (B) ^{15}N -Markierungen des Chromophors oder Apoproteins. Gezeigt ist die Amid I Region, in der schwerer Kohlenstoff besonders starke Frequenzänderungen verursachte.

Der Einfluss austauschbarer Protonen auf die Amid II Region

In der Region um 1550 cm^{-1} werden die Amid II Schwingungen erwartet, welche sich aus CN-Streck- und NH-Biegeschwingungen zusammensetzen (Barth & Zscherp, 2002). Sie zeigen gewöhnlich eine deuterierungsinduzierte Entkopplung, bei der sich die CN-Oszillationen nach $1460 - 1490 \text{ cm}^{-1}$ (Amid II') verschieben und die NH-Schwingungen zwischen $900 - 1070 \text{ cm}^{-1}$ erscheinen (Barth & Zscherp, 2002).

III. Ergebnisse

Die Absorption von CN-Schwingungen des PixD-Apoproteins bei (-)1516 und (+)1531 cm^{-1} wird durch die inversen RF-Muster unterstützt. Sie verursachten in der Amid II Region des PixD-Differenzspektrums starke Frequenzminderungen um 7 - 18 cm^{-1} (Abb. III-5.A und B a \rightarrow a', Anhang Tab. V-C). Nach D_2O -Austausch für PixD ähnelte der Frequenzbereich 1500 - 1600 cm^{-1} allerdings der Absorption in H_2O , wobei die Signale (+)1512, (-)1500 und (+)1475 der Amid II' entsprechen könnten (Abb. III-5.D b) und im niederfrequenten Bereich nur die Banden (+)1088 und (+)1074 von der Kontrolle abwichen (Abb. III-7.D F).

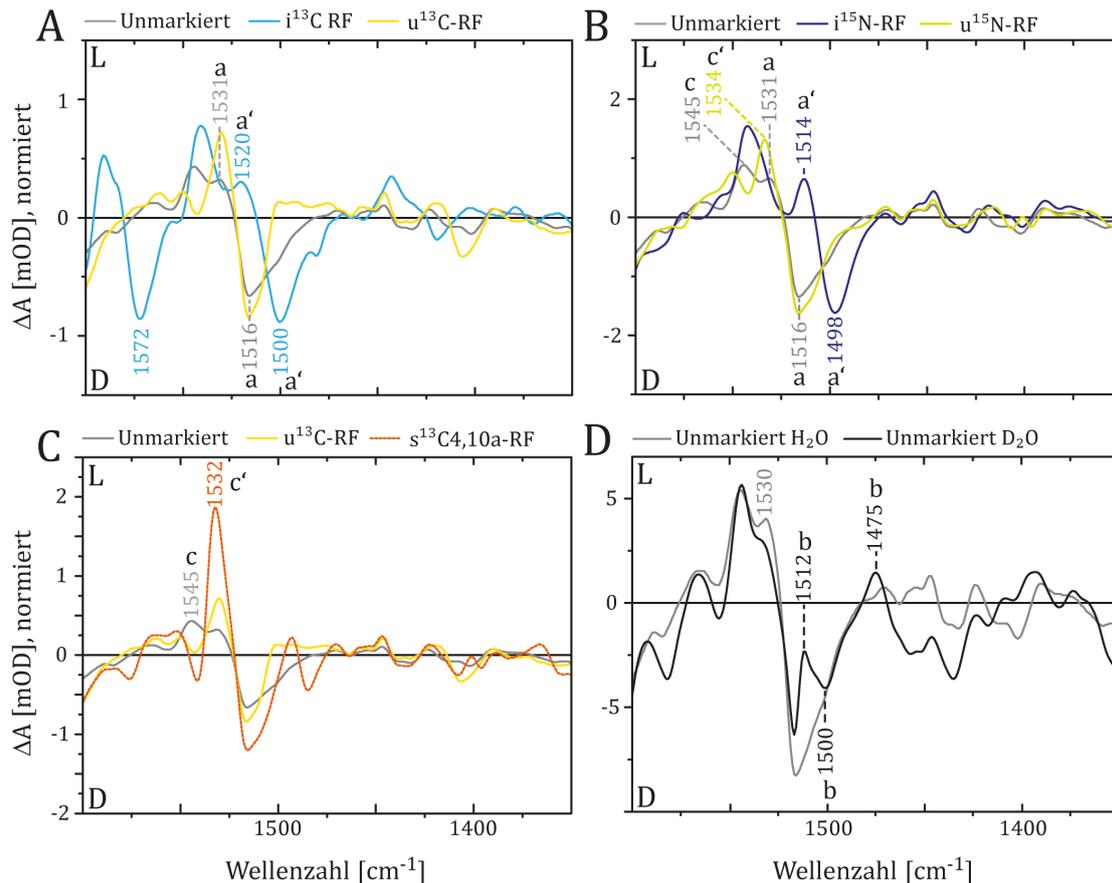


Abb. III-5 – Frequenzbereich 1350 - 1600 cm^{-1} selektiver und inverser Riboflavinmarkierungen

In der Amid II Region liegen zwei Signale, deren Beeinflussung durch die verschiedenen Isotopenmuster ähnlich war. Unter Umständen repräsentieren (-)1516/(+)1531 eine Schwingungsform in Dunkel- und Lichtzustand des Proteins, deren Frequenz bei Aktivierung zunimmt. Bei 1471 und 1447 cm^{-1} absorbieren weitere kohlenstoffhaltige Oszillatoren des Apoproteins, während bei 1424 und 1402 cm^{-1} zusätzlich Banden des Kofaktors überlagern. Die Datensätze $u^{13}\text{C}$ -RF und $i^{13}\text{C}$ -RF wurden von Dr. Tilo Mathes zur Verfügung gestellt. Helena Steinocher ist Urheberin des $u^{15}\text{N}$ -RF Datensatzes (Steinocher, 2013).

In Übereinstimmung mit früheren Analysen wurden bei (+)1545 außerdem Überlagerungen von Schwingungen des Kofaktors oder Kopplungen zur Flavinbindetasche mit den Amid II Banden festgestellt. Das auffällige Signal zeigte in der selektiven RF-Markierung an $^{13}\text{C}4,10\text{a}$ eine um etwa 13 cm^{-1} niedrigere Absorption (Abb. III-5.C c \rightarrow c') und wird in früheren Studien C5aN5 (Steinocher, 2013), C4aN5- oder C10aN1- Schwingungen zugeordnet (Masuda *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*; 2005). Eine signifikante Verschiebung im Spektrum der $s^{15}\text{N}$ -RF Probe (Abb. III-5.B c \rightarrow c') bestätigte ebenfalls, dass eine Flavin CN-Schwingung vorliegt.

Da die ^{15}N - und ^{13}C -Markierungen einen vergleichsweise geringen Einfluss ausüben (Anhang Abb. V-10.B, D), ist die bei 1545 cm^{-1} absorbierende Schwingung möglicherweise nur an diese Atome gekoppelt. Aufgrund der vorliegenden Daten und der Einschätzung eines Signals bei 1552 cm^{-1} in Resonanz-Raman Untersuchungen an Lumiflavin (Abe & Kyogoku, 1987) ist auch eine Zuordnung dieser Bande zur C10aN1-Bindung plausibel.

Charakteristika der Fingerprint Region

In der, an die Amid II Region anschließenden, *Fingerprint* Region können neben Normalschwingungen auch Ober- und Kombinationsschwingungen auftreten. Sie entstehen durch Absorption eines vielfachen des Frequenzwertes der zugehörigen Normalschwingung oder bei einer Kombination zweier oder mehrerer Normalschwingungen (Struve, 1989). Die Interpretation der Banden ist daher wesentlich erschwert. Zudem vermischen sich im *Fingerprint* Bereich des PixD LmD-Differenzspektrums Schwingungen von Chromophor und Apoprotein stärker. Unter ihnen konnten die Banden (+)1471 und (+)1447 cm^{-1} dem Apoproteinanteil zugeordnet werden (Abb. III-6.A). Die höherfrequente Schwingung (a) absorbierte vergleichsweise breit, mit flacher Amplitude und wurde bei $^{13}\text{C}_{4,10\text{a}}$ -Markierung des Flavins von verschobenen Banden überdeckt (Abb. III-6.A a'). In den meisten Mustern blieb dieses Signal unbeeinflusst (Anhang Tab. V-C), erfuhr aber eine Frequenzminderung durch ^{13}C -Inkorporation in das Apoprotein (Abb. III-5.A b). Es handelt sich daher um nicht an Stickstoff gekoppelte CC-, CH- oder C-OH-Schwingungen. Eine genauere Zuordnung erlaubte das Spektrum in D_2O nicht, da die Bande hier auf 1475 cm^{-1} verschoben oder nur überlagert sein könnte (Abb. III-5.D b'). Ähnliches gilt für das Maximum bei (+)1447, welches in früheren Publikationen als Flavin- oder CH_3 -Biegeschwingung $\rho(\text{CH}_3)$ von Aminosäureseitenketten interpretiert wird (Masuda *et al.*, 2004). Das Signal blieb von Flavin- und ^{15}N -Apoproteinmarkierungen unbeeinflusst (Abb. III-6.B, C c), war aber in der $i^{13}\text{C}$ -RF Probe nach 1443 cm^{-1} verschoben (Abb. III-6.A c'). Diese Daten unterstützen daher die vorherige Zuordnung. Zudem zeigte das D_2O -Spektrum in diesem Bereich zwar einen sehr starken Intensitätsverlust, die Form der Signale stimmte jedoch mit dem des Proteins in Wasser weitestgehend überein (Abb. III-5.D c'').

An den Banden bei (+)1424 und (-)1402 cm^{-1} sind zusätzlich Schwingungen des Isoalloxazinringes beteiligt. Ersteres wird hauptsächlich von der Absorption des Apoproteins gebildet und war entsprechend stark in der $i^{13}\text{C}$ -RF- und schwächer in der $i^{15}\text{N}$ -RF-Markierung verschoben (Abb. III-5.A, B d \rightarrow d'). Die Frequenzminderungen um -5 und -9 cm^{-1} in den Spektren der $u^{13}\text{C}$ - und $u^{15}\text{N}$ -RF-Markierungen (d'') deutet jedoch auf eine Überlagerung oder Kopplung mit Banden des Chromophors hin (Abb. III-6.A). Ein fehlender Einfluss des ^{13}C -RF Isotopomers (Anhang Abb. V-10) und eines D_2O -Austausches (Abb. III-5.D d''') schließt die vormalige Zuordnung zu C4N3, C2N3 oder C2N1 (Steinocher, 2013) aus.

III. Ergebnisse

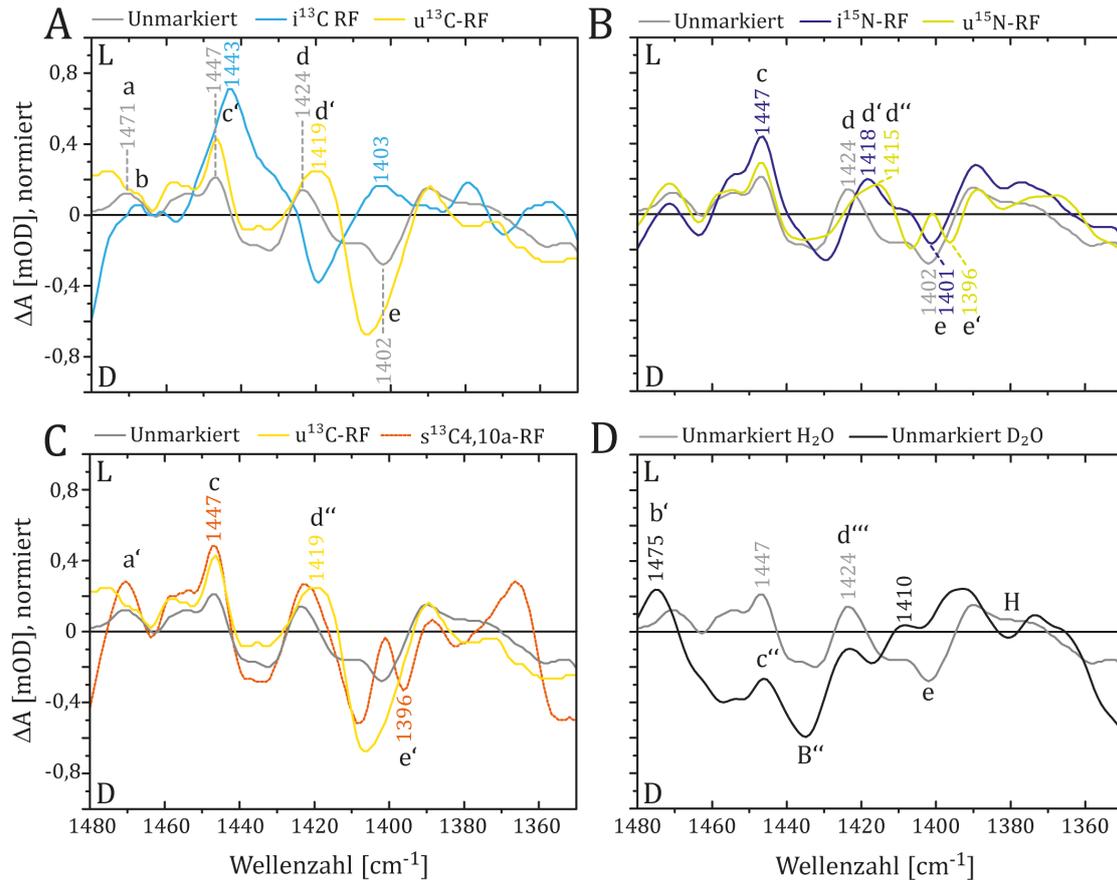


Abb. III-6 – *Detailansicht für die Frequenzänderungen der Signale (+)1447, 1424 und (-)1402 cm⁻¹*
 Ausschnitte der LmD-Differenzspektren von PixD mit ¹³C-Markierungen (A) und ¹⁵N-Markierungen von Chromophor und Apoprotein (B). Mit Beginn der *Fingerprint* Region wechseln sich Signale des Apoproteins und des Chromophors stärker ab. Außerdem ist dieser Frequenzbereich deutlich stärker durch einen D₂O-Austausch beeinflusst.

Die zweite Bande bei (-)1402 schien hingegen durch ¹⁵N-Markierungen des Apoproteins kaum beeinträchtigt (Abb. III-6.B e). Sie war in der ¹³C-RF-Probe möglicherweise überlagert und wies die stärkste Verschiebung im Differenzspektrum der ¹³C-RF-Probe auf (Abb. III-6.A e). Das Signal zeigte aber auch durch ¹³C_{4,10a}- und ¹⁵N-RF-Markierung eine um 6 cm⁻¹ verringerte Frequenz (Abb. III-5.A, B, C e'). Es wird daher sehr wahrscheinlich hauptsächlich durch eine Chromophorbinding verursacht und wurde zuvor der $\nu(\text{C4N3})$ zugeordnet (Steinocher, 2013). Da es im ¹⁵N₅-RF-Spektrum unverschoben bleibt und die Interpretation einer Deuterierungssensitivität durch Bandenüberlagerung schwierig ist (Abb. III-6.D e), käme ebenfalls die C_{4a10a}-Bindung in Frage.

Zwischen 1055 -1221 cm⁻¹ konnten Proteinsignale identifiziert werden, die nur eine geringe Verschiebung in den Spektren der ¹⁵N-RF-Proben aufwiesen und daher eventuell schwach an Stickstoff gekoppelt sind, aber hauptsächlich von CC-, CH- oder C-OH-Oszillationen gebildet werden. In dieser Region wurden durch die Isotopenmarkierungen an Tyrosinen auch Signale dieser Aminosäure gefunden (Takahashi *et al.*, 2007; Mehlhorn *et al.*, 2013). Die bei (+)1221/(-)1205 cm⁻¹ absorbierenden Banden zeigten sehr ähnliche isotopeninduzierte Verschiebungen in den Markierungsmustern (Abb. III-7A, B a→a'; Anhang Tab. V-C) und könnten daher eine Proteinbindung repräsentieren, die beim Übergang in den Lichtzustand gestärkt wird.

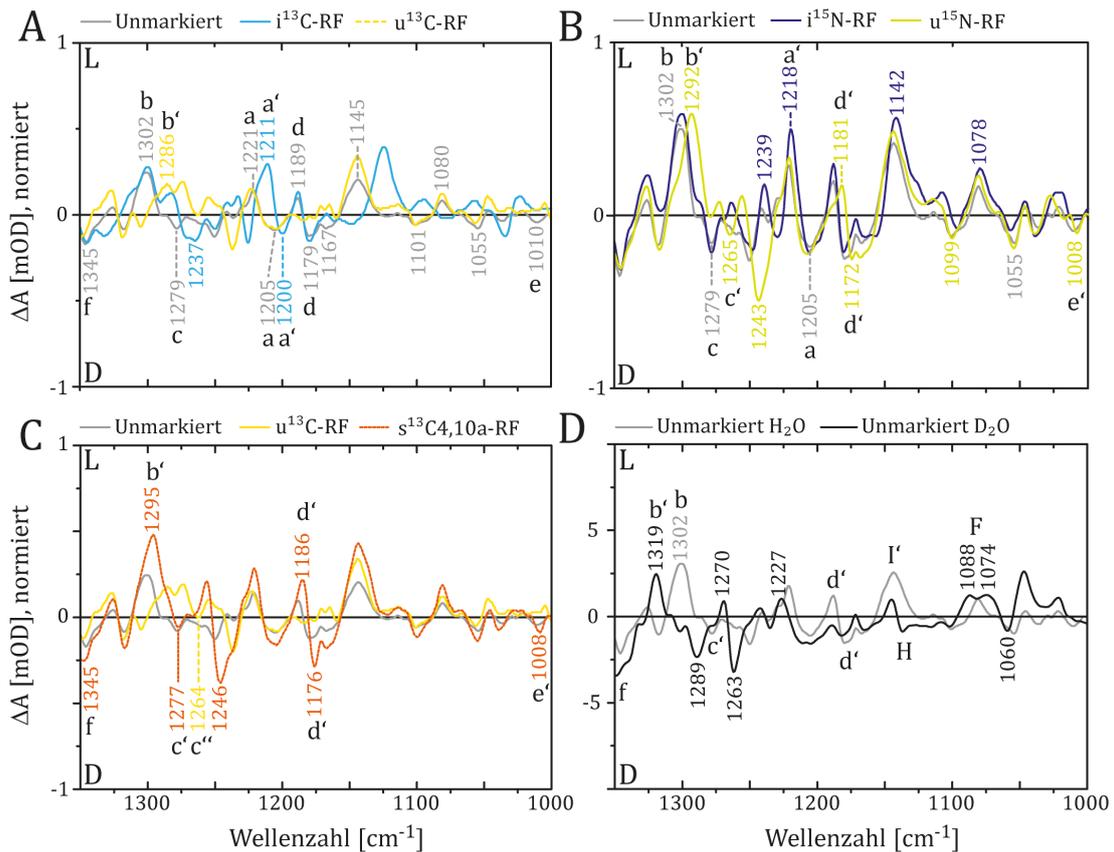


Abb. III-7 – Frequenzbereich 1000 - 1350 cm^{-1} selektiver und inverser Riboflavinmarkierungen

Im niederfrequenten Messbereich absorbieren vorwiegend kohlenstoffhaltige Bindungen von Chromophor und Apoprotein. Hierbei werden die Banden (+)1345, (-)1279, (+)1221, (-)1205, (+)1189/(-)1179 und (-)1010 hauptsächlich durch Isotopenmarkierung des Flavins beeinflusst (B, C) und können überwiegend dem Ring III des Isoalloxazinsystems zugeordnet werden (Anhang Tab. V-C). (-)1167, (+)1145, (-)1121, (-)1101, (+)1080 und (-)1055 verschieben dagegen bei ^{13}C -Isotopenmarkierung des Apoproteins (A) und zeigen oftmals eine Frequenzänderung nach Deuterierung (D). Sie repräsentieren daher vermutlich CC- oder CH-Schwingungen, die schwach an Stickstoff und Gruppen mit austauschbaren Protonen gekoppelt sind. Die Datensätze $u^{13}\text{C}$ -RF und $i^{13}\text{C}$ -RF wurden von Dr. Tilo Mathes zur Verfügung gestellt. Helena Steinocher ist Urheberin des $u^{15}\text{N}$ -RF Datensatzes (Steinocher, 2013).

Daneben grenzen sich in der *Fingerprint* Region viele reine Flavin-Signaturen ab, die hauptsächlich Schwingungen des Ringes III zugeordnet werden können (siehe Anhang Tab. V-C). Dazu gehören (+)1302 (b \rightarrow b') und (-)1279 cm^{-1} (c \rightarrow c', c''), die vermutlich von den Bindungen C4N3 und C4aN5 stammen (Abb. III-7). Für das höherfrequente Signal wurde auch eine Zugehörigkeit zu C2-Bindungen vermutet (Steinocher, 2013). Diese Interpretation lässt sich jedoch anhand des $^{13}\text{C}2$ -Markierungsmusters ausschließen (Anhang Abb. V-10). Die (-)1279 Bande wird in früheren Studien der C4N3-Streckschwingung zugeordnet (Masuda *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*, 2005). Die isotopeninduzierten Verschiebungen waren in der $^{13}\text{C}4,10\text{a}$ -RF-Markierung allerdings mit 2 cm^{-1} sehr gering und deuten auf eine andere CN-Bindung des Flavins hin (Abb. III-7.C c'). So ist dieses Signal eines der wenigen, die im Spektrum der ^{15}N -RF-markierten Probe verändert sind (Anhang Abb. V-10). Da die Analyse der Banden bei Deuterierung sehr erschwert wurde und das Signal möglicherweise nur überlagert war (Abb. III-7.D c'), wird es vorläufig der C4aN5-Bindung zugeordnet.

III. Ergebnisse

Auch die Banden bei (+)1189 und (-)1179 scheinen dem Flavin C4a-Atom zugehörig, was durch die Untersuchungen an Lumiflavin unterstützt würde (Abe & Kyogoku, 1987). Beide Signale waren bei ^{15}N -Inkorporation in das Flavin um etwa 7 cm^{-1} zu niedrigerer Frequenz verschoben und noch stärker durch die ^{13}C -RF-Markierung (Abb. III-7.A, B d \rightarrow d'). ^{15}N - und $^{13}\text{C}_{4,10\text{a}}$ -RF induzierten Verschiebungen um $2 - 4\text{ cm}^{-1}$ (Anhang Tab. V-C, Abb. III-7.C d'), während die Amplituden dieser Signale in D_2O nur durch Überlagerung anderer Banden leicht verschoben erschienen (Abb. III-7.D d'). (+)1189/(-)1179 wurden vormals Schwingungen von N3 oder N1 im Ring III zugeordnet. Unter Einbeziehung der anderen Isotopenmuster erscheinen die C4C4a- oder C4aC10a-Bindungen jedoch wahrscheinlicher. Zudem lässt das gleiche Verhalten dieser Banden eine Zusammengehörigkeit vermuten und entspräche der Stärkung dieser Bindung beim Übergang in den Signalzustand. Masuda *et al.*, 2004 postulieren für diese Schwingung hingegen nur eine schwache Änderung bei Lichtaktivierung, stattdessen sollte die C4aN5-Bindung gestärkt werden. Eine weitere mögliche Flavinschwingung absorbiert am Rande des Messbereichs bei (-)1010 cm^{-1} (Abb. III-7.A e). Die Bande zeigte nur geringe Verschiebungen durch die Isotopenmarkierungen des Flavins (Abb. III-7.B, C e'), könnte aber einer CN-Bindung zugeordnet werden, die möglicherweise schwach an C2 koppelt.

Neben den Schwingungen des Isoalloxazinringes III deuten die Resultate der Isotopenmuster auch auf die Zuordnung einer Bande zu Bindungen des Ringes I hin. Hierbei handelt es sich um das Dunkelzustandssignal bei (-)1345, welches ausschließlich in der ^{13}C -RF-Markierung verschoben ist und vom D_2O -Austausch scheinbar unbeeinflusst blieb (Abb. III-7.A, D f). Dieses Verhalten ist konsistent mit der Interpretation als Schwingung der Methylgruppen an Ring I durch Masuda *et al.*, 2004. Die Zuordnung impliziert allerdings, dass sich die Veränderungen innerhalb der Bindetasche nicht um Ring II und III konzentrieren, sondern sich auf den β -Strängen 2 und 3 bis zu den Ring I umgebenden Aminosäuren erstrecken müssten. Die Bindetasche wird hier von den hydrophoben Aminosäuren I24, L41 und F48 ausgekleidet (Yuan *et al.*, 2006). Obwohl Strukturanalysen an AppA und BlrP1 Hinweise darauf geben, dass L41 Konformationsänderungen beim Übergang in den Lichtzustand erfährt (Grinstead *et al.*, 2006b; Jung *et al.*, 2006; Wu & Gardner, 2009), bieten Untersuchungen von Abe und Kyogoku, 1987 an Lumiflavinen eine logischere Interpretation. Sie werteten ein Signal bei 1346 cm^{-1} als Streckung der C5aC6- und C10aN10-Bindungen. Die entsprechende Bande im Differenzspektrum von PixD blieb bei ^{15}N -Markierung des Kofaktors unbeeinflusst (Abb. III-7.B, Anhang Tab. V-C), durch die Kopplung der Oszillatoren im Isoalloxazinsystem ist aber eine Ausbreitung der Schwingungsänderung an C4O4 über N5 bis zu C5aC6 denkbar.

Die Analyse der Chromophor-/Apoproteinmarkierungen unterstützt viele Schwingungszuordnungen aus früheren Veröffentlichungen. Generell waren Flavinsignale vor allem den Bindungen der Isoalloxazinringe II und III zugehörig. Lichtinduzierte Konformationsänderungen der Flavinbindetasche erstrecken sich in PixD daher vermutlich nicht bis in die Umgebung der Ribitylseitenkette oder der Ring I Methylgruppen.

Nicht bestätigt wurde die Zugehörigkeit der $(-)$ 1670 cm^{-1} Bande zur $\nu(\text{C2O2})$. Stattdessen scheinen die Wasserstoffbrückenbindungen an der C2-Carbonylgruppe in Grund- und Lichtzustand sehr ähnlich zu sein. Außerdem wurden Banden des Apoproteins beobachtet, die im unmarkierten Wildtypspektrum von den Amid I Schwingungen bzw. den Signaturen der $\nu(\text{C4O4})$ verdeckt werden.

III.2.2 Konformation und Struktur des essenziellen Q50

Um die Konformationsänderung des Q50 bei Lichtaktivierung zu untersuchen, wurden drei verschiedene Glutamin-Markierungsmuster angelegt. Der globale Einbau von ^{15}N -Amid-Glutamin ($s^{15}\text{N}$ -Amid-Q) diente der Analyse der intramolekularen Schwingungsfrequenzen in den Glutamin-Resten. Im Falle einer Imidsäure-Bildung des Q50 würde der C=O Oszillator von der C=N-Streckschwingung abgelöst, für die bei ^{15}N -Markierung der Glutaminseitenkette eine stärkere Frequenzminderung um 14 - 16 cm^{-1} zu erwarten ist (Domratcheva *et al.*, 2016) (Abb. III-8).

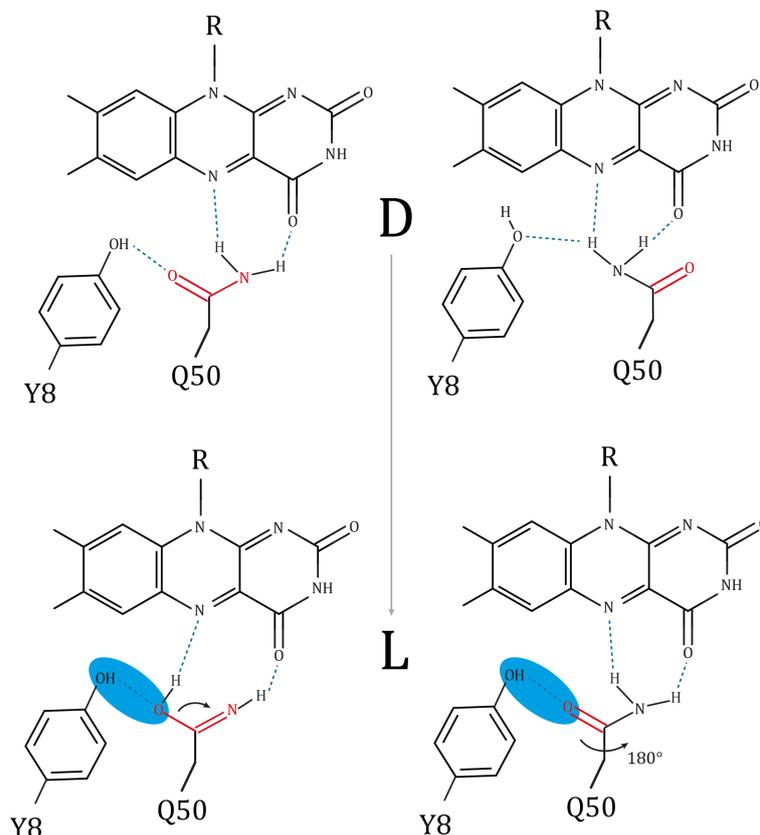


Abb. III-8 – Potenzielle Änderungen der Wasserstoffbrückenkonfiguration um Q50

In Abhängigkeit des zugrunde liegenden Photozyklus-Modells ändert sich bei Belichtung die Position der Doppelbindung innerhalb der Q50-Seitenkette (rot hervorgehoben). Die spezifischen Wechsel des C=O-Bindungsstatus ermöglichen eine Unterscheidung der putativen Zustände im Differenzspektrum von $i^{13}\text{C}$ - oder ^{15}N -Amid-Glutamin-markiertem Protein. Zudem ist aufgrund der von Iwata *et al.*, 2011 an AppA gezeigten, starken Interaktion zwischen Q50 und Y8 im Lichtzustand eine Kopplung der Schwingungen beider Reste zu erwarten (blau).

III. Ergebnisse

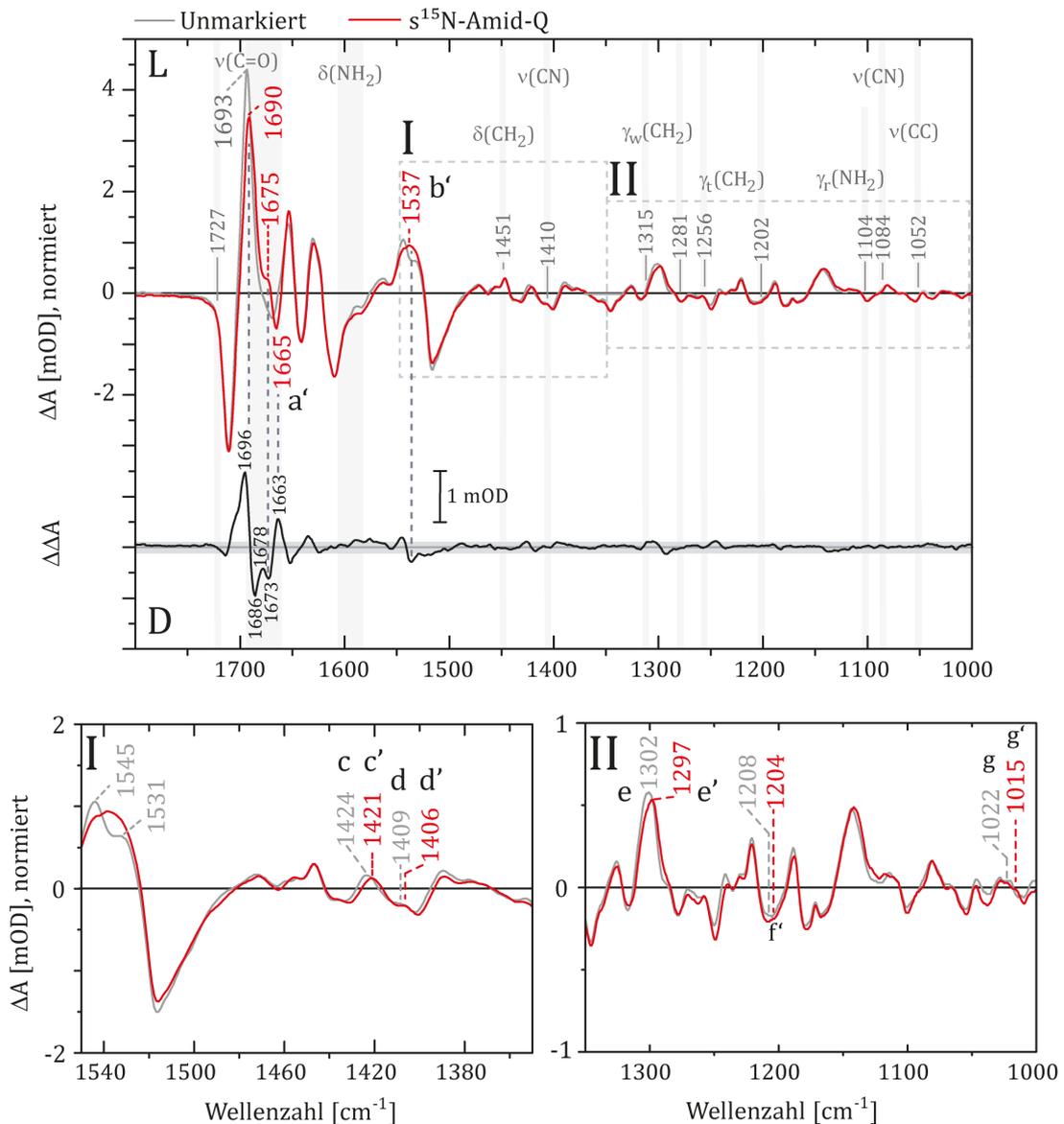
Zur Analyse der $\nu(\text{C}=\text{O})$ -Schwingung der Glutaminseitenkette wurden eine Doppelmarkierung mit ^{15}N -Amid-Glutamin und $^{13}\text{C}_{4,10\text{a-RF}}$ ($s^{13}\text{C}_{4,10\text{a-RF}}, s^{15}\text{N}$ -Amid-Q), sowie ein inverses ^{13}C -Glutamin-Muster ($i^{13}\text{C}$ -Q), ergänzt (Tab. III-B). In ersterer bewirkt die Flavin-Markierung die Freilegung der schwachen Signale bei (-)1712 und (+)1694 (Abb. III-3.C). Handelt es sich dabei tatsächlich um Glutaminschwingungen, würden die Banden aufgrund der zusätzlichen Markierung der Glutaminseitenketten zu niedrigeren Frequenzen verschoben werden. Im Gegensatz dazu bleiben Banden, die von der Aminosäure stammen, im Spektrum der $i^{13}\text{C}$ -Q-Probe idealerweise unbeeinflusst.

Neben dem mit Schwingungen des Chromophors und des Proteinerückgrates überlagerten Absorptionsbereich von Glutaminsignaturen, mussten bei der Datenanalyse die metabolische Isotopenstreuung sowie die Häufigkeit dieser Aminosäure (11 Glutamine in PixD) und ihre Position berücksichtigt werden. Außer Q50 könnten auch Q94, Q105 und Q128 Änderungen bei der Lichtaktivierung erfahren (Abb. I-2). Sie sind im $\beta 5$ -Strang sowie am Beginn der $\alpha 3$ und $\alpha 4$ -Helices lokalisiert, jener Strukturelemente, die als potenzieller Signalweg zur Proteinoberfläche in BLUF-Proteinen diskutiert werden (Ren *et al.*, 2012).

Die Lage der Doppelbindung in der Q50-Seitenkette

Die ^{15}N -Amid-Q-Markierung wurde mit CpX Δ Qv2 umgesetzt. Dieser Expressionsstamm ist nicht Riboflavin-auxotroph und besitzt eine Vielzahl von Transaminasen, die Glutamin als Substrat nutzen. Als universaler Stickstoffdonor im Metabolismus von *E. coli* streut das Seitenkettenamid besonders stark, entsprechend wurden Peptide mit höchster Abundanz von ein bis zwei Massezahlen Übermarkierung in der massenspektrometrischen Analyse detektiert (Anhang Abb. V-5). Darüber hinaus fließen drei Seitenkettenamide von Glutamin in die Synthese von Guanosin-5'-Triphosphat (GTP) ein, ein Edukt von Riboflavin. Sie finden sich anschließend an den Positionen N1, N5 und N10 im Isoalloxazinring wieder (Fischer & Bacher, 2008; Keseler *et al.*, 2013). Infolgedessen könnten auch CN- und NH-Bindungen des Flavins von dieser Markierung betroffen sein. Trotz der Isotopenstreuung zeigte das Differenzspektrum im Vergleich zur Kontrolle nur wenige signifikante Änderungen (Abb. III-9). Hierzu zählte die bei 1675 cm^{-1} erscheinende Bande, die durch die Verschiebung des Minimums bei 1670 cm^{-1} um -5 cm^{-1} (a') hervortrat. In der in Abb. III-9.I vergrößerten Amid II Region fällt bei einer Frequenz von 1537 cm^{-1} zudem eine Zunahme der Signalintensität auf (b'). Ursächlich könnte eine Erniedrigung der Schwingung (+)1545 auf 1537 cm^{-1} sein, oder das Auftreten eines neuen Maximums, welches die Banden bei (+)1531 und (+)1545 verdeckte.

Eine durch die ^{15}N -Amid-Q-Markierung hervorgerufene Frequenzverringern um minus 3 cm^{-1} betraf die als Flavin-C10a- und Protein-CN-Schwingungen eingeschätzte Bande bei 1424 cm^{-1} (c \rightarrow c'). Sie wurde von einer ähnlich starken Verschiebung der Chromophorsignatur bei 1409 cm^{-1} (d \rightarrow d') begleitet (Abb. III-9.I). Eine andere Flavinschwingung absorbierte in der Markierung bei 1297 cm^{-1} um 5 cm^{-1} niedriger (e \rightarrow e') als in der Kontrolle (Abb. III-9.II). In der Region $1240 - 1280\text{ cm}^{-1}$ schlossen sich weitere, schwächere Frequenzänderungen um $2 - 3\text{ cm}^{-1}$ an.

Abb. III-9 – ^{15}N -Amid-Glutaminmarkierung von PixD

Die Isotopeninkorporation hatte nur einen schwachen Einfluss auf die Infrarotabsorption weniger Schwingungen, die in den vergrößerten Bereichen I und II gezeigt sind. Glutamin wirkt auch in der Riboflavinsynthese von *E. coli* als Stickstoffdonor bei der Bildung von 5-Amino-Imidazol-Ribonucleotid und Inositol-Monophosphat. Infolgedessen war eine Streuung des eingesetzten ^{15}N -Amid-Glutamin im Metabolismus des nicht RF-auxotrophen Expressionsstammes möglich. Isotopeninduzierte Verschiebung im Spektrum der Reste-spezifischen Markierung wiesen große Ähnlichkeit zu dem von Domratcheva *et al.*, 2016 publizierten analogen Isotopenmuster in BlrB auf. Grau unterlegt sind bekannte Schwingungsfrequenzen von L-Glutamin (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002). r = rocking, t = twisting, w = wagging

In der niederfrequenten Region besitzt die möglicherweise von 1208 cm^{-1} auf 1204 cm^{-1} (f') verschobene Schulter eine zu $\gamma_t(\text{CH}_2)$ -Schwingungen von Glutamin passende Frequenz (Abb. III-9.II). Diese Schwingungsform absorbiert nach Barth, 2000 bei etwa 1202 cm^{-1} für Glutamin in Lösung und wäre mit dem ^{15}N -Seitenkettenamid gekoppelt. Daneben werden um 1052 cm^{-1} CC-Streckschwingungen dieser Aminosäure erwartet (Barth, 2000). Ihnen könnte eine Schulter bei (+) 1022 cm^{-1} zugeordnet werden, welche durch die ^{15}N -Amid-Markierung möglicherweise um 7 cm^{-1} verschoben wurde (Abb. III-9.II $g \rightarrow g'$).

III. Ergebnisse

Bei Berechnung des Doppeldifferenzspektrums $\Delta\Delta A$ aus den IR-Absorptionen der unmarkierten und der markierten Probe, zeigten die beobachteten Verschiebungen jedoch nur eine schwache Signifikanz, wohingegen Extrema bei (+)1696, 1678 und 1663 cm^{-1} sowie (-)1686 und 1673 cm^{-1} herausgestellt wurden (Abb. III-9). Sie gehen vermutlich auf die Frequenzminderung der $\nu(\text{C4O4})$ von (+)1693 auf (+)1690 cm^{-1} und des (-)1670 Signals auf 1665 cm^{-1} zurück (Abb. III-9, Vergleich ΔA und $\Delta\Delta A$). Solche Verschiebungen würden das sehr starke Doppeldifferenzsignal bei (+)1696 erzeugen und indirekt die Intensität der bei 1675 cm^{-1} auftretenden Schulter erhöhen. Diese Schulter ist, abhängig von der Probenpräparation, in IR-Spektren verschiedener PixD-WT-Proben mehr oder weniger stark ausgeprägt (Anhang Abb. V-13) und wie das 1670 cm^{-1} Minimum von überlagernden Wasserbanden beeinflusst. Wasserschwingungen bilden ein Maximum bei 1643 cm^{-1} (Max & Chapados, 2009). Da eine ^{13}C -Markierung des Apoproteins mit und ohne gleichzeitiger ^{13}C -Markierung der Glutamine ähnlich starke Verschiebungen dieser positiven Schulter hervorriefen, scheint eine Beteiligung von Kohlenstoffatomen aus Glutaminen an der verursachenden Schwingung jedoch ausgeschlossen (Abb. III-10).

Zusammenfassend zeigte das Spektrum der ^{15}N -Amid-Q-Probe sehr differenzierte Signalverschiebungen, die eine Beteiligung weniger Glutamin-Reste vermuten lassen. Zu ihnen zählte das Dunkelzustandssignal bei (-)1670 cm^{-1} , dessen Frequenz der $\nu(\text{C=O})$ von Glutamin entspräche (Barth, 2000). Andere betroffene Banden wurden in Abschnitt III.2.1 als Schwingungen des Flavin-Isoalloxazinringes identifiziert. Unter ihnen ließ die schwache Verschiebung von (+)1693 auf 1690 cm^{-1} (Abb. III-9) eine Beeinflussung der C4-Schwingungen des Lichtzustandes durch ^{15}N -Amid-Markierung des Q50 vermuten. Sie könnte hypothetisch auch auf Streuung des Seitenketten-Stickstoffes in das Flavin-N5 zurückgehen, in diesem Fall müsste jedoch auch die Dunkelzustandsschwingung um $\approx 3 \text{ cm}^{-1}$ niedriger absorbieren, was nicht beobachtet wurde.

Schwingungen des Glutamin-Carbonyls

Die ^{13}C -Markierungen des Kofaktors machten im PixD-Differenzspektrum Signale des Proteins um 1711 und 1694 cm^{-1} sichtbar, welche dem Frequenzbereich der Carbonylschwingungen von Asn, Asp, Gln oder Glu sowie der $\nu_{\text{as}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$ von Arg entsprechen (Barth, 2000, Barth & Zscherp, 2002) (Abschnitt III.2.1, Abb. III-3). Die Zuordnung sollte dabei über eine inverse Markierung aller Kohlenstoffe außer derer in Glutaminen eingegrenzt werden. Das resultierende Differenzspektrum des „ $i^{13}\text{C}$ -Q.2“ benannten Musters ist in Abb. III-10 gezeigt.

Der Einbau des $^{13}\text{C}_4,10\text{a}$ -RF-Isotopomers ist nötig, um die hochfrequenten Schwingungen des Proteins im Differenzspektrum sichtbar zu machen. Sie würden bei einer Zuordnung zu Glutaminbindungen aufgrund der inversen ^{13}C -Markierung dieser Aminosäure unverschoben bleiben. Zur besseren Abschätzung der Isotopenstreuung ist zusätzlich das Spektrum der $i^{13}\text{C}$ -Q.1-Probe aufgetragen, die unter Fütterung von unmarkiertem Glutamin sowie ^{13}C -Glukose in CpX Δ Qv2 synthetisiert wurde. Diese Probe wurde aus einem *E. coli* Stamm isoliert, der RF synthetisieren kann. Das Chromophor dieser Probe blieb dennoch weitestgehend unmarkiert, da das Vitamin ein geringes *turnover* aufweist.

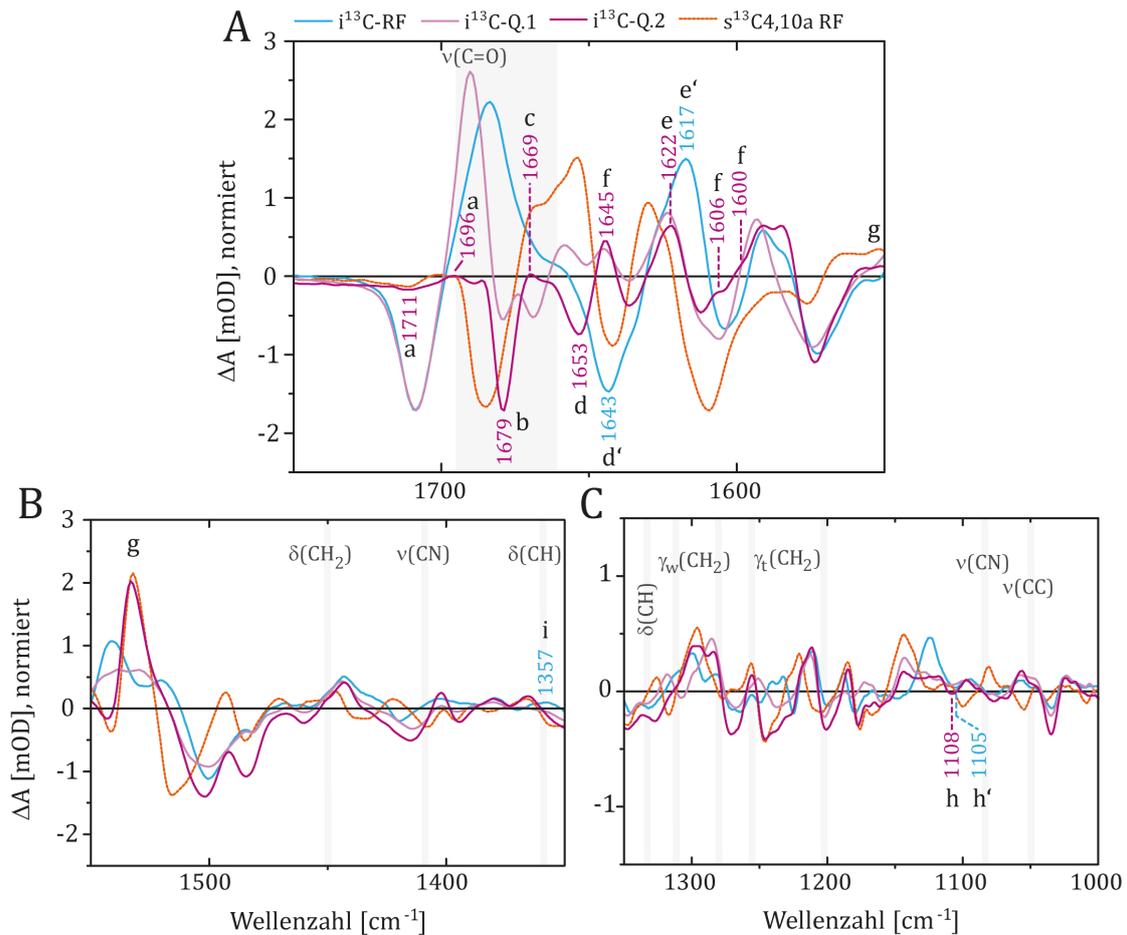


Abb. III-10 – $i^{13}\text{C-Q}$ -Markierungen im Vergleich zu den $u^{13}\text{C}$ -Mustern für Apoprotein (blau) und Flavin (gelb) Während im niederfrequenten Bereich nur wenige Signale Glutaminschwingungen zugeordnet werden konnten, fielen zwischen 1550 - 1700 cm^{-1} zusätzliche Banden auf, die möglicherweise durch die Kopplung der Oszillatoren im Proteinrückgrat und die Isotopenmarkierung hervorgerufen wurden. Zudem blieben weiterhin schwache Signale bei 1711 und 1693 cm^{-1} (a) übrig, die zur Glutaminseitenkette passen würden. Grau unterlegt sind bekannte Schwingungsfrequenzen von L-Glutamin (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002). r = rocking, t = twisting, w = wagging

Im $i^{13}\text{C-Q.2}$ -Spektrum weisen die schwachen Signale geringe Verschiebungen nach 1711 und 1696 cm^{-1} auf (Abb. III-10.A, B a). Die negative Bande ist allerdings stark verbreitert, wodurch die Bestimmung des Minimums erschwert ist. Tendenziell ist ein vergleichbares Verhalten erkennbar, was die Betrachtung von (-)1710 und (+)1694 als Schwingungspaar erlauben würde.

Wie bereits beim Vergleich der $s^{13}\text{C}_{4,10a}$ - und der $u^{13}\text{C}$ -Daten beobachtet wurde (Abb. III-3.C), erscheinen möglicherweise weitere positive Banden als Schulter um 1685 cm^{-1} (Abb. III-10). Es muss jedoch beachtet werden, dass in der $i^{13}\text{C-Q.2}$ Probe eine größere Varianz zwischen 1600 - 1800 cm^{-1} auftrat, die im Differenzspektrum erkennbar die Basislinie über 1750 cm^{-1} verzerrt und möglicherweise falsche Signale erzeugte (Anhang Abb. V-14). Einen weiteren Einfluss könnte die $\nu(\text{C4O4})$ Schwingung des Dunkelzustandes nehmen, die in der inversen Glutamin-Markierung deutlich stärker nach 1679 cm^{-1} verschoben wurde (Abb. III-10.A b). Ursächlich sind vermutlich die größeren Frequenzminderungen in der Amid I Region. Zusätzlich erschien die prominente $\nu(\text{C4O4})$ Bande mit stark verringerter Intensität (Abb. III-10.A c).

III. Ergebnisse

Möglicherweise kam es hier zu einer Überlagerung mit einem negativen Signal, dessen Amplitude wiederum durch die Verschiebung der Amid I Signaturen erhöht wurde und so das 1669 cm^{-1} Signal im Differenzspektrum beinahe löschte (c). Des Weiteren unterschied sich die Amid I Region durch zusätzliche Signale sehr stark von der der $i^{13}\text{C}$ -RF-Markierung. Hier erfuhr die putative $\nu(\text{C=O})$ -Glutaminschwingung eine um 10 cm^{-1} geringere Frequenzminderung (Abb. III-10.A d, d'). Diese Beobachtung untermauert die Zuordnung zu Glutamin. Außerdem absorbierte die 1617 cm^{-1} Lichtzustandsbande stattdessen bei 1622 cm^{-1} (e, e') und weitere Maxima erschienen bei 1645 , 1606 und 1600 cm^{-1} (f) (Abb. III-10.A). Letztere fehlten im Spektrum von $i^{13}\text{C}$ -Q.1 (Abb. III-10.A) und traten somit nur bei der höheren Markierungseffizienz auf. Mehrere Szenarien könnten diese Ergebnisse erklären. Im Spektrum der $i^{13}\text{C}$ -RF-Markierung wurden Hinweise auf verdeckte Signale in der Amid I Region gefunden, die möglicherweise in der $i^{13}\text{C}$ -Q.2 Probe hervortraten. Da Glutaminatome über Glutamat in Arginin und Lysin einfließen können (Anhang Abb. V-1), würde die Vermutung, dass es sich um Seitenkettensignaturen dieser Aminosäuren handelt, unterstützt. Andererseits können (+)1645, 1622, 1606 und 1600 durch Bandenteilung entstanden sein. Dieses Phänomen wird bei Vermischung von ^{12}C und ^{13}C in Rückgratcarbonylen von α -helikalen und β -strängigen Modellpeptiden beobachtet (Brauner *et al.*, 2000; Wieczorek & Dannenberg, 2003; Hauser *et al.*, 2008). Sieben der elf Glutaminreste kommen in den α -Helices vor (Abb. I-2). Für die IR-Absorptionen dieser Sekundärstrukturelemente ist eine Bandenteilung daher besonders wahrscheinlich.

Die Amid II Region erschien durch die Mischung der $i^{13}\text{C}$ -RF und $s^{13}\text{C}_{4,10\text{a}}$ -RF-Markierungen schmaler (Abb. III-10.A, B g), wobei auch im *Fingerprint* Bereich Abschnitte deutlich dem Spektrum der $i^{13}\text{C}$ -RF- bzw. $^{13}\text{C}_{4,10\text{a}}$ -RF-Musters ähnelten und zum niederfrequenten Bereich die Übereinstimmung mit der $i^{13}\text{C}$ -RF-Markierung zunahm. Da das Differenzspektrum einer vollständig ^{13}C -markierten Probe von Masuda *et al.*, 2004 ein anderes Flavin-Isotopomer aufweist, konnten weitere unbeeinflusste Signale der $i^{13}\text{C}$ -Q.2-Markierung nicht bestimmt werden. Nur bei 1108 cm^{-1} fiel eine Dunkelzustandsschwingung auf, die im Spektrum der $i^{13}\text{C}$ -RF-Probe um 3 cm^{-1} stärker zu niedrigen Frequenzen verschoben schien (Abb. III-10.E h \rightarrow h') und im unmarkierten Wildtyp möglicherweise bei 1121 cm^{-1} absorbierte. Außerdem zeigten die $i^{13}\text{C}$ -RF- und $i^{13}\text{C}$ -Q.1-Markierung eine Bande bei 1357 cm^{-1} (i), welche sich nicht im Spektrum des $i^{13}\text{C}$ -Q.2-Musters wiederfand (Abb. III-10.C h). Diese Oszillationen könnten in der unmarkierten Probe zwischen 1374 - 1390 cm^{-1} absorbieren. Bei ähnlichen Frequenzen werden auch die $\nu(\text{CN})$, $\delta(\text{CH})$ (1410 , 1359 cm^{-1}) und $\gamma_{\rho}(\text{NH}_2)$ (1104 cm^{-1}) Schwingungen von freiem Glutamin in Lösung erwartet (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002). Beide Banden zeigten außerdem eine Sensitivität gegenüber D_2O Austausch (Abb. III-6.D, Abb. III-7.D H), wie es für die NH_2 - und die CN-Schwingungen von Glutaminseitenketten anzunehmen ist.

Die Interpretation der Signalverschiebungen im $i^{13}\text{C}$ -Q.2-Spektrum war aufgrund des mangelnden Vergleichs mit einer $u^{13}\text{C}$ -Probe erschwert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die Banden (-)1710 und (+)1694 kaum verschieben und daher eine Zuordnung zu Glutamin möglich ist. Darüber hinaus wurde eine starke Abhängigkeit der Amid I Region von Schwingungen dieser Aminosäure festgestellt und die Zugehörigkeit des Signals bei (-)1670 cm^{-1} zu Glutamin bestätigt.

Schwingungsfrequenz des Q50-Seitenkettencarbonyls

Die Erzeugung einer $s^{13}\text{C}_4,10\text{a-RF}/s^{15}\text{N-Amid-Q}$ -Doppelmarkierung sollte dem Erhalt weiterer Hinweise auf die Herkunft der überlagerten Signale dienen. Für dieses Muster wurde PixD unter Zusatz von $^{15}\text{N-Amid-Q}$, $s^{13}\text{C}_4,10\text{a-RF}$ und Supplementierung aller anderen Aminosäuren in *E. coli* Glutamatator synthetisiert, um die Isotopenstreuung aus Glutamin durch Katabolitrepression zu verringern. In den massenspektrometrischen Analysen wurden neben dem gewünschten Hauptsignal dennoch hauptsächlich Peptide mit einer Untermarkierung von -1 in der massenspektrometrischen Analyse des tryptischen Verdaus gefunden. Außerdem zeigen zusätzlich auftretende Übermarkierungen von +1 ungerichtete Isotopenstreuung in andere Aminosäuren an. Der Markierungsgrad des strikt konservierten Glutamins blieb unbekannt, da das Peptid 67 - 101 welches Q50 enthält, im Peptidmassefingerabdruck nicht detektiert wurde (Anhang Abschnitt V.3.2). Er liegt vermutlich zwischen 10 – 50%, wie aus den massenspektrometrischen Daten der gefundenen Peptide abgeleitet werden kann (Anhang Abb. V-6.D – F).

Abb. III-11 zeigt den Vergleich der Differenzspektren von der Doppelmarkierung und der $^{13}\text{C}_4,10\text{a-RF}$ -Markierung, wodurch Signale, die durch die zusätzliche Isotopeninkorporation in Glutamine verschoben, sichtbar wurden. Erstaunlicherweise ähnelten sich die beiden Spektren sehr und zeigten nur wenige signifikante Abweichungen in unerwarteten Frequenzbereichen. Die sehr kleinen Amplituden bei $(-)/1712/(+)/1694\text{ cm}^{-1}$ waren auch in der Doppelmarkierung vorhanden (a) und zeigten keine weitere Verschiebung zu niedrigeren Wellenzahlen (Abb. III-11). Dagegen wurde durch die addierte Glutamin-Markierung das bei 1653 cm^{-1} auftretende Maximum in zwei definierte Banden aufgeteilt (Abb. III-11.I b). In der Flavin-Markierung waren hier zwei Schultern angedeutet, von denen eine möglicherweise durch die Isotopenmarkierung verschoben wurde und dadurch die Signatur bei 1670 cm^{-1} deutlich hervortrat. Die neue Position des Lichtzustandsignals ist jedoch unklar. Weitere Glutaminabsorptionen werden erst wieder ab 1610 cm^{-1} erwartet (Barth & Zscherp, 2002; Wolpert & Hellwig, 2006). Ab dieser Wellenzahl traten definierte Änderungen im Differenzspektrum auf, die nicht von der RF-Markierung verursacht wurden. Die positiven Signale mit Maxima bei 1064 und 1018 cm^{-1} (Abb. III-11.II c) könnten Glutamin CN- und CC-Streck-, sowie CH_2 -Deformationsschwingungen ($1084, 1078, 1052, 999\text{ cm}^{-1}$, Barth, 2000; Wolpert & Hellwig, 2006) zugeordnet werden und stünden im Zusammenhang mit Änderungen der Carbonyl- oder Amid-Interaktionen von Glutamin. Möglicherweise erschien nicht nur die $(+)/1064\text{ cm}^{-1}$ Bande bei niedrigeren Wellenzahlen, sondern wurde von einer Verschiebung des negativen Signals von $(-)/1071$ nach $(-)/1067\text{ cm}^{-1}$ ($d \rightarrow d'$) begleitet (Abb. III-11.II). Würden diese Signale dieselbe Schwingung in Licht- und Dunkelzustand repräsentieren, könnte die Oszillation der Glutamin-CN/CC-Schwingungen durch Ausbildung oder Stärkung einer Wasserstoffbrückenbindung an der Seitenkette geschwächt werden.

III. Ergebnisse

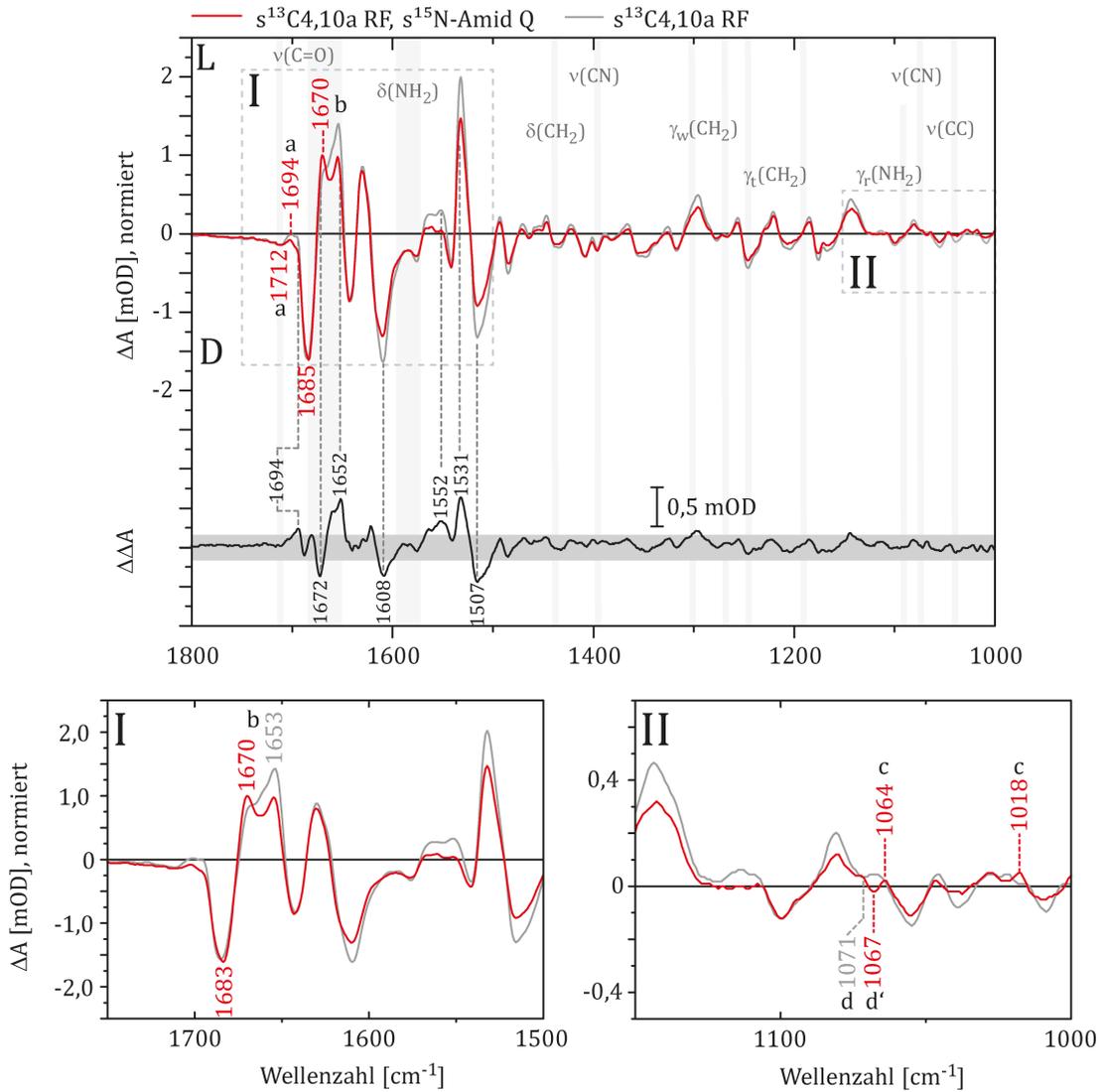


Abb. III-11 – Doppelmessung mit $^{13}\text{C}_4,10\text{a}$ - RF und ^{15}N -Amid-Glutamin

Das schwere Stickstoffisotop in der Glutaminsidekette hatte nur einen geringen Einfluss auf die IR-Absorption des Proteins. Während um 1670, 1064 und 1000 cm^{-1} Signalverschiebungen auftraten, blieben die Banden bei (-)1710/(+)1694 cm^{-1} erhalten (a) und stammen daher wahrscheinlich nicht von Glutaminschwingungen. Normiert wurde auf die Dunkelzustandsschwingung der doppelmessungsmarkierten Probe bei 1712 cm^{-1} . Grau unterlegt sind bekannte Schwingungsfrequenzen von L-Glutamin (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002). Mit Bildung eines Doppeldifferenzspektrums ($\Delta\Delta A$) sollten Signalverschiebungen durch die ^{15}N -Amid-Q-Markierung hervorgehoben werden. Der grau unterlegte Bereich stellt ein arbiträres Signifikanzlevel dar, das anhand geringer Intensitätsunterschiede beider Spektren festgelegt wurde. r = rocking, t= twisting, w = wagging

Die Bildung eines Doppeldifferenzspektrums beider Isotopenmuster sollte Signalverschiebungen aufgrund der ^{15}N -Amid-Q-Markierung herausstellen (Abb. III-11). Es weist recht viele Signale auf, die auf teilweise große Intensitätsunterschiede zurückgehen und unter dem arbiträren Signifikanzlevel bleiben. In der Amid I und II Region stechen jedoch Doppeldifferenzbanden bei 1694, 1672, 1652 und 1608 cm^{-1} sowie bei 1552, 1531 und 1507 cm^{-1} hervor. Augenscheinlich gehen nur die Signale 1694, 1672 und die Schulter bei 1659 cm^{-1} auf unterschiedliche Spektrenformen zurück, wohingegen die übrigen Banden wiederum aufgrund der verschiedenen Intensitäten entstehen könnten.

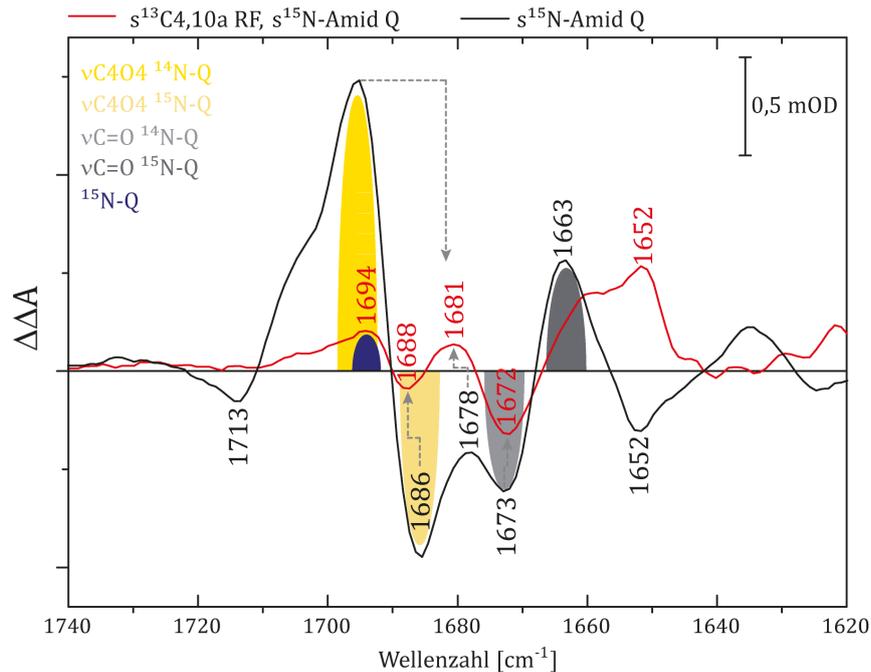


Abb. III-12 – Vergleich der Doppeldifferenzspektren bei ^{15}N -Markierung der Glutaminseitenkettenamide
 Im Vergleich der beiden Doppeldifferenzspektren für die ^{15}N -Amid-Q-Einfachmarkierung und für das doppelte Isotopenmuster mit dem $^{13}\text{C}_4,10\text{a}$ -RF Isotopomer, können Differenzbanden identifiziert werden, die auf Flavinschwingungen zurückgehen. Sie waren im $s^{15}\text{N}$ -Amid-Q- Spektrum nur durch Kopplung der Flavin $\nu(\text{C}4\text{O}4)$ mit dem Q50-Seitenkettenamid verschoben.

Theoretisch wäre ein recht ähnliches Spektrum zu erwarten, wie es aus der Doppeldifferenz des unmarkierten Wildtyps und der ^{15}N -Amid-Q-Markierung hervorging. Ein Ausschnitt beider Ergebnisse ist vergleichend in Abb. III-12 aufgetragen. Durch die Doppelmarkierung verschob die starke Differenzbande bei 1696 cm^{-1} nach 1681 cm^{-1} (Vergleich mit der $\nu(\text{C}4\text{O}4)$ Isotopenverschiebung im $s^{13}\text{C}_4,10\text{a}$ -RF-Spektrum Abb. III-3.C) 1681 cm^{-1} . Infolgedessen verringerten sich die Intensitäten der Minima 1686 und 1673 und wurden leicht verschoben. Zusätzlich wird aus dem kleinen Signal bei 1678 cm^{-1} das deutliche Maximum bei 1681 cm^{-1} (Abb. III-12). Daneben scheinen auch (+) 1663 und (-) 1652 durch die Doppelmarkierung verschoben worden zu sein. Insgesamt ließen sich die Signale (-) 1713 , (+) 1694 und dessen Schulter sowie (+) 1663 und (-) 1652 der Einfachmarkierung auf Flavinschwingungen oder gekoppelte Bindungen zurückführen. (-) 1686 , (+) 1678 und (-) 1672 sollten hingegen von der ^{15}N -Amid-Q-Markierung ausgehen. Die Aufteilung des (+) 1653 Signals im Differenzspektrum der doppelmarkierten Probe geschieht daher sehr wahrscheinlich durch die Frequenzminderung der (-) 1670 Bande (Abb. III-11 b).

Auffällig ist, dass bei 1694 cm^{-1} im Doppeldifferenzspektrum der $^{13}\text{C}_4,10\text{a}$ -RF, ^{15}N -Amid-Q-Probe ein schwaches Maximum zurück bleibt, wohingegen im höherfrequenten Bereich keine Banden existieren (Abb. III-12). Diese Beobachtung unterstützt die Existenz verdeckter Banden unter der Flavin $\nu(\text{C}4\text{O}4)$ Signatur. Eines davon scheint bei ^{15}N -Amid-Q-Inkorporation in das Apoprotein verschoben worden zu sein, wodurch die Doppeldifferenzbande bei (+) 1694 cm^{-1} entsteht (Abb. III-12). Die entstandene Frequenzverringerng kann jedoch nicht bestimmt werden.

Die Doppelmarkierung bestätigte erneut die Zuordnung der (-)1670 Bande zu einer Carbonylstreckschwingung von Glutamin. Im Vergleich der Doppeldifferenzspektren von $s^{15}\text{N}$ -Amid-Q und $s^{15}\text{N}$ -Amid-Q- $s^{13}\text{C}_4,10\text{a-RF}$ wurde ein schwaches Maximum bei 1694 cm^{-1} identifiziert. Seine Frequenzminderung bei ^{15}N -Amid-Q-Markierung bewies, dass es sich um eine Glutaminsignatur handelt. Sie könnte die zugehörige Lichtzustandsbande zu der Dunkelzustandsschwingung (-)1670 darstellen. Da Domratcheva *et al.*, 2016 in einem analogen Isotopenmuster für BlrB sehr ähnliche Frequenzminderungen zeigen und die Anwesenheit einer verdeckten Bande um 1691 cm^{-1} postulieren, sollte die verursachende Glutaminseitenkette in beiden Proteinen eine vergleichbare Umgebung aufweisen. PixD und BlrB teilen nur ein Glutamin, womit die Signale dem strikt konservierten Q50 zuzuordnen sind.

Eine Bandenpaarung von (+)1694/(-)1670 für die Q50-Seitenkette weist auf eine Zunahme der Schwingungsfrequenz um 24 cm^{-1} hin. Änderungen der Elektronendichte einer Schwingung produzieren nahe beieinander gelegene Differenzbanden (Barth & Zscherp, 2002). Die beobachtete Frequenzzunahme sollte daher nicht auf einen Verlust oder eine Schwächung der Wasserstoffbrücke zurückgehen. Weiter auseinander liegende Differenzbanden entstehen hingegen unter chemischen Veränderungen, sodass eine negative Bande bei Proteinaktivierung verschwindet und stattdessen ein neues Lichtzustandssignal auftritt (Barth & Zscherp, 2002). Wie bereits erwähnt soll die Isotopenverschiebungen bei ^{15}N -Markierung in der Imidsäure-Form deutlich ausgeprägter sein, als in der Amid-Form (Domratcheva *et al.*, 2016). Aus den Doppeldifferenzspektren mit $s^{15}\text{N}$ -Amid-Q-Markierung lassen sich die korrespondierenden Bandenpaare der Schwingungsfrequenzen von markierter und unmarkierter Flavin $\nu(\text{C}4\text{O}4)$ im Lichtzustand sowie der Q50 $\nu(\text{C}=\text{O})$ im Dunkelzustand recht deutlich extrahieren (Abb. III-12). Die Position der Q50 $\nu(\text{C}=\text{O})$ im Lichtzustand bei ^{15}N -Amid-Q-Markierung ging hingegen aus den Doppeldifferenzspektren nicht eindeutig hervor. Die meisten Unterschiede können durch Verschiebung der Flavin $\nu(\text{C}4\text{O}4)$ in die Region zwischen $1681 - 1686\text{ cm}^{-1}$ erklärt werden. Demnach liegt die Seitenkettenschwingung für ^{15}N -Amid-Q vermutlich unterhalb dieser Region oder absorbiert noch niedriger. Das würde einer größeren ^{15}N -induzierten Frequenzminderung von $> 14\text{ cm}^{-1}$ entsprechen, die auf eine Q50-Imidsäure im Lichtzustand von PixD hinweist.

Neben den Schwingungen von Glutaminen selbst können Wasserstoffbrückenpartner des Q50 für die Analyse seiner Konformationsänderungen herangezogen werden. Während seine Interaktion mit Y8 experimentell gesichert ist (Iwata *et al.*, 2011), werden zum $\beta 5$ -Strang hin die Reste W91 und M93 als putative Bindungspartner diskutiert (Stelling *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2011). Ihr Positionswechsel soll zugleich Änderungen der Sekundärstrukturen initiieren.

Zu einem näheren Aufschluss über die Konformationsänderungen von W91 bei der PixD-Lichtaktivierung und zu einer abschließenden Bewertung seiner Rolle sollten FT-IR spektroskopische Untersuchungen der stabilen Zustände von isotopenmarkierten Proteinen oder Substitutionsmutanten beitragen.

III.2.3 Die Rolle von W91 in der Photoaktivierung und Signalweiterleitung

Im PixD-WT befinden sich in der auswärtsgerichteten Orientierung von W91 die Seitenketten von V90 und Q94 in näherer Umgebung der Indolseitenkette, die zusätzlich von Aminosäuren des C-Terminus fixiert werden könnte (Abb. III-13.A). Dagegen umrahmen Q29, N32, L41 und M93 das zum Flavin gerichtete Tryptophan (Yuan *et al.*, 2006) (Abb. III-13.B). Sollte W91 an der Stabilisierung des Q50 im P_{red} Zustand beteiligt sein und dafür in die Flavinbindetasche verlagern, ist eine Abnahme der NH- und C=N-Schwingungsfrequenzen des Indols zu erwarten. Diese wären in inversen oder selektiven Isotopenmarkierungen für Tryptophan sichtbar und würden aufgrund des exklusiven Vorkommens dieser Aminosäure in PixD eine exakte Zuordnung von IR-Banden zu diesem Rest erlauben. Zur Umsetzung solcher Isotopenmuster erzeugte Tom Lindtner in seiner Masterarbeit den *E. coli* Stamm CpXFΔWv2 mit verminderter Isotopenstreuung von Tryptophan und exprimierte PixD unter Supplementierung von u¹⁵N-RF sowie ¹⁵N-Ammoniumchlorid (Lindtner, 2016). Als Ergänzung zu seiner Proteinprobe wurde CpXFΔWv2 außerdem für die selektive Isotopenmarkierung mit vollmarkiertem ¹³C₁₁¹⁵N₂-Tryptophan (sW) verwendet. Die massenspektrometrische Analyse dieses Musters zeigte Isotopenstreuung, wobei für das Peptid NFEVWSMQAITVNDLSTEQVK mit einer Massendifferenz von -1 eine Abundanz von rund 70 % bestimmt wurde (Anhang Abb. V-7). Wohingegen die vollständige Markierung des in der Expressionsphase gefütterten, reinen Tryptophans bestätigt werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies entspricht wahrscheinlich dem Verlust von einem ¹⁵N-Atom durch den Katabolismus von *E. coli* und deutet auf Aktivität einer unspezifischen Trans- oder Desaminase hin. Denkbar ist z.B. die Tyrosin-Aminotransferase TyrB, welche ein breites Substratspektrum aufweist (Powell & Morrison, 1978).

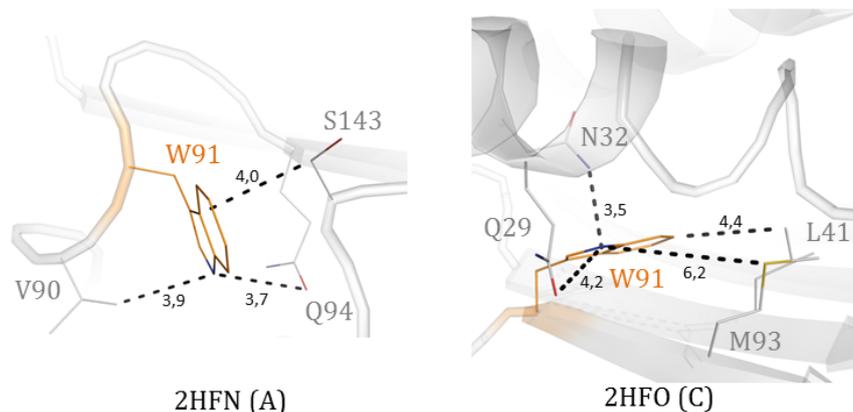


Abb. III-13 – Umgebung von W91 in der in- und out-Konformation

Mit den verschiedenen Positionen der Tryptophan-Seitenkette wird sie entweder von V90 aus der $\beta_4\beta_5$ -Schleife, Q94 im β_5 -Strang und S143 eingerahmt, oder befindet sich in Nähe zu Resten der α_1 -Helix (Q29 und N32) sowie M93 und L41 im β -Faltblatt. Yuan *et al.*, 2006, PyMOL, Abstände in Ångström

Tom Lindtners inverses Markierungsmuster für W91, in dem alle Stickstoffatome außer denen des Tryptophans durch schwere Isotope substituiert wurden, zeigt eine auffällige Übereinstimmung mit den Daten der uniformen ¹⁵N-Inkorporation von Helena Steinocher (Steinocher, 2013, Lindtner, 2016) (Abb. III-14).

III. Ergebnisse

Tryptophan-Signaturen werden über den gesamten Messbereich verteilt erwartet (Barth, 2000; Wolpert & Hellwig, 2006), bis auf wenige Ausnahmen können jedoch keine Signale gefunden werden, die auf Tryptophan CN- oder NH-Schwingungen schließen lassen. Hierzu zählen die Schulter um $(+)$ 1623 cm^{-1} (a) sowie die Banden bei $(-)$ 1433 (b) und $(-)$ 1279 cm^{-1} (c), welche zu Schwingungsfrequenzen von Trp CC/C=C-Streck- und NH/CH-Dehnschwingungen passen (Barth, 2000; Wolpert & Hellwig, 2006). Obwohl die Zuordnung des Signals bei $(-)$ 1433 in den anderen Isotopenmarkierungen durch potenzielle Überlagerung der Differenzbanden schwierig ist, könnte diese Schwingung in $i^{13}\text{C}$ - und $i^{15}\text{N}$ -RF um 14 bzw. 4 cm^{-1} verschoben sein (Vergrößerung Abb. III-14). Dadurch würde eine Deutung als Ringoszillation unterstützt. Da $(-)$ 1433 und $(-)$ 1279 außerdem im Differenzspektrum des WT in D_2O beeinflusst erschienen (Abb. III-6.D B“, Abb. III-7.D C), ist eine Kopplung an Gruppen mit austauschbaren Protonen möglich. Referenzdaten lassen auch für das als Doppelbande bei $(+)$ 1421/1417 cm^{-1} (d) erscheinende Signal (Abb. III-14) eine Zuordnung zu $\nu(\text{CC})$, $\delta(\text{NH})$, (CH) Schwingungen des Indolrings zu (Barth, 2000; Wolpert & Hellwig, 2006), welche konsistent mit den Ergebnissen der globalen Proteinmarkierungen ist.

Eine sichere Aussage über die Beteiligung von Tryptophansignaturen am PixD-Spektrum ist jedoch nicht möglich. So wird das Signal mit Maximum bei $(+)$ 1623 bereits von Masuda *et al.*, 2004 als Amid I Signatur bestimmt. Eine putative Überlagerung von Flavinschwingungen, möglicherweise der von C4aN5 oder C5aN5, sowie von nicht an Stickstoff gekoppelten Protein-C-Schwingungen erschwert dagegen die Bewertung der Signalverschiebungen der $(-)$ 1279 cm^{-1} Bande (Abschnitt III.2.1). Auffällig ist zudem eine um 3 cm^{-1} stärkere Verschiebung der Protein-CN-Schwingungen repräsentierenden Bande bei 1101 cm^{-1} durch die $i^{15}\text{N}$ -W-Markierung gegenüber der $u^{15}\text{N}$ -Probe (Abb. III-14 e). Dieses unerwartete Verhalten weist möglicherweise auf unterschiedliche Markierungsgrade der Proteine hin.

Weitaus deutlichere Änderungen erzeugte die selektive Markierung des W91 (Abb. III-14). Hier fielen besonders die verringerten Intensitäten der Amid I Bande bei 1632 cm^{-1} (f) und des Protein-C=O-Signals bei $(-)$ 1610 cm^{-1} auf (g), die von einer Verschiebung der Schulter um etwa 5 cm^{-1} auf $(+)$ 1617 und einer stärkeren Ausprägung der Region um 1594 cm^{-1} begleitet wurden (Abb. III-14). Möglicherweise rückte ein Signal mit Minimum um 1670 cm^{-1} nach 1624 cm^{-1} . Diese putative Dunkelzustandsabsorption wäre breit und könnte durch die Frequenzminderung auf 1615 - 1642 cm^{-1} eine Reduktion der Intensitäten in der Region hervorgerufen haben, während die entsprechende Schwingung des Lichtzustandes durch die Isotopenmarkierung bei 1594 cm^{-1} erschien (Abb. III-14 i). Diese Interpretation wird sowohl von den verringerten Signalintensitäten als auch den einer Vollmarkierung entsprechenden, starken Verschiebungen um - 40 cm^{-1} gestützt. Infolgedessen wurde außerdem die Schulter bei $(+)$ 1662 (h) sichtbar (Abb. III-14). Sie könnte ein weiteres Indiz dafür sein, dass unter den Amid I Banden von PixD zusätzliche Signale verborgen liegen.

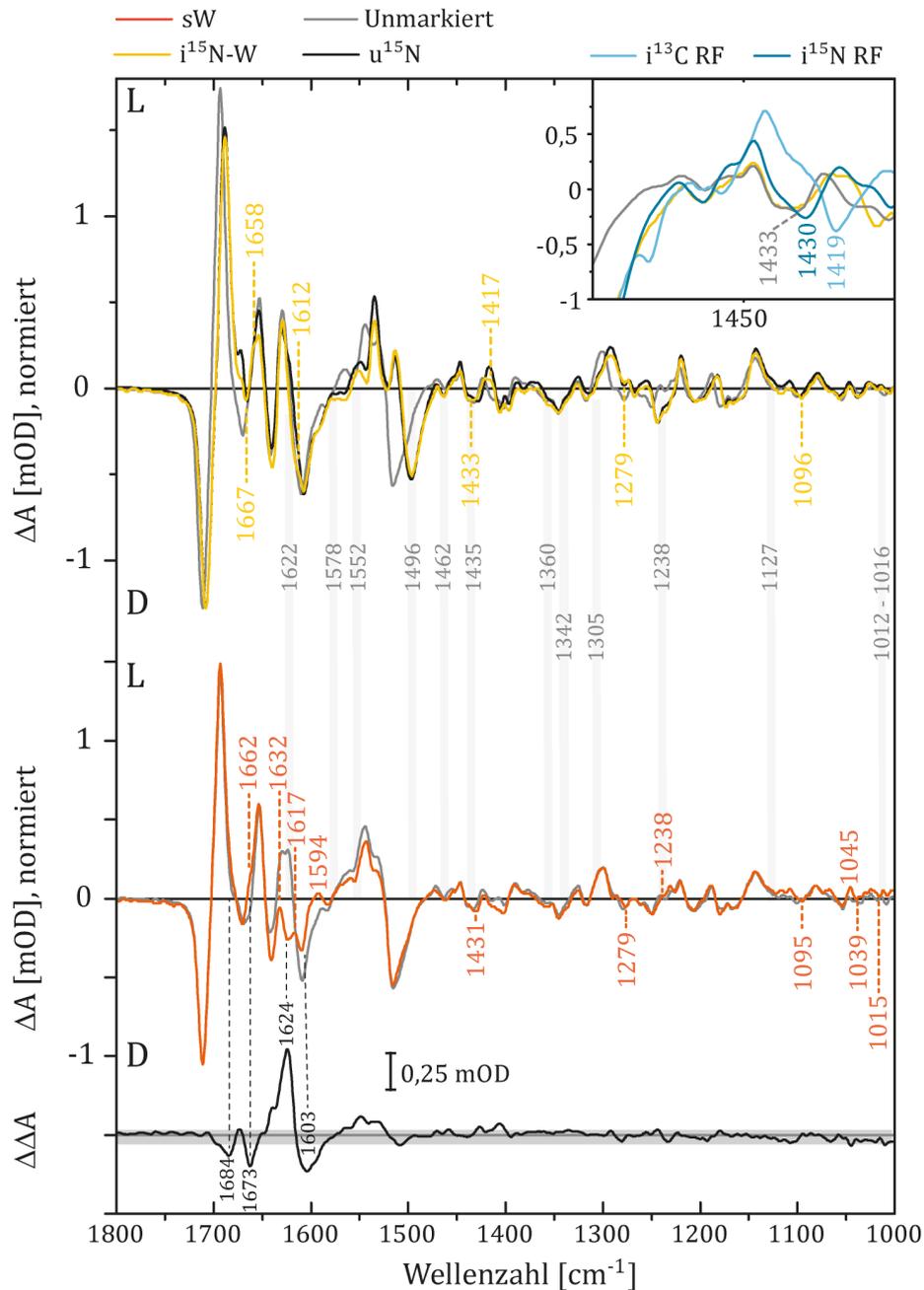


Abb. III-14 – Selektives Markierungsmuster für W91 in PixD

Das FT-IR LmD-Differenzspektren der selektiven Tryptophanmarkierung (sW, dunkel-orange) in PixD, wurde im Vergleich zum inversen Muster ($i^{15}\text{N}$ -W, hell-orange; Lindtner, 2016) und zum unmarkierten Wildtyp (grau) unter Normierung auf (-)1712 des sW-Spektrums abgebildet. Zusätzlich wurden Daten der $u^{15}\text{N}$ -Markierung (schwarz; Steinocher, 2013) verglichen, um Signale der Tryptophan-Stickstoffe aus der $i^{15}\text{N}$ -W-Probe besser identifizieren zu können. Grau unterlegt sind bekannte Schwingungsfrequenzen von L-Tryptophan (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002). Es zeigten sich nur sehr geringe Unterschiede, die Wasserstoffbrückenänderungen an der Indolseitenkette ausschließen, und von der Selektivmarkierung sW bestätigt werden. Die sW-Probe wies allerdings auf Veränderungen der nicht-kovalenten Bindungen im Bereich des Proteinerückgrates von W91 um (+)1632 cm^{-1} hin (f). Für die Identifizierung eines zugehörigen negativen Signals erfolgte die Bildung eines Doppeldifferenzspektrums ($\Delta\Delta A$) aus den Ergebnissen von unmarkiertem WT und sW. Der grau unterlegte Bereich symbolisiert ein arbiträres Signifikanzlevel, das anhand geringer Intensitätsunterschiede beider Spektren festgelegt wurde. Die größten Unterschiede bestanden bei 1624 und 1603 cm^{-1} und zeigten eine Verschiebung der höherfrequenten Bande um -21 cm^{-1} an. Damit blieb die äquivalente Schwingungsfrequenz der Dunkelzustandsbindung unklar, sie könnte aber um 1670 - 1680 cm^{-1} absorbieren.

III. Ergebnisse

Neben den ausgeprägten Veränderungen im Amid I Bereich existierten schwächere Verschiebungen um $\approx 3 \text{ cm}^{-1}$ in der *Fingerprint* Region. Doch auch wenn Schwingungen im niedrigen Frequenzbereich von W91 stammen könnten, waren die induzierten Änderungen sehr klein wie das Doppeldifferenzspektrum $\Delta\Delta$ zeigt (Abb. III-14). Hierzu zählt die im inversen Muster als Seitenkettenschwingung des W91 zugeordnete Bande bei $(-)$ 1276 cm^{-1} (Abb. III-14 c und c'). Einige weitere Signale, beispielsweise $(+)$ 1238 (k), $(-)$ 1095 (e) und $(-)$ 1015 (l), wurden auch durch die inverse Markierung beeinflusst (Abb. III-14, Anhang Tab. V-H), eine sichere Zuordnung zu Tryptophanschwingungen ist daher nicht möglich. Ebenso wie das Auftreten der Doppelbande bei 1417 cm^{-1} (Abb. III-14 m) könnten diese Verschiebungen Hinweise auf die ^{15}N -Amid-Isotopenstreuung sein.

Insgesamt widersprechen die Daten einer Änderung der Wasserstoffbrückeninteraktionen des W91 beim Übergang in den Lichtzustand. Des Weiteren weisen sie auf Umlagerungen am Proteinrückgrat um W91 hin, an dem das $\text{C}\alpha$ -Carbonyl beteiligt ist. Zusätzliche Informationen über die Rolle des semi-konservierten Tryptophans ließen sich aus einer Analyse von Substitutionsmutanten gewinnen. Hierfür wurden PixD-W91F und -W91A in Zusammenarbeit mit Tom Lindtner untersucht (Lindtner, 2016). Die Spektren werden in den folgenden Abschnitten vor dem Hintergrund der hier gezeigten Daten interpretiert und im Vergleich zu einer weiteren PixD-Mutante betrachtet.

Strukturelle Veränderungen in PixD durch W91F-Substitution

Tryptophan wird rein strukturell durch das verwandte Phenylalanin ersetzt, das mit seinem π -Ringsystem ebenfalls aromatische Interaktionen eingehen kann. Im Gegensatz zu Tryptophan ist es allerdings nicht zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken fähig (Barnes & Gray, 2003). Die Analyse einer W91F-Mutante kann daher aufzeigen, ob Position 91 nicht-kovalente Bindungen eingeht und sich diese Interaktionen nach Belichtung verändern, erhält aber weitestgehend den aromatischen Charakter der Seitenkette.

Die Substitution mit Phenylalanin zeigt ein LmD-Differenzspektrum, welches dem des WT ähnelt (Abb. III-15). Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante betreffen vor allem die positiven Signale 1692, 1406, und 1298 cm^{-1} (Abb. III-15 a), welche Flavinschwingungen zugeordnet werden konnten (Abschnitt III.2.1). Ebenfalls um $-2 - 4 \text{ cm}^{-1}$ verschoben sind außerdem $(+)$ 1543, 1420 und 1241 cm^{-1} , an denen zusätzlich Bindungen des Proteins beteiligt sind (Abb. III-15 b). Unter den Dunkelzustandschwingungen sind vier Banden verändert: 1575, 1266, 1247 (c) und 1012 cm^{-1} (d), worunter nur $(-)$ 1012 wahrscheinlich nicht mit Proteinbanden vermischt oder gekoppelt ist. Die gestärkten Wasserstoffbrücken zum Flavin könnten mit Veränderungen der Sekundärstruktur korrelieren, die von den Amid I Banden angezeigt wird. Hier sind $(-)$ 1667 und 1640 (e) sowie $(+)$ 1650 und $(+)$ 1626 (f) zu niedrigeren Frequenzen verschoben (Abb. III-15 e, f). Möglicherweise bilden die Banden $(-)$ 1575 und $(+)$ 1581 im Amid II Bereich zugehörige CN-Schwingungen des Rückgrates. Zusätzlich überlagert um 1580 cm^{-1} eine Flavin C10aN1 Signatur (Bonetti *et al.*, 2008; Steinocher, 2013).

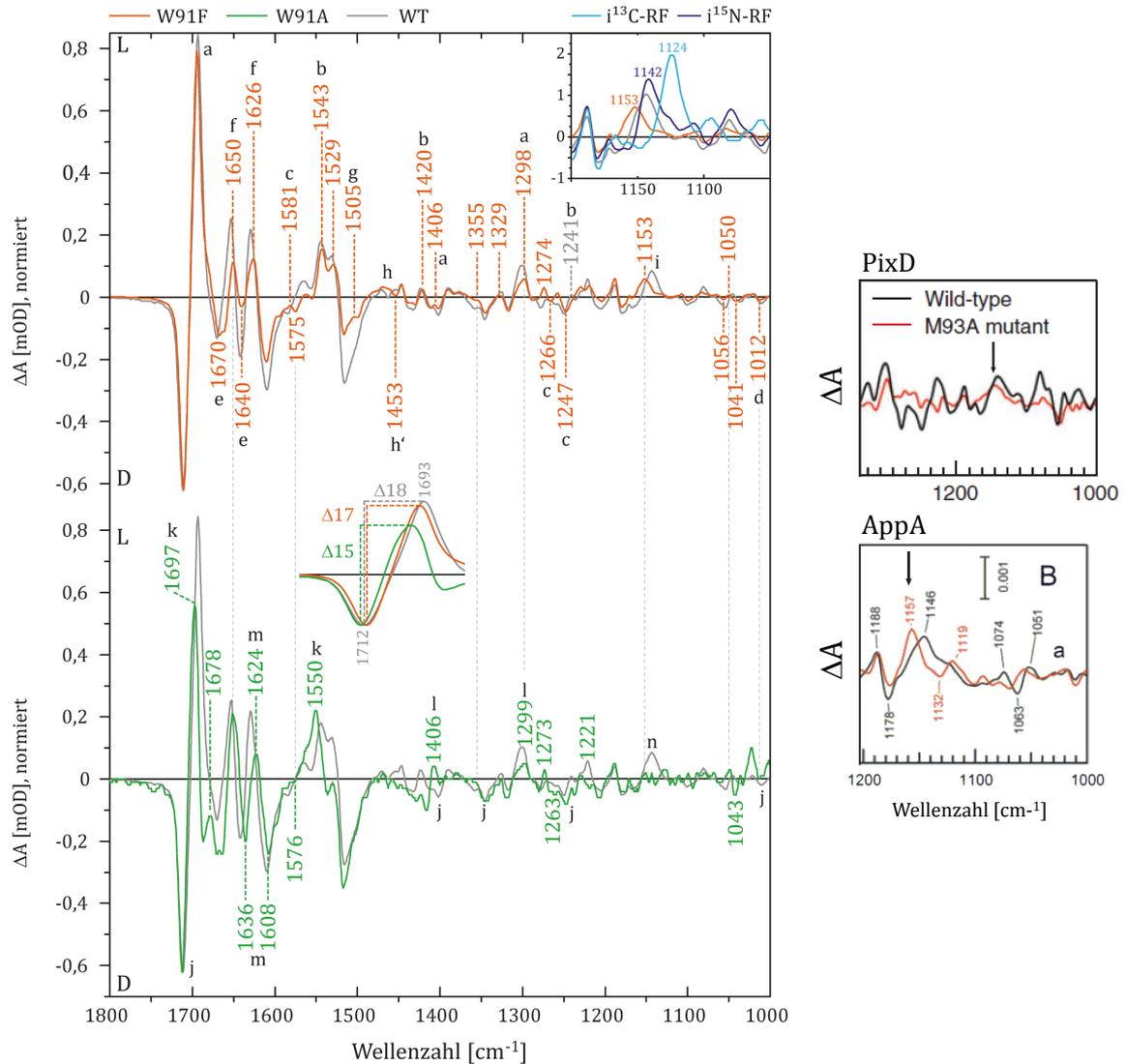


Abb. III-15 – FT-IR Lmd-Differenzspektren zweier W91-Substitutionen

Die Daten der Mutanten W91F (dunkel orange) und W91A (grün) wurden im Vergleich zum Wildtyp (WT, grau) dargestellt und auf das (-)1712 Signal des W91A-Spektrums normiert. Durch die Substitutionen induzierte Verschiebungen sind mit Angabe der neuen Position gekennzeichnet und betreffen neben der Sekundärstruktur und Aminosäureseitenketteninteraktionen auch Chromophorschwingungen wie die C4O4-Bindung, deren Frequenzminderung beim Übergang in den aktiven Zustand in den Mutanten um 1 cm⁻¹ und 3 cm⁻¹ verringert ist (Inset). Trotz des gegensätzlichen Phänotyps fanden sich in den Spektren einige Banden, die in beiden Mutanten gleichermaßen verändert waren (grau gestrichelt). Ein auffälliges Signal des *Fingerprint* Bereiches absorbiert bei 1145 cm⁻¹ (n, i) und erfuhr wahrscheinlich in beiden Varianten eine Verschiebung um +8 cm⁻¹. Es findet sich auch in den Differenzspektren von AppA-W104A und PixD-M93A mit ähnlicher Frequenzerhöhung (siehe rechts, Ausschnitte verändert aus (Masuda *et al.*, 2005a) und (Masuda *et al.*, 2008)). Das jeweils rote Spektrum zeigt die IR-Absorption der Mutante im Vergleich zum Wildtyp in schwarz). Die Spektren wurden in Zusammenarbeit mit Tom Lindtner gemessen.

III. Ergebnisse

Die Schwingungsänderungen beim Übergang in den Lichtzustand bleiben bei einer Zusammengehörigkeit der Bandenpaare (-)1667/(+)1626, (-)1640/(+)1650 und (-)1575/(+)1581 ähnlich zum WT, wo die korrespondierenden Signale bei (-)1670/(+)1631, (-)1643/(+)1653 und (-)1584/(+)1589 auftreten. Sie geben damit keine Hinweise auf die Stabilisierung der aktiven Konformation durch die W91F-Substitution. Zusätzlich zu der (+)1505 Absorption erschien möglicherweise bei (+)1463 (h) ein weiteres neues Signal (Abb. III-15), das aber auch durch die Dislokation des Minimums auf 1453 cm^{-1} (h') sichtbar geworden sein kann.

Die Bande (+)1145 (i) erfährt ebenfalls eine starke Verschiebung um 11 cm^{-1} , allerdings zu höheren Wellenzahlen auf 1153 cm^{-1} (Abb. III-15). Sie ist besonders auffällig, da sie auch in den von Masuda *et al.*, 2008 und 2005a publizierten Differenzspektren der Mutanten PixD-M93A und AppA-W104A vergleichbar beeinflusst auftritt. Eine Gegenüberstellung mit den ^{13}C - und ^{15}N -Markierungsmustern für Apoprotein und Chromophor deutete auf eine Kohlenstoffbindung mit schwacher Kopplung an Stickstoffatome hin (Abb. III-15, Inset; Anhang Tab. V-C). Die Bande war zudem nicht sensitiv gegenüber D_2O -Austausch (Abb. III-7.D I'), daher beeinflusste die W91-Mutation vermutlich eine CC-, CH-, CH_2 - oder CH_3 -Bindung.

Weitere Signale mit Frequenzerhöhung waren (+)1355, 1329, 1274, 1050 sowie die Dunkelzustandsschwingungen bei 1056 und 1041 cm^{-1} (Abb. III-15). Die Zunahme der Schwingungsfrequenz um $2-5\text{ cm}^{-1}$ könnte auf den Verlust oder die Schwächung einer Wasserstoffbrückenbindung zurückzuführen sein. Während (-)1056 anhand der Isotopenmarkierungen (Anhang Tab. V-C) und dem Differenzspektrum des deuterierten Wildtyps (Abb. III-7.D) einer mit Protonen gekoppelten Kohlenstoffbindung zugeordnet werden konnte, ließ sich die Herkunft der übrigen Signale nicht aus diesen Daten abschätzen. Bleibt der Einfluss der Mutation lokal, kann aber angenommen werden, dass zumindest die frequenzerhöhten Banden des Lichtzustandes auf einen spezifischen Rest in der Umgebung von Position 91 zurückgehen.

Insgesamt zeigte das FT-IR Differenzspektrum der W91F Mutante schwächere Rückgratschwingungen struktureller Elemente der Domäne an, die in beiden Konformationen vorliegen. Sie erlauben dennoch die lichtaktivierte Umstrukturierung, die im Wildtyp-Protein auftritt, stabilisieren aber den rotverschobenen Zustand. Signalverschiebungen betreffen entsprechend Schwingungsfrequenzen von Aminosäureketten die sich α -Helices, den Faltblattsträngen oder der $\beta_4\beta_5$ -Schleife zuordnen lassen (Anhang Tab. V-J, Tab. V-K). Trotz der distalen Position des W91 sind zusätzlich Schwingungen des Isoalloxazinringes III verändert (Anhang Tab. V-I). Diese Beeinflussung des Wasserstoffbrückennetzwerkes innerhalb der Bindetasche, geschieht vermutlich über die Interaktionen der Hauptkette und die Ausrichtung des großen, hydrophoben Ringsystems.

Veränderung der Wasserstoffbrückenstärke zur C4O4 durch W91A-Austausch

Alanin besitzt eine kurze, unpolare Seitenkette. Die räumliche Freiheit der Rückgratbindung ist jedoch genauso eingeschränkt wie bei anderen Aminosäuren (Barnes & Gray, 2003). Eine Substitution des Tryptophans gegen Alanin in PixD reduziert die sterische Restriktion der Seitenkette an Position 91 und könnte eine größere Flexibilität des β 5-Stranges vermitteln. Gleichzeitig sollten jedoch die Interaktionen des Proteinrückgrates aufrechterhalten werden. Das FT-IR LmD-Differenzspektrum von PixD-W91A wurde bereits 2008 von Masuda *et al.* veröffentlicht. Es wurde in Zusammenarbeit mit Tom Lindtner (Lindtner, 2016) für einen direkten Vergleich zur IR-Absorbanz der W91F-Mutante reproduziert.

Gegenüber der W91F Mutante wies die Substitution desselben Restes durch Alanin eine sehr viel stärkere Veränderung des LmD-Differenzspektrums auf. Neben der verschobenen Absorption des Signals bei (+)1697 (k) waren insbesondere im *Fingerprint* Bereich Form und Intensität der Banden stark beeinflusst. Dies korrelierte mit dem schlechteren Signal-Hintergrund-Verhältnis, welches durch den sehr schnellen Photozyklus dieser Mutante bedingt ist. In FT-IR Untersuchungen der Dunkelrelaxation von BLUF-Domänen wird nur ein Rückgang der entstandenen Signale beobachtet, aber keine Verschiebungen durch Intermediate oder die Entstehung neuer Signale (Hasegawa *et al.* 2004). Trotz des schnellen Zerfalls des Signalzustandes der W91A-Mutante, gab das FT-IR Differenzspektrum daher Aufschluss über veränderte Schwingungsformen in den zwei Zuständen. Aufgrund der erschwerten Zuordnung zu den entsprechenden Signalen im WT-Spektrum wurden die Daten der W91A vergleichend mit denen der W91F betrachtet.

Im Gegensatz zur W91F-Mutante induzierte der W91A-Austausch eine Abnahme der C4O4-Streckschwingungsänderung um nur 15 cm^{-1} , statt der 18 cm^{-1} im WT (Abb. III-15, Inset). Ähnlich ist dagegen die Verschiebung von Dunkelzustandsbanden mit Zuordnung zum Flavin oder einer Beteiligung von Chromophorschwingungen bei 1402 , 1345 , 1250 und 1010 cm^{-1} um maximal 3 cm^{-1} nach 1400 , 1344 , 1247 und 1012 cm^{-1} (Abb. III-15 j, Anhang Tab. V-I). Beide Mutationen beeinflussten daher vorrangig die Flavinbindetasche im Lichtzustand, wobei der Alaninaustausch größere Wirkung, insbesondere auf die Banden 1697 und 1550 cm^{-1} , ausübte (Abb. III-15 k). Des Weiteren waren die Signale 1406 und 1299 cm^{-1} der Lichtkonformation um 3 cm^{-1} zu niedrigeren Frequenzen verschoben (Abb. III-15 l). Gegenüber der Amid I Region des W91F-Differenzspektrums zeigten insbesondere die Banden bei (-)1636, (+)1624 und (-)1608 mit Verschiebungen um -6 , -7 und -2 cm^{-1} einen deutlich stärkeren Einfluss der W91A-Mutation (Abb. III-16.A m).

Die Frequenzänderungen der Rückgratschwingungen betrafen anders als im Fall der W91F-Substitution (Abb. III-15 oben) auch die putativen C=O-Schwingungen der Helices. Während die lichtinduzierten Frequenzminderungen für mögliche β -Strang-assoziierte Signalaare geringer ausfielen, waren sie für Helices erhöht. Trotz der unterschiedlichen Phänotypen fanden sich jedoch auch Schwingungen, die in beiden Varianten gleichermaßen beeinflusst waren.

III. Ergebnisse

Darunter sind vor allem positive Signale bei 1650, 1576/1575, 1529, 1406, 1266/1263, 1050 cm^{-1} und möglicherweise 1153 cm^{-1} (Abb. III-15 gestrichelte Linie). Die Region der letzteren Bande erschien im W91A-Differenzspektrum stark verändert, mit drei schwach erkennbaren Maxima (Abb. III-16 n). Masuda *et al.*, 2008 beobachten in ihrem LmD-Differenzspektrum von PixD-W91A nur zwei dieser Signale. Eines davon trat bei etwa 1153 cm^{-1} auf und könnte damit der auffälligen Bande des W91F-Spektrums entsprechen. Demgegenüber waren nur drei Dunkelzustandsschwingungen in beiden Mutanten ähnlich verändert: 1640/1636, 1041/1043 und 1012 cm^{-1} (Abb. III-15). Neben den zusammengehörigen Banden 1643/1653 könnten damit auch (+)1036 und (-)1046 cm^{-1} dieselbe Schwingung in Dunkel- und Lichtzustand repräsentieren.

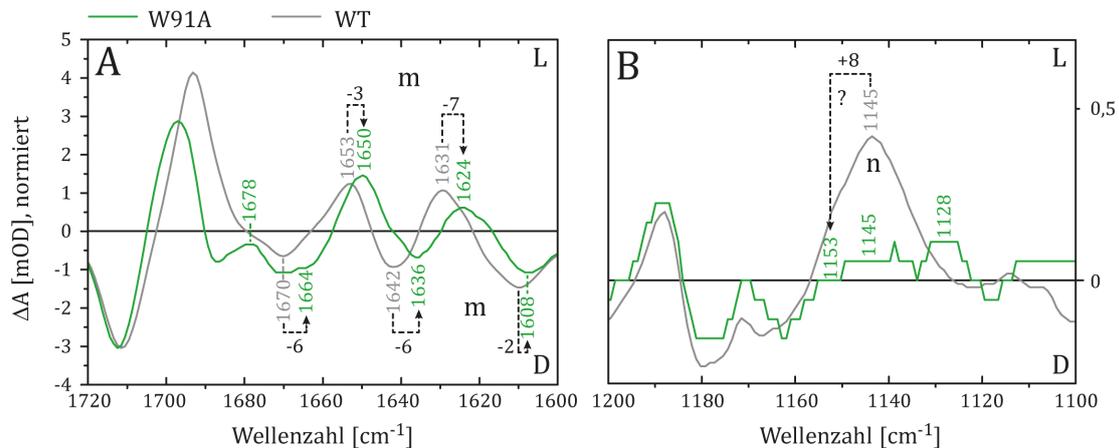


Abb. III-16 – Detailansicht der Amid I Signale und der 1145 cm^{-1} Region in PixD-W91A

Vergrößerte Ausschnitte der Amid I Region (A) und der (+)1145 Bande (B) im LmD-Differenzspektrum bei Substitution des W91 gegen Alanin. Der WT ist zum Vergleich aufgetragen. Signalverschiebungen sind durch Pfeile und die Angabe der Frequenzverringern in Wellenzahlen angegeben.

Eine genauere Analyse der Änderungen von Proteinsignalen ließ die starke Abweichung des Spektrums nicht zu. Alle in der W91F verschobenen Banden schienen auch durch die W91A-Mutation beeinflusst zu sein. Viele ähnliche Bandenverschiebungen deuten nicht auf einen jeweils umgekehrten Mechanismus hin, obwohl die beiden Substitutionen einen entgegengesetzten Einfluss auf die Dunkelrelaxation von PixD ausüben (Mathes, 2008). Nähere Informationen könnten Analysen der Differenzspektren weiterer Mutanten mit niedriger Zeitkonstante τ liefern, wie etwa die im Folgenden gezeigte PixD-S28A Variante (τ 4,5 s; Stierl, 2007).

III.2.4 Strukturelle Änderungen in der schnell relaxierenden Mutante S28A

Das PixD-Serin28 der α 1-Helix nimmt in BLUF-Domänen eine semi-konservierte Stellung ein und kann durch die ebenfalls kleine Aminosäure Alanin ersetzt sein. Nimmt man diese Substitution in PixD vor, wird die Stabilität des Signalzustandes verringert und eine 4-fach beschleunigte Dunkelrückkehr erzeugt. Begleitet ist der Phänotyp von der auffälligen 15 nm Rotverschiebung der UV/*vis*-Absorptionseigenschaften des Flavins (Bonetti *et al.*, 2009).

In der Kristallstruktur zeigen einige Monomere eine Seitenkettenorientierung des S28 mit möglichen Wasserstoffbrücken zum Isoalloxazinring (Yuan *et al.*, 2006). Daher lässt sich für PixD-S28A eine Erhöhung der Flavinschwingungsfrequenzen mit Beteiligung von N1 oder N5 sowohl im Grund- als auch im Lichtzustand vermuten. Findet dagegen eine von Kita *et al.*, 2005 unterstützte Interaktion zwischen der Carbonylgruppe von Ile24 und dem γ -Sauerstoff der Serin-Seitenkette in TePixD auch in PixD statt, würde der Ersatz durch Alanin Wasserstoffbrückenbindungen im Rückgrat aufheben und dadurch die C=O-Frequenzen der α 1-Helix erhöhen. Aufgrund der räumlichen Nähe der α 1-Helix zum β 5-Strang würden Übereinstimmungen mit den IR-Absorptionen der W91-Varianten ein putatives Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen C404-N32-S92 (Kristallstruktur PixD; Yuan *et al.*, 2006), unterstützen. Unter dieser Annahme sollten die beiden schnellen Mutanten W91A und S28A einander ähnlicher sein.

Die S28A Mutante wurde von Dr. Stierl hergestellt und aufgereinigt. Das Differenzspektrum von Licht- und Dunkelkonformation zeigte ebenfalls eine geringere Signalqualität. Es schien Veränderungen aus der W91F und der W91A Mutante zu vereinen, sodass die hochfrequente Region Merkmale des W91A-Spektrums aufwies, wohingegen ab 1516 cm^{-1} , wie für die W91F-Mutante, eher geringe, differenzierte Signaländerungen beobachtet wurden (Abb. III-17). Die Flavin C4-Carbonylschwingung des S28A-Dunkelzustandes erfuhr eine starke Frequenzminderung um 4 cm^{-1} (a), während die korrespondierende Lichtzustandsbande nahezu unverändert bei 1692 cm^{-1} absorbiert (a') (Abb. III-17). Damit verhielt sich dieses Protein entgegengesetzt zu PixD-W91A, in beiden Mutanten war die Schwingungsänderung der C404-Bindung zwischen Licht und Dunkel mit 16 und 15 cm^{-1} aber ähnlich reduziert. Unter den Amid I Schwingungen fand sich bei $(+)1675\text{ cm}^{-1}$ (b) eine Parallele zum Differenzspektrum der W91A-Mutante (Abb. III-17). Diese neue oder durch Verschiebungen besser sichtbare Schulter absorbierte nach Tryptophan-Alanin-Austausch bei 1678 cm^{-1} und könnte von demselben Aminosäurerest verursacht werden. Stellen $(-)1661$ und $(+)1631$ tatsächlich dieselbe Bindung in Licht- und Dunkelzustand dar, ist die bei Lichtapplikation auftretende Frequenzminderung mit 30 cm^{-1} deutlich geringer als in der W91A-Probe ($\Delta 38$). Demgegenüber erfuhren die putativen Helixschwingungen bei $(-)1639/(+)1651$ eine zu den W91A/F-Spektren vergleichbare Änderung (c, c'; Anhang Tab. V-I), während das postulierte Bandenpaar $(-)1610/(+)1623$ nicht verschoben war, wodurch eine Zugehörigkeit dieser Signale zu Strängen des β -Faltblattes unterstützt wird (Abb. III-17). Der *Fingerprint* Bereich erinnerte an das eher schwach veränderte Spektrum von PixD-W91F, wies aber auch Frequenzen mit größerer Übereinstimmung zu W91A auf.

Entsprechend des bathochromen Effektes auf die UV/*vis*-Absorption des Proteins, zeigte diese Variante Änderungen in der Chromophorbindingtasche bei $(-)1708$ (a) sowie $(-)1576$, 1397 , 1176 , 1006 (d) und $(+)1584$, 1537 , 1404 , 1298 , 1286 (e) (Abb. III-17). Sie konzentrieren sich wahrscheinlich um C404 und N1/N3/N5. Zusammen mit der Frequenzverringern der Bande bei 1537 cm^{-1} bildet $(-)1556$ (f) nach bisherigen Kenntnissen eine charakteristische Änderung im S28A-Spektrum (Abb. III-17).

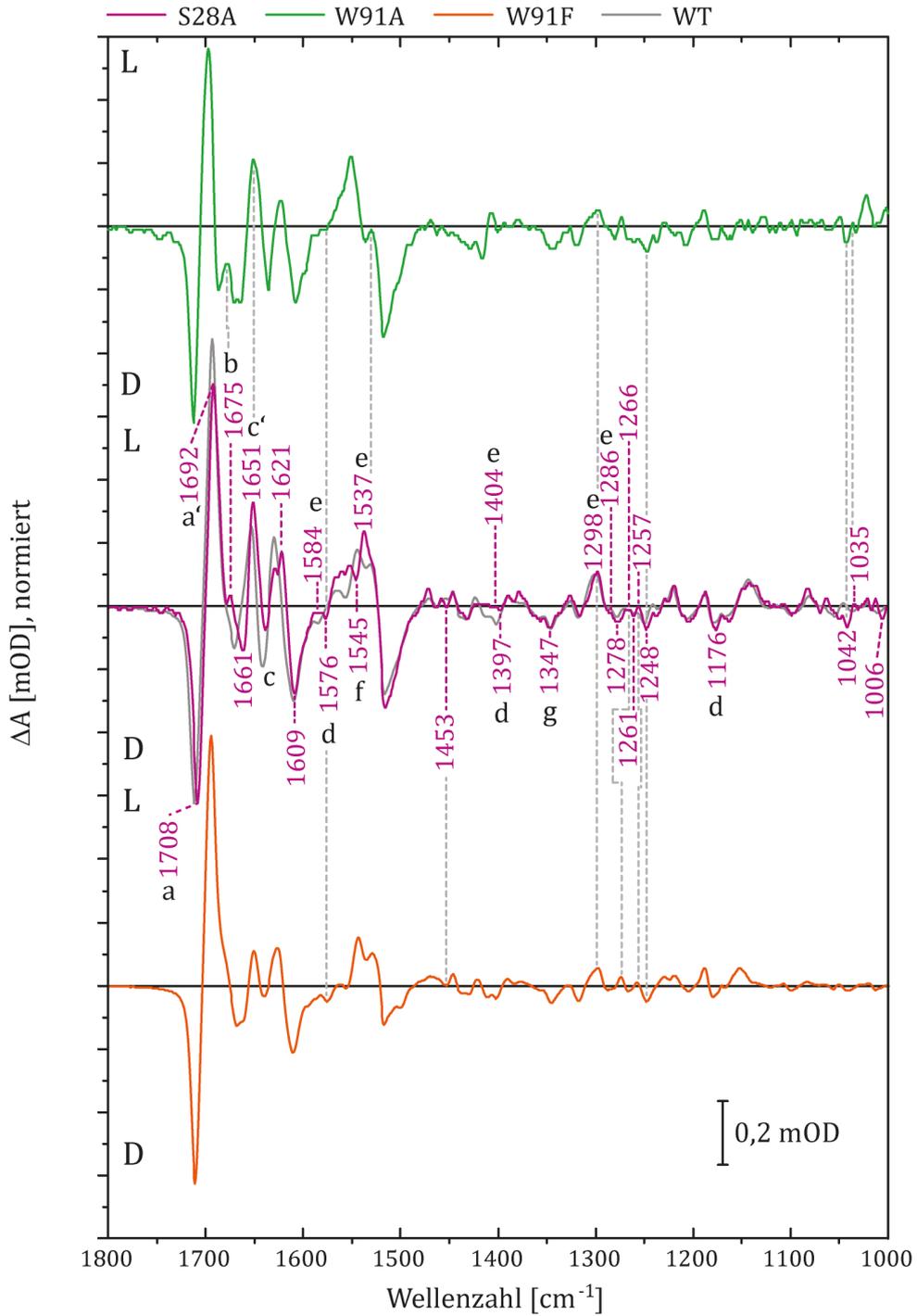


Abb. III-17 – PixD-S28A im Vergleich zu den W91-Mutanten

Mittig wurde die IR-Absorption von PixD-S28A (violett) im Vergleich zum WT (grau) aufgetragen. Die Spektren wurden auf das (-)1708 Signal der S28A-Mutante normiert und mit denen der W91-Substitutionen verglichen. Die Serin-Variante zeigte dabei Übereinstimmungen zu beiden W91-Mutanten, die mit gestrichelten Linien gekennzeichnet sind. Besonders der Amid I Bereich wies auffällige Parallelen zur schnell relaxierenden W91A-Probe auf. Die *Fingerprint* Region ähnelte dagegen mehr der der W91F-Mutante mit vergleichsweise wenigen, signifikanten Signalverschiebungen. Die Erhöhung der UV/*vis*-Absorption um 15 nm wurde vom IR-Spektrum eher schwach reflektiert, etwa von der um 4 cm^{-1} verringerten Frequenz der $\nu(\text{C4O4})$ im Grundzustand (a).

Unter Berücksichtigung der Zuordnung von Flavinsignalen (Abschnitt III.2.1) können die vorrangig frequenzmindernden Verschiebungen der negativen Extrema auf eine stärkere Bindung am C4-Carbonyl zurückgeführt werden. Die einzige verstärkte Bindung betraf die der C5aC6 zugeordneten Schwingung, die nach 1347 cm^{-1} verlagert war (g) (Abb. III-17, Anhang Tab. V-I). Aufgrund der WT-ähnlichen Absorption der C4O4-Bindung bei $(+)1692$, gehen die veränderten Lichtzustandsschwingungen im Flavin dagegen wahrscheinlich nicht von den Proteinbindungen zu O4 aus. Stattdessen traten hauptsächlich Verschiebungen von Banden zu niedrigeren Wellenzahlen auf, die mit N1, N5 oder N3-Bindungen assoziiert wurden und eine stärkere Koordination des Chromophors an diesen Atomen implizieren.

Obwohl S28 und W91 durch Einbettung in verschiedene Sekundärstrukturelemente räumlich getrennt sind, weisen die Ähnlichkeiten auf ein Wasserstoffbrückennetzwerk hin, das sich zwischen $\alpha 1$ und $\beta 5$ erstreckt. Da bekannt ist, dass W91 eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Dunkeladaptation einnimmt, ist die schnelle Rückkehrkinetik der S28A-Variante unter Umständen kein direkter Effekt, sondern resultiert aus der Umorientierung des Proteinerückgrates am Tryptophan-Rest oder den Asparaginen N31 und N32. Die S28A-Mutation löste, ähnlich zu W91F, definierte Änderungen der Proteinstruktur und der Position von umliegenden Aminosäureseitenketten aus. Diese liegen womöglich hauptsächlich in der $\alpha 1$ -Helix, durch Q29 und N32 besteht aber auch eine potenzielle Verbindung zur $\beta 4\beta 5$ -Schleife und dem angrenzenden $\beta 5$ -Strang.

III.3 Bildung und Zerfall des Signalzustandes in PixD

III.3.1 Die Funktion von Radikal-Intermediaten beim Antrieb des Photozyklus

Nach Betrachtung der stabilen Proteinkonformationen sollten auch transiente Prozesse, die an der Ausbildung und dem Zerfall von P_{red} beteiligt sind, untersucht werden. Eine treibende Kraft stellen dabei die durch Lichtabsorption induzierten Flavin-Radikale dar. Da diese Intermediate bisher ausschließlich in PixD, TePixD und BLUF-Mutanten beobachtet wurden (Stier, 2014; Gauden *et al.*, 2006; Lukacs *et al.*, 2014), wird ihre kritische Funktion für die Ausbildung des Signalzustandes kontrovers diskutiert.

Roman Fudim und Dr. Mathes untersuchten die primäre Photochemie der Q50A-Mutante von PixD mit Hilfe transientser Femtosekunden-Absorptionsspektroskopie (Fudim *et al.*, 2015). Die Mutation hat keinen Einfluss auf die UV/*vis*-Absorption des Dunkelzustandes und führt wie der WT zur lichtinduzierten Bildung anionischer und neutraler Flavin-Semichinone. Im Gegensatz zum WT wird die Lebensdauer des Neutralradikals auf mehrere Nanosekunden angehoben und führt nicht zur Bildung des rotverschobenen Zustandes. Darüber hinaus zeigt das erste Spektrum (Q1) der in einer globalen Datenanalyse erhaltenen *Species-associated difference spectra* (SADS) Charakteristika eines Tryptophan-Radikals zwischen 510 - 580 nm (Fudim *et al.*, 2015). Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Q50A-W91A-Doppelmutante angefertigt und das Protein exprimiert. Die Messungen und Analysen wurden von Dr. Mathes durchgeführt. Die Ergebnisse der *Target* Analyse sind in Abb. III-18 gezeigt.

III. Ergebnisse

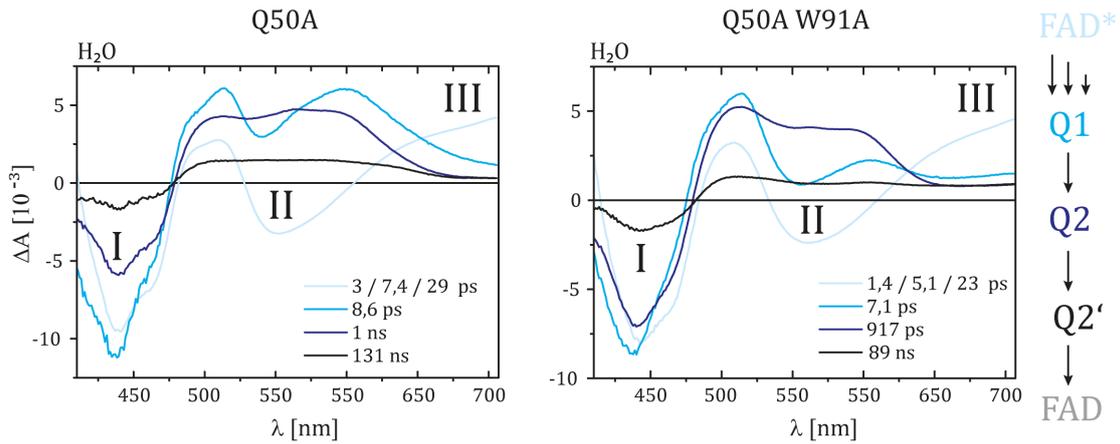


Abb. III-18 – Evolution der fs-Absorptionsspektren von PixD-Q50A und -Q50A W91A

Ergebnisse der parallelen Datenanalyse für die Femtosekunden-UV/vis-Absorptionsmessungen von PixD-Q50A und -Q50A-W91A in H₂O und D₂O mit Glutaran unter Annahme einer sequenziellen Evolution mit vier Komponenten (Dr. Mathes). Das erste SADS entspricht dem angeregten Flavin FAD* mit den Charakteristika von I = Ground state bleach (GSB), II = Stimulated Emission (SE) und III = Excited state absorption (ESA). Die Spektren wurden nach Anregung mit 400 nm, mit einer Auflösung von 12 μ s aufgenommen. In Klammern sind die Lebenszeiten der Spezies in D₂O angegeben.

Die ersten drei SADS beider Mutanten ähnelten der spektralen Evolution des Wildtyps (Gauden *et al.*, 2006). Das angeregte Flavin (FAD*) zeigte in beiden Mutanten die Komponenten der Grundzustandsbleichung (GSB, I) zwischen 425 - 475 nm, um 550 nm stimulierte Emission (SE, II) sowie die Absorption der angeregten Form über 600 nm (Gauden *et al.*, 2006) (Abb. III-18). Es zerfällt aufgrund der Inhomogenität des Grundzustandes multiexponentiell mit Lebenszeiten von 3/7,4/29 ps für Q50A und 1,4/5,1/23 ps in der Q50A-W91A-Mutante. Auffällig war hierbei, dass der Zerfall des angeregten Zustandes in der Doppelmutante geringfügig beschleunigt wurde und die Erholung der GSB erst parallel mit dem Zerfall des Neutralradikals (Q2) auftrat (Fudim *et al.*, 2015) (Abb. III-18). Im PixD-WT nimmt die GSB dagegen zeitgleich mit Formierung des Flavin-Semichinons um etwa 50 % ab, was auf die Rekombination der Flavin-Tyrosin-Radikale zurückgeführt wird (Gauden *et al.*, 2006; Bonetti *et al.*, 2009; Mathes *et al.*, 2012). Das Absorptionsspektrum Q1 wird von Gauden *et al.*, 2006 im Vergleich zu früheren Studien einem anionischen Semichinon-Radikal in einer charge transfer (CT) Interaktion zugeordnet, welches die breite Amplitude zwischen etwa 550 und 700 nm erzeugt. Die Signalintensität in diesem Bereich war in der Doppelmutante geringer, was durch einen verminderten CT-Charakter oder das Fehlen eines Tryptophan-Radikals verursacht werden könnte (Fudim *et al.*, 2015). Die Spektren Q2 zeigten in D₂O einen kinetischen Isotopeneffekt mit verlängerter Lebensdauer und neben der GSB (I) eine breite Absorption zwischen 480 - 650 nm mit schwach ausgeprägten Maxima bei etwa 510, 560 und 600 nm (Abb. III-18). In dieser Region absorbiert das neutrale Semichinon, dessen Lebensdauer mit etwa einer Nanosekunde auch in der Q50A-W91A-Variante stark erhöht ist. Anders als beim WT, wurde für die Beschreibung der Daten eine zusätzliche Komponente Q2' eingesetzt. Sie ist sowohl in der Einzel- als auch in der Doppelmutante von Absorptionen geprägt die eine Beteiligung von solvatisierten Elektronen oder Flavin Triplet Spezies andeuten (Fudim *et al.*, 2015).

Anschließend fallen beide Mutanten in den Grundzustand zurück, wohingegen im WT die rotverschobene Spezies mit einem charakteristischen Maximum bei etwa 483 nm folgt (Gauden *et al.*, 2006).

Das putative Auftreten eines FAD[•]/W91[•]-Radikalpaares wurde von Thomas Berthold, Dr. Erik Schleicher und Prof. Dr. Stefan Weber in transienten Elektronen-Spin-Resonanz-Experimenten (ESR) an den Mutanten näher untersucht. Sie fanden in beiden Spektren punktsymmetrische Signale, die jedoch unterschiedliche Breiten, Extrema und Lebenszeiten aufweisen und daher wahrscheinlich nicht vom gleichen Radikalpaar verursacht werden (Fudim *et al.*, 2015). Eine genauere Analyse erlaubte das Signal-Hintergrund-Verhältnis der Spektren nicht. Allerdings entsprach die Signalbreite in der Q50A-Mutante der des Wildtyps (Weber *et al.*, 2011), was auf einen vergleichbaren Abstand der Radikalpartner in beiden Proteinen, und somit auf ein FAD[•]/Y8[•]-Radikalpaar, schließen lassen könnte.

III.3.2 Putative Protonenleitung über H72

Histidine übernehmen durch den neutralen pK_s 6,04 der Seitenkette eine Vielzahl von Funktionen. Hierbei können sie unter anderem in katalytischen Triaden als Protonenakzeptor Nukleophile vorbereiten (Bachovchin & Roberts, 1978) oder in Protonen-Shuttles Wasserstoff über weite Strecken transportieren (Fisher *et al.*, 2005). Da in der BLUF-Photoaktivierung ein Protonentransfer zur Bildung des FADH[•]-Radikalintermediates stattfindet, kann für das einzige konservierte Histidin 72 eine essenzielle Rolle angenommen werden, die über bloße Koordination des Chromophors hinausgeht. Mutationen dieser Position resultieren jedoch in nicht-funktionalem Apoprotein (Dr. Mathes, persönliche Mitteilung) und lassen keine Untersuchung ihrer Aufgabe mit klassischen Ansätzen zu. Ob H72 in ein Protonen-Netzwerk zu Y8 eingebunden ist, wurde daher mit einer Reste-spezifischen Markierung für Histidine in PixD adressiert. Findet eine Protonenleitung entlang dieses Restes statt, müssten Wasserstoffbrückenbindungen an der Seitenkette aufgehoben werden und zu starken Veränderungen der Imidazolschwingungen führen. Ein analoges Isotopenmuster wurde in der *Paracoccus denitrificans* Cytochrom C Oxidase erfolgreich angewandt, um Histidinschwingungen zu identifizieren (Rich & Iwaki, 2007).

Im Vergleich der LmD-Differenzspektren von unmarkiertem und global-Histidin-markiertem Wildtyp waren jedoch keine signifikanten Verschiebungen erkennbar (Abb. III-19). Form und Intensität der Banden wichen nur geringfügig voneinander ab, wobei kleine Unterschiede in den markierten Regionen I und II auftraten. Bei näherer Betrachtung erschien die Amid I Bande (+)1630 cm⁻¹ weniger breit und zeigte eine Schulter mit sehr geringer Amplitude bei 1615 cm⁻¹ (Abb. III-19.I a). Im Bereich der Amid II waren dagegen vor allem Unterschiede in den Intensitäten der Absorptionsbanden zu beobachten. So war die des Signals bei 1531 cm⁻¹ leicht erhöht (b), während die Intensität des folgenden Dunkelzustandssignals verringert war (Abb. III-19.I). Zusätzlich zeigte das Differenzspektrum der Histidinmarkierung bei 1506 cm⁻¹ eine ausgeprägte Schulter (c).

III. Ergebnisse

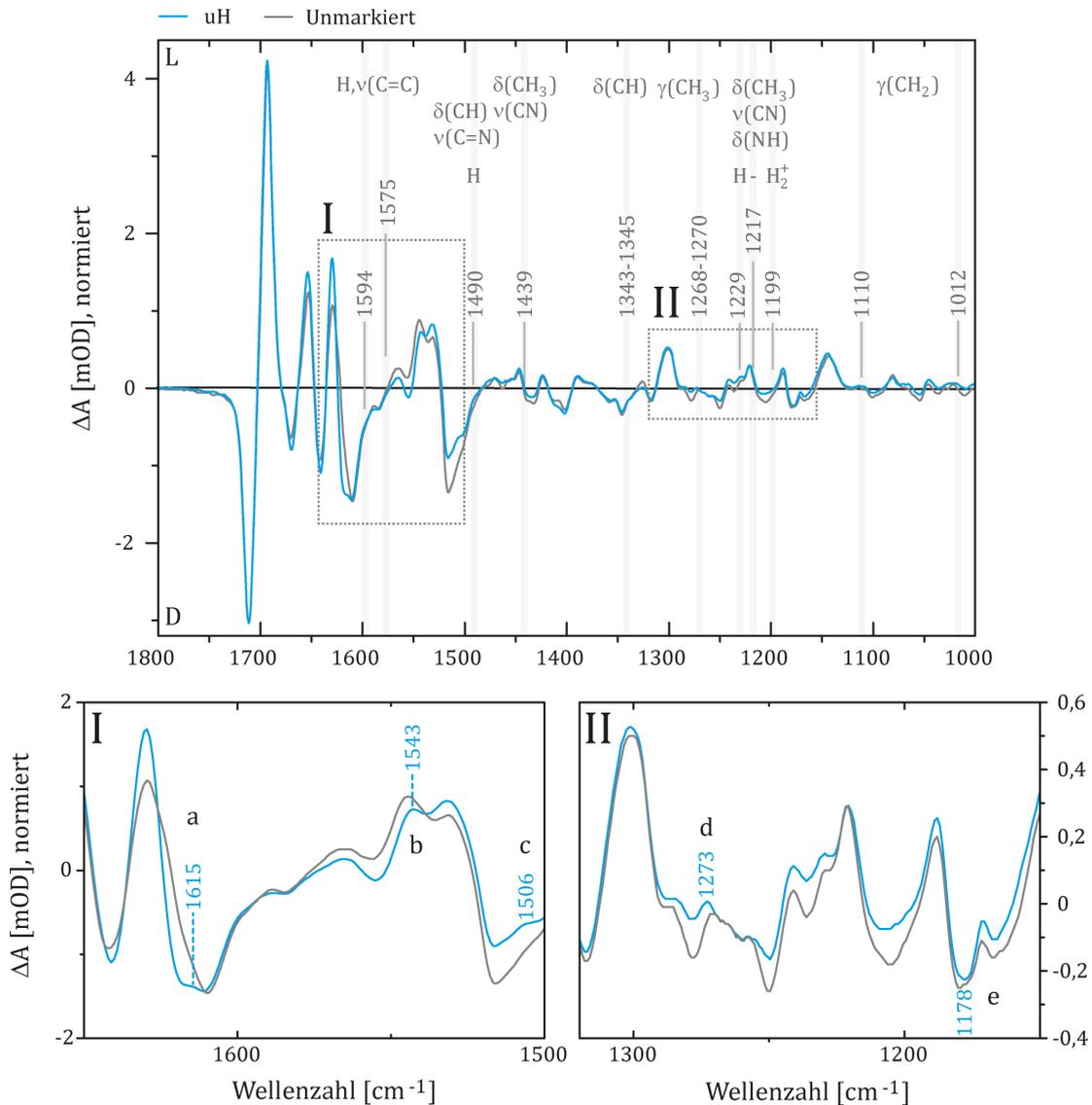


Abb. III-19 – Uniforme Markierung der Histidine in PixD

Ein Vergleich der LMD-Differenzspektren von unmarkiertem PixD (grau) mit einer Probe mit $^{13}\text{C}_6\text{-}^{15}\text{N}_3$ -Histidinen („uH“, blau), nach Normierung auf (-1712 cm^{-1}) des unmarkierten Proteins. Grau unterlegt sind bekannte Schwingungsfrequenzen von L-Histidin und Imidazol (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002). Es wurden nur wenige Verschiebungen induziert, die in I und II vergrößert dargestellt sind. Während das Signal bei 1543 cm^{-1} vorrangig einer Flavinschwingung zugeordnet wird, sind keine Signale von Histidin oder Imidazolderivaten in den betroffenen Bereichen zu erwarten. Stattdessen würden hier hauptsächlich Signaturen von Tyrosin-, aber auch Asparagin-, Glutamin- oder Tryptophan-Seitenketten auftreten (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002). Die Umgebung von H72, H73 und H64 bleibt damit in Dunkel- und Lichtzustand von PixD unverändert.

Im niederfrequenten Bereich (II) existierten ebenfalls nur geringe Abweichungen vom Wildtyp-Spektrum (Abb. III-19). Hier zeigte das positive Signal bei 1271 cm^{-1} eine leichte Verschiebung (d) zu höheren Wellenzahlen und die Dunkelzustandsschwingung bei 1180 cm^{-1} erschien in der markierten Probe verbreitert, mit einem um 2 cm^{-1} verschobenen Minimum. In diesem Zusammenhang verschwand eine sehr kleine Schulter bei 1178 cm^{-1} (Abb. III-19 e). Da unter den unmarkierten Spektren Intensitätsvariationen der Banden bei 1545 und 1531 cm^{-1} vorkamen (Anhang Abb. V-13), wurde diese Abweichung bei der Auswertung vernachlässigt. Ähnliche Fluktuationen zeigte die Intensität des Signals bei 1516 cm^{-1} .

Ausgehend von den Infrarotabsorptionen von Histidin und seinen Modellmolekülen (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002) können auch die Schultern bei 1616 und 1506 cm^{-1} keinen Histidinschwingungen zugeordnet werden. Diese Veränderungen waren mit einer Verschiebung von maximal 2 cm^{-1} gering und deuteten zudem in einigen Fällen eine Erhöhung der Schwingungsfrequenz anstatt der zu erwartenden Verringerung an.

Zusammenfassend wies die globale Markierung aller Histidine in PixD keine signifikanten Veränderungen des LmD-Differenzspektrums auf. Weiterführende Untersuchungen sollten daher zeitaufgelöste Messungen nutzen. Neben dem strikt konservierten Rest besitzt PixD zwei weitere, lösungsmittlexponierte Histidine 64 und 73 (Abb. I-2). Zwar existieren für Umstrukturierungen oder katalytische Funktionen dieser Positionen keine Hinweise, insbesondere das dem H72 benachbarte Histidin könnte jedoch mit der spezifischen Zuordnung von Banden in transienten Spektren interferieren. Aus diesem Grund wurden für die Position 73 zwei Substitutionsvarianten erzeugt und die Auswirkungen auf die IR-Absorption des Proteins geprüft.

III.3.3 Rückkehr in den Dunkelzustand

Funktion des H73

Im Gegensatz zu H72 konnte H73 ohne Verlust der Chromophorbindung oder offensichtlicher Beeinflussung der Proteinintegrität durch Alanin oder Serin ersetzt werden, da es nicht Teil der Chromophorbindetasche ist (Yuan *et al.*, 2006). Ein Vergleich der FT-IR LmD-Differenzspektren der erzeugten Mutanten (H73A, H73S) mit dem des Wildtyps (Abb. III-20) bewies, dass die Diversität der Eigenschaften dieses Restes in den verschiedenen BLUF-Proteinen (Abb. I-2) die niedrige Relevanz für seine Funktionalität widerspiegelt. Beide Differenzspektren stimmten mit dem von PixD überein. Der einzige signifikante Unterschied war das Auftreten einer Schulter in der Amid I Region bei (+)1624 (Abb. III-20). Durch sie erschien die Schwingungssignatur bei (+)1631 cm^{-1} als Doppelbande (a). Weitere Unterschiede manifestierten sich nur in geringen Intensitätsdifferenzen, welche jedoch vernachlässigbar waren und weder den Verlust noch die Verschiebung von Absorptionsbanden anzeigen. Differenzspektren des unmarkierten Wildtyps deuteten vielmehr an, dass es sich um eine präparationsbedingte Variation unter den Isolaten handelte.

In Abb. III-20 wurden zusätzlich bekannte Absorptionsbereiche von Schwingungsformen des Histidins bzw. Imidazolrings eingefügt. Sollte die H73-Seitenkette Wasserstoffbrückenbindungen mit der Umgebung ausbilden, wären in den markierten Regionen deutliche Unterschiede zum Wildtyp zu erwarten. Die Übereinstimmungen mit dem WT-Differenzspektrum implizieren dagegen eine ausschließliche Bedeutung der Hauptkette dieser Position am Beginn des β 4-Stranges und stehen im Einklang mit der Lösungsmittlexposition des H73 in der Röntgenkristallstruktur von PixD (Yuan *et al.*, 2006; PDB Einträge 2HFN, 2HFO).

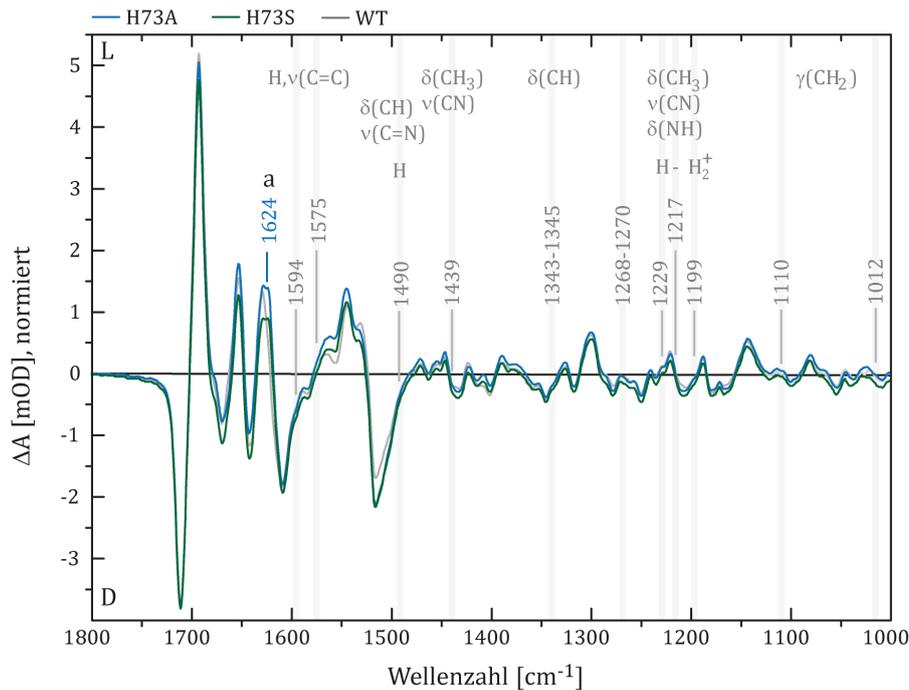


Abb. III-20 – H73-Substitutionen in PixD

Die eingeführten Mutationen erzeugten keine signifikanten Veränderungen des Spektrums, die mit bekannten Histidinschwingungen (grau; Barth, 2000) korrelieren. Position 73 erfüllt daher keine strukturelle Funktion und die Varianten können für weitere Isotopenmarkierungen genutzt werden. Die Spektren wurden auf die Dunkelzustandsschwingung der H73A Variante bei 1712 cm^{-1} normiert.

Einfluss von H73 auf die Dunkelrelaxation von PixD

Neben der Infrarotabsorbanz, wurden die Mutanten auch bezüglich ihrer Absorptionseigenschaften im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums getestet. Aufgrund der distalen Lokalisation des H73 ist ein Einfluss auf die Absorptionseigenschaften des Holo-proteins in dunkel- und lichtadaptiertem Zustand unwahrscheinlich. Auch die FT-IR Differenzspektren lieferten keine Hinweise dafür (Abb. III-20). Entsprechend waren die Absorptionsmaxima des Dunkelzustandes nicht verändert (Abb. III-21). Obwohl die Differenzspektren beider H73-Mutanten keine Bedeutung dieser Position für den Photozyklus vermuten ließen, zeigten die Rückkehrkinetiken dieser Proteinvarianten einen gegenüber dem WT verlangsamten, monoexponentiellen Zerfall des Signalzustandes mit τ_{H73A} 30 s und τ_{H73S} 32 s. Dagegen war für die Beschreibung des Kurvenverlaufs des Wildtyps eine biexponentielle Funktion mit zwei sehr unterschiedlichen Zeitkonstanten von 11 und 29 s nötig (Abb. III-21). Diese Eigenschaft wird dem heterogenen Grundzustand der BLUF-Domänen zugeschrieben (Gauden *et al.*, 2006; Zirak *et al.*, 2006; Mathes, 2008), wobei das Gleichgewicht durch die eingeführten Mutationen zu Gunsten der langsameren Komponente verschoben erscheint. Da die FT-IR Spektren keine globalen oder Histidin-assoziierten, lokalen strukturellen Änderungen in den Mutanten andeuteten, könnten diese Einflüsse auf Protonenübertragungen entlang der Seitenketten von H73 zu H72 zurückzuführen sein. Zum Test dieser Hypothese wurde die Rückkehrkinetik der Histidin-Mutanten in Anwesenheit unterschiedlicher Imidazol-konzentrationen verglichen (Abb. III-22.B, D, E - F).

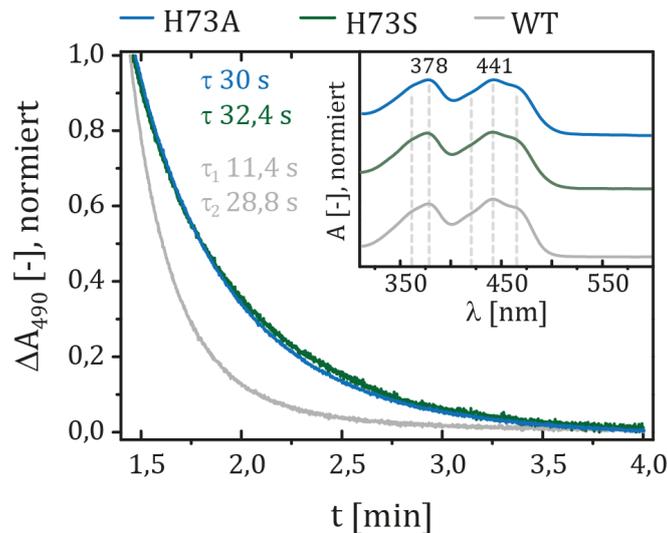


Abb. III-21 – UV/vis-spektroskopische Untersuchungen der H73A und H73S-Mutanten im Vergleich zum WT
 Das Inset zeigt einen Ausschnitt der Dunkelzustandsabsorptionen der Proteine. Sowohl das S₁- als auch das S₂-Absorptionsmaximum blieben von den Substitutionen des H73 unbeeinflusst. Allerdings wurde eine Verlangsamung des Lichtzustandzerfalls festgestellt, der für die H73-Mutanten mit einem monoexponentiellen Fit beschrieben werden kann. Zur Darstellung des Kurvenverlaufs des deutlich schneller relaxierenden Wildtyps waren hingegen zwei Zeitkonstanten nötig.

Einfluss von Imidazol auf die Dunkelrelaxation von PixD

Imidazol sollte als Säure-Base-Katalysator die durch die H73-Substitution entstandene Lücke überbrücken und den WT-Phänotyp wiederherstellen. Für den WT des BLUF-Proteins AppA und verschiedener LOV-Domänen ist bereits ein beschleunigender Effekt von Imidazol auf die Dunkelrelaxation bekannt (Laan *et al.*, 2006; El-Arab *et al.*, 2015). Dagegen wies der PixD-WT einen vergleichsweise schwachen Einfluss dieses Moleküls auf. Sein Lichtzustandszerfall nahm bei 500 mM nur um das etwa 1,3-fache zu (Abb. III-22.A). Entgegen der Erwartung wurde auch für beide Mutanten ein um maximal 1,6-fach beschleunigter Zerfall des Signalzustandes beobachtet, wobei der Prozess unter 100 mM Imidazol sogar unbeeinflusst blieb (Abb. III-22.B). Alexandre *et al.*, 2007 testeten Derivate dieses Moleküls an der LOV2-Domäne von Phototropin aus *Avena sativa*, um einen tieferen Einblick in den zu Grunde liegenden Mechanismus zu erhalten. Daran angelehnt wurde die Rückkehrkinetik der H73-Mutanten auch in Gegenwart von L-Histidin bei 22 °C gemessen. Aufgrund der schlechteren Wasserlöslichkeit wurden nur drei Konzentrationen bis maximal 180 mM verwendet. Abb. III-22.D zeigt die gemittelten Zeitkonstanten für zehn technische Wiederholungen an zwei biologischen Replikaten. Obwohl der pK_s-Wert beider Moleküle ähnlich ist, wurde der Zerfall des Lichtzustandes nicht von L-Histidin beeinflusst. Dies lässt vermuten, dass Imidazol nicht an der Proteinoberfläche wirkt, sondern an einer dem sterisch größeren Histidin unzugänglichen Position innerhalb der Kerndomäne.

III. Ergebnisse

Eine nähere Betrachtung des Imidazol-Effektes gelang in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Andreas Möglich, Dr. Florian Richter, Ulrike Scheib und Jonas Wietek (Richter *et al.*, 2015). Sie ermöglichten die parallele Messung der Rückkehrkinetik bei verschiedenen Imidazolkonzentrationen unter steigender Temperatur. Die mit diesen Ergebnissen berechneten Aktivierungsenergien sind in Abb. III-22.E aufgetragen. Sie waren für beide Mutanten ähnlich dem WT und stiegen mit zunehmender Imidazolkonzentration an.

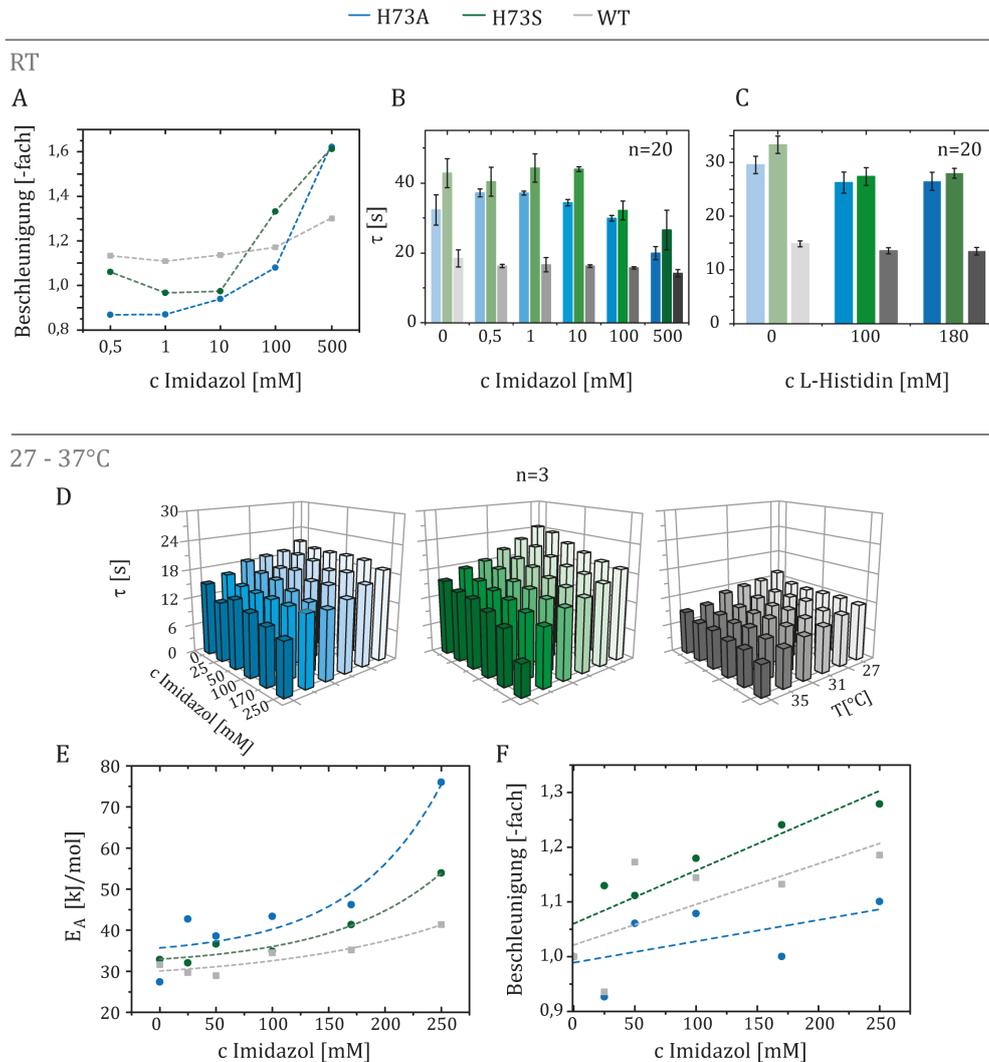


Abb. III-22 – Imidazolabhängigkeit der H73A und H73S-Mutanten im Vergleich zum WT

A und B) In Gegenwart von Imidazol wird nur eine geringfügige Beschleunigung der Dunkelrelaxation erreicht, während der WT, anders als AppA, nahezu unbeeinflusst blieb. C) Das größere L-Histidin hatte trotz vergleichbarer Eigenschaften keinen Effekt bis 180 mM. D) Messungen der Rückkehrkinetik unter Variation von Imidazolkonzentration und Temperatur. Gezeigt sind die Mittelwerte für zwei technische und ein biologisches Replikate (H73S, WT). Die Werte der H73A-Mutante wiesen jedoch, wahrscheinlich aufgrund von Temperatursensitivität, eine große Streuung auf. Daher ist nur eine Messung aufgetragen. E) Die Berechnung der Aktivierungsenergie E_A anhand der in E ermittelten Daten ergab einen polynomischen Anstieg über 170 mM Imidazol. F) Auftragung der Beschleunigung durch Imidazol bei 27 °C. Anders als im WT und in PixD-H73S war der lineare Anstieg für die H73A-Variante deutlich geringer.

Im Gegensatz zu WT und H73S ist für die H73A-Mutante nur ein Datensatz, mit der stabilsten Entwicklung, gezeigt. Die übrigen Replikate wiesen dagegen eine große Streuung auf, die möglicherweise auf eine erhöhte Temperaturinstabilität dieser Variante zurückzuführen ist.

Die imidazolinduzierte Beschleunigung dieser Mutante war bei 27 °C geringer als in der analogen H73S Mutation (Abb. III-22.G). Außerdem zerfiel die Lichtkonformation der Serin-Variante bei 37 °C und 250 mM Imidazol mit einer Zerfallskonstante $\tau \sim 6,4$ s ähnlich schnell wie der WT unter diesen Reaktionsbedingungen (Abb. III-22.E). Bei dieser Temperatur könnte partielle Entfaltung Einfluss auf die Resultate nehmen. Die Berechnung der Aktivierungsenergien erfolgte anhand von Arrhenius-Plots, aus welchen anschließend die Berechnung von Aktivierungsenthalpie ΔH und -entropie ΔS nach Eyring möglich war. Sie weisen darauf hin, dass Imidazol möglicherweise die Dunkelrückkehr der H73-Mutanten durch eine Erhöhung der Aktivierungsentropie beschleunigt (Anhang Abb. V-15).

Auch wenn unter Einwirkung höherer Temperaturen ein stärkerer Imidazoleffekt für die H73-Mutanten beobachtet wurde, blieb dieser deutlich hinter den Auswirkungen auf AppA zurück. Dies wirft die Frage auf, ob PixD allgemein unempfindlich gegenüber Imidazol reagiert, oder strukturelle Bedingungen eine Sensitivität erzeugen können. Da Laan *et al.*, 2006 auch für die AppA-W104F Mutante eine hohe Imidazol-Abhängigkeit demonstrieren und die analoge Mutation einen sehr langsamen Photozyklus in PixD induziert, lag die Vermutung nahe dass diese Substitution eine deutlichere Reaktion gegenüber Imidazol zeigen würde. Tatsächlich konnte im Gegensatz zu den H73-Mutanten die Abklingzeit des Lichtzustandes für PixD-W91F durch Zugabe von Imidazol enorm beschleunigt werden. Der Effekt war bereits in geringen Konzentrationen messbar und stieg mit 10 mM abrupt an. In Gegenwart von 500 mM Imidazol erreichte PixD-W91F sogar eine schnellere Relaxation als der WT (Abb. III-23.A, D). Das deutete auf einen komplexen Wirkungsmechanismus hin, der keine einfache Rettung eines Funktionsverlustes darstellt. Nach Überlegungen von Laan *et al.*, 2006 könnte die neutrale Form der Seitenkette in eine Säure-Base-Katalyse involviert sein. Entsprechend wurde die Aktivierungsenergie der Rückkehrreaktion durch Imidazolzugabe verringert, erreichte aber bereits bei 25 mM die Sättigung (Abb. III-23.C). Darüber hinaus schien Imidazol keinen katalytischen Einfluss auszuüben, förderte aber weiterhin die Destabilisierung des Signalzustandes erheblich (Abb. III-23.A, D). Das spiegelte sich auch im Eyring-Plot der W91-Mutante wider, dessen Resultate auf eine katalytische Wirkung von Imidazol schließen lassen (Anhang Abb. V-15). Unter Anwendung der Hochdurchsatzmessmethodik wurde zusätzlich die beschleunigende Wirkung der Temperatur auf PixD-W91F deutlich (Abb. III-23.A). Weder der Wildtyp noch die H73-Mutanten wiesen ein vergleichbares Verhalten auf.

Im Gegensatz zu AppA wurde für den PixD-Wildtyp keine Imidazolsensitivität festgestellt. Mutationen im β -Faltblatt änderten aber die Zugänglichkeit des Proteinkerns. Dort wirkte das Molekül entweder als Katalysator beschleunigend auf die Dunkelrelaxation, oder hob die Aktivierungsentropie an.

III. Ergebnisse

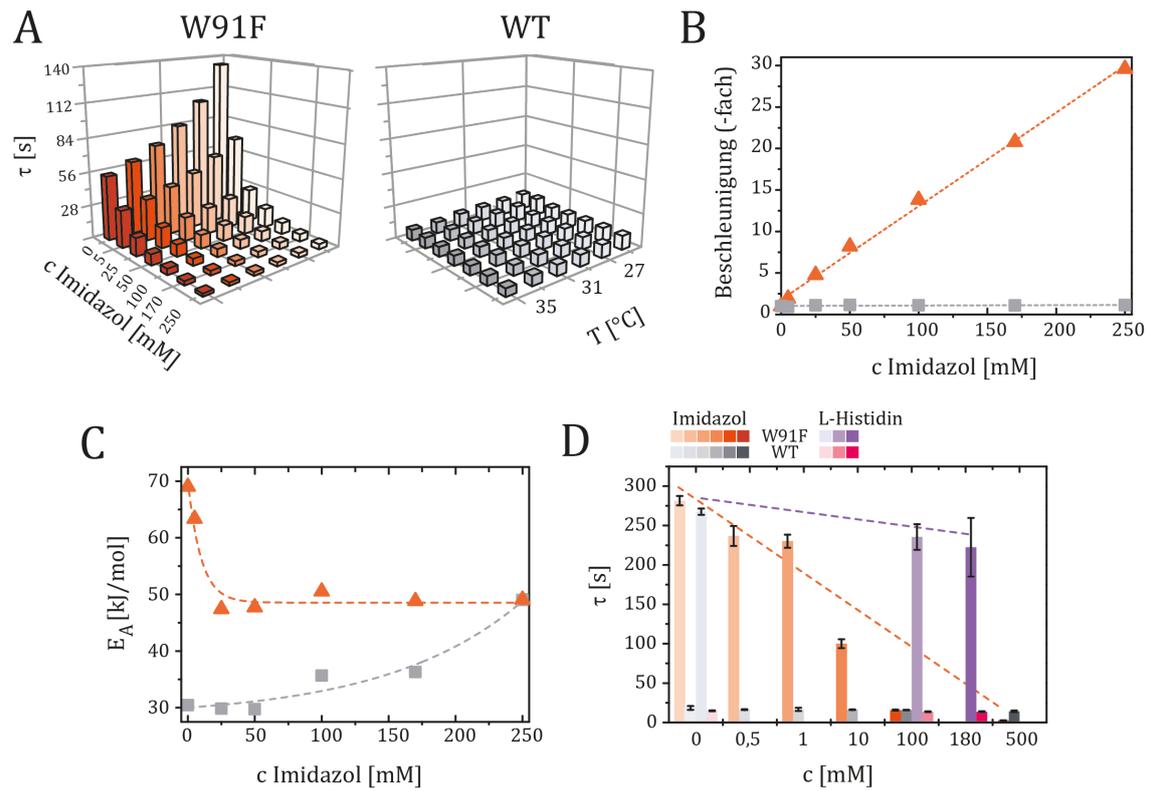


Abb. III-23 – Imidazolabhängigkeit der Dunkelrelaxation von *PixD-W91F*

(A, B) Im Gegensatz zum WT und den Mutanten H73A/S zeigte diese Variante eine lineare Abhängigkeit von der Konzentration des Base-Katalysators, wobei der Lichtzustand bei 22 °C und 100 mM Imidazol schneller zerfiel, als der des Wildtyps. C) Die Aktivierungsenergie näherte sich ab etwa 25 mM asymptotisch 49 kJ/mol an, L-Histidin zeigte dagegen keinen Effekt (D).

IV. Diskussion

IV.1 Eine Plattform zur Isotopenmarkierung von (Flavo-)Proteinen

Die Anwendungsmöglichkeiten der CmpX13-Stämme

Mit der in dieser Arbeit angelegten Erweiterung deckt die CmpX13-Sammlung Auxotrophe für neun proteinogene Aminosäuren in *E. coli* ab. Unter ihnen sind die Aromaten (H, F, W, Y), beide schwefelhaltigen Vertreter (C, M) und zwei zentrale Metaboliten (N, Q). Davon wurden der Glutamator, CpXFΔNv2 sowie die Phenylalanin- und Methionin-auxotrophen CmpX13-Derivate hier erstmalig vorgestellt. Alle Stämme weisen stabile, definierte genomische Modifikationen auf und wurden für den sparsamen Einsatz von isotopenmarkiertem Substrat auf ihren Aminosäurebedarf charakterisiert (Tab. III-A). Bis auf wenige Ausnahmen besitzen sie keine Antibiotikaresistenzen und zeigen eine mit CmpX13 vergleichbare Proteinexpression. Auch eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit, wie sie für nicht näher beschriebene Aminosäure-auxotrophe Mutanten kritisiert wird (Tong *et al.*, 2008), wurde bei den CmpX13-Derivaten nicht beobachtet (Tab. III-A).

Eine Gegenüberstellung mit anderen Sammlungen auxotropher *E. coli* Stämme sowie dem zellfreien System (Waugh, 1996; Baba *et al.*, 2006) fasst einige herausragende Eigenschaften der CmpX13-Varianten für die heterologe Proteinexpression zur Isotopenmarkierung zusammen (Tab. IV-A). Sie machen die Stämme einem breiten Anwendungsbereich zugänglich.

Tab. IV-A – Vorteile der CmpX13-Sammlung

Ein Vergleich einiger, für die Proteinexpression relevanter, Eigenschaften der CmpX13-Derivate mit weiteren *E. coli* Stammsammlungen und dem zellfreien Expressionssystem. Unter den aufgeführten Sammlungen ist die von Warscheid *et al.*, 2008 keine eigene Kollektion, sondern stellt die Isotopenstreuung aus den Aminosäuren R, N, D, Q, G, L, P, T, Y in dem Plasmid-tragenden *E. coli*-K12-WT, BL21(DE3) (John *et al.*, 1989) und wenigen Auxotrophen des *Genetic Stock Centers* der Yale Universität sowie des *National Institute of Genetics* in Japan gegenüber.

Eigenschaft	CmpX13	Keio ¹	„Warscheid“ ²	Waugh ³	Zellfrei ⁴
Mutation(en)	Einzel/Multipel, definiert	Einzel, definiert	Einzel/Vielfach		Abhängig vom Ursprungsorganismus
Isotopenmuster	Reste-spezifisch, invers, global		Reste-spezifisch, global		Reste-spezifisch, selektiv, invers, global
Reaktive Muster	Flavin, Aminosäuren		Aminosäuren		Kofaktoren, Aminosäuren
T7-RNA-Polymerase	genomisch, induzierbar	-	Teilweise	-	-
Antibiotika-Resistenzen	ab Δ5, genomisch	-	Teilweise	+	-
Konjugation	-	-	-	Teilweise	-
Kostenfaktor	Gering - Mittel	Mittel	Mittel	Mittel	Hoch

¹ Baba *et al.*, 2006 (Keio Collection), ² Warscheid *et al.*, 2008, ³ Waugh, 1996, ⁴ Katzen *et al.*, 2005

IV. Diskussion

Hervorzuheben ist vor allem, dass in Kombination mit Aminosäure-Auxotrophien sich ergänzende Muster aus inversen, Reste-spezifischen, globalen und Doppelmarkierungen erzeugt werden können, ohne dass eine Rückfaltung oder nachträgliche Rekonstitution des Proteins nötig ist. Wie Mathes *et al.*, 2012 zeigen ist der globale Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren möglich, sofern diese von den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen erkannt werden. Außerdem wären Zelllysate der entwickelten Auxotrophen für *in vitro* Isotopenmarkierungen nutzbar.

Aufgrund ihrer genomischen Besonderheiten sind die CmpX13-Derivate jedoch auch für einige Anwendungen ungeeignet. Eine Ursache dafür ist die *ΔribM::manX* Substitution. Die Permease-Untereinheiten ManX und ManY werden für die Penetration der DNA des Bakteriophagen λ benötigt (Erni *et al.*, 1987). Infolgedessen können von dem Phagen abgeleitete Expressionsvektorsysteme auf die CmpX13-Sammlung nicht angewendet werden. Sie ermöglichen unter anderem die Erstellung stabiler Expressionslinien und eine effiziente Proteinexpression (Padukone *et al.*, 1992). Daneben werden isotopenangereicherte *E. coli* Zellen als Vektoren zur Fütterung von *Caenorhabditis elegans* im *stable isotope labeling with amino acids in cell culture* (SILAC) eingesetzt. Diese Methode wurde erfolgreich angewandt, um Isotopenmarkierungen von bovinem Rhodopsin für NMR-Studien anzufertigen (Salom *et al.*, 2015). CmpX13-Derivate sind jedoch wegen ihrer Abstammung möglicherweise nicht dafür nutzbar, da ein verringertes Überleben der Nematoden auf Aminosäure-auxotrophen BL21(DE3) Zellen beobachtet wird (Larance *et al.*, 2011). Für andere Ergänzungen, wie z.B. im Fokus der Entwicklung stehende Glykosylierungs- (Wacker *et al.*, 2002) und Acetylierungssysteme (Chen, 2012), sekretorische Expression (Choi & Lee, 2004), oder die (*condensed*) *single protein production* (Suzuki *et al.*, 2005) existieren dagegen keine bekannten Einschränkungen.

Verbesserung der in vivo Markierungseffizienz für Aminosäuren durch genomische Modifikation

Das größte Problem für die Isotopenmarkierung von Aminosäuren ist die unkontrollierte Streuung durch katabolische Prozesse (Anhang Abb. V-1), die bisher in keinem Expressionssystem zufriedenstellend gelöst werden konnte. Ihre Unterbrechung mittels genomischer Manipulation des Wirtes erbringt den Vorteil einer verbesserten Reproduzierbarkeit von Isotopenmarkierungen. Im Idealfall wäre auch ein Verzicht auf die kostensteigernde Fütterung weiterer Aminosäuren sowie den Einsatz umwelt- und gesundheitsschädlicher Inhibitoren möglich. Unter den getesteten Auxotrophen erreichen die Stämme Glutamator, CpXF Δ Nv2 und CpXF Δ Wv2 dieses Ziel nicht vollständig. Sie bilden aber eine hervorragende Grundlage für zukünftige Projekte. Beispielsweise wird Glutamin als universaler Stickstoffdonor (Shapiro & Stadtman, 1970) in entsprechend hohen Konzentrationen von den auxotrophen *E. coli* Stämmen konsumiert. Der Bedarf des Glutamator ist, im Vergleich zu seinen Vorgängerstämmen, um 50 % (Tab. III-A) reduziert und wird von einer Verringerung der Isotopenstreuung begleitet (Anhang Abb. V-6.A - C). Letztere kann vermutlich mit dem von Tong *et al.*, 2008 angewandten Glutaminase-Inhibitor 6-Diazo-5-oxo-Norleucin, oder durch Fütterung von Aminosäuren sowie Purin- und Pyrimidinbasen reduziert werden.

Eine weitere genomische Modifizierung des Glutamators ist nur schwer realisierbar, da sie mit einer Vielzahl zu beachtender Nebeneffekte verknüpft wäre (Abschnitt III.1). In den bekannten Stoffwechselwegen nutzen mindestens elf weitere Enzyme Glutamin als Substrat (Anhang Abb. V-1) (Keseler *et al.*, 2013). Deletionen der codierenden Gene würden Defizienzen für L-Histidin ($\Delta hisH$), Guanosin-Monophosphat ($\Delta guaA$) oder Tetrahydrofolat ($\Delta pabAB$) (Abb. V-1) erzeugen (Tiedeman *et al.*, 1985; Klem & Davisson, 1993). Außerdem verhindern etwa $\Delta guaA$, $\Delta purF$, $\Delta carA$ und $\Delta pabA$ Wachstum in M9-Medium (Joyce *et al.*, 2006; Patrick *et al.*, 2007).

Eine andere Problematik, die nicht genetisch gelöst werden kann, betrifft die Stabilität der zentralen Metaboliten Asparagin und Glutamin. Asparagin wird in Peptiden, abhängig von Zeit, Temperatur, pH-Wert und Resten der Umgebung, autokatalytisch zu Aspartat umgesetzt (Stephenson & Clarke, 1989; Rivers *et al.* 2008). Neben einer Aktivität der Asparaginase I, könnte das Isotopenstreuung in CpXF Δ Nv2 verursachen (Anhang, Abb. V-12). Spontane Desamidierung wird ebenso für L-Glutamin beobachtet, und ist zusätzlich durch den verwendeten Puffer beeinflusst (Khan & Elia, 1991). Ob dieser Prozess an der hier festgestellten Isotopenstreuung beteiligt ist, müssen Tests zur Stabilität von L-Asparagin und L-Glutamin unter den genutzten Expressionsbedingungen zeigen.

Anders als der Glutamator können einige Auxotrophe mit Hilfe weiterer Gendeletionen optimiert werden. Beispielsweise ist die Entfernung von *tyrB* in *E. coli* CpXF Δ Wv2 aussichtsvoll, um eine Abspaltung des α -Amids durch die codierte Desaminase zu verhindern. Auch die Markierungseffizienz des Stammes CpXF Δ Nv2 kann durch eine weitere Deletion (*asnA*) verbessert werden (Anhang Abb. V-1). Mit der hier genutzten *Knock-out* Methode ist jedoch nur eine bestimmte Zahl an Gendeletionen möglich (S. 44). Müssen mehr Loci entfernt werden, sollte daher ein λ -Rekombinationssystem ohne die Einführung der Erkennungssequenzen für die Flp Rekombinase verwendet werden. Alternativ sind andere Techniken einsetzbar, wie etwa das CRISPR-Cas-System (Jiang *et al.*, 2013).

Neue Ziele für Isotopenmarkierungen mit der CmpX13-Sammlung

Die erstmalige Expression der Photorezeptoren bPAC und AtUVR8 in *E. coli* CmpX13 unter Minimalmedium-Bedingungen (Abb. III-1) bildet eine Grundlage für umfassende Isotopenmarkierungen mit der neuen Stammsammlung. Hierdurch würden sich beispielsweise die Bandenzuordnungen zu Sekundärstrukturelementen in IR-Spektren experimentell bestätigen und Signale von Argininen eindeutig identifizieren lassen, die durch Ausbildung von Salzbrücken an der Dimerisierung von AtUVR8 beteiligt sind (Christie *et al.*, 2012). Eine erste Voraussetzung für dieses Experiment erfüllte die vorliegende Arbeit mit Herstellung und Charakterisierung des *E. coli* CpX Δ R. Zusätzlich können Schwingungssignaturen von Tryptophan und einer Vielzahl weiterer Aminosäuren Aufschluss über die intramolekulare Signaltransduktion des UV-Rezeptors und der BLUF-Domänen liefern. Gelingt die Entwicklung effizienter Fermentationsprotokolle, werden auch für diese Proteine systematische Isotopenmuster möglich, wie sie hier für PixD gezeigt wurden.

IV.2 Wasserstoffbrückenkonfiguration des Dunkel- und Signalzustandes von PixD

Aktualisierung der Protein/Flavin-Schwingungszuordnungen für PixD

Die hier gezeigten LmD-Differenzspektren können direkt mit PixD-Markierungsmustern der Arbeitsgruppe von Dr. Shinji Masuda verglichen werden (Abb. IV-1). Sie weisen nur geringe Unterschiede weniger Signale um ein bis drei Wellenzahlen sowie der Signalintensitäten unter 1500 cm^{-1} auf, die den verschiedenen Probenpräparationen zuzuschreiben sind. Anders als in dieser Arbeit, werden die Proteinlösungen von Masudas Gruppe mehrere Minuten lang getrocknet und anschließend über 3 h bei 15 °C mit einer definierten Wassermenge rehydriert (Masuda *et al.* 2004; Hasegawa *et al.* 2004, 2005; Masuda *et al.* 2008).

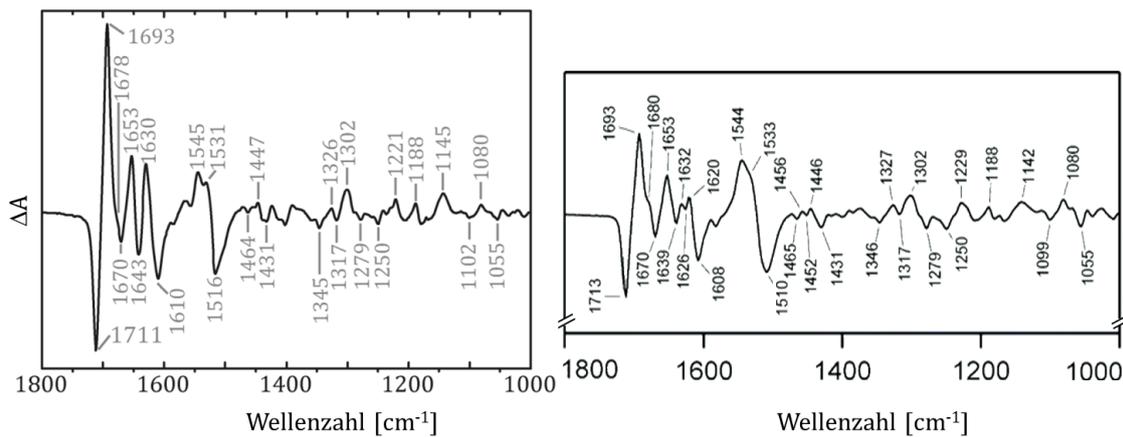


Abb. IV-1 – Vergleich des LmD-Spektrums mit den Messungen der Arbeitsgruppe von Dr. Shinji Masuda

Die unmarkierten Wildtyp-Differenzspektren zeigen präparationsbedingt geringe Abweichungen. Besonders auffällig ist die (+)1620 Schulter, die bei höherem Wassergehalt (links) von dem Lichtzustandssignal bei (+)1630 cm^{-1} verdeckt wird sowie die Feinstruktur der Amid II Region. Links = WT-Spektrum aus dieser Arbeit, Rechts = WT-Spektrum verändert aus Masuda *et al.*, 2004

Basierend auf den früheren Schwingungszuordnungen von Dr. Masudas Arbeitsgruppe wurde mit den hier vorgestellten Daten eine Aktualisierung der Schwingungszuordnungen von PixD vorgenommen. Sie ist in Tab. IV-B zusammengefasst und schließt auch die, durch Dr. Mathes zur Verfügung gestellten, Differenzspektren von ^{13}C -RF und ^{15}N -RF-Markierungen ein (Anhang Abb. V-10). Zur Veranschaulichung sind die zugeordneten Signale in Abb. IV-2 anhand der chemischen Struktur des Isoalloxazinringes dargestellt. Daraus geht hervor, dass vor allem Bindungen in Ring III und II von lichtinduzierten Frequenzänderungen betroffen sind. Unter ihnen erfahren Flavin N5-Bindungen hauptsächlich indirekt Schwingungsänderungen, wie die geringen Verschiebungen der Selektivmarkierung des Flavin-N5 vermuten lassen (Anhang Abb. V-10). Daraus und aus dem Spektrum der ^{15}N -Amid-Q-Probe, lässt sich eine Wasserstoffbrücke zwischen der Q50-Seitenkette und dem Flavin N5 sowohl im Dunkel- als auch im Lichtzustand ableiten (Abb. III-9, Anhang Tab. V-E). Das vermuten bereits Bonetti *et al.*, 2008 und es stünde zum Teil auch im Einklang mit Annahmen von Masuda *et al.*, 2004 in denen sie für die Bindungen C10aN10a, C4aC10a, N5C5a, C4aC4 und C4N3 geringe lichtinduzierte Schwingungsänderungen postulieren. Eine transiente Aufhebung der Wasserstoffbrücke zwischen Q50 und dem Flavin-N5 muss jedoch in zeitaufgelösten Messungen auf der Picosekundenzeitskala bestätigt werden.

Tab. IV-B – Zuordnung der Schwingungen im Lmd-Differenzspektrum von PixD

Gelistet sind die Schwingungsfrequenzen ausgeprägter Signale und ihre Zuordnung zu Bindungen des Chromophors und Apoproteins. Reine Flavin-Signale sind gelb unterlegt. Ein Vergleich mit der ^{15}N -Amid-Q-Markierung (Anhang Tab. V-C, Tab. V-E) zeigte Schwingungskopplungen mit dem Flavin auf.

Signal [cm^{-1}]		Vorherrschende Zuordnung	Referenzen
H_2O [D_2O]	^{15}N -Amid-Q		
(-)1711/(+)1693 [-8/-8]	0/-3	$\nu(\text{C4O4})$ gekoppelt an Protein-NH, überlagert Protein $\nu(\text{C=O})$	Masuda <i>et al.</i> , 2004; Hasegawa <i>et al.</i> , 2004; Hasegawa <i>et al.</i> , 2005; Mehlhorn <i>et al.</i> , 2013
(-)1670 [+5]	-5	Protein C=O Q50 $\nu(\text{C=O})$	Masuda <i>et al.</i> , 2004; Bonetti <i>et al.</i> , 2008; diese Arbeit
(+)1653 [+1]	-0	Amid I (α -Helix)	Masuda <i>et al.</i> , 2004; Steinocher, 2013; diese Arbeit
(-)1643 [+6]	-0	Amid I (α -Helix)	Masuda <i>et al.</i> , 2004; Hasegawa <i>et al.</i> , 2005; Steinocher, 2013; diese Arbeit
(+)1631 [+10]	-0	Amid I (β -Faltblatt, β 5-Strang)	Masuda <i>et al.</i> , 2004; Hasegawa <i>et al.</i> , 2005; Brust <i>et al.</i> , 2013; diese Arbeit
(+)1623 [-2]	-0	Amid I (β -Faltblatt)	Masuda <i>et al.</i> , 2004; Hasegawa <i>et al.</i> , 2005; Brust <i>et al.</i> , 2013; diese Arbeit
(-)1610 [-3]	-0	Amid I (β -Faltblatt)	Masuda <i>et al.</i> , 2004; Hasegawa <i>et al.</i> , 2005; diese Arbeit
(+)1545 [-1]	-7	$\nu(\text{C4aN5})/\nu(\text{C10aN1})$ Tyr $\nu(\text{CC})$, gekoppelt an $\nu(\text{CO})$, Amid II	Abe & Kyogoku, 1987; Masuda <i>et al.</i> , 2004; Hasegawa <i>et al.</i> , 2004; Hasegawa <i>et al.</i> , 2005; Takahashi <i>et al.</i> , 2007; Masuda <i>et al.</i> , 2008; Mehlhorn <i>et al.</i> , 2013; Steinocher, 2013
(+)1531 [0]	-0	Amid II	Masuda <i>et al.</i> , 2008; Steinocher, 2013; diese Arbeit
(-)1516 [+1]	-0	Amid II Tyr $\nu(\text{CC})$, gekoppelt an $\nu(\text{CO})$	Takahashi <i>et al.</i> , 2007; Masuda <i>et al.</i> , 2008; Mehlhorn <i>et al.</i> , 2013; Steinocher, 2013; diese Arbeit
(+)1424 [0]	-3	$\nu(\text{C10aN10})/\nu(\text{C10aN1})$ Protein $\nu(\text{CN})$	Abe & Kyogoku, 1987
(+)1409 [0]	-3	$\delta(\text{N3-H})$	diese Arbeit
(-)1402 [0]	-2	$\nu(\text{C4aC10a})/\nu(\text{C4N3})$	Diese Arbeit; Steinocher, 2013
(-)1345 [0]	0	$\nu(\text{C5aC6})/\rho(\text{CH3})$	Masuda <i>et al.</i> , 2004; Steinocher, 2013; diese Arbeit
(+)1302 [+18]	-5	$\nu(\text{C4N3})$	Masuda <i>et al.</i> , 2004; Hasegawa <i>et al.</i> , 2005; Steinocher, 2013
(-)1279 [+10]	0	$\nu(\text{C4aN5})$, Tyr $\nu(\text{CO})$, $\delta(\text{C-OH})$	Takahashi <i>et al.</i> , 2007; Mehlhorn <i>et al.</i> , 2013
(-)1250 [+12]	0	$\nu(\text{C2N3})$, überlagert mit Tyr $\nu(\text{CO})$, $\delta(\text{C-OH})$	Abe & Kyogoku, 1987; Mehlhorn <i>et al.</i> , 2013; Steinocher, 2013; diese Arbeit
(+)1241 [0]	0	$\nu(\text{C2N3})$	diese Arbeit
(+)1189/(-)1179 [+1]/[+2]	0	$\nu(\text{C4C4a})/\nu(\text{C4aC10a})$	Abe & Kyogoku, 1987; Masuda <i>et al.</i> , 2004; Mehlhorn <i>et al.</i> 2013
(-)1010 [+/-X]	-X	Flavin Ring III	diese Arbeit

IV. Diskussion

Für die stark an die $\nu(\text{C4O4})$ gekoppelten C4aN5- und C10aN1-Bindungen gingen aus den hier gezeigten Daten keine Bandenpaare hervor. Masuda *et al.*, 2004 schreiben ihnen allerdings größere Frequenzänderungen zu. In zukünftigen Experimenten wäre daher eine exaktere Zuordnung der C4aN5- und C10aN1-Schwingungen nötig, um lichtinduzierte Schwingungszunahmen zu evaluieren. Dafür können Markierungen mit $^{13}\text{C4a}$ - und $^{15}\text{N1}^{15}\text{N3}$ -Riboflavin erfolgen, deren Synthese kürzlich von Neti und Poulter, 2016 publiziert wurde. Mit ihrer Hilfe ließen sich die Zuordnungen der putativen C4a- und N1-Bindungen prüfen, die aufgrund des hier verwendeten, doppelmarkierten $^{13}\text{C4,10a}$ -Flavins nicht eindeutig waren. Während die vorliegende Arbeit für C4aN5 und C10aN1 keine wesentliche Schwingungsänderung durch Kopplung der Ring III Oszillationen andeutete, könnte sie auf eine putative Schwächung der C2N3-Bindung sowie eine Zunahme der C4aC10a-Frequenz um 10 cm^{-1} im Lichtzustand hinweisen (Tab. IV-B). Dabei bleiben Wasserstoffbrückeninteraktionen zwischen Asparaginen und dem Chromophor jedoch in Dunkel- und Lichtzustand gleich (Steinocher, 2013; Anhang Abb. V-11). Entsprechend ist die von Masuda *et al.*, 2004 postulierte Frequenzänderungen der $\nu(\text{C2O2})$ weitestgehend auszuschließen (Anhang Abb. V-10). Temperaturabhängigkeit (Hasegawa *et al.*, 2004), Deuterierungssensitivität (Abb. III-3.D) und starke isotoopeninduzierte Verschiebungen bei ^{13}C -Markierung des Apoproteins (Abb. III-3.A) mit schwacher Beteiligung von Stickstoff-Bindungen (Abb. III-3.D) grenzen die Herkunft der $(-)/1670/(+)/1653\text{ cm}^{-1}$ Signale auf Carbonylschwingungen des Apoproteins ein.

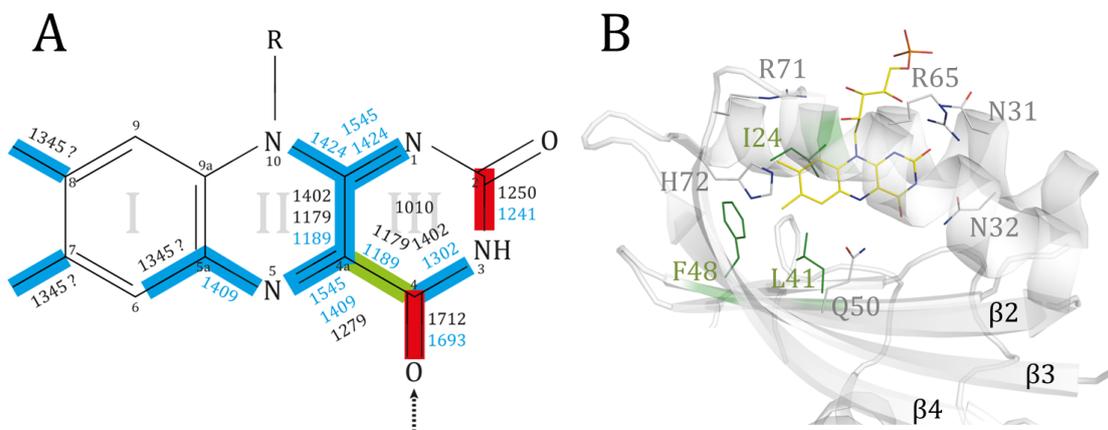


Abb. IV-2 – Schwingungsänderungen des Flavin-Chromophors in PixD

A) Die Bindungszuordnungen der Differenzsignale sind für den Lichtzustand (blau) und den Dunkelzustand (schwarz) eingetragen, wobei nicht für alle Bindungen eindeutige Zuordnungen vorliegen. Zusätzlich sind putative Bindungsstärkungen (grün) und Bindungsschwächungen (rot) markiert. B) Das Flavin wird von fünf Resten der Bindetasche koordiniert, während der hydrophobe Anteil von Ring I unter anderem in die Umgebung von L41, F48 oder I24 (grün) eingebettet ist. (PyMOL, PDB, Eintrag 2HFN, Yuan *et al.*, 2006)

Insgesamt ließen sich alle Flavinschwingungsänderungen auf die Ausbildung oder Stärkung einer Wasserstoffbrücke zum C4O4 zurückführen (Abb. IV-2). Dies stünde im Einklang mit der Theorie von Grinstead *et al.*, 2006a, welche als Ursache für N3H-Signalverschiebungen Änderungen der elektronischen Struktur des Flavins durch die Bildung der Wasserstoffbrücke zum Flavin-C4O4 vorschlagen.

Struktur und Wasserstoffbrücken des essentiellen Q50

Weiteren Einblick in die Wasserstoffbrückenkonfiguration der Chromophorbindetasche gewährten Reste-spezifische Isotopenmarkierungen. Dabei gaben die Glutamin-Muster keine Hinweise für eine Wasserstoffbrücke zwischen Q50 und C404 im Dunkelzustand (Abb. III-9). Dies ist konform zu Raman-spektroskopischen Untersuchungen der AppA-Mutante Q63L, bei der die Frequenz der Flavin $\nu(\text{C404})$ gegenüber dem WT unverändert bleibt (Unno *et al.*, 2006). Die ^{15}N -Amid-Q-Markierung bestätigte außerdem Interpretationen von Stelling *et al.*, 2007 und Bonetti *et al.*, 2008, welche bereits in transienten Absorptionsspektren Signale bei 1666 und 1670 cm^{-1} dem strikt konservierten Q50 zuordnen (Abb. III-9, Abb. III-11), wobei im FT-IR LmD-Spektrum von PixD vermutlich Amid I Banden überlagern (Tab. IV-B, Anhang Tab. V-F). Die vergleichsweise kleine ^{15}N -Isotopenverschiebung der (-)1670 Bande um 5 cm^{-1} (Abb. III-9) entspricht der vorhergesagten, schwachen Frequenzminderung in der Amid-Form (Domratheva *et al.*, 2016).

Das hier gezeigte Spektrum der ^{15}N -Amid-Glutaminmarkierung von PixD stimmt mit einem kürzlich veröffentlichten, analogen Isotopenmuster in BlrB(1-140) überein. Die publizierten Daten werden als Tautomerisierung des Q50 interpretiert (Domratheva *et al.*, 2016). Dazu extrahiert die Gruppe aus dem Doppeldifferenzspektrum ein verdecktes Bandenpaar bei (-)1672/(+)1691, das sie der C=O-Schwingung des strikt konservierten Glutamins zuordnen (Domratheva *et al.*, 2016). Diese rein mathematisch dargestellte Existenz einer schwachen Schwingungsabsorption um 1690 cm^{-1} konnte hier für das LmD-Differenzspektrum von PixD durch ^{13}C -Markierung des Flavin-C4 experimentell bewiesen werden (Abb. III-3.A, C). Die Analysen wiesen außerdem daraufhin, das mindestens eine weitere Bande mit der $\nu(\text{C404})$ im Lichtzustand überlagert. Somit lokalisieren die verdeckten Signale dicht beieinander, um 1694 cm^{-1} . Für eines von ihnen ist eine Paarung mit dem ebenfalls verdeckten, schwachen Signal bei (-)1710 cm^{-1} stark indiziert (Abschnitt III.2.1). Für das andere kann eine Zusammengehörigkeit mit der IR-Absorptionsbande (-)1670 auch für die hier gezeigten Datensätze angenommen werden.

Eine Tautomerisierung des konservierten Glutamins wird von den gezeigten Resultaten untermauert. Das Doppeldifferenzspektrum aus $i^{13}\text{C}$ -Q.2 und einer uniformen ^{13}C -Markierung des gesamten Proteins sollte die bisherigen Bandenzuordnungen unterstützen. Um jedoch eine gesicherte Aussage zu treffen und den Rotationsmechanismus gänzlich auszuschließen, muss die Umlagerung der Doppelbindung in weiteren Experimenten bestätigt werden. Dies wäre eventuell mit weiteren Isotopenmustern für Glutamin in Kombination mit einem $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -RF Isotopomer realisierbar. Dadurch würde die $\nu(\text{C404})$ -Schwingung stärker aus dem Frequenzbereich 1660 - 1690 cm^{-1} verschieben, um in Doppeldifferenzspektren die Banden der Q50-Seitenkette deutlicher abzutrennen. Unterstützend kann eine Ausweitung des Messbereiches vorgenommen werden, da Glutaminschwingungen auch unter 1000 cm^{-1} und über 2900 cm^{-1} absorbieren (Ramírez *et al.*, 1998; Barth, 2000; Wolpert & Hellwig, 2006). In Abhängigkeit der zu erreichenden Größe von Proteinkristallen wäre auch eine Lokalisation der Protonen mit Hilfe der Neutronen Kristallographie möglich (Blakeley *et al.*, 2008).

IV. Diskussion

Im Gegensatz zu den Interpretationen von Domratheva *et al.*, 2016, wird hier eine starke Wasserstoffbrücke zwischen dem Flavin C404 und dem Q50-Seitenkettenamid im Lichtzustand favorisiert. Um die daraus folgende Schwingungskopplung des Q50-Carbonyls mit der Hydroxylgruppe des Tyrosins-8 nachzuweisen, waren die Glutaminmuster eher ungeeignet. Eindeutiger wäre eine ¹³C- oder ¹⁸O-Markierung des Seitenkettencarbonyls von Glutamin. Zusätzlich wäre, angelehnt an Iwata *et al.*, 2011, eine Betrachtung der IR-Spektren zwischen 2400 - 2800 cm⁻¹ nötig. Darüber hinaus bleibt die Klärung der Q50-Imidsäure-Stabilisierung von großer Bedeutung. Hierfür könnten unter anderem weitere Markierungen (z.B. selektiv Methionin) und transiente Infrarot-Messungen eingesetzt werden.

Die Positionierung der Indolseitenkette von W91

Ein putativer Bindungspartner der Q50-Imidsäure ist das semi-konservierte Tryptophan. Für seine Ausrichtung in AppA lieferten *Acrylamid-Quenching-Assays* jedoch kontroverse Resultate, die vermutlich auf einen Einfluss terminaler Verkürzungen zurückgehen (Dragnea *et al.*, 2009; Unno *et al.*, 2012). Für PixD schließt diese Methode, übereinstimmend mit den hier gezeigten FT-IR Analysen der Isotopenmarkierungen und der Mutanten, einen W91 *in/out*-Wechsel in PixD aus (Yuan *et al.*, 2011) (Abb. III-14). Wie Acrylamid können umgebende Aminosäuren als Löscher von Tryptophanfluoreszenz wirken (Cowgill, 1967; Steiner & Kirby, 1969; Wells *et al.*, 1994; Van Gilst & Hudson, 1996). Allerdings müssen nicht zwangsläufig drastische Umlagerungen Ursache der von Yuan *et al.*, 2006 beobachteten Löschung und 2 nm Rotverschiebung der W91-Emission sein. In PixD übt möglicherweise bereits eine lichtaktivierte Annäherung des Tryptophans an umgebende Seitenketten von V90 oder S92 diesen Effekt aus. Verbleibt es dagegen in der Flavinbindetasche, müssten Reste der α 1-Helix die Tryptophanemission im Lichtzustand beeinträchtigen.

Da der *in/out*-Wechsel unterbleibt und eine W91A-Substitution *in vivo* keine Beeinträchtigung der Blaulichtaktivierung aufweist (Masuda *et al.*, 2008), ist eine Involvierung der Tryptophanseitenkette in die Signalweiterleitung von PixD unwahrscheinlich. Ihre Relevanz könnte jedoch innerhalb der BLUF-Familie unterschiedlich sein, wie die Aktivitätsunterschiede von Tryptophan-Substitutionen in AppA und bPAC vermuten lassen (Metz *et al.*, 2010; Stierl *et al.*, 2014).

Konformation und Protonierungsstatus des H72

Im Vergleich zu W91 ist die Funktion des strikt konservierten Histidins der BLUF-Domänen bisher kaum untersucht. Es soll an einem putativen Protonentransfer mit D82 (PixD D69) beteiligt sein (Majerus *et al.*, 2007), der durch S10 und möglicherweise ein Wassermolekül ergänzt wird, um die Übertragung auf Y8 oder das Flavin abschließen zu können (Mathes, 2008) (Abb. IV-3). Khrenova *et al.*, 2017 veröffentlichten kürzlich ein Modell, in dem das Histidin ein Proton direkt über Y9 an die Q51-Imidsäure weiterleitet um die Dunkelrelaxation einzuleiten.

Die Theorien können nur mit zeitauflösender Spektroskopie geprüft werden. Im LmD-Differenzspektrum der uniformen Histidin-Markierung für PixD wurden hingegen keine Signalverschiebungen detektiert (Abb. III-19). Damit bleiben Konformation und Protonierungsstatus des H72 in Dunkel- und Lichtzustand von PixD gleich, wobei unter den experimentellen Bedingungen die neutrale Seitenkette zu erwarten ist. Aus den Quantum Mechanischen und Molekular Mechanischen (QM/MM)-Simulationen von Khrenova *et al.*, 2017 ging hingegen eine leichte Zunahme der Wasserstoffbrückendistanz zwischen H73 und Y9 beim Übergang in den Grundzustand hervor, die hier nicht belegt werden konnte. Abgesehen von einer Beteiligung am Photozyklus lässt der Chromophor-Verlust bei H72-Substitution (Dr. Mathes, persönliche Kommunikation) auf eine wichtige strukturelle Funktion dieser Position schließen, die bereits Jung *et al.*, 2006 für das His85-Arg-X-Asp82-Motiv postulieren. Die H72-Seitenkette ist parallel, Zentrum versetzt in einem Winkel von $\sim 20^\circ$ im Abstand von 5,0 – 5,7 Å zu Ring I des Isoalloxazinsystems orientiert und könnte über aromatische Wechselwirkungen interagieren (Yuan *et al.*, 2006) (Abb. IV-3). Durch seine Lage am Anfang des $\beta 4$ -Stranges stabilisiert es möglicherweise die $\alpha 2\beta 4$ -Schleife über eine schwache Wasserstoffbrücke zum α -Carbonyl von D69 (Abb. IV-3). Da sich das Homodimer-Interface zwischen dem $\beta 4$ -Strang und der $\alpha 2$ -Helix zweier Monomere bildet (Abb. I-6), ist die Beständigkeit dieser Sekundärstrukturen vermutlich von essentieller Bedeutung für die zeitliche Kontrolle der Reassemblierung des PixD-PixE-Superkomplexes.

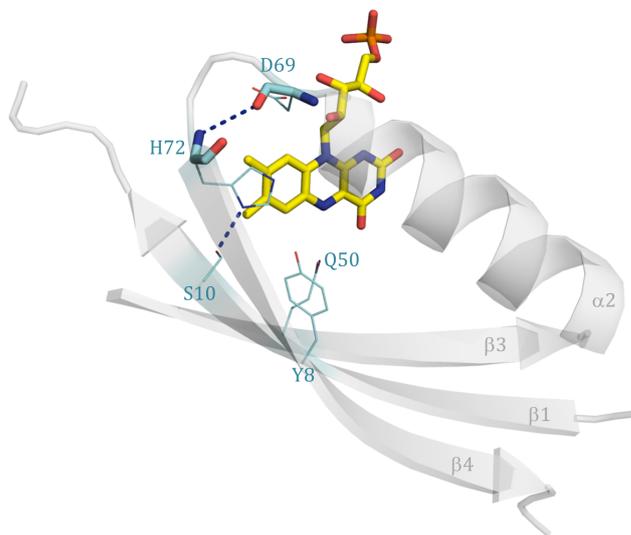


Abb. IV-3 – Putativer Protonentransfer über H72

Das strikt konservierte Histidin der BLUF-Domänen befindet sich im Übergang zwischen der $\alpha 2\beta 4$ -Schleife und dem $\beta 4$ -Strang. Es ist in Wasserstoffbrückenreichweite zu D69 und S10 lokalisiert und könnte entlang dieser Triade Protonen zum Y8 transportieren. Neben einer katalytischen Funktion ist auch eine reine Beteiligung an der Bindung des Chromophors denkbar. PDB Eintrag 2HFN, Monomer A, Yuan *et al.*, 2006, PyMOL

Für eine abschließende Klärung der Funktion von H72 ist die Betrachtung transientscher Veränderungen auf verschiedenen Zeitskalen notwendig. Daneben kann seine Rolle auch über Reste-spezifische Inkorporation von Derivaten dieser Aminosäure untersucht werden. Xiao *et al.*, 2014 entwickelten ein Aminoacyl-tRNA-Synthase/tRNA Paar, das für den effizienten Einbau von unter anderem 3-Pyridyl-Alanin, 2-Furyl-Alanin und 3-(2-Thienyl)-Alanin in *E. coli* verwendet werden kann. Die Sterik dieser Analoga erfüllt strukturelle Anforderungen an die Position 72, verändert aber die chemischen Eigenschaften der Seitenkette, um Wasserstoffbrücken oder Protonentransfers zu variieren.

Mögliche Aminosäureseitenketten-Signaturen von PixD

Neben Schwingungsänderungen innerhalb der Chromophorbindetasche sind auch solche zu erwarten, die Reste des Signaltransduktionspfades zur Proteinoberfläche betreffen. Im IR-Spektrum von PixD wurden mit den hier gezeigten Isotopenmarkierungen bei (-)1710/(+)1694 verdeckte Differenzbanden gefunden, die Glutamin (Abb. III-10), Glutamat (Abb. III-11), Arginin, Asparagin oder Aspartat zugeordnet werden könnten (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002; Wolpert & Hellwig, 2006). Wie die Analysen von Domratcheva *et al.*, 2016 andeuten, sind sie möglicherweise auch in anderen BLUF-Proteinen vorhanden und würden demnach von einem konservierten Rest stammen. Interessanterweise treten in dem Differenzspektrum einer uniformen ^{13}C -Markierung von AppA(1-126)-W104A ähnliche, geringe Signale um 1710 und 1690 cm^{-1} auf (Masuda *et al.*, 2005a). Es ist denkbar, dass zwei hochfrequente Banden mit Absorption oberhalb von 1800 cm^{-1} durch die Isotopenmarkierungen nach (-)1710/(+)1694 verschoben wurden. Da die analogen Spektren des AppA-WT kein solches Bandenpaar aufweisen (Masuda *et al.*, 2005a), veränderte sich die Schwingungsfrequenz der verursachenden Seitenkette möglicherweise mit Einführung der W104A-Substitution.

Anhand der hier vorliegenden Markierungsmuster kann nur Asparagin als Ursprung der verdeckten Schwingungen sicher ausgeschlossen werden (Steinocher, 2013; Abb. V-11). Eine Glutamin-Signatur ist unwahrscheinlich, da die $\nu(\text{C}=\text{O})$ des einzigen konservierten Glutamins bereits der Bande (-)1670 cm^{-1} zugeordnet wurde. Arginin würde sowohl die hohe Schwingungsfrequenz erfüllen, als auch eine starke D_2O -Abhängigkeit seiner Seitenkettenschwingungen aufweisen (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002; Wolpert & Hellwig, 2006). Das entspräche der beobachteten D_2O -Sensitivität beider Differenzbanden in den $^{13}\text{C}4\text{a},10\text{a}$ -RF und ^{13}C -RF-Markierungen (Dr. Mathes, persönliche Mitteilung). Dagegen kämen Aspartat oder Glutamat nur in Frage, wenn ihre Umgebung eine Protonierung aufrechterhalten würde. Somit kann über eine Zuordnung der Signale (-)1710/(+)1694 vor allem zu R71, E53, D20 oder D69 spekuliert werden (Abb. IV-4.A). Unter ihnen ist besonders für E53 (AppA-E66) ein Einfluss der W104A-Mutation denkbar, welche die putative Verbindung zur $\beta_4\beta_5$ -Schleife stören könnte. Die $\nu(\text{COOH})$ von Glutamat erscheint im Frequenzbereich 1703 - 1710 cm^{-1} , wenn zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden und schwingt sonst deutlich stärker (Nie *et al.*, 2005). Für eine E53 Hydroxy-Gruppe existiert in der Kristallstruktur allerdings kein geeigneter Wasserstoffbrückenakzeptor in Reichweite (Yuan *et al.*, 2006), wodurch seine Zuordnung zu den verdeckten Differenzbanden nur schwach indiziert ist. Durch eine W104F-Substitution ausgelöste Frequenzänderungen der übrigen Reste wären an eine Verlagerung der α 1-Helix gebunden (Abb. IV-4.A). Näheren Aufschluss sollte eine ^{13}C -RF-Markierung in der PixD-W91A Mutante sowie Doppelmarkierungen von Arginin und dem Flavin liefern. Andernfalls erschweren Überlagerungen von Arginin-Signaturen mit den Amid I und II Banden eine Identifizierung weiterer Schwingungen dieser Aminosäure (Barth, 2000).

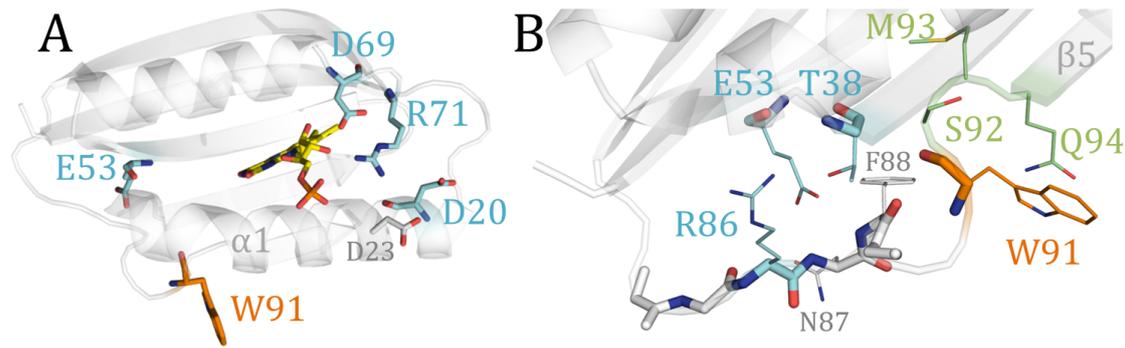


Abb. IV-4 – Potenzielle Ursprünge von Schwingungen mit Frequenzänderungen bei W91-Substitution

A) Ihre hohe Schwingungsfrequenz, eine mögliche Konservierung des verursachenden Restes sowie die putative Beeinflussung seiner Wasserstoffbrückeninteraktionen durch eine W91-Mutation lassen für die verdeckten Signale (-)1710/(+)1694 eine Zugehörigkeit zu R71, D20, D69 oder E53 vermuten. B) Aminosäuren, deren Wechselwirkungen am stärksten durch eine W91-Substitution beeinflusst wären, finden sich in direkter Nachbarschaft (Positionen 92 - 94), könnten aber auch an der Stabilisierung der β 4 β 5-Schleife beteiligt sein (T38, E53 und R86). Monomer A, PDB-Eintrag 2HFN, Yuan *et al.*, 2006

Ab 1500 cm^{-1} wurden vorrangig CC/C=C-, CH- oder CO-Schwingungen des Apoproteins gefunden (Abschnitt III.2.1). Unter ihnen könnten einige Banden durch Seitenketten von Ala, Ser und Phe verursacht werden (Anhang Tab. V-D). Deutlich mehr Signale würden jedoch zu bekannten Schwingungsfrequenzen von Glutamat und Aspartat passen (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002; Wolpert & Hellwig, 2006) (Anhang Tab. V-D). Wie zuvor beschrieben weisen BLUF-Domänen für beide Reste eine strikt konservierte Position (E53 und D69 in PixD) auf, wobei im PixD-Monomer insgesamt 19 dieser Aminosäuren häufig nahe beieinander vorkommen (Abb. I-2). Unter anderem ließe sich die interessante Bande bei $(+)1145\text{ cm}^{-1}$, die durch die W91-Mutationen Verschiebungen zu höheren Wellenzahlen erfuhr, ebenfalls Glutamat zuordnen (Anhang Tab. V-J). Das $(+)1145$ Signal wurde in den Mutanten PixD-M93A und AppA-BLUF-W104A sehr ähnlich verschoben und tritt in den FT-IR Differenzspektren vieler BLUF-Proteine auf (Hasegawa *et al.*, 2006; Iwata *et al.*, 2011; Stier, 2014; Stierl *et al.*, 2014). Wie es hier für die Bande festgestellt wurde, weisen isopeninduzierte Frequenzänderungen in YcgF auf eine Kohlenstoffbindung mit schwacher Kopplung an Stickstoff hin (Hasegawa *et al.*, 2006). Die von PixD verschiedene D_2O -Sensitivität der Bande könnte auf eine unterschiedliche Zugänglichkeit für das Lösungsmittel zurückzuführen sein, oder auf den Schwierigkeiten der Signalzuordnung in deuterierten Spektren basieren. Alternativ zu E53 kämen dann $\delta(\text{C-OH})$ oder $\rho(\text{CH}_3)$ -Schwingungen des semikonservierten Threonin-38 (Abb. I-2) als Ursprung der $(+)1145$ Bande in Frage (Anhang Tab. V-J). Es ko-lokalisiert in der Kristallstruktur von PixD mit E53, an der Interaktionsseite der Stränge β 2 und β 3 mit der β 4 β 5-Schleife (Yuan *et al.*, 2006) (Abb. IV-4.B).

Zusammengenommen sprechen die Beobachtungen dafür, dass die schwachen Schwingungssignaturen (-)1710/(+)1694 und das $(+)1145$ Signal strikt bis hoch-konservierten Aminosäuren zuzuordnen sind. In Frage kommen vor allem Reste in der Umgebung von W91 und M93. Weiter entfernt gelegene Seitenketten würden für ein Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen β 5-Strang und α 1-Helix sprechen.

Lichtinduzierte Konformationsänderungen des Proteinerückgrats von PixD

Für die prominenten Differenzbanden zwischen 1500 - 1700 cm^{-1} wurden bisherige Zuordnungen zu den Amid I und Amid II Banden bestätigt (Abb. III-3.C). Die Amid I Region weist dabei eine starke Ähnlichkeit zu der von YcgF-BLUF, PapB und TePixD (Masuda *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2012) auf und erstreckt sich nach den vorliegenden Ergebnissen vermutlich zwischen 1610 - 1670 cm^{-1} (Abb. IV-5). Dabei verdecken die Rückgratschwingungen möglicherweise Signale von Aminosäureseitenketten (Abschnitt III.2.1).

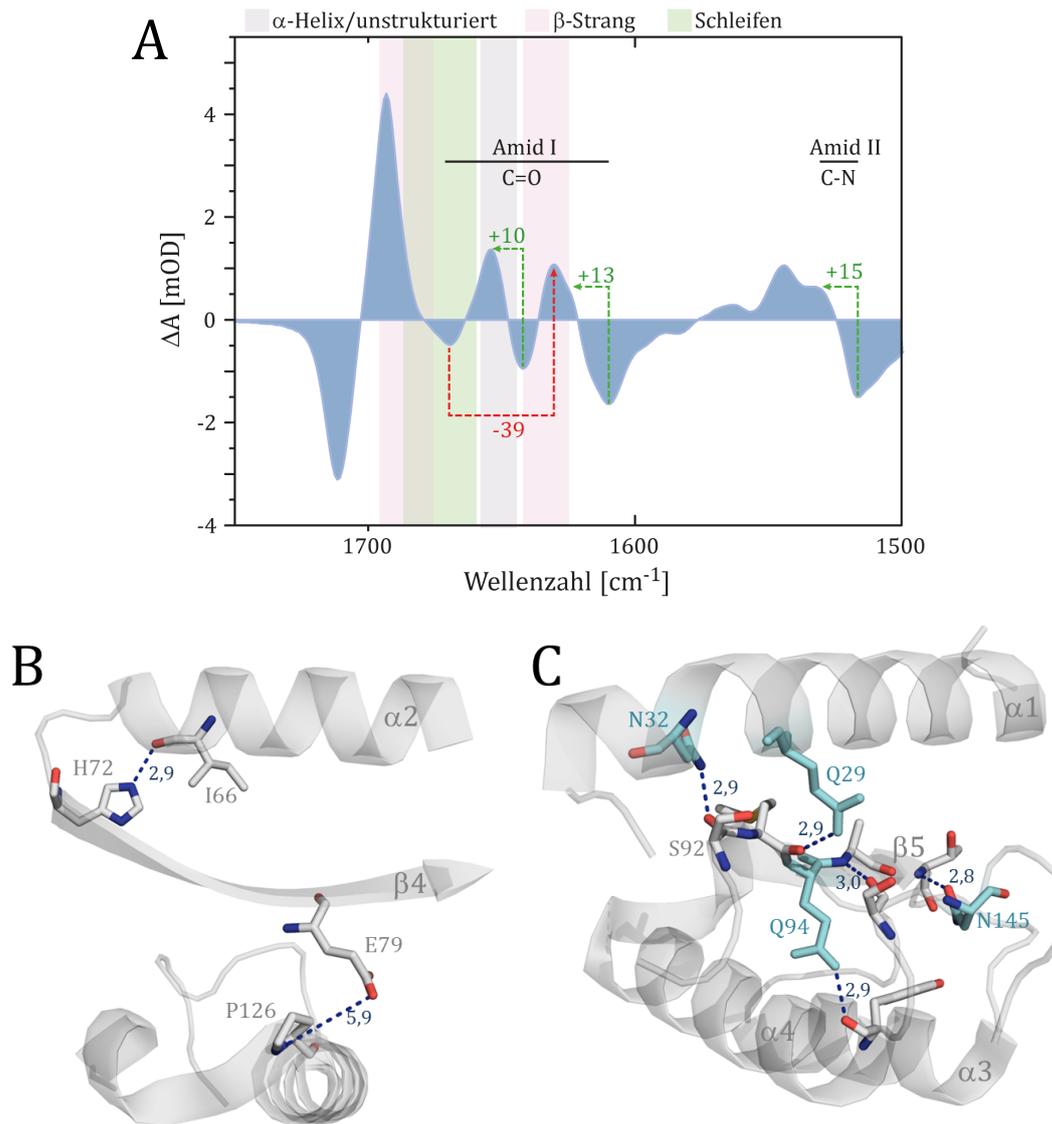


Abb. IV-5 – Mögliche Zuordnung der Amid I und II Signale zu Sekundärstrukturelementen

A) Die Banden der Schwingungsformen des Proteinerückgrats von PixD weisen auf verschiedene Vorgänge hin. Entweder fehlt der 1631 cm^{-1} Bande ein zugehöriges negatives Signal im Differenzspektrum, oder es absorbiert möglicherweise schwach bei (-)1670. Da die Deuterierung funktioneller Gruppen eine Zugehörigkeit der Signalpaare (-)1610/(+)1623 und (-)1642/(+)1653 anzeigt, werden bei Ausbildung von P_{red} wahrscheinlich Wasserstoffbrücken zwischen Seiten- oder Hauptketten benachbarter Strukturelemente und dem Rückgrat aufgebrochen. B) In Frage kämen hierfür Interaktionen zwischen $\alpha 2$ und $\beta 4$, wobei putativ, in Abhängigkeit der Ausrichtung von E79, auch eine nicht-kovalente Bindung unter $\beta 4$ und $\alpha 3$ denkbar ist. C) Gehäuft treten Wasserstoffbrücken zu anderen Sekundärstrukturen in der Kristallstruktur um den $\beta 5$ -Strang auf (Yuan *et al.*, 2006). PDB Eintrag 2HFN, PyMOL, Abstände in Ångström

Die Interpretation der Signale bei $(+)$ 1653/ $(-)$ 1642 cm^{-1} als Schwingungen der α -Helices (Masuda *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2008; Stierl *et al.*, 2014) und $(+)$ 1631, 1623/ $(-)$ 1610 cm^{-1} als der von β -Faltblattsträngen (Hasegawa *et al.*, 2005; Masuda *et al.*, 2005a; Brust *et al.*, 2013) wurden durch die vorgelegten Daten ebenfalls unterstützt (Tab. IV-B). Bereits Hasegawa *et al.*, 2005 vermuten die Bildung eines Signalpaares durch $(-)$ 1610/ $(+)$ 1623, worauf die im D_2O -Austausch erzeugten Verschiebungen um -3 und 2 cm^{-1} hindeuten (Abb. III-3.D). Diese Paarung und die der $(-)$ 1642/ $(+)$ 1653 Signaturen weist auf eine Zunahme der Schwingungsfrequenzen um 11 und 13 cm^{-1} und damit auf eine Stärkung der Rückgratmodi in β -Strängen und α -Helices nach Übergang in die aktive Konformation hin (Abb. IV-5.A). Das stünde im Einklang mit der homogeneren Struktur der Flavinbindetasche, welche aus der Photochemie des BLUF-Signalzustandes hervorgeht (Shibata *et al.*, 2009; Kennis & Mathes, 2013).

Begleitend zeigen auch die zur Amid II Region gehörenden Signale $(-)$ 1516 und $(+)$ 1531 (Takahashi *et al.*, 2007; Masuda *et al.*, 2008; Mehlhorn *et al.*, 2013; Steinocher, 2013) eine Frequenzzunahme der CN-Schwingungen im Proteinerückgrat bei Belichtung (Abb. IV-5.A). Sie sind durch die Wasserstoffbrücken der Sekundärstruktur vor einer Deuterierung weitestgehend abgeschirmt (Masuda *et al.*, 2004; Grinstead *et al.*, 2006b) (Abb. III-5.D). Über eine vollständige Deuterierung des Proteins oder massenspektrometrische Analysen des Protonen-Deuteronen-Austausches (Hamuro *et al.*, 2003) ließen sich die sensitiven Elemente genauer bestimmen. Für diese Technik ist *E. coli* besonders gut geeignet (Takahashi & Shimada, 2010). Mit Hilfe solcher Daten wären Interpretationen von Signalverschiebungen in dem deuterierten Wildtyp-Spektrum erleichtert, für das ein vollständiger Ersatz austauschbarer Protonen gegen Deuteronen nur angenommen werden kann.

Aufgrund der mangelnden Informationen bleibt die Interpretation der Sekundärstrukturänderungen wage. Möglicherweise führen Umlagerungen innerhalb des β -Faltblattes zu Neuorientierungen von Aminosäureseitenketten. Daraus könnte ein Verlust von Wasserstoffbrücken zwischen den Sekundärstrukturen resultieren, der Signalweiterleitungswege auf den Effektor eröffnet. In der Kristallstruktur von PixD bilden N32 (α 1) und S92 (β 5), Q29 (α 1) und M93 (β 5), oder Q94 (β 5) sowie E140 und L141 (C-Terminus) Wasserstoffbrücken zwischen den Sekundärstrukturelementen, welche die Amidschwingungen beeinflussen könnten (Abb. IV-5.C). Wie Barth und Zscherp, 2002 ausführen, können die tatsächlichen konformationellen Änderungen einer Proteinstruktur im IR-Spektrum maskiert sein, wenn die Netto-Änderung Null ist oder nur sehr wenige Reste beteiligt sind. Aus diesem Grund ist eine genauere Analyse der Sekundärstrukturschwingungen nötig. Beispielsweise mit segmentellen und selektiven Isotopen- oder Reaktivitätsmarkierungen, die mit Hilfe von Intein realisiert werden können (Minato *et al.*, 2012). Dabei ist eine Markierung des Rückgrates für 12 Aminosäuren über die Fütterung von 1,2- ^{13}C -Pyruvat möglich (Guo *et al.*, 2009). Wahlweise könnten auch Punktmutationen und Isotopenmarkierungen kombiniert werden, um die Signale von helikalen Strukturen oder Faltblattsträngen zu unterscheiden.

Ein Modell der Konformationsänderungen im β -Faltblatt

Anhand der selektiven Tryptophanmarkierung war die Zuordnung der Bande (+)1631 zu dem C α -Carbonyl von W91 möglich. Änderungen in diesem Bereich des Proteins wären plausibel, da er nahe der putativen Bindestelle für PixE lokalisiert ist (Ren *et al.*, 2013). Ein entsprechendes Dunkelzustandssignal wurde nicht eindeutig identifiziert (Abb. III-14), wodurch Umwandlungen von Sekundärstrukturen angedeutet wurden (Mehlhorn *et al.*, 2015). Umgekehrt dazu konnte in IR-Analysen der J α -Helices von LOV-Domänen nur eine negative Bande zugeordnet werden, deren zugehöriges Lichtzustandssignal durch Auflösung der Sekundärstruktur fehlt (Harper *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2009, Herman *et al.*, 2013). In den *Win/out*-Konformationen der PixD-Röntgenkristallstrukturen ist eine Verlängerung des β 5-Stranges durch eine veränderte Interaktion mit dem benachbarten β 2-Strang beobachtbar (Abb. IV-6). Da die Proteine im Dunkeln kristallisiert wurden und eine lichtaktivierte Zunahme der β 4 β 5-Flexibilität in BLUF-Domänen beobachtet wird (Yuan *et al.*, 2011, Wu *et al.*, 2008, Wu & Gardner, 2009), stellen die Monomere A wahrscheinlich die Konformation des Grundzustandes dar. Einer lichtinduzierten Transformation der Kette A zu den Konformationen C oder D (Abb. IV-6) widersprechen die hier gezeigten Ergebnisse, weil die Tryptophan-Hauptkette beim Übergang zwischen den Monomeren A/D (2HFN) bzw. A/C (2HFO) eine nicht-kovalente Bindung verlieren würde und der Indol-Teil in die Flavinbindetasche schwingt.

Dr. Florian Richter modellierte den Bereich zwischen N87 und E104 ausgehend von den Konformationen der Monomere A und C des PDB-Eintrages 2HFO (Yuan *et al.*, 2006), um Szenarien einer Registerverschiebung zu prüfen, die den experimentellen Daten besser entsprechen (Mehlhorn *et al.*, 2015). Vorgegeben wurde dabei die Ausbildung einer neuen Wasserstoffbrücke zwischen W91-N und I37-O, um eine Verschiebung der β 2 β 5-Rückgratinteraktionen zu fordern. Unter dieser Restriktion blieb die β -Strang-Faltung nur erhalten, wenn zusätzlich die Interaktion zwischen W91-O und G39-N bestehen blieb. Das Ergebnis der Simulation (grün) ist im Vergleich zur Kristallstruktur in Abb. IV-6 gezeigt.

Mit dem aus der Simulation hervorgehenden Modell eines putativen Signalzustandes und 2HFN/2HFO als wahrscheinliche Grundzustandskonfigurationen beschreiben die Wasserstoffbrückenänderungen die Ergebnisse der FT-IR Messungen eher. So verblieb die W91-Seitenkette in einer auswärtsgerichteten Position, wobei Prolin-33 als möglicher Fluoreszenzlöcher in seine Nähe rückte (Abb. IV-7). Die W91-Hauptkette verlor hingegen durch eine Aufwärtsdrehung den Kontakt zum Rückgrat an F88 und E89 und die Schleifenregion gewann an Flexibilität. Gleichzeitig trat infolge des +1-Registershifts eine Verlängerung des β 5-Stranges ein, bei der Teile der Schleife die konformationelle Umgestaltung vollzogen (Abb. IV-6). Nicht hinreichend umgesetzt war die Zunahme der Rückgratschwingungen in anderen Sekundärstrukturelementen (Abb. IV-6). Es ist jedoch zu beachten, dass aufgrund des Rechenaufwandes nur ein kleiner Teil der BLUF-Domäne modelliert wurde. Von zusätzlichen Anpassungen der umgebenden Reste ist auszugehen, da bereits in dem vergleichsweise kurzen, simulierten Abschnitt weitere Umstrukturierungen auftraten (Abb. IV-7).

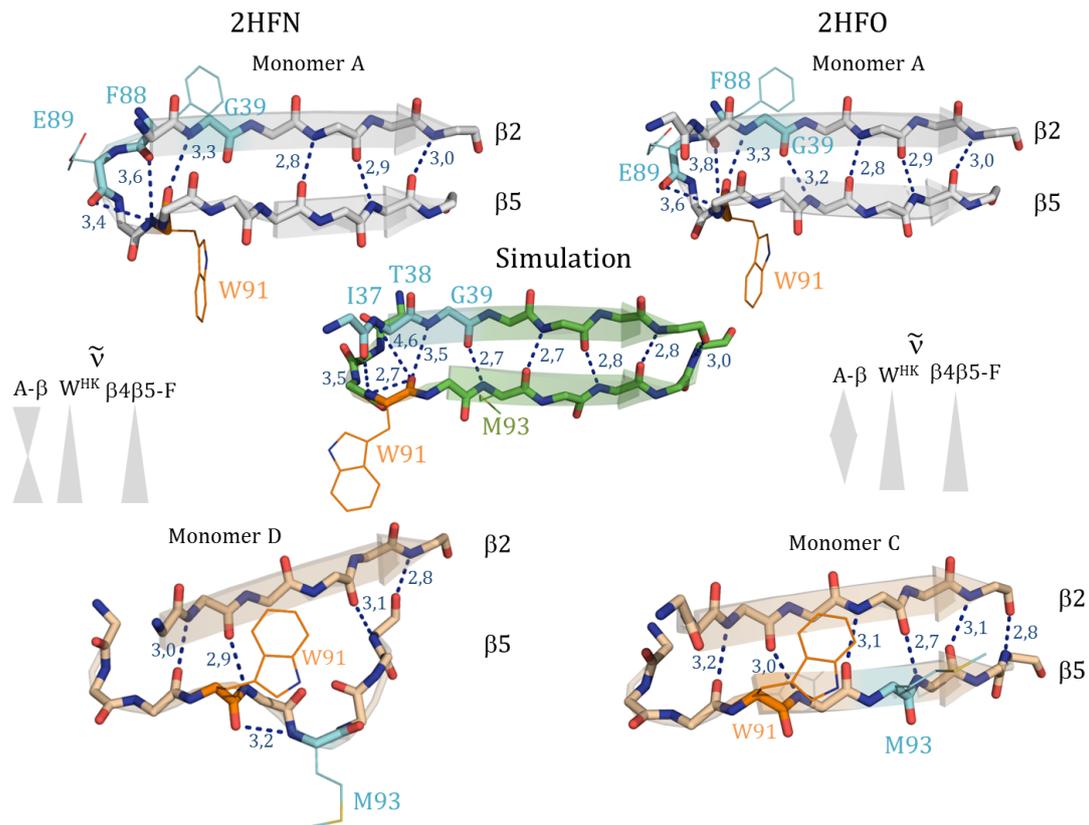


Abb. IV-6 – Potenzielle Änderungen der Wasserstoffbrücken zwischen $\beta 2$ und $\beta 5$ sowie der Schleifenregion
 Die in den Kristallstrukturen aufgelöste Interaktion der β -Stränge zeigt in wenigen Monomeren Änderungen, die an eine Registerverschiebung der Rückgrat-Bindungen gebunden sind und gleichzeitig den *in/out*-Wechsel von W91 vollziehen. Abhängig von der Neuordnung bleibt der $\beta 5$ -Strang erhalten (2HFO, C) oder löst sich in einer unstrukturierten Schleife auf (2HFN, D), wobei für M93 unterschiedliche Positionierung zum Lösungsmittel auffallen. Die Schwingungsänderungen der selektiven W91-Markierung und der W91-Mutanten zeigen wahrscheinlich eine Stärkung der nicht-kovalenten Bindung am W91-Rückgrat-Carbonyl, wodurch die Schwingungsfrequenzen der Faltblatt-assoziierten Amid I Signale (A- β) und der W91-Hauptkette (W^{HK}) verringert werden. Es ist außerdem bekannt, dass die Flexibilität der $\beta 4\beta 5$ -Schleife ($\beta 4\beta 5$ -F) nach Lichtapplikation zunimmt und die Indolseitenkette keine signifikante Veränderung der Umgebung erfährt. Yuan *et al.*, 2006, PyMOL, Abstände in Ångström

In der Simulation vollzogen M93 und Q94 mit dem Registershift einen *Flip* des Rückgrates, wodurch die Methioninseitenkette zur C-terminalen $\alpha 4$ -Helix ausgerichtet wurde und das Glutamin in Richtung der aufliegenden $\alpha 2$ -Helix zeigte (Abb. IV-7). Wasserstoffbrücken, die Q94 in den Strukturen 2HFN/2HFO zu den Hauptketten von Y140 und L142 bilden kann oder zwischen M93 und Q50 möglich wären, würden damit aufgebrochen. Darüber hinaus würde M93 in dieser Konformation den putativen Signaltransduktionspfad zum C-Terminus der BLUF-Domäne (Schroeder *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2012) schließen, womit der Funktionsverlust einer M93A-Mutante *in vivo* erklärt werden könnte (Masuda *et al.*, 2008). Diese Funktion nähme M93 möglicherweise nicht in allen BLUF-Domänen ein, wie die AppA-W104M-M106W-Mutante andeutet (Dragnea *et al.*, 2009). Ob daher beiden Resten eine vorrangig strukturelle Bedeutung für die Stabilisierung des $\beta 5$ -Stranges zukommt, müssen detailliertere Analysen solcher Mutanten aufzeigen.

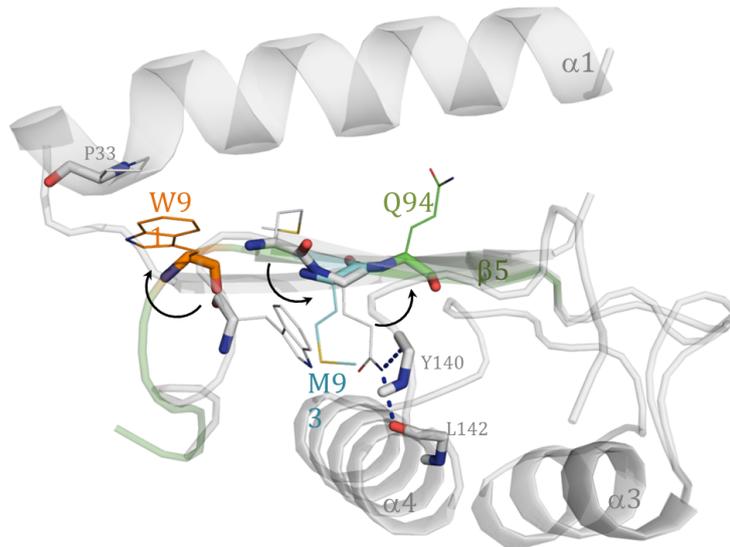


Abb. IV-7 – Konformationelle Änderungen im β 5-Strang bei Simulation eines +1-Registershifts

Gezeigt ist die Überlagerung eines Ausschnittes der Kristallstruktur (grau, 2HF0, Yuan *et al.*, 2006) mit dem Ergebnis der Simulation eines +1-Registershifts für den Proteinteil N87 – E104 (grün). Wird W91 in die Struktur des letzten β -Stranges eingepflegt (grau), erfährt dieser mit der Elongation eine Reorientierung der Aminosäureseitenketten. Das strikt konservierte M93 wird dabei aus der Flavinbindetasche zum C-Terminus ausgerichtet und könnte nicht mehr mit Q50 interagieren. Mit diesem Flip assoziiert ist die Aufrichtung des Q94 zur darüber liegenden α 1-Helix, wodurch seine Seitenkette putative Wasserstoffbrücken zu Y140 und L142 verlieren würde. PyMOL

Da die selektive Tryptophanmarkierung Isotopenverschiebungen der Rückgratschwingungen mit Frequenz von β -Faltblattschwingungen verursachte, ist dieser Rest im Lichtzustand in den β 5-Strang eingebettet. Das von Dr. Richter erstellte Modell weist darauf hin, dass eine Verschiebung der Stränge β 2 und β 5 gegeneinander die experimentellen Daten erklären könnte. Diese Konformationsänderung hätte zugleich Auswirkungen auf die β 4 β 5-Schleife und auf putative Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem β -Faltblatt und dem C-Terminus.

IV.3 Einfluss von Q50 und W91 auf die Bildung der Radikalintermediate und den Übergang nach P_{red}

Das konservierte Glutamin 50 nimmt eine unumstritten essenzielle Funktion in den BLUF-Domänen ein, dessen Substitutionen einen dauerhaften Lichtzustand erzeugen und den Übergang in den Dunkelzustand verhindern (Fukushima *et al.*, 2008; Dragnea *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2011). Diese Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Dunkel- und Lichtzustand ist auch für Y8-Mutationen in BLUF-Domänen bekannt, welche die Rezeptoren in einen permanent aktiven Zustand überführen (Metz *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2011; Stierl *et al.*, 2014). In bPAC-Y7F wird sogar eine invertierte Photoreaktion mit reduzierter Zyklase-Aktivität unter Blaulicht hergestellt (Stierl *et al.*, 2014). In selteneren Fällen resultieren Y8-Mutationen im Verlust des Kofaktors (Wu *et al.*, 2008), deren schwache Assoziation mit dem Flavin auch aus der Kristallstruktur von PixD-Y8F hervorgeht (Yuan *et al.*, 2011) und auf das Fehlen der Wasserstoffbrücke zwischen Q50 und Flavin-N5 bei Illumination zurückgeführt wird (Stierl *et al.*, 2014).

Während im AppA-WT ein kompetitiver Elektronentransfer von Y12 und W104 auftritt (Gauden *et al.*, 2007), wurde dies in PixD erst in Abwesenheit des Q50 beobachtet (Abb. IV-8). Darauf weisen ein partieller Rückgang der Grundzustandsbleichung sowie die Q1-Absorption im Bereich 550 - 700 nm hin (Abb. III-18). Tryptophan-Radikale bilden abhängig vom Protonierungsstatus Absorptionsmaxima um 335 und 560 nm (kationisch) oder 325 und 510 nm (neutral) auf (Bent & Hayon, 1975; Solar *et al.*, 1991). Daher entsteht in PixD-Q50A wahrscheinlich ein $\text{FAD}^{\cdot-}/\text{W91}^{\cdot+}$ -Radikalpaar, wofür die Indolseitenkette eine Annäherung an den Chromophor erfahren sollte. Die Existenz eines $\text{FAD}^{\cdot-}/\text{W91}^{\cdot+}$ -Radikalpaares geht aus den EPR-Untersuchungen allerdings nicht eindeutig hervor (Fudim *et al.*, 2015). Unterschiede in den Signalbreiten der Spektren deuten auf die Entstehung zweier verschiedener Aminosäure-Flavin-Radikalpartner in PixD-Wildtyp/Q50A und der Q50A-W91A-Mutante hin, die jedoch einen ähnlichen Abstand wie das Radikalpaar im Wildtyp aufweisen. Sie könnten aber auch Resultat einer Radikal-Vermischung oder einer veränderten Ausrichtung von Y8 und dem Isoalloxazinring zueinander sein.

Einen Hinweis für strukturelle Unterschiede der Bindetasche lieferte auch die beschleunigte Deaktivierung des angeregten Zustandes bei Q50A-Austausch (Abb. III-18). Putative Ursachen für den zugrunde liegenden, beschleunigten Elektronen-Transfer von Y8 auf das Flavin wären eine verkürzte Distanz zwischen den Radikalpartnern oder eine Überbrückung der Q50A-Lücke durch ein Wassermolekül.

Die konstitutive Aktivität von Q50-Mutanten lässt ebenfalls auf eine sub-optimale Ausrichtung von Seitenketten in der Chromophorbindetasche schließen, welche das Gleichgewicht zwischen inaktiver und aktiver Proteinkonformation stört. Die schwache 1,8-fache Aktivitätszunahme einer homologen bPAC-Q49A-Mutante (Stierl *et al.*, 2014) kann, ohne strukturelle Informationen, auch auf die Störung dieses Gleichgewichtes zurückgeführt werden. Ihr Grundzustand dürfte bereits der aktiven Form des Wildtyps ähneln. Bei Illumination könnte die Protonierung des anionischen Semichinons, durch einen Wasserstoffbrückenverlust zu putativen neuen Bindungspartnern, den Schlüssel für die Aktivitätssteigerung bilden und dabei indirekt von W90 ausgehen. Die Optimierung des Signalzustandes sollte anschließend an die Ausrichtung des M93 gebunden sein, dessen Alanin-Substitution ebenfalls eine Einnahme der inaktiven Grundzustandskonformation verhindert. Da bPAC-M92A *in vitro* ganz ähnliche phänotypische Charakteristika aufweist wie die Q49A-Variante (Stierl *et al.*, 2014), geht die Aktivitätszunahme beider Mutanten nach Belichtung wahrscheinlich auf denselben Mechanismus zurück.

Die Y8- und Q50-Proteinvarianten unterstützen eine funktionelle Bedeutung von Redoxintermediaten im BLUF-Photozyklus, die ohne Schlüsselreste Konformationsänderungen nach Belichtung induzieren. Die Rolle der Radikale wird auch durch die Rekonstitution von PixD mit Roseoflavin unterstützt, dessen Inaktivität durch die fehlende Elektronenübertragung von Tyr-8 ausgelöst wird. Als Ursache wird ein lichtinduzierter, intramolekularer Ladungstransfer, angenommen (Zirak *et al.*, 2009).

Auch QM/MM Berechnungen an einem BlrB-Roseoflavin Modell legen nahe, dass bei Bindung des Riboflavinderivats kein Elektronentransfer zur Bildung des Photoprodukts stattfinden kann (Merz *et al.*, 2011). Während dies die Notwendigkeit des anionischen Semichinons für die Bildung von P_{red} unterstützt, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass das entstehende elektrische Feld bereits für die Induktion der Wasserstoffbrückenumlagerung ausreicht (Lukacs *et al.*, 2014; Mathes & Götze, 2015).

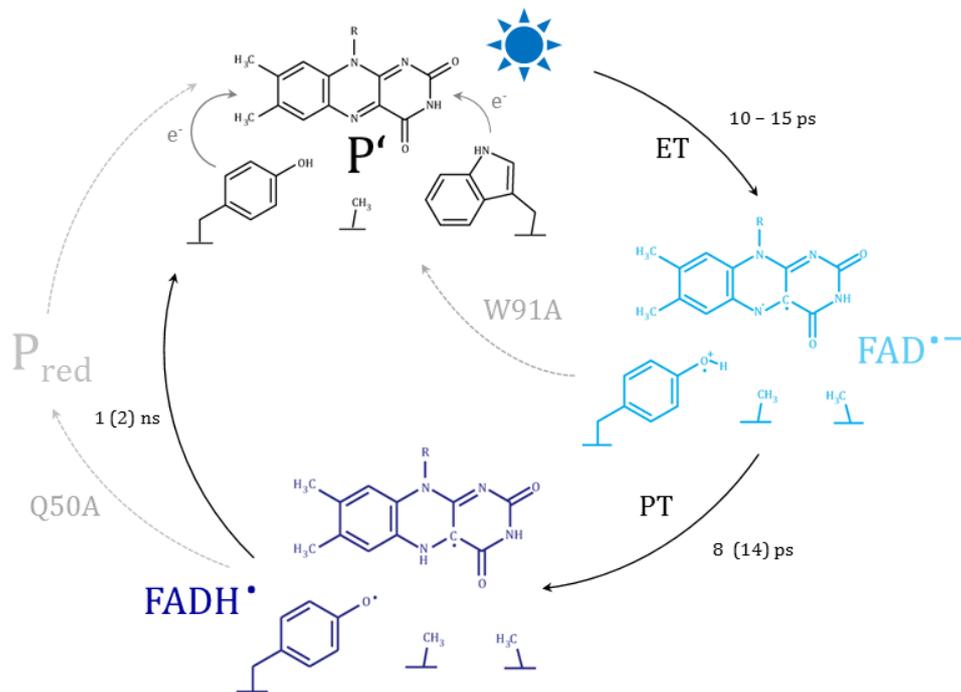


Abb. IV-8 – Der Photozyklus von PixD in Abwesenheit von Q50

Nach Anregung des Grundzustandes P' folgt der Photozyklus der Wildtyp-Reaktion mit PCET, über ein anionisches und neutrales Semichinon. Die Rotverschiebung der Flavinderivatsabsorption nach P_{red} bleibt aus. Stattdessen ist die Lebensdauer des $FADH^{\bullet}$ Intermediates stark erhöht. Neben diesem Reaktionszyklus deuten die Untersuchungen der Doppelmutante auf W91 als alternativen initialen Elektronendonator hin. Die Präsenz des entstehenden Tryptophanradikals könnte die partielle Rekombination des anionischen Semichinons zum Grundzustand erzeugen. Eine Substitution des W91 gegen Alanin unterdrückt diesen unproduktiven Nebenpfad und steigert die Effizienz der $FADH^{\bullet}$ -Bildung. Da Q50 als zentraler Schlüsselrest für die Konformationseinnahme des inaktiven Grundzustandes benötigt wird, ist der Zustand P' der Glutamin-Mutanten nicht mit P des Wildtyps gleich zu setzen.

IV.4 Mechanismen zur Modulation der Dunkelrelaxation von PixD

Die genauen Vorgänge bei der thermalen Dunkelrelaxation der BLUF-Domäne sind weitestgehend unklar. Hasegawa *et al.*, 2005 teilten die Dunkeladaptation von PixD in drei Teilprozesse ein, von denen jeder den Rückgang charakteristischer IR-Absorptionsbanden zwischen 1000 - 1800 oder 2700 - 3100 cm^{-1} beschreibt. Demnach beginnt die Relaxation an der $\nu(C4O4)$ mit einer Halbwertszeit von 1,5 min bei 15 °C, gefolgt von weiteren Oszillationen des Isoalloxazinringes III, den Amid I Signalen und CH-Streckschwingungen ($t_{1/2} \sim 2,4$ min), während zuletzt Signaturen von SH-Bindungen abklingen ($t_{1/2} \sim 4,5$ min) (Hasegawa *et al.*, 2005).

Aufgrund des Verlustes der Intensität von Absorptionsbanden ohne auftretende Verschiebungen schlossen sie außerdem die Entstehung von Intermediaten aus, womit der Signalzustand direkt in den Grundzustand zerfiel. Dabei unterliegt der geschwindigkeitsbestimmende Relaxationsschritt in D_2O einem kinetischen Isotopeneffekt. Gil *et al.*, 2016 beobachten eine dramatisch beschleunigte Dunkelrückkehr der AppA-BLUF Domäne, wenn diese Fluorotyrosin enthält. Das soll auf den saureren Charakter des Aminosäure-Analogs zurückgehen, der einen Protonentransfer von Y8 auf das Q50 verstärkt. Infolgedessen würde ein putatives Equilibrium der Amid-Imidsäure-Tautomere im Lichtzustand zu Gunsten der Glutamin-Imidsäure verschoben und nach einer Rotation die Rückkehr zum Grundzustand eingeleitet (Gil *et al.*, 2016).

Wirkung von Imidazol auf PixD-Mutanten

Auf Protonierungsreaktionen weist auch die lineare Korrelation von Erholungsgeschwindigkeit und Imidazolkonzentration für AppA hin, wobei dessen neutrale Form als Katalysator wirkt (Laan *et al.*, 2006). Diese Eigenschaft wird für spektroskopische Untersuchungen von AppA genutzt, da dessen Photozyklus mit einer Zeitkonstante von bis zu 17 min sonst schlecht zugänglich bleibt (Majerus *et al.*, 2007). Der Imidazoleffekt ist allerdings weitestgehend unverstanden.

Gegenüber AppA war für den PixD-WT auch in Gegenwart hoher Imidazolkonzentrationen keine Beschleunigung der Dunkelrückkehr zu beobachten (Abb. III-22). Auch unter den LOV-Domänen existieren Vertreter, die keine Sensitivität gegenüber Imidazol aufweisen. Hier wurde der Befund auf strukturelle Unterschiede oder die Präsenz einer intrinsischen Base zurückgeführt (El-Arab *et al.*, 2015). Dies könnte ebenfalls auf die BLUF-Photorezeptoren zutreffen, wie Mutationen im β -Faltblatt andeuten. So wiesen die H73-Mutanten von PixD wie AppA eine Sensitivität gegenüber Imidazol auf (Abb. III-22). Sie setzte allerdings erst ab rund 50 mM ein und fiel deutlich geringer aus. Bei RT konnte mit einer Imidazol-Konzentration bis 500 mM die Geschwindigkeit des Wildtyps nicht erreicht werden (Abb. III-22.C). H73 ist nahe der Dimerisierungsstelle an den β -Faltblättern zweier Monomere lokalisiert, zeigt aber in der Röntgenstruktur des decameren Komplexes nach außen (Yuan *et al.*, 2006). Es existieren daher keine Hinweise für einen Lösungsmittelausschluss in seiner Umgebung. Die ausbleibenden Rettungen der H73-Mutationen durch 500 mM Imidazol oder bis zu 180 mM L-Histidin für PixD (Abb. III-22.D) lassen darauf schließen, dass Imidazol das substituierte Histidin nicht ersetzt. Stattdessen wirkt es vermutlich innerhalb der Domäne in einer Pore, die für L-Histidin nicht zugänglich ist. Analog zu den Studien von Alexandre *et al.*, 2007 ließe sich diese Hypothese durch die partielle Entfaltung in Gegenwart von Guanidinhydrochlorid überprüfen. Trotz des notwendigen Eindringens in den Proteinkern hat das Molekül im Gegensatz zu den bisherigen Imidazolexperimenten allerdings keinen katalytischen Effekt in den H73-Mutanten, da unter gleichzeitiger Erhöhung von Temperatur und Imidazolkonzentration eine weitere Abnahme der Aktivierungsenergie E_A und Beschleunigung der Dunkeladaptation zu erwarten wäre. Aus den entsprechenden Messungen für PixD-H73A und H73S ging jedoch eine Zunahme von E_A hervor (Abb. III-22.F, Abb. IV-9).

IV. Diskussion

Schwach waren diese Auswirkungen auch für den Wildtyp erkennbar und deuten eher auf die von Alexandre *et al.*, 2007 angeführte Zerstörung nicht-kovalenter Bindungen, infolge derer die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur destabilisiert würde, und/oder eine Interferenz mit dem Flavin-umgebenden Netzwerk hin. Unterstützt wird diese Annahme durch eine zunehmende Aktivierungsenergie der H73-Mutanten bei steigender Imidazolkonzentration (Anhang, Abb. V-15). Genauere Aussagen können zukünftig zeitaufgelöste Untersuchungen liefern.

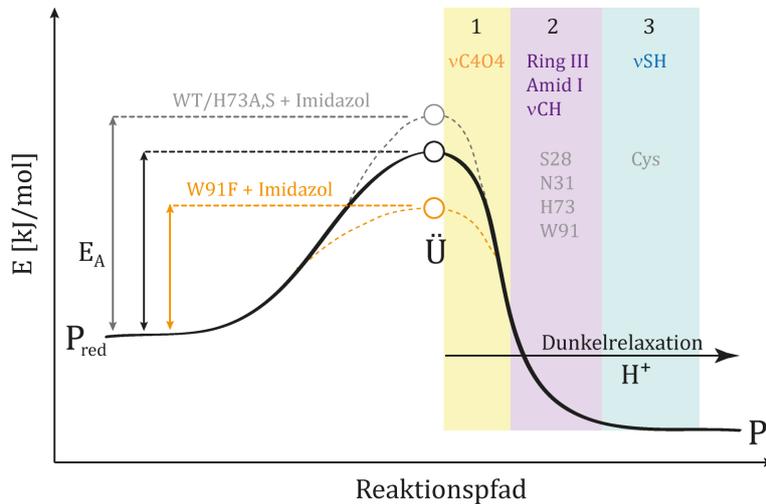


Abb. IV-9 – Dunkelrelaxation von PixD

Der Prozess wurde von Hasegawa *et al.*, 2005 in drei Teilschritte untergliedert. Ausgehend von der $\nu(C404)$ klingen Protein-assoziierte Oszillationen ab, denen bekannte, geschwindigkeits-regulierende Reste zugeordnet wurden. Erwartungsgemäß zeigt ein H_2O/D_2O -Austausch an, dass bei der Rückbildung Protonentransfers oder eine Umordnung von Wasserstoffbrücken stattfinden. Die zu überwindende Aktivierungsenergie wird von Imidazol beeinflusst, wobei Substitutionsmutationen dessen Effekt modulieren.

Vollkommen anders war der Befund bei W91F-Substitution. Hier beschleunigte Imidazol die Wiederherstellung des Grundzustandes mit hoher Sensitivität und wirkte auch bei Temperaturanstieg katalytisch (Abb. III-23, Abb. IV-9). Während Laan *et al.*, 2006 für AppA einen Einfluss auf die Proteinoberfläche annehmen, kann dies anhand fehlender Sensitivität gegenüber L-Histidin bei PixD ausgeschlossen werden (Abb. III-23.D). Die vorliegenden Ergebnisse zeigten damit zwei Wirkungsmechanismen von Imidazol, die von einer Diffusion in die Kerndomäne und einer Variation der Aktivierungsenergie abhängen. Ein allgemeingültiges Reaktionsmodell des Imidazols, wie die von Gil *et al.*, 2016 vorgeschlagene Übernahme des Q50-Enol-Protons, ist damit ausgeschlossen. Das Modell würde aber der Säure-Base-Katalyse in der W91F-Mutante entsprechen, die möglicherweise durch neue Wege in das Proteininnere ermöglicht wird. NMR-Strukturen könnten ein klareres Bild der Sekundärstrukturänderungen in PixD-W91F liefern und so weiteren Aufschluss über Stabilisierungsmechanismen für den Signalzustand liefern.

Einfluss beschleunigender Substitutionen auf die Flavinbindetasche und Sekundärstrukturen

Neben dem Einfluss freier Protonen sind aus Mutationsstudien verschiedene Reste bekannt, welche Stabilitätsunterschiede des P_{red} durch Änderung des Flavinredoxpotenziales oder der

Proteinstruktur erzeugen (Abb. IV-10). Sie konzentrieren sich vorrangig in der α 1-Helix und der β 4 β 5-Schleife und umfassen nach bisherigen Kenntnissen die Chromophor-koordinierenden Reste S28 und N31 sowie W91 und M93 (Abb. IV-10) (Yuan *et al.*, 2011; Mathes *et al.*, 2012). Aus Untersuchungen von BlrB, AppA, SnfB aus *Stenotrophomonas sp.* und TePixD ist zusätzlich ein Einfluss der Reste 27, 32, 66, 71 und 90 (PixD-Zählung) bekannt (Kita *et al.*, 2005; Zirak *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008; Tanwar *et al.*, 2016).

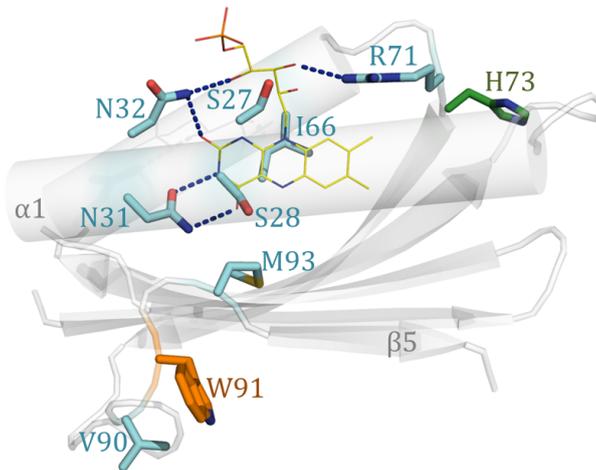


Abb. IV-10 – Geschwindigkeitsregulierende Aminosäuren der BLUF-Domänen

Bisherige Mutagenesen identifizieren vor allem Reste der α 1-Helix und des β 5-Stranges, die Einfluss auf die Geschwindigkeit des Photozyklus nehmen. Die meisten sind direkt in das Wasserstoffbrückennetzwerk um den Chromophor eingebunden. Eine Ausnahme bilden W91 und H73 auf den Endsträngen des β -Faltblattes und V90. PyMOL, Monomer A des PDB Eintrages 2HFN (Yuan *et al.*, 2006)

Die Substitution von W91 und S28 gegen Alanin erzeugt PixD-Proteine mit beschleunigter Dunkelrückkehr (Mathes, 2008), deren LmD-Differenzspektren zwei interessante Parallelen aufweisen. So induzierten beide Mutationen eine ähnliche Gesamtfrequenzminderung der $\nu(\text{C4O4})$ um 16 cm^{-1} (Tab. IV-C). Des Weiteren teilen sie eine ausgeprägte Schulter bei $(+)$ 1675/1678 cm^{-1} , die mit der Verschiebung der Dunkelzustandsschwingung bei 1670 cm^{-1} erschien (Abb. III-17). Die Frequenzverringerung könnte sowohl Wasserstoffbrückenänderungen in der Flavinbindetasche als auch in Sekundärstrukturen anzeigen. Ersteres würde einen indirekten Einfluss auf die Bindung des Flavins anzeigen, die den Dunkelzustand stabilisiert und damit das Gleichgewicht zugunsten der inaktiven Konformation verschiebt. Eine Zuordnung der $(-)$ 1670 Bande zum W91-Proteinrückgrat (Abschnitt III.2.3) und die damit einhergehende starke Verringerung der Signalverschiebung des putativen Bandenpaares $(-)$ 1670/ $(+)$ 1631 in der Serin-Mutante (Tab. IV-C) könnte eine bestehende Vernetzung des β 5-Stranges mit der α 1-Helix unterstützen. Sie ginge nur in der S28A-Mutante verloren und würde eine gegenüber dem Wildtyp weniger starre Lichtzustandskonformation erzeugen, die eventuell für die *in vitro* gefundene Verringerung der Dunkelaktivität von bPAC-S27A um etwa 40 % verantwortlich ist (Stierl, 2013). In der Umgebung von S28 und W91 gehen aus der Kristallstruktur mögliche Interaktionen zwischen der α 1-Helix und dem β 5-Strang über Wasserstoffbrücken zwischen N32-S92 und/oder Q29-M93 hervor (Yuan *et al.*, 2006) (Abb. IV-6). Jedoch können weder für Serine noch Methionine veränderte Schwingungsfrequenzen aus der *Fingerprint* Region des S28A-Spektrums abgeleitet werden (Anhang Tab. V-K).

IV. Diskussion

Auch die potenziellen E53-Signaturen blieben darin unbeeinflusst (Anhang Tab. V-J), womit eine Erstreckung struktureller Änderungen der S28A-Mutation in die $\beta_4\beta_5$ -Schleife unwahrscheinlich ist. Ob es ein Cluster schneller BLUF-Varianten gibt, welches die Frequenzminderung des Dunkelzustandssignals um 1670 cm^{-1} teilt, muss in zukünftigen Experimenten untersucht werden. Auffällig ist, dass sie auch im FT-IR Spektrum des schnell relaxierenden TePixD-N32A auftritt (Okajima *et al.*, 2006).

Tab. IV-C – Vergleich der Schwingungsänderungen des Flavin-C4-Carbonyls sowie der Amid I und II Banden in den untersuchten Mutanten von PixD

Die ausgewählten Bandenpaare reflektieren strukturelle Auswirkungen der Substitutionen und heben die beiden Alanin-Mutanten deutlich von der wildtypähnlicheren W91F-Variante ab (grau unterlegt). Interessanterweise nimmt die S28A-Substitution am stärksten Einfluss auf die putativ dem β_5 -Strang zugeordneten Banden bei 1670 und 1631 cm^{-1} , obwohl die Zerfallsbeschleunigung der spektralen Rotverschiebung langsamer ausfällt als für PixD-W91A und diese Mutation die Aktivität von bPAC nicht verändert (Stierl *et al.*, 2014).

Signalpaar	Zuordnung	Gesamtverschiebung Δ [cm^{-1}]			
		WT	W91F	W91A	S28A
(-)1712/(+)1693	Flavin C4O4	19	20	16	16
(-)1670/(+)1631	β_5 -Strang	39	41	41	30
(-)1642/(+)1653	α -Helices	11	11	14	12
(-)1610/(+)1623	β -Stränge	13	13	15	11
(-)1516/(+)1531	CN-Schwingungen α -Helices/ β -Strängen	15	13	13	15

Neben Gemeinsamkeiten wiesen die FT-IR Differenzspektren der W91A- und S28A-Mutante auf jeweilige Besonderheiten hin. So war die Gesamtfrequenzerhöhung von putativen, α -helikalen Rückgratschwingungen, insbesondere aufgrund starker Verschiebungen im Dunkelzustand, durch die W91A-Mutation erhöht (Tab. IV-C, Anhang Tab. V-I). Dies sollte indirekt, beispielsweise durch Veränderungen im hydrophoben *Interface* zu α_3 und α_4 oder eine Wasserstoffbrückenverbindung zwischen S92 zu N32, geschehen. Tatsächlich ließen sich einige Signalverschiebungen in den W91-Mutanten Schwingungsfrequenzen von Serin zuordnen, die in PixD-S28A unbeeinflusst bleiben (Anhang Tab. V-K) und damit eher von S92 stammen könnten. Im Gegensatz zu einem W91A-Austausch, ist bei der analogen Mutation des S28 eine direkte Auswirkung auf Schwingungen der α_1 -Helix denkbar. Diese Aminosäure nimmt in der Kristallstruktur unterschiedliche Konformationen ein (Yuan *et al.*, 2006) (Abb. IV-11). Dabei kann S28 durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zum Rückgrat an L25 oder I24, ähnlich der Präsenz von Prolin, die Strukturaltung in helikalen Elementen schwächen (Barnes & Gray, 2003). Oder es unterstützt die Bindung des Chromophor durch Wasserstoffbrücken zu den Heteroatomen des Isoalloxazinringes (Abb. IV-11).

Theoretisch sollte eine Austausch des S28 gegen den Helixbildner Alanin (Pace & Scholtz, 1998) die Sekundärstruktur stärken. Eine genauere Vorhersage muss jedoch den Peptidaufbau und die Lage des Alanins berücksichtigen, sodass Effekte unter Umständen nur marginal bleiben (Chakrabarty *et al.*, 1991).

Ein Beispiel bildet etwa das Influenza Fusionspeptid, in dem Alanin-Substitutionen im Glycin-Zipper eine Strukturschwächung mit Frequenzerhöhung der IR-Banden um $14 - 30 \text{ cm}^{-1}$ verursachen. Ein Tryptophan-Alanin Austausch bewirkt dagegen eine schwache Frequenzminderung der Helixsignaturen um 2 cm^{-1} (Lousa *et al.*, 2016). Neben intramolekularen Einflüssen erhöht auch ein Verlust von Wasserstoffbrücken an Sekundärstrukturen die Rückgratschwingungen (Torii *et al.*, 1998).

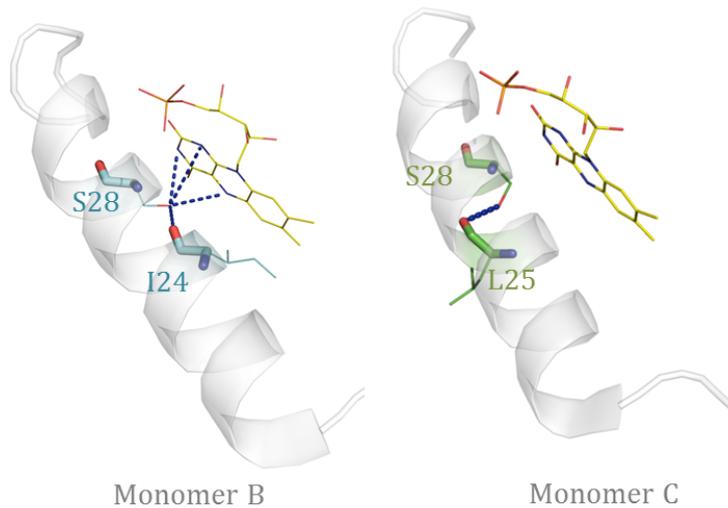


Abb. IV-11 – Konformationen des S28 in PixD

Die Seitenkette dieses Restes kann in Richtung des Flavins ausgerichtet sein, wobei zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zu der Hauptkette von I24 möglich ist. In anderen Monomeren weist die Hydroxygruppe dagegen nach außen (nicht gezeigt) oder könnte die Wasserstoffbrücken am Rückgrat von L25 stören. Monomer A, PDB-Eintrag 2HFN, Yuan *et al.*, 2006, PyMOL, Abstände zwischen $2,8 - 3,8 \text{ \AA}$

Tatsächlich nahm die 1642 cm^{-1} Frequenz bei S28A-Substitution um 3 cm^{-1} ab, was der postulierten Bindung zwischen S28-OH O=C-Ile24 widerspräche (Kita *et al.*, 2005) (Abb. III-17, Anhang Tab. V-I). Die zugehörige Bande des Lichtzustandes war ebenfalls um -2 cm^{-1} verschoben und erzeugte daher eine WT-ähnliche Gesamtfrequenzerhöhung. Dies stünde zudem entgegen der vermuteten Umlagerung des Restes, bei der S41 (nach AppA-Zählung) abhängig von der Position des W104, zwei definierte Orientierungen mit Wasserstoffbrücken zu N45 und W104 oder einer Wasserstoffbrücke zu I37 einnahme (Götze & Saalfrank, 2009). Diese Konformationsänderung solle zugleich 50 % der 10 nm Rotverschiebung der UV/*vis*-Absorption durch Belichtung erklären (Götze & Saalfrank, 2009). Sie kann jedoch nicht für die Frequenzverschiebung von $(-)$ 1642 auf $(+)$ 1653 verantwortlich sein, die in der S28A-Mutante weitestgehend unbeeinflusst bleibt. Die Frequenzerhöhung der Rückgratschwingungen muss entsprechend mit der Umlagerung anderer Aminosäuren verknüpft sein.

Ein weiterer Unterschied betraf die Auswirkungen der beschleunigenden Mutationen auf die Schwingungen des Chromophors. So schien die S28A-Substitution im Dunkelzustand eine Frequenzminderung des Flavin-C4-Carbonyls sowie Wasserstoffbrückenänderungen an N5 und N3 zu verursachen, die mit der 15 nm Rotverschiebung des Absorptionsspektrums (Mathes, 2008; Bonetti *et al.*, 2009) korrelieren würden (Abb. III-17, Anhang Tab. V-I). Im Lichtzustand der S28A-Mutante könnten putative N3 und/oder N1-Bindungen bei niedrigeren Frequenzen absorbieren, (Abb. III-17, Tab. IV-B), wohingegen die Schwingungsfrequenzen von C4O4 ähnlich dem Wildtyp blieb (Abb. III-17, Anhang Tab. V-I). Diese Beobachtung impliziert eine lichtinduzierte Änderung der Interaktion mit dem Flavin in PixD-S28A, bei der offenbar die bathochrome Verschiebung der UV/*vis*-Absorption erhalten bleibt.

IV. Diskussion

Fraglich ist, ob S28 tatsächlich selbst im Kontakt zu dem Isoalloxazinring steht, da sich dessen Schwingungsfrequenzen in diesem Fall durch die Alanin-Substitution hätten erhöhen müssen. Damit kann die Theorie von Götze und Saalfrank, 2009 nicht ausgeschlossen werden, der zufolge bei einem S28A-Austausch eine stärkere Delokalisation und damit verbundene Senkung der am S₁-Übergang beteiligten Orbitale aufträte.

Anders als eine S28A-Substitution induziert W91A nur schwache Verschiebungen des UV/vis-Spektrums um 1-2 nm zu höheren (z.B. bPAC und PixD-W91A) oder niedrigeren Wellenlängen (z.B. AppA-W104A) (Masuda *et al.*, 2005a; Mathes, 2008; Stierl, 2013) und zeigt dennoch Veränderungen des Wasserstoffbrückennetzwerkes um den Kofaktor (Masuda *et al.*, 2008). Die hier vorgestellten Analysen wiesen darauf hin, dass die Chromophorkoordination im Grundzustand wildtypähnlich bleibt, mit geringfügig stärkeren Wasserstoffbrückenbindung des Flavin-N3H und möglicherweise des C4-Carbonyls (Abb. III-15, Anhang Tab. V-I). Im Lichtzustand kommt es jedoch zu stärkeren Frequenzerhöhungen des Kofaktors, die in Übereinstimmung mit dem beschleunigten Abklingen von P_{red} (Mathes, 2008; Masuda *et al.*, 2008) von der Flavin-C4O4-Bindung ausgehen (Abb. III-15, Anhang Tab. V-I).

Parallelen zwischen dem erstmalig gezeigten PixD-S28A FT-IR Spektrum und denen der W91-Mutanten könnten eine Wasserstoffbrückenvernetzung unter dem β5-Strang und der aufliegenden α1-Helix, oder einen Einfluss beider Reste auf die Positionierung von Q50, andeuten. Die strukturelle Bedeutung des S28 würde sich vermutlich in einem entscheidenden Beitrag zur Flexibilität der α1-Helix begründen, die in PixD, als einzige BLUF-Domäne, den Helixbrecher Prolin beinhaltet (Abb. I-2). Auch die Beschleunigung der Dunkelrelaxation in BlrB-A28I und -A28T (S27 in PixD) um etwa 50 % (Wu *et al.*, 2008) unterstützt den möglichen Einfluss der Helixstabilität auf den Zerfall von P_{red}. In diesem Zusammenhang steht möglicherweise auch der leichte Einfluss von Position 28 auf die Kofaktor-Selektivität (Mathes, 2008), der mit einer indirekten Ausrichtung der Seitenketten von R30 und/oder N31 korrelieren könnte. Um eine Einbindung von S28 in das Wasserstoffbrückennetzwerk um den Kofaktor und eine mögliche Vernetzung von α1-Helix und β5-Strang näher zu untersuchen, kann zunächst das LmD-Differenzspektrum von PixD-N31A auf Ähnlichkeiten geprüft werden. Die zielgerichtete Analyse von Seitenketteninteraktionen des S28 ist aufgrund der Häufigkeit dieser Aminosäure und dem benachbarten S27 erschwert. Hier wäre eine kombinierte Studie von Mutanten und Reste-spezifischen Markierungen nötig, um die Herkunft von Serinschwingungen aufzuschlüsseln.

Stabilisierung des Lichtzustandes durch Mutationen im β-Faltblatt

Wie für PixD-W91A zeigen die Frequenzverringerungen im LmD-Spektrum der W91F-Mutante eine stärkere Koordination des Isoalloxazinringes an N3H in beiden Proteinkonformationen, wobei N1/N10 und C4O4 wahrscheinlich über Schwingungskopplung indirekt betroffen sind. Es ist anzunehmen, dass die Umstrukturierungen in der Flavinbindetasche und die veränderten Rückgratschwingungen der W91-Varianten indirekt, durch eine neue Ausrichtung benachbarter Seitenketten zustande kommen.

Neben Q50 können dessen postulierter Bindungspartner M93 sowie Reste der unmittelbaren Umgebung von W91 (S92, Q94, R86, N87, F88) und E53 Schwingungsänderungen betroffen sein (Abb. IV-12). Eine Verbindung zum Flavin-N3H wird hierbei möglicherweise durch S92 hergestellt, welches in der Kristallstruktur von PixD mit seiner Hauptkette die Amid-Gruppe des N32 fixiert (Yuan *et al.*, 2006) und auf diese Weise dessen Abstand zu N3H bestimmen könnte (Abb. IV-12.A). Ein vergleichbarer Mechanismus ist auch für die Bindung zwischen Q50 und N5 denkbar. Dabei limitieren unter anderem M93 und L41 die Bewegungsfreiheit des Glutamins. E53 und die Aminosäuren 86-88 sind in der Kristallstruktur an der Stabilisierung der $\beta_4\beta_5$ -Schleife beteiligt und könnten durch die veränderten Rückgratinteraktionen um Position 91 beeinflusst werden (Abb. IV-12.B). Aus einem Vergleich von Signalverschiebungen der *Fingerprint Region* in den Spektren der W91-Mutanten ließ sich eine höhere Wahrscheinlichkeit für strukturelle Änderungen an E53, S92, M93 und Q94 ableiten (Abb. IV-4, Anhang Tab. V-J, Tab. V-K). Es kann außerdem eine stärkere Wasserstoffbrückenkoordination der E53-Seitenkette in P_{red} angenommen werden, die möglicherweise mit einer von den Amid I und Amid II Banden reflektierten Schwächung der Rückgratschwingungen von Schleifenregionen einhergeht (Abb. III-15, Anhang Tab. V-I).

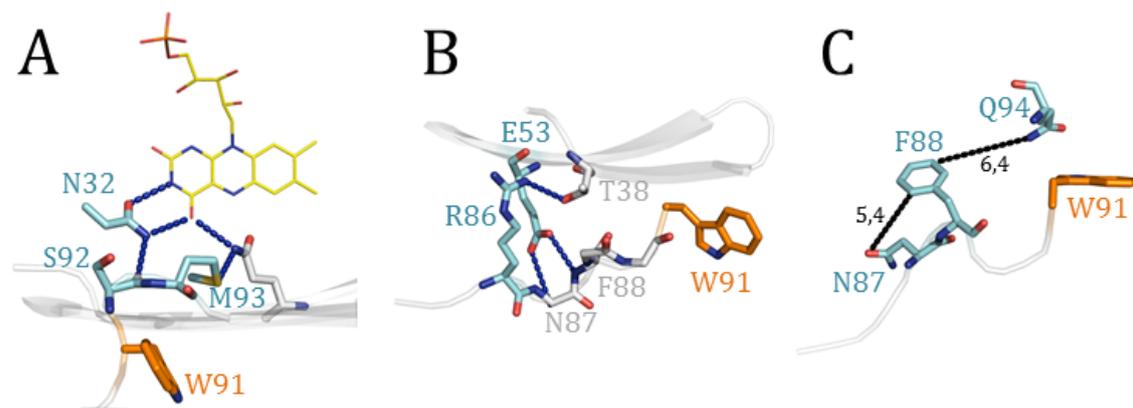


Abb. IV-12 – Putative Ursprünge der in W91-Mutanten verschobenen Differenzsignale

A) Die Verbindungen der $\beta_4\beta_5$ -Schleife reichen über Wasserstoffbrücken in die Flavinbindetasche hinein und hinauf in die α_1 -Helix. Besonders dieses Netzwerk erklärt die Auswirkungen der W91-Mutationen auf das LmD-Differenzspektrum. B) Von essentieller Bedeutung kann auch die Interaktion mit den β -Faltblattsträngen 2 und 3 sein. Sie wird durch eine erhöhte Flexibilität in der Schleifenregion möglicherweise erleichtert, wobei sich die Sekundärstruktur an das unstrukturierte Rückgrat annähert. C) In die Schleife ist das F88 eingebunden, das ebenso wie F91 bei W91F-Substitution vermutlich Signale im Differenzspektrum erzeugt und dafür aromatische Wechselwirkungen eingehen sollte. Hierfür kämen putativ N87 und F88 in Frage. Monomer A, PDB-Eintrag 2HFN, Yuan *et al.* 2006. PyMOL, Abstände in Ångström

Die FT-IR Spektren der W91F- und W91A-Varianten deuten daraufhin, dass die sperrige Sterik der Seitenkette für die Dynamik der Dunkelrelaxation entscheidend ist wie bereits Dragnea *et al.*, 2009 formulieren. Da Phenylalanin wichtige Eigenschaften mit Tryptophan teilt, induzierte eine W91F-Substitution vergleichsweise wenige, definierte Frequenzänderungen (Abb. III-15), wie auch Gauden *et al.*, 2007 in zeitaufgelösten IR- und NMR NOESY Messungen an AppA-W104F beobachten. Hingegen hat eine zu starke Reduktion der Seitenkette, wie sie in W91A auftritt, globalere Auswirkungen auf die Proteinstruktur (Abb. III-15).

Neben ihrer sterischen Eigenschaften unterscheiden sich Alanin und Phenylalanin auch in der favorisierten Ausrichtung. So kommen die Seitenketten aromatischer Aminosäuren in allen β -Faltungen zumeist exponiert vor, wohingegen diese Position für Alanin vermieden wird und hochgradig ungünstig scheint (Fujiwara *et al.*, 2012). Dennoch vermitteln beide Mutationen vermutlich eine größere Flexibilität am Beginn des β 5-Stranges, so dass Stärke oder Anzahl der Wasserstoffbrücken im Proteinrückgrat zunehmen und eine Frequenzminderung der $C\alpha C=O$ -Schwingungen bewirkten (Abb. III-15).

Ohne eine Identifizierung der Schwingungsbanden kann über die genauen Effekte der Mutationen nur spekuliert werden. Offenbar ersetzt Phenylalanin die Interaktionen von Tryptophan zum großen Teil, ändert durch das kleinere Ringsystem aber die Koordinierung der Sekundärstrukturelemente und verschiebt das Gleichgewicht daher zu Gunsten des Lichtzustandes. Dagegen könnte sich PixD-W91A durch eine globalere, strukturelle Änderung auszeichnen, die sich bis in die Chromophorbindetasche erstreckt und auf diese Weise die Oligomerisierung, die Dunkelaktivität und die Tertiärstruktur beeinflusst (Metz *et al.*, 2010; Brosi, 2013; Stierl *et al.*, 2014). Möglicherweise verstärkt die erhöhte Flexibilität der β 4 β 5-Schleife aufgrund einer Alanin-Substitution die Interaktion der Sekundärstrukturen, erzeugt aber einen energetisch ungünstigen Signalzustand oder reduziert eine Energiebarriere bei der Dunkelrückkehr. In diesem Zusammenhang sind vermutlich die zwei reinen Proteinschwingungen bei (-)1101 und (-)1463 cm^{-1} bedeutsam, die von Resten des β -Faltblattes oder der β 4 β 5-Schleife verursacht werden könnten (Tab. V-J, Tab. V-K). Letztere erfuhr bei W91F-Substitution eine starke Frequenzminderung um 10 cm^{-1} , wohingegen das Signal bei 1101 cm^{-1} eine signifikante Verschiebung im Spektrum der W91A-Variante zeigte. Entgegen dieser Hypothese wirkte eine Y90A-Mutation (entspricht PixD-V90) in SnfB verlangsamt auf die Dunkelrückkehr (Tanwar *et al.*, 2016), wobei ein Einfluss des Prolin-89 in der β 4 β 5-Schleife dieses BLUF-Proteins nicht ausgeschlossen ist.

Im W91F-Spektrum fiel bei (+)1505 cm^{-1} eine Bande auf (Abb. III-15 g). Sie könnte eine stärker aufgelöste Schulter darstellen, oder eine neue Signatur repräsentieren. Referenzdaten lassen Phenylalanin als Herkunft vermuten (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002; Wolpert & Hellwig, 2006). Passende Schwingungsfrequenzen würden auch die Seitenketten von Arginin, Tyrosin und Histidin verursachen. Diese Aminosäuren können anhand fehlender Verschiebungen in Regionen charakteristischer Signaturen sowie auf Basis der hier gezeigten Histidin- und den Tyrosin-Markierungen von Takahashi *et al.*, 2007 und Mehlhorn *et al.*, 2013 weitestgehend ausgeschlossen werden.

Damit kämen F88 und das substituierte F91 in Frage, deren Seitenketten aromatische Wechselwirkungen eingehen müssten, um im Differenzspektrum sichtbare Frequenzänderungen aufzuweisen. Die Amid-Gruppen von N87 und Q94 liegen als potenzielle Partner für π -NH-Wechselwirkungen in der Röntgenkristallstruktur lösungsmittlexponiert vor und weisen keine Ausrichtung zum Benzylring auf (Yuan *et al.*, 2006) (Abb. IV-12.C). Ihre Konformation kann sich aber durch die eingeführte Mutation geändert haben.

H73 befindet sich in dem Eckstrang $\beta 2$, gegenüber vom $\beta 5$ -Strang (Abb. I-3), und verursacht bei Substitution gegen Alanin oder Serin keine detektierbaren Veränderungen der Sekundärstrukturen oder der Umgebung benachbarter Seitenketten (Abb. III-20). Dies steht im Einklang mit der geringen Konservierung dieser Position, an der allgemein basische und hydrophobe Aminosäuren häufiger vorkommen, wohingegen unpolare und saure Reste seltener vertreten sind. Die eingeführten Mutationen imitieren dabei die Situation in putativen Sequenzen (z.B. *Methylobacterium sp.* 88A, *Desulfococcus deovorans* Hxd3, NCBI Datenbank) in denen Position 73 durch ein Alanin besetzt ist, sowie in AppA und einigen nicht untersuchten Proteinen, die ein Serin tragen. Im Einklang mit den IR-Spektren blieben die UV/*vis*-Absorptionseigenschaften und die Aktivierungsenergie des Wildtyps erhalten (Abb. III-22.A). Demnach lösen Änderungen der Proteinstruktur, die in Dunkel- und Lichtzustand bestehen und dadurch aus dem Differenzspektrum gelöscht werden, oder transiente Prozesse im Bereich der $\alpha 2\beta 4$ -Schleife die verlangsamte Dunkelrückkehr aus (Abb. III-22.B).

Wie W91 befindet sich H73 in größerer Distanz zum Chromophor und übt dennoch Langstreckeneffekte aus, die in LOV-Photorezeptoren unter anderem als Hinweis auf Protonen-Shuttles von der Proteinoberfläche zum π -Kern interpretiert werden (Jentzsch *et al.*, 2009). In einen solchen Prozess ist möglicherweise das strikt konservierte Histidin-72 der BLUF-Domänen involviert, dessen umgebende Reste die Geschwindigkeit der Ladungsleitung bestimmen könnten. Dies muss jedoch in zukünftigen Experimenten überprüft werden. Dafür ist neben einem Einbau von Histidin-Analoga, deren Struktur einen Protonentransfer unterbindet, ein klassischer D_2O -Austausch oder eine Variation von pH-Wert und Puffer möglich. Außerdem könnte der Versuch von Alexandre *et al.* angewandt werden, die eine verlangsamte Dunkelrelaxation durch Blockierung von Histidinen mit Diethyl-Pyrocyanin in der *Avena sativa* Phot-1 LOV2-Domäne erzeugten (Alexandre *et al.*, 2007).

IV.5 Ein aktualisiertes Modell der PixD Photoaktivierung

Unter Verwendung ausgewählter Stämme der CmpX13-Sammlung war erstmals eine detaillierte, systematische Aufschlüsselung von Signalen der Stickstoff- und Kohlenstoff-enthaltenden Bindungen des Chromophors und des Apoproteins im LmD-Differenzspektrum von PixD möglich. Hervorzuheben sind insbesondere die globalen Markierungen der Tryptophane und Histidine, welche erstmals für eine BLUF-Domäne erstellt wurden und in zukünftigen Anwendungen an weiteren Proteinen konservierte Bestandteile der Signaltransduktion dieser Photorezeptorfamilie aufdecken werden. Eine aktualisierte Zuordnung der Signale des Wildtypspektrums ist in Abb. IV-13 gezeigt (siehe auch Tab. IV-B, C, D, E).

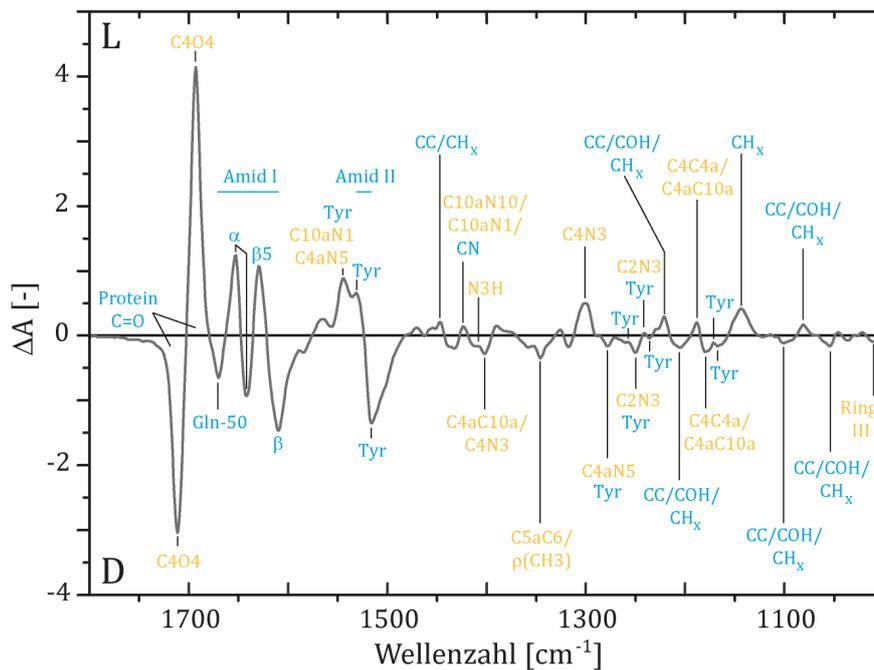


Abb. IV-13 – Änderungen der Bandenzuordnung im LmD-Differenzspektrum von PixD

Im Vergleich zu den bisherigen Signalinterpretationen (Abb. I-9) konnten unter anderem verdeckte Carbonylschwingungen des Apoproteinanteils sichtbar gemacht und die Banden der Amid I Region näher differenziert werden. (-)1516 zeigte keine Beteiligung von Flavinbindungen, sondern repräsentiert eine Amid II Schwingung. Reine Proteinsignale sind auch bei (+)1447 und 1145 cm^{-1} zu finden, die wie der Großteil der niederfrequenten Signale von kohlenstoffhaltigen Bindungen verursacht werden. Außerdem wurden die Signaturen der Isoalloxazinringe II und III näher eingegrenzt. Den Resten Q50 und wahrscheinlich Y8 zugehörige Frequenzen sind zur Vollständigkeit addiert. gelb = Schwingungszuordnungen des Flavin-Chromophors, blau = Schwingungszuordnungen des Apoproteins, X = Methin-/Methylen-/Methylgruppe

Die vorgestellten Ergebnisse stellen weitere Puzzleteile für das Gesamtbild der BLUF-Photoaktivierung zur Verfügung. In Verbindung mit den publizierten Informationen ergibt sich zur Beantwortung der im Vorfeld angeführten, aktuellen Fragestellungen (siehe Seite 20), folgende Zusammenfassung:

Wie sind der Dunkel- und der Signalzustand aufgebaut und welche Aminosäureseitenketten sind am Übergang von P nach P_{red} beteiligt?

Aus den umfassenden FT-IR-Analysen isotonenmarkierter Proben konnten einige sichere Aussagen über die Wasserstoffbrückenkonfiguration um Y8, Q50 sowie dem Chromophor in Dunkel- und Lichtzustand von PixD extrahiert werden. Aus ihnen gehen nur zwei mögliche Konfigurationen des Dunkelzustands hervor, in denen Q50 keine Wasserstoffbrücke zum Flavin-O4 ausbildet (Abb. IV-14). Stattdessen wird das Chromophor, in Übereinstimmung mit der Röntgenkristallstruktur, über Bindungen an N5, C2O2 und N3H koordiniert. Dabei sollte der Grundzustand eine gewisse Variation in der Flavinbindetasche aufweisen, die von diversen Untersuchungen unterstützt wird und für den multiexponentiellen Zerfall des angeregten Zustandes verantwortlich gemacht wird (Goyal & Hammer-Schiffer, 2017).

Die P-Konfiguration A entspricht dem Modell nach Gauden *et al.*, 2006 und Bonetti *et al.*, 2008 und zeigt das strikt konservierte Glutamin im Grundzustand in Wasserstoffbrückenbindung zum Tyr-8, mit der elektrostatisch ungünstigen Zuwendung seines Seitenkettencarbonyls zur Flavin-C4O4 (P-Zustand in Abb. IV-14). Nach Photonenabsorption des Flavins ist ausgehend von dieser P-Konfiguration eine Rotation des Q50 zwingend, um die Kopplung der ^{15}N -Amid-Q-Markierung mit der C4O4-Streckschwingung des Lichtzustandes zu realisieren. Für den entstehenden P_{red} sind dabei die Varianten I und II (Bonetti *et al.*, 2008; Obanayama *et al.*, 2008) konform mit den vorgestellten Ergebnissen. Vorteile gegenüber dem Signalzustandsmodell II sind die günstigere Sterik und die mögliche Interaktion des Q50 mit M93 in P_{red} I (Abb. IV-14). Wäre W91 in die Flavinbindetasche gerichtet, würde es mit Y8 um den Elektronentransfer auf das Flavin konkurrieren. Dadurch sollte eine Herabsetzung der Photozykluseffizienz zu auftreten, wie sie aus den Untersuchungen der Q50A-Mutante hervorging (Fudim *et al.*, 2015). Gleichzeitig unterstützen eine häufigere Exponierung von Tryptophanen in β -Faltblattstrukturen (Fujiwara *et al.*, 2012) und die stark überwiegende Mehrzahl von W_{out} -Konformationen unter den BLUF-Kristallstrukturen eine Auswärtsrichtung des W91. Da seine Seitenkettenschwingungen in Dunkel- und Lichtzustand nahezu unverändert bleiben, erfüllt das Tryptophan in PixD keine Ankerfunktion zur Stabilisierung von P wie Masuda *et al.*, 2007 es aus Untersuchungen an AppA schlossen.

Einige der Resultate deuten jedoch eher auf das Modell B hin, welches auf Amid-Imidsäure-Tautomerisierung des Glutamins basiert (Abb. IV-14). Die Grundzustandskonformation, in der das Glutamin-Seitenkettenamid Interaktionen mit N5 und Met93 eingeht, entspräche dabei den Vorschlägen von Domratcheva *et al.*, 2008; Sadeghian *et al.*, 2008, 2016 und Khrenova *et al.*, 2017. Im Gegensatz zu Reaktion A gewänne M93 hier nach Belichtung konformationelle Freiheit und könnte Sekundärstrukturänderungen im β -Faltblatt erlauben. Die vorliegende Arbeit favorisiert den Übergang von P zu P_{red} I, da FT-IR Simulationen des P_{red} II auch eine Verschiebung der $\nu(\text{C4O4})$ im Grundzustand hervorrufen (Domratcheva *et al.*, 2016), die im Experiment nicht beobachtet wurden. Darüber hinaus müsste der Isotopeneffekt des ^{15}N -Amid-Q über die Wasserstoffbrücken zum Flavin N5 und/oder dem Seitenkettencarboxyl auf die $\nu(\text{C4O4})$ koppeln (Abb. IV-14 P_{red} II), wohingegen eine direkte Interaktion eine sparsamere Erklärung liefert.

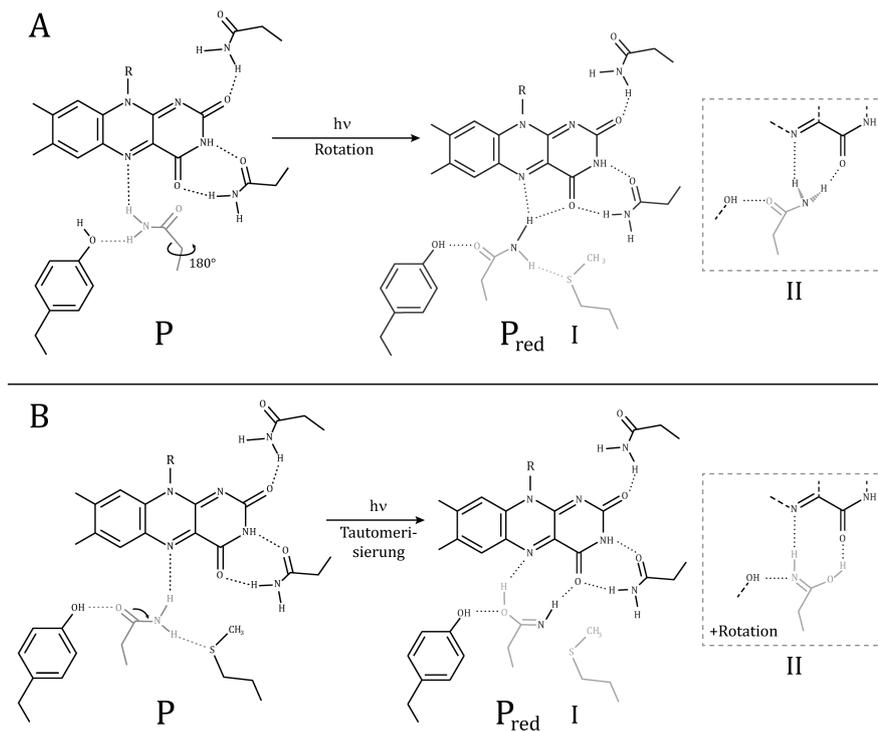


Abb. IV-14 – Mögliche Wasserstoffbrückennetzwerke der Flavinbindetasche im PixD Licht- und Dunkelzustand
 Die gemessenen Schwingungskopplungen zwischen Apoprotein und Flavin weisen daraufhin, dass das Seitenkettenamid im Lichtzustand eine Wasserstoffbrücke zum C4-Carbonyl des Kofaktors bildet, die im Dunkelzustand des Proteins fehlt. Zudem sollte Tyr-8 in P_{red} als Bindungsdonor für Q50 auftreten (Iwata *et al.*, 2011). Nur die gezeigten Übergangsmodelle erfüllen diese Kriterien und erhalten zugleich eine relativ konstante Interaktion von N5. A) I Entspricht dabei der Theorie von Bonetti *et al.* 2008. Experimentell vertretbar wäre auch eine P_{red}-Konstellation wie sie Obanayama *et al.*, 2008 publizierten (II). B) Zeigt das konkurrierende Tautomerisierungsmodell ohne (I) und mit (II) zusätzlicher Rotation von Q50 nach Domratheva *et al.* 2008, 2016.

Der Wasserstoffbrückenstatus des Q50 könnte sich aus der Schwingungsfrequenz schwer abschätzen lassen. So wurden mit Hilfe einer ¹³C-Q-Markierung der Rab Guanosin-tri-Phosphat Hydrolase (GTPase) Rab1b und ihres Aktivators TBC1D20, Glutamin-Carbonylschwingungen bei 1648/1651 cm⁻¹ detektiert. Die Banden sollen von einem Glutamin mit Wasserstoffbrücken am Seitenkettenamid und -carbonyl stammen (Gavriljuk *et al.*, 2012), dessen Schwingungssignatur deutlich unter der hier beobachteten mit 1670 cm⁻¹ liegt. Dies könnte darauf hindeuten, dass Q50 im PixD-Dunkelzustand weniger Wasserstoffbrücken als die Glutamine in Rab1b bildet. Bis diese Ergebnisse näher geprüft und eine Q50-Imidsäure im Lichtzustand experimentell nachgewiesen werden kann, ist vorläufig Modell B dem Modell A vorzuziehen.

Auch für Asparagin einer Cellulase des Basidiomyceten *Phanerochaete chrysosporium* ist eine Amid-Imidsäure-Tautomerisierung bekannt. Sie wurde von Nakamura *et al.*, 2105 mit Hilfe von Neutronenbeugung durch die Kristallstruktur aufgelöst. Weitaus verbreiteter ist Tautomerisierung jedoch unter Liganden (Martin, 2009). Die in Abschnitt IV.2 näher diskutierten Ergebnisse werfen zusätzlich die Frage auf, wie das postulierte Q50-Tautomer in PixD stabilisiert würde. Da die Indolschwingungen des W91 keine Frequenzänderungen erfahren, bleibt der Interaktionsstatus von W91 in PixD nach Belichtung unverändert.

Methionin ist ein reiner Wasserstoffbrücken-Akzeptor (Gregoret *et al.*, 1991). Nach Tautomerisierung könnte Q50 höchstens über eine geteilte Wasserstoffbrücke sowohl mit dem Flavin C4O4 als auch dem M93 interagieren. Da jedoch eine sehr starke Bindung zum C4-Carbonyl des Kofaktors gefunden wurde, ist eine Stabilisierung der Q50-Imidsäure über die nicht-kovalente Interaktion mit M93 unwahrscheinlich. Im Dunkelzustand wäre die Wasserstoffbrücke zwischen Glutamin und Methionin maßgeblich für die Aktivitätsänderungen von Q50-Mutanten (Masuda *et al.*, 2007; Dragnea *et al.*, 2010) verantwortlich, wie auch die erhöhte Dunkelaktivität mit geringfügiger Aktivitätssteigerung bei Belichtung von bPAC- Q49A und -M92A (Stierl, 2013) andeutet. Konsistent dazu fanden Khrenova *et al.*, 2011 in MD-Simulationen an AppA ausschließlich für die Abstände zwischen Q63 und Flavin-N5/-C4O4, sowie dem Öffnungswinkel der M106 Seitenkette eine deutliche Korrelation. Darauf basierend, entwickelte die Gruppe ein Photozyklus-Modell, in der das strikt konservierte Methionin bei der Rotation der Glutamin-Seitenkette assistiert. Die Phänotypen der Q50-Mutanten könnten demnach indirekt, durch die mutationsbedingte, dauerhafte konformationelle Freiheit des M93 entstehen (Stierl *et al.*, 2014). Weitere Konformationsänderungen in der Flavinbindetasche wurden nicht festgestellt. Speziell die Wasserstoffbrückenbindungen der Asparagine-31 und -32 bleiben gleich, womit eine Annäherung ihrer Seitenketten für die Ausprägung der Rotverschiebung in PixD ausgeschlossen ist. Damit lösen vermutlich allein Interaktionsänderung zwischen Q50 und dem C4-Carbonyl die beobachteten Schwingungsänderungen von Flavinbindungen aus. Unter Umständen wäre auch N5 beteiligt, auch wenn in dieser Arbeit keine Hinweise für starke Wasserstoffbrückenänderungen gefunden wurden. Eine exaktere Definition der Dunkel- und Lichtzustandsorientierungen wird erst aus zukünftigen Experimenten hervorgehen, da insbesondere Wasserstoffbrücken zwischen Q50 und Y8 hier nicht belegt werden konnten.

Wie wird das Signal an die Proteinoberfläche geleitet und anschließend auf den Effektor übertragen?

Abb. IV-15 fasst den hypothetischen Prozess der Signalweiterleitung in PixD schematisch zusammen. In Übereinstimmung mit NMR-spektroskopischen Ergebnissen fährt die intramolekulare Signalweiterleitung entlang des β 5-Stranges fort und bezieht die Reste 91 - 93 ein. Sie manifestiert sich in PixD jedoch nicht in einem Met93/Trp91-*in/out*-Wechsel sondern in Umstrukturierungen der Hauptketteninteraktionen, denen die Frequenz 1631 cm^{-1} zugeordnet werden konnte. Dr. Florian Richter fand in Simulationen eine Konformationsänderung des β -Stranges, welcher der postulierten Eingliederung des W91 in den β 5-Strang durch eine +1-Registerverschiebung der Rückgratanlagerung unter den Strängen β 2 und β 5 nahe kommt. Begleitende Reorientierungen von Aminosäureseitenketten, die in diesem Modell auftraten, müssen jedoch in umfassenderen Simulationen überprüft werden. Speziell eine Verifizierung der möglichen Positionswechsel von M93 und Q94 ist für die Bewertung der Y8-Q50-Flavin-Vernetzung essenziell, da die Q50-Lichtkonfiguration von weiteren Resten der Umgebung stabilisiert werden sollte. Nach Ausschluss einer direkten Beteiligung von W91 übernimmt diese Funktion vermutlich das strikt konservierte M93. Fehlt es, kann keine Stabilisierung der Q50-Konformation erfolgen, was die verkürzte Lebensdauer des Lichtzustandes in der M93A-Mutante (Yuan *et al.*, 2006) erklären könnte.

Ein Abschluss der intramolekularen Signaltransduktion könnte durch Aufbruch von Wasserstoffbrücken oder Umlagerungen hydrophober Seitenketten erfolgen. Dadurch würde eine von Yuan *et al.*, 2011 postulierte, interne Drehung des Ringkomplexes induziert, infolge derer die Quartärstruktur aufgelöst und PixE freigesetzt wird (Abb. IV-15). Wassermoleküle wirken möglicherweise unterstützend auf die Disassemblierung, wie es Hazra *et al.*, 2008 für AppA vorschlagen.

Wie wird der Signalzustand stabilisiert und was geschieht bei der thermalen Dunkelrelaxation?

In Übereinstimmung mit publizierten Ergebnissen zeigte sich die Rigidität des β 5-Stranges als Kernelement der P_{red} -Stabilisierung. Große Flexibilität in dieser Sekundärstruktur, wie sie die W91A-Substitution bildet, nimmt bereits im Grundzustand einen Einfluss auf die Schwingungen des Q50 bei $(-)$ 1670 cm^{-1} , indem die Distanz zu Wasserstoffbrückenpartnern verringert wird. Um welche Reste oder Heteroatome des Isoalloxazinringes es sich dabei genau handelt, ist noch unklar. Neben einer Bindung zu M93, wie im Modell B postuliert (Abb. IV-14), ist auch eine Annäherung des Isoalloxazinringes an den β 3-Strang des Faltblatts denkbar. Sie könnte aus stärkeren Interaktionen zwischen β 5 und α 1 resultieren. Im Vergleich der BLUF-Kristallstrukturen heben sich dafür die Reste N32 und 29 hervor, deren Seitenketten theoretisch mit der Hauptkette des β -Stranges interagieren könnten. Auf eine Beteiligung der α 2-Helix an der Signalzustandsstabilisierung deutet auch die um 3 cm^{-1} verstärkte Gesamtfrequenzerhöhung helikaler Strukturen nach Illumination hin, die in der schnellen Variante PixD-W91A auftritt (Tab. IV-C). Die Relevanz der Integrität des β -Faltblattes zeigt sich ebenfalls in C-terminalen Verkürzungen, die Instabilität, Chromophorverlust, aber auch schneller oder langsamer relaxierende Varianten erzeugen (Wu *et al.*, 2008; Tanwar *et al.*, 2016). Des Weiteren sind Reste im β 4-Strang für die Aufrechterhaltung der aktiven Proteinkonformation entscheidend. Aus den FT-IR-Daten der stabilen PixD-Zustände ließen sich keine Argumente für den von Khrenova *et al.*, 2017 vorgeschlagenen Mechanismus mit Protonenübertragung auf die Q50-Imidsäure *via* Y8 ableiten. Die FT-IR Spektren und UV/*vis*-Analysen der H73-Mutanten unterstützen allerdings das Auftreten von Protonentransfers. Sie wären im PixD-Wildtyp hoch optimiert, würden aber in den Mutanten durch Imidazol gestört.

Der Wirkungskreis von Imidazol befindet sich dabei im Proteinkern. Der Mechanismus mit dem die Dunkelrelaxation beeinflusst wird, ist aber von den strukturellen Auswirkungen der Mutation abhängig, sodass Imidazol einerseits die Aktivierungsenergie anheben oder, als Katalysator fungierend, absenken kann. Bei der Planung weiterer Untersuchungen der thermalen Dunkelrelaxation sollte die physiologische Funktion und die putative Bindestelle für das Effektormolekül einbezogen werden. Zusätzlich sind Einflüsse C-terminaler Verkürzung, der Konzentration von Makromolekülen und der Lichtintensität auf die BLUF-Aktivität bekannt (Schroeder *et al.*, 2008; Toyooka *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2012) und von lokaler Kompartimentierung zu erwarten.

Sind die Prozesse tatsächlich unter den BLUF-Proteinen konserviert?

Abgesehen von den initialen Vorgängen sind die essenziellen Elemente der Photoaktivierung allgemein anerkannt und wurden bisher bei Charakterisierungen neuer BLUF-Proteine bestätigt. Da einige der hier erbrachten Analysen weiterer IR-Differenzsignale Übereinstimmungen zu früheren spektroskopischen Daten und Mutationsstudien zeigen, wird eine grundlegende Basis der BLUF-Photochemie bekräftigt. Abweichende Phänotypen, wie im Beispiel von AppA-W104F und PixD-W91F, können mit der geringen Zahl strikt konservierter Reste in dieser Rezeptorfamilie korrelieren und bedürfen genauerer struktureller Analysen der Mutageneseeffekte. Hierfür bilden die Ergebnisse für PixD-W91F und -S28A, zusammen mit den bereits publizierten Differenzspektren von W91A- und M93A-Mutanten, einen guten Ausgangspunkt. Möglicherweise können mit theoretischen Methoden, wie sie von Afonnikov und Kolchanov entwickelt wurden, Reste identifiziert werden, die Abweichungen von ansonsten hochkonservierten Aminosäuren unter den BLUF-Sensoren kompensieren (Afonnikov & Kolchanov, 2004). Eine strikte Konservierung abwärtsgelegener Elemente scheint hingegen aufgrund der Modulkombinationen von BLUF-Sensoren mit kurzen C- (wie etwa PixD) sowie N-terminalen Erweiterungen (z.B. das nicht näher untersuchte Protein NCBI Ref. WP003463988.1 aus *Pseudomonas pseudoalcaligenes*) oder C-terminal verknüpfter (z.B. AppA) BLUF-Domänen in komplexen Proteinen unwahrscheinlich. Darauf deuten die kürzlich veröffentlichten Kristallstrukturen von OaPAC und bPAC hin, in deren parallel assoziiertem Homodimer die Signalweiterleitung über ein zentrales *coiled coil* Motiv von den BLUF-Domänen zu den C-terminalen Cyclase-Domänen verläuft (Ohki *et al.*, 2016; Lindner *et al.*, 2017). An der Übertragung des Stimulus vom β -Faltblatt auf die C-terminale Helix 3 der BLUF-Domäne soll der β 4-Strang beteiligt sein (Lindner *et al.*, 2017). Ob sich weitere Cluster verwandter Transduktionswege finden, muss in intensiveren Studien an anderen Vertretern überprüft werden. Eine Beteiligung von H72 am Photozyklus eröffnet zumindest eine Theorie für den Zerfall des decameren TePixD-Superkomplexes in zwei Pentamere, da dieser Rest auf dem an der Dimerisierung beteiligten β 4-Strang lokalisiert ist.

IV.6 Perspektiven

Weitere Ziele für Isotopenmarkierungen in BLUF-Domänen

Die hier gezeigten Ergebnisse bieten eine Vielzahl von Anhaltspunkten für weiterführende Analysen, um ein detailliertes Bild des intramolekularen Signaltransportes und der Proteindynamik von BLUF-Domänen zu erhalten. Zukünftige Untersuchungen kritischer Reste sind etwa an artifiziellen Domänen denkbar. Dafür könnte eine BLUF-Domäne konzipiert werden, die außer den strikt-konservierten Resten nur wenige Variationen der Aminosäurekomposition aufweist, um die FT-IR Analysen zu erleichtern und sich aktuellen Fragestellungen weiter zu nähern. Im Fokus stehen vor allem geschwindigkeitsregulierende Faktoren, putative Wassercluster im Proteinkern oder die Mechanismen, welche eine Aktivierung verschiedener Effektoren durch die Photorezeptordomäne ermöglichen (Pudasaini *et al.*, 2015). Hierfür können auch interessante Mutationsphänomene mit den vorgestellten Auxotrophen adressiert werden.

Beispielsweise spielt Phenylalanin in der intramolekularen Signaltransduktion nach bisherigem Verständnis keine Rolle. Diese Aminosäure ist jedoch durch den speziellen Phänotyp der W91F-Substitution von Interesse. Ähnliche Auswirkungen hat eine L66F Substitution in BlrB (R65 in PixD), deren Rückkehrkinetik mit einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 0,72 s bei 25 °C den schnellsten BLUF-Photozyklus erzielt (Wu *et al.*, 2008). Sowohl IR-Spektroskopie als auch NMR-Studien würden von der Isotopenmarkierung der Phenylalanine in diesen Mutanten profitieren, wenn die strukturellen Auswirkungen dieser Substitutionen untersucht werden sollen. Analog zu W91 deuten verschiedene Untersuchungen eine mechanistische Funktion für das benachbarte M93 an. Mutationen dieser Position versetzen BLUF-Domänen in einen konstitutiv aktiven Zustand (Masuda *et al.*, 2008; Stierl, 2013). Im FT-IR Differenzspektrum von Licht- und Dunkelzustand einer PixD-M93A Mutante gehen Signale zwischen 1510 - 1540 cm^{-1} verloren (Masuda *et al.*, 2008). Isotopenmarkierungen in CpX Δ M können dazu beitragen, Methionin als Ursprung dieser Schwingungen zu verifizieren und einen strukturellen Effekt der Mutation auszuschließen.

In einer anderen BLUF-Domäne ist mit Hilfe einer Argininmarkierung auch die Übertragung des Stimulus auf den Effektor adressierbar. So zeigt das kurze BLUF-Protein PapB durch eine R130A Substitution eine gestörte Interaktion mit PapA, was auf eine Kommunikation über Salzbrücken hindeutet (Kanazawa *et al.*, 2010). Diese Art der Bindung ist auch für andere Photorezeptoren, wie etwa AtUVR8 von erwiesener Bedeutung, und könnte durch Isotopenmarkierung ebenfalls eingehender untersucht werden (Christie *et al.*, 2012).

Von den aus Isotopenmarkierungen gewonnenen Erkenntnissen profitieren unter anderem bPAC und PixD, deren Eigenschaften für optogenetische Anwendungen gezielt weiter verbessert und angepasst werden können. Darüber hinaus bieten Kenntnisse über die Akteure eines BLUF-Signalweges und ihrer Interaktion Ansätze für medizinische Strategien. So ermöglicht das verbreitete Vorkommen BLUF-regulierter Virulenz- und Biofilmfaktoren gleichzeitig Optionen für Bekämpfung und Prävention. Aktuelle Strategien zur Bekämpfung von Biofilmen durch Lichtapplikation bedienen sich hingegen Sauerstoffradikale-erzeugender Photosensitizer aus der onkologischen *Photodynamic Therapy* und wirken nur gegen Gram-positive Bakterien effektiv (Hamblin & Hasan, 2004).

Anwendungsbeispiele über die BLUF-Proteine hinaus

Parallelen zwischen der Aktivierung von BLUF und LOV-Domänen werfen die Frage nach der evolutiven Entwicklung der Flavin-bindenden Photorezeptoren und ihrer Signalweiterleitungsmechanismen auf (Losi, 2007). Hierzu zählt die Ausbildung des C4a-Cysteinyladduktes in einer BLUF-Ile66Cys-Mutante. Bei einer analogen Entwicklung beider Proteinfamilien, kann die Herausstellung von Gemeinsamkeiten und Unterschieden, zur Übertragung der teilweise überlegenden Eigenschaften von LOV-Domänen beitragen, aufgrund derer bisher eine größere Anzahl optogenetischer Werkzeuge entwickelt werden konnte (Chapman *et al.*, 2008; Ohlendorf *et al.*, 2012; Strickland *et al.*, 2012; Renicke *et al.*, 2013).

IV. Diskussion

Ziel antibakteriell wirksamer Verbindungen ist auch die FMN-bindende Isopentenyl-di-Phosphat-Isomerase (IDI) *type 2* (de Ruyck *et al.*, 2014). Daneben finden Flavoproteine Verwendung als apoptotische Fluoreszenzmarker (Ranji *et al.*, 2006) und bilden nützliche Protektiva. Berardesca *et al.* konnten etwa zeigen, dass die DNA-Photolyase von *Anacystis nidulans* einen effizienten Zusatz für herkömmliche Sonnencremes darstellt, der die UV-induzierte Entstehung von *Cyclobutane-type Pyrimidine Dimers* (CPD) und apoptotische Vorgänge weiter reduziert (Berardesca *et al.*, 2011). Rationales Proteindesign, basierend auf strukturellen Daten, könnte zur weiteren Optimierung der Proteineigenschaften beitragen. Einen Beitrag dazu könnten unter anderem FT-IR-spektroskopische Untersuchungen liefern (Schleicher *et al.*, 2005; Wijaya *et al.*, 2013). Die, aufgrund der Gegenwart des DNA-Substrates, erschwerte Bandenanalysen würde ebenfalls von der CmpX13-Sammlung profitieren. Gleiches gilt für die Untersuchung der konformationellen Antwort des Apoproteins auf unlängst beschriebene, neuartige Reaktionsmechanismen der Flavine (Leys & Scrutton, 2016). Dazu zählen die in Isotopenmarkierungen gezeigte superoxidierte Flavin-N5-Oxid-Spezies bei der Biosynthese des antibiotisch wirksamen Enterocins durch EncM in *Streptomyces maritimus* (Xiang *et al.*, 2004; Teufel *et al.*, 2015), und die Prenylierung des FMNH₂ Kofaktors der 3-Polyprenyl-4-Hydroxybenzoat Decarboxylase UbiD zur Formierung eines vierten Ringes zwischen N5 und C6 (Jacewicz *et al.*, 2013; Payne *et al.*, 2015).

Interessante Ziele für die Übertragung der Isotopenmarkierung auf membranassoziierte Proteine bilden die A Untereinheit des Komplex II der Atmungskette (Succinat-Dehydrogenase SDHA), die NADPH-Oxidase (gp91^{PHOX}, Cytochrom b₅₅₈) in neutrophilen Granulozyten und die Xenobiotika-oxidierenden Cytochrome-P450 (Rotrosen *et al.*, 1990; Gonzalez, 1992; Remijsen *et al.*, 2011; Renkema *et al.*, 2015). Unter anderem ließe sich die SDHA Arg554Trp Mutation untersuchen, um die Ursache für eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem natürlichen Inhibitor Oxalacetat zu definieren (Bourgeron *et al.*, 1995). Daneben sind Isotopenmuster für Arginine in pathogenen Mutanten der NADPH-Oxidase (Kuhns *et al.*, 2010) zur Klärung des Wirkungsmechanismus ebenso denkbar, wie eine Unterstützung röntgenkristallografischer Ergebnisse für etwa Cytochrom-P450 2B4 Phe220Trp (Shah *et al.*, 2016).

Nicht zuletzt zeigte die vorliegende Arbeit auch eine Anwendungsmöglichkeit der CmpX13-Stämme für Flavin-unabhängige Proteine. Gezeigt wurde es am Beispiel von AtUVR8, das System könnte aber beispielsweise auch auf das mikrobielle Rhodopsin KR2 von *Krokinobacter eikastus* (Inoue *et al.*, 2013) oder CarH (Kutta *et al.*, 2015) übertragen werden, die in *E. coli* exprimierbar sind.

V. Anhang

V.1 Publierte Wachstumsbedingungen Aminosäure-auxotropher *E. coli* Stämme

Aminosäure-auxotrophe Mutanten von *E. coli* sind vielfach publiziert worden. Einige ausgewählte Referenzen sind in Tab. V-A aufgeführt. Sie beinhalten keine systematische Bestimmung des Aminosäureverbrauchs in Relation zum Kohlenstoffangebot, geben jedoch minimalisierte Wachstumsbedingungen wieder. Aus ihnen wurden die entsprechenden Verhältnisse zwischen Aminosäure und Kohlenstoffquelle berechnet, welche gut mit den hier festgestellten Mindestmengen für optimales Wachstum übereinstimmen (Tab. III-A). Stärkere Abweichungen zeigen Arginin, Histidin, Methionin und Phenylalanin (Tab. III-A und Tab. V-A). Wie bereits hervorgehoben kann dies einerseits auf die eher randomisierte Konzentrationswahl zurückgeführt werden. Andererseits addieren einige Autoren dem Medium weitere Zusätze, die eine Reduktion des Verbrauchs der jeweiligen essentiellen Aminosäure zur Folge hat (Novick & Maas, 1961; Bloom *et al.* 1978).

Tab. V-A – Errechneter Verbrauch Aminosäure-auxotropher *E. coli* Mutanten

Angegeben sind die Stammbezeichnungen und die Medienzusammensetzungen, aus denen hier das Verhältnis von Glukose zu Aminosäure errechnet wurde.

Aminosäure	<i>E. coli</i> Stämme	AS-Angebot g pro g Kohlenstoffquelle (w/w)	Medium	Referenz(en)
Arg	ATCC9637 Mutante 160-37	0,02	Davis Minimalmedium mit 0,5 % Natriumlaktat; 100 µg/ml L-Arginin; Anreicherung weiterer Aminosäuren 0,05 – 0,4 µg/ml	Novick & Maas, 1961
Asn	ER	0,025	M9 und M63 Minimalmedium mit 0,4 % Kohlenstoffquelle, 100µg/ml L-Asparagin	Felton <i>et al.</i> , 1980
Gln	Et5000 – Et5003	0,5	W-salts Minimalmedium mit 0,4 % Glukose; 2 mg/ml L-Glutamin; weitere Aminosäuren mit 50 µg/ml)	Bloom <i>et al.</i> , 1978
His	W-74	0,005	Modifiziertes Werkmans Minimalmedium mit 0,2 % Glukose, 10 µg/ml L-Histidin	Shedlovsky & Magasanik, 1962
Met	ATCC9637 Mutante 137-133	1 (0,5)	Davis Minimalmedium mit 2 % Glukose; 20 µg/ml DL- Methionin Racemat	Davis & Mingioli, 1950
Phe	XAC-1	0,14	M9 Minimalmedium mit 0,4 % Glukose; 30 µM L-Phenylalanin	Furter, 1998
Trp/Indol	B/1t7	0,006	Minimalmedium mit 0,16 % Kohlenstoffquelle ; 0,1 % Casein (hydrolysiert)	Newton & Snell, 1962

V.2 Umwandlung von Aminosäuren in *E. coli*

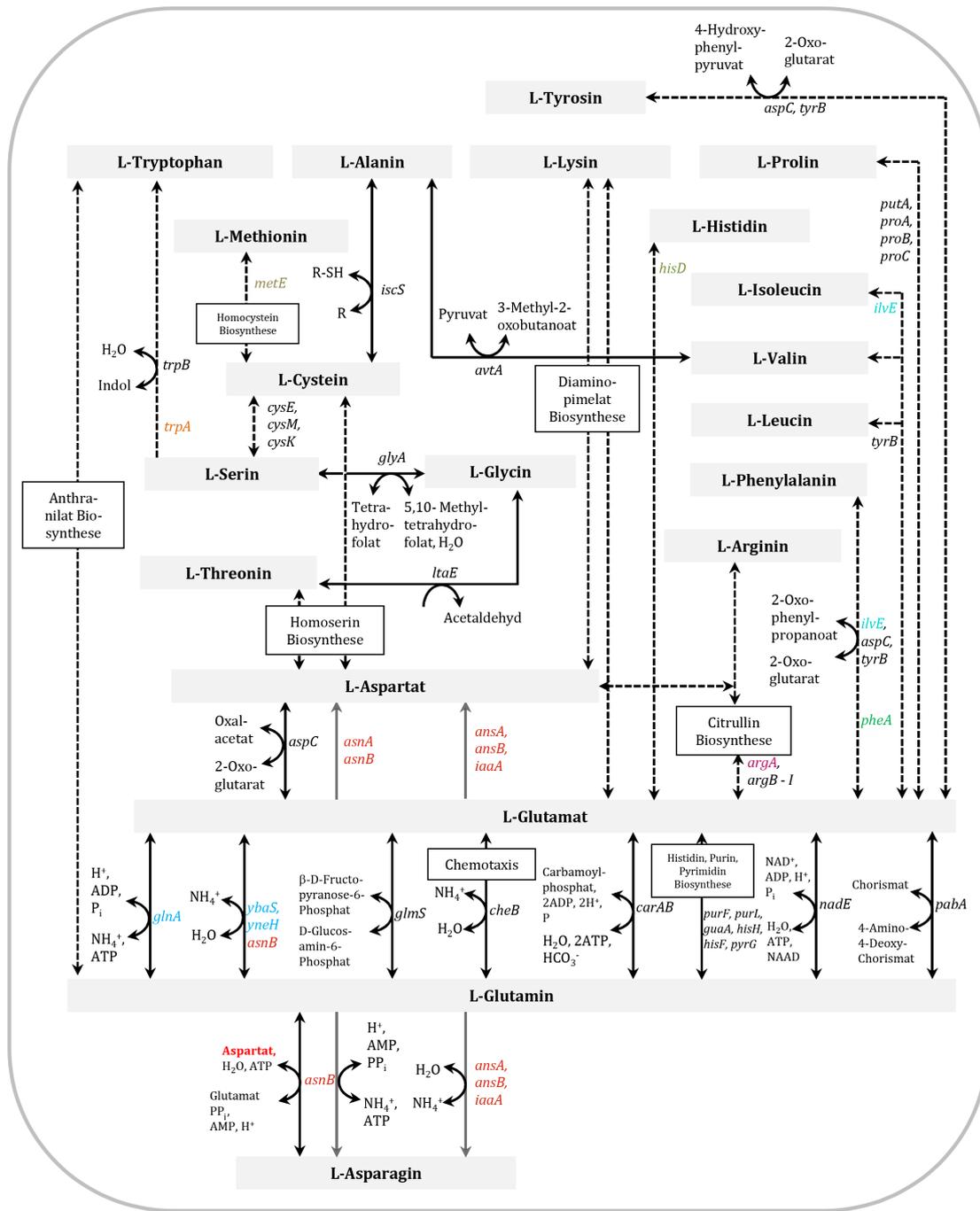


Abb. V-1 – Schematischer Ausschnitt des Umwandlungsnetzwerks proteinogener Aminosäuren in *E. coli*
 Dargestellt sind die katalysierten Reaktionen mit zusätzlichen Edukten und Produkten, sowie die codierenden Gene der beteiligten Enzyme. Mehrstufige Prozesse sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet und in dieser Arbeit deletierte Gene farbig hervorgehoben. Basierend auf Informationen aus Keseler *et al.*, 2013

V.3 Massenspektrometrische Resultate

V.3.1 Isotopenmarkierung des Kofaktors

Die Markierung des inkorporierten RF-Isotopomers wurde nach der Proteinisolation nochmals geprüft. Hierfür wurde das Chromophor wie in Abschnitt II.4.4 beschrieben aus dem Holoprotein extrahiert und von Dr. Sebastian Beck analysiert. Er fand in Übereinstimmung zu früheren Publikationen neben dem natürlichen Kofaktor FAD auch dessen Vorstufen FMN und RF (Mathes, 2008; Schroeder *et al.*, 2008; Penzkofer *et al.*, 2014). Exemplarisch sind die Resultate der Fourier Transformation Massenspektrometrie (FTMS) für Chromophore aus den Proben $^{13}\text{C}_4,10\text{a-RF}$ (Abb. V-2) und ^{15}N -Amid-Q (Abb. V-3) gezeigt.

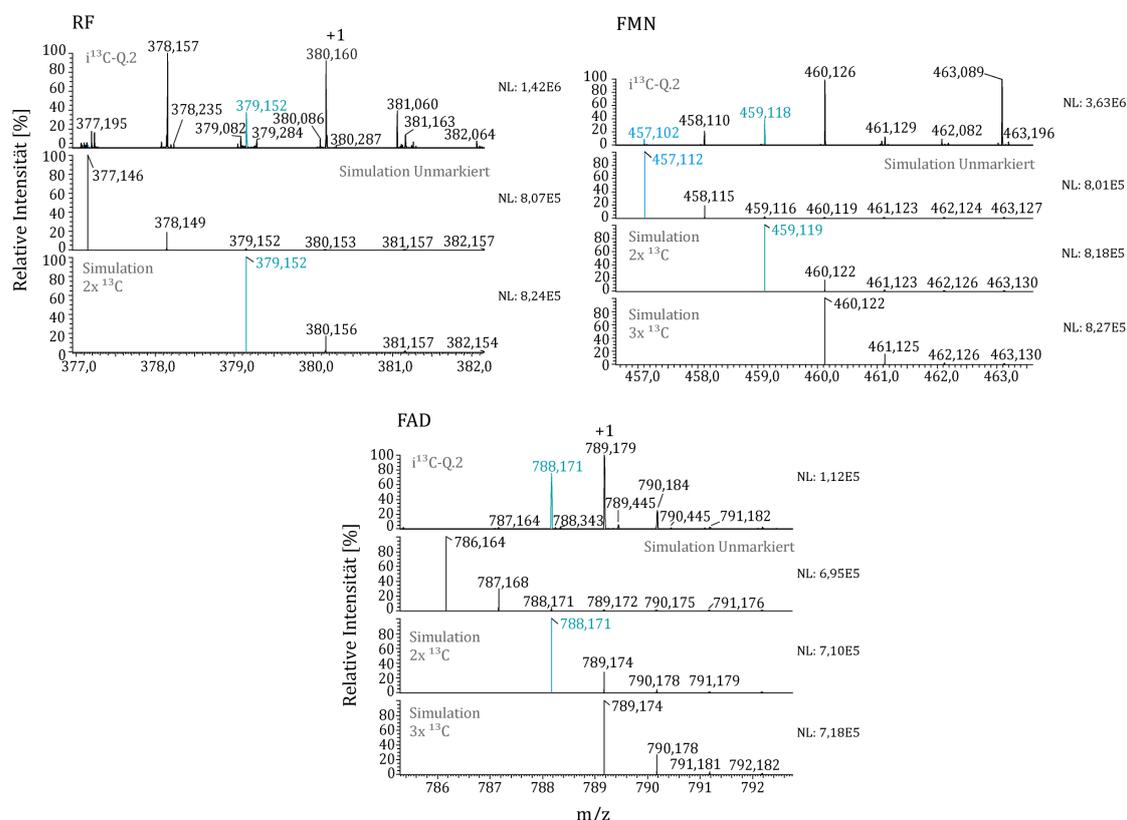


Abb. V-2 – Massenspektrum von $^{13}\text{C}_4,10\text{a}$ -markierten Flavinen aus $i^{13}\text{C}_4,2\text{-PixD}$

Das gemessene m/z-Verhältnis aller Flavine ist um zwei höher, als theoretisch für die unmarkierten Moleküle zu erwarten wäre und bestätigt die Anwesenheit des eingesetzten Isotopomers. Der hohe Anteil von Molekülen mit m/z +1 oder +2 repräsentiert reduzierte Flavine und ist ein Resultat des *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI) Verfahrens (Itoh *et al.*, 2002). In der inversen ^{13}C -Markierung kann außerdem ein bis zu +5 erhöhtes m/z-Verhältnis für FAD auftreten, da der Adeninanteil vom Bakterium synthetisiert wird. FTMS+MALDI (300 - 1000), Mittel aus 35 Spektren, NL = *Normalized largest* (= Absolutintensität des höchsten Signals)

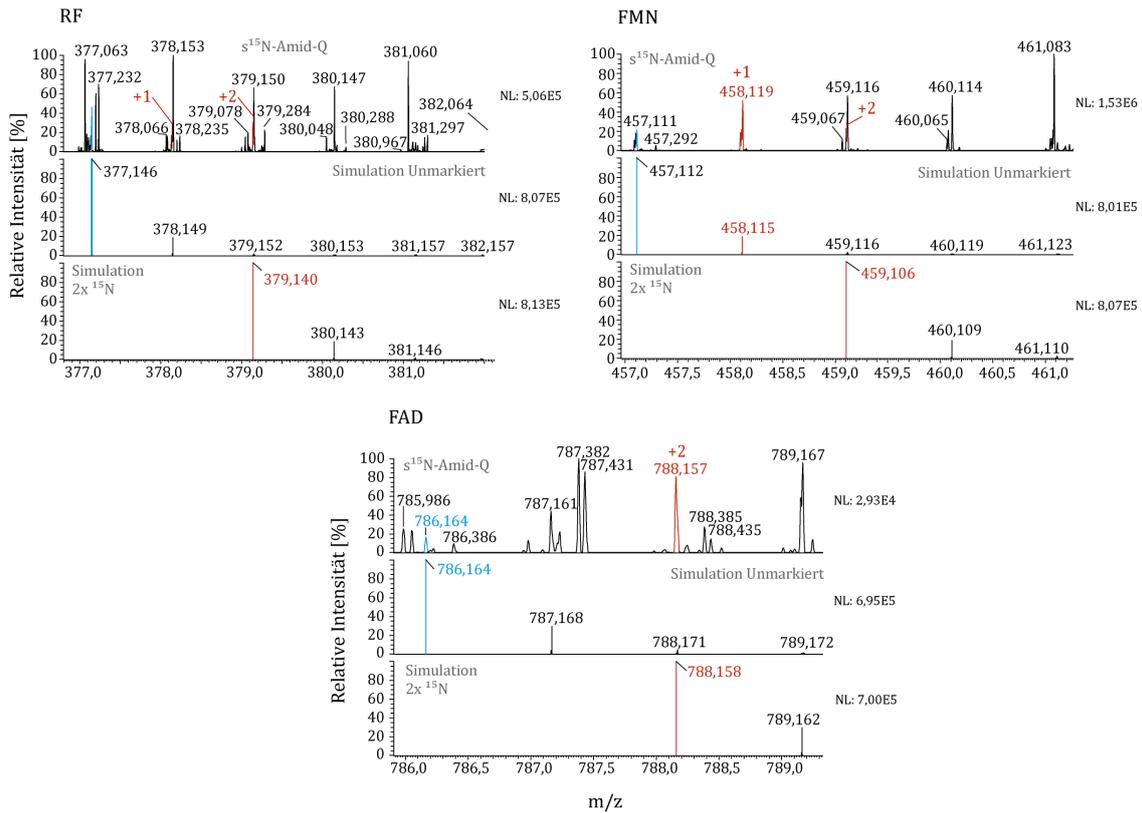


Abb. V-3 – Massenspektrum von Flavininen aus ^s¹⁵N-Amid-Q-PixD

Neben den unmarkierten Molekülen wurden wiederum Signale mit m/z-Verhältnissen von +1 und +2 gefunden. Sie repräsentieren sehr wahrscheinlich eine Mischung aus reduzierten und ¹⁵N-markierten Flavininen, da der verwendete *E. coli* Stamm CpXΔQv2 nicht Riboflavin-auxotroph ist und das Seitenkettenamid von Glutamin in die Biosynthese des Isoalloxazinringes eingeht. FTMS+MALDI (300 - 1000), Mittel aus 40 Spektren, NL = Normalized largest

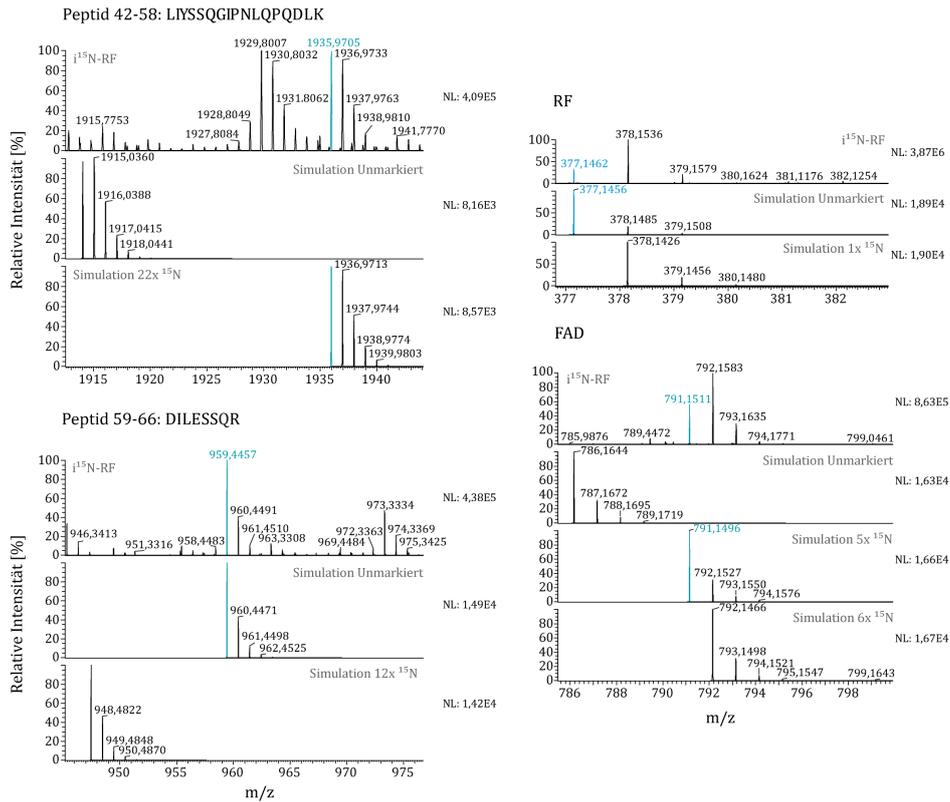


Abb. V-4 – Massenspektrum zweier Peptide und des Chromophors von $i^{15}\text{N}$ -RF-PixD

Entsprechend der selektiven Isotopenmuster des Kofaktors, konnten auch reine Markierungen des Apoproteins in *E. coli* CpXribF mit großer Effizienz hergestellt werden. Streuung in den RF-Anteil des Chromophors trat nicht auf. Hier liegt die Abweichung der Messung mit 378,1536 m/z von der Simulation mit 378,1426 bei 29 ppm und ist damit zu hoch. Das m/z-Verhältnis von FAD war jedoch aufgrund des Adeninanteils mit 5 zusätzlichen Stickstoffatomen erhöht. FTMS+MALDI (350 - 4000), Mittel aus 23 Spektren; Chromophor: FTMS+MALDI (200 - 2000), Mittel aus 20 Spektren, NL = *Normalized largest*

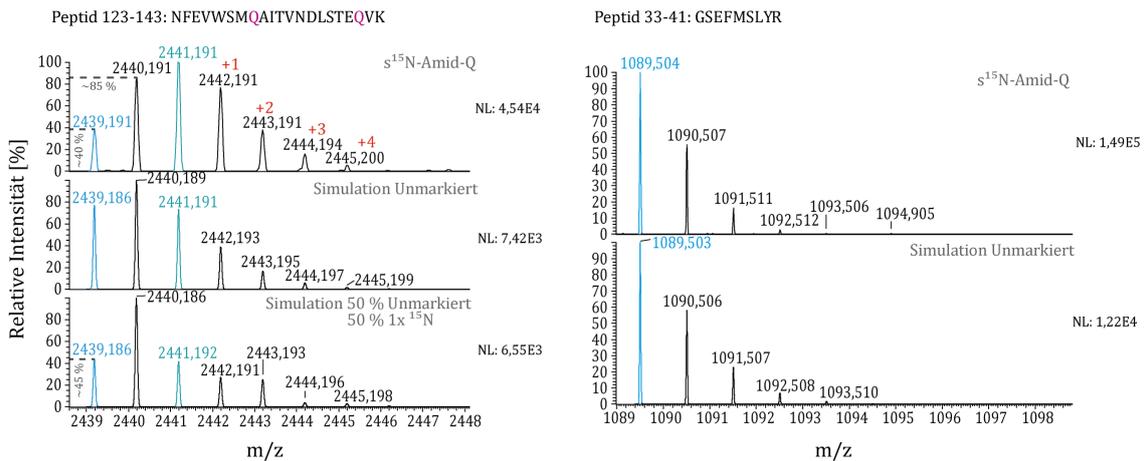


Abb. V-5 – Massenspektrum zweier Peptide der $s^{15}\text{N}$ -Amid-Q-Markierung in PixD

Unter Fütterung des im Seitenkettenamid mit ^{15}N markierten Glutamins kam es vor allem zur Streuung der Gruppe in andere Aminosäuren, sodass eine Übermarkierung um +1 bis +4 detektiert wurde. Gleichzeitig wurde Glutamin aus Glutamat unter Einbau von ^{14}N -Amid-Gruppen re-synthetisiert, wodurch die hohe Abundanz des 2440,191 m/z Maximums erklärbar ist. FTMS+MALDI (300 - 4000), Mittel aus 44 Spektren, NL = *Normalized largest*

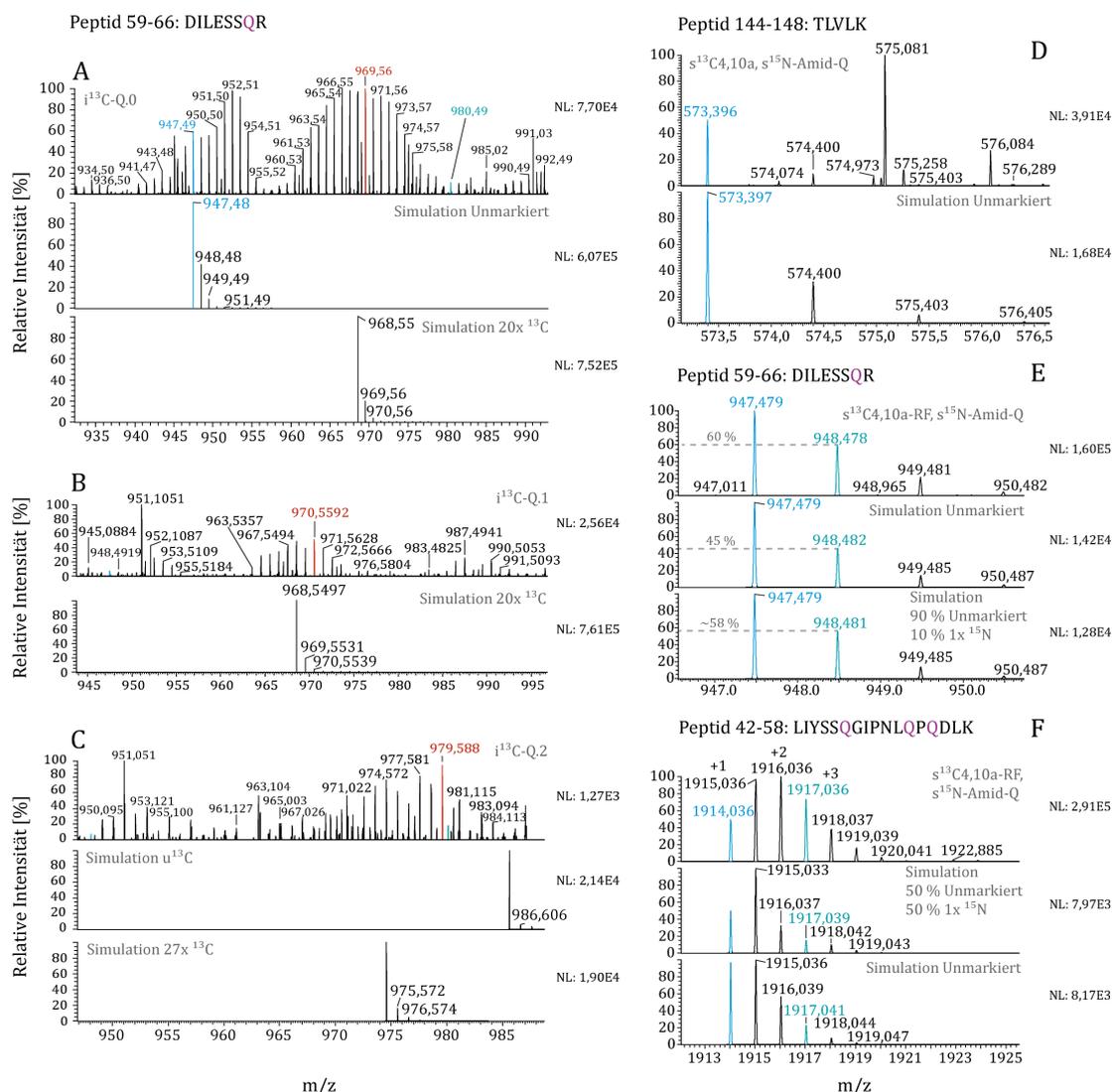


Abb. V-6 – Massenspektren inverser $^{13}\text{C-Q}$ -Markierungen und der $s^{13}\text{C}_4,10a\text{-RF}, s^{15}\text{N-Amid-Q}$ -Markierung (A-C) Mit Entwicklung des Glutamators gelang eine Verbesserung der Markierungseffizienz durch Reduktion der Isotopenstreuung aus Glutamin. Hierdurch verschob sich das Signal stärkster Intensität in die Nähe des zu erzielenden m/z -Verhältnisses, eine vollständige Elimination untermarkierter Peptide gelang jedoch nicht. A = CpXΔQ, FTMS+MALDI (400 - 4000), Mittel aus 23 Spektren; B = CpXΔQv2, FTMS+MALDI (400 - 4000), Mittel aus 31 Spektren; C = Glutamator, FTMS+MALDI (300 - 4000), Mittel aus 44 Spektren; D-E). Streuung des Glutamins konnte auch unter Supplementierung aller anderen Aminosäuren nicht unterdrückt werden. In der Doppelmarkierung wurde erneut eine uneinheitliche Effizienz für verschiedene Peptide festgestellt, wobei neben unter- und schwach markierten Fragmenten (siehe D und E) auch eine Übermarkierung mit hoher Abundanz von Signalen mit +2 und +3 m/z auftrat. FTMS+MALDI (300 - 4000), Mittel aus 44 Spektren. NL = *Normalized largest*

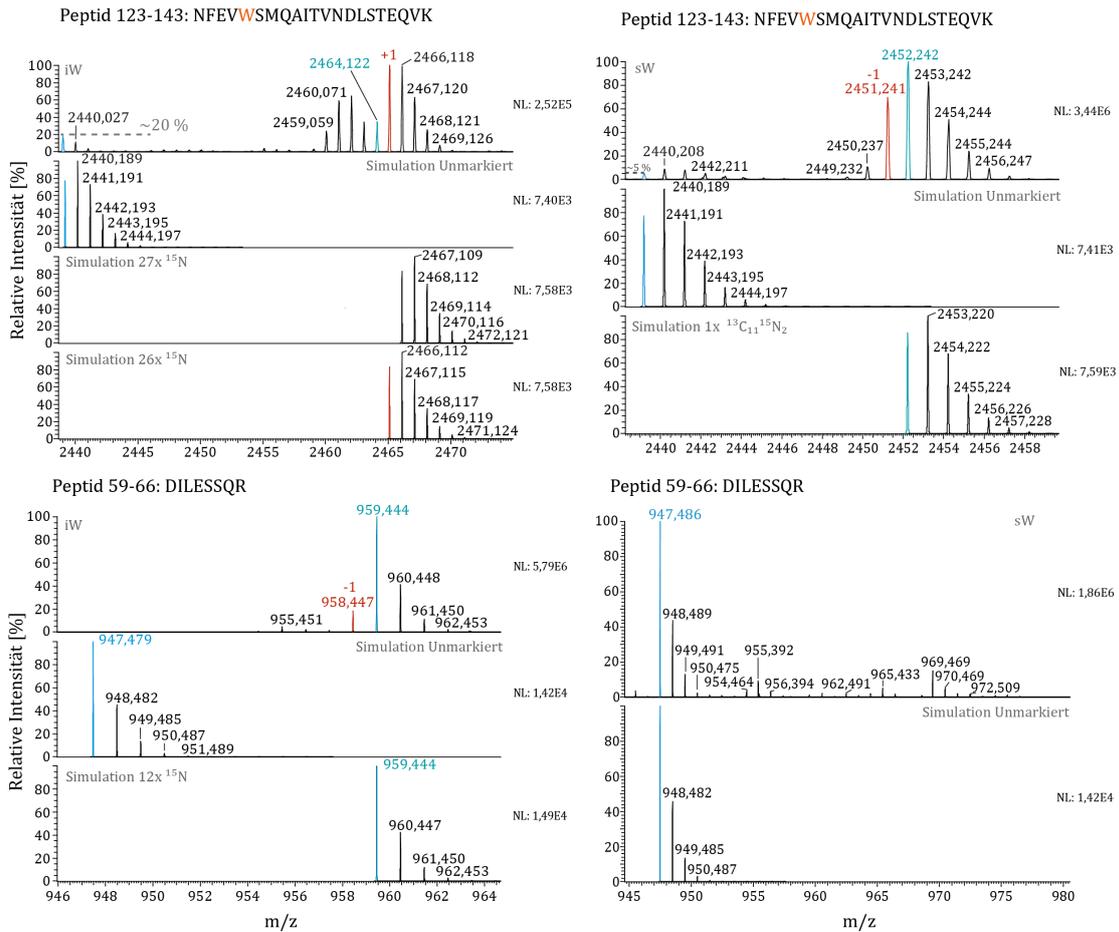


Abb. V-7 – Massenspektren der Tryptophan-Markierungen

Mit zusätzlicher Deletion der Tryptophanase TnaA ist die Isotopenstreuung aus und in Tryptophan reduziert, es kommt jedoch noch immer zur Abspaltung des Hauptkettenamids, sodass in einem inversen Muster eine hohe Abundanz von +1 m/z und in der selektiven Markierung entsprechend -1 m/z beobachtet wurde. FTMS+MALDI (200 - 4000), Mittel aus 28 Spektren, sW FTMS+MALDI (300 - 4000), Mittel aus 44 Spektren NL = Normalized largest

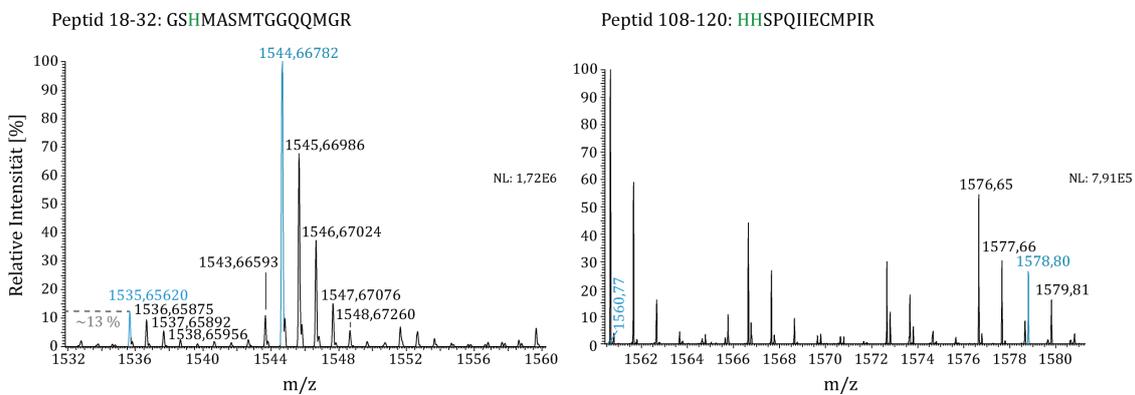


Abb. V-8 – Massenspektrum zweier Peptide der sH-Markierung von PixD

Die selektive Markierung der Histidine gelang mit dem rein auxotrophen Stamm CpXΔH unter hoher Effizienz und wies nicht auf Streuung der Aminosäure in andere Reste hin. FTMS+MALDI (400 - 4000), links Mittel aus 17 Spektren, rechts Mittel aus 67 Spektren, NL = Normalized largest

Kontaminationen in der Proteinisolierung

Die in der IMAC isolierten PixD-Proben enthielten stets Reste von Fremdproteinen, die exemplarisch für eine Histidinmarkierung tryptisch verdaut und von Dr. Sebastian Beck im Peptidmassefingerabdruck analysiert wurden. Unter Aufkonzentrierung von 40 μ l Probe erschienen in der SDS-PAGE neben der zu erwartenden Bande für PixD neun weitere, teils weiterhin schwache, Signale (Abb. V-9).

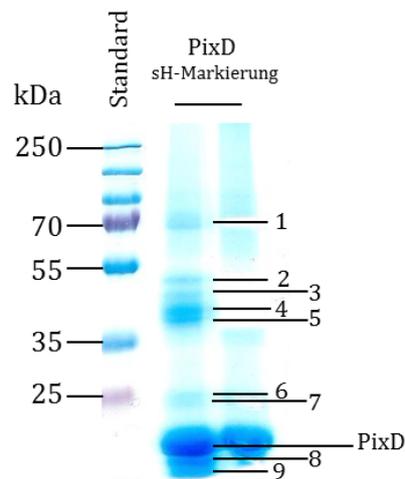


Abb. V-9 – Fremdproteine in der SDS-PAGE eines sH-Isolats nach Coomassie-Färbung

Trotz der starken Expression von PixD wurden nach der IMAC unspezifisch gebundene Fremdproteine detektiert, die beispielhaft für ein Isolat mit selektiver Histidinmarkierung gezeigt sind. Höhere Konzentrationen erreichten Proteine mit einem MW von rund 40 kDa und unter 20 kDa, wobei eine Beteiligung des PixD-Dimers oder von PixD-Abbauprodukten an diesen Signalen angenommen werden kann. Schwächere Banden migrierten bei etwa 25, 45 - 50 und 70 kDa. Unter ihnen wäre eine Identifizierung der Chaperone DnaK (Hitzeschockprotein Hsp70, 77 kDa) und DnaJ (Hsp40, 41 kDa) denkbar (Gamer *et al.*, 1992).

Es konnten Peptide mit hoher Wahrscheinlichkeit den Proteinen ArnA (auch als YfbG beschrieben) und SlyD zugeordnet werden (Bande 1 und 9), welche durch ein verstärktes Histidin-Vorkommen sehr häufig in der IMAC ko-eluierten (Bolanos-Garcia & Davies, 2006). Fragmente oder Modifizierungsvarianten dieser Enzyme könnten auch die Banden 6 und 8 in der SDS-PAGE erzeugen. Des Weiteren ließen sich Signale des Peptidmassefingerabdrucks der Glycerol-Dehydrogenase GldA zuordnen (Bande 3), die in der SDS-PAGE möglicherweise mit der Migration von FadA zusammenfiel. Diese Proteine sind vergleichsweise Histidin-arm. Die Identifizierung der Banden 2 und 4, als HisB und AbgA, blieb schwach indiziert und muss in weiteren Experimenten bestätigt werden. In diesem Zuge ließe sich auch eine Wiederholung für die schwachen Signale 5 und 7 durchführen, in denen nur Trypsin gefunden wurde.

Tab. V-B - Mögliche Proteinkontaminationen in IMAC-gereinigten PixD-Proben

Neben Histidin-reichen Proteinen, deren Ko-Aufreinigung Effekt der IMAC ist (ArnA, SlyD), ließen sich die Banden der SDS-PAGE aus Abb. V-9 metabolischen Enzymen zuordnen, die an der β -Oxidation von Fettsäuren (FadA) oder am Abbau eines toxischen Produktes der Glykolyse, dem Methylglyoxal (GldA), beteiligt sind (Yang & Schulz, 1983; Subedi *et al.*, 2008). Hochregulation des *fadAB* Operons ist unter Kohlenstoff-limitierten Bedingungen bekannt (Hua *et al.*, 2004) und ist möglicherweise für die Ko-Aufreinigung verantwortlich. Die HisB Kontamination könnte ebenfalls auf eine Überexpression des Gens zurückgehen, die durch die Histidin-Auxotrophie bedingt wäre.

Bande	UniProt Zugang ¹	Beschreibung	Identifizierungs-Score	Abdeckung ²	Anzahl einzigartiger Peptide	MW [kDa]
1	A7ZP73	<i>Bifunctional polymyxin resistance protein</i> ArnA OS= <i>Escherichia coli</i> O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=arnA PE=3 SV=1 - [ARNA_ECO24]	139,64	13,94	6	74,2
2	Q8FG50	<i>Histidine biosynthesis bifunctional protein</i> HisB OS= <i>Escherichia coli</i> O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=hisB PE=3 SV=2 - [HIS7_ECOL6]	96,53	25,92	9	40,3
	A1AI32	3-ketoacyl-CoA thiolase OS= <i>Escherichia coli</i> O1:K1 / APEC GN=fadA PE=3 SV=1 - [FADA_ECOK1]	63,17	17,05	5	40,8
3	P0A9S6	<i>Glycerol dehydrogenase</i> OS= <i>Escherichia coli</i> O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=gldA PE=3 SV=1 - [GLDA_ECOL6]	108,16	22,34	6	38,7
	A1AI32	3-ketoacyl-CoA thiolase OS= <i>Escherichia coli</i> O1:K1 / APEC GN=fadA PE=3 SV=1 - [FADA_ECOK1]	102,04	19,64	6	40,8
4	B2TW38	<i>Putative bifunctional polymyxin resistance protein</i> ArnA OS= <i>Shigella boydii</i> serotype 18 (strain CDC 3083-94 / BS512) GN=arnA PE=5 SV=1 - [ARNA_SHIB3]	56,76	6,65	3	59,4
	P77357	<i>p-aminobenzoyl-glutamate hydrolase subunit A</i> OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12) GN=abgA PE=1 SV=2 - [ABGA_ECOLI]	47,17	8,94	3	46,6
5	-	Trypsin	-	-	-	-
6	A7ZP73	<i>Bifunctional polymyxin resistance protein</i> ArnA OS= <i>Escherichia coli</i> O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=arnA PE=3 SV=1 - [ARNA_ECO24]	358,91	33,94	17	74,2
7	-	Trypsin	-	-	-	-
8	P0A9L1	<i>FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase slyD</i> OS= <i>Escherichia coli</i> O157:H7 GN=slyD PE=3 SV=1 - [SLYD_ECO57]	92,7	17,35	3	20,8
9	P0A9L1	<i>FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase slyD</i> OS= <i>Escherichia coli</i> O157:H7 GN=slyD PE=3 SV=1 - [SLYD_ECO57]	259,45	35,71	4	20,8

¹Datenbank der *Universal Protein Resource* (UniProt), ²Sequenzabdeckung auf Basis des unmarkierten Proteins

V.4 Schwingungssignaturen von Chromophor und Apoprotein

Die Zusammenfassung der isotopeinduzierten Signalverschiebungen bei Markierungen von Apoprotein oder Chromophor sowie selektiver Muster im Isoalloxazinring (Abb. III-3, Abb. III-5, Abb. III-7) zeigte die Bandenzugehörigkeit zum Proteinanteil und lässt Rückschlüsse auf Überlagerungen und Kopplungen zu.

Tab. V-C - Unterscheidung der Schwingungssignaturen von Chromophor und Apoprotein

Sichere Verschiebungen, bei denen keine Hinweise auf die neue Absorptionsfrequenz gefunden werden konnten, sind mit „X“ gekennzeichnet. Unsichere Bandenzuordnungen sind außerdem kursiv ausgewiesen.

Bande [cm ⁻¹]	Verschiebung im Markierungsmuster							
	u ¹³ C-RF	s ¹³ C4,10a-RF	s ¹³ C2-RF	i ¹³ C-RF	u ¹⁵ N-RF	s ¹⁵ N5-RF	i ¹⁵ N-RF	D ₂ O
(-)1712	-28, verbleibende Bande bei 1710 cm ⁻¹	-27, verbleibende Bande bei 1709 cm ⁻¹	0	-3	-3	0	-2	-8
(+)1693	-26, verbleibende Bande bei 1694 cm ⁻¹	-24, verbleibende Bande bei 1695 cm ⁻¹	0	-9	-1	0	-3	-9
(-)1670	0	0	0	-27	-4	0	-5	+5
(+)1653	0	0	0	-36	0	0	-1	+3
(-)1642	0	0	0	-40	0	0	-4	+6
(+)1631	0	0	0	-40	0	0	-2	+8
(+)1623	0	0	0	-40	0	0	-2	-2
(-)1610	0	0	0	-38	0	0	-3	-3
(+)1545	-15	-13	-3	-4	-11	-2	-2	0
(+)1531	0	0	0	-11	0	0	-17	0
(-)1516	0	0	0	-16	0	0	-18	+1
(+)1471	0	0	0	-X	0	0	0	0/+4
(-)1447	0	0	0	-4	0	0	0	0
(+)1424	-5, verbreitert	-2	0	-21	-9	0	-6	0
(+)1409	-X	-8	-5	-X	-8	-3	0	0
(-)1402	-X	-6	0	0	-6	0	-1	0
(+)1345	-X	0	0	0	0	0	0	0
(+)1302	-16	-7	-2	0	-10	0	0	+17
(-)1279	-15	-2	0	-15	-14	-12	0	0
(-)1250	-13	-4	-8	0	-7	0	-3	-X
(+)1241	-X	-X	-X	0	-X	0	-2	0
(+)1221	0	0	-2	-10	0	0	-2	+6
(-)1205	0	0	-1	-5	0	0	-2	0
(+)1189	-X	-3	0	0	-8	-3	0	0
(-)1179	-X	-3	0	0	-7	-3	0	0
(-)1167	0	0	0	-6	0	0	-2	-2
(+)1145	0	0	0	-18	0	0	-3	0
(-)1121	0	0	0	-16	0	0	-3	16
(-)1101	0	0	0	-21	0	-2	-3	+/-X
(+)1080	0	0	0	-23	0	0	-2	4
(-)1055	0	0	0	-20	0	0	0	+/-X
(-)1010	-X	-2	-1	0	-2	0	0	-X

Mit sinkender Frequenz folgen auf C=O-Streckschwingungen des Flavin C4-Carbonyls und von Seitenketten die Amid I und Amid II Banden des Proteinrückgrates sowie der *Fingerprint* Bereich mit den komplexeren Amid III Banden. Große Isotopenverschiebungen wurden erwartungsgemäß bei ^{13}C -Markierungen beobachtet, hingegen waren die Frequenzänderungen in D_2O überraschend klein. Tab. V-D vergleicht die im niedrigeren Frequenzbereich auftretenden Banden mit den publizierten Infrarot-Signaturen 20 proteinogener Aminosäuren (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002; Wolpert & Hellwig, 2006) und ordnet sie unter Verwendung einer arbiträren Abweichung von $\pm 10\text{ cm}^{-1}$ zu. Mit Hilfe der Reste-spezifischen Markierungen für Asn, Gln und His und der Selektivmarkierung von W91 konnte der Schwingungsursprung weiter eingegrenzt werden. Besonders häufig vertreten sind Signale mit zu Glutamat, Aspartat, Serin, Phenylalanin und Alanin passenden Frequenzen.

Tab. V-D – Putative Seitenkettenschwingungen in der *Fingerprint* Region des *PixD* Differenzspektrums
Eingetragen sind die Bandenpositionen in H_2O und die Frequenzverschiebungen bei Deuterierung, mit möglichen Zuordnungen zu Schwingungsformen der Aminosäureseitenketten.

Signal(e) [cm^{-1}] H_2O [D_2O]	Mögliche Zuordnung
(+)1471 [+5]	1447-1472 Pro, 1467/1450 Ser, 1472 Asp, 1475 Arg, 1476 Lys, 1457 Phe $\delta(\text{CH}_2)$, $\nu(\text{CC})$ 1465 Ile, 1470 Ala, Leu, 1469 Val $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
(+)1447 [0]	1444, 1447-1454 Tyr-, 1446 Phe $\delta(\text{CH}_2)$, 1444 Met $\delta(\text{CH}_2)$, $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ 1440 Glu $\nu(\text{COO}^-)$
(+)1424 [0]	1424/1429 Cys $\delta(\text{CH}_2)$
(-)1326 [-/+X]	1324 Asp $\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH})$, 1323 Glu $\gamma_t(\text{CH}_2)$ 1225-1330 Thr $\delta(\text{COH})$, $\delta(\text{CH})$
(-)1279 [+10]	1269-1273 Tyr-O- 1235-1270 Tyr-OH $\nu(\text{CO})$, $\nu(\text{CC})$ (Mehlhorn <i>et al.</i> 2013) 1276 Trp $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CN})$, $\delta(\text{CHb})$
(-)1250 [+12]	Tyr (Mehlhorn <i>et al.</i> 2013) 1246 Met, 1259 Cys $\gamma_t(\text{CH}_2)$ 1252 Ile $\rho(\text{CH}_3)$, $\delta(\text{CCN})$, 1255 Thr $\delta(\text{C-OH})$, 1256 Trp $\delta(\text{CH}_2)$ 1259 Ser $\gamma_t(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH})$
(+)1221/(-)1205 [+6]	Glu 1233 $\nu(\text{CO})$, $\nu(\text{CC})$, $\delta(\text{OH})$, $\delta(\text{CH})$ / 1205 $\gamma_t(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH})$
(-)1167 [-2]	1161 Val $\delta(\text{CH})$, 1162 Glu $\gamma_t(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH})$ 1157 Thr $\nu(\text{C-OH})$, $\rho(\text{CH}_3)$ Tyr $\nu(\text{CO})$, $\delta(\text{C-OH})$ (Mehlhorn <i>et al.</i> 2013)
(+)1145 [0]	1130 Glu COO^- $\gamma_t(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH})$ 1142 Ala, Gly $\delta(\text{CH})$, 1148 Asp $\gamma_t(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH})$
(-)1121 [+16]	1121/1115 Ser/Thr $\nu(\text{C-O})$ 1118/1120 Asp $\delta(\text{CH})$ 1119/1130 Glu- COO^- $\gamma_t(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH})$
(-)1101/(+)1080 [+1]/[+/-X]	1075 - 1150 Thr $\nu(\text{C-O})$ 1104 Phe $\delta(\text{CH})$, 1104 Trp $\delta(\text{CH})$ / 1092 Trp $\delta(\text{CH})$, $\nu(\text{CN})$ 1105 Gln $\delta(\text{CH})$ / 1084 Gln $\nu(\text{CN})$, 1105 Val 1114 Ala, 1117 Ile $\rho(\text{CH}_3)$, 1115 Thr $\nu(\text{C-O})$
(-)1055 [+4]	1040 Glu $\nu(\text{CC})$ 1052, 1078 Gln $\nu(\text{CC})$ 1054, 1075 - 1150 Thr $\nu(\text{C-O})$ 1030 Ser $\nu(\text{C-O})$, 1031 Phe CH, 1033 Pro $\gamma_w(\text{CH}_2)$

p = Pyrrol-Anteil, nach Barth & Zscherp, 2002

V.5 Selektive Markierungen für Flavin-C2 und -N5

Für die Bestätigung potenzieller C2- und N5-Schwingungen, deren Zuordnung aus den Apoprotein- und Chromophor-Markierungen abgeleitet werden konnte, stellte Dr. Tilo Mathes freundlicherweise die LMD-Differenzspektren der selektiven Isotopenmuster zur Verfügung.

Das Resultat der $^{13}\text{C}_2$ -RF-Markierung beweist dabei die fehlende Detektion einer hochfrequenten C2O2-Streckschwingung um 1670 cm^{-1} (Abb. V-10). Die Stärke dieser Bindung ist demzufolge in Dunkel- und Lichtzustand von PixD gleich. $^{13}\text{C}_2$ -induzierte Verschiebungen finden sich dagegen bei niedrigeren Wellenzahlen, wo einige schwache Änderungen beispielsweise die positiven Signale bei 1545 cm^{-1} ($a \rightarrow a'$) und 1221 cm^{-1} ($b \rightarrow b'$) betreffen (Abb. V-10). Ersteres wird wahrscheinlich durch Kopplung der Oszillatoren im Ring III hervorgerufen, da es in der deuterierten Probe unbeeinflusst blieb (Abb. V-10.D). Auch die Schwingung bei 1221 cm^{-1} wird nicht von Bindungen des C2-Atoms verursacht, weil das Signal vorrangig in Apoproteinmarkierungen verschoben wurde (Abb. III-7.A, B). Signifikante Änderungen induzierte $^{13}\text{C}_2$ -RF hingegen bei (+)1404 und (-)1242 (VI-c und d). In der höherfrequenten Region wurde durch die Schwächung der Lichtzustandsschwingung das negative Signal bei 1410 cm^{-1} aufgedeckt, während Intensität und Maximum des (-)1402 Signals leicht verringert waren (Abb. V-10.B). Im Vergleich zu anderen Isotopenmustern kann die Bande (+)1409 der unmarkierten Probe einer reinen Flavinsignatur zugeordnet werden. Sie wurde jedoch nicht allein durch eine $^{13}\text{C}_2$ -Markierung verschoben, sondern auch durch $^{15}\text{N}_5$ (Abb. V-10.D) und lässt wiederum auf eine Kopplung der Ring II und III Schwingungen schließen. $^{13}\text{C}_{4,10\text{a}}$ -RF induziert ebenfalls eine Frequenzminderung, die mit 8 cm^{-1} eher hoch ist. Dies würde zu der Zuordnung eines IR-Signals bei 1413 cm^{-1} von Lumiflavin zu der N3H-Biegeschwingung passen (Abe & Kyogoku, 1987). Auch wenn die Deuterierungssensitivität dieser Bande nicht abgeschätzt werden kann (Abb. III-3.D), bleibt das (+)1409 Signal vorläufig der N3-Bindung zugeordnet. Dagegen deuten die Verschiebungen des Signals bei 1250 cm^{-1} auf eine C2-Schwingung hin (Tab. V-C). Helena Steinocher ordnete es anhand der ^{15}N - und ^{15}N -RF-Markierungen der $\nu(\text{C}_2\text{N}_3)$ zu (Steinocher, 2013). Deuterierungssensitivität und eine leichte Verschiebung in einer C_{4,10a}-Markierung unterstützen diese Interpretation. Darüber hinaus treffen die meisten dieser Beobachtungen auch auf die Bande bei (+)1241 zu, nur eine Kopplung an eine NH-Gruppe könnte fehlen (Tab. V-C). Bei einer Zusammengehörigkeit von (-)1250 und (+)1241 würde eine lichtinduzierte Stärkung der Chromophor-Protein-Interaktion am N3H impliziert.

Isotopenmarkierung der Chromophoratome C2 und N5 beeinflusste nur wenige Signale. Ein $^{15}\text{N}_5$ -Isotopenmuster in Lumiflavin verursachte hingegen vor allem zwischen $1460 - 1660\text{ cm}^{-1}$ Frequenzabnahmen (Abe *et al.*, 1986). Ursächlich scheinen vorrangig Schwingungskopplungen zu sein, wie etwa das potenzielle Bandenpaar (-)1179/(+)1189, das von der C₄C_{4a}- oder C_{4a}C_{10a}-Bindung verursacht werden sollte. Eine exakte Zuordnung von N5- und C2-Bindungen ist dadurch erschwert. Der Wasserstoffbrückenstatus von N5 und der C₂N₃H unterscheiden sich in Dunkel- und Lichtzustand wahrscheinlich kaum.

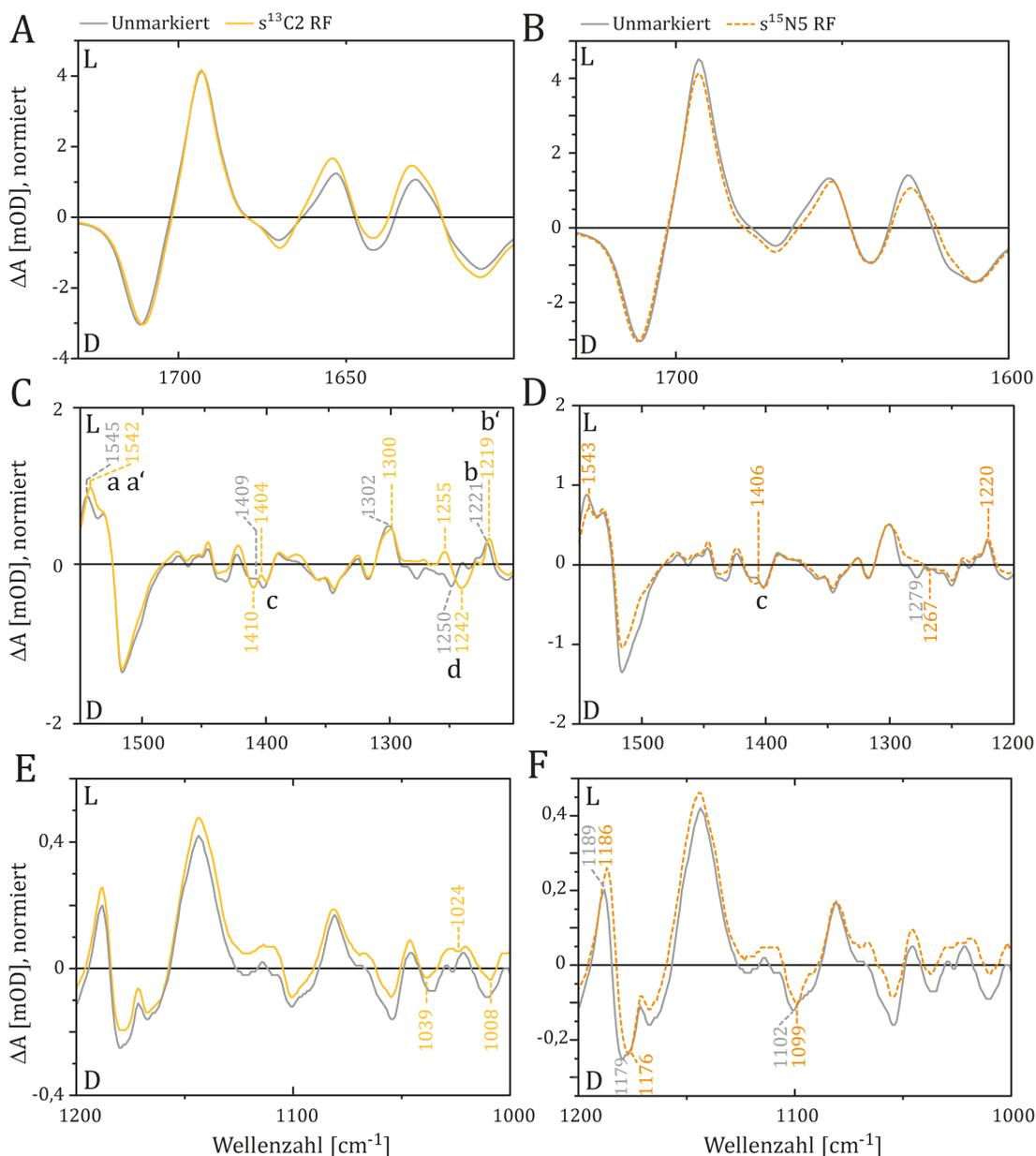


Abb. V-10 - LMD-Differenzspektren selektiver Markierungen des C2-Atoms (A, B) und des N5-Atoms (C, D) im Chromophor

Durch die Isotopen verursachte Verschiebungen konzentrierten sich im niederfrequenten Bereich und ließen die 1600 - 1750 cm^{-1} Region unbeeinflusst (A, C). Ab 1550 cm^{-1} fanden sich definierte Änderungen, wobei die Signale (+)1545 und (+)1409 cm^{-1} in beiden Mustern bei niedrigeren Frequenzen absorbierten. Diese Verschiebungen deuten auf Schwingungskopplungen zwischen den Ringen II und III hin, die sowohl von N5-, als auch C2-Schwingungsformen beeinflusst werden. Das Dunkelzustandssignal bei 1250 cm^{-1} wird wahrscheinlich durch die C2N3-Schwingung verursacht, welche zusammen mit der C4N3-Bindung oszilliert und zusätzlich an Bewegungen des Apoproteins gekoppelt ist. Zudem könnten Banden des Apoproteinanteils bei 1241 und 1250 cm^{-1} überlagern. Die Spektren wurden auf die Dunkelzustandsschwingung der unmarkierten Probe bei 1712 cm^{-1} normiert. Die Daten wurden freundlicherweise von Dr. Tilo Mathes zur Verfügung gestellt.

V.6 Zusammenfassung der Signalverschiebungen für die Glutamin-Markierungsmuster

Im Vergleich zu den Frequenzänderungen bei Inkorporation schwerer Kohlenstoffatome in das Flavin oder den Apoproteinanteil lassen sich anhand der Glutaminmarkierungsmuster wahrscheinliche Schwingungen dieser Aminosäure im PixD-Differenzspektrum feststellen. Echte Glutaminschwingungen sollten in $i^{13}\text{C}$ -Q.2 nicht, oder schwächer als in der $i^{13}\text{C}$ -RF-Markierung verschoben sein. Dafür aber in der $s^{15}\text{N}$ -Amid-Q Probe sowie der Doppelmarkierung, wenn sie mit dem Seitenkettenamid koppeln. Signale auf die diese Bedingungen tendenziell zutreffen sind in Tab. V-E grau unterlegt.

Tab. V-E - Zusammenfassung der Signalverschiebungen für die Glutaminmarkierungsmuster

Listung von Banden die durch Isotopenmuster für Glutamine eine Frequenzänderung erfuhren. Sichere Verschiebungen, bei denen keine Hinweise auf die neue Absorptionsfrequenz gefunden werden konnten, sind mit „X“ gekennzeichnet. Unsichere Bandenzuordnungen sind außerdem kursiv ausgewiesen.

Unmarkiert	$s^{13}\text{C}_4, 10\text{a RF}$	$i^{13}\text{C-RF}$	$i^{13}\text{C-Q.2}$	$s^{15}\text{N-Amid-Q}$	$s^{13}\text{C}_4, 10\text{a RF}, s^{15}\text{N-Amid Q}$
(-)1712	0/-27	-3	-1/-31	0	-28
(+)1693	0/-24	-11	+1/-25	-3	-24
(-)1670	0	-27	-17	-5	-8
(+)1653	0	-36	-9/-30	0	0
(-)1643	0	-38	-5/-30	0	0
(+)1631	0	-39	-25/-38	0	0
(+)1623	0	-40	-23/-39	0	0
(-)1610	0	-37	-36	0	0
(+)1545	-13	-4	-14	-7	-13
(+)1423	0	-20	-21	-3	0
(+)1409	-8	X	X	-3	-8
1374-1390	0/-X	X	X	0	0/-X
(+)1302	-7	0	-1/-7	-5	-4
(+)1208	0	X	X	-4	-5
(-)1121	0	-16	-13	0	0
(+)1114	0	-20	-16	+3	-X / schlechte Signalqualität
(-)1071	0	-21	-20	-2	-3
(+)1068	0	-23	-4	0	-4
(+)1046	0	-23	-22	0	0
(+)1022	-6	0	-4	0/-7	-4
(-)1010	-2	0	0	-1	-1

Mögliche Glutaminschwingungen im LmD-Differenzspektrum von PixD

Besonders die Signale zwischen 1623 - 1670 cm^{-1} und 1068 - 1208 cm^{-1} werden in den Glutamin-Isotopenmustern konsistent verschoben und können bekannten Glutaminschwingungen zugeordnet werden. Andere Banden, darunter (+)1693 und (+)1409 lassen auf eine Kopplung der isotoopeninduzierten Frequenzminderung in Glutaminen auf Oszillationen des Kofaktors schließen. Die möglichen Zuordnungen der Differenzbanden zu Schwingungskopplungen und Schwingungsformen von Glutamin sind in Tab. V-F aufgeführt.

Tab. V-F – Signale von Glutaminen im Differenzspektrum von PixD

Neben den niederfrequenten Signalen ab 1208 cm⁻¹ wurden auch Beteiligungen von Glutaminhauptketten an Signalen der Amid I Region sichtbar. Die induzierten Bandenverschiebungen bestätigen zudem die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Q50-ε2NH und Flavin-N5 in beiden Proteinkonformationen sowie ihre Interaktion in P_{red}.

Unmarkiert	Hauptsächliche Zuordnung	Glutaminschwingungen
(-)1712/(+)1693	Flavin ν(C4O4)	Kopplung Q50-δ(NH) mit ν(C4O4) im Lichtzustand
(-)1710/(+)1694	Protein ν(C=O)	1668-1687 Gln ν(C=O)
(-)1670	Proteinrückgrat C=O	1668-1687 Gln (SK)
(+)1653	Proteinrückgrat C=O	C=O Gln (HK)
(-)1643	Proteinrückgrat C=O	C=O Gln (HK)
(+)1631	Proteinrückgrat C=O	C=O Gln (HK)
(+)1623	Proteinrückgrat C=O	C=O Gln (HK)
(+)1545	C10aN1, C4aN5; Amid II	Kopplung Q50-δ(NH) mit ν(C4O4), ν(N5C5a), ν(N5C4a)
(+)1424	C10aN10, C10aN1 Protein CN	Kopplung Q50-δ(NH) mit ν(C4O4), ν(N5C5a), ν(N5C4a) 1410 Gln ν(CN) / 1411 Gln δ(CH), ν(CC)
(+)1409	N5C5a, N5C4a	Kopplung Q50-δ(NH) mit ν(N5C5a), ν(N5C4a)
1374-1390	-	1359 Gln δ(CH) / 1350, 1363 Gln δ(CH), ν(CC)
(+)1208	-	1202 Gln γ _i (CH ₂)
(-)1121	Protein	-
(+)1114	-	1104 Gln γ _p (NH ₂)
(-)1071	-	1084 Gln ν(CN) 1052 Gln ν(CC)
(+)1068	-	1052 Gln ν(CC)
(+)1046	-	1052 Gln ν(CC)
(+)1022	-	-
(-)1010	Flavin Ring III	Kopplung Q50-NH mit ν(N5C5a), ν(N5C4a)

HK = Hauptkette, SK = Seitenkette

Schwingungskopplung zwischen Y8 und Q50

Aus den Untersuchungen von Iwata *et al.* ging die Existenz einer sehr starken Wasserstoffbrückenbindung zwischen Y8 und Q50 im Lichtzustand hervor (Iwata *et al.* 2011). Entsprechend ist für P_{red} eine niedrigere Tyr-¹³C-O Schwingungsfrequenz bei vollständiger ¹³C-Markierung des Apoproteins zu erwarten als unter ¹³C-Q-Bedingungen. Die durch Takahashi *et al.*, 2007 und Mehlhorn *et al.*, 2013 identifizierten Tyrosinschwingungen in Differenzspektren von TePixD und PixD sind in Tab. V-G mit den induzierten Frequenzänderungen der Glutaminmarkierungen gezeigt. Ebenfalls eingetragen sind die Ergebnisse des ¹³C-RF-Musters, wodurch eine Unterscheidung der Apoprotein- und Flavin-dominierten Banden möglich ist. Hierbei wird ersichtlich, dass ¹⁵N-Amid-Glutamine keine signifikanten Verschiebungen der Tyrosin-Hydroxylsignale erzeugten (Tab. V-G). Doch auch ein Vergleich der Bandenverschiebungen in den Spektren der ¹³C-Q.2- und ¹³C-RF-Proben stellte nur Unterschiede für Signale mit vorrangiger Zuordnung zum Flavin [(+)1545, (-)1250, (-)1279 cm⁻¹] heraus (Tab. V-F). Ausgehend vom ¹⁵N-Amid-Muster, bildet Q50 nur mit der Carbonylgruppe nicht-kovalente Interaktionen zu Y8 aus, wie es bei einer Tautomerisierung des Glutamins möglich ist. In diesem Fall würden die Tyrosinschwingungen bei ¹³C-RF Markierung stärker zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben, als in der ¹³C-Q-Probe. Diese Vermutung wurde von den isotopeinduzierten Frequenzverschiebungen nicht unterstützt.

Aufgrund der Überlagerungen von Tyrosinschwingungen mit anderen Signalen und der Isotopenstreuung aus Glutamin in weitere Aminosäuren, kann die Interaktion von Q50 und Y8 nicht sicher abgeleitet werden.

Tab. V-G – *In Glutamin-Isotopenmustern beobachtete Frequenzverschiebungen von Tyrosin-Signalen*
Eingetragen sind die identifizierten Schwingungsfrequenzen von Tyrosinen sowie ihre Verschiebungen in den Isotopenmarkierungsmustern für Glutamine. Gelb unterlegt sind Banden mit Beteiligung von Flavinschwingungen.

Unmarkiert	Tyr Zuordnungen*	s ¹⁵ N-Amid-Q	i ¹³ C-Q.2	i ¹³ C-RF	Doppelmarkierung
(+)1545	v(CC) _{Ring} , gekoppelt mit v(CO)	-7	-14	-4	-13
(+)1531	v(CC) _{Ring} , gekoppelt mit v(CO)	0/+X	-20	-11	0
(-)1516	v(CC) _{Ring} , gekoppelt mit v(CO)	0	-15	-16	0
(-)1279	v(C-O), δ(COH)	0	-9	-15	-2
(+)1258	v(C-O), δ(COH)	0	-2	-2	0/-X
(-)1250	Flavin, gemischt mit Tyr	-1	-4	0	-4
(+)1241	v(C-O), δ(COH)	-1	0	0	0
(-)1236	v(C-O), δ(COH)	0	0/-X	+1/überlagert	0/-X
(+)1172	v(C-O), δ(COH)	0	0	0	0
(-)1167	v(C-O), δ(COH)	-1	-2	0	0

*(Mehlhorn *et al.*, 2013)

V.7 Zusammenfassung der Signalverschiebungen der Trp-Markierungen

Im Vergleich der selektiven Isotopenmuster für W91 können Banden identifiziert werden, deren Frequenzänderungen eine Zuordnung zu Tryptophanschwingungen zulassen. Sie sollten im Spektrum der sW-Probe deutliche Verschiebungen aufweisen und bei Stickstoff-Beteiligung durch das i¹⁵N-W-Muster unbeeinflusst bleiben bzw. geringere Alternierungen erfahren (Tab. V-H).

Tab. V-H - *Putative Schwingungsfrequenzen von W91 in PixD*

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von H. Steinocher für u¹⁵N-markiertes PixD und den IR-Absorptionen von freiem Tryptophan in Lösung (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002; Wolpert & Hellwig, 2006) wurden die grau unterlegten Signale als potenzielle W91-Schwingungen eingestuft. Banden mit Beteiligung von Flavin-Oszillationen sind gelb unterlegt. Sichere Verschiebungen, bei denen keine Hinweise auf die neue Absorptionsfrequenz gefunden werden konnten, sind mit „X“ gekennzeichnet. Unsichere Bandenzuordnungen sind außerdem kursiv ausgewiesen.

Signal [cm ⁻¹] [D ₂ O]	sW	i ¹⁵ N-W	u ¹⁵ N	Frequenzen von Tryptophanschwingungen
(-)1670 [+5]	+1	-4	-5	1684 δ(NH ₂) ^{HK}
(+)1623 [-2]	-6	-9	-	1619/1622 v(C-C), v(C=C)
(-)1434 [0]	-3	?	-6	1412-1435 δ(NH), v(CC), δ(CH)
(+)1285 [-25]	-0	-6	-6	1285 v(C-OH)
(-)1279[0]	-3	-15	-15	1276 δ(NH), v(CN), δ(CH)
(+)1241 [0]	-3	-3	-3	1245 δ(CH), v(CC)
(+)1123 [0]	-7	-6	-6	1119 Benzen δ(CH), v(CC)
(-)1101 [+/-X]	-6	-5	-3	1092 δ(CH), v(CN)
(+)1046 [0]	-2	-0	-0	1064 v(CN), δ(CH), v(CC)
(-)1042 [-9]	-3	-0	-0	1033 δ(CH)
(-)1018 [0]	-3	-5	-5	1012-1016 v(CC), δ(CH)

V.8 Zusammenfassung der Signalverschiebungen für W91- und S28-Mutanten

Die Ergebnisse der Mutanten-Analyse wurden vergleichend zusammengefasst, um Ähnlichkeiten und Unterschiede hervorzuheben. Übereinstimmungen der Differenzspektren von W91A und S28A lassen Rückschlüsse auf die Dunkeladaptation beschleunigende Faktoren zu. Gleichzeitig geben die in Tab. V-I gelb unterlegten Flavin-Signale Hinweise auf den Kopplungsmechanismus in die Chromophorbindetasche.

Tab. V-I - Zusammenfassung der Frequenzänderungen durch W91A, W91F und S28A-Austausch

Vergleichend sind verschobene Signale in den LmD-Differenzspektren der Mutanten eingetragen. Übereinstimmungen unter allen drei Proteinvarianten sind eingerahmt hervorgehoben. Gelb unterlegt wurden Banden die hauptsächlich von Flavinschwingungen erzeugt werden. Sichere Verschiebungen, bei denen keine Hinweise auf die neue Absorptionsfrequenz gefunden werden konnten, sind mit „X“ gekennzeichnet. Unsichere Bandenzuordnungen sind außerdem kursiv ausgewiesen.

Signal [cm ⁻¹]	W91F	W91A	S28A	Signal [cm ⁻¹]	W91F	W91A	S28A
	Dunkelzustand				Lichtzustand		
(-)1712	0	+1	-4	(+)1693	-1	+4	-1
(-)1670	-3	-6, (+)1678 neu	-9, (+)1675 neu	(+)1653	-3	-3	-2
(-)1642	-3	-6	-3	(+)1631	-5	-7	0
(-)1610	0	-2	0	(+)1623	0	0	-2
(-)1584	-9	-8	-8	(+)1589	-8	-7	-4
(-)1516	0, (+)1505 neu	+1	0	(+)1566	-3	-3	0
(-)1463	-10	0	+1	(+)1545	-2	+7	-6
(-)1433	-3	-5	-2	(+)1531	-2	-1	0
(-)1402	0	-2	-5	(+)1447	0	+1	0
(-)1345	0	-1	+2	(+)1436	-2	0	+1
(-)1317	0	+2	-1	(+)1424	-3	0/-16	0/-8
(-)1279	-13/+10?	+2	-1	(+)1409	-3	-3	-5
(-)1250	-3	-3	-2	(+)1390	0	+3	0
(-)1236	-9	+1	+2	(+)1353	+1	+4	0
(-)1179	0	0	-3	(+)1326	0	+2	0
(-)1167	0	-3	-5	(+)1302	0	-4	-3
(-)1101	-1	-8	-2	(+)1289	0	-2	-3
(-)1055	+2	+5	?	(+)1271	+3	+3	0
(-)1036	+5	+7	+6	(+)1258	-1	0	-1
(-)1010	+2	+2	-4	(+)1241	-X	0	0
				(+)1221	-2	-6	-1
				(+)1145	+8	+8	0
				(+)1080	0	0	+2
				(+)1046	+3	+3	?
				(+)1030	-2	+7	+5
				(+)1022	0	+2	0

Besonders interessant ist das Signal (+)1145, das unter Berücksichtigung der Resultate von Isotopenmarkierungen für PixD und der LmD-Differenzspektren weiterer BLUF-Proteine, einem konservierten Rest in Umgebung des W91 zuzuordnen wäre. Dies schränkt mögliche Kandidaten auf T38, E53 und R86 ein. Arginin wurde aufgrund der für (+)1145 festgestellten, nur schwachen Kopplung an Stickstoffatome ausgeschlossen. Zu dieser Aminosäure passen, wie auch zu Threonin, zudem nur weitere Banden des Dunkelzustandes (Tab. V-J). Für eine gesicherte Zuordnung der Schwingung zu E53 muss jedoch die Deuterierungssensitivität und das Vorkommen eines vergleichbaren Signals im FT-IR Differenzspektrum von PapB geprüft werden.

Tab. V-J – Mögliche Zuordnung der (+)1145 cm^{-1} Bande zu T38, E53 oder R86

In den PixD-Mutanten W91A, W91F und S28A verschobene Banden wurden mit bekannten Schwingungsfrequenzen von Threonin, Glutamat und Arginin verglichen (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002; Wolpert & Hellwig, 2006), um den Ursprung der Bande (+)1145 cm^{-1} näher bestimmen zu können. Gelb unterlegt sind Banden mit Beteiligung von Flavinschwingungen.

Rest, Frequenz [cm^{-1}]	W91F	W91A	S28A	Frequenz [cm^{-1}]	Schwingungsform
T38					
(-)1463	-10	0	+1	1456	$\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
(-)1402	0	-2	-5	1385	$\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$
(-)1345	0	-1	+2	1339, 1355	$\rho(\text{CH}), \delta(\text{CH})$
(-)1317	0	+2	-1	1317	$\delta(\text{CH})$
(-)1279	-13/+10?	+2	-1	1270	$t(\text{CH}), \delta(\text{CH})$
(-)1250	-3	-3	-2	1255	$\delta(\text{C-OH})$
(+)1145	+9	+9	0	1185	$\rho(\text{CH}), \nu(\text{CC}), \delta(\text{OH})$
(-)1179	0	0	-3	1157	$\delta(\text{C-OH}), \rho(\text{CH}_3)$
(-)1101	-1	-8	-2	1115	$\nu(\text{C-O})$
(-)1055	+2	+5	?	1044	$\nu(\text{C-O}), \delta(\text{OH})$
(-)1036	+5	+7	+6	1044	$\nu(\text{C-O}), \delta(\text{OH})$
E53					
(+)1566	-3	(-3, -6?)	-6	1556 – 1560	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
(+)1545	-2	+7	-6	1556 – 1560	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
(+)1436	-2	-2	0	1440	$\delta(\text{CH}_2)$
(+)1409	-3	-3	-5	1404	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$
(+)1353	+1	+4	0	1359, 1349	$\gamma_{\text{w}}(\text{CH}_2)/\nu(\text{CO}), \delta(\text{CH})$
(+)1271	+3	+3	0	1292, 1289, 1266	$\gamma_{\text{w}}(\text{CH}_2)/\delta(\text{CH}_2), \nu(\text{CC})/\delta(\text{CH}_2)$
(+)1258	-1	0	-1	1266	$\delta(\text{CH}_2)$
(+)1221	-2	-6	-1	1233	$\delta(\text{CH}_2)$
(+)1145	+9	+9	0	1162	$t(\text{CH}_2), \delta(\text{CH})$
(-)1101	-1	-8	-2	1119	$\delta(\text{CH})$
R86					
(-)1516	0, (+)1505 neu	+1	0	1522	$\delta(\text{NH}_3^+)$
(-)1463	-10	0	+1	1475	$\delta(\text{CH}_2)$
(-)1345	0	-1	+2	1330	$\delta(\text{CH})$
(+)1145	+9	+9	0	1173	$\delta(\text{C-O})$
(-)1055	+2	+5	?	1052	$\nu(\text{CN})$
(-)1036	+5	+7	+6	1052	$\nu(\text{CN})$

Basierend auf der räumlichen Nähe der untersuchten Positionen und Signalverschiebungen in den W91- und der S28-Mutante wurde die Beeinträchtigung eines gemeinsamen Wasserstoffbrückennetzwerkes angenommen, das die α 1-Helix und den β 5-Strang miteinander verbindet und wahrscheinlich in die Leitung der Signaltransduktion an die Proteinoberfläche eingebunden ist. Vor allem die W91 umgebenden Aminosäuren gehen aus der Kristallstruktur als potenzielle Brückenbildner hervor, die außerdem eine Verbindung zur Flavinbindetasche herstellen können.

Tab. V-K – Mögliche Zuordnung von frequenzveränderten Schwingungen in PixD-W91A, -W91F und -S28A
Eingetragen sind Schwingungen, die Glutamin-, Methionin- oder Serinsignaturen (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002; Wolpert & Hellwig, 2006) ähneln und in den Mutanten eine Frequenzänderung erfuhren Gelb unterlegt sind Banden mit Beteiligung von Flavinschwingungen.

Rest, Frequenz [cm ⁻¹]	W91F	W91A	S28A	Frequenz [cm ⁻¹]	Schwingungsform
Q94					
(+)1424	-3	(0/-16)	(0/-8)	1411	$\delta(\text{CH}_2)$
(+)1409	-3	-3	-5	1410, 1411	$\nu(\text{CN}), \delta(\text{CH}), \nu(\text{CC})$
(+)1359	-1	(+8?)	-3	1359	$\delta(\text{CH})$
(+)1353	+2	+4	0	1350, 1359, 1363	$\delta(\text{CH}), \nu(\text{CC})$
(-)1345	0	-1	+2	1350, 1359, 1363	$\delta(\text{CH}), \nu(\text{CC})$
(+)1046	+3	+3	?	1052	$\nu(\text{CC})$
(-)1010	+2	+2	-4	Kopplung Q50-NH mit $\nu(\text{N5C5a}), \nu(\text{N5C4a})$	
S92					
(+)1409	-3	-3	-5	1409	$\delta(\text{CH}_2)$
(+)1353	+1	+4	0	1340,1352	$\rho(\text{CH}), \delta(\text{CH})$
(+)1271	+3	+3	0	1307	$\delta(\text{CH})$
(+)1258	-1	0	-1	1259	$t(\text{CH}_2), \delta(\text{CH})$
(+)1240	(- X)	0	0	1236	$\nu(\text{COH})$
(+)1145	+9	+9	0	1121,1152	$\nu(\text{CO}), \nu(\text{COH}), \rho(\text{CH}_3)$
(-)1055	+2	+5	?	1054, 1035	$\nu(\text{CO}), \delta(\text{OH})$
(+)1046	+3	+3	?	1030	$\nu(\text{CO})$
M93					
(+)1436	-2	0	+1	1444, 1432	$\delta(\text{CH}_2)/ \nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
(+)1353	+2	4	0	1348, 1332	$\delta(\text{CH}), \nu_s(\text{CH}_3)$
(-)1250	-3	-3	-2	1246, 1194	$\rho(\text{CH}_2)$
(-)1101	-1	-8	-2	1090	$\nu(\text{CN}), \beta(\text{HNC})$
(-)1055	2	+5	?	1072	$\nu(\text{CC})$

Im Vergleich zu den Signalen, die bei Isotopenmarkierung von Glutaminen eine Frequenzminderung erfuhren, wird deutlich dass Q94 wahrscheinlich nicht an Umstrukturierungen in den betrachteten Mutanten beteiligt ist. Dagegen stimmten auffällig viele verschobene Banden mit Schwingungssignaturen von Serin überein, auch wenn S92 kein Ursprung des 1145 cm⁻¹ Maximums sein dürfte (Tab. V-K). Wiederum waren mit überwiegender Mehrheit Banden des Lichtzustandes durch die W91F-Substitution verschoben, wobei in höherfrequenten Regionen CH-Biegeschwingungen auftreten (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002; Wolpert & Hellwig, 2006).

Ihnen könnten die Maxima 1409, 1353, 1271 und 1258 cm^{-1} zugeordnet werden, die mit Verschiebungen um 1 - 3 cm^{-1} (Abb. III-15) sowohl eine geringe Stärkung intramolekularer Schwingungen als auch eine leichte Abnahme der Frequenzen benachbarter Bindungen andeuteten. Die funktionale Gruppe der Serinseitenkette absorbiert um 1236, 1121/1152, 1054/1035 sowie 1030 cm^{-1} (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002; Wolpert & Hellwig, 2006) und ist potenzieller Verursacher der Signale (+)1241, (+)1145, (-)1055 und (+)1046 des PixD-Differenzspektrums. Bis auf 1241 cm^{-1} , wo Signaturen des Flavins überlagern, erfahren diese Banden im P_{red} der W91F-Variante eine Frequenzerhöhung, die an eine Reduktion der Wasserstoffbrückenbindung am S92-OH gebunden wäre (Tab. V-K). Putative Methionin-Signaturen sind (+)1436 [1444/1432 cm^{-1} : $\delta(\text{CH}_2)/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$], (+)1353 [1348/1332 cm^{-1} : $\delta(\text{CH})$, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$], (-)1250 [1246/1194 cm^{-1} : $\gamma_{\text{t}}(\text{CH}_2)$] und (-)1055 [1072 cm^{-1} : $\nu(\text{CC})$] (Barth, 2000; Barth & Zscherp, 2002; Wolpert & Hellwig, 2006), die wiederum nur schwache Frequenzänderungen bis 3 cm^{-1} erfahren (Abb. III-15, Tab. V-K). Auch hier würde eine Kombination aus Stärkung und Schwächung von Bindungen in Dunkel- und Lichtzustand auftreten, die ohne Informationen über die SH-Schwingungen jedoch nicht eindeutig interpretierbar sind. Änderungen der Streckschwingungen in Thiolgruppen müssen in zukünftigen Experimenten durch Betrachtungen der Infrarotregion 2000 bis 3000 cm^{-1} spezifiziert werden.

V.9 Lichtinduzierte Konformationsänderungen von Asparaginen

Die Asparagine N31 und N32 in der Flavinbindetasche von PixD sind an der Koordination des Chromophors beteiligt. Einige Autoren vermuten außerdem eine aktive Rolle dieser Positionen in der BLUF-Photochemie. So postulieren Jung *et al.*, 2006 für N32 eine konformationelle Änderung beim Übergang in den Lichtzustand, die von QM/MM-Simulationen an BlrB unterstützt werden (Sadeghian *et al.*, 2008). Die errechneten Grund- und Signalzustände zeigen eine Verkürzung des O4-N32-Amid-Abstandes um 0,3 Å. Eine Umordnung, welche die Ausbildung der Z-Konformation des Q51-Enols und die Reorientierung von W92 zu Q51 begleiten sollte. Zudem zeigt die Seitenkettenresonanz des zu PixD-N31 homologen H44 in der NMR-Struktur von AppA eine große lichtinduzierte Verlagerung, die als Stärkung der Wasserstoffbrückenbindung am H δ 1 interpretiert wird (Grinstead *et al.*, 2006b). Die Wechselwirkung dieses Restes mit dem C202 und dem Phosphatanteil des FAD würden demnach stärker. Eine Annäherung der N32 Seitenkette an das C4-Carbonyl oder Stärkung der Wasserstoffbrücke an N31 würden die NH₂-Schwingungen der Asparagin-Seitenkette verringern. Sie sind bei 1612 - 1622 δ (NH₂), 1271 und 1314 ν (C-NH₂) sowie 1121 ρ (NH₂) cm⁻¹ zu erwarten (Barth & Zscherp, 2002; Wolpert & Hellwig, 2006) und wären durch Markierungsmuster für Asparagine in PixD identifizierbar.

Die putativen Szenarien für beide Reste der Flavinbindetasche wurden von Helena Steinocher in FT-IR Studien an global ¹⁵N-Amid-Asparagin-markiertem Protein ausgeschlossen (Steinocher, 2013). Im Einklang mit ihren Ergebnissen konnten auch durch eine inverse Markierung keine aminosäurespezifischen Banden im Differenzspektrum gefunden werden. Signale stickstoffhaltiger Schwingungen der Asparagine sollten durch dieses Isotopenmusters nicht oder geringer verschoben sein als in der ¹⁵N-Markierung. Im Vergleich beider Spektren wiesen nur vier Signale dieses Verhalten auf (Abb. V-11). Hierzu zählen die Lichtzustandsschwingungen bei 1447, 1144 und 1047 cm⁻¹ sowie die negative Bande mit Minimum bei 1345 cm⁻¹. All diese Schwingungen erfuhren jedoch auch durch die ¹⁵N-RF-Markierung keine, oder nur sehr geringe, Frequenzminderungen und wurden anhand der Apoprotein- und Flavinmarkierungen hauptsächlich CC-, CH- oder C-OH-Bindungen zugeordnet. Darunter wurde (-)1345 als Flavin ν (C5aC6)/ ρ (CH3) Schwingung identifiziert und (+)1047 zeigte keine Änderungen in den angefertigten Isotopenmustern. Nur für das Signal bei (+)1145 ließ sich eine Kopplung an Stickstoffatome vermuten. Es war durch die ¹⁵N-N-Markierung minimal schwächer verschoben als im Spektrum des ¹⁵N-Proteins, zeigte aber keine Sensitivität gegenüber der Selektivmarkierung (M.Sc. H. Steinocher) und ist wahrscheinlich nicht mit Asparagin assoziiert. Die geringere Frequenzminderung der Bande geht daher auf die starke Isotopenstreuung des Restes in andere Aminosäuren zurück (Abb. V-12).

Diese Daten unterstützen die zuvor festgestellte, qualitativ unveränderte Konformation und Interaktion der Asparagin-Seitenketten im lichtaktivierten PixD. Auftretende Umordnungen könnten jedoch transient sein oder nicht detektierbare Änderungen von Wasserstoffbrücken beinhalten.

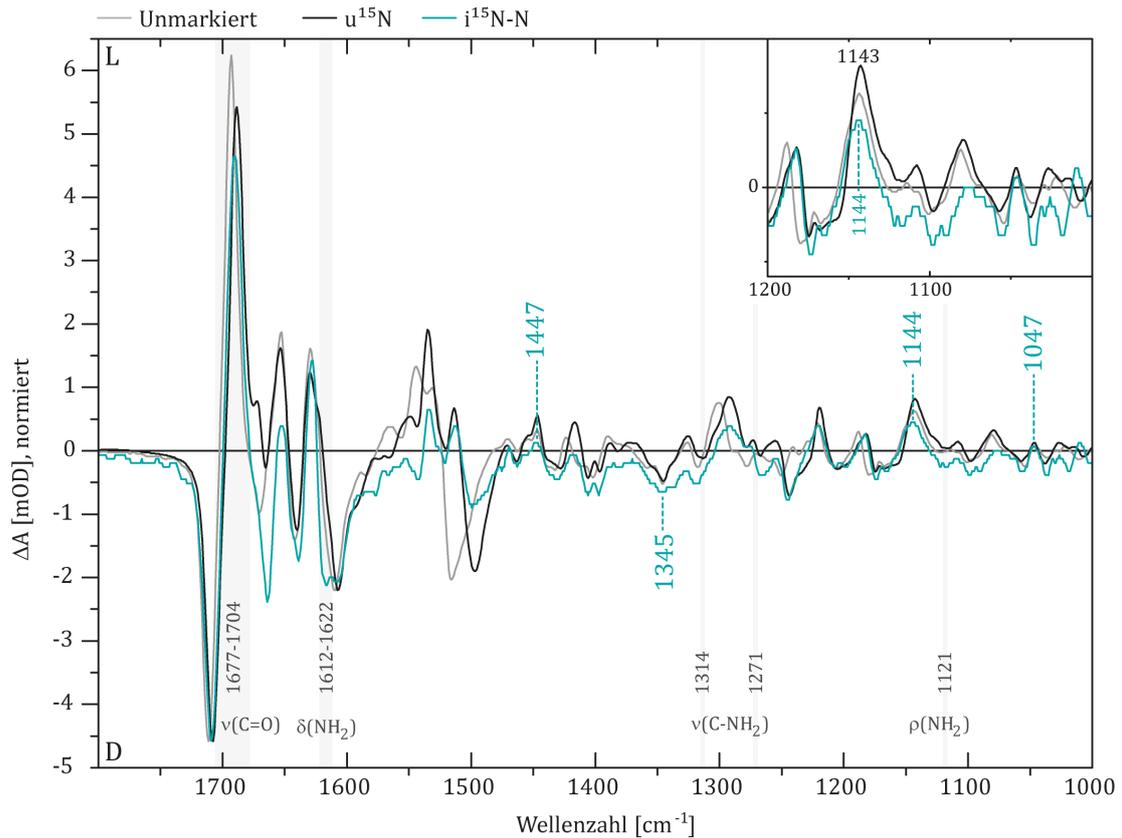


Abb. V-11 - LMD-Differenzspektrum einer inversen ^{15}N -Asn-Markierung

Zur Identifizierung unbeeinflusster Signale sind die Differenzspektren des unmarkierten und des uniform ^{15}N -markierten Wildtyps, unter Normierung auf (-)1712 des $i^{15}\text{N}$ -N-Musters, vergleichend aufgetragen. Analog zu den Ergebnissen von Steinocher, 2013 konnten keine Schwingungsänderungen von Asparaginen beobachtet werden. Zwischen 1160 - 1253 cm^{-1} werden Schwingungsabsorptionen von Aspartat und Glutamat erwartet (Barth & Zscherp, 2002). Möglicherweise lässt sich das nicht verschobene Signal bei 1145 cm^{-1} daher Aspartat zuordnen, welches aufgrund von Isotopenstreuung aus Asparagin unmarkiert blieb.

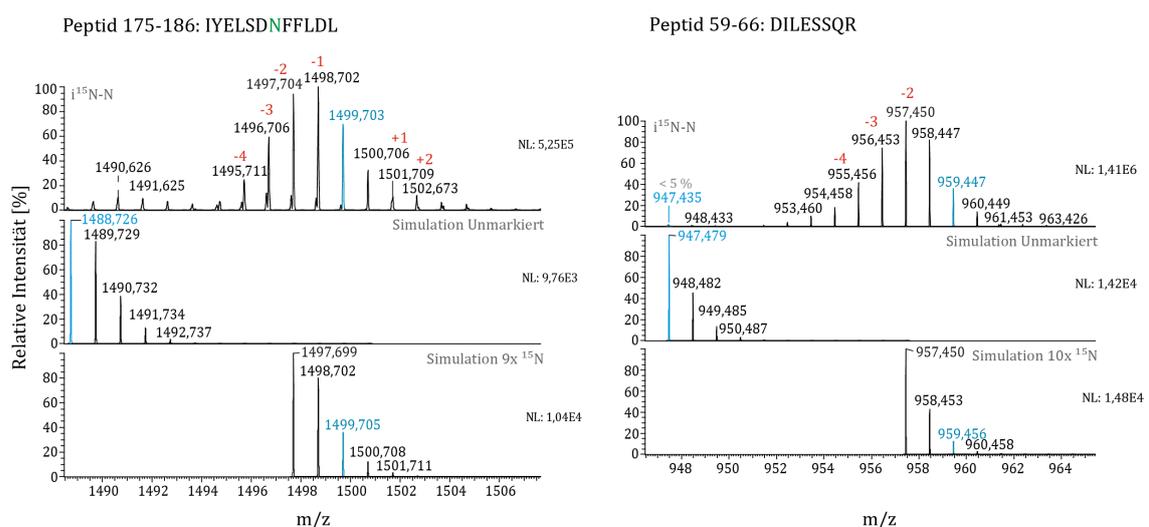


Abb. V-12 - Massenspektrum zweier Peptide der $i^{15}\text{N}$ -N-Markierung von *PixD*

Trotz zusätzlicher Deletion des L-Asparaginase codierenden Gens *iaaA* konnte die Isotopenstreuung von Asparagin gegenüber dem von Helena Steinocher erzielten Ergebnis kaum verbessert werden. Hierdurch entstanden für das inverse Muster vor allem untermarkierte Proteine in variierenden Graden. FTMS+MALDI (200 - 4000), links Mittel aus 53 Spektren, rechts Mittel aus 67 Spektren, NL = *Normalized largest*

V.10 Varianz der Infrarotspektren

In den IR-Messungen konnte sowohl für die technischen Replikate der Markierungen, als auch für die biologischen Replikate des unmarkierten Proteins Varianz unter den Messungen beobachtet werden. Ursächlich sind vor allem Evaporation von Wasser und Fluktuationen in der Luftfeuchtigkeit (Abb. V-14). Ein Einfluss von Proteinkontaminationen wurde durch die Aufnahme des LmD-Differenzspektrums einer Gelfiltrations-gereinigten Probe weitestgehend ausgeschlossen (Abb. V-13, Spektrum 5). Aufgrund der unterschiedlichen *Knock-outs* können die Verunreinigungen in den einzelnen Auxotrophen jedoch variieren.

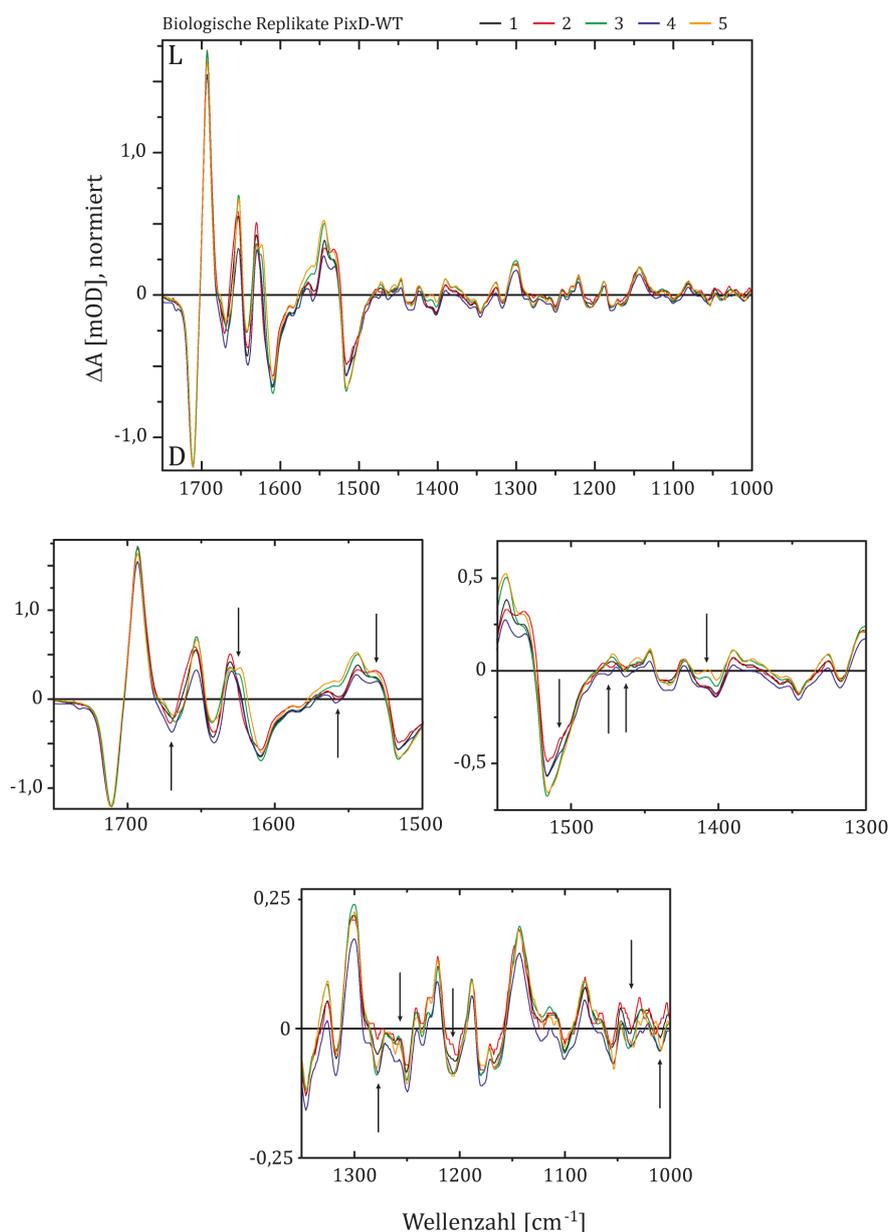


Abb. V-13 – Natürliche Varianz der Infrarot-Signale zwischen 1000 - 1800 cm^{-1} im PixD-WT

Unter fünf biologischen Replikaten betreffen Abweichungen die Banden (-)1670, (+)1623, (+)1475, (-)1461, (+)1409, (+)1287, (+)1271, (-)1206 und (-)1010, deren Extrema um bis zu $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ abweichen. Schwache Frequenzänderungen dieser Schwingungen müssen in Spektren isotopenmarkierter Proben kritisch analysiert werden, da sie neben Unterschieden in der Hydratisierung, inhomogene Konformationen von Dunkel- und Lichtzustand widerspiegeln könnten.

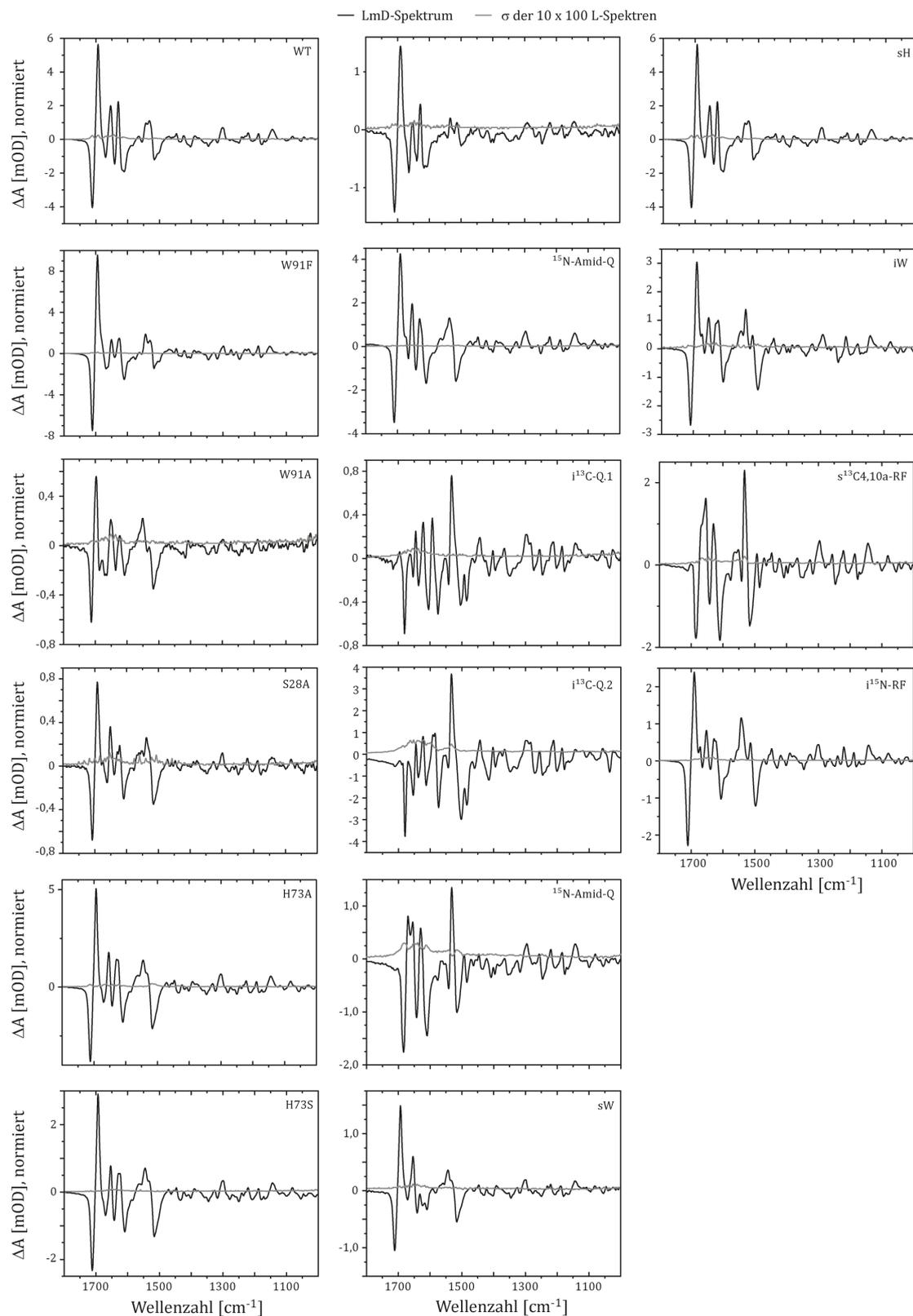


Abb. V-14 – Experimentelle Varianz der gemessenen LmD-Spektren

Neben den Abweichungen unter biologischen Replikaten, tritt bei Evaporation auch eine Streuung in den technischen Replikaten auf. Zur Einschätzung des Einflusses fluktuierender Wasserkonzentrationen in den Proben, ist repräsentativ die Standardabweichung σ der Lichtzustandsspektren zusammen mit dem finalen LmD-Spektrum aufgetragen.

V.11 Effekt von Imidazol auf thermodynamische Parameter von PixD und Mutanten

Zusätzlich zur Berechnung der Aktivierungsenergie nach Arrhenius, wurden auch die korrespondierenden Eyring-Plots angefertigt (Abb. V-15). Aus den extrapolierten Schnittpunkten der Graphen mit der y-Achse (n) sowie den Steigungen (m) der linearen Fits beschrieben durch $y = mx+n$ ließen sich die Aktivierungsentropie ΔS und die Aktivierungsenthalpie ΔH nach den Formeln (5) und (6) berechnen.

$$(5) \quad \Delta S = \left(n - \ln \left(\frac{k'}{h} \right) \right) \times R$$

$$(6) \quad -\Delta H = m \times R$$

Dabei sind

k' die Boltzmann-Konstante $1,380 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$

h die Planck-Konstante $6,626 \times 10^{-34} \text{ J s}$

R die Molare Gaskonstante $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

Da gilt: $(7) \quad \Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger,$

konnte anschließend die freie Enthalpie ΔG bei 25 °C (298 K) berechnet werden. Weil die graphische Bestimmung von ΔS als Schnittpunkt von Graph und y-Achse im Eyring-Plot eine starke Extrapolation benötigt, ist die Genauigkeit jedoch niedrig.

Die thermodynamischen Parameter machen deutlich, dass in PixD die geringe Aktivierungsenergie durch eine stark negative und daher unvorteilhafte Entropie ausgeglichen wird. Die erhaltenen Werte der Aktivierungsenthalpie decken sich erwartungsgemäß mit den berechneten Aktivierungsenergien, wobei Abweichungen aus der größeren Unsicherheit des Eyring-Plots resultieren. PixD ähnelt damit der McLOV-Domäne (El-Arab *et al.*, 2015). Die H73-Substitutionen änderten diese Eigenschaften nur geringfügig. Wie schon aus den Arrhenius-Plots hervorgeht, wies die W91F-Variante dagegen eine stark erhöhte Aktivierungsenergie und -enthalpie auf, wodurch die enorm verlangsamte Rückkehrkinetik dieser Proteinvariante entsteht. Imidazol wirkt ausschließlich auf die Aktivierungsentropie ein. Für PixD-H73A und -H73S wurde eine Zunahme festgestellt, welche den beschleunigenden Effekt auf die Dunkelrelaxationen erklärt. Mit steigender Imidazolkonzentration nimmt ΔS für PixD-W91F hingegen ab.

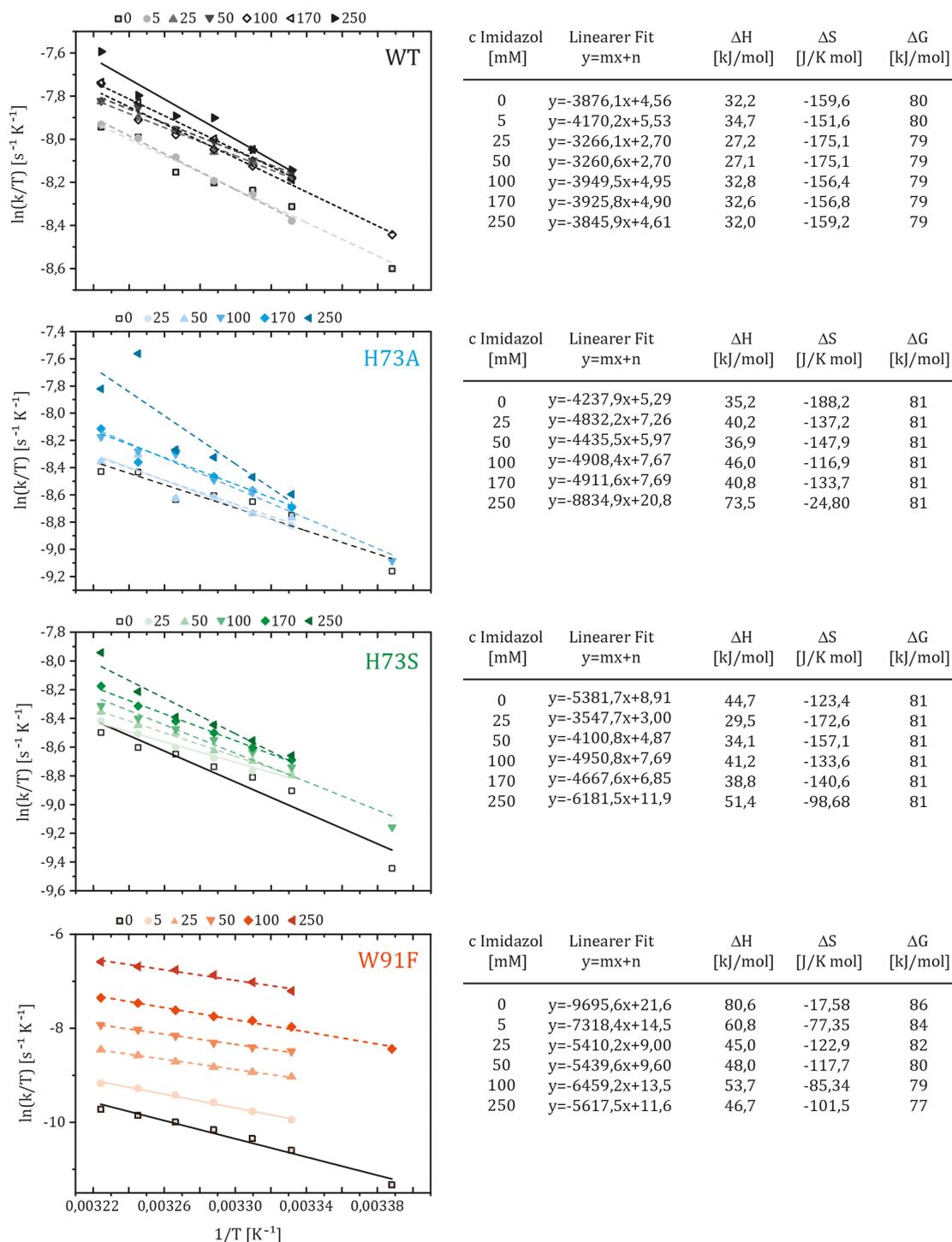


Abb. V-15 – Einfluss von Imidazol auf die thermodynamischen Größen von PixD-WT und Mutanten

Aktivierungsenthalpie ΔH und -entropie ΔS wurden wie unter V.9 beschrieben aus den linearen Fits der Eyring-Plots entnommen. Diese sind für alle Imidazolkonzentrationen zusammen mit den errechneten Werten für ΔH , ΔS und der resultierenden freien Enthalpie in den nebenstehenden Tabellen erfasst. Es wird deutlich, dass Imidazol einen leicht beschleunigenden Effekt auf die H73-Mutanten ausübt, weil es eine größere Unordnung des Übergangszustandes erzeugt. Die scheinbar erhöhte Aktivierungsenthalpie ΔH der H73A-Mutante bei 250 mM Imidazol geht nur auf den stark abweichenden Messwert 2 zurück. In PixD-W91F wirkt Imidazol hingegen als Katalysator und unterstützt die Dunkelrückkehr durch Senkung der Aktivierungsenergie E_a . Dies spiegelt sich in der abnehmenden Aktivierungsenthalpie bei steigender Imidazolkonzentration wider. Da ein Katalysator keinen Einfluss auf den Energiestatus von Edukt und Produkt ausübt, ist die schwach abfallende Tendenz der freien Enthalpie wahrscheinlich auf die rechnerische Unsicherheit zurückzuführen.

VI. Abkürzungsverzeichnis

BLUF	<i>sensor of Blue Light Using FAD</i>
bp	Basenpaar(e)
c-di-GMP	zyklisches Diguanylatmonophosphat
FT-IR	Fourier-Transformations Infrarot-Spektroskopie
i	invers
IR	Infrarot
LmD	Licht-minus-Dunkel
LOV	<i>Light-Oxygen-Voltage</i> Sensoren
MW	<i>Molecular Weight</i> , Molekulargewicht
OD ₆₀₀	Optische Dichte einer Zellsuspension gemessen bei 600 nm
P	Dunkelzustand der BLUF-Domäne
P _{red}	Lichtzustand der BLUF-Domäne
PCET	<i>proton coupled electron transfer</i> , gekoppelter Protonen-Elektronen-Transfer
R	Rest
RF	Riboflavin
RT	Raumtemperatur
s	selektiv
u	uniform
ÜN	Über Nacht
QM/MM	Quantum Mechanischen und Molekular Mechanischen Simulationen
WT	Wildtyp

Ein-/Dreibuchstabencode der proteinogenen Aminosäuren in E. coli

A	Ala	Alanin			
R	Arg	Arginin			
N	Asn	Asparagin			
D	Asp	Asparaginsäure/Aspartat			
C	Cys	Cystein	U	Sec	Selenocystein
G	Gly	Glycin			
Q	Gln	Glutamin			
E	Glu	Glutaminsäure/Glutamat			
H	His	Histidin			
I	Ile	Isoleucin			
L	Leu	Leucin			
K	Lys	Lysin			
M	Met	Methionin			
F	Phe	Phenylalanin			
P	Pro	Prolin			
S	Ser	Serin			
T	Thr	Threonin			
W	Trp	Tryptophan			
Y	Tyr	Tyrosin			
V	Val	Valin			

Schwingungsformen

nach Barth & Zscherp 2002; Wolpert & Hellwig 2006 und Masuda *et al.* 2004

ν	Streckschwingung
δ	Deformationsschwingung in der Ebene (<i>in plane</i> , ip)
ρ	<i>rocking</i> Schwingung
β	<i>scissoring</i> Schwingung
γ	Deformationsschwingung aus der Ebene (<i>out of plane</i> , oop)
t	<i>twisting</i> Schwingung
w	<i>wagging</i> Schwingung
as	asymmetrisch
s	symmetrisch

Isotopenmuster

u ¹³ C	Ersatz der Kohlenstoffatome des Holoproteins durch das Schwerisotop
u ¹⁵ N	Ersatz der Stickstoffatome des Holoproteins durch das Schwerisotop
i ¹³ C-RF	Ersatz der Kohlenstoffatome des Apoproteins durch das Schwerisotop
i ¹⁵ N-RF	Ersatz der Stickstoffatome des Apoproteins durch das Schwerisotop
u ¹³ C-RF	Ersatz der Kohlenstoffatome des Chromophors durch das Schwerisotop
u ¹⁵ N-RF	Ersatz der Stickstoffatome des Chromophors durch das Schwerisotop
s ¹³ C4,10a-RF	Ersatz der Kohlenstoffatome C4 und C10a im Isoalloxazinring des Chromophors durch das Schwerisotop
s ¹⁵ N-Amid-Q	Ersatz des Stickstoffatoms im Seitenkettenamid aller Glutamine durch das Schwerisotop
i ¹³ C-Qv2	Ersatz der Kohlenstoffatome des Apoproteins durch das Schwerisotop, mit Ausnahme der Kohlenstoffatome in Glutaminen
s ¹⁵ N-Amid-Q- s ¹³ C4,10a-RF	Ersatz des Stickstoffatoms im Seitenkettenamid aller Glutamine durch das Schwerisotop und Ersatz der Kohlenstoffatome C4 und C10a im Isoalloxazinring des Chromophors durch das Schwerisotop
s ¹³ C2-RF	Ersatz des Kohlenstoffatoms C2 im Isoalloxazinring des Chromophors durch das Schwerisotop
s ¹⁵ N5-RF	Ersatz des Stickstoffatoms N5 im Isoalloxazinring des Chromophors durch das Schwerisotop
sH	Ersatz der Kohlen- und Stickstoffatome aller Histidine durch das Schwerisotop
sW	Ersatz der Kohlen- und Stickstoffatome aller Tryptophane durch das Schwerisotop
i ¹⁵ N-N	Ersatz der Stickstoffatome des Apoproteins durch das Schwerisotop, mit Ausnahme der Stickstoffatome in Asparaginen
i ¹⁵ N-W	Ersatz der Stickstoffatome des Apoproteins durch das Schwerisotop, mit Ausnahme der Stickstoffatome in Tryptophanen

VII. Abbildungsverzeichnis

Abb. I-1- Strukturformel von Riboflavin, seinen Derivaten und Redoxzustände des Isoalloxazinringes	3
Abb. I-2 - Vergleich der Aminosäuresequenzen von 11 intensiv studierten BLUF-Kerndomänen	5
Abb. I-3 – Tertiärstruktur von PixD	5
Abb. I-4 – Physiologische Funktion bisher untersuchter, natürlich vorkommender* BLUF-Proteine	8
Abb. I-5 – Modell der Regulation von Phototaxis in <i>Synechocystis</i>	10
Abb. I-6 – Kristallstruktur des decameren Komplexes von PixD	11
Abb. I-7 – Möglicher Photozyklus der BLUF-Domänen am Beispiel von PixD (<i>Slr1694</i>)	13
Abb. I-8 – Mögliche Dunkel- und Lichtzustandskonformationen ausgewählter Aminosäurereste der Flavinbindetasche	15
Abb. I-9 – Licht-minus-Dunkel-Differenzspektrum von PixD und Signalverschiebung durch schwere Isotopen ..	18
Abb. II-1 – Routine für die Software Tecan i.Control zur OD-Bestimmung in Wachstumsassays	25
Abb. III-1 – Expression von <i>AtUVR8</i> und <i>bPAC</i> in <i>E. coli CmpX13</i> unter Hochzellbedingungen	40
Abb. III-2 – Aminosäureverbrauch der charakterisierten <i>E. coli</i> Mutanten	42
Abb. III-3 – Frequenzbereich 1600 - 1730 cm^{-1} von uniformen und inversen Isotopenmarkierungen des Chromophors in PixD	50
Abb. III-4 – Detailansicht für die Frequenzänderungen der Signale (-)1670 und (+)1653 cm^{-1}	51
Abb. III-5 – Frequenzbereich 1350 - 1600 cm^{-1} selektiver und inverser Riboflavinmarkierungen	52
Abb. III-6 – Detailansicht für die Frequenzänderungen der Signale (+)1447, 1424 und (-)1402 cm^{-1}	54
Abb. III-7 – Frequenzbereich 1000 - 1350 cm^{-1} selektiver und inverser Riboflavinmarkierungen	55
Abb. III-8 – Potenzielle Änderungen der Wasserstoffbrückenkonfiguration um Q50	57
Abb. III-9 – ^{15}N -Amid-Glutaminmarkierung von PixD	59
Abb. III-10 – $i^{13}\text{C}$ -Q-Markierungen im Vergleich zu den $u^{13}\text{C}$ -Mustern für Apoprotein (blau) und Flavin (gelb) ..	61
Abb. III-11 – Doppelmarkierung mit $^{13}\text{C}_4,10\alpha$ - RF und ^{15}N -Amid-Glutamin	64
Abb. III-12 – Vergleich der Doppeldifferenzspektren bei ^{15}N -Markierung der Glutaminseitenkettenamide	65
Abb. III-13 – Umgebung von W91 in der in- und out-Konformation	67
Abb. III-14 – Selektives Markierungsmuster für W91 in PixD	69
Abb. III-15 – FT-IR LmD-Differenzspektren zweier W91-Substitutionen	71
Abb. III-16 – Detailansicht der Amid I Signale und der 1145 cm^{-1} Region in PixD-W91A	74
Abb. III-17 – PixD-S28A im Vergleich zu den W91-Mutanten	76
Abb. III-18 – Evolution der fs-Absorptionsspektren von PixD-Q50A und -Q50A W91A	78
Abb. III-19 – Uniforme Markierung der Histidine in PixD	80
Abb. III-20 – H73-Substitutionen in PixD	82
Abb. III-21 – UV/vis-spektroskopische Untersuchungen der H73A und H73S-Mutanten im Vergleich zum WT ..	83
Abb. III-22 – Imidazolabhängigkeit der H73A und H73S-Mutanten im Vergleich zum WT	84
Abb. III-23 – Imidazolabhängigkeit der Dunkelrelaxation von PixD-W91F	86
Abb. IV-1 – Vergleich des LmD-Spektrums mit den Messungen der Arbeitsgruppe von Dr. Shinji Masuda	90
Abb. IV-2 – Schwingungsänderungen des Flavin-Chromophors in PixD	92
Abb. IV-3 – Putativer Protonentransfer über H72	95
Abb. IV-4 – Potenzielle Ursprünge von Schwingungen mit Frequenzänderungen bei W91-Substitution	97
Abb. IV-5 – Mögliche Zuordnung der Amid I und II Signale zu Sekundärstrukturelementen	98
Abb. IV-6 – Potenzielle Änderungen der Wasserstoffbrücken zwischen β_2 und β_5 sowie der Schleifenregion ..	101
Abb. IV-7 – Konformationelle Änderungen im β_5 -Strang bei Simulation eines +1-Registershifts	102
Abb. IV-8 – Der Photozyklus von PixD in Abwesenheit von Q50	104
Abb. IV-9 – Dunkelrelaxation von PixD	106

Abb. IV-10 – Geschwindigkeitsregulierende Aminosäuren der BLUF-Domänen.....	107
Abb. IV-11 – Konformationen des S28 in PixD	109
Abb. IV-12 – Putative Ursprünge der in W91-Mutanten verschobenen Differenzsignale	111
Abb. IV-13 – Änderungen der Bandenzuordnung im LmD-Differenzspektrum von PixD.....	114
Abb. IV-14 – Mögliche Wasserstoffbrückennetzwerke der Flavinderetasche im PixD Licht- und Dunkelzustand	116
Abb. IV-15 – Modell der intra- und intermolekularen Signalweiterleitung von PixD.....	118
Abb. V-1 – Schematischer Ausschnitt des Umwandlungsnetzwerks proteinogener Aminosäuren in <i>E. coli</i>	124
Abb. V-2 – Massenspektrum von ¹³ C4,10a-markierten Flavinen aus <i>i</i> ¹³ C-Q,2-PixD	125
Abb. V-3 – Massenspektrum von Flavinen aus <i>s</i> ¹⁵ N-Amid-Q-PixD	126
Abb. V-4 – Massenspektrum zweier Peptide und des Chromophors von <i>i</i> ¹⁵ N-RF-PixD	128
Abb. V-5 – Massenspektrum zweier Peptide der <i>s</i> ¹⁵ N-Amid-Q-Markierung in PixD	128
Abb. V-6 – Massenspektren inverser ¹³ C-Q-Markierungen und der <i>s</i> ¹³ C4,10a-RF , <i>s</i> ¹⁵ N-Amid-Q-Markierung	129
Abb. V-7 – Massenspektren der Tryptophan-Markierungen	130
Abb. V-8 – Massenspektrum zweier Peptide der sH-Markierung von PixD.....	130
Abb. V-9 – Fremdproteine in der SDS-PAGE eines sH-Isolats nach Coomassie-Färbung	131
Abb. V-10 - LmD-Differenzspektren selektiver Markierungen des C2-Atoms (A, B) und des N5-Atoms (C, D) im Chromophor	136
Abb. V-11 - LmD-Differenzspektrum einer inversen ¹⁵ N-Asn-Markierung	145
Abb. V-12 - Massenspektrum zweier Peptide der <i>i</i> ¹⁵ N-N-Markierung von PixD.....	145
Abb. V-13 – Natürliche Varianz der Infrarot-Signale zwischen 1000 - 1800 cm ⁻¹ im PixD-WT.....	146
Abb. V-14 – Experimentelle Varianz der gemessenen LmD-Spektren.....	147
Abb. V-15 – Einfluss von Imidazol auf die thermodynamischen Größen von PixD-WT und Mutanten.....	149

VIII. Tabellenverzeichnis

Tab. I-A– Bekannte Photorezeptorfamilien, in denen Blaulichtsensoren vorkommen	2
Tab. II-A – Im Rahmen dieser Arbeit benutzte Bakterienstämme und Mutanten	21
Tab. II-B– Verwendete Plasmide und Vektoren.....	23
Tab. II-C - Für die <i>E. coli</i> Kultivierung verwendete Komplex- und Minimalmedien	24
Tab. II-D –Weitere Zusätze und Lösungen für die Fermentation von <i>E. coli</i> Zellen.....	26
Tab. II-E – Oligonukleotide zum Knock-out ausgewählter Loci des <i>E. coli</i> Chromosoms.....	29
Tab. II-F –Oligonukleotide zum Nachweis korrekter Gendeletion in Knock-out Mutanten	30
Tab. II-G –Oligonukleotide zur Einführung von Punktmutationen	32
Tab. II-H – Oligonukleotide zur Sequenzanalyse	32
Tab. II-I – Pufferzusammensetzungen für die Proteinisolation	33
Tab. II-J – Lösungen für SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung	34
Tab. III-A - Eigenschaften der auxotrophen <i>E. coli</i> Stämme.....	41
Tab. III-B - Angefertigte Isotopenmuster für PixD.....	46
Tab. IV-A – Vorteile der <i>CmpX13</i> -Sammlung	87
Tab. IV-B –Zuordnung der Schwingungen im LmD-Differenzspektrum von PixD	91
Tab. IV-C – Vergleich der Schwingungsänderungen des Flavin-C4-Carbonyls sowie der Amid I und II Banden in den untersuchten Mutanten von PixD	108
Tab. V-A – Errechneter Verbrauch Aminosäure-auxotropher <i>E. coli</i> Mutanten.....	123
Tab. V-B - Mögliche Proteinkontaminationen in IMAC-gereinigten PixD-Proben.....	132
Tab. V-C - Unterscheidung der Schwingungssignaturen von Chromophor und Apoprotein	133
Tab. V-D – Putative Seitenkettenschwingungen in der Fingerprint Region des PixD Differenzspektrums.....	134
Tab. V-E - Zusammenfassung der Signalverschiebungen für die Glutaminmarkierungsmuster	137
Tab. V-F – Signale von Glutaminen im Differenzspektrum von PixD	138
Tab. V-G – In Glutamin-Isotopenmustern beobachtete Frequenzverschiebungen von Tyrosin-Signalen	139
Tab. V-H - Putative Schwingungsfrequenzen von W91 in PixD.....	139
Tab. V-I - Zusammenfassung der Frequenzänderungen durch W91A, W91F und S28A-Austausch	140
Tab. V-J – Mögliche Zuordnung der (+)1145 cm ⁻¹ Bande zu T38, E53 oder R86	141
Tab. V-K – Mögliche Zuordnung von frequenzveränderten Schwingungen in PixD-W91A, -W91F und -S28A..	142

IX. Literaturverzeichnis

- Abe M., Kyogoku Y. (1987) Vibrational analysis of flavin derivatives: normal coordinate treatments of lumiflavin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* **43**(8):1027–1037.
- Abe M., Kyogoku Y., Kitagawa T., Kawano K., Ohishi N., Takai-Suzuki A., Yagi K. (1986) Infrared spectra and molecular association of lumiflavin and riboflavin derivatives. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* **42**(9):1059–1068.
- Afonnikov D.A., Kolchanov N.A. (2004) CRASP: a program for analysis of coordinated substitutions in multiple alignments of protein sequences. *Nucleic Acids Research* **32**(Suppl. 2):W64–W68.
- Ahmad M., Cashmore A.R. (1993) HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**(6451):162–166.
- Alexandre M.T.A., Arents J.C., van Grondelle R., Hellingwerf K.J., Kennis J.T.M. (2007) A Base-Catalyzed Mechanism for Dark State Recovery in the *Avena sativa* Phototropin-1 LOV2 Domain. *Biochemistry* **46**(11):3129–3137.
- 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**(22):7998–8005.
- Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology* **2**(1).
- Bachmann B.J. (1972) Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriological Reviews* **36**(4):525.
- Bachovchin W.W., Roberts J.D. (1978) Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy. The state of histidine in the catalytic triad of alpha-lytic protease. Implications for the charge-relay mechanism of peptide-bond cleavage by serine proteases. *Journal of the American Chemical Society* **100**(26):8041–8047.
- Barends T.R.M., Hartmann E., Griese J.J., Beitlich T., Kirienko N.V., Ryjenkov D.A., Reinstein J., Shoeman R.L., Gomelsky M., Schlichting I. (2009) Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature* **459**(7249):1015–1018.
- Barnes M.R., Gray I.C. (2003) *Bioinformatics for geneticists*. John Wiley & Sons.
- Barth A. (2000) The infrared absorption of amino acid side chains. *Progress in biophysics and molecular biology* **74**(3):141–173.
- Barth A., Zscherp C. (2002) What vibrations tell about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* **35**(04):369–430.
- Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Tuchin V.V. (2005) Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm. *Journal of Physics D: Applied Physics* **38**(15):2543–2555.
- Bent, D.V., Hayon, E. (1975) Excited State Chemistry of Aromatic Amino Acids and Related Peptides. III. Tryptophan. *Journal of the American Chemical Society* **97**:2612-2619.
- Berardesca E., Bertona, M., Altabas K., Altabas V., Emanuele E. (2012) Reduced ultraviolet-induced DNA damage and apoptosis in human skin with topical application of a photolyase-containing DNA repair enzyme cream: Clues to skin cancer prevention. *Molecular Medicine Reports* **5**(2): 570-574.
- Bhaya D., Takahashi A., Grossman A.R. (2001) Light regulation of type IV pilus-dependent motility by chemosensor-like elements in *Synechocystis* PCC6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(13):7540–7545.

IX. Literaturverzeichnis

- Bitrian M., González R.H., Paris G., Hellingwerf K.J., Nudel C.B. (2013) Blue-light-dependent inhibition of twitching motility in *Acinetobacter baylyi* ADP1: additive involvement of three BLUF-domain-containing proteins. *Microbiology* **159**(9):1828–1841.
- Blakeley M.P., Langan P., Niimura N., Podjarny A. (2008). Neutron crystallography: opportunities, challenges, and limitations. *Current opinion in structural biology*, **18**(5): 593-600.
- Bloom F.R., Levin M.S., Foor F., Tyler B. (1978) Regulation of glutamine synthetase formation in *Escherichia coli*: characterization of mutants lacking the uridylyltransferase. *Journal of Bacteriology* **134**(2):569–577.
- Blyth A.W. (1879) LVI.—The composition of cows' milk in health and disease. *Journal of the Chemical Society, Transactions* **35**:530–539.
- Bolanos-Garcia V.M., Davies O.R. (2006) Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1760**(9):1304–1313.
- Bonetti C., Mathes T., van Stokkum I.H.M., Mullen K.M., Groot M.-L., van Grondelle R., Hegemann P., Kennis J.T.M. (2008) Hydrogen Bond Switching among Flavin and Amino Acid Side Chains in the BLUF Photoreceptor Observed by Ultrafast Infrared Spectroscopy. *Biophysical Journal* **95**(10):4790–4802.
- Bonetti C., Stierl M., Mathes T., van Stokkum I.H.M., Mullen K.M., Cohen-Stuart T.A., van Grondelle R., Hegemann P., Kennis J.T.M. (2009) The Role of Key Amino Acids in the Photoactivation Pathway of the *Synechocystis* Slr1694 BLUF Domain. *Biochemistry* **48**(48):11458–11469.
- Bourgeron T., Rustin P., Chretien D., Birch-Machin M., Bourgeois M., Viegas-Péquignot E., Munnich A., Rötig A. (1995) Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nature Genetics* **11**:144–149.
- Braatsch S., Gomelsky M., Kuphal S., Klug G. (2002) A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular microbiology* **45**(3):827–836.
- Brauner J.W., Dugan C., Mendelsohn R. (2000) ¹³C Isotope Labeling of Hydrophobic Peptides. Origin of the Anomalous Intensity Distribution in the Infrared Amide I Spectral Region of β -Sheet Structures. *Journal of the American Chemical Society* **122**(4):677–683.
- Brockerman J.A., Okon M., McIntosh L.P. (2014) Detection and characterization of serine and threonine hydroxyl protons in *Bacillus circulans* xylanase by NMR spectroscopy. *Journal of Biomolecular NMR* **58**(1):17–25.
- Brosi R.W. (2013) *ELDOR spectroscopy on co-chaperone DnaJ and BLUF domain BlrB*. Doktorarbeit. Freie Universität Berlin, Germany.
- Brust R., Lukacs A., Haigney A., Addison K., Gil A., Towrie M., Clark I.P., Greetham G.M., Tonge P.J., Meech S.R. (2013) Proteins in Action: Femtosecond to Millisecond Structural Dynamics of a Photoactive Flavoprotein. *Journal of the American Chemical Society* **135**(43):16168–16174.
- Brych A., Mascarenhas J., Jaeger E., Charkiewicz E., Pokorny R., Bölker M., Doehlemann G., Batschauer A. (2015) White collar 1-induced photolyase expression contributes to UV-tolerance of *Ustilago maydis*. *MicrobiologyOpen*.
- Burriesci M., Bhaya D. (2008) Tracking phototactic responses and modeling motility of *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **91**(2):77–86.
- Chakrabarty A., Schellman J.A., Baldwin R.L. (1991) Large differences in the helix propensities of alanine and glycine. *Nature* **351**(6327):586.
- Cashmore A.R., Jarillo J.A., Wu Y.-J., Liu D. (1999) Cryptochromes: Blue Light Receptors for Plants and Animals. *Science* **284**(5415):760–765.

- Chapman S., Faulkner C., Kaiserli E., Garcia-Mata C., Savenkov E.I., Roberts A.G., Oparka K.J., Christie J.M. (2008) The photoreversible fluorescent protein iLOV outperforms GFP as a reporter of plant virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(50):20038–20043.
- Chen R. (2012) Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances* **30**(5):1102–1107.
- Cherepanov P.P., Wackernagel W. (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**(1):9–14.
- Choi J.-S., Chung Y.-H., Moon Y.-J., Kim C., Watanabe M., Song P.-S., Joe C.-O., Bogorad L., Park Y.M. (1999) Photomovement of the gliding cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochemistry and Photobiology* **70**(1):95–102.
- Choi J.H., Lee S.Y. (2004) Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**(5):625–635.
- Christie J.M., Arvai A.S., Baxter K.J., Heilmann M., Pratt A.J., O'Hara A., Kelly S.M., Hothorn M., Smith B.O., Hitomi K., Jenkins G.I., Getzoff E.D. (2012) Plant UVR8 Photoreceptor Senses UV-B by Tryptophan-Mediated Disruption of Cross-Dimer Salt Bridges. *Science* **335**(6075):1492–1496.
- Christie J.M., Salomon M., Nozue K., Wada M., Briggs W.R. (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(15):8779–8783.
- Csernaton F., Socaciu C., Pop R.M., Fetea F. (2013) Application of FT-IR Spectroscopy for Fingerprinting Bioactive Molecules in a Nutraceutical PROMEN, comparatively with Plantingredients. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Food Science and Technology* **70**:68–69.
- Datsenko K.A., Wanner B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(12):6640–6645.
- Datta S., Costantino N., Court D.L. (2006) A set of recombineering plasmids for gram-negative bacteria. *Gene* **379**:109–115.
- Davis B.D., Mingioli E.S. (1950) Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. *Journal of Bacteriology* **60**(1):17.
- Deeb S.S. (2006) Genetics of variation in human color vision and the retinal cone mosaic. *Current Opinion in Genetics & Development* **16**(3):301–307.
- Del Casale T., Sollitti P., Chesney, R.H. (1983). Cytoplasmic L-asparaginase: isolation of a defective strain and mapping of ansA. *Journal of bacteriology*, **154**(1): 513-515.
- Di Wu, Hu Q., Yan Z., Chen W., Yan C., Huang X., Zhang J., Yang P., Deng H., Wang J., Deng X., Shi Y. (2012) Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature* **484**(7393):214–219.
- Diensthuber R.P., Bommer M., Gleichmann T., Möglich A. (2013) Full-Length Structure of a Sensor Histidine Kinase Pinpoints Coaxial Coiled Coils as Signal Transducers and Modulators. *Structure* **21**(7):1127–1136.
- Domratheva T., Grigorenko B.L., Schlichting I., Nemukhin A.V. (2008) Molecular Models Predict Light-Induced Glutamine Tautomerization in BLUF Photoreceptors. *Biophysical Journal* **94**(10):3872–3879.
- Domratheva T., Hartmann E., Schlichting I., Kottke T. (2016) Evidence for Tautomerisation of Glutamine in BLUF Blue Light Receptors by Vibrational Spectroscopy and Computational Chemistry. *Scientific Reports* **6**:22669.
- Dragnea V., Arunkumar A.I., Lee C.W., Giedroc D.P., Bauer C.E. (2010) A Q63E *Rhodobacter sphaeroides* AppA BLUF Domain Mutant Is Locked in a Pseudo-Light-Excited Signaling State. *Biochemistry* **49**(50):10682–10690.

IX. Literaturverzeichnis

- Dragnea V., Arunkumar A.I., Yuan H., Giedroc D.P., Bauer C.E. (2009) Spectroscopic Studies of the AppA BLUF Domain from *Rhodobacter sphaeroides*: Addressing Movement of Tryptophan 104 in the Signaling State. *Biochemistry* **48**(42):9969–9979.
- Durfee T., Nelson R., Baldwin S., Plunkett G., Burland V., Mau B., Petrosino J.F., Qin X., Muzny D.M., Ayele M., Gibbs R.A., Csörgő B., Pósfai G., Weinstock G.M., Blattner F.R. (2008) The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse. *Journal of Bacteriology* **190**(7):2597–2606.
- El-Arab K.K., Pudasaini A., Zoltowski B.D. (2015) Short LOV proteins in methylocystis reveal insight into LOV domain photocycle mechanisms. *PLOS ONE* **10**(5):e0124874.
- Erni B., Zanolari B., Kocher H.P. (1987) The mannose permease of *Escherichia coli* consists of three different proteins. Amino acid sequence and function in sugar transport, sugar phosphorylation, and penetration of phage lambda DNA. *Journal of Biological Chemistry* **262**(11):5238–5247.
- Essen L.O., Klar T. (2006) Light-driven DNA repair by photolyases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**(11):1266–1277.
- Felton J., Michaelis S., Wright A. (1980) Mutations in two unlinked genes are required to produce asparagine auxotrophy in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **142**(1):221–228.
- Fiedler B., Börner T., Wilde A. (2005) Phototaxis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: role of different photoreceptors. *Photochemistry and Photobiology* **81**(6):1481–1488.
- Finn R.D., Coghill P., Eberhardt R.Y., Eddy S.R., Mistry J., Mitchell A.L., Potter S.C., Punta M., Qureshi M., Sangrador-Vegas A., Salazar G.A., Tate J., Bateman A. (2016) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research* **44**(D1):D279–D285.
- Fischer M., Bacher A. (2008) Biosynthesis of vitamin B2: Structure and mechanism of riboflavin synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **474**(2):252–265.
- Fisher Z., Hernandez Prada J.A., Tu C., Duda D., Yoshioka C., An H., Govindasamy L., Silverman D.N., McKenna R. (2005) Structural and Kinetic Characterization of Active-Site Histidine as a Proton Shuttle in Catalysis by Human Carbonic Anhydrase II. *Biochemistry* **44**(4):1097–1105.
- Fudim R., Mehlhorn J., Berthold T., Weber S., Schleicher E., Kennis J.T.M., Mathes T. (2015) Photoinduced formation of flavin radicals in BLUF domains lacking the central glutamine. *FEBS Journal* **282**(16):3161–3174.
- Fujiwara K., Toda H., Ikeguchi M. (2012) Dependence of α -helical and β -sheet amino acid propensities on the overall protein fold type. *BMC Structural Biology* **12**(1):1–15.
- Fukushima Y., Murai Y., Okajima K., Ikeuchi M., Itoh S. (2008) Photoreactions of Tyr8- and Gln50-Mutated BLUF Domains of the PixD Protein of *Thermosynechococcus elongatus* BP-1: Photoconversion at Low Temperature without Tyr8. *Biochemistry* **47**(2):660–669.
- Fukushima Y., Okajima K., Ikeuchi M., Itoh S. (2007) Two Intermediate States I and J Trapped at Low Temperature in the Photocycles of two BLUF Domain Proteins of Cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Photochemistry and Photobiology* **83**(1):112–121.
- 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**(13):5149–5158.
- Fulton C., Dingle A.D. (1967) Appearance of the flagellate phenotype in populations of *Naegleria* amoebae. *Developmental Biology* **15**(2):165–191.
- Furter R. (1998) Expansion of the genetic code: site-directed p-fluoro-phenylalanine incorporation in *Escherichia coli*. *Protein Science* **7**(2):419.
- Gamer J., Bujard H., Bukau B. (1992) Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ, and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor σ 32. *Cell* **69**(5):833–842.

- Gauden M., Grinstead J.S., Laan W., van Stokkum I.H.M., Avila-Perez M., Toh K.C., Boelens R., Kaptein R., van Grondelle R., Hellingwerf K.J., Kennis J.T.M. (2007) On the Role of Aromatic Side Chains in the Photoactivation of BLUF Domains. *Biochemistry* **46**(25):7405–7415.
- Gauden M., van Stokkum I.H., Key J.M., Lührs 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(29):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. (2005) Photocycle of the Flavin-Binding Photoreceptor AppA, a Bacterial Transcriptional Antirepressor of Photosynthesis Genes. *Biochemistry* **44**(10):3653–3662.
- Gavriljuk K., Gazdag E.M., Itzen A., Kötting C., Goody R.S., Gerwert K. (2012) Catalytic mechanism of a mammalian Rab-RabGAP complex in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**(52):21348–21353.
- Gehring W.J. (2005) New Perspectives on Eye Development and the Evolution of Eyes and Photoreceptors. *Journal of Heredity* **96**(3):171–184.
- Ghisla S. (1980) [51] Fluorescence and optical characteristics of reduced flavins and flavoproteins. *Methods in Enzymology* **66**:360–373.
- Gil A.A., Haigney A., Laptinok S.P., Brust R., Lukacs A., Iuliano J.N., Jeng J., Melief E.H., Zhao R.-K., Yoon E., Clark I.P., Towrie M., Greetham G.M., Ng A., Truglio J.J., French J.B., Meech S.R., Tonge P.J. (2016) Mechanism of the AppA_{BLUF} Photocycle Probed by Site-Specific Incorporation of Fluorotyrosine Residues: Effect of the Y21 pK_a on the Forward and Reverse Ground-State Reactions. *Journal of the American Chemical Society* **138**(3):926–935.
- Glas A.F., Schneider S., Maul M.J., Hennecke U., Carell T. (2009) Crystal Structure of the T(6-4)C Lesion in Complex with a (6-4) DNA Photolyase and Repair of UV-Induced (6-4) and Dewar Photolesions. *Chemistry – A European Journal* **15**(40):10387–10396.
- Gomelsky M., Hoff W.D. (2011) Light helps bacteria make important lifestyle decisions. *Trends in Microbiology* **19**(9):441–448.
- Gomelsky M., Kaplan S. (1995) appA, a novel gene encoding a trans-acting factor involved in the regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of Bacteriology* **177**(16):4609–4618.
- Gomelsky M., Kaplan S. (1997) Molecular genetic analysis suggesting interactions between AppA and PpsR in regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of Bacteriology* **179**(1):128–134.
- Gomelsky M., Kaplan S. (1998) AppA, a redox regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, is a flavoprotein Identification of a novel FAD binding domain. *Journal of Biological Chemistry* **273**(52):35319–35325.
- Gomelsky M., Klug G. (2002) BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends in Biochemical Sciences* **27**(10):497–500.
- Gonzalez F.J. (1992) Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends in Pharmacological Sciences* **13**:346–352.
- Götze J., Saalfrank P. (2009) Serine in BLUF domains displays spectral importance in computational models. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **94**(2):87–95.
- Goyal, P., Hammes-Schiffer, S. (2017). Role of active site conformational changes in photocycle activation of the AppA BLUF photoreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**(7):1480–1485.
- Gregoret L.M., Rader S.D., Fletterick R.J., Cohen F.E. (1991) Hydrogen bonds involving sulfur atoms in proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **9**(2):99–107.
- Grinstead J.S., Avila-Perez M., Hellingwerf K.J., Boelens R., Kaptein R. (2006a) Light-induced flipping of a conserved glutamine sidechain and its orientation in the AppA BLUF domain. *Journal of the American Chemical Society* **128**(47):15066–15067.

IX. Literaturverzeichnis

- Grinstead J.S., Hsu S.-T.D., Laan W., Bonvin A.M.J.J., Hellingwerf K.J., Boelens R., Kaptein R. (2006b) The Solution Structure of the AppA BLUF Domain: Insight into the Mechanism of Light-Induced Signaling. *ChemBioChem* **7**(1):187–193.
- Guo, C., Geng, C., Tugarinov, V. (2009). Selective backbone labeling of proteins using {1,2 -13C2}-pyruvate as carbon source. *Journal of biomolecular NMR*, **44**(3): 167-173.
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2**(2):95–108.
- Hamblin M.R., Hasan T. (2004) Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical & Photobiological Sciences* **3**(5):436–450.
- Hamuro Y., Coales S.J., Southern M.R., Nemeth-Cawley J.F., Stranz D.D., Griffin P.R. (2003) Rapid analysis of protein structure and dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Journal of Biomolecular Techniques* **14**(3):171.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(33):12306–12311.
- Harper S.M., Neil L.C., Gardner K.H. (2003) Structural basis of a phototropin light switch. *Science* **301**(5639): 1541–1544.
- 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 and Cell Physiology* **46**(1):136–146.
- 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**(47):14979–14986.
- 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**(11):3785–3793.
- Hasnain G., Frelin O., Roje S., Ellens K.W., Ali K., Guan J.-C., Garrett T.J., de Crécy-Lagard V., Gregory J.F., McCarty D.R., Hanson A.D. (2013) Identification and Characterization of the Missing Pyrimidine Reductase in the Plant Riboflavin Biosynthesis Pathway. *Plant Physiology* **161**(1):48–56.
- Hauser K., Krejtschi C., Huang R., Wu L., Keiderling T.A. (2008) Site-Specific Relaxation Kinetics of a Tryptophan Zipper Hairpin Peptide Using Temperature-Jump IR Spectroscopy and Isotopic Labeling. *Journal of the American Chemical Society* **130**(10):2984–2992.
- Hazra P., Inoue K., Laan W., Hellingwerf K.J., Terazima M. (2008) Energetics and Role of the Hydrophobic Interaction during Photoreaction of the BLUF Domain of AppA. *The Journal of Physical Chemistry B* **112**(5):1494–1501.
- Heilmann M., Christie J.M., Kennis J.T.M., Jenkins G.I., Mathes T. (2015) Photoinduced transformation of UVR8 monitored by vibrational and fluorescence spectroscopy. *Photochemical Photobiological Sciences* **14**(2):252–257.
- Hemmerich P., Massey V., Weber G. (1967) Photo-induced Benzyl Substitution of Flavins by Phenylacetate: a Possible Model for Flavoprotein Catalysis. *Nature* **213**:728–730.
- Herman, E., Sachse, M., Kroth, P. G., Kottke, T. (2013). Blue-light-induced unfolding of the J α helix allows for the dimerization of aureochrome-LOV from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochemistry*, **52**(18), 3094-3101.
- Hitomi K., Okamoto K., Daiyasu H., Miyashita H., Iwai S., Toh H., Ishiura M., Todo T. (2000) Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Nucleic Acids Research* **28**(12):2353–2362.

- 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. *Accounts of Chemical Research* **37**(1):13–20.
- Hu M., Zhang C., Mu Y., Shen Q., Feng Y. (2010) Indole Affects Biofilm Formation in Bacteria. *Indian Journal of Microbiology* **50**(4):362–368.
- Hua Q., Yang C., Oshima T., Mori H., Shimizu K. (2004) Analysis of Gene Expression in *Escherichia coli* in Response to Changes of Growth-Limiting Nutrient in Chemostat Cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(4):2354–2366.
- Huber F., Erni B. (1996) Membrane topology of the mannose transporter of *Escherichia coli* K12. *European Journal of Biochemistry* **239**(3):810–817.
- Inoue K., Ono H., Abe-Yoshizumi R., Yoshizawa S., Ito H., Kogure K., Kandori H. (2013) A light-driven sodium ion pump in marine bacteria. *Nature communications*, **4**:1678
- 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**(6875):1047–1051.
- Ito S., Murakami A., Iseki M., Takahashi T., Higashi S., Watanabe M. (2010) Differentiation of photocycle characteristics of flavin-binding BLUF domains of α - and β -subunits of photoactivated adenylyl cyclase of *Euglena gracilis*. *Photochemical & Photobiological Sciences* **9**(10):1327–1335.
- Itoh Y., Ohashi Y., Shibue T., Hayashi A., Maki S., Hirano T., Niwa H. (2002) Reduction in Desorption Mass Spectrometry: Multiple Protonation on Flavins without Charge Increment. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan* **50**(2):52–57.
- Iwata T., Watanabe A., Iseki M., Watanabe M., Kandori H. (2011) Strong Donation of the Hydrogen Bond of Tyrosine during Photoactivation of the BLUF Domain. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2**(9):1015–1019.
- Jacewicz A., Izumi A., Brunner K., Schnell R., Schneider G. (2013) Structural Insights into the UbiD Protein Family from the Crystal Structure of PA0254 from *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS ONE* **8**(5):e63161.
- Jansen V., Alvarez L., Balbach M., Strünker T., Hegemann P., Kaupp U.B., Wachten D. (2015) Controlling fertilization and cAMP signaling in sperm by optogenetics. *Elife* **4**:e05161.
- Jékely G. (2009) Evolution of phototaxis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**(1531):2795–2808.
- Jensen K.F. (1993) The *Escherichia coli* K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an rph frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low pyrE expression levels. *Journal of Bacteriology* **175**(11):3401–3407.
- Jentsch K., Wirtz A., Circolone F., Drepper T., Losi A., Gärtner W., Jaeger K.-E., Krauss U. (2009) Mutual Exchange of Kinetic Properties by Extended Mutagenesis in Two Short LOV Domain Proteins from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **48**(43):10321–10333.
- Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F., Marraffini L.A. (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology* **31**(3):233–239.
- John J., Schlichting I., Schiltz E., Rösch P., Wittinghofer A. (1989) C-terminal truncation of p21H preserves crucial kinetic and structural properties. *Journal of Biological Chemistry* **264**(22):13086–13092.
- Joyce A.R., Reed J.L., White A., Edwards R., Osterman A., Baba T., Mori H., Lesely S.A., Palsson B.O., Agarwalla S. (2006) Experimental and Computational Assessment of Conditionally Essential Genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **188**(23):8259–8271.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(35):12350–12355.

IX. Literaturverzeichnis

- Jung A., Reinstein J., Domratheva T., Shoeman R.L., Schlichting I. (2006) Crystal Structures of the AppA BLUF Domain Photoreceptor Provide Insights into Blue Light-mediated Signal Transduction. *Journal of Molecular Biology* **362**(4):717–732.
- Kanazawa T., Ren S., Maekawa M., Hasegawa K., Arisaka F., Hyodo M., Hayakawa Y., Ohta H., Masuda S. (2010) Biochemical and Physiological Characterization of a BLUF Protein–EAL Protein Complex Involved in Blue Light-Dependent Degradation of Cyclic Diguanylate in the Purple Bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Biochemistry* **49**(50):10647–10655.
- Katzen F., Chang G., & Kudlicki W. (2005) The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends in Biotechnology*, **23**(3), 150-156.
- Kennis J.T.M., Mathes T. (2013) Molecular eyes: proteins that transform light into biological information. *Interface Focus* **3**(5):20130005.
- Keseler I.M., Mackie A., Peralta-Gil M., Santos-Zavaleta A., Gama-Castro S., Bonavides-Martínez C., Fulcher C., Huerta A.M., Kothari A., Krummenacker M., Latendresse M., Muñoz-Rascado L., Ong Q., Paley S., Schröder I., Shearer A.G., Subhraveti P., Travers M., Weerasinghe D., Weiss V., Collado-Vides J., Gunsalus R.P., Paulsen I., Karp P.D. (2013) EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Research* **41**(D1):D605–D612.
- Khan K., Elia M. (1991) Factors affecting the stability of L-glutamine in solution. *Clinical Nutrition* **10**(4):186–192.
- Khrenova M.G., Domratheva T., Schlichting I., Grigorenko B.L., Nemukhin A.V. (2011) Computational Characterization of Reaction Intermediates in the Photocycle of the Sensory Domain of the AppA Blue Light Photoreceptor. *Photochemistry and Photobiology* **87**(3):564–573.
- Khrenova M.G., Nemukhin A.V., Grigorenko B.L., Krylov A.I., Domratheva T.M. (2010) Quantum Chemistry Calculations Provide Support to the Mechanism of the Light-Induced Structural Changes in the Flavin-Binding Photoreceptor Proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation* **6**(8):2293–2302.
- Khrenova, M.G., Domratheva, T., Nemukhin, A.V. (2017) Molecular mechanism of the dark-state recovery in BLUF photoreceptors. *Chemical Physics Letters* **676**: 25-31.
- Kiontke S., Geisselbrecht Y., Pokorny R., Carell T., Batschauer A., Essen L.-O. (2011) Crystal structures of an archaeal class II DNA photolyase and its complex with UV-damaged duplex DNA. *The EMBO Journal* **30**(21):4437–4449.
- Kirik I.A., Nefedova L.N., Fantin Y.S., Babykin M.M. (2008) Inversion of phototaxis in cells of *Synechocystis sp.* PCC 6803 determined by a mutation in the regulatory gene prqR. *Russian Journal of Genetics* **44**(4):405–412.
- Kita A., Okajima K., Morimoto Y., Ikeuchi M., Miki K. (2005) Structure of a Cyanobacterial BLUF Protein, Tll0078, Containing a Novel FAD-binding Blue Light Sensor Domain. *Journal of Molecular Biology* **349**(1):1–9.
- Klem T.J., Davisson V.J. (1993) Imidazole glycerol phosphate synthase: the glutamine amidotransferase in histidine biosynthesis. *Biochemistry* **32**(19):5177–5186.
- 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**(22):6726–6734.
- Kuhns D.B., Alvord W.G., Heller T., Feld J.J., Pike K.M., Marciano B.E., Uzel G., DeRavin S.S., Priel D.A.L., Soule B.P., Zarembek K.A., Malech H.L., Holland S.M., Gallin J.I. (2010) Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease. *New England Journal of Medicine* **363**(27):2600–2610.
- Kumar C.G., Anand S.K. (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* **42**(1):9–27.
- Kuroi K., Okajima K., Ikeuchi M., Tokutomi S., Kamiyama T., Terazima M. (2015) Pressure-Sensitive Reaction Yield of the TePixD Blue-Light Sensor Protein. *The Journal of Physical Chemistry B* **119**(7):2897–2907.

- Kuroi K., Okajima K., Ikeuchi M., Tokutomi S., Terazima M. (2014) Transient conformational fluctuation of TePixD during a reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**(41):14764-14769.
- Kuroi K., Tanaka K., Okajima K., Ikeuchi M., Tokutomi S., Terazima M. (2013) Anomalous diffusion of TePixD and identification of the photoreaction product. *Photochemical & Photobiological Sciences* **12**(7):1180.
- Kutta R.J., Hardman S.J., Johannissen L.O., Bellina B., Messiha H. L., Ortiz-Guerrero J.M., Elías-Arnanz M., Padmanabhan S., Barran P., Scrutton N.S., Jones A.R. (2014). The photochemical mechanism of a B12-dependent photoreceptor protein. *Nature communications* **6**:7907-7907.
- Laan W., Gauden M., Yeremenko S., van Grondelle R., Kennis J.T.M., Hellingwerf K.J. (2006) On the Mechanism of Activation of the BLUF Domain of AppA. *Biochemistry* **45**(1):51-60.
- Larance M., Bailly A.P., Pourkarimi E., Hay R.T., Buchanan G., Coulthurst S., Xirodimas D.P., Gartner A., Lamond A.I. (2011) Stable-isotope labeling with amino acids in nematodes. *Nature Methods* **8**(10):849-851.
- Lee J. (1993) Lumazine protein and the excitation mechanism in bacterial bioluminescence. *Biophysical Chemistry* **48**(2):149-158.
- Leid J.G. (2009) Bacterial biofilms resist key host defenses. *Microbe* **4**(2):66-70.
- Leys D., Scrutton N.S. (2016) Sweating the assets of flavin cofactors: new insight of chemical versatility from knowledge of structure and mechanism. *Current Opinion in Structural Biology* **41**:19-26.
- Li G., Young K.D. (2013) Indole production by the tryptophanase TnaA in *Escherichia coli* is determined by the amount of exogenous tryptophan. *Microbiology* **159**(2):402-410.
- Lindner, R., Hartmann, E., Tarnawski, M., Winkler, A., Frey, D., Reinstein, J., Meinhart, A., Schlichting, I. (2017) Photoactivation mechanism of a bacterial light-regulated adenylyl cyclase. *Journal of Molecular Biology*
- Liu B., Liu H., Zhong D., Lin C. (2010) Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors. *Current Opinion in Plant Biology* **13**(5):578-586.
- Losi A. (2007) Flavin-based Blue-light Photosensors: A Photobiophysics Update. *Photochemistry and Photobiology* **83**(6):1283-1300.
- Losi A., Gärtner W. (2011) Old Chromophores, New Photoactivation Paradigms, Trendy Applications: Flavins in Blue Light-Sensing Photoreceptors. *Photochemistry and Photobiology* **87**(3):491-510.
- Losi A., Gärtner W. (2012) The Evolution of Flavin-Binding Photoreceptors: An Ancient Chromophore Serving Trendy Blue-Light Sensors. *Annual Review of Plant Biology* **63**:49-72.
- Losi A., Mandalari C., Gärtner W. (2014) From Plant Infectivity to Growth Patterns: The Role of Blue-Light Sensing in the Prokaryotic World. *Plants* **3**(1):70-94.
- Lousa, D., Pinto, A. R. T., Victor, B. L., Laio, A., Veiga, A. S., Castanho, M. A. R. B., & Soares, C. M. (2016). Fusing simulation and experiment: The effect of mutations on the structure and activity of the influenza fusion peptide. *Scientific Reports* **6**.
- Luck M., Mathes T., Bruun S., Fudim R., Hagedorn R., Tran Nguyen T.M., Kateriya S., Kennis J.T.M., Hildebrandt P., Hegemann P. (2012) A Photochromic Histidine Kinase Rhodopsin (HKR1) That Is Bimodally Switched by Ultraviolet and Blue Light. *Journal of Biological Chemistry* **287**(47):40083-40090.
- Lukacs A., Brust R., Haigney A., Laptенок S.P., Addison K., Gil A., Towrie M., Greetham G.M., Tonge P.J., Meech S.R. (2014) BLUF Domain Function Does Not Require a Metastable Radical Intermediate State. *Journal of the American Chemical Society* **136**(12):4605-4615.
- Mah T.-F.C., O'Toole G.A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* **9**(1):34-39.

IX. Literaturverzeichnis

- Mahmood K., Hussain M., Aminuddin M. (2001) A Study of the Molar Absorptivity and Structure of Vitamin B2 Relationship. *Journal-Chemical Society of Pakistan* **23**(4):205–209.
- Majerus T., Kottke T., Laan W., Hellingwerf K., Heberle J. (2007) Time-Resolved FT-IR Spectroscopy Traces Signal Relay within the Blue-Light Receptor AppA. *ChemPhysChem* **8**(12):1787–1789.
- Mandalari C., Losi A., Gärtner W. (2013) Distance-tree analysis, distribution and co-presence of bilin- and flavin-binding prokaryotic photoreceptors for visible light. *Photochemical & Photobiological Sciences* **12**(7):1144.
- Martin YC. (2009) Let's not forget tautomers. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. **23**(10):693-704.
- Massey V. (2000) The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochemical Society Transactions* **28**:283–296.
- Masuda S., Hasegawa K., Ono T. (2005) Tryptophan at Position 104 is Involved in Transforming Light Signal into Changes of β -sheet Structure for the Signaling State in the BLUF Domain of AppA. *Plant and Cell Physiology* **46**(12):1894–1901.
- Masuda S., Bauer C.E. (2002) AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Cell* **110**(5):613–623.
- Masuda S., Hasegawa K., Ishii A., Ono T. (2004) 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**(18):5304–5313.
- Masuda S., Hasegawa K., Ohta H., Ono T. (2008) Crucial Role in Light Signal Transduction for the Conserved Met93 of the BLUF Protein PixD/Slr1694. *Plant and Cell Physiology* **49**(10):1600–1606.
- Masuda S., Hasegawa K., Ono T. (2005a) 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**(4):1215–1224.
- Masuda S., Hasegawa K., Ono T. (2005b) Adenosine diphosphate moiety does not participate in structural changes for the signaling state in the sensor of blue-light using FAD domain of AppA. *FEBS Letters* **579**(20):4329–4332.
- Masuda S., Nakatani Y., Ren S., Tanaka M. (2013) Blue Light-Mediated Manipulation of Transcription Factor Activity *in vivo*. *ACS Chemical Biology* **8**(12):2649–2653.
- Masuda S., Ono T. (2004) Biochemical characterization of the major adenylyl cyclase, Cya1, in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Letters* **577**(1-2):255–258.
- 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. *Journal of Molecular Biology* **368**(5):1223–1230.
- Mathes T. (2008) Photochemie und Signaltransduktion von Blaulichtrezeptorproteinen aus photosynthetisierenden Mikroorganismen. Doktorarbeit. Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.
- Mathes T., Götze J.P. (2015) A proposal for a dipole-generated BLUF domain mechanism. *Frontiers in Molecular Biosciences* **2**:62.
- Mathes T., van Stokkum I.H.M., Bonetti C., Hegemann P., Kennis J.T.M. (2011) The Hydrogen-Bond Switch Reaction of the Blrb Bluf Domain of *Rhodobacter sphaeroides*. *The Journal of Physical Chemistry B* **115**(24):7963–7971.
- Mathes T., van Stokkum I.H.M., Stierl M., Kennis J.T.M. (2012) Redox Modulation of Flavin and Tyrosine Determines Photoinduced Proton-coupled Electron Transfer and Photoactivation of BLUF Photoreceptors. *Journal of Biological Chemistry* **287**(38):31725–31738.
- Mathes T., Vogl C., Stolz J., Hegemann P. (2009) *In Vivo* Generation of Flavoproteins with Modified Cofactors. *Journal of Molecular Biology* **385**(5):1511–1518.

- Mathes T., Zhu J., van Stokkum I.H.M., Groot M.L., Hegemann P., Kennis J.T.M. (2012) Hydrogen Bond Switching among Flavin and Amino Acids Determines the Nature of Proton-Coupled Electron Transfer in BLUF Photoreceptors. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **3**(2):203–208.
- Max J.-J., Chapados C. (2009) Isotope effects in liquid water by infrared spectroscopy. III. H₂O and D₂O spectra from 6000 to 0 cm⁻¹. *The Journal of Chemical Physics* **131**(18):184505.
- McIntosh L.P., Griffey R.H., Muchmore D.C., Nielson C.P., Redfield A.G., Dahlquist F.W. (1987) Proton NMR measurements of bacteriophage T4 lysozyme aided by ¹⁵N isotopic labeling: structural and dynamic studies of larger proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**(5):1244–1248.
- McRee D.E., Meyer T.E., Cusanovich M.A., Parge H.E., Getzoff E.D. (1986) Crystallographic characterization of a photoactive yellow protein with photochemistry similar to sensory rhodopsin. *Journal of Biological Chemistry* **261**(29):13850–13851.
- Medina M. (2009) Structural and mechanistic aspects of flavoproteins: photosynthetic electron transfer from photosystem I to NADP⁺. *FEBS Journal* **276**(15):3942–3958.
- Mehlhorn J., Steinocher H., Beck S., Kennis J.T.M., Hegemann P., Mathes T. (2013) A Set of Engineered *Escherichia coli* Expression Strains for Selective Isotope and Reactivity Labeling of Amino Acid Side Chains and Flavin Cofactors. *PLOS ONE* **8**(11):e79006.
- Mehlhorn J., Lindtner T., Richter F., Glaß K., Steinocher H., Beck S., Hegemann P., Kennis J.T.M., Mathes T. (2015) Light-Induced Rearrangement of the β5 Strand in the BLUF Photoreceptor SyPixD (Slr1694). *The Journal of Physical Chemistry Letters*. **6**(23):4749–4753.
- Merz T., Sadeghian K., Schütz M. (2011) Why BLUF photoreceptors with roseoflavincofactors lose their biological functionality. *Physical Chemistry Chemical Physics* **13**(32):14775.
- Metz S., Hendriks J., Jäger A., Hellingwerf K., Klug G. (2010) *In Vivo* Effects on Photosynthesis Gene Expression of Base Pair Exchanges in the Gene Encoding the Light-responsive BLUF Domain of AppA in *Rhodobacter sphaeroides*. *Photochemistry and Photobiology* **86**(4):882–889.
- Miles, E. W., & Moriguchi, M. (1977). Tryptophan synthase of *Escherichia coli*. Removal of pyridoxal 5'-phosphate and separation of the alpha and beta2 subunits. *Journal of Biological Chemistry*, **252**(19): 6594-6599.
- Minato Y., Ueda T., Machiyama A., Shimada I., Iwai H. (2012) Segmental isotopic labeling of a 140 kDa dimeric multi-domain protein CheA from *Escherichia coli* by expressed protein ligation and protein trans-splicing. *Journal of Biomolecular NMR* **53**(3):191–207.
- 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. *Journal of Molecular Biology* **260**(3):289–298.
- Möglich A., Yang X., Ayers R.A., Moffat K. (2010) Structure and Function of Plant Photoreceptors. *Annual Review of Plant Biology* **61**:21–47.
- Møller M.M., Nielsen L.P., Jørgensen B.B. (1985) Oxygen responses and mat formation by *Beggiatoa* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **50**(2):373–382.
- Moskvin O.V., Kaplan S., Gilles-Gonzalez M.-A., Gomelsky M. (2007) Novel Heme-based Oxygen Sensor with a Revealing Evolutionary History. *Journal of Biological Chemistry* **282**(39):28740–28748.
- Mullis K.B., Faloona F.A., Scharf S.J., Saiki R.K., Horn G.T., Erlich H. (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Laboratory Press **51**:263–273.
- Mussi M.A., Gaddy J.A., Cabruja M., Arivett B.A., Viale A.M., Rasia R., Actis L.A. (2010) The Opportunistic Human Pathogen *Acinetobacter baumannii* Senses and Responds to Light. *Journal of Bacteriology* **192**(24):6336–6345.
- Nakamura, A., Ishida, T., Kusaka, K., Yamada, T., Fushinobu, S., Tanaka, I., Kaneko S., Ohta K., Tanaka H., Inaka K., Higuchi Y., Niimura N., Samejima M., Igarashi K. (2015) “Newton’s cradle” proton relay with amide–imidic acid tautomerization in inverting cellulase visualized by neutron crystallography. *Science Advances* **1**(7):e1500263.

IX. Literaturverzeichnis

- Narikawa R., Suzuki F., Yoshihara S., Higashi S., Watanabe M., Ikeuchi M. (2011) Novel Photosensory Two-Component System (PixA-NixB-NixC) Involved in the Regulation of Positive and Negative Phototaxis of Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant and Cell Physiology* **52**(12):2214–2224.
- Nash A.I., Ko W.-H., Harper S.M., Gardner K.H. (2008) A Conserved Glutamine Plays a Central Role in LOV Domain Signal Transmission and Its Duration. *Biochemistry* **47**(52):13842–13849.
- Neti S.S., Poulter C.D. (2016) Site-Selective Synthesis of ¹⁵N- and ¹³C-Enriched Flavin Mononucleotide Coenzyme Isotopologues. *The Journal of Organic Chemistry* **81**(12):5087–5092.
- Newton W.A., Snell E.E. (1962) An inducible tryptophan synthetase in tryptophan auxotrophs of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **48**(8):1431.
- Ng W.-O., Grossman A.R., Bhaya D. (2003) Multiple Light Inputs Control Phototaxis in *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. *Journal of Bacteriology* **185**(5):1599–1607.
- Nie B., Stutzman J., Xie A. (2005). A vibrational spectral marker for probing the hydrogen-bonding status of protonated Asp and Glu residues. *Biophysical Journal*, **88**(4): 2833-2847.
- Nilsson D.-E., Colley N.J. (2016) Comparative Vision: Can Bacteria Really See? *Current Biology* **26**(9):R369–R371.
- Novick R.P., Maas W.K. (1961) Control by endogenously synthesized arginine of the formation of ornithine transcarbamylase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **81**(2):236–240.
- Ntefidou M., Iseki M., Watanabe M., Lebert M., Häder (2003) Photoactivated Adenylyl Cyclase Controls Phototaxis in the Flagellate *Euglena gracilis*. *Plant Physiology* **133**(4):1517–1521.
- Nudel C.B., Hellingwerf K.J. (2015) Photoreceptors in Chemotrophic Prokaryotes: The Case of *Acinetobacter* spp. Revisited. *Photochemistry and Photobiology* **91**(5):1012-1020.
- Obanayama K., Kobayashi H., Fukushima K., Sakurai M. (2008) Structures of the Chromophore Binding Sites in BLUF Domains as Studied by Molecular Dynamics and Quantum Chemical Calculations. *Photochemistry and Photobiology* **84**(4):1003–1010.
- Ohki S., Kainosho M. (2008) Stable isotope labeling methods for protein NMR spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **53**(4):208–226.
- Ohki M., Sugiyama K., Kawai F., Tanaka H., Nihei Y., Unzai S., Takebe M., Matsunaga S., Adachi S., Shibayama N., Zhou Z., Koyama R., Ikegaya Y., Takahashi T., Tame J.R.H., Iseki M., Park S.-Y. (2016) Structural insight into photoactivation of an adenylyl cyclase from a photosynthetic cyanobacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*:201517520.
- Ohlendorf R., Vidavski R.R., Eldar A., Moffat K., Möglich A. (2012) From Dusk till Dawn: One-Plasmid Systems for Light-Regulated Gene Expression. *Journal of Molecular Biology* **416**(4):534–542.
- Okajima K., Yoshihara S., Fukushima Y., Geng X., Katayama M., Higashi S., Watanabe M., Sato S., Tabata S., Shibata Y., Itoh S., Ikeuchi M. (2005) Biochemical and Functional Characterization of BLUF-Type Flavin-Binding Proteins of Two Species of Cyanobacteria. *Journal of Biochemistry* **137**(6):741–750.
- Okajima K., Fukushima Y., Suzuki H., Kita A., Ochiai Y., Katayama M., Shibata Y., Miki K., Noguchi T., Itoh S., Ikeuchi M. (2006) Fate Determination of the Flavin Photoreceptions in the Cyanobacterial Blue Light Receptor TePixD (Tll0078). *Journal of Molecular Biology* **363**(1):10–18.
- Ortiz-Guerrero J.M., Polanco M.C., Murillo F.J., Padmanabhan S., Elías-Arnanz M. (2011) Light-dependent gene regulation by a coenzyme B12-based photoreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**(18):7565–7570.
- Pace C.N., Scholtz J.M. (1998) A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. *Biophysical Journal* **75**(1):422–427.
- Padukone N., Peretti S.W., Ollis D.F. (1992). Bacteriophage Lambda Expression Systems for Enhanced Recombinant Protein Production. In *Recent Advances in Biotechnology*: 367-372. Springer Netherlands.

- Park S.Y., Tame J.R. (2017) Seeing the light with BLUF proteins. *Biophysical Reviews*:1-8.
- Patrick W.M., Quandt E.M., Swartzlander D.B., Matsumura I. (2007) Multicopy Suppression Underpins Metabolic Evolvability. *Molecular Biology and Evolution* **24**(12):2716–2722.
- Payne K.A.P., White M.D., Fisher K., Khara B., Bailey S.S., Parker D., Rattray N.J.W., Trivedi D.K., Goodacre R., Beveridge R., Barran P., Rigby S.E.J., Scrutton N.S., Hay S., Leys D. (2015) New cofactor supports α,β -unsaturated acid decarboxylation via 1,3-dipolar cycloaddition. *Nature* **522**(7557):497–501.
- Pedrolli D., Langer S., Hobl B., Schwarz J., Hashimoto M., Mack M. (2015) The *ribB* FMN riboswitch from *Escherichia coli* operates at the transcriptional and translational level and regulates riboflavin biosynthesis. *FEBS Journal* **282**(16):3230–3242.
- Pei J., Grishin N.V. (2001) GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **42**(2):210–216.
- Penzkofer A., Atri Y., Sharma K., Veetil S.K., Kateriya S. (2016) Photodynamics of photo-activated BLUF coupled Endonuclease III mutant RmPAE from mesophilic, pigmented bacterium *Rubellimicrobium mesophilum* strain MSL-20T. *BAOJ Chemistry* **2**(2:008):1–24.
- Penzkofer A., Stierl M., Mathes T., Hegemann P. (2014) Absorption and emission spectroscopic characterization of photo-dynamics of photoactivated adenylyl cyclase mutant bPAC-Y7F of *Beggiatoa sp.* *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **140**:182–193.
- Penzkofer A., Tanwar M., Veetil S.K., Kateriya S. (2014) Photo-dynamics of photoactivated adenylyl cyclase LiPAC from the spirochete bacterium *Leptonema illini* strain 3055. *Trends in Applied Spectroscopy* **11**:39–62.
- Penzkofer A., Tanwar M., Veetil S.K., Kateriya S. (2015) Photo-dynamics of photoactivated adenylyl cyclase TpPAC from the spirochete bacterium *Turneriella parva* strain HT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **153**:90–102.
- Pérez-Marín M.C., Padmanabhan S., Polanco M.C., Murillo F.J., Elías-Arnanz M. (2007) Vitamin B12 partners the CarH repressor to downregulate a photoinducible promoter in *Myxococcus xanthus*: Light-inducible promoter control by B12 and CarH. *Molecular Microbiology* **67**(4):804–819.
- Powell J.T., Morrison J.F. (1978) The purification and properties of the aspartate aminotransferase and aromatic-amino-acid aminotransferase from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **87**(2):391–400.
- Pudasaini A., El-Arab K.K., Zoltowski B.D. (2015) LOV-based optogenetic devices: light-driven modules to impart photoregulated control of cellular signaling. *Frontiers in Molecular Biosciences* **2**:18.
- Raffelberg S., Wang L., Gao S., Losi A., Gärtner W., Nagel G. (2013) A LOV-domain-mediated blue-light-activated adenylyl (adenylyl) cyclase from the cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* PCC 7420. *Biochemical Journal* **455**(3):359–365.
- 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*. *Photochemistry and Photobiology* **80**(3):542–547.
- Ramírez, F. J., Tuñón, I., & Silla, E. (1998). Amino acid chemistry in solution: Structural study and vibrational dynamics of glutamine in solution. An *ab initio* reaction field model. *The Journal of Physical Chemistry B*, **102**(32): 6290-6298.
- Ranji M., Kanemoto S., Matsubara M., Grosso M.A., Gorman J.H., Gorman R.C., Jaggard D.L., Chance B. (2006) Fluorescence spectroscopy and imaging of myocardial apoptosis. *Journal of Biomedical Optics* **11**(6):064036.
- Remijnsen Q., Berghe T.V., Wirawan E., Asselbergh B., Parthoens E., De Rycke R., Noppen S., Delforge M., Willems J., Vandenabeele P. (2011) Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Research* **21**(2):290–304.

IX. Literaturverzeichnis

- Ren S., Sato R., Hasegawa K., Ohta H., Masuda S. (2013) A Predicted Structure for the PixD–PixE Complex Determined by Homology Modeling, Docking Simulations, and a Mutagenesis Study. *Biochemistry* **52**(7):1272–1279.
- Ren S., Sawada M., Hasegawa K., Hayakawa Y., Ohta H., Masuda S. (2012) A PixD–PapB Chimeric Protein Reveals the Function of the BLUF Domain C-Terminal α -Helices for Light Signal Transduction. *Plant and Cell Physiology* **53**(9):1638–1647.
- Ren S., Sugimoto Y., Kobayashi T., Masuda S. (2015) Cross-linking analysis reveals the putative dimer structure of the cyanobacterial BLUF photoreceptor PixD. *FEBS Letters* **589**(15):1879–1882.
- Renicke C., Schuster D., Usherenko S., Essen L.-O., Taxis C. (2013) A LOV2 Domain-Based Optogenetic Tool to Control Protein Degradation and Cellular Function. *Chemistry & Biology* **20**(4):619–626.
- Renkema G.H., Wortmann S.B., Smeets R.J., Venselaar H., Antoine M., Visser G., Ben-Omran T., van den Heuvel L.P., Timmers H.J., Smeitink J.A., Rodenbrug R.J.T. (2015) SDHA mutations causing a multisystem mitochondrial disease: novel mutations and genetic overlap with hereditary tumors. *European Journal of Human Genetics* **23**(2):202–209.
- Rich P.R., Iwaki M. (2007) Methods to probe protein transitions with ATR infrared spectroscopy. *Molecular BioSystems* **3**(6):398.
- Richter F., Scheib U.S., Mehlhorn J., Schubert R., Wietek J., Gernetzki O., Hegemann P., Mathes T., Möglich A. (2015) Upgrading a microplate reader for photobiology and all-optical experiments. *Photochemical & Photobiological Sciences* **14**(2):270–279.
- Rivers J., McDonald L., Edwards I.J., Beynon R.J. (2008) Asparagine Deamidation and the Role of Higher Order Protein Structure. *Journal of Proteome Research* **7**(3):921–927.
- Rizzini L., Favory J.-J., Cloix C., Faggionato D., O'Hara A., Kaiserli E., Baumeister R., Schäfer E., Nagy F., Jenkins G.I., Ulm R. (2011) Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 Protein. *Science* **332**(6025):103–106.
- Rockwell N.C., Lagarias J.C., Bhattacharya D. (2014) Primary endosymbiosis and the evolution of light and oxygen sensing in photosynthetic eukaryotes. *Frontiers in Ecology and Evolution* **2**(66).
- Rosche B., Li X.Z., Hauer B., Schmid A., Buehler K. (2009) Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis? *Trends in Biotechnology* **27**(11):636–643.
- Rotrosen D., Yeung C.L., Leto T.L., Malech H.L., Kwong C.H. (1990) Cytochrome b_{558} The Flavin-Binding Component of the Phagocyte NADPH Oxidase. *Nature* **343**:377.
- de Ruyck J., Janczak M.W., Neti S.S., Rothman S.C., Schubert H.L., Cornish R.M., Matagne A., Wouters J., Poulter C.D. (2014) Determination of Kinetics and the Crystal Structure of a Novel Type 2 Isopentenyl Diphosphate: Dimethylallyl Diphosphate Isomerase from *Streptococcus pneumoniae*. *ChemBioChem* **15**(10):1452–1458.
- Ryu M.-H., Moskvin O.V., Siltberg-Liberles J., Gomelsky M. (2010) Natural and Engineered Photoactivated Nucleotidyl Cyclases for Optogenetic Applications. *Journal of Biological Chemistry* **285**(53):41501–41508.
- Sadeghian K., Bocola M., Schütz M. (2008) A Conclusive Mechanism of the Photoinduced Reaction Cascade in Blue Light Using Flavin Photoreceptors. *Journal of the American Chemical Society* **130**(37):12501–12513.
- Sadeghian K., Bocola M., Schütz M. (2010) A QM/MM study on the fast photocycle of blue light using flavin photoreceptors in their light-adapted/active form. *Physical Chemistry Chemical Physics* **12**(31):8840–8846.
- Salom D., Cao P., Yuan Y., Miyagi M., Feng Z., Palczewski K. (2015). Isotopic labeling of mammalian G protein-coupled receptors heterologously expressed in *Caenorhabditis elegans*. *Analytical biochemistry*. **472**:30–36.

- Savakis P., De Causmaecker S., Angerer V., Ruppert U., Anders K., Essen L.-O., Wilde A. (2012) Light-induced alteration of c-di-GMP level controls motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803: c-di-GMP controls cyanobacterial phototaxis. *Molecular Microbiology* **85**(2):239–251.
- Scaglia M., Strosselli M., Grazioli V., Gatti S., Bernuzzi A.M., de Jonckheere J.F. (1983) Isolation and identification of pathogenic *Naegleria australiensis* (Amoebida, Vahlkampfiidae) from a spa in northern Italy. *Applied and Environmental Microbiology* **46**(6):1282–1285.
- Scheib U., Stehfest K., Gee C.E., Körschen H.G., Fudim R., Oertner T.G., Hegemann P. (2015) The rhodopsin-guanlyl cyclase of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* enables fast optical control of cGMP signaling. *Science Signaling* **8**(389).
- Schleicher E., Heßling B., Illarionova V., Bacher A., Weber S., Richter G., Gerwert K. (2005) Light-induced reactions of *Escherichia coli* DNA photolyase monitored by Fourier transform infrared spectroscopy: FT-IR on DNA photolyase. *FEBS Journal* **272**(8):1855–1866.
- Schneider F., Grimm C., Hegemann P. (2015) Biophysics of Channelrhodopsin. *Annual Review of Biophysics* **44**:167–186.
- 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*. *Nature Methods* **4**(1):39–42.
- Schroeder C., Werner K., Otten H., Krätzig S., Schwalbe H., Essen L.-O. (2008) Influence of a Joining Helix on the BLUF Domain of the YcgF Photoreceptor from *Escherichia coli*. *ChemBioChem* **9**(15):2463–2473.
- Schuergers N., Lenn T., Kampmann R., Meissner M.V., Esteves T., Temerinac-Ott M., Korvink J.G., Lowe A.R., Mullineaux C.W., Wilde A. (2016) Cyanobacteria use micro-optics to sense light direction. *Elife* **5**:e12620.
- Schwerdtfeger C., Linden H. (2003) VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *The EMBO Journal* **22**(18):4846–4855.
- Senda T., Senda M., Kimura S., Ishida T. (2009) Redox Control of Protein Conformation in Flavoproteins. *Antioxidants & Redox Signaling* **11**(7):1741–1766.
- Shah M.B., Jang H.-H., Wilderman P.R., Lee D., Li S., Zhang Q., Stout C.D., Halpert J.R. (2016) Effect of detergent binding on cytochrome P450 2B4 structure as analyzed by X-ray crystallography and deuterium-exchange mass spectrometry. *Biophysical Chemistry* **216**:1–8.
- Shapiro B.M., Stadtman E.R. (1970) The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. *Annual Reviews in Microbiology* **24**(1):501–524.
- Shedlovsky A.E., Magasanik B. (1962) A defect in histidine biosynthesis causing an adenine deficiency. *Journal of Biological Chemistry* **237**(12):3725–3730.
- Shibata Y., Murai Y., Satoh Y., Fukushima Y., Okajima K., Ikeuchi M., Itoh S. (2009) Acceleration of Electron-Transfer-Induced Fluorescence Quenching upon Conversion to the Signaling State in the Blue-Light Receptor, TePixD, from *Thermosynechococcus elongatus*. *The Journal of Physical Chemistry B* **113**(23):8192–8198.
- Song J.-Y., Cho H.S., Cho J.-I., Jeon J.-S., Lagarias J.C., Park Y.-I. (2011) Near-UV cyanobacteriochrome signaling system elicits negative phototaxis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**(26):10780–10785.
- Spring K.J., Jerlström P.G., Burns D.M., Beacham I.R. (1986) L-asparaginase genes in *Escherichia coli*: isolation of mutants and characterization of the ansA gene and its protein product. *Journal of Bacteriology* **166**(1):135–142.
- Steinocher, H. (2013) FTIR-spektroskopische Untersuchung des isotopenmarkierten *Synechocystis* Photorezeptor 1694. Masterarbeit. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Steiner R.F., Kirby E.P. (1969) Interaction of the ground and excited states of indole derivatives with electron scavengers. *The Journal of Physical Chemistry* **73**(12):4130–4135.

IX. Literaturverzeichnis

- Stelling A.L., Ronayne K.L., Nappa J., Tonge P.J., Meech S.R. (2007) Ultrafast Structural Dynamics in BLUF Domains: Transient Infrared Spectroscopy of AppA and Its Mutants. *Journal of the American Chemical Society* **129**(50):15556–15564.
- Stephenson R.C., Clarke S. (1989) Succinimide formation from aspartyl and asparaginyll peptides as a model for the spontaneous degradation of proteins. *Journal of Biological Chemistry* **264**(11):6164–6170.
- Stier, D. (2014) Heterologe Expression des Blaulichtrezeptors TePixD (Tll0078) aus *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 für temperaturabhängige Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie. Bachelorarbeit. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Stierl, M. (2007) Photochemische und Funktionelle Untersuchung von BLUF-Photorezeptoren. Diplomarbeit. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Stierl M. (2013) Kleine Enzyme mit großer Perspektive. Doktorarbeit. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Stierl M., Penzkofer A., Kennis J.T.M., Hegemann P., Mathes T. (2014) Key Residues for the Light Regulation of the Blue Light-Activated Adenylyl Cyclase from *Beggiatoa* sp. *Biochemistry* **53**(31):5121–5130.
- Stierl M., Stumpf P., Udvari D., Gueta R., Hagedorn R., Losi A., Gärtner W., Petereit L., Efetova M., Schwarzel M., Oertner T.G., Nagel G., Hegemann P. (2011) Light Modulation of Cellular cAMP by a Small Bacterial Photoactivated Adenylyl Cyclase, bPAC, of the Soil Bacterium *Beggiatoa*. *Journal of Biological Chemistry* **286**(2):1181–1188.
- Stolz B., Huber M., Marković-Housley Z., Erni B. (1993) The mannose transporter of *Escherichia coli*. Structure and function of the IIAB^{Man} subunit. *Journal of Biological Chemistry* **268**(36):27094–27099.
- Strauss A., Bitsch F., Cutting B., Fendrich G., Graff P., Liebetanz J., Zurini M., Jahnke W. (2003) Amino-acid-type selective isotope labeling of proteins expressed in Baculovirus-infected insect cells useful for NMR studies. *Journal of Biomolecular NMR* **26**(4):367–372.
- Strickland D., Lin Y., Wagner E., Hope C.M., Zayner J., Antoniou C., Sosnick T.R., Weiss E.L., Glotzer M. (2012) TULIPs: tunable, light-controlled interacting protein tags for cell biology. *Nature Methods* **9**(4):379–384.
- Struve W.S. (1989) Fundamentals of molecular spectroscopy. John Wiley & Sons.
- Subedi K.P., Kim I., Kim J., Min B., Park C. (2008) Role of GldA in dihydroxyacetone and methylglyoxal metabolism of *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiology Letters* **279**(2):180–187.
- Sugimoto Y., Nakamura H., Ren S., Hori K., Masuda S. (2016) Genetics of the Blue Light-Dependent Signal Cascade That Controls Phototaxis in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant and Cell Physiology*:pcw218.
- Suzuki H., Okajima K., Ikeuchi M., Noguchi T. (2008) LOV-Like Flavin-Cys Adduct Formation by Introducing a Cys Residue in the BLUF Domain of TePixD. *Journal of the American Chemical Society* **130**(39):12884–12885.
- Suzuki M., Zhang J., Liu M., Woychik N.A., Inouye M. (2005) Single Protein Production in Living Cells Facilitated by an mRNA Interferase. *Molecular Cell* **18**(2):253–261.
- Takahashi R., Okajima K., Suzuki H., Nakamura H., Ikeuchi M., Noguchi T. (2007) FTIR Study on the Hydrogen Bond Structure of a Key Tyrosine Residue in the Flavin-Binding Blue Light Sensor TePixD from *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochemistry* **46**(22):6459–6467.
- Takahashi H., Shimada I. (2010) Production of isotopically labeled heterologous proteins in non-*E. coli* prokaryotic and eukaryotic cells. *Journal of Biomolecular NMR* **46**(1):3–10.
- Tanaka K., Nakasone Y., Okajima K., Ikeuchi M., Tokutomi S., Terazima M. (2011) Light-Induced Conformational Change and Transient Dissociation Reaction of the BLUF Photoreceptor *Synechocystis* PixD (Slr1694). *Journal of Molecular Biology* **409**(5):773–785.

- Tanaka K., Nakasone Y., Okajima K., Ikeuchi M., Tokutomi S., Terazima M. (2012) Time-Resolved Tracking of Interprotein Signal Transduction: *Synechocystis* PixD–PixE Complex as a Sensor of Light Intensity. *Journal of the American Chemical Society* **134**(20):8336–8339.
- Tanio M., Tanaka R., Tanaka T., Kohno T. (2009) Amino acid-selective isotope labeling of proteins for nuclear magnetic resonance study: Proteins secreted by *Brevibacillus choshinensis*. *Analytical Biochemistry* **386**(2):156–160.
- Tanwar M., Nahar S., Gulati S., Veetil S.K., Kateriya S. (2016) Molecular Determinant Modulates Thermal Recovery Kinetics and Structural Integrity of the Bacterial BLUF Photoreceptor. *FEBS Letters* **590**(14):2146–2157.
- Tanwar M., Stierl M., Veetil S.K., Penzkofer A., Hegemann P., Kateriya S. (2014) Biochemical characterization of photoactivated adenylyl cyclase from *Naegleria gruberi*. *Journal of Proteins & Proteomics* **5**(1).
- Terauchi K., Ohmori M. (2004) Blue light stimulates cyanobacterial motility via a cAMP signal transduction system: Cyanobacterial blue light-cAMP signal transduction. *Molecular Microbiology* **52**(1):303–309.
- Teufel R., Stull F., Meehan M.J., Michaudel Q., Dorrestein P.C., Palfey B., Moore B.S. (2015) Biochemical Establishment and Characterization of EncM's Flavin-N5-oxide Cofactor. *Journal of the American Chemical Society* **137**(25):8078–8085.
- Tiedeman A.A., Smith J.M., Zalkin H. (1985) Nucleotide sequence of the *guaA* gene encoding GMP synthetase of *Escherichia coli* K12. *Journal of Biological Chemistry* **260**(15):8676–8679.
- Tong K.I., Yamamoto M., Tanaka T. (2008) A simple method for amino acid selective isotope labeling of recombinant proteins in *E. coli*. *Journal of Biomolecular NMR* **42**(1):59–67.
- Torii, H., Tatsumi, T., Kanazawa, T., & Tasumi, M. (1998). Effects of intermolecular hydrogen-bonding interactions on the amide I mode of N-methylacetamide: matrix-isolation infrared studies and *ab initio* molecular orbital calculations. *The Journal of Physical Chemistry B*, **102**(1): 309–314.
- Toyooka T., Tanaka K., Okajima K., Ikeuchi M., Tokutomi S., Terazima M. (2011) Macromolecular Crowding Effects on Reactions of TePixD (TII0078). *Photochemistry and Photobiology* **87**(3):584–589.
- Tschowri N., Busse S., Hengge R. (2009) The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*. *Genes & Development* **23**(4):522–534.
- Tyagi A., Penzkofer A., Griese J., Schlichting I., Kirienko N.V., Gomelsky M. (2008) Photodynamics of blue-light-regulated phosphodiesterase BlrP1 protein from *Klebsiella pneumoniae* and its photoreceptor BLUF domain. *Chemical Physics* **354**(1):130–141.
- Udvarhelyi A., Domratcheva T. (2013) Glutamine Rotamers in BLUF Photoreceptors: A Mechanistic Reappraisal. *The Journal of Physical Chemistry B* **117**(10):2888–2897.
- 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. *Journal of the American Chemical Society* **128**(17):5638–5639.
- Unno M., Sano R., Masuda S., Ono T., Yamauchi S. (2005) Light-Induced Structural Changes in the Active Site of the BLUF Domain in AppA by Raman Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* **109**(25):12620–12626.
- Unno M., Tsukiji Y., Kubota K., Masuda S. (2012) N-Terminal Truncation Does Not Affect the Location of a Conserved Tryptophan in the BLUF Domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *The Journal of Physical Chemistry B* **116**(30):8974–8980.
- Van Gilst M., Hudson B.S. (1996) Histidine-tryptophan interactions in T4 lysozyme: “Anomalous” pH dependence of fluorescence. *Biophysical Chemistry* **63**(1):17–25.
- Wacker M., Linton D., Hitchen P.G., Nita-Lazar M., Haslam S.M., North S.J., Panico M., Morris H.R., Dell A., Wren B.W., Aebi M. (2002) N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science* **298**(5599):1790–1793.

IX. Literaturverzeichnis

- Walsh C. (1986) Naturally occurring 5-deazaflavin coenzymes: biological redox roles. *Accounts of Chemical Research* **19**(7):216–221.
- Warscheid B., Brucker S., Kallenbach A., Meyer H.E., Gerwert K., Kötting C. (2008) Systematic approach to group-specific isotopic labeling of proteins for vibrational spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* **48**(1):28–36.
- Waugh D.S. (1996) Genetic tools for selective labeling of proteins with α - ^{15}N -amino acids. *Journal of biomolecular NMR* **8**(2):184–192.
- Weber S., Schroeder C., Kacprzak S., Mathes T., Kowalczyk R.M., Essen L.-O., Hegemann P., Schleicher E., Bittl R. (2011) Light-generated Paramagnetic Intermediates in BLUF Domains. *Photochemistry and Photobiology* **87**(3):574–583.
- Weinberg D.R., Gagliardi C.J., Hull J.F., Murphy C.F., Kent C.A., Westlake B.C., Paul A., Ess D.H., McCafferty D.G., Meyer T.J. (2012) Proton-Coupled Electron Transfer. *Chemical Reviews* **112**(7):4016–4093.
- Wells T.A., Nakazawa M., Manabe K., Song P.S. (1994) A conformational change associated with the phototransformation of Pisum phytochrome A as probed by fluorescence quenching. *Biochemistry* **33**(3):708–712.
- Wieczorek R., Dannenberg J.J. (2003) Hydrogen-Bond Cooperativity, Vibrational Coupling, and Dependence of Helix Stability on Changes in Amino Acid Sequence in Small 3_{10} -Helical Peptides. A Density Functional Theory Study. *Journal of the American Chemical Society* **125**(46):14065–14071.
- Wijaya I.M.M., Zhang Y., Iwata T., Yamamoto J., Hitomi K., Iwai S., Getzoff E.D., Kandori H. (2013) Detection of Distinct α -Helical Rearrangements of Cyclobutane Pyrimidine Dimer Photolyase upon Substrate Binding by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biochemistry* **52**(6):1019–1027.
- Wilson A., Punginelli C., Gall A., Bonetti C., Alexandre M., Routaboul J.-M., Kerfeld C.A., van Grondelle R., Robert B., Kennis J.T.M., Kirilovsky D. (2008) A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(33):12075–12080.
- Winkler A., Heintz U., Lindner R., Reinstein J., Shoeman R.L., Schlichting I. (2013) A ternary AppA–PpsR–DNA complex mediates light regulation of photosynthesis-related gene expression. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**(7):859–867.
- Wolpert M., Hellwig P. (2006) Infrared spectra and molar absorption coefficients of the 20 alpha amino acids in aqueous solutions in the spectral range from 1800 to 500 cm^{-1} . *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **64**(4):987–1001.
- Wu Q., Gardner K.H. (2009) Structure and Insight into Blue Light-Induced Changes in the BlrP1 BLUF Domain. *Biochemistry* **48**(12):2620–2629.
- Wu Q., Ko W.-H., Gardner K.H. (2008) Structural Requirements for Key Residues and Auxiliary Portions of a BLUF Domain. *Biochemistry* **47**(39):10271–10280.
- Xiang L., Kalaitzis J.A., Moore B.S. (2004) EncM, a versatile enterocin biosynthetic enzyme involved in Favorskii oxidative rearrangement, aldol condensation, and heterocycle-forming reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(44):15609–15614.
- Xiao H., Peters F.B., Yang P.-Y., Reed S., Chittuluru J.R., Schultz P.G. (2014) Genetic Incorporation of Histidine Derivatives Using an Engineered Pyrrolysyl-tRNA Synthetase. *ACS Chemical Biology* **9**(5):1092–1096.
- Yamamoto A., Iwata T., Sato Y., Matsuoka D., Tokutomi S., Kandori H. (2009) Light Signal Transduction Pathway from Flavin Chromophore to the $\text{J}\alpha$ Helix of *Arabidopsis* Phototropin1. *Biophysical Journal* **96**(7):2771–2778.
- Yang S.Y., Schulz H. (1983) The large subunit of the fatty acid oxidation complex from *Escherichia coli* is a multifunctional polypeptide. Evidence for the existence of a fatty acid oxidation operon (fad AB) in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **258**(16):9780–9785.

- Yasukawa H., Konno N., Haneda Y., Yamamori B., Iseki M., Shibusawa M., Ono Y., Kodaira K., Funada H., Watanabe M. (2012) Photomanipulation of antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Escherichia coli* heterologously expressing photoactivated adenylyl cyclase. *The Journal of general and applied Microbiology* **58**(3):183–190.
- Yasukawa H., Sato A., Kita A., Kodaira K., Iseki M., Takahashi T., Shibusawa M., Watanabe M., Yagita K. (2013) Identification of photoactivated adenylyl cyclases in *Naegleria australiensis* and BLUF-containing protein in *Naegleria fowleri*. *The Journal of general and applied Microbiology* **59**(5):361–369.
- Yoshihara S., Ikeuchi M. (2004) Phototactic motility in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Photochemical & Photobiological Sciences* **3**(6):512–518.
- Yoshihara S., Katayama M., Geng X., Ikeuchi M. (2004) Cyanobacterial phytochrome-like PixJ1 holoprotein shows novel reversible photoconversion between blue- and green-absorbing forms. *Plant and Cell Physiology* **45**(12):1729–1737.
- 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.
- Yuan H., Bauer C.E. (2008) PixE promotes dark oligomerization of the BLUF photoreceptor PixD. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(33):11715–11719.
- Yuan H., Dragnea V., Wu Q., Gardner K.H., Bauer C.E. (2011) Mutational and Structural Studies of the PixD BLUF Output Signal That Affects Light-Regulated Interactions with PixE. *Biochemistry* **50**(29):6365–6375.
- Zirak P., Penzkofer A., Hegemann P., Mathes T. (2007a) Photo dynamics of BLUF domain mutant H44R of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *Chemical Physics* **335**(1):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. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **86**(1):22–34.
- Zirak P., Penzkofer A., Mathes T., Hegemann P. (2009) Absorption and emission spectroscopic characterization of BLUF protein Slr1694 from *Synechocystis sp.* PCC6803 with roseoflavin cofactor. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **97**(2):61–70.
- Zirak P., Penzkofer A., Schiereis T., Hegemann P., Jung A., Schlichting I. (2005) Absorption and fluorescence spectroscopic characterization of BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *Chemical Physics* **315**(1):142–154.
- Zirak P., Penzkofer A., Schiereis T., Hegemann P., Jung A., Schlichting I. (2006) Photodynamics of the small BLUF protein BlrB from *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **83**(3):180–194.
- Zoltowski B.D., Gardner K.H. (2011) Tripping the Light Fantastic: Blue-Light Photoreceptors as Examples of Environmentally Modulated Protein–Protein Interactions. *Biochemistry* **50**(1):4–16.

X. Danksagung

“No one can whistle a symphony.

It takes a whole orchestra to play it.”

(Halford E. Lucckock)

Auch zum Gelingen dieser Arbeit haben eine ganze Reihe Menschen beigetragen, denen ich sehr dankbar bin. Allen voran Dr. Tilo Mathes und Prof. Dr. Peter Hegemann, Initiatoren, Diskussionsleiter, Richtungsgeber, Mitexperimentierer dieses Projektes. Dr. Mathes verdanke ich darüber hinaus die FT-IR LmD-Differenzspektren des $u^{13}C$ -, $i^{13}C$ -, $s^{15}N5$ -RF und $s^{13}C2$ -RF-markierten PixDs, die eine so umfassende Analyse der Banden erst ermöglichten.

Den Gutachtern gilt mein Dank für ihre Bereitschaft zur Bewertung dieser Arbeit.

The FT-IR measurements were done in the group of Dr. John T.M. Kennis, and did not only receive scientific but also financial support from the LaserLab Europe. Special thanks go to Henny van Roon, who carefully stored each protein sample after their journey to Amsterdam and introduced me to the Biochemical Lab. She and Bart (the technician) were also the saviors after a power break down. Many thanks to Jörn Weißenborn, who put so much effort in the time-resolved set-up for measurements that sadly never happened, and Yusaka Hontani for the wonderful advice to visit a Japanese hanabi during my Tokyo trip. Alberto Natali was always helpful and open for questions, although he did not even belong to Dr. Kennis' group – Thanks a lot.

Besonderer Dank gilt auch Dr. Sebastian Beck und David Benda, für die massenspektrometrische Analyse unzähliger Proben, unermüdliches Simulieren der unmöglichsten Streuungsmuster, für ein stets offenes Ohr und die geduldige Beantwortung aller Fragen.

Einen essentiellen Beitrag lieferten die Arbeiten von Roman Fudim und Dr. Florian Richter. Roman Fudim legte mit der Herstellung und der Analyse der Q50A Mutante den Grundstein für die zeitaufgelösten Messungen an der Q50A-W91A-Doppelmutante. Dr. Richter half nicht nur stets bei Fragen zu PyMOL und verschiedenen Rechnungen, mein Dank gilt auch seiner Beteiligung an den Imidazol-Messungen und der Simulation des +1 $\beta 5\beta 2$ -Registershifts. Dank Thomas Berthold, Dr. Erik Schleicher und Dr. Stefan Weber erhielten wir einen näheren Einblick in die Radikale der Q50A-Mutante.

Ebenso dankbar bin ich für die Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Andreas Möglich und seiner ehemaligen, berliner Arbeitsgruppe, die kritische Impulse mit einem unfassbaren Wissensschatz setzte. Diese Kooperation machte die nähere Analyse des Imidazoleffektes, mit dem von Dr. Florian Richter, Ulrike Scheib und Jonas Wietek entwickelten Add-On für den Tecan Plate Reader, erst möglich. Außerdem ertrugen sie mich als Dauergast für die Wachstumsmessungen.

Auch bei den Studenten, die mich durch meine Doktorandenzeit begleitet haben, bedanke ich mich recht herzlich. Helena Steinochers Arbeit brachte dabei wertvollen Aufschluss über fehlende Änderungen an den Asparaginen sowie Isotopenstreuung, während Tom Lindtner den Tryptophanase-defizienten Stamm und die inverse W91-Markierung herstellte. Besonderer Dank gilt Deborah Stier und Kathrin Glaß für die tolle Zusammenarbeit, spannende Tage in Amsterdam und Vieles mehr.

X. Danksagung

Obwohl die Ergebnisse ihrer Bemühungen in dieser Arbeit leider nicht untergekommen sind haben Dr. Jacek Kozuch und Dr. Matthias Broser Begeisterung, Aufwand und Fachkenntnisse geteilt, sodass die Ergebnisse zumindest an dieser Stelle honoriert werden sollen. Dasselbe gilt für Prof. Dr. Matthias Mack und seine Arbeitsgruppe, insbesondere Christian Kühm, die mir viel Zeit, Informationen und ein offenes Ohr schenkten. Ihnen verdanke ich eine großartige Woche in Mannheim.

Von Dr. Monika Heilmann und Dr. Manuela Stierl erhielt ich die Plasmide zur Expression von AtUVR8 und bPAC sowie wertvolle Hinweise und Ratschläge, für die ich mich bedanken möchte.

Der Gruppe von Prof. Dr. Hegemann gebührt mein Dank für eine tolle Arbeitsatmosphäre, jederzeit offene Türen, ihren großartigen Humor, der auch durch so manche dunkle Stunde half, ein schier unerschöpfliches Maß an Hilfsbereitschaft und Wissen, und noch viele kleine und große Dinge die weitere 100 Seiten füllen könnten. Vielen Dank an Christina Schnick, Maila Reh, Heide Evers, Margrit Michalsky, Thao Ngyuen und Tharsana Tharmalingam. Ebenso an die „Kellerkinder“ und starken Jungs Dr. André Greiner, Dr. Carlos Gasser, Simon Kelterborn, Benjamin Krause und Roman Fudim. Vielen Dank für die vielen schönen Bürostunden auch an Dr. Julia Moldt und Dr. Lina Sciesielski. Bedanken möchte ich mich ebenso bei Christiane Grimm, Dr. Irina Sizova, Ulrike Scheib, Dr. Franziska Schneider, Dr. Kyoko und Satoshi Tsunoda, Dr. Matthias Broser, Dr. Eglolf Ritter, Johannes Vierock, Arend Vogt und Jonas Wietek. *It is really sad that we could not share more coffee breaks and discussions! Thank you so much, Arita Silapeter and Dr. Shatanik Mukherjee.*

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Angela Piater, Cora Berniol und Dr. Wiebke Apel für ihre rundumsorglos-Organisation bedanken, in der man sich jederzeit gut aufgehoben fühlte.

Für Chemikalienspenden, *Device-Sharing*, freundliche Worte im Flur, intensivere Gespräche bei Kaffee und erinnernswerte Weihnachtsfeiern danke ich außerdem den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Klipp und Prof. Dr. Herrmann.

Ein großes Dankeschön gilt Dr. Lina Sciesielski, Anja Heinz, Meike Luck und Roman Fudim, deren Ratschläge und Kommentare diese Arbeit ein gutes Stück sinnvoller und lesbarer machten.

Melanie Meiworm hat mich als Büroplatz- und *Bench*-Nachbarin begleitet. Ihr danke ich für eine kleine Kräuterkunde, die javanische Samtpflanze, ihre Objektivität und Ehrlichkeit, ihre gute Laune und Beharrlichkeit sowie für ihre Unterstützung bei der Studentenbetreuung.

Anja Heinz und Meike Luck teilten mit mir die Leiden missglückter Experimente, undurchschaubarer Ergebnisse, des Schreibens und Schreibens und Schreibens... . Ohne die vielen Gespräche und Telefonate, Kaffees und Kekse hätte ich die Zeit nicht überstanden. Stets ein aufmunterndes Wort hatte auch Dr. Peter Müller. Vielen Dank dafür.

Zu Guter letzt, das Fundament auf dem alles steht: Basti und meine Familie gewährten mir stets einen anderen Blickwinkel, warteten geduldig, mit unendlichem Optimismus und unerschöpflichem Glauben. Von Herzen Danke für so Vieles, das nicht in Worte gefasst werden kann.